

Regulation und Funktion von Homeobox- Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe – Universität
in Frankfurt am Main

von
Jens-Florian Diehl
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2006
(D30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. Rüdiger Wittig

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Stefanie Dimmeler

Datum der Disputation:.....

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2003 bis November 2006 an der Universitätsklinik der Johann Wolfgang Goethe – Universität in der Abteilung für Molekulare Kardiologie der Medizinischen Klinik III unter Leitung von Frau Prof. Dr. Stefanie Dimmeler und Herrn Prof. Dr. Andreas M. Zeiher angefertigt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Stefanie Dimmeler für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und ihr großes Engagement bei der Betreuung dieser Arbeit. Ihre vielen kreativen Anregungen und Ideen haben maßgeblichen Einfluss auf das Gelingen dieser Arbeit gehabt.

Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz danke ich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit sowie für ihre Hilfestellung und persönlichen Ratschläge während meines Studiums und meiner Doktorarbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Carmen Urbich und Herrn Dr. Lothar Rössig für ihre Unterstützung bei der Planung und konzeptionellen Umsetzung von Projekten im Rahmen dieser Arbeit bedanken.

Iris Stügelmaier, Andrea Knau, Nicole Konecny und Dorit Lüthje möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung und die angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit danken. Auch möchte ich mich bei meinen Laborgenossen Tom Brühl, Thomas Ziebart, Angelika Kühbacher, Corina Schütz, Gigi Carmona und Dörte Scharner für viel gemeinsamen Spaß bedanken. Allen Mitarbeitern der Molekularen Kardiologie hiermit nochmal ein ganz herzliches Dankeschön.

Nicht zuletzt noch mein ganz besonderer Dank an meine Freundin Manuela, Niels, Thomas und Rene, die immer mit Rat und Tat für mich da waren sowie meinen Eltern, für ihre warmherzige Unterstützung.

Während der Zeit dieser Arbeit wurden folgende Arbeiten mit eigener Beteiligung zur Publikation eingereicht oder publiziert:

Diehl F., Rössig L., Zeiher AM., Dimmeler S., Urbich C. (2006)

The histone methyltransferase MLL is an upstream regulator of endothelial cell sprout formation.

Blood, 17.Okt. 2006 [Epub ahead of print].

Rössig L., Urbich C., Brühl 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. (2005)

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

J Exp Med 201(11):1825-35.

Haendeler J., Hoffmann J., **Diehl JF.**, Vasa M., Spyridopoulos I., Zeiher AM., Dimmeler S. (2004)

Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells.

Circ Res 94(6):768-75.

1. Einleitung	1
1.1. Das Blutgefäßsystem.....	1
1.1.1. Entstehung des Blutgefäßsystems	1
1.1.2. Aufbau des Blutgefäßsystems.....	2
1.1.3. Das Endothel und seine Funktionen.....	3
1.2. Die Familie der Homeobox-Transkriptionsfaktoren.....	5
1.2.1. Strukturelle Organisation von Hox-Transkriptionsfaktoren	6
1.2.2. Entwicklungsbiologische Funktionen von Hox-Transkriptions-faktoren	7
1.2.3. Rolle von Hox-Transkriptionsfaktoren im adulten Organismus.....	8
1.2.3.1. HoxD3.....	9
1.2.3.2. HoxA9	10
1.2.3.3. HoxB4	10
1.2.3.4. HoxB5.....	11
1.3. Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren.....	13
1.3.1. Transkriptionelle Regulation von Hox-Genen	13
1.3.1.1. Die Histon-Methyltransferase MLL.....	14
1.3.2. Posttranskriptionelle Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren	15
1.3.2.1. Hox Co-Faktoren	15
1.3.2.2. Regulation der Hox-Lokalisation	18
1.4. Fragestellung.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Verwendete Zellen.....	21
2.2. Nährmedien	21
2.3. Kultivieren von Endothelzellen.....	22
2.4. Kultivieren von humanen embryonalen Nieren Epithelzellen (HEK293)	22
2.6. Plasmidpreparation.....	24
2.7. Isolation von RNA aus Säugerzellen	24
2.8. RT-PCR und <i>real-time</i> PCR.....	24
2.9. Protein-Isolation aus Säugerzellen	26
2.10. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz	26
2.11. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
2.12. Transfer von Proteinen (Western-Blot)	27

2.13. Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen	27
2.14. Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Proteinen	28
2.15. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	29
2.16. Transfektion von Zellen mit Oligonukleotiden	30
2.17. Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA	31
2.18. Bestimmung der Proliferation reifer Endothelzellen	31
2.19. Messung der Apoptoserate reifer Endothelzellen	33
2.20. Luciferase-Reporter-Gen-Assay	34
2.21. Bestimmung der migratorischen Kapazität reifer Endothelzellen mittels „ <i>Scratched Wound</i> “ Assay	35
2.22. In vitro Matrigel Assay	36
2.23. Der Sphäroid-Assay	36
2.24. <i>Shear Stress</i> Exposition	37
2.25. Statistik	38
3. Ergebnisse	39
3.1. Analyse der Expression von Hox-Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Zelltypen	39
3.2. Untersuchung der Funktion verschiedener Hox-Transkriptions-faktoren in Endothelzellen	42
3.2.1. Der Hox-Transkriptionsfaktor HoxB5 beeinflusst die Morphologie von Endothelzellen	43
3.2.2. Einfluss von Hox-Transkriptionsfaktoren auf die in vitro Gefäßbildung	45
3.2.3. Einfluss von Hox-Transkriptionsfaktoren auf das Sprouting von Endothelzellen	47
3.2.4. Untersuchung von Proliferation und Apoptose	48
3.2.5. Regulation der eNOS durch Hox-Transkriptionsfaktoren	49
3.3. Regulation der Hox Transkriptionsfaktoren.....	50
3.3.1. Untersuchung der intrazellulären Hox-Lokalisation	51
3.3.2. Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren durch Co-Faktoren.....	52
3.3.2.1. Differentielle Expression von Hox Co-Faktoren der Meis- und PBX-Familie	53
3.3.2.2. Der Hox Co-Faktor Meis1 wird in HUVEC aktiv degradiert.....	54

3.3.2.3. Die HoxA9-vermittelte Induktion des eNOS Promoters wird durch Meis1 moduliert.....	57
3.3.3.1. Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren durch laminare Schubspannung	59
3.3.3.2. <i>Shear Stress</i> reguliert die Histon-Methyltransferase MLL.....	60
3.4. Die Rolle der Histon-Methyltransferase MLL im Kontext endothelialer Zellfunktionen	61
3.4.1. Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren durch MLL.....	65
3.4.2. Die Promotoren von HoxA9 und HoxD3 sind Ziel von Histon H3 Lysin 4 Methylierung	67
3.4.3. Funktionelle Relevanz von Hox-Transkriptionsfaktoren als regulatorische Zielgene von MLL	68
3.4.4. MLL reguliert die Endothelzell-Migration über HoxA9 und EphB4	69
3.4.5. Funktionelle Rolle von HoxD3 im Kontext der Endothelzell-Migration.....	71
3.4.6. Die Rolle von HoxA9 und HoxD3 im Kontext des MLL-abhängigen Sprouting von Endothelzellen	72
4. Diskussion	75
4.1. Auswahl von Hox-Transkriptionsfaktoren zur funktionellen Analyse.....	75
4.2. Die Bedeutung von Hox-Transkriptionsfaktoren für endotheliale Zellfunktionen	77
4.3. Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen durch Co-Faktoren, Lokalisation und <i>Shear Stress</i>	82
4.4. Die Regulation angiogener Endothelzell-Funktionen durch die Histon-Methyltransferase MLL	86
4.4.1. Epigenetische Genregulation durch <i>Shear Stress</i>	86
4.4.2. Regulation von Hox-Genen durch die Histon-Methyltransferase MLL.....	87
4.4.3. Bedeutung der SET-vermittelten Methylierung von H3K4 für die transkriptionelle Regulation von HoxA9 und HoxD3	89
4.4.4. Funktionelle Bedeutung von MLL für Endothelzell-Funktionen.....	91
5. Zusammenfassung.....	95
6. Abkürzungsverzeichnis	97
7. Literatur.....	99

1. Einleitung

1.1. Das Blutgefäßsystem

In Wirbeltieren stellt das Blutgefäßsystem neben dem lymphatischen System eines von zwei evolutionär entstandenen Netzwerken dar, die gemeinsam zur funktionellen Integrität des Kreislaufs beitragen. Hierbei dient das Blutgefäßsystem der Versorgung des Organismus mit Nährstoffen und Sauerstoff, dem Transport einer Vielzahl von Signalmolekülen und spezialisierten Zellen sowie der Entgiftung durch Abtransport und Austausch von Abfallprodukten. Das lymphatische System ist Teil der körpereigenen Immunabwehr und reguliert die Rückführung von Gewebswasser (Harvey and Oliver, 2004).

1.1.1. Entstehung des Blutgefäßsystems

Die Entstehung des Blutgefäßsystems ist in zwei Phasen unterteilt (Abb. 1.1). Während der Vaskulogenese kommt es in situ zur Differenzierung von frühen Vorläuferzellen, den so genannten Hemangioblasten, hin zu Angioblasten. Für die Vaskulogenese ist der VEGF-Rezeptor *Flk1* (KDR) von essentieller Bedeutung. So resultiert der genetische Knockout von *Flk1* in einem Fehlen endothelialer und hämatopoetischer Zellen und damit verbundener Letalität zwischen E8,5 und E9,5 in der Maus (Shalaby et al., 1995). Zu den transkriptionellen Regulatoren dieses Prozesses zählt unter anderem der Homeobox (Hox-) Transkriptionsfaktor HoxB5, der als direkter Induktor der *Flk1*-Expression wirkt (Wu et al., 2003). Die Familie der Hox-Transkriptionsfaktoren soll in den folgenden Kapiteln noch ausführlich behandelt werden. Ausgehend vom Angioblasten kommt es zur Differenzierung in arterielle oder venöse Endothelzellen (Abb. 1.1). Durch Proliferation, gerichtete Migration und Anlagerung der Zellen aneinander, kommt es zur Lumen-Ausbildung und Entstehung der ersten Gefäßstrukturen. Während der

Angiogenese findet in einem sekundären Prozess, ausgehend vom primär gebildeten vaskulären Plexus, die Ausbildung eines verzweigten Netzwerks großer und kleiner Gefäße durch Aussprossen bereits differenzierter Endothelzellen statt (Coffin and Poole, 1988; Kamei et al., 2006; Risau, 1997; Risau et al., 1988).

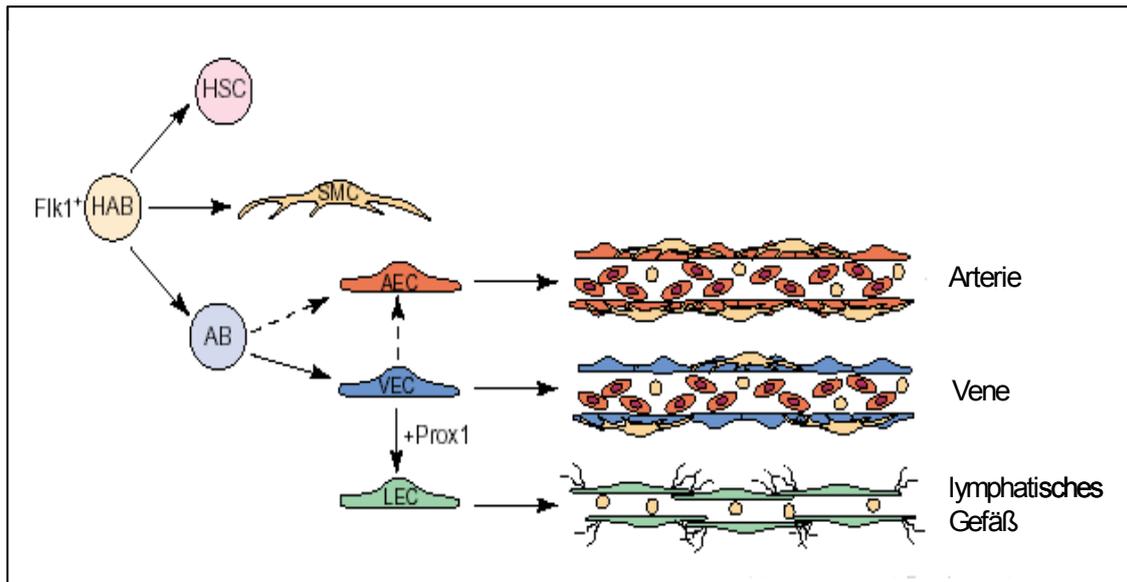


Abb. 1.1. Entstehung des Blutgefäßsystems. Aus dem $Fik1^+$ Hemangioblast (HAB) gehen die hämatopoetischen Stammzellen (HSC), die glatten Muskelzellen der Gefäßwand (SMC) sowie der Angioblast (AB) hervor. Der Angioblast besitzt das Potential zur Differenzierung in arterielle (AEC) und venöse Endothelzellen (VEC), wobei es vermutlich primär zur Differenzierung in venöse Endothelzellen kommt, aus denen dann arterielle- und lymphatische Endothelzellen hervorgehen. Modifiziert nach Harvey & Oliver, 2004 (Harvey and Oliver, 2004)

1.1.2. Aufbau des Blutgefäßsystems

Das Blutgefäßsystem ist hierarchisch in große Gefäße (die Arterien und Venen) sowie kleine, stark verzweigte Kapillaren (die Arteriolen und Venolen) unterteilt (Abb. 1.2). Die großen Gefäße des Körpers setzen sich alle aus jeweils drei spezialisierten Schichten zusammen. Luminal bildet eine geschlossene Schicht

von Endothelzellen die Intima, gefolgt von der aus glatten Muskelzellen bestehenden Media und umgeben von einer aus Fibroblasten, extrazellulärer Matrix und elastischer Lamina bestehenden Adventitia (Jain, 2003). Große und kleine Gefäße des Körpers unterscheiden sich vor allem in Zusammensetzung und Ursprung der die Gefäßwand umgebenden stabilisierenden Zellen, welche abhängig von der Gefäßlokalisierung und Funktion ist (Jain, 2003).

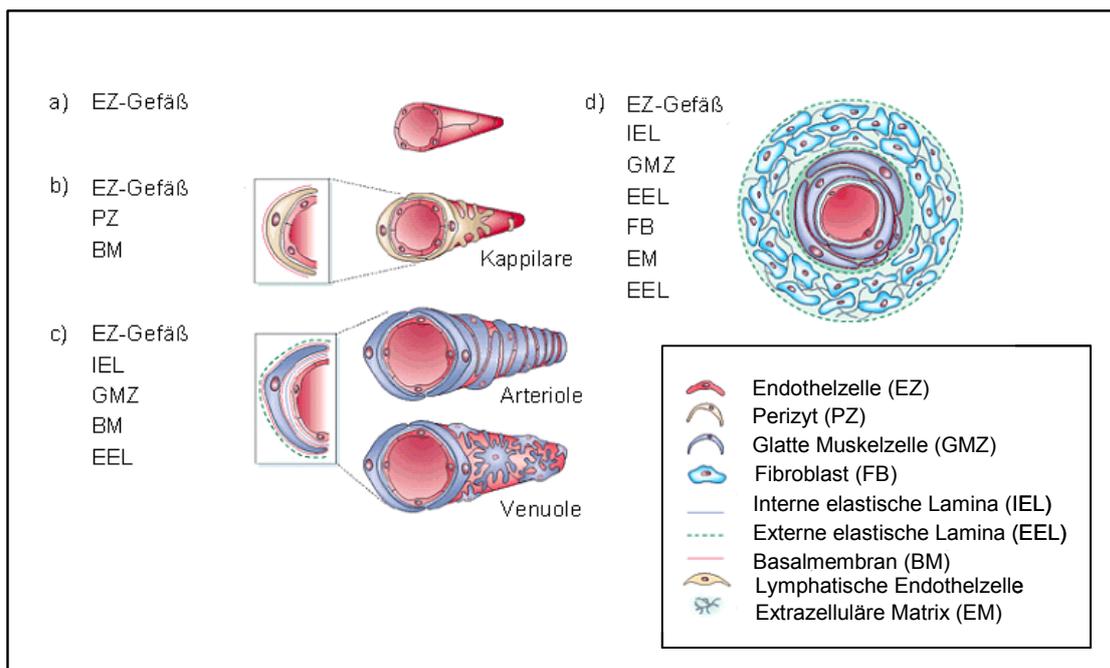


Abb. 1.2. Struktureller Aufbau der Gefäße des vaskulären Systems. A) Entstehendes Gefäß. B) Kapillare. C) Arteriolen & Venuolen. D) Aufbau der großen Arterien und Venen. Modifiziert nach Jain, 2003 (Jain, 2003).

1.1.3. Das Endothel und seine Funktionen

Das Endothel kleidet sämtliche Gefäße des Blutgefäßsystems aus und bildet somit die luminale Barriere zwischen Blutstrom und den Geweben und Organen des Körpers (Ross, 1995). Aufgrund seiner zum Blutstrom exponierten Lage, kommen den Zellen des Endothels neben der protektiven Barrierefunktion zusätzliche wichtige biologische Funktionen zu. So dient das Endothel dem selektiven Transport von Nährstoffen und bioaktiven Signalmolekülen bis hin

zur Attraktion und interzellulären Passage von im Blutstrom zirkulierenden Zellen (Cines et al., 1998). Durch Synthese des vasoaktiven Gases Stickstoffmonoxid (NO) über die endotheliale NO-Synthase (eNOS), reguliert das Endothel auch den Gefäßtonus vermittelt durch die umliegenden glatten Muskelzellen. Somit ist es ein wichtiger Regulator des Blutflusses (Palmer et al., 1987). Die Vielzahl der endothelialen Funktionen und deren enorme Bedeutung für den Organismus machen eine funktionelle Interaktion des Endothels mit dem umgebenden Milieu unabdingbar. Diese Interaktion beinhaltet auch die Fähigkeit zur Transduktion äußerer Stimuli und Reaktion durch Modulation des Expressionsmusters verschiedener Gene (Lehoux et al., 2006). Zu den wichtigsten externen Stimuli, welchen das Endothel unter physiologischen Bedingungen permanent ausgesetzt ist, zählt die laminare Schubspannung (engl.: *shear stress*). Veränderungen im Flussprofil des Blutstromes werden vom Endothel wahrgenommen und haben einen direkten Einfluss auf die Biologie der Gefäßwand (Harrison et al., 2006; Lehoux et al., 2006). Die Signaltransduktion erfolgt hierbei mutmaßlich über die simultane Aktivierung membranständiger Proteine wie Rezeptoren und Ionenkanälen, die zu einer Initiation intrazellulärer Signaltransduktionswege führen (Chien et al., 1998). Hierbei scheinen insbesondere Zell-Matrix Adhäsionsproteine der Integrin-Familie eine wichtige Rolle einzunehmen, da diese u.a. die Transformation mechanischer Kräfte in biochemische Signale vermitteln (Wang et al., 1993). Physiologischer *Shear Stress* ist einer der wichtigsten atheroprotektiven Stimuli. So bilden sich atherosklerotische Plaques bevorzugt in Gefäßregionen, die ein langsames oszillierendes Flussprofil aufweisen, während solche Regionen, die einem stetigen laminaren Fluss ausgesetzt sind, vor einer Bildung von Läsionen geschützt sind (Malek et al., 1999). Die Synthese von NO ist dabei einer der Schlüsselmediatoren des atheroprotektiven Effektes von *Shear Stress* (Dimmeler et al., 1996).

1.2. Die Familie der Homeobox-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der Homeobox (Hox-) Transkriptionsfaktoren ist durch eine hoch konservierte DNA-Bindungsdomäne charakterisiert. Die so genannte Homeodomäne umfasst 60-Aminosäuren und bildet strukturell ein Helix-Turn-Helix DNA-Bindemotiv, welches Zielensequenzen der Konsensus-Sequenz 5'-TTNAT-3' (wobei die dritte Base abhängig vom jeweiligen Hox-Protein abhängig ist) bindet (Affolter et al., 1990; Ekker et al., 1991). Strukturell weist die Homeodomäne große Ähnlichkeit mit den prokaryotischen Transkriptionsfaktoren Cro, CAP oder dem λ -Repressor auf (Scott et al., 1989). Ursprünglich gefunden wurde diese Familie von Transkriptionsfaktoren anhand von Mutationen in der axialen Körperbau-Segmentierung bei der Fruchtfliege *Drosophila* (Abb. 1.3) (McGinnis and Krumlauf, 1992). Bis zum heutigen Tag konnten Mitglieder der Hox-Familie auch in allen untersuchten Vertebraten nachgewiesen werden (Akam, 1989; Levine et al., 1984). Die Mitglieder der Hox-Transkriptionsfaktoren besitzen eine große Homologie zwischen *Drosophila* und Vertebraten, die hauptsächlich auf der Homeodomäne basiert, jedoch gibt es auch einige Hox-Gene, deren Homologie über dies hinaus auf konservierte Bereiche außerhalb der Homeodomäne ausgeweitet ist (Graham et al., 1988).

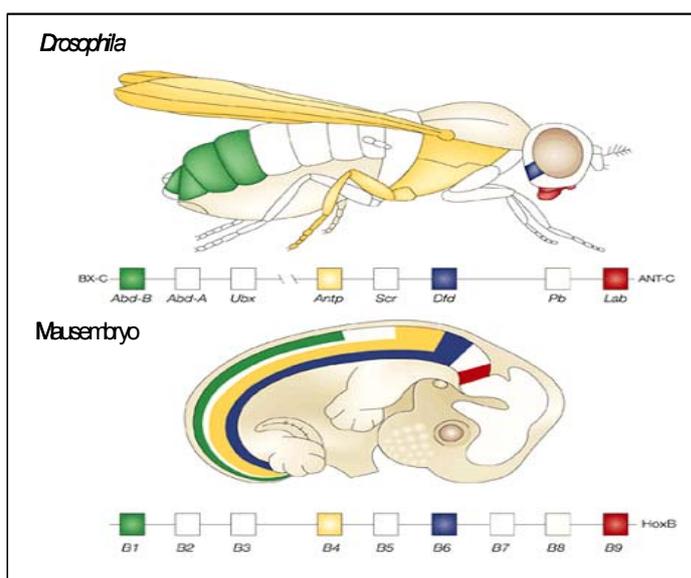


Abb. 1.3. Schematische Darstellung der Beziehung zwischen Hox-Genen und der axialen Körpersegmentierung in *Drosophila* und Säugetieren (Modifiziert nach Abate-Shen, 2002) (Abate-Shen, 2002).

1.2.1. Strukturelle Organisation von Hox-Transkriptionsfaktoren

Drosophila Melanogaster besitzt 8 Homeobox-Gene die als Cluster im Genom angeordnet sind und zusammen als homeotischer Komplex HOM-C bezeichnet werden (Akam, 1989). In der Maus und im Menschen haben sich evolutionär durch Genduplikationen 4 ungekoppelte Hox-Cluster (A-D) entwickelt, welche sich im Menschen auf die Chromosomen 2, 6, 11 und 15 verteilen. Jeder dieser 4 Cluster enthält zwischen 9 und 13 Hox-Gene, was in einer Gesamtzahl von 39 bekannten Hox-Genen im Menschen resultiert (Abb. 1.4) (Kosaki et al., 2002; Krumlauf, 1994). Aufgrund der genetischen Duplikation können Hox-Transkriptionsfaktoren bis zu 3 genetische Paraloge besitzen, was zu einer gewissen genetischen Redundanz führt (Hunt et al., 1991). Die Hox-Gene des HOM-C Komplexes sind chromosomal parallel zu ihrer Expression entlang der Körperachse des Embryos von anterior nach posterior angeordnet. Diese Beziehung zwischen der Anordnung der Gene und ihrem Expressionsmuster wird als Kolinearität bezeichnet (Lewis, 1978). Während der frühen Embryonalentwicklung kommt es hierbei zunächst zur Expression der am weitesten 3'-gelegenen Hox-Gene, die für die rostral gelegenen Körpersegmente kodieren, während die an 5'-gelegenen caudal-kodierenden Hox-Gene erst später exprimiert werden (Mlodzik et al., 1988). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem Transkriptionsfaktor *Antennapedia* in *Drosophila*, werden beim Menschen Hox-Transkriptionsfaktoren der Gruppen 1-8 der *Antennapedia*-Klasse (ANTP-Klasse) zugeordnet. Diese größte Klasse von Hox-Transkriptionsfaktoren zeichnet sich neben ihrer Homeodomäne, durch den Besitz einer zusätzlichen Protein-Interaktionsdomäne aus. Über die als Hexapeptid-Sequenz bezeichnete Domäne wird eine Interaktion mit anderen Hox-Transkriptionsfaktoren ermöglicht (Acampora et al., 1989). Die Gruppen 9-13 zeigen größere Ähnlichkeit mit dem *Drosophila* Transkriptionsfaktor Abdominal-B und werden daher zur ABD-B Klasse zusammengefasst (Acampora et al., 1989). Für HoxA9 konnte gezeigt werden, dass dieses ebenso wie die Mitglieder der ANTP-Klasse von Hox-Transkriptionsfaktoren über eine Hexapeptid-Sequenz verfügt, die sich jedoch strukturell stark von der

Hexapeptid-Sequenz der Hox-Paraloge 1-8 unterscheidet und es zu einer Interaktion mit dem PBC-Familien Mitglied PBX1 befähigt (LaRonde-LeBlanc and Wolberger, 2003). Kennzeichen aller ABD-B Proteine, die zu einer Interaktion mit Mitgliedern der PBC-Familie in der Lage sind, ist eine aus drei Aminosäuren bestehende „Linker“-Sequenz (LaRonde-LeBlanc and Wolberger, 2003).

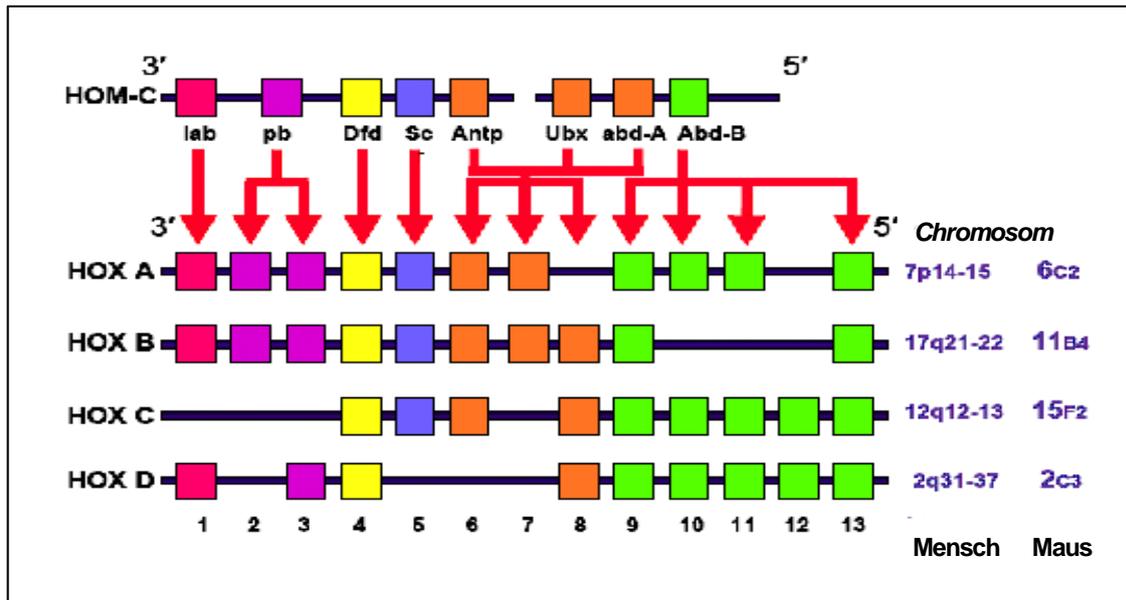


Abb. 1.4. Struktureller Aufbau der Hox-Cluster (modifiziert) (Lappin et al., 2006) Hox-Gene sind horizontal entsprechend ihrer physikalischen Anordnung auf den Chromosomen und vertikal anhand ihrer größten Homologie zueinander dargestellt.

1.2.2. Entwicklungsbiologische Funktionen von Hox-Transkriptionsfaktoren

Hinweise zur Funktion von Hox-Transkriptionsfaktoren in höheren Vertebraten wurden bisher meist durch gezielten genetischen Knockout einzelner oder mehrerer Hox-Gene, vor allem in der Maus oder dem Krallenfrosch *Xenopus laevis*, erhalten. Der Verlust eines einzelnen Hox-Transkriptionsfaktors zeigt hier wesentlich mildere entwicklungsbiologische Defekte, als es bei *Drosophila* der Fall ist. Ein Phänomen das mit großer Wahrscheinlichkeit auf die zuvor erwähnte Redundanz von Hox-Transkriptionsfaktoren in Vertebraten

zurückzuführen ist (Benson et al., 1996; Favier et al., 1995). Die Auswirkungen des genetischen Knockouts verschiedener, im Rahmen dieser Arbeit untersuchter, Hox-Transkriptionsfaktoren auf die Embryonalentwicklung, soll im Folgenden beschrieben werden. So resultiert zum Beispiel der Knockout von HoxA9 in einer Veränderung des Blutbildes, einhergehend mit einer Reduktion der Granulozyten und Lymphozyten des Peripherblutes der Maus. Weiterhin weisen diese Tiere verkleinerte Milzen sowie Defekte in der B-Zell Entwicklung auf (Lawrence et al., 1997). Zusätzlich wurden in HoxA9^{-/-}-Mäusen morphologische Defekte der unteren Rippenbögen beobachtet (Fromental-Ramain et al., 1996). Der Knockout von HoxB4 resultiert in einer Reduktion der Zellularität verschiedener hämatopoetischer Organe, einer geringfügigen Reduktion der Anzahl primitiver Progenitorzellen sowie verminderte Repopulationskapazität hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark (Brun et al., 2004). Für den Knockout von HoxB5 in der Maus gibt es, mit Ausnahme einer rostralen Verschiebung des Schultergürtels (ähnlich der Sprengel-Anomalie beim Menschen), bisher keine Befunde (Rancourt et al., 1995). Der Knockout von HoxD3 in der Maus führt zu massiven Fehlbildungen des anterioren Skeletts. Die Mehrzahl homozygoter HoxD3 Knockout-Tiere stirbt bereits wenige Tage postnatal, wahrscheinlich aufgrund einer instabilen craniocarvicalen Verbindung (Condie and Capecchi, 1993). Die Knockouts von HoxA9, HoxB4 oder HoxB5 sind nicht letal, was insbesondere im Falle von HoxB5 interessant ist, da man aufgrund der Funktion als Transaktivator des *Flik1*-Promoters, dessen Knockout letal ist, einen ähnlich drastischen Phänotyp erwarten würde. Dieser Befund ist möglicherweise auf die zuvor erwähnte Redundanz genetischer Hox-Paraloge zurückzuführen.

1.2.3. Rolle von Hox-Transkriptionsfaktoren im adulten Organismus

Obwohl die funktionelle Rolle von Hox-Transkriptionsfaktoren während der Embryogenese bis zum heutigen Tag bereits das Ziel intensiver Untersuchungen war, sind deren Funktion und Regulation im adulten

Organismus noch in weiten Teilen ungeklärt (Daftary and Taylor, 2006). Eine Vielzahl von Zellen und Geweben des adulten Organismus besitzt aufgrund ihrer Funktion, eine gewisse Entwicklungs-Plastizität, die sich in der Fähigkeit zur Regulation von Proliferation, Differenzierung oder auch Remodellierungsprozessen widerspiegelt. Es wird daher vermutet, dass Hox-Transkriptionsfaktoren in solchen Geweben und Organen exprimiert werden und deren Entwicklungs-Plastizität erhalten, um funktionelle Veränderungen herbeizuführen (Daftary and Taylor, 2006). Das Endothel stellt ein solches Organ dar, da dieses wie zuvor beschrieben, zur permanenten Interaktion mit einem fluktuierenden Milieu in der Lage sein muss.

1.2.3.1. HoxD3

Eine funktionelle Relevanz der Hox-Transkriptionsfaktoren im Endothel konnte zum Beispiel für HoxD3 aufgezeigt werden. So reguliert HoxD3 die Expression der Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha V\beta 3$ während der Angiogenese und wird erhöht in proliferierenden Endothelzellen exprimiert, welche zur Bildung von Gefäßstrukturen auf Matrigel angeregt wurden (Boudreau et al., 1997; Boudreau and Varner, 2004). In ruhenden Endothelzellen ist HoxD3 hingegen nur schwach exprimiert. HoxD3 spielt damit eine wichtige Rolle bei der Induktion des angiogenen Phänotyps von Endothelzellen (Boudreau et al., 1997). Auch während Remodellierungsprozessen der Gefäßwand, wie sie bei der Wundheilung stattfinden, kommt es zu einer Induktion der HoxD3-Expression (Hansen et al., 2003; Uyeno et al., 2001). Das HoxD3 Paralog HoxB3 besitzt ebenso Einfluss auf das angiogene Verhalten von Endothelzellen, jedoch in unterschiedlicher Weise. HoxB3 ist wichtig für die kapilläre Morphogenese dermalen mikrovaskulärer Endothelzellen durch funktionelle Regulation des EphA2-Rezeptors (Myers et al., 2000).

1.2.3.2. HoxA9

HoxA9 wird funktionell vor allem mit der myeloiden, erythroiden und lymphoiden Hämatopoese sowie Stammzell-Expansion in Verbindung gebracht (Izon et al., 1998; Lawrence et al., 1997; Thorsteinsdottir et al., 2002). Hier kommt es zum Beispiel durch genetische Fusion mit dem Kernporen-Protein NUP98 zur Entstehung und Progression akuter myeloider Leukämie (AML) (Thorsteinsdottir et al., 2002). Neuere Arbeiten stützen jedoch auch eine Rolle für HoxA9 als Regulator endothelialer Zellfunktionen (Bruhl et al., 2004; Rossig et al., 2005). So konnte gezeigt werden, dass HoxA9 durch direkte Bindung der Promotoren, die Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS), des VEGF-Rezeptors 2 (KDR) sowie des EphB4-Rezeptors reguliert und indirekt auch die Expression des Zelladhäsionsmoleküls VE-Cadherin (Rossig et al., 2005). Die genetische Suppression von HoxA9 resultiert in einem nahezu vollständigen Verlust der in vitro Gefäßbildungsfähigkeit humaner Nabelschnurendothelzellen sowie der migratorischen Kapazität der Endothelzellen (Bruhl et al., 2004). Darüber hinaus konnte für HoxA9 auch in vivo eine wesentliche Bedeutung im adulten Organismus aufgezeigt werden. So weisen HoxA9 Knockout-Mäuse eine stark beeinträchtigte Revaskularisierung nach Hinterlaufischämie auf (Rossig et al., 2005). Mögliche Ursachen dieses drastischen in vivo Effekts werden neben einer Dysregulation differenzierter Endothelzellen vor allem in einer gestörten Differenzierung von Vorläuferzellen in die endotheliale Linie gesehen (Rossig et al., 2005).

1.2.3.3. HoxB4

Die Funktion des Hox-Transkriptionsfaktors B4 ist bisher hauptsächlich in primitiven hämatopoetischen Stammzellen (HSC) untersucht. In diesem Zelltyp fungiert HoxB4 als starker positiver Regulator des Expansionspotentials (Antonchuk et al., 2002). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bisher zeigen, dass die Überexpression von HoxB4 in hämatopoetischen Stammzellen zu

einer effektiven Expansion dieser Zellen in vitro führt (Antonchuk et al., 2002; Krosi et al., 2003; Schiedlmeier et al., 2003; Schmittwolf et al., 2005). Aufgrund dieser Funktion wurden bis heute experimentell viele Anstrengungen unternommen, um das Potential von HoxB4 für eine Expansion hämatopoetischer Stammzellen klinisch nutzbar zu machen. Untersuchungen zur Expansion hämatopoetischer Stammzellen des Menschen in vitro zeigen jedoch, dass die Überexpression von HoxB4 in CD34⁺ HSCs die myeloerythroide Differenzierungslinie beeinflusst, was sich in einer Reduktion erythroider und myeloider Progenitorzellen widerspiegelt (Schiedlmeier et al., 2003). Ziel aktueller wissenschaftlicher Studien ist daher zu evaluieren, ob HoxB4 zur therapeutischen Stammzell-Expansion eingesetzt werden kann (Klump et al., 2005). Eine Funktion von HoxB4 in differenzierten Endothelzellen ist bisher nicht beschrieben worden.

1.2.3.4. HoxB5

Analysen zur Funktion von HoxB5 im adulten Organismus gibt es nach aktuellem Kenntnisstand nicht. Während der embryonalen Vaskulogenese agiert HoxB5 als Transaktivator des *Fik1*-Promoters in endothelialen Vorläuferzellen. In Überexpressions-Studien konnte zudem gezeigt werden, dass HoxB5 so die Differenzierung von Vorläuferzellen in die endotheliale Linie induziert (Wu et al., 2003). Der VEGF-Rezeptor 2 ist essentiell für die Vaskulogenese und stellt einen der frühesten Differenzierungsmarker in die endotheliale Linie dar (Shalaby et al., 1995; Yamaguchi et al., 1993). Die Expression des VEGF-Rezeptors 2 bleibt auch in differenzierten Endothelzellen des adulten Organismus erhalten und spielt eine wichtige Rolle für verschiedene Endothelzellfunktionen wie z.B. Sprossung, Ausbildung von Gefäßartigen Strukturen, Proliferation und Überleben (Zachary, 2003). Der Hox-Transkriptionsfaktor B5 ist daher auch von potentieller Relevanz für differenzierte Endothelzellen. Die verschiedenen Funktionen der genannten Hox-Transkriptionsfaktoren sind in Tabelle 1.1 noch einmal zusammengefasst.

Hox	Zielgene	Funktion	Referenz
HoxA9	eNOS, VEGF-R2, VE-Cadherin, EphB4, Osteopontin	HoxA9 ^{-/-} Mäuse: Defekte in der Ischämie-induzierten Neovaskularisierung, endothelialen Differenzierung und Hämatopoese; in vitro reguliert HoxA9 die Migration und Gefäßstrukturbildung von Endothelzellen.	Lawrence et al., 1997 Brühl et al., 2004 Rössig et al., 2005 Shi et al., 2001
HoxB4	keine bekannt	HoxB4 ^{-/-} Mäuse: milde Reduktion der Zellularität hämatopoetischer Organe und Anzahl primitiver Progenitorzellen sowie verminderte Repopulationskapazität von HSCs, nicht letal. Fördert die Differenzierung von HSC und Stammzellexpansion	Antonchuk, 2002 Brun et al., 2004
HoxB5	flk1 (Maus)	HoxB5 ^{-/-} Mäuse: Milde skelettale Anomalien, nicht letal. Fördert die embryonale endotheliale Differenzierung	Wu et al., 2003 Rancourt et al., 1995
HoxD3	Integrin $\alpha 5\beta 1$, Integrin $\alpha V\beta 3$	HoxD3 ^{-/-} -Mäuse: Sterben größtenteils kurz nach der Geburt aufgrund schwerer skelettaler Anomalien. Reguliert Invasion und Angiogenese, erhöhte HoxD3 Expression in Tumorangio-genese	Condie et al., 1993 Boudreau et al., 1997 Boudreau et al., 2004

Tabelle 1.1. Zusammenfassung verschiedener Hox-Funktionen

1.3. Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren

1.3.1. Transkriptionelle Regulation von Hox-Genen

Einer der am besten charakterisierten Faktoren für die transkriptionelle Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren während der Embryogenese ist die Retinsäure (Vitamin A) (Durston et al., 1989; Nieuwkoop, 1955). Retinsäure wirkt durch Bindung ihrer kernständigen Liganden RAR und RXR, die beide der Superfamilie von Liganden-gesteuerten Kernrezeptoren angehören. Die Bindungsdiversität dieser Kernrezeptoren wird durch Homo- und Heterodimerisierung sowie der Expression verschiedener Protein-Isoformen verstärkt. Durch die Rezeptor-Ligand-Interaktion kommt es zur Komplexbildung und Bindung an die Transkriptions-Enhancer Elemente RARE oder RXRE (engl.: *retinoic acid response element*) (Oosterveen et al., 2003). Die Kapazität von Retinsäure zur Liganden-vermittelten Aktivierung von Hox-Transkriptionsfaktoren beschränkt sich nach heutigem Kenntnisstand auf die 3'-gelegenen Paraloge der Hox-Familie und konnte für HoxA1 und HoxB1 direkt nachgewiesen werden (Ogura and Evans, 1995a; Ogura and Evans, 1995b). Neben der Retinsäure wurden auch Vitamin D sowie die Hormone Östrogen und Progesteron als transkriptionelle Regulatoren der Hox-Genexpression beschrieben (Du et al., 2005; Ma et al., 1998; Taylor et al., 1998). In Endothelzellen wurde über dies eine transkriptionelle Regulation von HoxA9 durch den pro-inflammatorischen Stimulus $TNF\alpha$ beschrieben, das als Repressor der HoxA9-Expression wirkt (Patel et al., 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *Shear Stress* zu einer Steigerung der HoxA9-Expression in Endothelzellen führt, wobei die Signaltransduktion bei diesem Vorgang bisher nicht im Detail aufgeklärt werden konnte (Rossig et al., 2005).

1.3.1.1. Die Histon-Methyltransferase MLL

Ebenso wie die Hox-Gene des HOM-C Komplex in *Drosophila* wurden auch 2 Gruppen von Hox-Regulator-Proteinen durch Mutationen in *Drosophila* gefunden. Die Mitglieder der Polycomb-Gruppe (PcG) wirken dabei generell als Inhibitoren der Hox-Expression, während die Mitglieder der trithorax-Gruppe (trxG) als Aktivatoren der Hox-Expression wirken (Grimaud et al., 2006). Man geht heute davon aus, dass PcG-, als auch trxG-Proteine als epigenetische Regulatoren agieren, welche den transkriptionellen Status von Zielgenen durch Histon-Modifikationen und den daraus resultierenden Veränderungen der Chromatinstruktur im Promoterbereich beeinflussen (Simon and Tamkun, 2002). Die Methyltransferase MLL (engl.: *mixed lineage leukemia*) ist das humane Homolog zu *Drosophila trithorax* und Mitglied der trxG-Familie (Djabali et al., 1993; Gu et al., 1992). Das MLL-Gen kodiert für ein 3969 Aminosäuren Multidomänen-Protein mit einem Molargewicht von 430 kDa. Zu diesen Domänen zählen 3 als „AT-hook“-bezeichnete DNA-Bindungsmotive, eine im aminoterminalen Bereich liegende DNA-Methyltransferase Homologiedomäne (DNMT), eine zentral positionierte Zink-Finger (PHD) Region sowie eine carboxyterminale, hoch konservierte SET-Domäne, welche die katalytische Methyltransferase-Aktivität besitzt. Genetische Rearrangements des MLL-Gens sind oftmals mit der Entstehung und Progression von Leukämien assoziiert. Diese werden ursächlich auf eine Dysregulation verschiedener Hox-Transkriptionsfaktoren durch MLL zurückgeführt (Armstrong et al., 2002; Rozovskaia et al., 2001; Yeoh et al., 2002). Neben der pro-leukämischen Rolle chimärerer MLL-Fusionsproteine, reguliert auch das native MLL verschiedene Hox-Transkriptionsfaktoren, wie z.B. HoxA7, HoxA9 und HoxA10 (Ernst et al., 2004a; Nakamura et al., 2002; Yu et al., 1998). In MLL-Knockout Mäusen konnte zudem in vivo gezeigt werden, dass MLL unerlässlich für die korrekte Initiation verschiedener Hox-Gene während der Embryonalentwicklung ist. Der Knockout von MLL führt unter anderem zu einer drastischen Störung der physiologischen Hämatopoese und letztlich zu embryonaler Letalität (Ernst et al., 2004a; Ernst et al., 2004b; Hess et al., 1997; Yagi et al., 1998; Yu et al.,

1995). Funktionell vermittelt MLL, im Zusammenspiel mit zusätzlichen Proteinen in Form eines stabilen Superkomplexes, die Methylierung von Histon H3 an Lysin K4 (H3K4) (Nakamura et al., 2002; Terranova et al., 2006). Die di- oder tri-Methylierung im Promoterbereich von MLL-Zielgenen an H3K4 wirkt fördernd auf den transkriptionellen Status dieser Promotoren (Bernstein et al., 2002; Santos-Rosa et al., 2003; Strahl et al., 1999). Eine direkte Promoteraktivierung durch Bindung und H3K4-Methylierung konnte für HoxA9 in HeLa-Zellen und HoxC8 in einer murinen Fibroblasten Zell-Linie bereits nachgewiesen werden (Milne et al., 2002; Nakamura et al., 2002).

1.3.2. Posttranskriptionelle Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren

Die bisher bekannten Mechanismen posttranskriptioneller Hox-Regulation lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. So kann z.B. durch den aktiven Import von Hox-Transkriptionsfaktoren aus dem Zytosol über die Kernporenkomplexe in den Zellkern oder durch den Ausschluss aus dem Zellkern die Fähigkeit zur Transaktivierung von Zielgenen moduliert werden (Dintilhac et al., 2004; Kiritto et al., 2004; Komuves et al., 2000). Zusätzlich kann die DNA-Bindungsaffinität der Hox-Transkriptionsfaktoren im Zellkern sowohl direkt, durch chemische Modifikationen wie der Phosphorylierung oder aber durch die Interaktion mit verschiedenen Co-Faktoren gesteuert werden (Merabet et al., 2003; Moens and Selleri, 2006; Vijapurkar et al., 2004).

1.3.2.1. Hox Co-Faktoren

Der hohe Grad an Konservierung innerhalb der Homeodomäne von Hox-Transkriptionsfaktoren resultiert in einer stark ähnelnden Bindung an DNA-Zielsequenzen der Konsensus-Sequenz 5'-TTNAT-3' in vitro, was die Frage aufwirft, wie die Spezifität der Hox-Transkriptionsfaktoren in vivo sichergestellt wird (Hoey and Levine, 1988; Laughon, 1991). Heute weiß man, dass die

Spezifität durch Interaktion der Hox-Transkriptionsfaktoren mit Co-Faktoren erreicht wird, die in Abhängigkeit des jeweils gebildeten Hox/Co-Faktor Komplexes, die Bindungsspezifität beeinflussen (Mann and Affolter, 1998; Mann and Chan, 1996). Die Mehrzahl an bisher bekannten Hox Co-Faktoren sind Proteine der TALE-Familie (engl.: *three amino acid loop extension*), die ihrerseits in die 2 Subgruppen der Meis - und PBC-Proteine unterteilt ist (Moens and Selleri, 2006). Die meisten Hox-Proteine sind zu einer Interaktion mit PBX (einer Subgruppe der PBC-Proteine) in der Lage. Die Interaktion der Hox-Paraloge 1-9 mit PBX wird über die Hexapeptid-Sequenz, N-terminal zu ihrer Homeodomäne, vermittelt (Chang et al., 1995; Knoepfler and Kamps, 1995; Neuteboom et al., 1995; Passner et al., 1999; Phelan et al., 1995; Piper et al., 1999). Für HoxA10 konnte zudem eine Hexapeptid-unabhängige Bindung mit PBX1 gezeigt werden (Chang et al., 1996). Die Komplexbildung mit Meis ist nur für die ABD-B Hox-Paraloge 9 und 10 beschrieben (Shen et al., 1997). Für den Hox-Transkriptionsfaktor A9 wurde auch die Bildung eines trimeren Komplexes mit Meis1 und PBX2 in myeloiden Zellen beschrieben (Shen et al., 1999). Die funktionelle Relevanz der Hox Co-Faktoren konnte bisher zum Beispiel anhand der *CYBB*-Gens, welches für die gp91^{Phox}-Komponente des phagozytären Respirationskomplex kodiert, aufgezeigt werden. Dieses Gen wird durch HoxA9 im Komplex mit PBX1 aktiviert, während es durch Bindung von HoxA9 und Meis1 reprimiert wird (Bei et al., 2005). Ebenso ist das Potential von HoxA9 zur malignen leukämischen Transformation primärer Stammzellen des Knochenmarks, von einer spezifischen Interaktion mit Meis1 abhängig, während PBX1 hier unwirksam ist (Kroon et al., 1998). Ebenfalls für HoxA9 konnte gezeigt werden, dass sowohl die Fähigkeit zur endogenen Komplexbildung mit PBX1, als auch die in vitro DNA-Bindungsaffinität durch Proteinkinase C (PKC) vermittelte Phosphorylierung von HoxA9 an Serin 204 vermindert werden kann (Vijapurkar et al., 2004). Obwohl Anstrengungen unternommen wurden, um die Sequenz-Spezifität der verschiedenen Hox/Co-Faktor Komplexe bestimmen zu können, bleibt eine genaue Vorhersage bis heute sehr schwierig (Ebner et al., 2005). Neuere Untersuchungen bringen zusätzlich die Proteinfamilie der Smads in den Blickpunkt der posttranskriptionellen Hox-Regulation. Die funktionelle

Interaktion von Hox-Transkriptionsfaktoren mit Smad-Proteinen konnte am Beispiel des Osteopontin-Promoters (OPN) aufgezeigt werden. Dieser Promoter steht unter der reprimierenden Kontrolle von HoxC8 (Shi et al., 1999), jedoch führt die Stimulation mit BMP zu einer Verdrängung von HoxC8 durch Smad1 und somit zur Aktivierung der OPN-Expression (Shi et al., 1999; Wan et al., 2001). Smad6 wirkt hingegen am gleichen Promoter als Co-Repressor von HoxC8 (Bai et al., 2000). Eine ähnliche Regulation des OPN-Promoters konnte auch für HoxA9 nachgewiesen werden. Die Stimulation mit TGF- β resultiert hier in einer Bindung von Smad4 an den transkriptionellen Repressor HoxA9 und verdrängt diesen vom Promoter. Gleichzeitig führt die Bindung von Smad3 an den OPN-Promoter zu einer Aktivierung (Shi et al., 2001). Diese Befunde verdeutlichen das Potential von Hox-Transkriptionsfaktoren zur differentiellen Regulation von Zielgenen (Abb. 1.5).

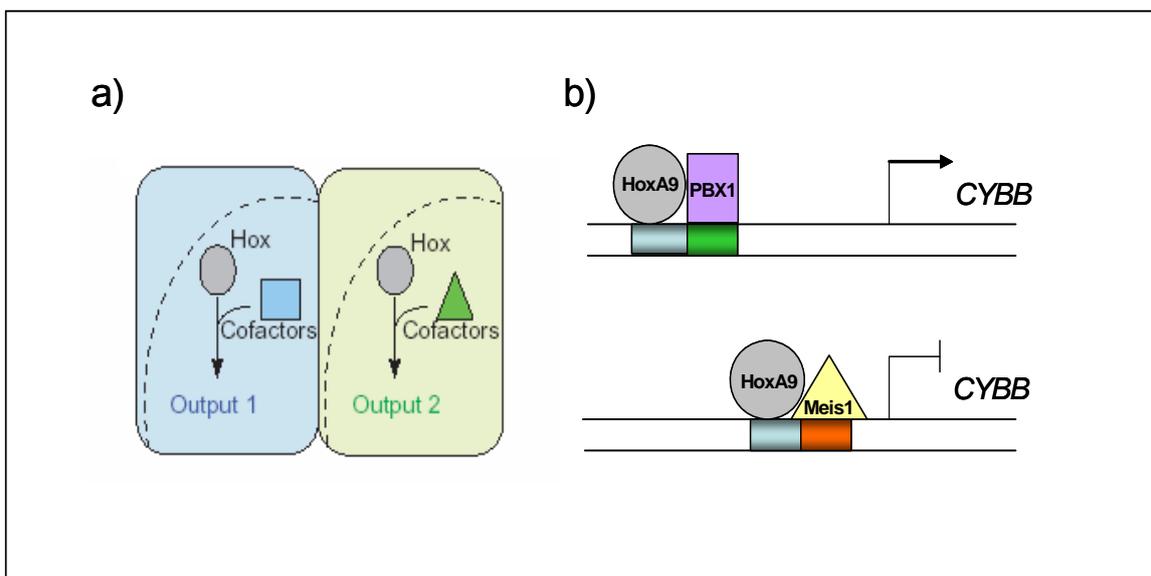


Abb. 1.5. Kontext-abhängige Hox-Funktionen (modifiziert nach Merabet et al., 2005) (Merabet et al., 2005). A) Zelltyp-abhängiger Kontext. Ein spezifisches Hox-Protein übt unterschiedliche Funktionen, in Abhängigkeit der im jeweiligen Zelltyp vorhandenen Co-Faktoren aus. B) Zielgen-abhängiger Kontext: Durch Bindung unterschiedlicher Co-Faktoren in einer Zelle, kann ein Hox-Gen sowohl als Aktivator als auch als Repressor des gleichen Zielgens agieren.

1.3.2.2. Regulation der Hox-Lokalisation

Der Transport von Transkriptionsfaktoren aus oder in den Zellkern ermöglicht die schnelle Regulation von Genen, da es keiner Neusynthese des Transkriptionsfaktors bedarf. NF κ B ist eines von vielen Beispielen für einen solchen Transkriptionsfaktor. NF κ B ist unter physiologischen Bedingungen an den Inhibitor I κ B gebunden, was zu einer Retention im Zytosol führt. Durch Stimulation mit dem pro-inflammatorischen Stimulus TNF α kommt es zur Degradation des Inhibitors und nukleärem Import von NF κ B. Dies resultiert letztlich in der Aktivierung inflammatorischer Gene (Turpin et al., 1999). Die intrazelluläre Lokalisation ist auch für die funktionelle Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren von Bedeutung (Kirito et al., 2004). In immaturren hämatopoetischen Stammzellen lokalisiert HoxA9 vorwiegend im Zytosol der Zellen. Nach Stimulation mit dem Zytokin Thrombopoietin, kommt es jedoch, in Abhängigkeit von einer Komplexbildung mit Meis1 zu einem nukleärem Import von HoxA9 (Kirito et al., 2004). Der aktive Im- oder Export eines Proteins durch den Kernporenkomplex des Zellkerns wird durch die kleine GTPase Ran vermittelt und setzt den Besitz eines Kernimport- (NLS) bzw. Kernexport-Signals (NES) voraus (Moore and Blobel, 1994). HoxA9 besitzt 2 NLS im Bereich der Homeodomäne, die einen solchen Kernimport vermitteln können (Kirito et al., 2004). Eine Exklusion von HoxA9 und HoxB6 aus dem Zellkern wurde über dies durch alternatives Splicen der mRNA beschrieben. In beiden Fällen kommt es zu einem Verlust der Homeodomäne und der darin enthaltenen NLS-Sequenzen (Dintilhac et al., 2004; Komuves et al., 2000). Auch die nukleäre Lokalisation der Hox Co-Faktoren Meis und PBX wird durch NLS und NES reguliert, wobei Meis1 primär nukleär lokalisiert und die nukleäre Lokalisation des zytoplasmatischen PBX1, in nicht vollständig aufgeklärter Weise, von einem Co-Import mit Meis1 abzuhängen scheint (Abu-Shaar et al., 1999; Saleh et al., 2000a). Ob die Regulation des Kern Im- und/oder Exports von Hox Co-Faktoren auch direkt mit einer Translokation gebundener Hox-Transkriptionsfaktoren einhergeht, ist bisher nicht im Detail geklärt, jedoch wird

für Meis1 ein solcher Vorgang während des Kernimports von HoxA9 nach Stimulation mit Thrombopoietin vermutet (Kirito et al., 2004).

1.4. Fragestellung

Endothelzellen bilden die luminale Barriere zum Blutstrom und agieren unter anderem als Sensoren und Transduktoren für Stimuli des umgebenden Milieus. Die funktionelle Interaktion mit ihrer Umgebung wird dabei durch eine Vielzahl zellulärer Funktionen, wie z.B. Migration, Gefäßformierung oder Proliferation gewährleistet.

Homeobox-Transkriptionsfaktoren sind an der Regulation von Proliferation, Migration und Differenzierungsprozessen in verschiedenen Zellen beteiligt, wobei insbesondere für HoxA9 und HoxD3 wichtige Funktionen auch in Endothelzellen beschrieben sind. Hox-Transkriptionsfaktoren stellen somit interessante Kandidaten für die Regulation endothelialer Zellfunktionen dar.

Ziel dieser Arbeit sollte es daher sein, die funktionelle Relevanz verschiedener Hox-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen zu untersuchen. Der Schwerpunkt sollte hierbei auf Hox-Transkriptionsfaktoren mit bekannter oder potentieller Relevanz für die Endothelzellbiologie liegen, zu denen neben HoxA9 und HoxD3 auch HoxB4 und HoxB5 gehören. Untersucht werden sollten hierbei insbesondere folgende Aspekte:

1. Analyse von Expression und Funktion der bisher nicht in Endothelzellen beschriebenen Hox-Transkriptionsfaktoren HoxB4 und HoxB5.
2. Analyse der funktionellen Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren auf transkriptioneller als auch auf post-transkriptioneller Ebene in Endothelzellen sowie deren Relevanz für pro-angiogene Endothelzell-Funktionen.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Zellen

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen aufgelistet.

Zelltyp	Anmerkungen
HUVEC	Humane venöse Nabelschnurendothelzellen (Fa. Cambrex)
HMVEC	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (Fa. Cambrex)
HEK293	Humane embryonale Nieren Epithelzellen (transformierte Zell-Linie)
EPC	Endotheliale Progenitorzellen aus humanem Peripherblut

Tab. 2.1. Verwendete Zellen

2.2. Nährmedien

In der folgenden Tabelle sind die zur Kultivierung humaner Zellen verwendeten Nährmedien aufgelistet.

Zelltyp	Medium	Zusätze
HUVEC	Endothelial cell basal medium (EBM), Fa. Cambrex	10% fötales Kälberserum (FCS), Fa. Boehringer Mannheim, hEGF (10 µg/ml), Hydrocortison (1 µg/ml), Bovine brain extract (3 µg/ml), Gentamycin Sulfat (50 µg/ml, Amphotericin-B (50 mg/ml). Alle Fa. Cambrex
HMVEC	Endothelial cell basal medium-2 (EBM-2), Fa. Cambrex	10% FCS, Fa. Boehringer Mannheim, EGM [®] -MV Bullet Kit, Fa. Cambrex
HEK293	DMEM 4500 Glucose with Glutamax, Fa. Gibco	10% hitzeinaktiviertes FCS, Penicillin/Streptomycin (500 U/ml), Fa. Gibco

Tab. 2.2. Nährmedien

2.3. Kultivieren von Endothelzellen

Humane venöse Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) wurden in EBM in T-75 Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit bis zur 3. Passage kultiviert. Zum Passagieren wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 6 ml Phosphatpuffer (PBS; GibcoBRL, Karlsruhe) gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA (Boehringer Mannheim) bis zum Abrunden der Zellen inkubiert. Nach Absaugen des Trypsins, wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Greiner) in 10 ml Medium abgelöst und zur Zellerhaltung in 250 ml-Zellkulturflaschen ausgebracht und für 18 h kultiviert. Zur Durchführung der Versuche wurde die Zellzahl bestimmt und je nach Versuchsansatz 3,5 - 4,5 x 10⁵ Zellen in 6 cm-Zellkulturschalen (Greiner) ausgebracht und für 18 h kultiviert.

2.4. Kultivieren von humanen embryonalen Nieren Epithelzellen (HEK293)

HEK293 wurden in DMEM 4500 inkl. Zusätze in T-75 Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das FCS wurde durch Inkubation bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert. Zum Passagieren wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 6 ml Phosphatpuffer (PBS; GibcoBRL, Karlsruhe) gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA (Boehringer Mannheim) bis zum Ablösen der Zellen inkubiert. Durch Zugabe von 7 ml Kulturmedium wurde die Enzymreaktion abgestoppt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension durch Zentrifugation (5 min, 200 x g) pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellen zur weiteren Kultivierung in neue 250 ml Flaschen ausgebracht.

2.5. Klonierungen aus humaner cDNA

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden verschiedene Plasmid-Konstrukte generiert. Die Klonierung von HoxB4, HoxB5, HoxD3 und Meis1 erfolgte durch mRNA-Isolation, reverse Transkription und anschließende Amplifikation mittels

PCR aus HUVEC. Klonierungs-Schnittstellen und Zielvektoren sowie Oligonukleotid-Primer Sequenzen sind in den folgenden Tabellen aufgeführt (Tab. 2.3a und Tab. 2.3b).

Konstrukt	Insert	Zielvektor	Schnittstellen 5'-3'
HoxB4-myc	HoxB4wt	pcDNA3.1 myc/His (Fa. Invitrogen)	<i>XhoI / EcoRI</i>
HoxB4-GFP	HoxB4wt	pEGFP-C3 (Fa. Clontech)	<i>XhoI / EcoRI</i>
HoxB5-myc	HoxB5wt	pcDNA3.1 myc/His (Fa. Invitrogen)	<i>XhoI / EcoRI</i>
HoxB5-GFP	HoxB5wt	pEGFP-C3 (Fa. Clontech)	<i>XhoI / EcoRI</i>
HoxD3-myc	HoxD3wt	pcDNA3.1 myc/His (Fa. Invitrogen)	<i>BamHI / Hind III</i>
Meis1-myc	Meis1wt	pcDNA3.1 myc/His (Fa. Invitrogen)	<i>XhoI / EcoRI</i>

Tab. 2.3a. Klonierte Plasmidkonstrukte

Konstrukt	sense Primer (5'→3')	antisense Primer (5'→3')
HoxB4-GFP	<u>CTCGAGGTGGGCAATTCCCAGAAA</u> TTAATGG	<u>GAATTC</u> CGCGTGCGGGGGCACTA GAG
HoxB4-myc	<u>CTCGAGGGGCAATTCCCAGAAATT</u> AATGGCT	<u>GAATTC</u> GAGCGCGCGGGGGCCTCC ATTG
HoxB5-GFP	<u>CTCGAGTCCAAAATCACCCAAATG</u> AGCTCG	<u>GAATTC</u> GCGGGCTCAGGGCTGGA AGG
HoxB5-myc	<u>CTCGAGCCAAAATCACCCAAA</u> TGAGCTCGT	<u>GAATTC</u> GGGCTGGAAGGCGCTGCC AGC
HoxD3-myc	<u>GGATCCGGCAGTGAAGGATACAG</u> TGGTAG	<u>AAGCTT</u> CAGATGCGTCAGTTTGGGA GC
Meis1-myc	<u>CTCGAGGAAGTAGGAAGGGAGCC</u> AGAGAG	<u>GAATTC</u> CATGTAGTGCCACTGCCCC TCCA

Tab. 2.3b. Oligonukleotid-Primer zur Klonierung aus cDNA. Restriktions-Schnittstellen sind unterstrichen.

2.6. Plasmidpreparation

Sämtliche Plasmidpräparationen wurden mit kommerziell erwerblichen Kits zur Spin-, Midi- oder Maxipräparation von Plasmid-DNA (Fa. Qiagen) durchgeführt. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch bestimmt. Als saubere DNA wurde ein Quotient $OD_{260nm}/280nm = 1,6 - 1,8$ angesehen.

2.7. Isolation von RNA aus Säugerzellen

Die Isolation von RNA aus Säugerzellen erfolgte durch Aufschluss der Zellen über QIAshredder™-Säulchen und anschließende RNA-Aufreinigung mittels RNeasy®-Säulchen (beides Fa. Qiagen) nach Herstellerangaben. Zusätzlich erfolgte ein optionaler Verdau mit DNase (Fa. Qiagen), um eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen.

2.8. RT-PCR und *real-time* PCR

Die Untersuchung der Expression verschiedener Gene erfolgte durch reverse Transkription der mRNA in cDNA unter Nutzung eines M-MLV Reverse Transkriptase Systems (Fa. Invitrogen) und anschließende semiquantitative Analyse mittels konventioneller PCR (Fa. Invitrogen) oder quantitativer Analyse mittels Lightcycler gestützter *real-time* PCR. Als Gleichladungskontrolle wurde die Expression der GAPDH untersucht und die Expression der verschiedenen Gene als Quotient mit GAPDH angegeben. Die semiquantitative Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte nach Auftrennung der DNA-Fragmente in einem Agarosegel densitometrisch mittels Scion Image-Software (Scion Corporation). Die quantitative *real-time* PCR erfolgte mittels LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Fa. Roche) unter Verwendung des LightCycler 2.0 und der LightCycler3 Software (Fa. Roche). Alle für RT-PCR und Lightcycler Studien verwendeten Primer-Paare sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

RT-PCR	sense primer (5'→3')	antisense primer (5'→3')
HoxA9	gcccgggtgcgctctccttcgc	catcctgcggttctggaaccag
HoxB3	ctgctctcttcggaggctattc	ctgttgctagtggcactggtagg
HoxB4	gtcccactccgcgtgcaaagag	cagagcgcgtggcgatctcc
HoxB5	ggcttcgagctgctccctgtcc	ggctgatgtgaagcttctcatcc
HoxB9	gcacgaagtggccagactcctc	gctggaagtgaggggctaggac
HoxD3	agaaggctgcttactatgaaaacc	acaagtagcgggtgaagtggaattc
MLL	cagctatcctctcagatccatc	ccttgctttccggactttctg
EphB4	cctgctatccctgcacctcttc	ctgatccaatgggtgtagagtg
Integrin α V	cacttctctgggcactttgtc	cactgatttggtagtaggatgt
Integrin α 5	gaccagagttacgggactcaactg	cttggccattgcacagctgtgg
Integrin β 1	tgagtgcaaccccaactacactg	gtctggaccagtgaggacactctg
Integrin β 3	gtgaatgtgtccaagaatccag	cttctctagatcccctcgcgcttc
Meis1	ggtacgacgatctacccattac	gtcattgacagaggagcccatgc
GAPDH	tcaccatctccaggagcgagatc	gagaccacctggtgctcagtgtag
ChIP	sense primer (5'→3')	antisense primer (5'→3')
HoxA9 P1	aatgcgattggctgctttttatg	tcaatctagccttctctgtac
HoxA9 P2	gggagacgggagagtacagagac	cgtccagcagaacaataacgcg
HoxA9 P3	caactactacgtggactcgttc	gtgatgggtgggtacaccgc
HoxD3 P4	gtagtggattgtcattgagtg	cctgcctccaagttgacaaag
HoxD3 P5	ggtaggctgtttgtgcagggtg	cataggtcagctccctggtctc
HoxD3 P6	cacctccttagtccccctggtc	ctgtggtgaggactgtggttttg
Lightcycler	sense primer (5'→3')	antisense primer (5'→3')
HoxA9	aaaaacaaccagcgaa	caaatggcatcactcgtc
HoxB3	ctgctctcttcggaggctattc	ctgttgctagtggcactggtagg
HoxB4	gtcccactccgcgtgcaaagag	cagagcgcgtggcgatctcc
HoxB5	ggcttcgagctgctccctgtcc	ggctgatgtgaagcttctcatcc
HoxB9	gcacgaagtggccagactcctc	gctggaagtgaggggctaggac
HoxD3	agaaggctgcttactatgaaaacc	acaagtagcgggtgaagtggaattc
MLL	cagctatcctctcagatccatc	ccttgctttccggactttctg
Meis1	ggtacgacgatctacccattac	gtcattgacagaggagcccatgc
GAPDH	ttggtatcgtggaaggactca	tgtcatcatattggcagggtt

Tab. 2.4. Verwendete Oligonukleotide für RT-PCR, ChIP und Lightcycler

2.9. Protein-Isolation aus Säugerzellen

Die Zellen wurden auf Eis mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber (Fa. Greiner) von der Kulturschale abgelöst. Durch Zentrifugation (5 min, 700 x g, 4°C) wurden die Zellen pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl Lysispuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM Na₃VO₄; 1mM EDTA; 1 mM EGTA, 1% Triton; 2,5 mM Na-Pyrophosphat, 1 mM β-Glycerolphosphat; 1 mM PMSF; 1 µg/ml Leupeptin) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (20.000 x g, 15 min, 4°C) wurde das Proteinlysat von unlöslichen Zellbestandteilen getrennt und die Proteinkonzentration im Überstand mittels Bradford-Reagenz bestimmt.

2.10. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz

Je 2 µl Proteinlysat wurde mit 798 µl H₂O und 200 µl Bradford-Reagenz (Fa. BIO-RAD) gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Als Referenz wurden 798 µl H₂O mit 200 µl Protein-Färbereagenz sowie 2 µl 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.

2.11. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Protein-Proben wurden mit 4x-Probenpuffer (250 mM Tris/HCl pH 6,8, 8% SDS, 40% Glycerin, 0,04% Bromphenolblau, 200 mM DTT) versetzt und 5 min bei 100°C gekocht. Die Auftrennung der Proteine nach Molargewicht erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach Laemmli, wobei die Proteine zunächst durch ein Sammelgel (1 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4% SDS) horizontal fokussiert werden, um dann mit Eintritt in das Trenngel (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4% SDS), der Größe nach separiert zu werden. Die Größenbestimmung erfolgte anhand eines Standards, welcher farblich markierte Proteine bekannter Größe enthält (Fa. BIO-RAD). Verwendet wurde das Gelelektrophoresesystem

Mini Protean II (Fa. BIO-RAD). Die Separation der Proteine erfolgte bei 80 V Spannung im Sammelgel und wurde auf 120 V bei Eintritt in das Trenngel erhöht. Als Laufpuffer wurde 0,25 M Tris, 0,96 M Glycin und 1% SDS verwendet

2.12. Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Beim Western-Blotting werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Trenngel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)- oder Nitrocellulose-Membran transferiert und dort immobilisiert. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgt durch anlegen eines elektrischen Feldes, das senkrecht zum Trenngel verläuft. Die PVDF-Membranen (Immobilon-P, Fa. Millipore) wurden durch Vorbehandlung aktiviert. Hierzu wurden diese 1 min in Methanol inkubiert und anschließend 2 min in H₂O 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“ eingelegt und vertikal in die mit Transferpuffer gefüllte Wet-Blot-Kammer (Fa. BIO-RAD) eingehängt. Der Proteintransfer erfolgte 1,5 -2 h bei 20 W konstant und 4°C. Der Nachweis gebundener Proteine erfolgte immunzytochemisch.

2.13. Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen

Der Nachweis von transferierten Proteinen auf PVDF-Membranen erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen das zu untersuchende Protein. Hierzu wurde die Transfermembran zunächst durch Inkubation mit TBS/TWEEN (50 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 0,1% Tween-20) + 3% Magermilchpulver (Fa. Töpfer, Dietmannsried) oder 3% Rinderserumalbumin (Fa. Merck), abhängig vom eingesetzten Antikörper, für 2h unter leichter Rotation abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit einem spezifischen Antikörper in geeigneter Verdünnung bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS/TWEEN erfolgte die Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Zweitantikörper,

welcher gegen den Fc-Teil des Erstantikörpers gerichtet ist. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS/TWEEN erfolgte der Nachweis des zu untersuchenden Proteins durch Inkubation mit ECL-Reagenz (Fa. Amersham), welches zur Emission von Chemilumineszenz des Zweitantikörpers führt. Diese wurde mittels geeigneten Filmmaterials (Hyperfilm-ECL, Fa. Amersham) detektiert und sichtbar gemacht. Nach Belichtung erfolgte die Entwicklung der Filme in einem AGFA Curix 60. Die Inkubationen der Membran mit Blockierungsreagenzien bzw. des Zweitantikörpers sowie alle Waschschriffe wurden auf einem Schüttelinkubator der Fa. IKA-Labortechnik durchgeführt. In der folgenden Tabelle sind alle im Western-Blot verwendeten Antikörper aufgelistet (Tab. 2.5).

Erstantikörper	Einsatz	Blockierung	Hersteller	Zweitantikörper (alle 1:6000)
anti-HoxA9	1:1500	5% BSA	Upstate	anti-Rabbit-HRP
anti-HoxD3	1:1000	3% Milch	Zymed	anti-Rabbit-HRP
anti-EphB4	1:400	3% Milch	Santa Cruz	anti-Rabbit-HRP
anti-di-methyl-Histon H3 (Lys4)	1:5000	3% BSA	Upstate	anti-Rabbit-HRP
anti-eNOS	1:4000	3% BSA	BD Biosciences	anti-Mouse-HRP
anti-myc	1:250	3% Milch	Santa Cruz	anti-Mouse-HRP
anti-Tubulin	1:2500	3% Milch	Dianova	anti-Mouse-HRP

Tab. 2.5. Antikörper für den Einsatz im Western-Blot

2.14. Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Proteinen

Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis von intrazellulären Proteinen erfolgte im Falle von Fusionsproteinen mit GFP (engl.: *green fluorescent protein*) direkt unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops und digitaler Kamera (Axiovert 100, AxioCam, AxioVision Software, Fa. Carl Zeiss, Göttingen). Der indirekte Nachweis von Proteinen erfolgte unter Verwendung spezifischer Farbstoffe

oder fluoreszenz-gekoppelter Antikörper. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert (15 min, RT). Nach Permeabilisierung mit Triton-X-100 (0,25%) und Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen mit BSA (1%) für je 15 min bei Raumtemperatur erfolgte der Nachweis der zu untersuchenden Proteine durch Inkubation mit einem spezifischen Farbstoff oder fluoreszenz-gekoppelten Antikörper in geeigneter Verdünnung und Inkubationsdauer. Die Färbung der Zellkerne erfolgte nach dreimaligem Waschen mit PBS durch 3-minütige Inkubation mit 4,6 Diamino-2-Phenylindol (DAPI). Anschließend wurden die Präparate mit Fluoromount Medium (Fa. Dako) eingebettet und wie zuvor erwähnt mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.15. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunopräzipitation wurde zum Nachweis transkriptionell-aktiver Chromatin-Bereiche, welche sich durch di- oder tri-Methylierung an Histon H3 Lysin K4 auszeichnen angewendet. Hierzu wurden die Zellen durch Zugabe von 1% Formaldehyd zum Kulturmedium für 10 min fixiert. Bei diesem Vorgang werden alle DNA-gebundenen Proteine im Komplex mit der gebundenen DNA fixiert. Anschließend werden die fixierten Zellen 1 x mit kaltem PBS gewaschen und dann mit einem Zellschaber abgelöst und durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 500 x g, 4°C). Das Zellpellet wurde im Anschluss für 5 min auf Eis lysiert um die Zellkerne zu erhalten (50 mM Tris pH 8.0, 2 mM EDTA, 0,1% NP-40, 10% Glycerol, Protease-Inhibitor-Cocktail, Fa. Roche). Die Zellkernfraktion wurde nach Zentrifugation mit einem zweiten Lysispuffer aufgeschlossen (50 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA, 0,1% SDS) und die nukleäre DNA durch Sonifikation mit Ultraschall fragmentiert (Branson Sonifire 450, Fa. Branson, USA). Die Protein/DNA-Komplexe wurden dann mit einem anti-dimethyl-Histon H3 (Lys4) Antikörper (Fa. Upstate) über Nacht bei 4°C auf einem Rotator inkubiert und am Folgetag mit Protein-A/G Agarose Beads immunpräzipitiert. Nach mehrfachem Waschen wurden die Proben dann entweder zur Analyse mittels Western-Blot oder zum Nachweis der Promoter-

Bindung in einer PCR verwendet. Der schematische Ablauf einer CHIP ist in Abb. 2.1 dargestellt. Die verwendeten Primer-Paare sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

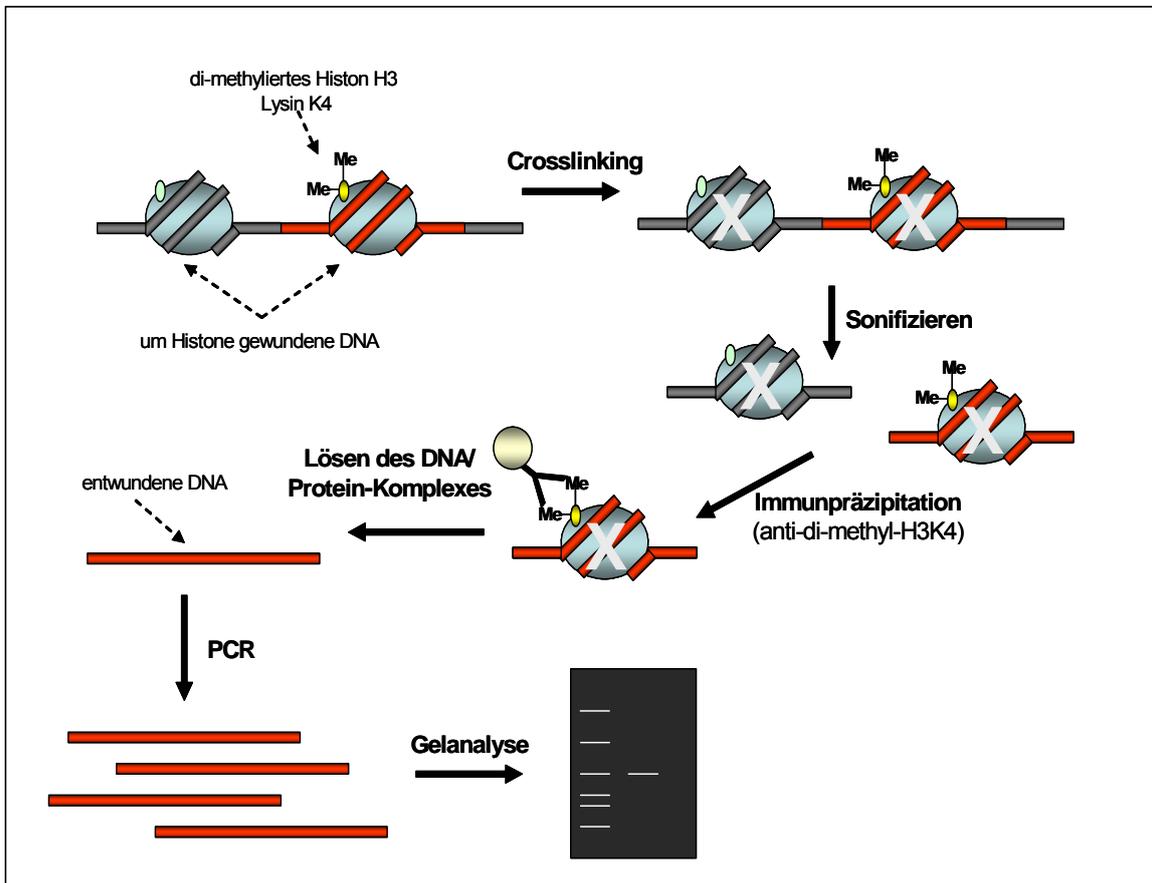


Abb. 2.1. Schematische Darstellung der Chromatin-Immunopräzitation

2.16. Transfektion von Zellen mit Oligonukleotiden

Die Transfektion von HUVEC mit Oligonukleotiden erfolgte zur Suppression spezifischer mRNAs unter Verwendung von siRNAs (engl.: *small interfering RNA*). Hierzu wurden HUVEC ($3,5 \times 10^5$ Zellen/6 cm Kulturschale) mit siRNA in einer Endkonzentration von 160 nM mittels GeneTrans II (Fa. MoBiTec) oder TranspassR2 (Fa. NEB) nach Angaben der Hersteller transfiziert. Als Kontrolle diente eine als „scrambled“ bezeichnete Oligonukleotidsequenz, welche zu keinerlei Bindung an bekannte humane mRNA-Sequenzen in der Lage ist

(NCBI BLAST-Suche). Die verwendeten siRNA-Sequenzen sind in Tab. 2.6 aufgeführt.

Bezeichnung (Zielgen)	Sequenz (sense: 5'→3')
HoxA9 siRNA	ucaacaaagaccgagcaaa
HoxB4 siRNA	gaaggaaauucacuacaac
HoxB5 siRNA	gggaguauacggaaacaaa
MLL siRNA I	gcuacugaucuugaaucaa
MLL siRNA II	cgaucaaaugcccgccuaa
scrambled siRNA	agcgugaugcuagcagagg

Tab. 2.6. Verwendete siRNA-Oligonukleotide

2.17. Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

Zur Transfektion mit Plasmid-DNA wurden 3 µg DNA in 150 µl serumfreiem EBM verdünnt und nach Zugabe von 18 µl Superfect-Reagenz (Fa. Qiagen) kurz gevortext und für 10 min inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Transfektions-Ansatz mit 1,2 ml serumhaltigem EBM gemischt und dieser auf die Zellen gegeben. Nach 3-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und frisches Kulturmedium auf die Zellen gegeben. Die Überexpression von Proteinen ist 18-24 h nach Transfektion auf Proteinebene nachweisbar.

2.18. Bestimmung der Proliferation maturer Endothelzellen

Die Proliferationsrate von Zellen kann anhand des Einbaus von Brom-deoxy-Uridin (BrdU) in die zelluläre DNA während der mitotischen S-Phase gemessen werden. Hierzu werden Zellen 30 min mit 10 µM BrdU bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert wobei es zum Einbau des Thymidin-Analogons BrdU in die neu-synthetisierte DNA proliferierender Zellen kommt. Im Anschluss

kann das inkorporierte BrdU mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert werden, was eine durchflußzytometrische Analyse der Zellen mittels FACS im Hinblick auf ihren mitotischen Status ermöglicht. Die Durchführung der BrdU-Analyse erfolgte mit einem kommerziell erwerblichen System (Fa. BD Biosciences) wie im Folgenden am Beispiel einer 6 cm Kulturschale beschrieben.

Durchführung der Bestimmung von Proliferation mittels BrdU

1. Zugabe von 10 µM BrdU zum Kulturmedium und Inkubation der Zellen für weitere 30 min bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit.
2. Abnehmen des Kulturmediums und Waschen der Zellen mit kaltem PBS.
3. Ablösen der Zellen durch Inkubation mit 500 µl Trypsin für 2 min bei 37°C.
4. Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von 3 ml serumhaltigem Kulturmedium.
5. Pelletieren der Zellen durch Zentrifugation (200 x g / 5 min / 4°C).
6. Überstand absaugen und Zellpellet 1x mit kaltem PBS waschen.
7. Pellet in 100 µl Cytofix/Cytoperm-Puffer resuspendieren, dann 15 min bei RT inkubieren.
8. Zugabe von 1ml Perm/Wash-Puffer und Zentrifugation (1500 x g / 3 min / 4°C)
9. Überstand absaugen und Pellet in 100 µl Cytoperm Plus-Puffer resuspendieren, dann 10 min auf Eis inkubieren.
10. Zugabe von 1 ml Perm/Wash-Puffer und Zentrifugation (1500 x g / 3 min / 4°C)
11. Überstand absaugen und Pellet in 100 µl Cytofix/Cytoperm-Puffer resuspendieren und 5 min auf Eis inkubieren.
12. Zugabe von 1 ml Perm/Wash-Puffer und Zentrifugation (1500 x g / 3 min / 4°C)
13. Überstand absaugen und Pellet in 100 µl DNase I (300 µg/ml) resuspendieren und 1h bei 37°C inkubieren
14. Zugabe von 1 ml Perm/Wash-Puffer und Zentrifugation (1500 x g / 3 min / 4°C)
15. Überstand absaugen und Pellet in 50 µl Perm/Wash-Puffer resuspendieren, dann Zugabe von 20 µl anti-BrdU-Antikörper (bzw. Isotyp-Kontrolle) und Inkubation 20 min bei RT.
16. Zugabe von 1 ml Perm/Wash-Puffer und Zentrifugation (1500 x g / 3 min / 4°C)
17. Überstand absaugen und Zugabe von 10 µl 7AAD, dann 10 min bei RT Inkubieren
18. Zugabe von 300 µl PBS und Messung der Proben mittels FACS

2.19. Messung der Apoptoserate reifer Endothelzellen

Apoptotische Zellen lassen sich anhand typischer Charakteristika, die unter anderem morphologische Veränderungen beinhalten, charakterisieren. Zu diesen Veränderungen zählen unter anderem Veränderungen der Plasmamembran, wie z.B. der Verlust der Membranasymmetrie, eine Kondensation des Zytoplasmas und des Kerns sowie eine internukleosomale Spaltung der DNA. Zu den frühen Ereignissen der Apoptose zählt der Transport des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) von der Membrannenseite an die Membranaußenseite. Diese Exposition von PS kann durch Annexin V, einem 35-36 kDa großen Phospholipid-bindenden Protein mit hoher Affinität für PS, detektiert werden. Die Bindung von Annexin V an PS kann anschließend durchflußzytometrisch analysiert werden. Für die Untersuchungen wurden die Zellen mit 500 µl Trypsin abgelöst (2 min, 37°C) und die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Kulturmedium abgestoppt. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 50 µl Annexin-V-Binding-Puffer (Fa. PharMingen) resuspendiert und mit 2,5 µl PE-konjugierten Annexin V (Fa. PharMingen) sowie 2,5 µl 7-AAD zum Nachweis nekrotischer Zellen (Fa. PharMingen) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Annexin V-Binding-Puffer auf 300 µl aufgefüllt und sofort mittels FACS analysiert.

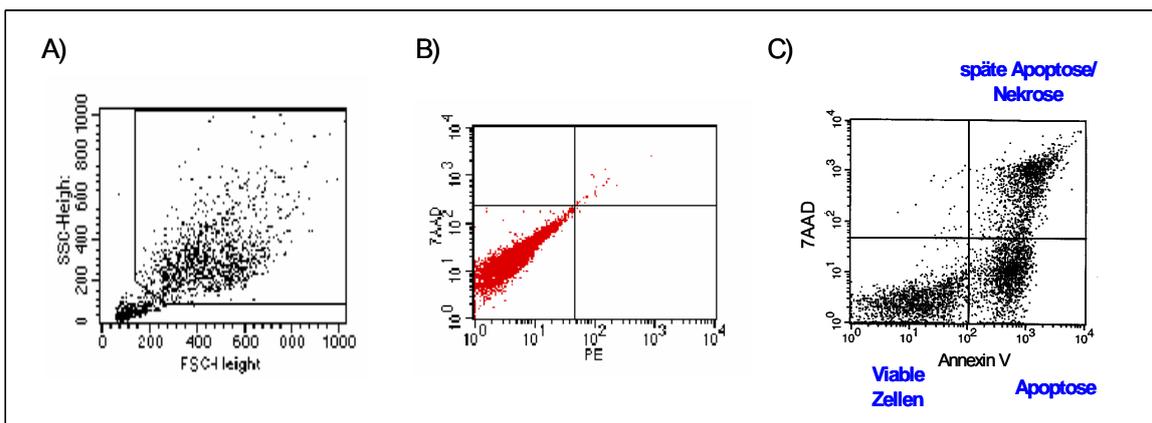


Abb. 2.2. Bestimmung der Apoptoserate mittels FACS. A) Sortierung der Zellen nach Größe. B) Ungefärbte, in A eingeschlossene Kontrolle. C) Sortierung nach Annexin V (PE) und 7-AAD markierten Zellen.

2.20. Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Mit Reporter-Gen-Systemen kann unter anderem der regulative Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Transaktivierung spezifischer Promotoren *in vitro* untersucht werden. Hierzu wird der zu untersuchende Promoter oder Promoterbereich vor ein so genanntes Reporter-Gen kloniert, was dessen Expression unter die genetische Kontrolle dieses Promoters bringt. Das Enzym Luciferase ist ein häufig verwendetes Reporter-Gen, da die Synthese der Luciferase durch Inkubation des Zell-Lysats mit deren Substrat Luciferin in einer Enzymreaktion resultiert, welche luminometrisch gemessen werden kann. Die Transaktivierung des Promoters kann somit indirekt quantifiziert werden. Für die durchgeführten Reporter-Gen-Studien wurden HEK293 Zellen mit einem Luciferase-Reporter-Gen-Plasmid unter der Kontrolle eines 3,5 kb langen Fragments des eNOS-Promoters (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Huige Li, AG Förstermann (Li et al., 1998)) sowie einem HoxA9wt-Plasmid und einem Leerplasmid (pcDNA3.1, Fa. Invitrogen) oder Meis1wt-Plasmid kotransfiziert. 24 h nach Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen durch Inkubation mit 1x Reporter-Puffer (Fa. Promega) und Schockgefrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff. Nach Zentrifugation des Lysats (2 min, 1000 x g, 4°C) erfolgte die Bestimmung der Luciferase-Aktivität im Überstand mittels eines Luminometers (Lumat LB9510, Fa. Berthold). Hierzu wurden je 100 µl Luciferase-Reagenz mit 20 µl Proteinlysate gemischt und die Lumineszenz für 10 sek. im Luminometer gemessen. Der erhaltene Wert wurde als „relative light units“ (RLU) angegeben. Von diesem Wert wurde anschließend der Messwert einer Probe ohne Proteinlysate (nur Reporter-Puffer) als Hintergrund abgezogen. Um die Luciferase-Aktivität zu berechnen wurde der Proteingehalt der einzelnen Proben wie unter Punkt 2.10 beschrieben gemessen und so die eingesetzte Proteinmenge ermittelt. Die Luciferase-Aktivität ergibt sich aus dem Quotienten der RLU geteilt durch die eingesetzte Proteinmenge als RLU/µg Protein.

2.21. Bestimmung der migratorischen Kapazität maturer Endothelzellen mittels „*Scratched Wound*“ Assay

Für den „*Scratched Wound*“ - Assay wurden HUVEC in Kulturschalen (\varnothing 6 cm, Fa. Greiner), 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 den Zell-Monolayer geschabt (engl.: *scratch*), das Kulturmedium erneuert und der Abstand zwischen den Enden der intakten Endothelschichten an 5 festgelegten Punkten im Abstand von je 5 mm mikroskopisch ausgemessen. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24h kultiviert und erneut die Breite der Wunde an denselben 5 Punkten ausgemessen. Der Aufbau des „*Scratched Wound*“ Assay ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt (Abb. 2.3).

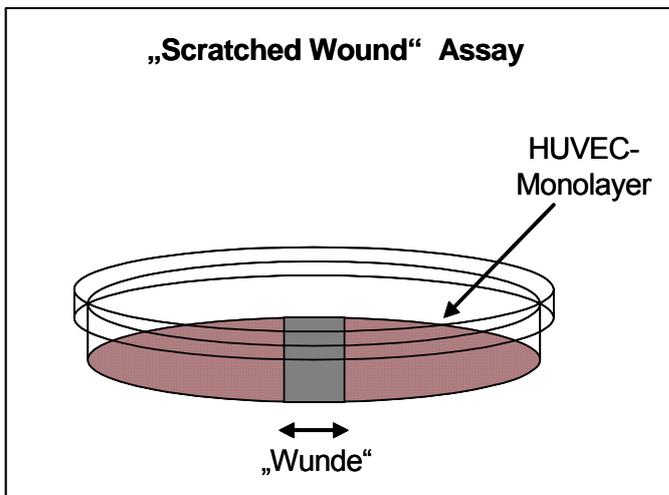


Abb. 2.3. Schematische Darstellung des „*Scratched Wound*“ Assay

2.22. In vitro Matrigel Assay

Der in vitro Matrigel Assay dient zur Analyse des angiogenen Potentials maturer Endothelzellen indem man die Fähigkeit der Zellen zur Selbstorganisation und Ausbildung gefäßartiger Strukturen auf einer 2-dimensionalen Matrigel-Matrix untersucht. Hierbei werden 1×10^5 HUVEC auf eine mit 200 μ l Matrigel (Fa. BD Biosciences) beschichteten 12-well Platte (Fa. Greiner) ausgebracht und für 24 h inkubiert. Die Analyse der gebildeten gefäßartigen Strukturen erfolgte softwaregestützt mittels Durchlichtmikroskop (Mikroskop Axiovert 100, AxioCam, Axiovision Software, Fa. Carl Zeiss) anhand von je 5 Gesichtsfeldern durch Messung der Gesamtlänge gebildeter gefäßartiger Strukturen.

2.23. Der Sphäroid-Assay

Ähnlich dem in vitro Matrigel Assay stellt auch der von Korff et al. entwickelte Sphäroid-Assay (Korff and Augustin, 1998) eine Möglichkeit zur Untersuchung endothelialer Funktionen dar, wobei der Aufbau dieses Assays so gewählt ist, dass insbesondere die als „Sprouting“ bezeichnete Fähigkeit zur Ausbildung 3-dimensionaler gefäßartiger Strukturen der Endothelzellen aus einem multizellulären Endothelzell-Verband heraus untersucht werden kann. Aufgrund dieser 3-Dimensionalität kommt das Verhalten der Endothelzellen der in vivo Situation näher als der 2-dimensionale in vitro Matrigel Assay. Für den Sphäroid-Assay wurden HUVEC in EBM Kulturmedium mit 0,2% (w/v) Carboxymethylcellulose (Fa. Sigma) resuspendiert und je 400 HUVEC pro well in eine 96-well, nicht-adhäsive U-Boden Platten (Fa. Greiner) ausgebracht. Während einer 18-stündigen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kommt es zur Aggregation der Endothelzellen und Ausbildung eines runden Sphäroids. Anschließend wurden die Sphäroide mit einem sterilen Plümper (Fa. Copan) geerntet und durch Zentrifugation mit niedriger g-Kraft (2 min, 200 x g, RT) pelletiert. Die Sphäroide einer 96-well Platte wurden dann in 1 ml Suspension (80% Kulturmedium mit 0,2% (w/v) Carboxymethylcellulose und 20% fötalem Kälberserum) vorsichtig resuspendiert und im Verhältnis 1:1 mit

einer Kollagen-Lösung (adjustiert auf pH: 7,4) gemischt. Nach 2-minütiger Vorinkubation bei RT wurde je 1 ml der Sphäroid-Suspension (enthält 48 Sphäroide / entspricht einer Versuchs-Bedingung) in eine 24-well Platte (Fa. Greiner) überführt und sofort für weitere 5 min bei 37°C inkubiert, um die Polymerisation des Kollagens zu induzieren. 30 min nach Polymerisation der letzten Versuchsbedingung erfolgte entweder eine Stimulation mit bFGF (30 ng/ml) oder VEGF (50 ng/ml) oder die Zugabe von 100 µl Kulturmedium ohne Stimulus (Basalbedingung). Nach 24-stündiger Inkubation der Sphäroide kann die kumulative Gesamtlänge der gebildeten Sprouts pro Sphäroid als Maß für das angiogenetische Potential der Endothelzellen mikroskopisch ausgewertet werden. Der Aufbau des Sphäroid-Assays ist in der folgenden Abbildung noch einmal schematisch dargestellt (Abb. 2.4).

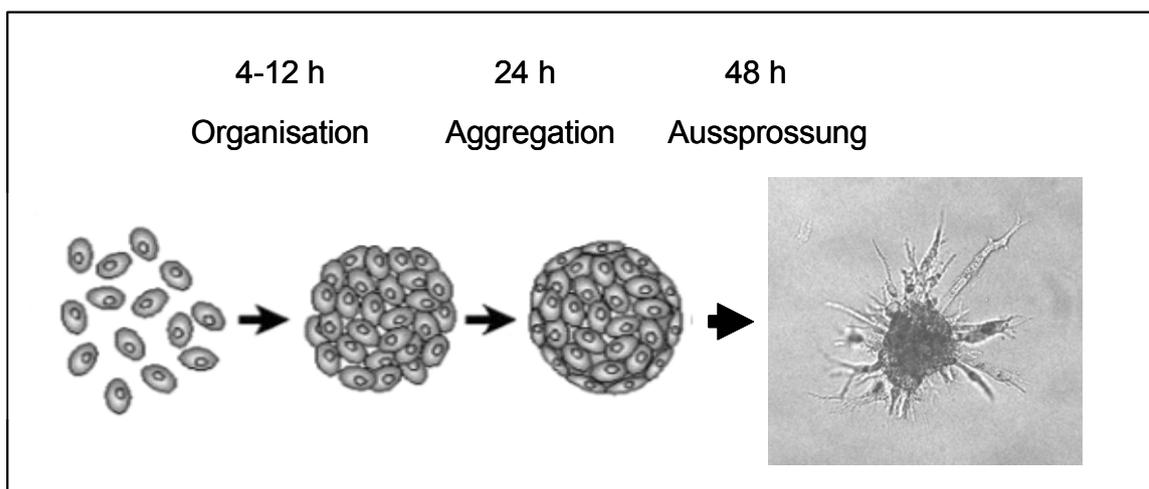


Abb. 2.4. Schematische Darstellung der Sphäroid-Bildung maturer Endothelzellen (modifiziert nach Korff et al., 1998) (Korff and Augustin, 1998)

2.24. *Shear Stress Exposition*

HUVEC (4×10^5 Zellen) wurden in 6 cm Kulturschalen (Fa. Falcon) ausgebracht und mit einem konischen Kegelplattenviskosimeter laminarer Schubspannung von 15 dynes/cm^2 für verschiedene Zeitpunkte exponiert. Durch die gleichmäßige Rotation des Konus im Kulturmedium entsteht eine definierte

laminare Schubspannung τ (*Shear Stress*), die auf den Endothelzell-Monolayer wirkt. Die verwendeten Apparaturen wurden von Dr. R. Popp und Prof. R. Busse (Universität Frankfurt, Physiologie) zur Verfügung gestellt. Die *Shear Stress* Applikation ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt (Abb. 2.5).

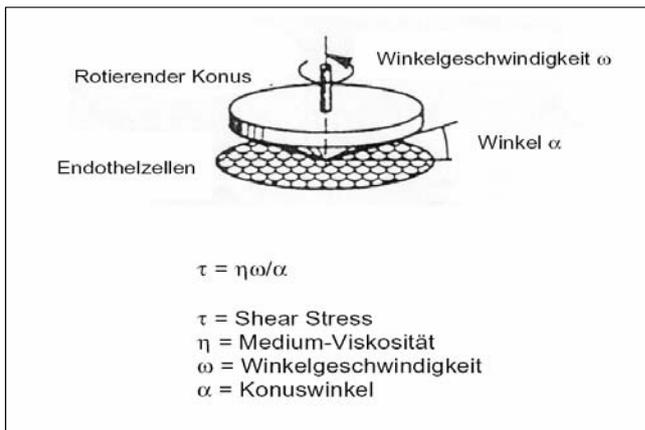


Abb. 2.5. *Shear Stress* Applikation mit einem konischen Kegelpplatten-Viskosimeter (modifiziert nach Noris et al., 1995) (Noris et al., 1995)

2.25. Statistik

Die erhobenen Daten sind als Mittelwerte \pm 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 bei Vergleich zweier Werte oder einer Varianzanalyse mit ANOVA und folgendem LSD (Least Significant Difference)-Test mit der Software von SPSS bei Signifikanzberechnungen zwischen mehreren Werten. Ein p-Wert von weniger als 0,05 (*) wurde als signifikant bezeichnet.

3. Ergebnisse

Um die Relevanz von Hox-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen zu untersuchen wurde in den folgenden Experimenten zunächst deren Expression, Lokalisation und Regulation sowie die Auswirkung der genetischen Suppression auf verschiedene Funktionen von Endothelzellen untersucht. Im Anschluss erfolgten dann Untersuchungen zur Bedeutung der Histon-Methyltransferase MLL als transkriptioneller Regulator von Hox-Transkriptionsfaktoren für die Funktion von Endothelzellen.

3.1. Analyse der Expression von Hox-Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Zelltypen

Zur Analyse der Funktion von Homeobox-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen wurde zunächst die mRNA-Expression von verschiedenen Hox-Transkriptionsfaktoren im Microarray untersucht. Neben humanen venösen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) wurden auch humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVEC) untersucht. Da sowohl CD34⁺ hämatopoetische Progenitorzellen, als auch endothelialen Progenitorzellen aus Peripherblut (EPC) und humane mononukleären Zellen (MNC) in vitro zu Endothelzellen differenziert werden können (Asahara et al., 1997; Fernandez Pujol et al., 2000; Schmeisser et al., 2001), wurde die Hox-Expression auch in diesen Zelltypen als potentiellen endothelialen Vorläuferzellen untersucht (Abb. 3.1). Fokussiert wurde dabei auf Hox-Transkriptionsfaktoren von potentieller oder bekannter Relevanz für die Endothelzellbiologie. Es zeigte sich, dass die Hox-Transkriptionsfaktoren A9, B5 und B7 am stärksten in HUVEC exprimiert sind (Abb. 3.1 a-c), während sich die höchste Expression von HoxD3 in mikrovaskulären Endothelzellen zeigt (Abb. 3.1d). In EPC sind alle untersuchten Hox-Transkriptionsfaktoren im Vergleich zu HUVEC nur schwach exprimiert (Abb. 3.1 a-d).

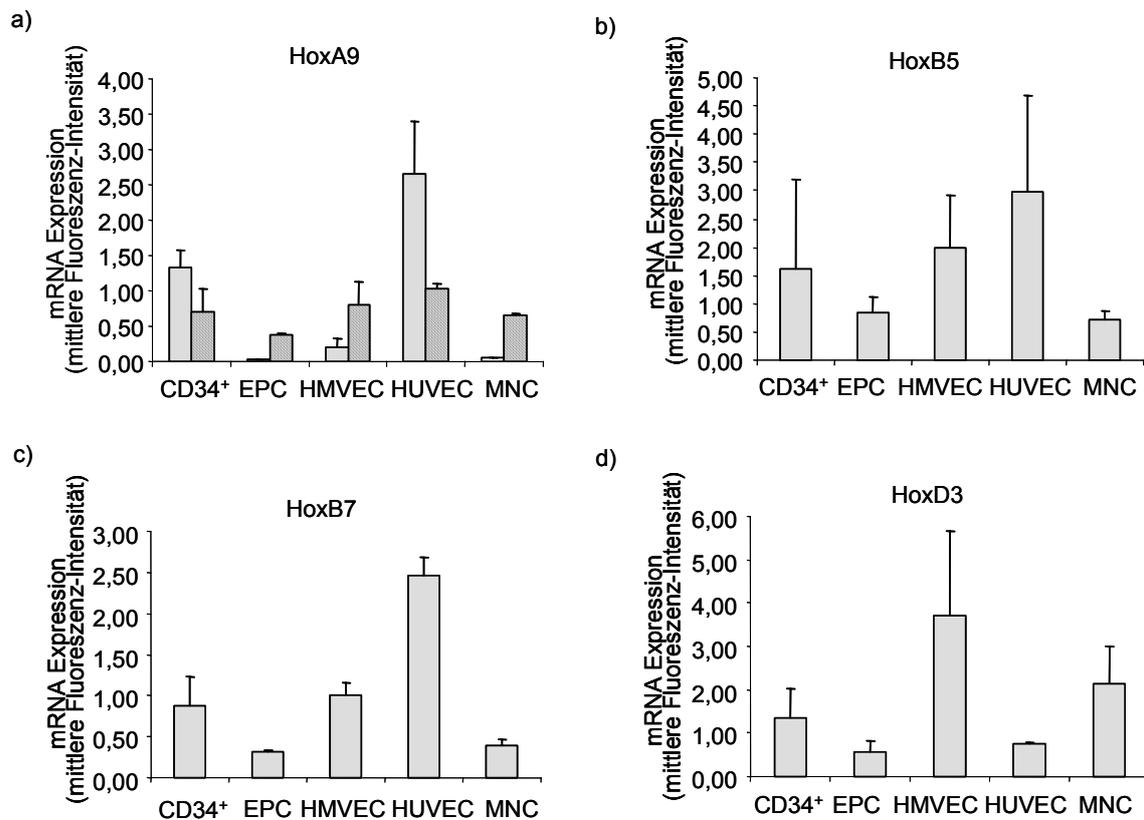


Abb. 3.1. Differentielle Expression verschiedener Hox-Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Zelltypen. Microarray-Expressionsanalyse verschiedener Hox-Transkriptionsfaktoren. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM; n=3-4. Der Hox-Transkriptionsfaktor HoxA9 war in dieser Datenbank mit 2 unterschiedlichen „Sonden“ vertreten.

Um die mittels Microarray erhobenen Daten zur differentiellen Expression der verschiedenen Hox-Transkriptionsfaktoren zu verifizieren, wurden zusätzlich RT-PCR Analysen durchgeführt (Abb. 3.2). Neben den im Microarray enthaltenden Hox-Transkriptionsfaktoren A9, B5, B7 und D3, wurde zusätzlich die Expression von HoxB4 und HoxB9 untersucht. In Übereinstimmung mit den Microarray-Daten, zeigte sich auch in der RT-PCR die jeweils größte Expression der Hox-Transkriptionsfaktoren A9, B5 und B7 in HUVEC verglichen mit HMVEC und EPC (Abb. 3.1 und 3.2 a/b/d/e). Die HoxD3 Expression war zwischen HUVEC und HMVEC nicht unterschiedlich, jedoch deutlich verringert in EPC (Abb. 3.2 a/g). Die im Microarray nicht enthaltenden Hox-Transkriptionsfaktoren HoxB4 und HoxB9 sind in differenzierten

Endothelzellen (HUVEC) exprimiert, wobei die Expression von HoxB9 nur in HUVEC detektiert werden konnte (Abb. 3.2 a/c/f). Endotheliale Progenitorzellen zeigten für alle untersuchten Hox-Transkriptionsfaktoren mit Ausnahme von HoxB4, das deutlich niedrigste Expressionslevel (Abb. 3.2 a-g).

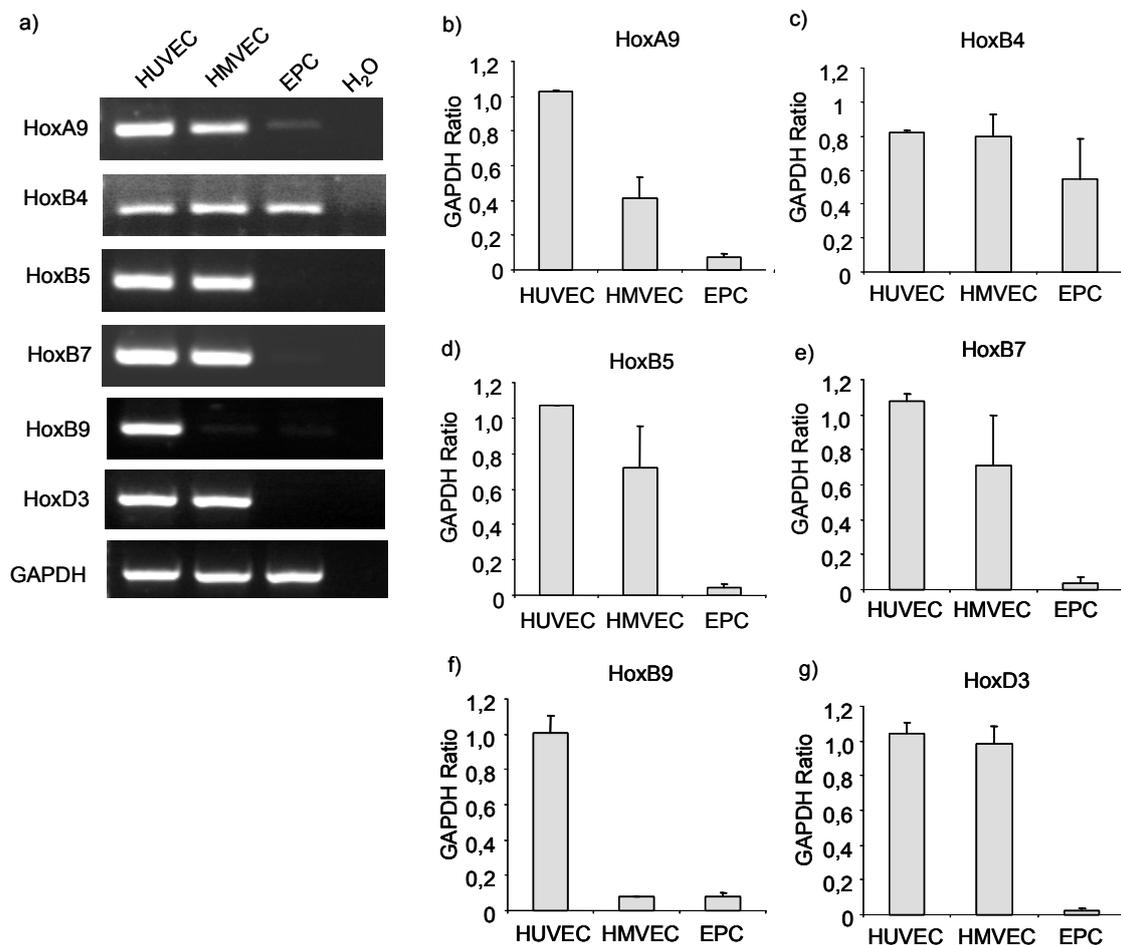


Abb. 3.2. Semiquantitative Analyse der Hox-Expression in verschiedenen Zelltypen. A-G) Die Expression verschiedener Hox-Transkriptionsfaktoren in HUVEC, HMVEC oder EPC wurde mittels RT-PCR untersucht. A) Ein repräsentatives Gel ist gezeigt. GAPDH diente als Ladungskontrolle. B) Semiquantitative Analyse der Hox-Expression. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. n=2.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass differenzierte Endothelzellen eine Vielzahl von Hox-Transkriptionsfaktoren exprimieren, was eine Relevanz für endotheliale Zellfunktionen nahe legt.

3.2. Untersuchung der Funktion verschiedener Hox-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen

Nach der Analyse der Expression verschiedener Hox-Transkriptionsfaktoren, wurde nun deren funktionelle Relevanz in Endothelzellen untersucht. Grundsätzlich bieten sich zur Funktionsanalyse von Transkriptionsfaktoren zwei Möglichkeiten an. Zum einen kann man durch ektopische Überexpression des Transkriptionsfaktors einen Funktionsgewinn (engl.: *gain of function*) oder aber durch Suppression der genetischen Information, einen Funktionsverlust (engl.: *loss of function*) simulieren. Da sowohl HoxA9, als auch HoxB4 und HoxB5 in HUVEC exprimiert sind, erfolgten die Untersuchungen zur funktionellen Rolle dieser Hox-Transkriptionsfaktoren nach siRNA-vermittelter Suppression der genetischen Information auf mRNA-Ebene. Wie in Abb. 3.3 dargestellt, führte die Transfektion von HUVEC mit siRNA zu einer deutlichen und für das jeweilige Zielgen spezifischen Reduktion der mRNA Expression.

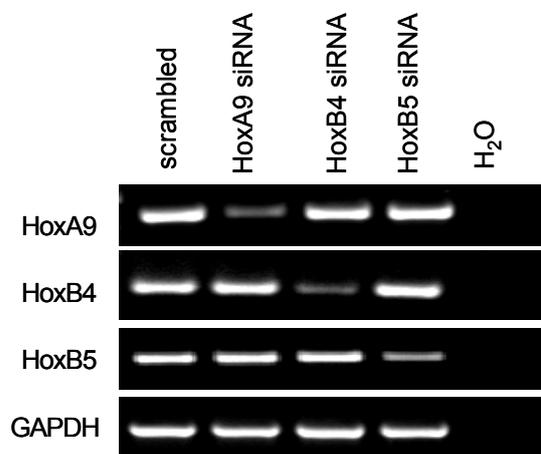


Abb. 3.3. Spezifität der verwendeten siRNAs. HUVEC wurden mit siRNAs gegen verschiedene Hox-Transkriptionsfaktoren transfiziert. 24h nach Transfektion wurde die Expression der Hox-Transkriptionsfaktoren mittels RT-PCR untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Agarosegel. GAPDH diente als Gleichladungskontrolle.

3.2.1. Der Hox-Transkriptionsfaktor HoxB5 beeinflusst die Morphologie von Endothelzellen

Endothelzellen lagern sich im konfluenten Verband typischerweise so aneinander an, dass man von einer polygonalen, pflastersteinartigen Morphologie spricht. Um den Einfluss von Hox-Transkriptionsfaktoren auf die Morphologie von Endothelzellen zu untersuchen, wurde die genetische Information verschiedener Hox-Transkriptionsfaktoren durch Transfektion von HUVEC mit siRNA supprimiert.

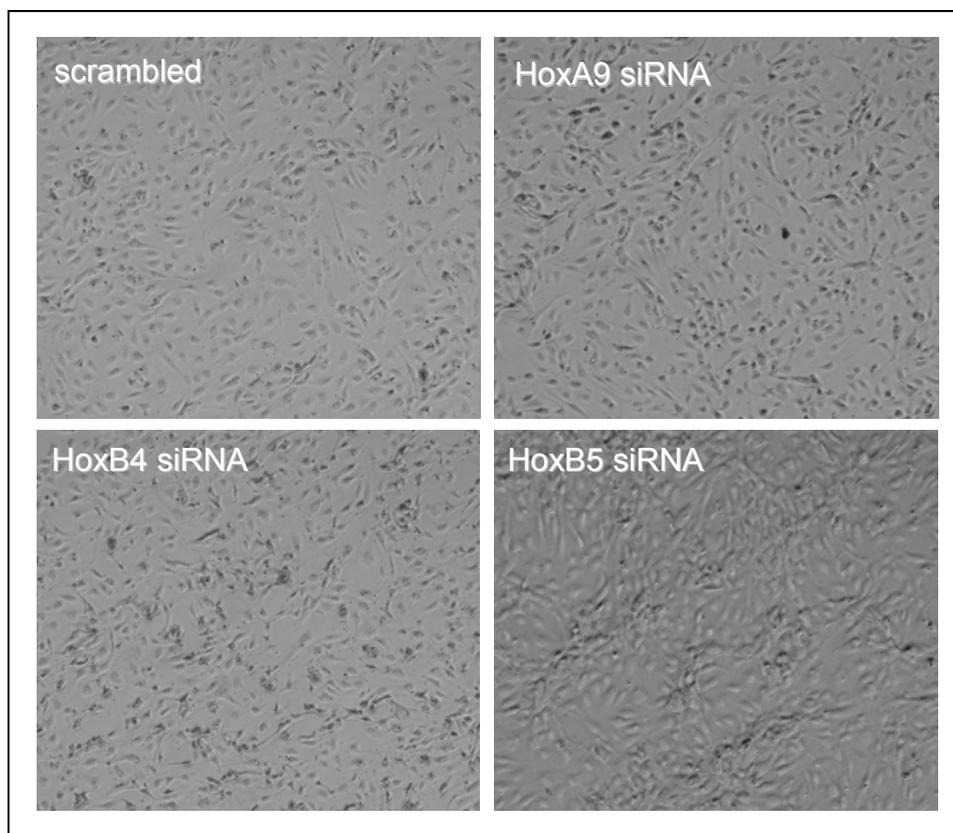


Abb. 3.4. Morphologie von HUVEC nach Transfektion mit Hox siRNAs. HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder siRNAs gegen verschiedene Hox-Transkriptionsfaktoren transfiziert. 24h nach Transfektion wurde die Zellmorphologie durchlichtmikroskopisch analysiert (5x Vergrößerung), n>3.

Die Transfektion mit scrambled Oligonukleotiden bzw. siRNAs gegen HoxA9 oder HoxB4 hatte keinen sichtbaren Effekt auf die Zellmorphologie (Abb. 3.4).

Die Transfektion mit HoxB5 siRNA resultierte hingegen in einer deutlichen morphologischen Veränderung des Zellmonolayers. So nahmen die HUVEC nach Behandlung mit HoxB5 siRNA eine elongierte, leicht spindelförmige Morphologie an (Abb. 3.4). Da die Morphologie von Endothelzellen maßgeblich über den kontraktilem Apparate des Actinomyosin-Skeletts reguliert wird, wurde das Actin Zytoskelett der Endothelzellen durch Inkubation mit fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin angefärbt. Es zeigte sich, dass die Suppression von HoxB5 in einer Veränderung der Actin-Organisation unter Zunahme an Actin Stress-Fasern resultiert (Abb. 3.5).

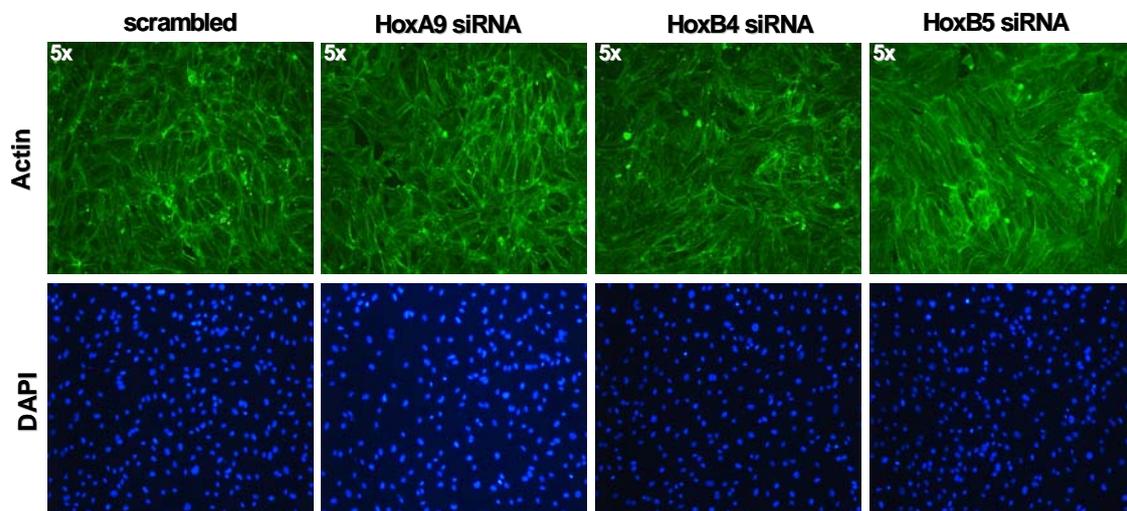


Abb. 3.5. Die genetische Suppression von HoxB5 resultiert in einer Reorganisation des Actin Zytoskeletts. HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder siRNAs gegen verschiedene Hox-Transkriptionsfaktoren transfiziert. 24h nach Transfektion erfolgte die Färbung des Actin Zytoskeletts mittels Alexa-Fluor 488-Phalloidin sowie der Zellkerne mittels DAPI (5x Vergrößerung).

Die interzelluläre Übertragung mechanischer Kräfte durch den Actinomyosin-Apparat erfolgt durch Zell-Adhäsions-Moleküle der Cadherin-Familie. Da sich die 2-dimensionale Morphologie der Zellen im konfluenten Verband durch Anfärben der Zell-Zell-Kontakte besser darstellen lässt, wurden neben dem Actin Zytoskelett auch die Zell-Zell-Kontakte nach Suppression der verschiedenen Hox-Transkriptionsfaktoren untersucht. Hierzu wurde das von HUVEC exprimierte VE-Cadherin mit einem fluoreszenzgekoppeltem

Antikörper immunzytochemisch angefärbt. Nach Transfektion mit siRNA gegen HoxA9 oder HoxB4 siRNA blieb die Morphologie der lateralen VE-Cadherin Zell-Zell Kontakte im Vergleich zu scrambled transfizierten Kontrollzellen erhalten (Abb. 3.6). Die siRNA gegen HoxB5 induzierte eine starke Elongation der Endothelzellen bei gleichzeitigem Verlust der typischen Pflasterstein-Morphologie (Abb. 3.6).

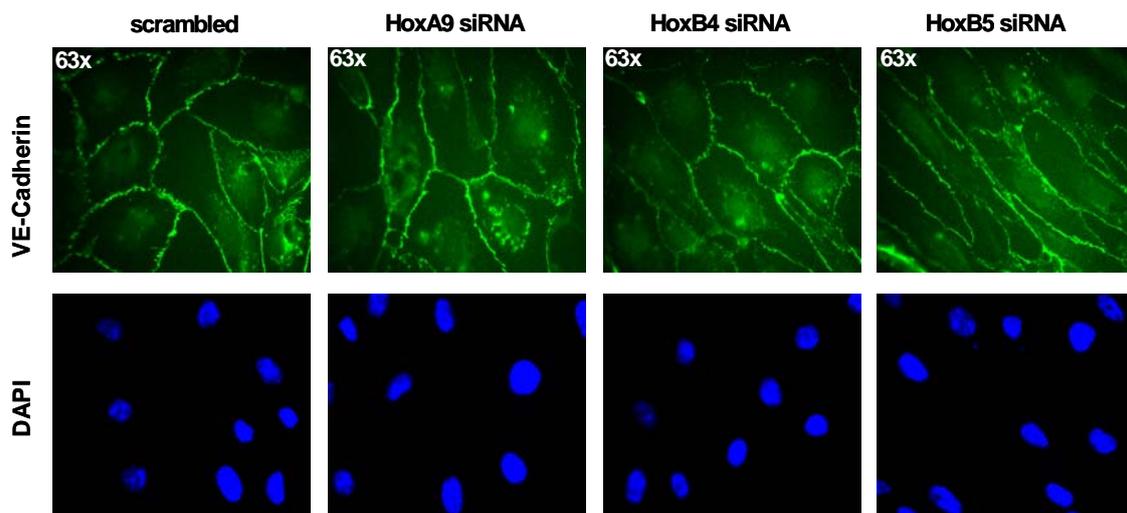


Abb. 3.6. Analyse der lateralen Zell-Zell Kontakte. HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder siRNAs gegen verschiedene Hox-Transkriptionsfaktoren transfiziert. 24h nach Transfektion erfolgte der immunzytochemische Nachweis des humanen VE-Cadherins (63x Vergrößerung).

3.2.2. Einfluss von Hox-Transkriptionsfaktoren auf die *in vitro* Gefäßbildung

Im folgenden Abschnitt sollte nun die Relevanz der Hox-Transkriptionsfaktoren A9, B4 und B5 für pro-angiogene Endothelzellfunktionen näher untersucht werden. Hierzu wurde zunächst die Fähigkeit von Endothelzellen zur Ausbildung gefäßartiger Strukturen mittels Matrigel-Assay untersucht. Bei diesem Vorgang der Selbstorganisation von Endothelzellen zu netzartigen gefäßähnlichen Strukturen sind neben Zell-Matrix Adhäsionsmolekülen der Integrin-Familie auch Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle wie PECAM oder das zuvor untersuchte VE-

Cadherin von Bedeutung. Wie für HoxA9 bereits beschrieben, resultiert siRNA-vermittelte Suppression in einer signifikanten Hemmung der Gefäßbildungsfähigkeit (Abb. 3.7 a/b) und (Bruhl et al., 2004). Die Transfektion mit siRNA gegen HoxB4 führt hingegen zu einer leichten, jedoch signifikanten Zunahme sowohl der Gesamtlänge an Gefäßstrukturen, als auch der Anzahl an Verzweigungspunkten, wobei die Gefäßstrukturen weniger differenziert sind. Die Transfektion mit siRNA gegen HoxB5 hatte keinen Effekt auf die Gefäßstrukturbildung (Abb. 3.7 a-c).

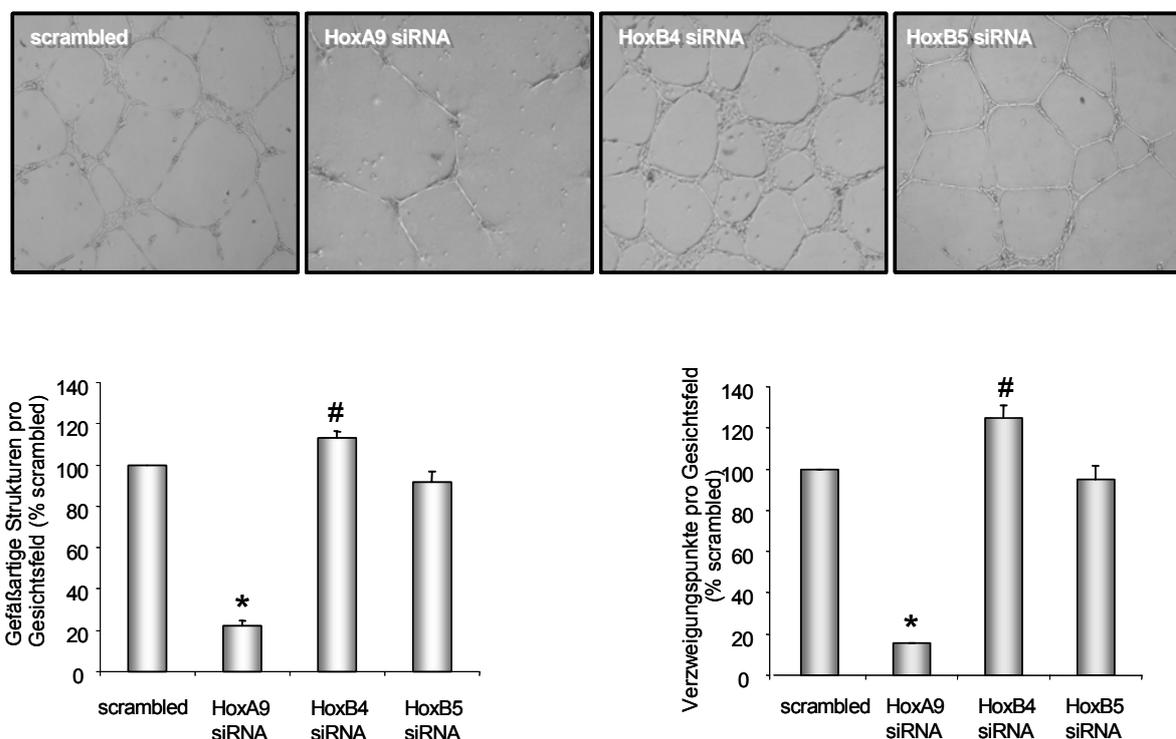


Abb. 3.7. Die Hox-Transkriptionsfaktoren HoxA9 und HoxB4 beeinflussen die Fähigkeit von Endothelzellen zur Ausbildung gefäßartiger Strukturen in vitro.

HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder siRNAs gegen verschiedene Hox-Transkriptionsfaktoren transfiziert. A) Repräsentative gefäßartige Strukturen sind dargestellt. B/C) Die Quantifizierung von Länge und Verzweigungspunkten der gefäßartigen Strukturen erfolgte durch Analyse von je 5 Gesichtsfeldern pro Ansatz. B) Gesamtgefäßlänge; Daten sind Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,01$ vs. scrambled; # $p < 0,05$ vs. scrambled; $n = 3$. C) Verzweigungspunkte; Daten sind Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,01$ vs. scrambled; # $p < 0,05$ vs. scrambled; $n = 3$.

3.2.3. Einfluss von Hox-Transkriptionsfaktoren auf das Sprouting von Endothelzellen

Die Untersuchung der 2-dimensionalen Ausbildung gefäßartiger Strukturen auf einer Matrigel Matrix wird zur Analyse des angiogenetischen Potentials von Endothelzellen herangezogen. Die so genannte *in vitro* „tube formation“ kommt der 3-dimensionalen *in vivo* Situation jedoch nur begrenzt nahe. Aus diesem

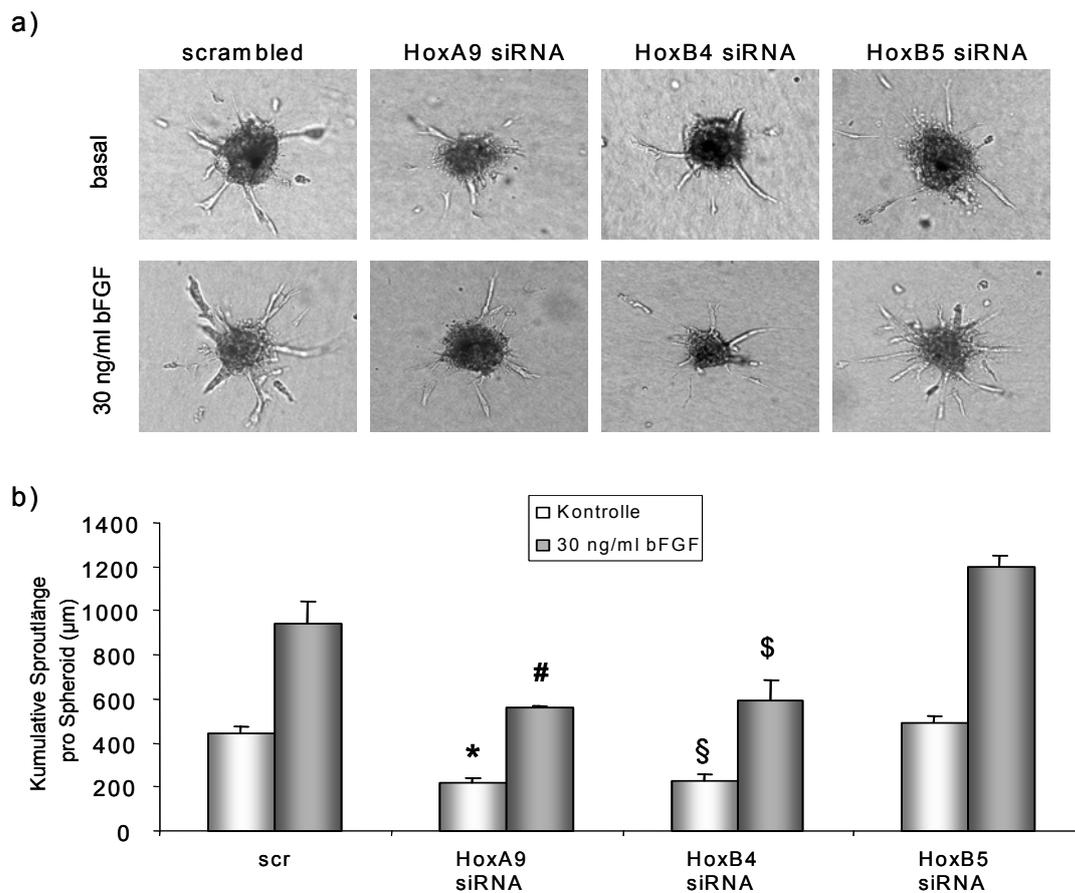


Abb. 3.8. Relevanz von Hox-Transkriptionsfaktoren für das *in vitro* Sprouting von Endothelzellen. HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder siRNAs gegen verschiedene Hox-Transkriptionsfaktoren transfiziert. Das *in vitro* Sprouting wurde mittels Sphäroid-Assay analysiert. A) Darstellung repräsentativer Sphäroide. B) Quantitative Analyse der kumulativen Sproutlänge pro Sphäroid. Daten sind Mittelwerte±SEM; * $p < 0,05$ vs. scrambled; # $p < 0,01$ vs. scrambled + bFGF; \$ $p < 0,01$ vs. scrambled; \$ $p < 0,05$ vs. scrambled + bFGF; $n = 3-4$.

Grund wurde mit einer weiteren Methode zusätzlich die Fähigkeit zur 3-dimensionalen Ausbildung gefäßartiger Strukturen (engl.: *sprouting*) der Endothelzellen nach Hox-Suppression in einem „Sphäroid-Modell“ untersucht. Dabei wird den Endothelzellen in einem ersten Schritt das Aggregieren zu einem 3-dimensionalen Sphäroid ermöglicht. Anschließend werden die so entstandenen Sphäroide dann in ein semisoliden Gel überführt, in dem ein 3-dimensionales Sprouting der Endothelzellen untersucht werden kann (Korff and Augustin, 1998). Im Vergleich zu scrambled transfizierten Kontrollzellen, führte die Transfektion mit siRNA gegen HoxA9 oder HoxB4 zu einer signifikanten Hemmung des Sprouting von HUVEC um ca. 50% sowohl unter Basalbedingungen, als auch nach Stimulation mit dem pro-angiogenen Wachstumsfaktor bFGF. Die Transfektion mit siRNA gegen HoxB5 zeigte keinen Effekt auf das Sprouting (Abb. 3.8 a/b).

3.2.4. Untersuchung von Proliferation und Apoptose

Mit den vorangegangenen Methoden wurden funktionelle Aspekte wie in vitro Gefäßbildung und Sprouting nach Hox-Suppression untersucht. Da eine Reduktion des angiogenetischen Potentials in diesen Assays z.B. auch durch einen Anstieg der Endothelzell-Apoptose zu erklären wäre, wurden nun auch die Apoptose und die Proliferation von HUVEC nach siRNA-Transfektion untersucht. Die Endothelzell-Proliferation wurde, wie unter 2.1.8 beschrieben, nach Inkorporation des Thymidin-Analogons Brom-deoxy-Uridin (BrdU) mittels FACS in siRNA-transfizierten Zellen analysiert. Es zeigte sich, dass die Transfektion mit siRNA gegen HoxB5 zu einer signifikant gesteigerten Endothelzell-Proliferation im Vergleich zu scrambled transfizierten Zellen führt. Die siRNA gegen HoxA9 hatte keinen Effekt auf die Endothelzell-Proliferation, während die Transfektion mit siRNA gegen HoxB4 zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der Proliferation führte (Abb. 3.9 a). Die Messung der Endothelzell-Apoptose erfolgte durch Zellfärbung mit dem Farbstoff Annexin V und anschließender Quantifizierung mittels FACS. Es zeigte sich

jedoch kein signifikanter Einfluss auf die Apoptoserate nach Suppression der untersuchten Hox-Transkriptionsfaktoren im Vergleich zu scrambled transfizierten Zellen (Abb. 3.9 b).

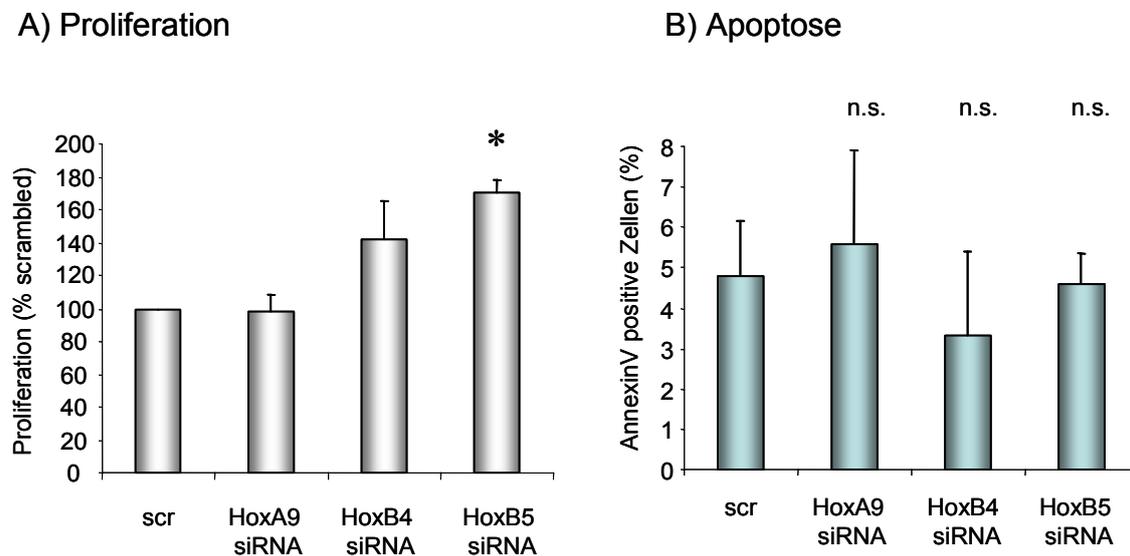


Abb. 3.9. Einfluss von Hox-Transkriptionsfaktoren auf die Endothelzell-Apoptose und Proliferation. HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder siRNAs gegen verschiedene Hox-Transkriptionsfaktoren transfiziert. A) Analyse der Endothelzell-Proliferation mittels BrdU. Daten sind Mittelwerte \pm SEM * $p < 0,05$ vs. scrambled; $n = 4$. B) Analyse der Endothelzell-Apoptose mittels Annexin V. Daten sind Mittelwerte \pm SEM; $n = 3$.

3.2.5. Regulation der eNOS durch Hox-Transkriptionsfaktoren

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) ist funktionell eines der bedeutendsten Enzyme für Endothelzellen und stellt somit einen für Endothelzellen charakteristischen Marker dar. In kürzlich publizierten Studien von Rössig et al., konnte gezeigt werden, dass die eNOS auf transkriptioneller Ebene von HoxA9 reguliert wird und die siRNA-vermittelte Suppression von HoxA9 mit einer Reduktion der eNOS auf Proteinebene einhergeht, was eine direkte Relevanz von Hox-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen aufzeigt (Rossig et al., 2005). Daher wurde nun auch der Einfluss von HoxB4 und HoxB5 auf die eNOS-Expression untersucht. Wie in Abb. 3.10 dargestellt, führt die Transfektion mit

siRNA gegen HoxB5 zu einer signifikanten Reduktion der eNOS im Western-Blot verglichen mit scrambled transfizierten Zellen. Die siRNA gegen HoxB4 hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die eNOS-Expression (Abb. 3.10 a/b).

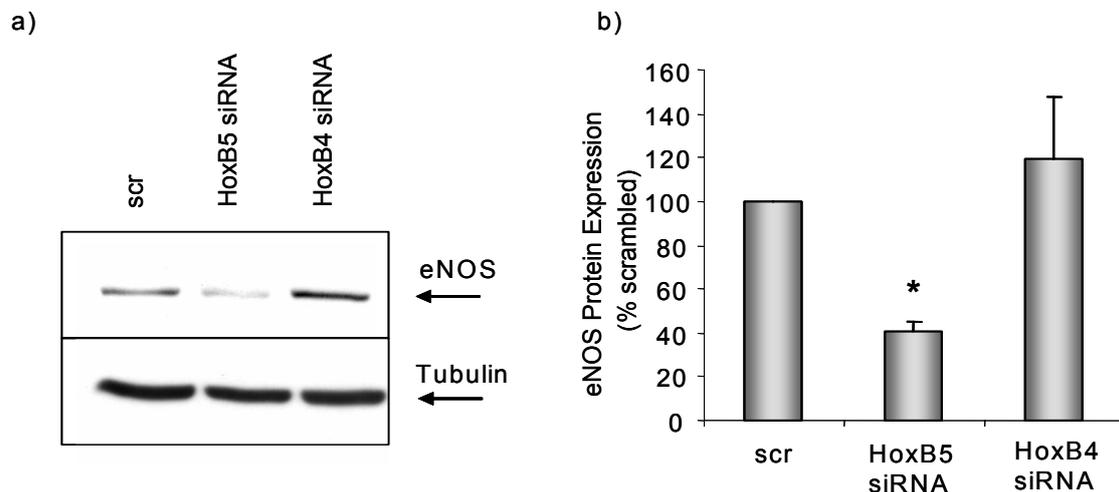


Abb. 3.10. Regulation der eNOS durch HoxB5. HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder siRNA gegen HoxB4 oder HoxB5 transfiziert. 48h nach Transfektion erfolgte die Analyse der eNOS-Expression mittels Western-Blot. A) Repräsentativer Western-Blot. Tubulin dient als Gleichladungskontrolle. B) Quantitative Analyse der eNOS-Expression. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$, $n = 5-8$.

3.3. Regulation der Hox Transkriptionsfaktoren

In den vorangegangenen Abschnitten wurde neben der Hox-Expression insbesondere auch der funktionelle Effekt nach gezielter genetischer Suppression von Hox-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen mittels siRNA untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Hox-Transkriptionsfaktoren unter anderem an der Regulation verschiedener funktioneller Aspekte wie Proliferation oder der angiogenetischen Fähigkeit zur Ausbildung 2- und 3-dimensionaler gefäßartiger Strukturen in vitro beteiligt sind. Diese Daten unterstreichen daher die Relevanz von Hox-Transkriptionsfaktoren für die Endothelzellbiologie. Im

nächsten Abschnitt soll die Lokalisation und Regulation der Hox-Transkriptionsfaktoren näher untersucht werden.

3.3.1. Untersuchung der intrazellulären Hox-Lokalisation

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit von Hox-Transkriptionsfaktoren zur Regulation von Zielgenen auf post-translationaler Ebene durch Veränderung der subzellulären Lokalisation moduliert werden kann (Dintilhac et al., 2004; Kirito et al., 2004; Komuves et al., 2000). So konnte z.B. für HoxA9 gezeigt werden, dass es zwischen Zytosol und Zellkern transloziert (Kirito et al., 2004). Um diesen regulatorischen Aspekt auch in Endothelzellen zu überprüfen, wurde daher die Lokalisation von HoxA9, HoxB4 und HoxB5 in HUVEC untersucht. Hierzu wurden die Hox-Transkriptionsfaktoren als Fusionsproteine mit GFP (engl. *green fluorescent protein*) in HUVEC überexprimiert und deren Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Wie in Abb. 3.11 gezeigt, weisen alle untersuchten Hox-Transkriptionsfaktoren eine nukleäre Lokalisation in HUVEC auf, während GFP alleine sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch lokalisiert. Um eine mögliche regulatorische Translokation der Hox-Transkriptionsfaktoren aus dem Zellkern in das Zytosol zu induzieren, wurden die transfizierten HUVEC mit verschiedenen Stimuli behandelt. Neben den anti-angiogen wirkenden Faktoren Angiostatin und Endostatin, wurde auch das pro-angiogen wirkende VEGF untersucht. Als pro-inflammatorischer Stimulus wurde $TNF\alpha$ eingesetzt. Schließlich wurde noch der Effekt hoher Glucose, als typisches Merkmal der Diabetis sowie der Histon-Deacetylase-Inhibitor Butyrat untersucht. Wie in Abb. 3.11 dargestellt, induzierte keiner der getesteten Stimuli eine Veränderung, der ausschließlich nukleären Lokalisation der Hox-Transkriptionsfaktoren über den gesamten Beobachtungszeitraum.

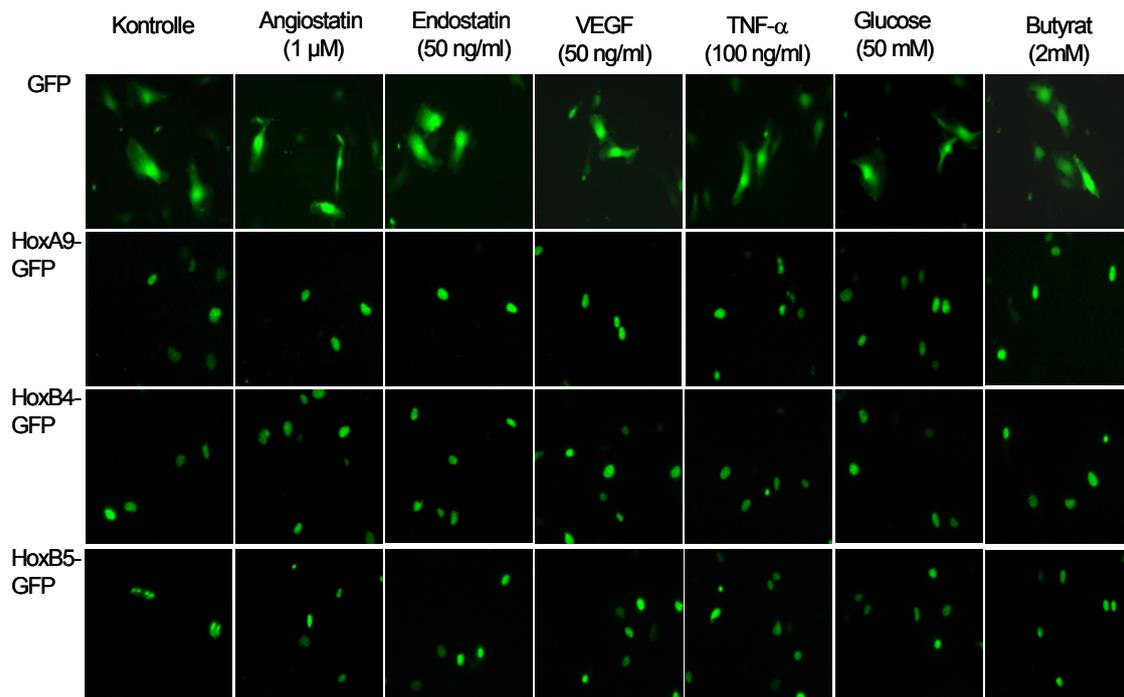


Abb. 3.11. Intrazelluläre Lokalisation von Hox-Transkriptionsfaktoren. HUVEC wurden mit GFP oder verschiedenen Hox-Transkriptionsfaktoren als Fusionsproteine mit GFP transfiziert. Die Stimulation mit Angiostatin (1 μ M), Endostatin (50 ng/ml), VEGF (50 ng/ml), TNF α (100 ng/ml), Glucose (50 mM) oder Butyrat (2 mM) erfolgte über einen Zeitraum von 8h. Die Lokalisation wurde alle 30 min überprüft. Die dargestellten Bilder sind jeweils repräsentativ für den gesamten Beobachtungszeitraum

3.3.2. Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren durch Co-Faktoren

Neben der Lokalisation der Hox-Transkriptionsfaktoren spielen, wie unter Kapitel 1.3.2.1 und 1.3.2.2 beschrieben, auch transkriptionelle Co-Faktoren der Meis und PBX-Familie eine wichtige Rolle bei der Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren. Diese können sowohl direkt die Funktion von Hox-Transkriptionsfaktoren durch Modulation der Zielsequenz-Spezifität, als auch indirekt durch Beeinflussung ihrer intrazellulären Lokalisation regulieren. Die im folgenden Abschnitt durchgeführten Untersuchungen befassen sich daher neben der Expression dieser Co-Faktoren auch mit deren Einfluss auf die Funktion von Hox-Transkriptionsfaktoren.

3.3.2.1. Differentielle Expression von Hox Co-Faktoren der Meis- und PBX-Familie

Als Ausgangspunkt für funktionelle Untersuchungen der Hox Co-Faktoren wurde zunächst deren Expression in verschiedenen Zelltypen untersucht. Wie zuvor unter Kap. 3.1.1 beschrieben diente auch hier eine Microarray-Datenbank als Grundlage für die Expressionsanalyse. Wie in Abb. 3.12 a/b gezeigt, sind Meis1, Meis2 und PBX1 am stärksten in mikrovaskulären Zellen und HUVEC exprimiert. PBX2 ist am stärksten in Monozyten exprimiert während PBX3 eine ähnlich starke Expression in allen Zelltypen aufweist.

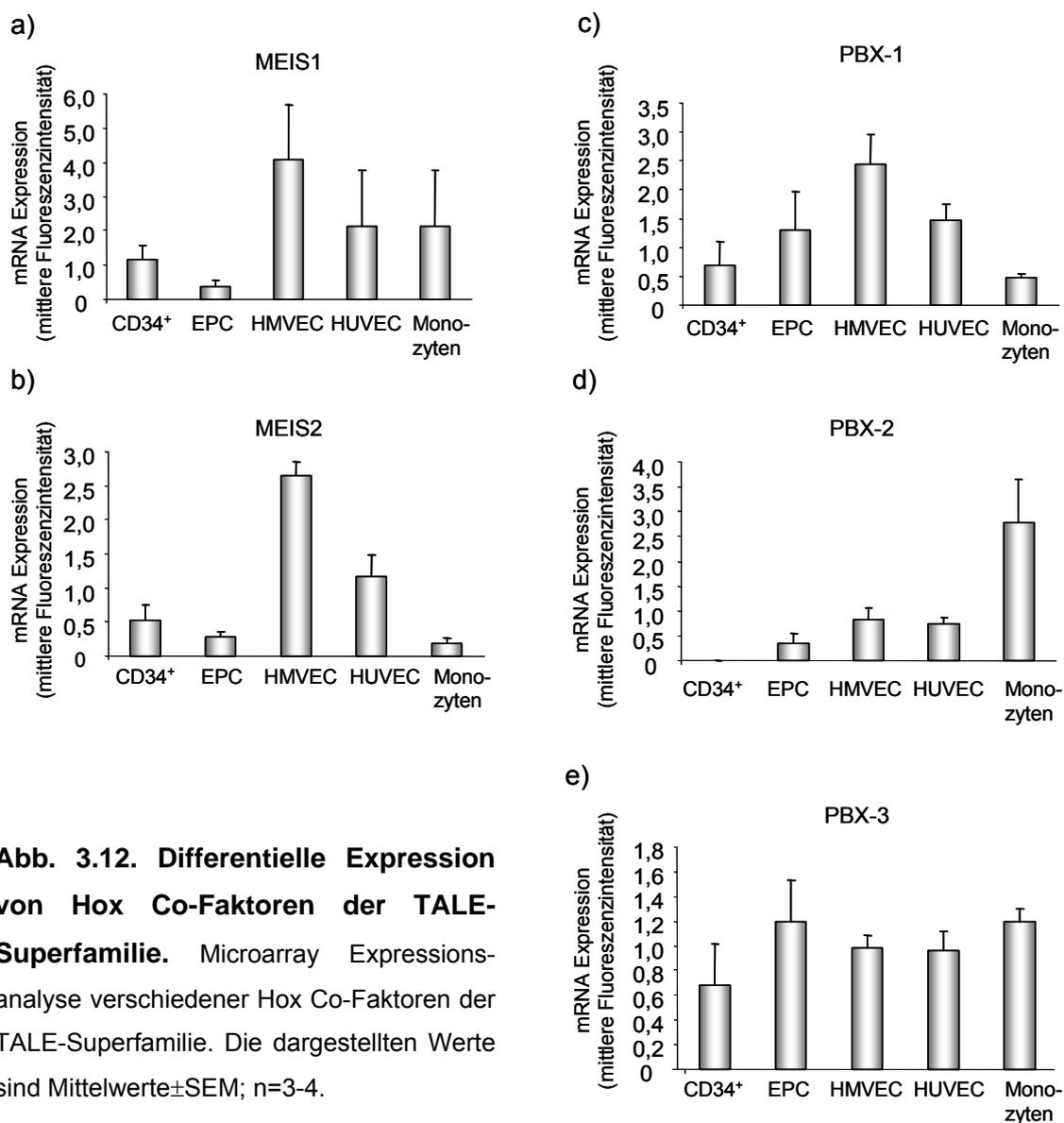


Abb. 3.12. Differentielle Expression von Hox Co-Faktoren der TALE-Superfamilie. Microarray Expressionsanalyse verschiedener Hox Co-Faktoren der TALE-Superfamilie. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM; n=3-4.

3.3.2.2. Der Hox Co-Faktor Meis1 wird in HUVEC aktiv degradiert

Ausgehend von der mittels Microarray erhobenen Expressions-Analyse erschien Meis1 als ein für Endothelzellen interessanter Co-Faktor, da er zum einen in HUVEC exprimiert wird (Abb. 3.12 a und 3.13 b) und zum anderen als Co-Faktor von HoxA9 beschrieben wurde (Shen et al., 1999). Deshalb sollte nun die funktionelle Relevanz der Interaktion zwischen Meis1 und HoxA9 in HUVEC untersucht werden. Hierzu wurde humanes Meis1 als myc-Fusionsprotein in einen Vektor zur ektopischen Überexpression in HUVEC kloniert. Wie in Abb. 3.13 a gezeigt, führte die Transfektion von HUVEC

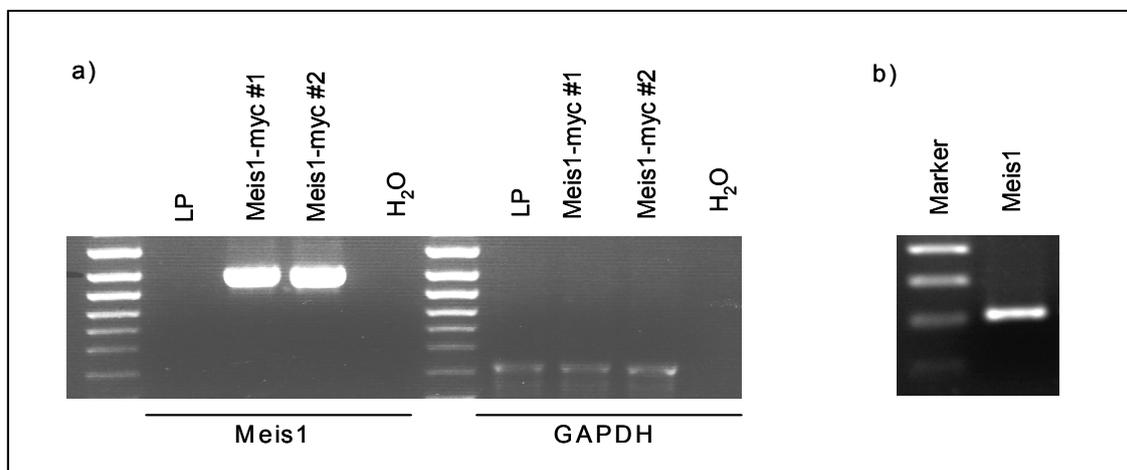


Abb. 3.13. RT-PCR zum Nachweis der Meis1-Überexpression. A) HUVEC wurden mit einem Leerplasmid oder Meis1-myc Plasmiden aus 2 verschiedenen Klonierungsansätzen (#1 und #2) transfiziert. Der Nachweis der Überexpression erfolgte 24 h nach Transfektion mittels RT-PCR unter Verwendung der Klonierungsprimer. GAPDH diente als Gleichladungskontrolle. B) Nachweis des endogenen Meis1 mittels RT-PCR unter Verwendung effektiverer RT-PCR Primer.

mit dem Meis1-Plasmid zu einer deutlichen Überexpression von Meis1 auf mRNA-Ebene. Ein Nachweis der Überexpression auf Proteinebene mittels Western-Blot konnte jedoch zunächst nicht erbracht werden. Der Nachweis des myc-Tag fusionierten HoxB4 im gleichen Western-Blot diente als Positiv-Kontrolle für den Myc-Antikörper sowie den generellen Transfektions-Erfolg

(Abb. 3.14). Das Fehlen des Meis1-Signals in den Leerplasmid transfizierten Zellen konnte durch Verwendung effektiverer RT-PCR-Primer auf eine zu geringe Zyklenzahl der PCR bzw. die Ineffektivität der verwendeten Primer zurückgeführt werden (Abb. 3.13 b).

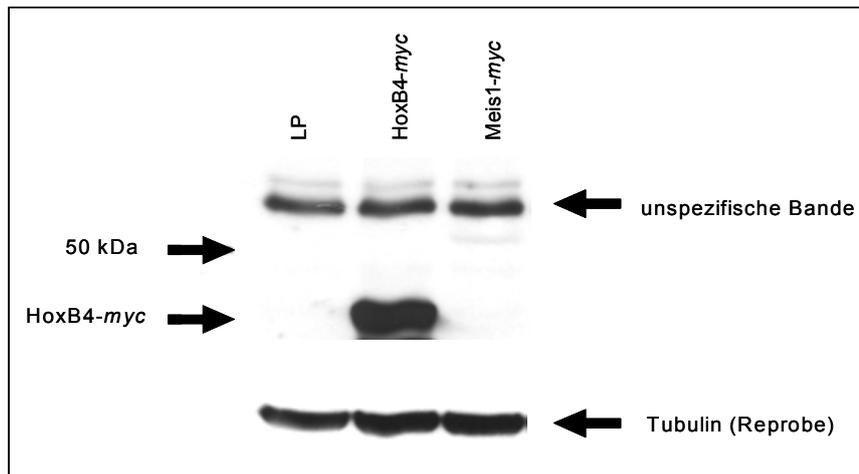


Abb. 3.14. Western-Blot zur Analyse der Meis1-Überexpression. HUVEC wurden mit einem Leerplasmid (LP), HoxB4-myc oder Meis1-myc transfiziert. 24 h nach Transfektion erfolgte der Nachweis der ektopischen Überexpression auf Proteinebene mittels Western-Blot gegen den *myc*-Tag. Das vorhergesagte Molekulargewicht für HoxB4 bzw. Meis1 beträgt 27,6 bzw. 43,1 kDa (SwissProt Vorhersage).

Da dieser Befund einen aktiven Degradationsprozess von Meis1 auf Proteinebene in HUVEC nahe legte, wurde untersucht, ob eine Stabilisierung des überexprimierten Meis1-Proteins durch Inhibition des Ubiquitin-Proteasomen-Komplexes mit Lactacystin möglich ist. Da die aktive Degradation von Meis1 auch einen möglichen Regulationsmechanismus darstellen könnte, wurde neben der Inhibition des Proteasomen-Komplex auch der Effekt der Stimulation mit dem pro-inflammatorischen Stimulus $TNF\alpha$ oder dem pro-angiogenen Wachstumsfaktor VEGF auf die Meis1 Proteinstabilität mittels Western-Blot untersucht. Wie in Abb. 3.15 dargestellt führte die Hemmung des Ubiquitin-Proteasomen-Komplexes mit Lactacystin zu einer Stabilisierung des überexprimierten Meis1-*myc* auf Proteinebene. Das überexprimierte Meis1-*myc* konnte nun sowohl mit einem Antikörper gegen den *myc*-Tag, als auch mit

einem Antikörper gegen Meis1 nachgewiesen werden. Die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ oder VEGF hatte keinen Effekt auf die Degradation von Meis1.

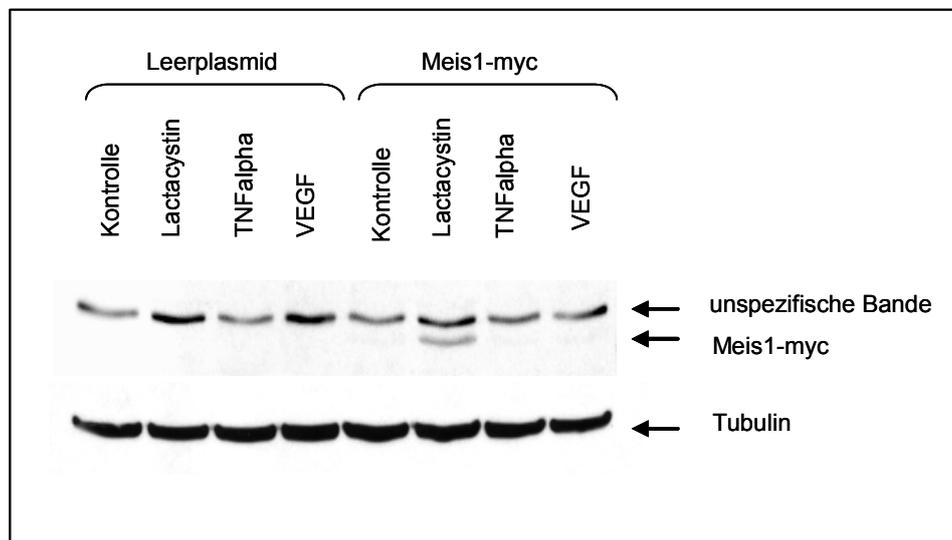


Abb. 3.15. Meis1 wird in HUVEC auf Proteinebene degradiert. HUVEC wurden mit einem Leerplasmid oder Meis1-myc-Plasmid transfiziert. Die Stimulation mit Lactacystin (40 μM), $\text{TNF}\alpha$ (50 ng/ml) oder VEGF (50 ng/ml) erfolgte 6h nach Transfektion für weitere 14h. Der Expressionsnachweis erfolgte mittels Western-Blot unter Verwendung eines Antikörpers gegen den Myc-Tag. Tubulin dient als Gleichladungskontrolle.

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Degradation von Meis1-*myc* um einen artifiziellen Prozess handelt, der auf die Fusion von Meis1 mit dem „Myc-Tag“ zurückzuführen ist oder um einen Zelltyp-spezifischen Vorgang, wurde das klonierte Meis1-*myc* Konstrukt in HEK293 Zellen überexprimiert und dessen Expression anschließend im Western-Blot untersucht. Es zeigte sich, dass es in HEK293 Zellen zu keiner Degradation des Meis1-*myc* Proteins kommt. Der Nachweis der erfolgreichen Überexpression konnte in diesem Zelltyp auch ohne Stimulation mit dem Proteasomen-Komplex Inhibitor Lactacystin, sowohl mit einem Antikörper gegen den *myc*-Tag, als auch mit einem Antikörper gegen humanes Meis1 erbracht werden (Abb. 3.16). Die Degradation von Meis1 stellt somit einen aktiven und zellspezifischen Prozess dar. Eine Computer-

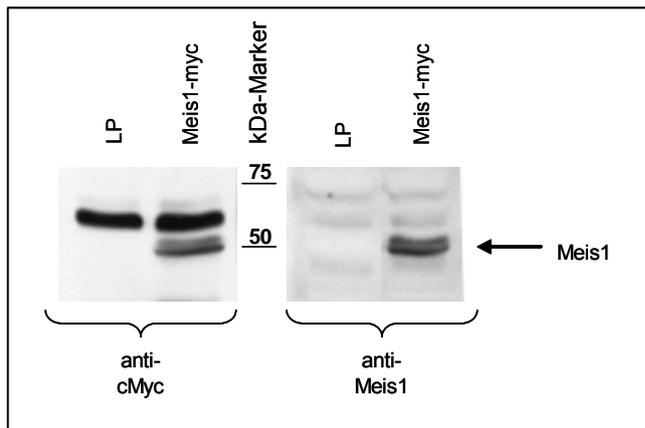


Abb. 3.16. Überexpression von Meis1-myc in HEK293. HEK293 wurden mit einem Leerplasmid oder Meis1-myc Plasmid transfiziert. Der Nachweis der Meis1-myc Überexpression erfolgte 24h nach Transfektion mittels Western-Blot unter Verwendung eines Myc-Tag- bzw. Meis1-Antikörpers.

gestützte Analyse der Meis1-Proteinsequenz mit der Software PESTfind kam zu dem Ergebnis, dass Meis1 mit hoher Wahrscheinlichkeit einem durch PEST-Sequenzen vermittelten Abbau durch den Proteasomen-Komplex unterliegt (Abb. 3.17). Die Analyse der funktionellen Bedeutung dieses Degradations-Prozesses, ist daher ein wichtiger Aspekt, zukünftiger Studien.

250 HSGDNSSEQDGLDNSVASPSTGDDDDPDK 279

PESTfind score: +17.43

Abb. 3.17. Analyse der Meis1 Proteinsequenz auf PEST-Sequenzen. Die Analyse der Meis1 Proteinsequenz erfolgte mit der frei zugänglichen Software PESTfind (<https://emb1.bcc.univie.ac.at/content/view/21/45/>). Dargestellt ist die Aminosäure-Sequenz der vorhergesagten PEST-Sequenz.

3.3.2.3. Die HoxA9-vermittelte Induktion des eNOS Promoters wird durch Meis1 moduliert.

Für HoxA9 konnte gezeigt werden, dass es die endotheliale NO-Synthase (eNOS) durch direkte Bindung des Promoters transaktiviert (Rossig et al., 2005). Da Meis1 als Co-Faktor von HoxA9 dessen Bindungs-Spezifität

modulieren kann, wurde der funktionelle Einfluss von Meis1 auf die Transaktivierung des eNOS-Promoters durch HoxA9 untersucht. Aufgrund des Befundes, dass Meis1 in HUVEC nur unphysiologisch durch Stimulation mit dem Proteasomen-Komplex-Inhibitor Lactacystin stabilisiert werden kann, wurden die Transaktivierungsexperimente mittels Luciferase Reporter-Gen-Assay in HEK293 durchgeführt. Wie in Abb. 3.18 dargestellt, kommt es nach Kotransfektion eines eNOS-Reporter-Plasmids mit einem HoxA9wt-Plasmid zu einer signifikanten Transaktivierung des eNOS-Promoters, im Vergleich zur Kotransfektion mit einem Leerplasmid.

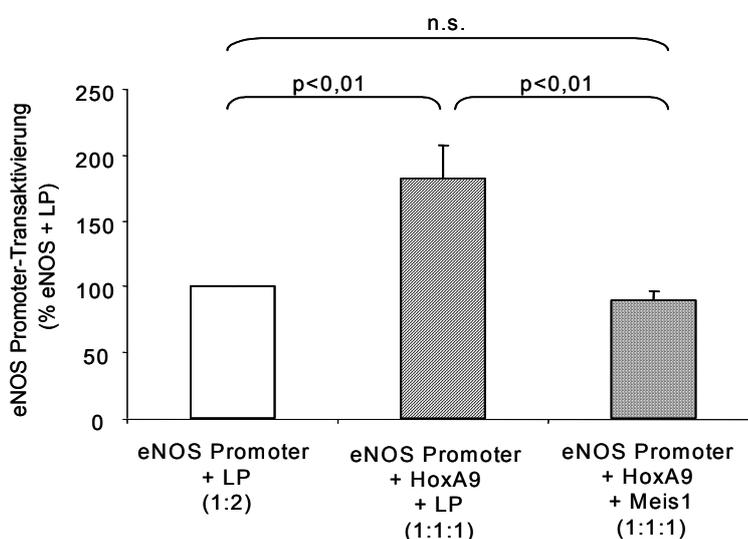


Abb. 3.18. Meis1 moduliert die eNOS Promoter-Transaktivierung durch HoxA9.

HEK293 wurden mit einem eNOS-Reporter-Gen-Plasmid, welches 3,5 kb des humanen eNOS-Promoters enthält, und einem Leerplasmid (Kontrolle), dem eNOS-Reporter-Gen-Plasmid und HoxA9wt oder eNOS-Reporter-Gen-Plasmid, HoxA9wt und Meis1wt kotransfiziert. Das Verhältnis der Plasmide zueinander wurde wie angegeben gewählt. Die Analyse der Reporter-Gen-Transaktivierung erfolgte 24h nach Transfektion durch luminometrische Messung der Luciferase-Aktivität. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM; n=3.

Die Kotransfektion des eNOS-Reporter-Plasmids, HoxA9wt und Meis1wt, resultierte hingegen in einer signifikanten Hemmung der Promoter-Transaktivierung auf Kontrollniveau. Zusammenfassend zeigen diese Daten somit, dass die Expression des Hox Co-Faktors Meis1 in HUVEC einem Zelltyp-spezifischen Degradations-Mechanismus auf Proteinebene unterliegt.

Die funktionelle Rolle von Meis1 als transkriptionellem Co-Faktor von HoxA9 konnte zudem durch Überexpression von Meis1 in HEK293 aufgezeigt werden. Hier inhibiert Meis1 die etablierte Regulation der eNOS durch HoxA9 und agiert somit als Regulator der HoxA9-Funktion.

3.3.3.1. Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren durch laminare Schubspannung

Laminare Schubspannung (engl. *shear stress*) ist ein wesentlicher mechanischer atheroprotektiver Faktor, da diese durch Induktion der NO-Synthese einen anti-apoptotischen Effekt auf Endothelzellen ausübt (Traub and Berk, 1998).

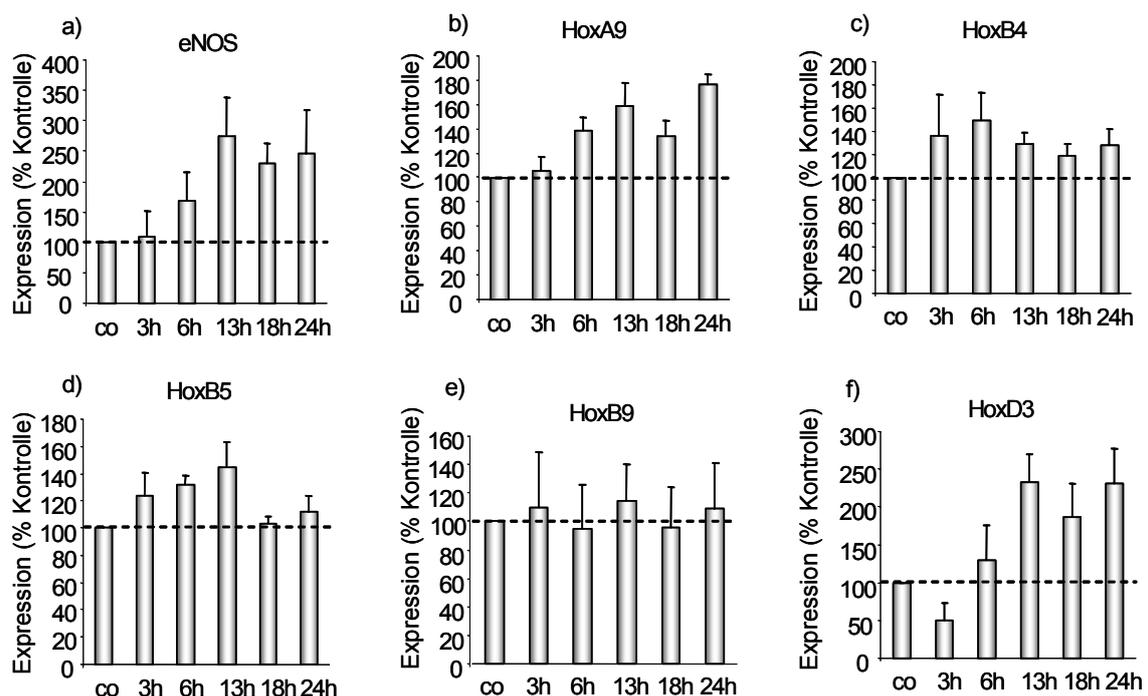


Abb. 3.19. Transkriptionelle Hox-Regulation durch *Shear Stress*. HUVEC wurden über einen Zeitraum von 24 h laminarem *Shear Stress* (15 dynes/cm^2) exponiert. Die mRNA wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert und die Hox- bzw. eNOS Expression mittels RT-PCR untersucht. GAPDH diente als Ladungskontrolle. Daten sind Mittelwerte \pm SEM und als % im Vergleich zur statischen Kontrolle gezeigt. n=5.

Kürzlich wurde publiziert, dass HoxA9 durch *Shear Stress* transkriptionell reguliert wird (Rossig et al., 2005). Daher wurde der regulative Einfluss von *Shear Stress* auch auf weitere Hox-Transkriptionsfaktoren in HUVEC untersucht. Um sicherzustellen, dass der applizierte *Shear Stress* einen funktionellen Effekt auf die Zellen hatte, wurde zusätzlich auch die Expression der eNOS, als typischem *Shear Stress*-regulierten Gen, bestimmt (Boo and Jo, 2003; Davis et al., 2004). Ähnlich wie bereits durch Rössig et al. beschrieben (Rossig et al., 2005), resultierte die Applikation von *Shear Stress* in einer Steigerung der HoxA9-Expression beginnend nach 6 h und einem Maximum nach 24 h (Abb. 3.19 b). HoxB4 und HoxB5 zeigen einen leichten Anstieg der Expression in den ersten 3-13 h nach *Shear Stress* Applikation (Abb. 3.19 c/d), während HoxB9 keine expressionelle Regulation über den Verlauf von 24 h zeigen (Abb. 3.19 e). HoxD3 ist biphasisch durch *Shear Stress* reguliert, so nimmt die Expression mit Beginn der *Shear Stress* Applikation nach 3 h zunächst ab, erreicht nach 6 h wieder Kontrollniveau und steigt dann bis zu einem Expressionsmaximum nach 13 h, welches auch nach 24 h erhalten bleibt (Abb. 3.19 f). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass insbesondere HoxA9 und HoxD3 durch längere *Shear Stress* Exposition, transkriptionell aktiviert werden.

3.3.3.2. *Shear Stress* reguliert die Histon-Methyltransferase MLL

Die molekularen Grundlagen der Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren durch *Shear Stress* konnten bisher nicht aufgeklärt werden. Die Tatsache, dass diese Daten einen regulativen Einfluss von *Shear Stress* auf mehrere Hox-Transkriptionsfaktoren aufzeigten, ließ jedoch einen globalen Regulations-Mechanismus als wahrscheinlich erscheinen. Ausgehend von dem Befund dass die Histon-Methyltransferase MLL als essentieller genetischer Regulator verschiedener Hox-Transkriptionsfaktoren während der Embryonalentwicklung beschrieben ist (Ernst et al., 2004a; Nakamura et al., 2002; Yu et al., 1998) und bekannt ist, dass *Shear Stress* über Chromatin Remodulierung einen

regulatorischen Einfluss auf die Transkription von Zielgenen ausübt (Illi et al., 2003), wurde daher untersucht, ob *Shear Stress* MLL reguliert. Wie in Abb. 3.20 dargestellt resultiert die Exposition von HUVEC mit *Shear Stress* in einem signifikanten Anstieg der MLL-Expression nach 24 h.

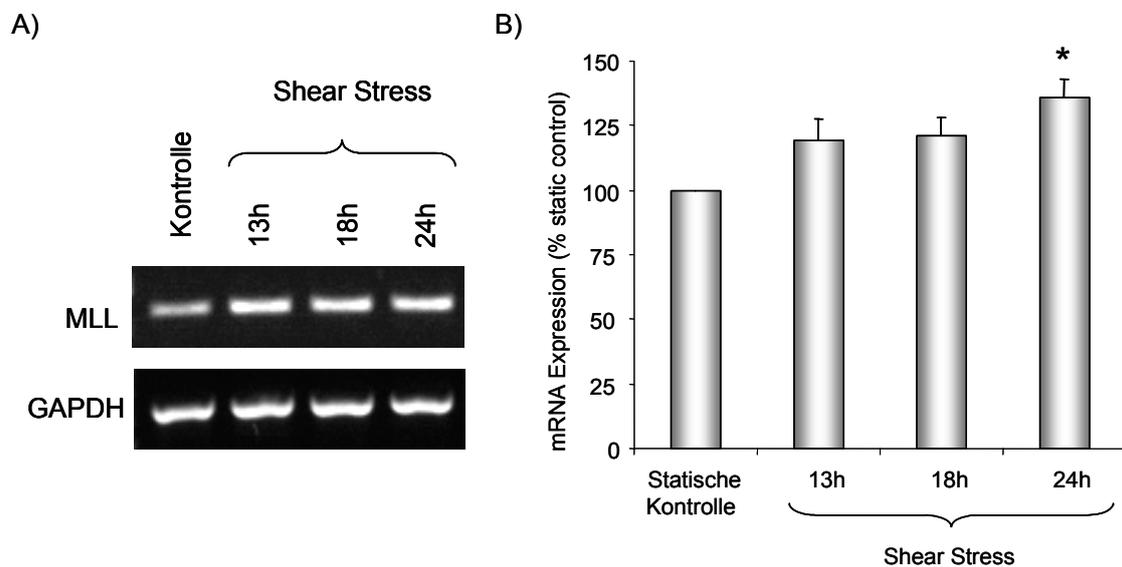


Abb. 3.20. Die Histon-Methyltransferase MLL wird durch *Shear Stress* reguliert. HUVEC wurden über einen Zeitraum von bis zu 24h laminarem *Shear Stress* (15 dynes/cm²) exponiert. Die mRNA wurde wie angegeben zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert. A) RT-PCR-Analyse der MLL Expression. GAPDH diente als Gleichladungskontrolle. B) Semiquantitative Analyse der MLL Expression. Daten sind Mittelwerte \pm SEM und als % im Vergleich zur statischen Kontrolle gezeigt. n=4

3.4. Die Rolle der Histon-Methyltransferase MLL im Kontext endothelialer Zellfunktionen

Die Rolle der Histon-Methyltransferase MLL ist bisher hauptsächlich als epigenetischer Regulator der Hox-Genexpression während der Embryonalentwicklung untersucht worden. Eine Rolle als Regulator endothelialer Zellfunktionen ist bisher nicht beschrieben worden. Der Befund, dass *Shear Stress* MLL in differenzierten Endothelzellen reguliert, warf die Frage auf, in wiefern MLL funktionell für differenzierte Endothelzellen von

Bedeutung ist. Um die funktionelle Bedeutung von MLL in Endothelzellen zu untersuchen, wurde daher zunächst der Effekt der siRNA-vermittelten Suppression von MLL auf die HUVEC Migration und das Sprouting untersucht. Um die Spezifität der Suppression sicherzustellen, wurden zwei verschiedene siRNAs mit unterschiedlichen MLL-Bindungssequenzen etabliert. Wie in Abb. 3.21 a dargestellt, waren beide siRNAs funktionell wirksam. Die Reduktion von MLL auch auf Proteinebene wurde zusätzlich mittels Western-Blot nachgewiesen (Abb. 3.21 b).

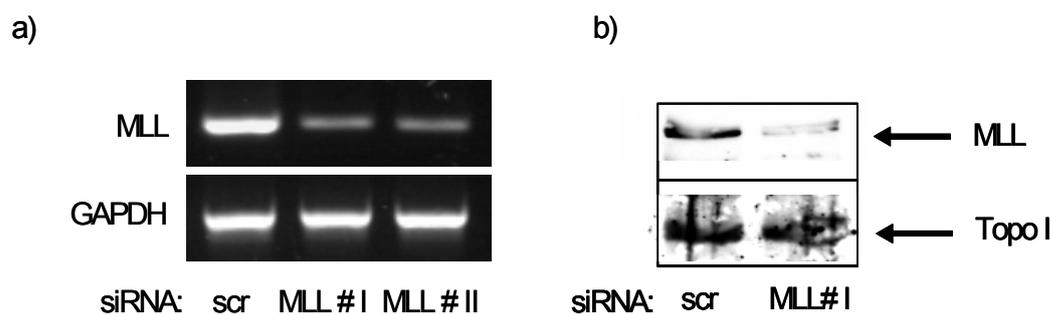


Abb. 3.21. Nachweis der siRNA-vermittelten Reduktion von MLL. HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder siRNAs gegen MLL (wie dargestellt) transfiziert. 48h nach Transfektion erfolgte die Analyse der MLL-Expression mittels RT-PCR (A) bzw. Western-Blot nukleärer Zellfraktionen (B). Als Gleichladungs-Kontrolle dienten GAPDH (A) bzw. Topoisomerase I (B).

Funktionell resultierte die genetische Suppression von MLL sowohl in einer signifikanten Hemmung der Endothelzell-Migration, als auch des Sprouting im Sphäroid-Assay (Abb. 3.22), was die Bedeutung von MLL für die Funktion differenzierter Endothelzellen unterstreicht. Die transkriptionelle Aktivierung von MLL-Zielgenen durch Methylierung an Histon H3 Lysin K4 im Promoterbereich wird durch die katalytische SET-Domäne des Proteins vermittelt. Daher wurde in einem zweiten Versuchsansatz untersucht, ob der beobachtete Effekt direkt von der Methyltransferase-Aktivität von MLL abhängig ist. Hierzu wurden die Migration und das Sprouting von HUVEC nach biochemischer Inhibition der Methyltransferase-Aktivität untersucht. Da ein spezifischer Inhibitor für MLL derzeit nicht verfügbar ist, wurde der Methyltransferase-Inhibitor 5'-deoxy-5'-

(methylthio)adenosine (MTA) verwendet. Für diese Substanz konnte eine Inhibition der di- und tri-Methylierung von Histon H3 Lysin K4 gezeigt werden (Huang et al., 2006).

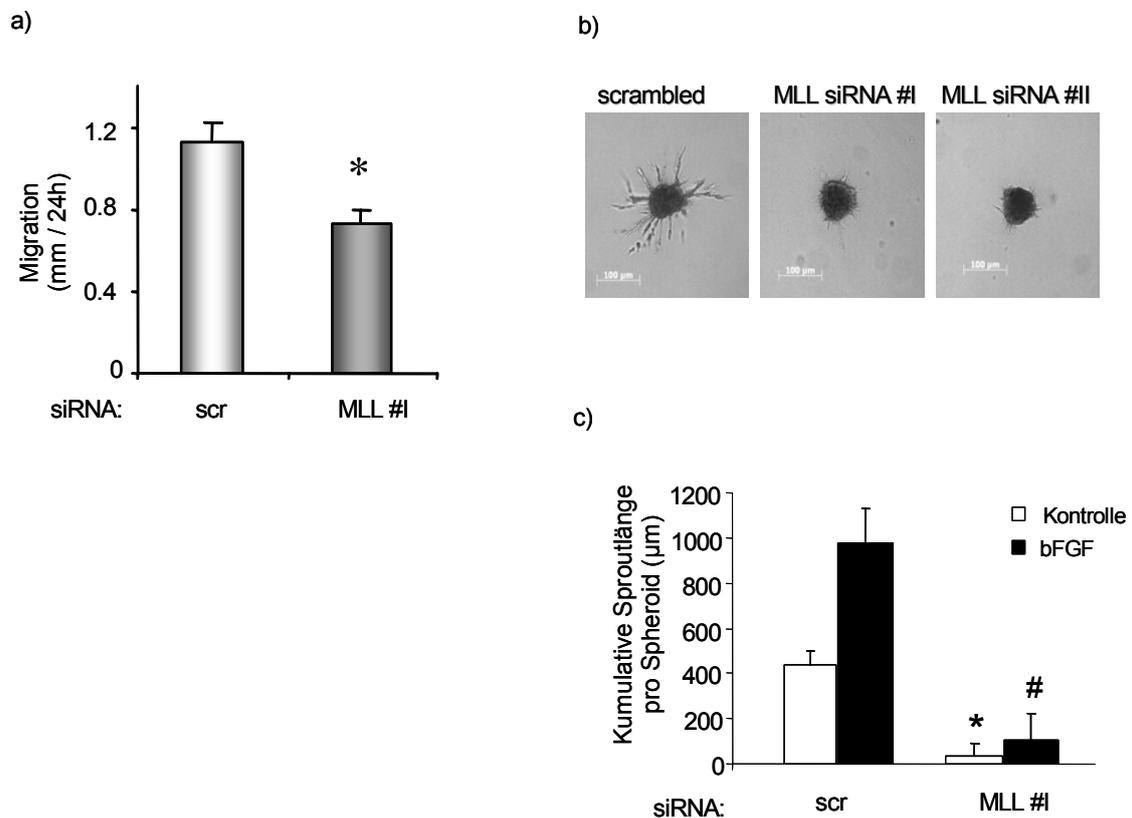


Abb. 3.22. MLL reguliert die pro angiogene Endothelzell-Funktionen Migration und Sprouting. A/C: HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden siRNA gegen MLL (# I) transfiziert. A) Die migratorische Kapazität wurde mittels *Scratched Wound Assay* 24h nach Transfektion bestimmt. * $p < 0,05$ vs. scrambled, $n = 3$. B) HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder 2 verschiedenen siRNAs gegen MLL (# I bzw. # II) transfiziert und das Sprouting im Sphäroid-Assay untersucht. Repräsentative Sphäroide sind dargestellt. C) Quantitative Analyse der MLL-Suppression auf das Sprouting von HUVEC unter basal bzw. bFGF (30 ng/ml) induzierten Bedingungen. * $p < 0,01$ vs. scrambled, # $p < 0,01$ vs. scrambled + bFGF, $n = 3$. Daten sind Mittelwerte \pm SEM.

Wie in Abb. 3.23 dargestellt, resultierte die Hemmung der Methyltransferase-Aktivität, sowohl zu einer dosisabhängigen Inhibition der Migration (Abb. 3.23a), als auch des Sprouting (Abb. 3.23b). Um nun zusätzlich zu

untersuchen, ob Methyltransferase-Aktivität auch von Bedeutung für die Expression von Hox-Transkriptionsfaktoren ist, wurde diese nach Behandlung mit MTA mittels RT-PCR untersucht. Hier zeigte sich, dass insbesondere die Expression der beiden *Shear Stress*-regulierten Hox-Transkriptionsfaktoren HoxA9 und HoxD3 bereits durch niedrige MTA-Konzentrationen von 1 mM

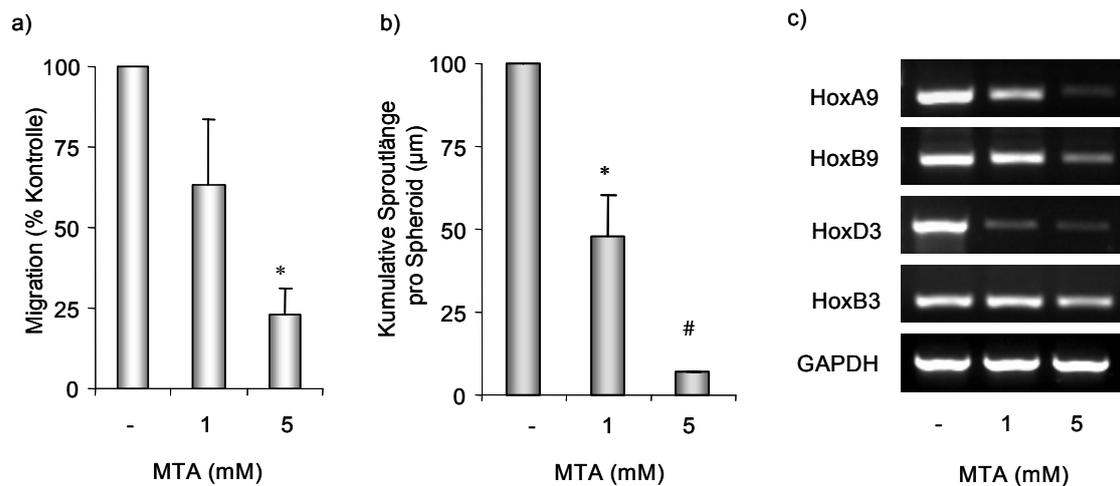


Abb. 3.23. Methyltransferase-Aktivität ist essentiell für Migration und Sprouting.

HUVEC wurden mit verschiedenen Dosen MTA (1 und 5 mM) bzw. DMSO als Kontrolle stimuliert. A) Analyse der Migration mittels *Scratched Wound* Assay. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 3$. B) Analyse der Sprouting Kapazität im Sphäroid-Assay. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,01$ vs. Kontrolle, $n = 3$. Daten sind Mittelwerte \pm SEM und als % Kontrolle dargestellt. C) Analyse der Regulation verschiedener Hox-Transkriptionsfaktoren nach Stimulation mit MTA mittels RT-PCR. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

deutlich inhibiert wird, während die Paraloge HoxB9 und HoxB3 bei dieser Konzentration nicht reguliert werden (Abb. 3.23c). Bei höheren Konzentrationen von 5 mM wirkt MTA auch auf HoxB9 und HoxB3 inhibierend (Abb. 3.23c), was mit der bereits erwähnten Unspezifität des Inhibitors erklärt werden kann. Dieser Befund untermauert somit die besondere Bedeutung der katalytischen Methyltransferase-Aktivität von MLL für die Regulation von Migration und Sprouting und kann zusätzlich als Hinweis auf eine funktionelle Rolle von Hox-Transkriptionsfaktoren in diesem Zusammenhang gewertet werden.

3.4.1. Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren durch MLL

Wie im vorangegangenen Abschnitt aufgezeigt, reguliert MLL die Migration und das Sprouting von Endothelzellen. Da MLL ein etablierter transkriptioneller Regulator verschiedener Hox-Transkriptionsfaktoren ist und sich die Expression von Hox-Transkriptionsfaktoren dosisabhängig durch Methyltransferase-Hemmung inhibieren ließ, wurde der Einfluss von MLL auf die Expression von Hox-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen untersucht. Hierzu wurde die Expression von MLL mittels siRNA inhibiert. Um eine quantitative Aussage zur Regulation potentieller MLL-Zielgene zu ermöglichen, kam in diesen Studien neben der semiquantitativen RT-PCR, auch die „real time“ PCR mittels Lightcycler zum Einsatz (3.24 a/b). Wie in Abb. 3.24 dargestellt führte die Transfektion mit 2 verschiedenen siRNAs gegen MLL zu einer signifikanten Reduktion von MLL auf RNA-Ebene (Abb. 3.24 a/b). In Übereinstimmung mit der für MLL beschriebenen Funktion als transkriptioneller Aktivator des HoxA9 Promoters in HeLa-Zellen (Nakamura et al., 2002), ging die Inhibition von MLL durch beide verwendeten siRNAs auch in HUVEC, mit einer Reduktion der HoxA9-Expression einher (Abb. 3.24 a/b). Zusätzlich zeigte sich eine Reduktion der Expression von HoxD3, das bisher nicht als Zielgen von MLL beschrieben worden ist (Abb. 3.24 a/b). Die Regulation von HoxA9 und HoxD3 konnte über dies zusätzlich auch mittels Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.24 c/d). Die Expression der HoxA9 bzw. HoxD3 Paraloge HoxB9 und HoxB3 sowie der Hox-Transkriptionsfaktoren B4, und B5 wurde durch die siRNAs gegen MLL nicht reguliert (Abb. 3.24 a/b). Die Aktivierung von MLL ist daher spezifisch für die Expression der Hox-Transkriptionsfaktoren HoxA9 und HoxD3 in differenzierten Endothelzellen notwendig.

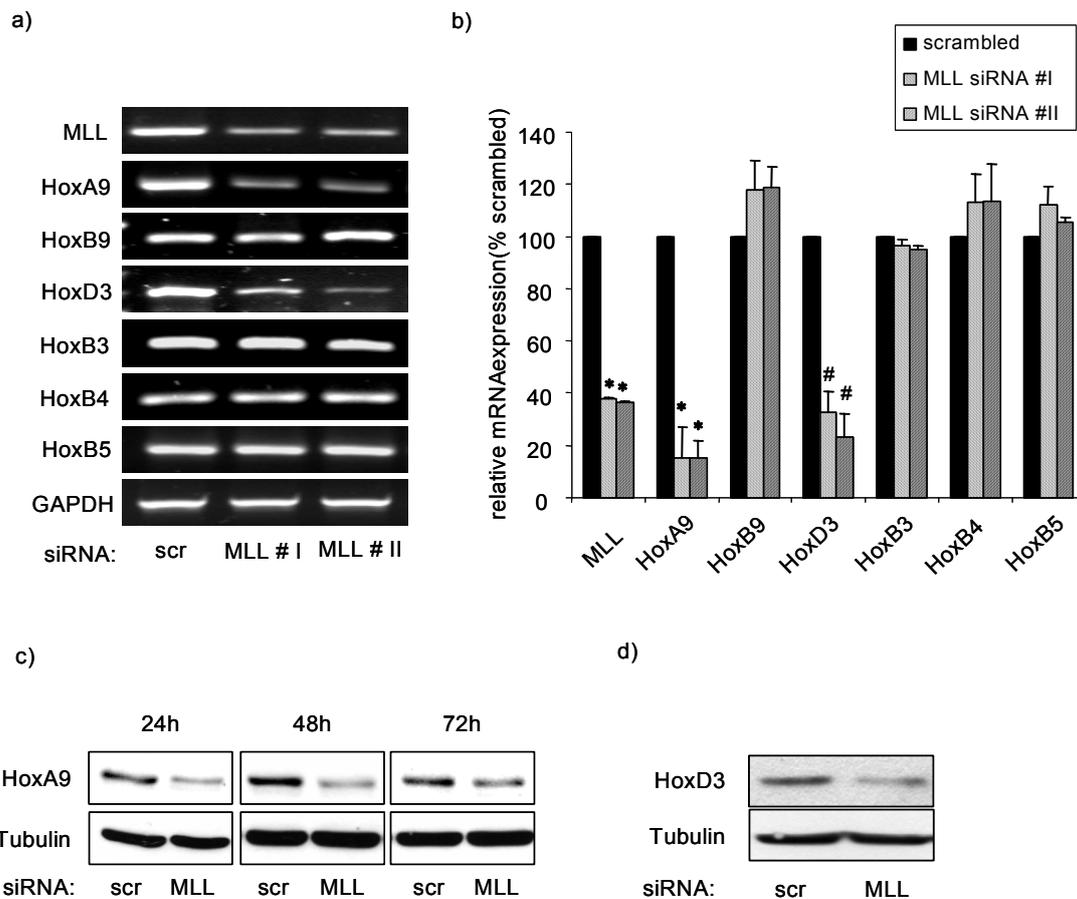


Abb. 3.24. Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren durch MLL. A/B: HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder 2 verschiedenen siRNAs gegen MLL (siRNA #I + siRNA #II) transfiziert. 48h nach Transfektion wurde die mRNA isoliert und die Expression von MLL sowie verschiedener Hox-Transkriptionsfaktoren mittels RT-PCR und Lightcycler untersucht. A) Darstellung einer repräsentativen RT-PCR. GAPDH diente als Gleichladungskontrolle. B) Quantitative Analyse der MLL und Hox-Expression mittels Lightcycler. Daten sind Mittelwerte \pm SEM und als % scrambled dargestellt. * $p < 0,01$ vs. scrambled, # $p < 0,05$ vs. scrambled, $n = 3$. C/D) HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder siRNA gegen MLL (# I) transfiziert. C) Western-Blot Analyse der HoxA9-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion. Tubulin diente als Ladungskontrolle. D) Western-Blot Analyse der HoxD3-Expression 48h nach Transfektion.

3.4.2. Die Promotoren von HoxA9 und HoxD3 sind Ziel von Histon H3 Lysin 4 Methylierung

Die katalytische SET-Domäne der Methyltransferase MLL methyliert das Histon H3 an Lysin K4 (H3K4) und führt dadurch zur Aktivierung von Hox-Promotoren (Milne et al., 2002). Um zu prüfen, ob MLL direkt an der transkriptionellen Regulation von HoxA9 und HoxD3 beteiligt ist, wurden daher Chromatin-Immunpräzipitations- (ChIP) Studien durchgeführt. Die Immunpräzipitation wurde mit einem Antikörper gegen di-methyliertes H3K4 durchgeführt. Der Nachweis auf Promotermethylierung erfolgte mittels PCR gegen verschiedenen Promoterregionen (Abb. 3.25 a). Wie in Abb. 3.25 b gezeigt, konnte sichergestellt werden, dass der für die Immunpräzipitation verwendete Antikörper auch in der ChIP geeignet ist.

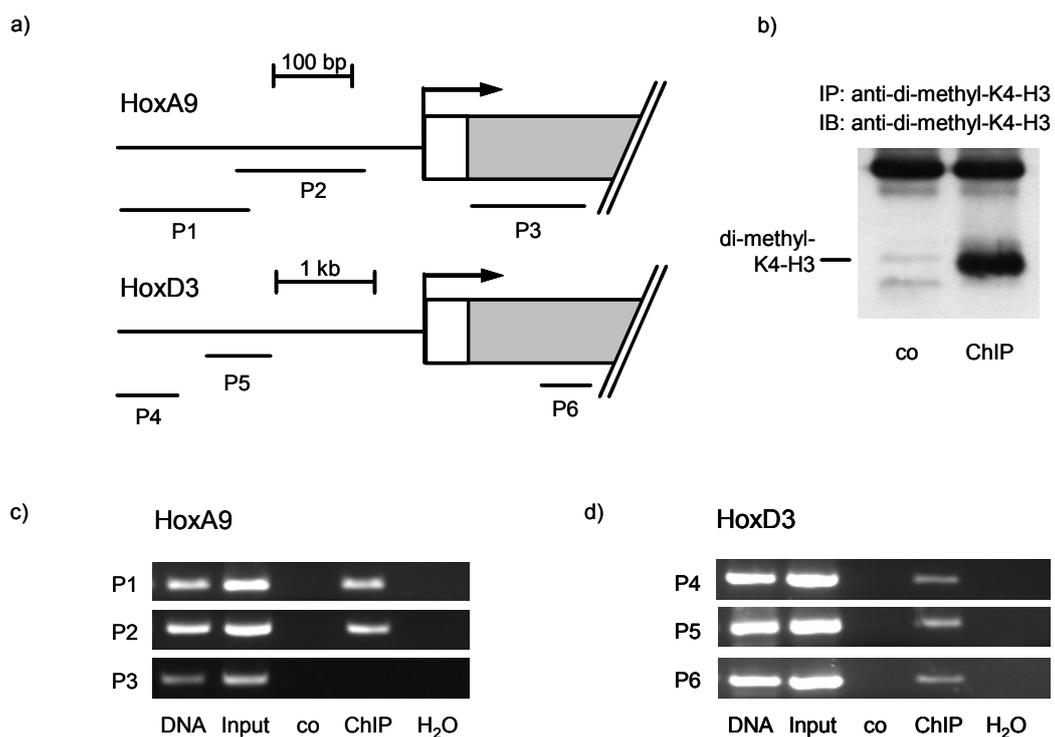


Abb. 3.25. Die Promotoren von HoxA9 und HoxD3 werden an Histon H3 Lysin 4 methyliert. Chromatin-Immunpräzipitationen wurden mit HUVEC Lysaten unter Verwendung eines Antikörpers gegen di-methyliertes H3K4 durchgeführt. A) Schematische Darstellung der mittels PCR nachgewiesenen Promoterregionen. B) Nachweis der Immunpräzipitation mittels Western-Blot. C/D) Repräsentative PCRs zum Nachweis der Methylierung in den HoxA9 und HoxD3 Promoterregionen. Co = Antikörper Kontrolle, Input = sonifizierte DNA vor IP. n=3.

Es zeigte sich, dass HoxA9 nur in den Promoter-Regionen P1 und P2 eine Methylierung an H3K4 aufweist, während es zu keiner Methylierung in der Exon-Region P3 kommt (Abb. 3.25 c). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Daten aus HeLa-Zellen (Dou et al., 2005; Nakamura et al., 2002) Für HoxD3 hingegen zeigt sich sowohl eine Methylierung an H3K4 in den Promoter-Regionen P4 und P5, als auch in der kodierenden Exon-Region P6 (Abb. 3.25 d). Das Auftreten von di-Methylierungen an H3K4 auch in kodierenden Genbereichen wurde von Bernstein et al., als Zeichen transkriptioneller Gen-Aktivität beschrieben (Bernstein et al., 2002) und steht somit im Einklang mit der aktuellen Literatur.

3.4.3. Funktionelle Relevanz von Hox-Transkriptionsfaktoren als regulatorische Zielgene von MLL

Wie in Abb. 3.22 a dargestellt, ist MLL an der Regulation der Migration von Endothelzellen beteiligt. Da HoxA9 als ein wichtiger Regulator der Migration von Endothelzellen beschrieben ist (Bruhl et al., 2004), sollte nun der kausale Zusammenhang zwischen MLL und HoxA9 im Kontext der Migration untersucht werden. Hierzu wurden Kotransfektionsstudien durchgeführt. Wie in Abb. 3.26 dargestellt, war es durch ektopische Überexpression von HoxA9 bei gleichzeitiger Suppression von MLL durch siRNA möglich, der MLL-vermittelten Migrations-Hemmung partiell entgegenzuwirken. Das „Axon guidance“ Molekül

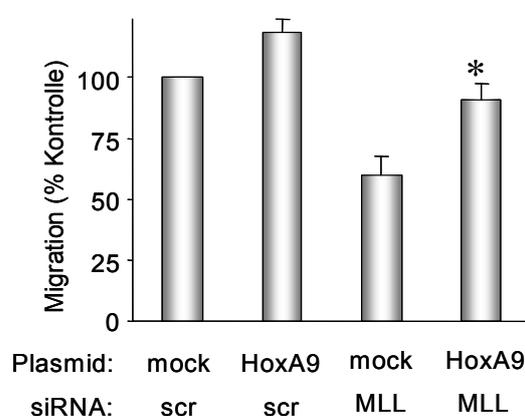


Abb. 3.26. HoxA9 wirkt der MLL-vermittelte Hemmung der Migration entgegen. HUVEC wurden mit scrambled oder MLL siRNA (# 1) und einem Leerplasmid oder HoxA9wt kotransfiziert. Analyse der Migration mittels *Scratched Wound* Assay. * $p < 0,05$ vs. mock+MLL siRNA, $n=4$. Daten sind Mittelwerte \pm SEM und als % Kontrolle dargestellt.

EphB4, ist als Rezeptor des EphB2-Liganden maßgeblich an der korrekten vaskulären Morphogenese während der Embryonalentwicklung (Gerety et al., 1999) beteiligt und zudem wichtig für die Migration von Krebszellen (Masood et al., 2006). Da EphB4 kürzlich als ein Zielgen von HoxA9 bei der Migration von Endothelzellen beschrieben wurde (Bruhl et al., 2004), war es das Ziel weiterer Untersuchungen, ob MLL die Migration von HUVEC über HoxA9 und EphB4 reguliert. Hierzu wurde zunächst der Effekt der siRNA-vermittelten Suppression von MLL auf EphB4 untersucht. Wie in Abb. 3.27 dargestellt, führte die Transfektion mit siRNA gegen MLL zu einer signifikanten Reduktion von EphB4 auf RNA-Ebene.

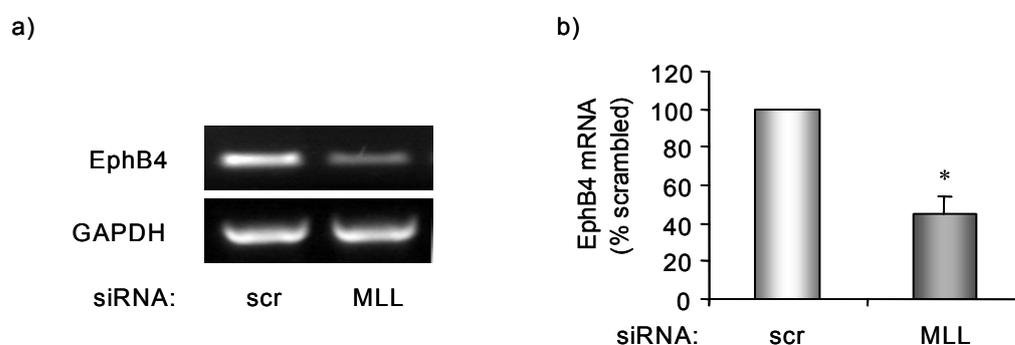


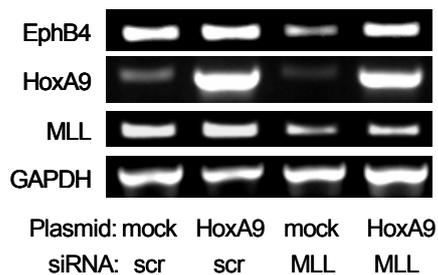
Abb. 3.27. MLL reguliert die Expression des EphB4-Rezeptors. A/B) HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder siRNA gegen MLL (# 1) transfiziert. 48h nach Transfektion wurde die EphB4-Expression mittels RT-PCR untersucht. A) Darstellung einer repräsentativen RT-PCR. GAPDH diente als Gleichladungskontrolle. B) Semiquantitative Analyse der EphB4-Regulation durch MLL. * $p < 0,05$ vs. scrambled, $n = 3$. Daten sind Mittelwerte \pm SEM und als % scrambled dargestellt.

3.4.4. MLL reguliert die Endothelzell-Migration über HoxA9 und EphB4

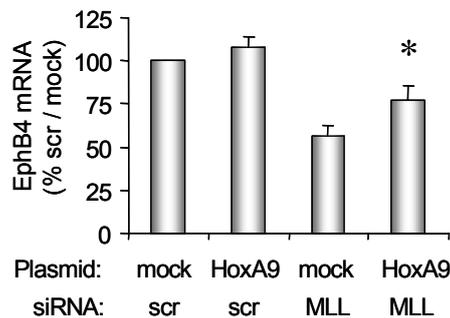
Um nun die funktionelle Achse $MLL \rightarrow HoxA9 \rightarrow EphB4$ näher zu untersuchen, wurde die Expression des EphB4-Rezeptors in Kotransfektionsexperimenten, wie bereits zuvor in Abb. 3.26 für die Migration beschrieben analysiert. Hier zeigte sich, dass die Suppression von MLL, wie zuvor beschrieben, mit einer Inhibition der EphB4-Expression einhergeht. Durch Kotransfektion eines

HoxA9wt-Plasmids war es hier im Vergleich zur Kotransfektion mit einem Leerplasmid möglich, der MLL siRNA-vermittelten Reduktion der EphB4-Expression signifikant entgegenzuwirken (Abb. 3.28). Die beobachtete Kapazität von HoxA9, der MLL-vermittelten Migrationshemmung entgegenzuwirken, lässt sich daher auf die Regulation der EphB4-Expression zurückführen.

a)



b)



c)

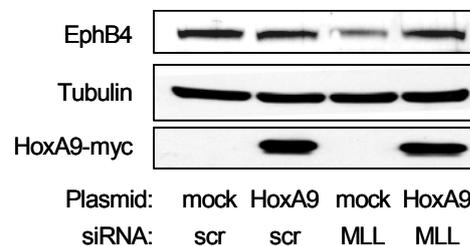


Abb. 3.28. MLL reguliert EphB4 über HoxA9 in Endothelzellen. HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder MLL siRNA (# 1) und einem Leerplasmid oder HoxA9wt-Plasmid transfiziert. A) RT-PCR Analyse der EphB4, HoxA9 und MLL-Expression. Ein repräsentatives Gel ist gezeigt. GAPDH dient als Gleichladungskontrolle B) Semiquantitative Analyse der EphB4-Expression. Daten sind Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$; $n = 6$. C) Western-Blot Analyse der EphB4-Expression. Tubulin dient als Gleichladungskontrolle.

3.4.5. Funktionelle Rolle von HoxD3 im Kontext der Endothelzell-Migration

Einer der wenigen Hox-Transkriptionsfaktoren neben HoxA9 mit bekannter Relevanz für endotheliale Funktionen ist HoxD3. Als Regulator der Integrine $\alpha V\beta 3$ sowie $\alpha 5\beta 1$ greift es unter anderen direkt in die migratorische Kapazität von Endothelzellen ein (Boudreau et al., 1997; Boudreau and Varner, 2004). Da HoxD3, ebenso wie HoxA9 durch MLL reguliert wird (Abb.3.24 a/b/d) und sowohl der HoxD3 Promoter, als auch kodierenden Genregionen di-Methylierungen an Histon H3 Lysin K4 aufweisen (Abb. 3.25 d), war ein funktioneller Einfluss von MLL auf die Migration auch über HoxD3 denkbar. Wie zuvor für HoxA9, wurden daher auch für HoxD3 Kotransfektionsstudien mit dem funktionellen „Readout“ der Migration im *Scratched Wound* Assay durchgeführt. Auch hier konnte ein ähnlich kompensatorischer Effekt auf die MLL siRNA-induzierte Hemmung der Migration nachgewiesen werden, wie er

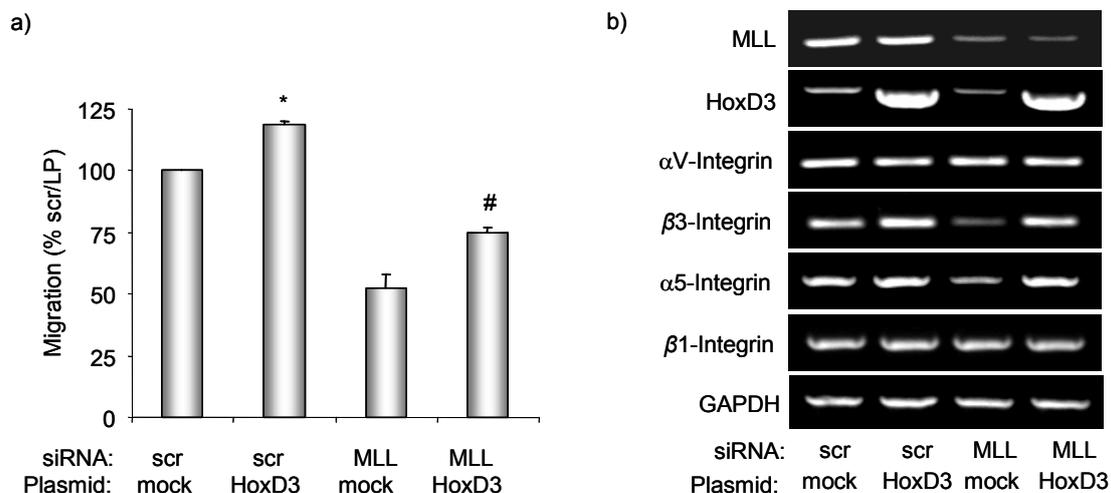


Abb. 3.29. Funktioneller Einfluss von MLL auf HoxD3 und Integrine. HUVEC wurden mit scrambled oder MLL siRNA (# 1) und einem Leerplasmid oder HoxD3wt kotransfiziert. A) Analyse der Migration mittels *Scratched Wound* Assay. * $p < 0,05$ vs. mock+scrambled, # $p < 0,05$ vs. mock+MLL siRNA, $n=3$. Daten sind Mittelwerte \pm SEM und als % Kontrolle dargestellt. B) RT-PCR Analyse der Expression von MLL, HoxD3 sowie Integrin-Untereinheiten. GAPDH ist die als Gleichladungskontrolle.

bereits für HoxA9 gefunden wurde (Abb. 3.29 und Abb. 3.26). Um die kausale Ursache für diesen Effekt aufzuklären, wurde die Expression der Integrin-Untereinheiten αV , $\beta 3$, $\alpha 5$, und $\beta 1$ unter den verschiedenen Kotransfektionsbedingungen mittels RT-PCR untersucht. Hier zeigte sich in Einklang mit der aktuellen Literatur, dass HoxD3 zu einer transkriptionellen Induktion der Integrin-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 3$ ist, während es nach Transfektion mit siRNA gegen MLL sowohl zu einer Reduktion der HoxD3, als auch der beiden genannten Integrin-Untereinheiten kommt. Die Integrin-Untereinheiten αV und $\beta 1$ werden nicht reguliert.

3.4.6. Die Rolle von HoxA9 und HoxD3 im Kontext des MLL-abhängigen Sprouting von Endothelzellen

Die Migration von Endothelzellen im 2-dimensionalen *Scratched Wound Assay* umfasst funktionell primär Aspekte der Zell-Proliferation und des *Spreading* (engl.: Ausbreiten, Ausdehnen) (Dimmeler et al., 2000; Tamura et al., 1998). Das Sprouting im 3-dimensionalen Sphäroid-Assay ist hingegen ein wesentlich komplexerer Vorgang, der unter anderem die Degradation und Invasion in die Kollagen Matrix, die Elongation der Zellen und Ausbildung gefäßartiger Strukturen sowie die Transition von Proliferation zu Differenzierung beinhaltet (Yang et al., 2004). Daher wurde die funktionelle Rolle von HoxA9 und HoxD3 nach Suppression von MLL auch im Sphäroid-Assay untersucht. Da wie zuvor beschrieben, sowohl HoxA9 als auch HoxD3 einen partiell kompensatorischen Effekt auf die MLL-abhängige Hemmung der Migration von HUVEC ausüben (Abb. 3.26 und 3.29 a), wurden auch für die Untersuchung des Sprouting im Sphäroid-Assay, Kotransfektionsansätze zur funktionellen Analyse von HoxA9 und HoxD3 gewählt. Im Gegensatz zur Analyse der Migration, besaßen weder HoxA9 noch HoxD3 im Sphäroid-Assay das Potential, den MLL-abhängigen Verlust der Sprouting-Kapazität zu kompensieren (Abb. 3.30). Ein vergleichbares Resultat ergab sich auch nach adenoviraler Überexpression von HoxA9 (n=1, Daten nicht gezeigt), was eine möglicherweise unzureichende

Transfektionseffizienz als nicht ursächlich für dieses Ergebnis erscheinen lässt. Um einem potentiell synergistischen Effekt von HoxA9 und HoxD3 Rechnung zu tragen, wurde das Sprouting auch nach gleichzeitiger Überexpression von HoxA9 und HoxD3 untersucht (Abb. 3.30 c). In diesem Versuchsansatz kam es

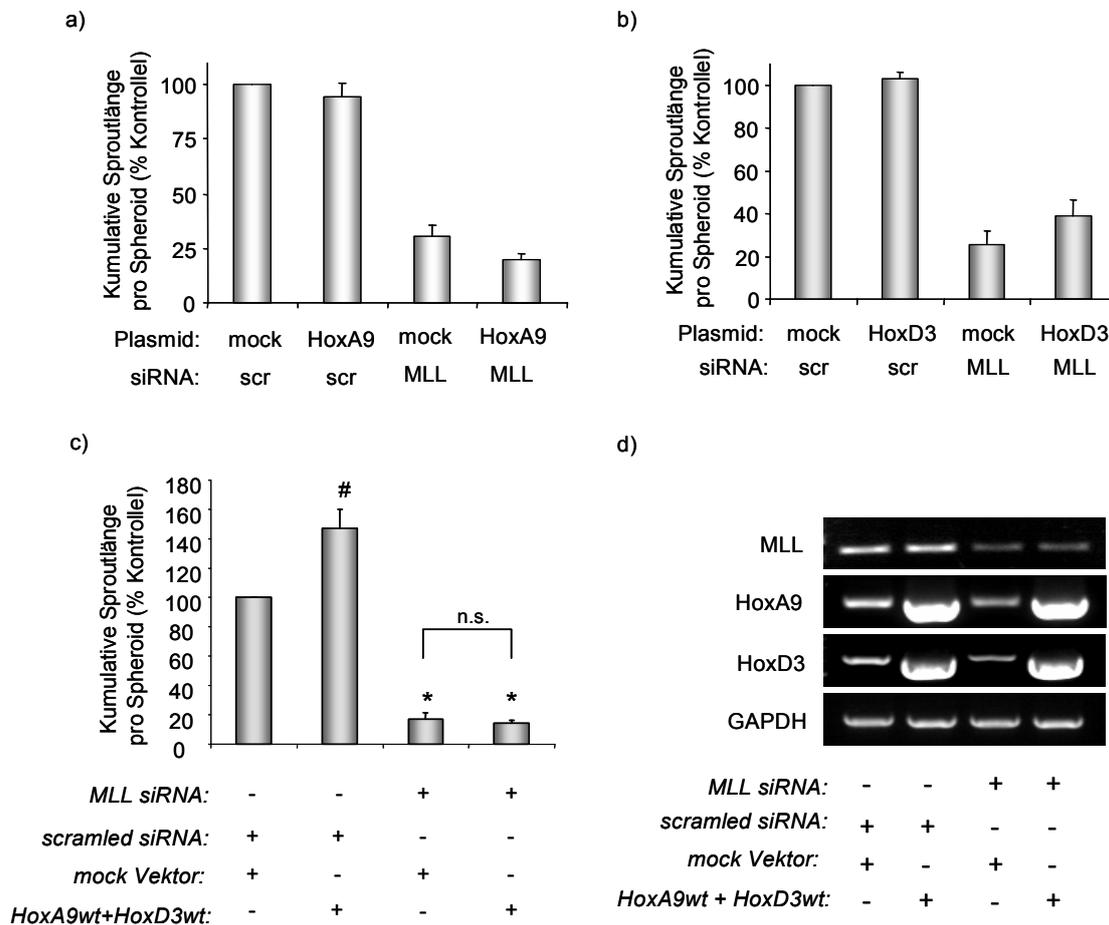


Abb. 3.30. HoxA9 und HoxD3 können den MLL-abhängigen Verlust der Sprouting Kapazität nicht kompensieren. A) HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder MLL siRNA # II und einem Leerplasmid oder HoxA9wt transfiziert. Das Sprouting wurde mittels Sphäroid-Assay analysiert. Daten sind Mittelwerte \pm SEM und als % Kontrolle dargestellt. n=2. B) HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder MLL siRNA # II und einem Leerplasmid oder HoxD3wt transfiziert. Das Sprouting wurde mittels Sphäroid-Assay analysiert. Daten sind Mittelwerte \pm SEM und als % Kontrolle dargestellt. n=4. C/D) HUVEC wurden mit scrambled Oligonukleotiden oder MLL siRNA # II und einem Leerplasmid oder HoxA9wt+HoxD3wt transfiziert. Das Sprouting wurde mittels Sphäroid-Assay analysiert. Daten sind Mittelwerte \pm SEM und als % Kontrolle dargestellt. #p<0,05 vs. scrambled+mock, *p<0,01 vs. scrambled+mock. n=4.

zwar zu einem gesteigerten Sprouting durch simultane Überexpression von HoxA9 und HoxD3 in den scrambled kotransfizierten Zellen, jedoch blieb auch hier ein kompensatorischer Effekt auf den MLL-abhängigen Verlust der Sprouting Kapazität aus. Der Erfolg, der simultanen Überexpression von HoxA9 und HoxD3 sowie die Wirksamkeit der siRNA wurde mittels RT-PCR sichergestellt (Abb. 3.30 d). Der Effekt von MLL auf das Sprouting von Endothelzellen scheint daher über zusätzliche Faktoren mediiert zu werden, die bisher nicht bekannt sind.

4. Diskussion

Homeobox-Transkriptionsfaktoren sind wichtige Regulatoren der embryonalen Morphogenese und modulieren Funktionen differenzierter Zellen, wie z.B. Proliferation, Migration, Wundheilung und Angiogenese (Botas, 1993; Care et al., 2001; Leroy et al., 2004; Myers et al., 2000; Myers et al., 2002). Bis heute sind wesentliche Aspekte der Regulation und Funktion von Hox-Transkriptionsfaktoren in differenzierten Endothelzellen noch weitgehend unbekannt. Ein Hauptanliegen dieser Arbeit war deshalb, die funktionelle Rolle von bekannten, als auch von bisher noch nicht beschriebenen Hox-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen zu untersuchen. Des Weiteren sollten verschiedenen Mechanismen zur funktionellen Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen sowie schließlich die Bedeutung der als Hox-Regulator etablierten Histon-Methyltransferase MLL im Kontext pro-angiogener Endothelzell-Funktionen untersucht werden.

4.1. Auswahl von Hox-Transkriptionsfaktoren zur funktionellen Analyse

Die funktionelle Relevanz einiger Hox-Transkriptionsfaktoren für differenzierte Endothelzellen konnte während der letzten Jahre aufgezeigt werden. Neben HoxD3, HoxB3 und HoxD10, die vor allem an der Regulation von Zell-Adhäsionsproteinen der Integrin-Familie sowie Endothelzell-Migration und Angiogenese beteiligt sind (Boudreau et al., 1997; Boudreau and Varner, 2004; Myers et al., 2000; Myers et al., 2002), ist insbesondere HoxA9 von besonderer Relevanz, sowohl für endotheliale Progenitorzellen, als auch für das angiogene Potential differenzierter Endothelzellen (Bruhl et al., 2004; Rossig et al., 2005). Für HoxB4 war bisher keine funktionelle Rolle in differenzierten Endothelzellen beschrieben, jedoch fördert HoxB4 in Zellen der hämatopoetischen Linie die Stammzellexpansion und wird als potentieller Marker undifferenzierter Zellen diskutiert (Antonchuk et al., 2002). Im Gegensatz zu HoxB4, ist HoxB5 als transkriptioneller Aktivator des *flk-1* Promoters wichtig für die Differenzierung

von Vorläuferzellen in die endotheliale Linie (Wu et al., 2003). Diese scheinbar gegensätzliche Wirkweise von HoxB4 und HoxB5, machte diese beiden Hox-Transkriptionsfaktoren zu interessanten Kandidaten für eine detaillierte Analyse der Funktion in differenzierten Endothelzellen.

Die Expression auf mRNA-Ebene konnte für beide Hox-Transkriptionsfaktoren in humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) nachgewiesen werden. Insbesondere die HoxB5-Expression konnte hierbei als deutlich ausgeprägt in differenzierten Zellen (HUVEC, HMVEC) gezeigt werden, während es nur schwach in den wenig differenzierten EPCs exprimiert wird. Im Hinblick auf die beschriebene Funktion von HoxB5 als Differenzierungs-Induzierender Faktor (Wu et al., 2003), ist es daher z.B. denkbar, dass HoxB5 nach Induktion der endothelialen Differenzierung, auch für deren weitere Progression und schließlich für die Aufrechterhaltung des Differenzierungs-Status (z.B. in HUVEC) von Bedeutung ist.

Im Vergleich dazu wies HoxB4 eine ähnlich starke Expression in EPCs und den beiden differenzierten Zelltypen HUVEC und HMVEC auf. Die ähnlich stark ausgeprägte Expression von HoxB4 in HUVEC und EPC ist ein Hinweis auf eine bisher nicht bekannte Funktion in maturen Endothelzellen, da es bisher nur von Relevanz in Stamm- und Progenitorzellen beschrieben wurde. Da für HoxB4 eine dosisabhängige Wirkweise beschrieben wurde (Kaushansky, 2005; Klump et al., 2005), wäre ein Nachweis von HoxB4 in den unterschiedlichen Zelltypen auf Proteinebene sehr aufschlussreich. Dies konnte aber aufgrund des Fehlens geeigneter Antikörper im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Die in HUVEC ausgeprägte Expression der ebenfalls untersuchten Hox-Transkriptionsfaktoren HoxA9, HoxB9, HoxB7 und HoxD3 steht im Einklang mit der Literatur und wurde für HoxA9 und HoxD3 auch mittels Western-Blot gezeigt (Belotti et al., 1998; Boudreau et al., 1997; Bruhl et al., 2004; Care et al., 2001). Die HoxD3 Expression im Microarray deckt sich nicht mit den Ergebnissen der RT-PCR, in der eine starke Expression von HoxD3 in HUVEC gefunden wurde. Diese Diskrepanz ist möglicherweise auf Unterschiede in der Konfluenz bzw. dem proliferativen Status der verwendeten Zellen zurückzuführen, da bekannt ist, dass die HoxD3 Expression in

Endothelzellen stark von diesen beiden Aspekten abhängig ist (Hansen et al., 2003).

4.2. Die Bedeutung von Hox-Transkriptionsfaktoren für endotheliale Zellfunktionen

Um Aussagen über die Relevanz dieser Hox-Transkriptionsfaktoren für differenzierte Endothelzellen zu machen, wurde die Expression der einzelnen Hox-Transkriptionsfaktoren spezifisch inhibiert. Neben Auswirkungen auf die Zellmorphologie, Proliferation, Apoptose und Expression der eNOS als Endothel-spezifischem Markerprotein, wurde auch die Fähigkeit zur funktionellen Interaktion der Endothelzellen untersucht. Hierbei wurde speziell das pro-angiogene Potential im 2-dimensionalen Matrigel und im 3-dimensionalen *Sphäroid Assay* analysiert.

Ein Charakteristikum von HUVEC in Kultur ist die Ausbildung geschlossener Monolayer, die eine typische pflastersteinartige Morphologie aufweisen (de Groot et al., 1995). Im Gegensatz zur Situation in vivo, bei der die Endothelzellen aufgrund des Blutflusses einer laminaren oder turbulenten Schubspannung ausgesetzt sind, unterscheiden sich zur Konfluenz gebrachte Endothelzellen in Kultur kaum in Bezug auf die Organisation ihres Actin-Zytoskeletts (Colangelo et al., 1994). Die Reorganisation des Actin-Zytoskeletts und die Ausbildung von Actin-Stressfasern parallel zum Blutfluss, erfolgt in vivo typischerweise als Reaktion vaskulärer Endothelzellen auf erhöhten hämodynamischen Stress, wie er in Regionen mit besonders ausgeprägten Flussgeschwindigkeiten auftritt (Wong et al., 1983).

Nach HoxB5 Funktionsblockierung durch RNA-Interferenz (RNAi) zeigten HUVEC eine Zunahme an Stressfasern, die mit einem Verlust der pflastersteinartigen Anordnung einherging. Im Gegensatz dazu hatte die Suppression von HoxB4 und HoxA9 keinen Einfluss auf die Zellmorphologie. In Kultur kann die Ausbildung von Actin-Stressfasern z.B. durch Stimulation der Endothelzell-Migration mit VEGF induziert werden. Neben der Ausbildung von

Actin-Stressfasern sind hierbei verschiedene zellulärer Signaltransduktionswege von Bedeutung. Eine zentrale Rolle konnte hier z.B. für die kleinen GTPasen Rho und Rac (Hiramoto et al., 2006; Katoh et al., 2006) sowie des PI3-Kinase/Akt Signaltransduktionswegs (Dimmeler and Zeiher, 2000; Morales-Ruiz et al., 2000; Zheng and Liu, 2006) aufgezeigt werden. Als ein möglicher Mediator der durch HoxB5-Suppression induzierten Veränderung des Actin-Zytoskeletts könnte hier die kleine GTPase RhoA oder ihre Effektor kinase ROCK agieren. Durch Aktivierung von RhoA/ROCK kommt es zur Ausbildung von Actin-Stressfasern (Amano et al., 1997; Uehata et al., 1997; Wojciak-Stothard et al., 2006). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression der eNOS über RhoA/ROCK durch Reduktion ihrer mRNA-Stabilität, reguliert wird (Ming et al., 2002). Dies stimmt mit den hier gefundenen Daten nach HoxB5 Suppression überein (Stressfasern, Reduktion der eNOS). Widersprüchlich ist der Befund das RhoA auch als wichtiger Regulator während der Angiogenese beschrieben wurde (Hoang et al., 2004), was einen funktionellen Effekt auf das in vitro Sprouting nach HoxB5-Suppression nahe legen würde, der in dieser Arbeit nicht gefunden wurde. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von konstitutiv aktivem RhoA in vivo die Neovaskularisation fördert, während dominant negatives RhoA diese inhibiert. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass die Autoren dieser Studie einen funktionellen Effekt von RhoA nur in vivo gefunden haben, während RhoA in vitro keine Effekte auf die pro-angiogene Funktionen wie Migration oder Proliferation hatte (Hoang et al., 2004).

Die ebenso angesprochene Proteinkinase Akt scheint im Zusammenhang mit der Reorganisation des Actin-Zytoskeletts nach HoxB5-Suppression, keine zentrale Rolle zu spielen. Die mit einer HoxB5-Suppression ebenso gefundene Reduktion der eNOS auf Proteinebene stünde im funktionellen Widerspruch mit der für Akt beschriebenen Funktion als Aktivator der eNOS durch Phosphorylierung an Serin 1177 (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999; Michell et al., 1999).

Neben der Reduktion der eNOS auf Proteinebene, konnte nach HoxB5-Suppression eine gesteigerte Proliferation der Endothelzellen gemessen

werden. Für Stickstoffmonoxid konnten dosisabhängig sowohl pro-proliferative, als auch anti-proliferative Effekte in Endothelzellen aufgezeigt werden (Heller et al., 1999; Ridnour et al., 2005; Zanetti et al., 2000). Hierbei scheinen insbesondere niedrige NO-Konzentrationen ($<0,1 \mu\text{M}$) einen pro-proliferativen Effekt auszuüben (Ridnour et al., 2005). Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Reduktion der eNOS und der gesteigerten Proliferation nach HoxB5-Suppression ist daher vorstellbar.

Die Identifizierung von HoxB5 Zielgenen als Mediatoren der beobachteten Effekte in HUVEC, ist daher ein wichtiges Anliegen weiterführender Studien, zur Aufklärung der funktionellen Rolle von HoxB5 in Endothelzellen.

Das angiogenetische Potential von Endothelzellen spiegelt sich unter anderem in ihrer Fähigkeit zur Selbstorganisation zu gefäßartigen Strukturen wieder (Watanabe et al., 2005). Hierbei spielt jedoch insbesondere das umgebende Milieu eine entscheidende Rolle. Während Proliferation die primäre Aktivität von Endothelzellen in 2-dimensionalen Kulturschalen ist, rücken Differenzierungsprozesse mit zunehmender Interaktionsfähigkeit der Zellen mit der Umgebung in den Vordergrund (Yang et al., 2004). Diese graduelle Transition von Proliferation zu Differenzierung ist möglicherweise eine Ursache für den fehlenden Effekt der HoxB5-Suppression bei der Analyse der in vitro Gefäßbildungsfähigkeit sowie des Sprouting im Sphäroid-Assay. Im Gegensatz zu HoxB5 RNAi konnte nach HoxB4 und HoxA9 Suppression in HUVEC ein anti-angiogener Effekt im Matrigel- und im Sphäroid Assay beobachtet werden. Die essentielle Rolle von HoxA9 für die Ausbildung und Aufrechterhaltung von Gefäßstrukturen im Matrigel-Assay steht im Einklang mit bereits publizierten Daten von Brühl et al., und konnte funktionell mit einer Dysregulation des EphB4-Rezeptors in Zusammenhang gebracht werden (Bruhl et al., 2004). Die Familie von Eph-Rezeptoren und ihren membranständigen Ephrin-Liganden konnte unter anderem als wichtige Regulatoren für die morphologische Ausbildung neuronaler und vaskulärer Netzwerk-Strukturen gezeigt werden (Palmer and Klein, 2003; Zimmer et al., 2003). Neben der Bedeutung für die Endothelzell-Migration (Bruhl et al., 2004; Steinle et al., 2002) ist EphB4 auch relevant für die Migration von Krebszellen (Masood et al., 2006) und deren

Metastasierungspotential (Xia et al., 2005). Die funktionelle Relevanz von EphB4 auch für das 3-dimensionale Sprouting von Endothelzellen im Sphäroid Assay konnte zudem erst kürzlich nachgewiesen werden (Fuller et al., 2003). Die beobachtete Inhibition der Sprouting-Kapazität nach HoxA9-Suppression, ist daher mit einem gestörten EphB4-Signalling zu erklären. Untersuchungen zur funktionellen Involvierung der Achse HoxA9/EphB4 für das Sprouting von Endothelzellen wurden im Rahmen dieser Arbeit im Kontext der Regulation durch die Histon Methyltransferase MLL durchgeführt und werden an anderer Stelle (4.4.4) ausführlich behandelt.

Ähnlich wie es für HoxA9 der Fall ist, scheint auch HoxB4 eine wichtige Rolle für das Sprouting von Endothelzellen zu spielen. Der Vergleich des funktionellen Effektes der HoxA9-Suppression mit der HoxB4-Suppression im Matrigel-Assay, lässt hierbei allerdings unterschiedliche Mechanismen als kausal erscheinen. Während HoxA9-defiziente Endothelzellen zu keiner Etablierung gefäßartiger Strukturen in der Lage sind, lagern sich HoxB4-defiziente Zellen zu deutlich weniger differenzierten Strukturen zusammen. Die Ausbildung 3-dimensionaler Strukturen im Sphäroid-Assay umfasst noch weitere zelluläre Vorgänge zu denen unter anderem die Ausbildung intrazellulärer Vakuolen, die Degradation und Invasion in die Kollagen-Matrix, Zell-Elongation und Anlagerung der Zellen aneinander gehören (Yang et al., 2004). Eine Beeinträchtigung des Differenzierungspotentials und eine mögliche Störung beim Aneinanderlagern der Zellen, wie sie die Ergebnisse des Matrigel-Assay nahe legen, sind daher mögliche Ursachen für die eingeschränkte Sprouting-Kapazität nach HoxB4-Suppression.

Im Kontext der bekannten HoxB4 Funktionen in embryonalen Stammzellen wirkt dieses Ergebnis erstaunlich. Als potenter Inhibitor der Differenzierung wird HoxB4 zur Expansion von Stammzellen eingesetzt (Antonchuk et al., 2002; Bowles et al., 2006; Miyake et al., 2006). Dieses Ergebnis zeigt daher zum einen, dass HoxB4 in der Tat eine funktionelle Bedeutung in differenzierten Zellen besitzt und zum anderen, dass es sich hierbei vermutlich um eine andere Funktion handelt, als es in undifferenzierten Stammzellen der Fall ist.

Bisher gibt es keine Untersuchungen, die die Funktion von HoxB4 mechanistisch aufklären konnten. Um den differentiellen Wirkmechanismus von HoxB4 in embryonalen Stammzellen und in den hier untersuchten Endothelzellen zu erklären, bieten sich verschiedene Ansätze an. Neben der bekannten dosis-abhängigen Wirkweise von HoxB4 (Kaushansky, 2005; Klump et al., 2005), könnten z.B. auch transkriptionelle Co-Faktoren eine wichtige Rolle spielen. Dass die Bildung unterschiedlicher Hox/Co-Faktor Komplexe die Funktion eines Hox-Transkriptionsfaktors in Abhängigkeit des jeweiligen Zelltyps modulieren kann, ist mehrfach beschrieben worden (Bei et al., 2005; Mann and Affolter, 1998; Mann and Chan, 1996). Auch der im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Einfluss von Meis1 auf die Kapazität von HoxA9, den eNOS-Promoter zu transaktivieren, verdeutlicht die besondere Bedeutung von transkriptionellen Co-Faktoren.

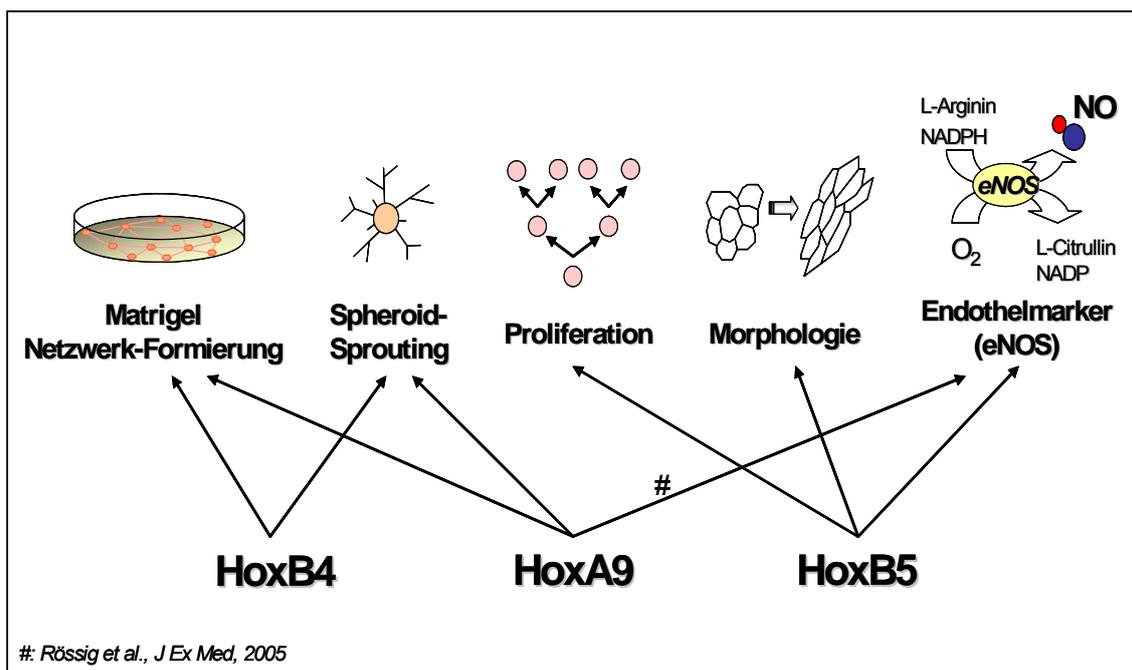


Abb. 4.1. Bedeutung von Hox-Transkriptionsfaktoren für Funktionen differenzierter Endothelzellen.

Zusammenfassend hat die Funktionsanalyse von Hox-Transkriptionsfaktoren mit bisher unbekannter Relevanz für Endothelzellen im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle von HoxB4 und HoxB5 für verschiedene funktionelle Aspekte wie

Proliferation, 2-dimensionale Netzwerkformierung sowie das 3-dimensionale Sprouting in HUVEC aufzeigen können, die in Abb. 4.1 noch einmal zusammengestellt sind. Von großer Bedeutung in weiterführenden Untersuchungen wird die Identifikation spezifischer Zielgene sein, um ein besseres Verständnis für die zu Grunde liegenden Signaltransduktionswege zu erhalten.

4.3. Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen durch Co-Faktoren, Lokalisation und *Shear Stress*

Der Befund, dass HoxB4 und HoxB5 an der Regulation verschiedener Endothelzell-Funktionen beteiligt sind, erweitert das Repertoire an Hox-Transkriptionsfaktoren mit Bedeutung für differenzierte Endothelzellen. Jedoch zeigt die Vielfalt an beobachteten Effekten nach Hox-Suppression in HUVEC (siehe Punkt 4.2), wie sehr sich die verschiedenen Hox-Transkriptionsfaktoren im Hinblick auf diese funktionelle Bedeutung unterscheiden. Umso entscheidender stellte sich daher die Frage nach Regulationsmechanismen.

Der wahrscheinlich bedeutendste Mechanismus ist hierbei die Regulation der Zielgen-Spezifität durch Bindung von transkriptionellen Co-Faktoren wie PBX oder Meis (Bei et al., 2005; Hoey and Levine, 1988; Laughon, 1991; Mann and Affolter, 1998; Mann and Chan, 1996). Ein interessanter Co-Faktor für HoxA9 ist Meis1, da für HoxA9 und Meis1 sowohl ein direktes Bindungsvermögen (Shen et al., 1999), als auch die differentielle Regulation des HoxA9-Zielgens CYBB in myeloiden Zellen durch Interaktion zwischen HoxA9 und Meis1 bzw. Pbx1 beschrieben ist (Bei et al., 2005). Da für HoxA9 die Transaktivierung des eNOS-Promoters bereits durch Reporter-gen-Analysen sowie durch den Nachweis der direkten Bindung an den eNOS Promoter in HUVEC gezeigt werden konnte (Rossig et al., 2005), wurde ein funktioneller Einfluss von Meis1 in der HoxA9 vermittelten Transaktivierung des eNOS-Promoters analysiert. Tatsächlich war es durch Überexpression von Meis1 in HEK293 Zellen möglich, die Transaktivierung des eNOS-Promoters durch HoxA9 zu inhibieren und ist

somit in die Wirkung von HoxA9 zu modulieren. Interessanterweise konnte in HUVEC keine funktionelle Rolle von Meis1 nachgewiesen werden, da es zwar auf mRNA Ebene exprimiert wird, das Protein jedoch einem konstitutivem Degradierungsprozess durch den Ubiquitin-Proteasomen-Komplex unterliegt. Nur durch die artifizielle Zugabe des Proteasomen-Komplex Inhibitors Lactacystin, konnte das Protein stabilisiert und im Western-Blot nachgewiesen werden.

Die Beobachtung, dass Meis1 in HUVEC, nicht jedoch in HEK293 Zellen abgebaut wird, deutet auf einen Zelltyp-spezifischen Degradationsprozess hin. Es stellt sich daher die Frage, nach der Regulation und Bedeutung der endothelspezifischen Degradation von Meis1. Dass insbesondere Meis1 einer Regulation durch gezielte Degradation unterliegen könnte, legt vor allem eine in silico Analyse der Proteinsequenz nahe. Diese zeigt eine ausgeprägte PEST-Sequenz von AS 250-279 innerhalb des Meis1-Proteins. Solche PEST-Sequenzen sind oftmals Merkmal von Proteinen, die einem schnellen Abbau durch den Proteasomen-Komplex unterliegen (Garcia-Alai et al., 2006). Zusätzliche Hinweise für eine gezielte Degradation von Meis1, lassen sich aus funktionellen Untersuchungen des nahe verwandten TALE Homeobox-Proteins *Prep1* ableiten. In Studien von Ferretti et al. konnte gezeigt werden, dass *Prep1*-defiziente Mäuse eine verminderte Expression von Meis1 sowie PBX1 und PBX2 auf Proteinebene, nicht jedoch auf mRNA-Ebene aufweisen. Diese Beobachtung wird mit einer regulatorischen Stabilisierung dieser Proteine erklärt, die z.B. Meis1 vor einer Degradation durch den Proteasomen-Komplex schützt (Ferretti et al., 2006). Der Verlust von *Prep1* geht zudem mit einer funktionellen Störung angiogener Vorläuferzellen einher, die sich in weniger organisierten kapillären Strukturen der embryonalen Allantois manifestiert (Ferretti et al., 2006). Obwohl diese Beobachtung nicht direkt auf die Reduktion von Meis1 zurückführen lässt, könnte sie dennoch ein möglicher Hinweis auf eine Funktion von Meis1 in Vorläuferzellen hindeuten, die mit zunehmender Differenzierung der Zellen unterdrückt wird. Eine regulative Degradation von Meis1 könnte weiterhin zum Beispiel als potentieller Schutzmechanismus vor maligner Entartung myeloider Zellen sein. In diesem Zelltyp kann es durch

genetische Mutationen von HoxA9, z.B. durch Fusion mit dem Kernporenprotein NUP98, zu akuter myeloider Leukämie (AML) kommen (Nakamura, 2005; Takeda et al., 2006). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Rezeptor-Tyrosinkinase *Flt3* eine wichtige Rolle bei der Induktion aggressiver AML durch Kollaboration mit HoxA9-Nup98 spielt. Meis1 ist hierbei von Bedeutung, da *Flt3* durch Meis1-Überexpression in myeloiden Zellen induziert wird (Palmqvist et al., 2006). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein dominant trans-aktivierendes Meis1 durch Fusion mit Vp16, als autonomes Onkogen in myeloiden Zellen agiert, dass die normalerweise kombinierten Funktion von Meis1 und HoxA9 bei der Induktion aggressiver AML ausübt (Wang et al., 2006).

Die funktionelle Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren durch andere Co-Faktoren der Meis/Prep- und/oder PBC-Familie in HUVEC ist aufgrund der geringen Bindungsspezifität der Hox-Transkriptionsfaktoren, dennoch als wahrscheinlich anzusehen. Die Bedeutung der gefundenen Degradation von Meis1 in Endothelzellen aber auch deren potentielle Relevanz als regulativer Mechanismus in anderen Zelltypen wie z.B. EPCs, ist ein sehr interessanter Gesichtspunkt, nicht nur im Bezug auf Transaktivierung des eNOS Promoters. Je nach Zielgen können Hox/Co-Faktor Komplexe als transkriptionelle Aktivatoren oder als transkriptionelle Repressoren wirken (Gebelein et al., 2004; Kobayashi et al., 2003; Saleh et al., 2000b). So wird z.B. der HoxB1/Pbx1 Komplex durch Bindung der HDAC1 an Pbx1 vom Repressor zum Aktivator (Saleh et al., 2000b). Genauere Untersuchungen zur Expression und Regulation von Hox Co-Faktoren sind daher wichtige Gesichtspunkte für zukünftige Studien zur Rolle von Hox Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen. Neben der Interaktion mit Co-Faktoren wurde auch die Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren durch Modulation ihrer intrazellulären Lokalisation sowie die transkriptionelle Regulation durch laminare Schubspannung untersucht. HoxB4-GFP und HoxB5-GFP sowie HoxA9-GFP lokalisieren unter basalen Zellkulturbedingungen im Zellkern von HUVEC. Da für verschiedene Hox-Transkriptionsfaktoren eine funktionelle Regulation durch Ausschluss aus dem Zellkern gezeigt werden konnte (Dintilhac et al., 2004; Komuves et al., 2000),

deutet die gefundene nukleäre Lokalisation auf eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation von Genen hin. Im Einklang mit dieser These, stünde auch die Beobachtung, dass sich ein aktiver Export dieser Hox-Transkriptionsfaktoren aus dem Zellkern, mit keinem der getesteten Stimuli induzieren ließ.

Der regulative Einfluss laminarer Schubspannung auf die transkriptionelle Expression von Hox-Transkriptionsfaktoren konnte für HoxA9 bereits nachgewiesen werden (Rossig et al., 2005). Neben HoxA9 erwies sich in dieser Arbeit auch HoxD3 als ein durch *Shear Stress* reguliertes Gen. HoxD3 stellt neben HoxA9 einen von wenigen Hox-Transkriptionsfaktoren mit beschriebener Funktion in Endothelzellen dar und ist wichtig für die Angiogenese. Hierbei agiert es als positiver Modulator der Expression von Integrinen sowie Matrix-degradierender Proteinase (Chen et al., 2004). Auch bei Wundheilungsprozessen und der Migration von Endothelzellen ist HoxD3 als wichtiger Regulator beschrieben (Boudreau and Varner, 2004; Hansen et al., 2003). Diese Funktionen von HoxD3 decken sich mit den Effekten von *Shear Stress* auf Endothelzellen. *Shear Stress* führt sowohl in vitro zu einer gesteigerten Endothelzell-Migration und Wundheilung (Albuquerque et al., 2000; Tardy et al., 1997; Urbich et al., 2002), als auch in vivo zu einer verbesserten Migration auf implantierten Stents und verbesserter Reendothelialisierung (Sprague et al., 1997; Wu et al., 1995).

Die *upstream* liegenden Signaltransduktions-Mechanismen, die zu einer verstärkten Expression von HoxA9 oder HoxD3 durch *Shear Stress* führen, sind bisher nicht bekannt. Von besonderer Bedeutung in diesem Kontext ist die mögliche Rolle der Histon-Methyltransferase MLL als Regulator angiogener Funktionen von Endothelzellen. Die hier gezeigte Regulation von MLL durch *Shear Stress* in Endothelzellen, gibt erstmals Hinweise auf die potentielle Möglichkeit zur globalen Modulation von Hox-Transkriptionsfaktoren durch *Shear Stress*.

4.4. Die Regulation angiogener Endothelzell-Funktionen durch die Histon-Methyltransferase MLL

Die Histon-Methyltransferase MLL wurde im Rahmen dieser Arbeit als spezifischer Regulator der HoxA9 und HoxD3 Expression in differenzierten Endothelzellen identifiziert. Die Regulation pro-angiogener Funktionen von Endothelzellen durch MLL ist von besonderer Bedeutung und wird im nächsten Abschnitt ausführlich diskutiert.

4.4.1. Epigenetische Genregulation durch *Shear Stress*

Die Exposition von Endothelzellen mit laminarer Schubspannung resultiert in einer Aktivierung multipler intrazellulärer Signaltransduktionswege, die z.B. über ERK1/2 (Jalali et al., 1998), (PI3K)/Akt (Fisslthaler et al., 2000), und die p38 MAP-Kinase (Surapisitchat et al., 2001) mediiert werden und führt letztlich zur transkriptionellen Aktivierung so genannter „*immediate early genes*“ (Chen et al., 1999; Hsieh et al., 1993; Illi et al., 2003). Als *Shear Stress* regulierte Gene wurden z.B. NF κ B, CREB oder AP1 beschrieben, die ihrerseits an der Regulation einer Vielzahl endothelspezifischer Gene beteiligt sind (de Nigris et al., 2003; Korenaga et al., 1997; Lan et al., 1994). Interessanterweise werden auch Transkriptionsfaktoren der Smad-Proteinfamilie durch *Shear Stress* reguliert (Brown et al., 1999; Topper et al., 1997). Smad-Proteine können ebenso wie Mitgliedern der Meis/Prep- und PBC-Familie, als transkriptionelle Hox Co-Faktoren agieren (Bai et al., 2000; Shi et al., 1999; Wan et al., 2001). Für einige Gene konnte gezeigt werden, dass ihr transkriptioneller Status außerdem über die Zugänglichkeit des Chromatins für Transkriptionsfaktoren reguliert wird (Jenuwein and Allis, 2001). Eine wichtige Rolle spielen hierbei insbesondere Histon-modifizierende Enzyme. Zu den am besten charakterisierten Klassen Histon-modifizierender Enzyme zählen die Familien der Histon-Acetyltransferasen (HAT) sowie ihrer Antagonisten den Histon-Deacetylasen (HDAC) (Chen et al., 2001; Jenuwein and Allis, 2001). Die

epigenetische Kontrolle von Genen durch *Shear Stress*, konnte für diese Klassen Histon-modifizierender Enzyme bereits aufgezeigt werden. So resultiert die Exposition von Endothelzellen mit *Shear Stress* z.B. in einer verstärkten Acetylierung an Histon H3 in den Promotoren verschiedener „*immediate early*“ Gene, wie z.B. dem proto-Onkogen *c-fos* (Illi et al., 2003; Illi et al., 2005). Die Acetylierung von Histonen stellt jedoch neben der Phosphorylierung, poly(ADP-Ribosylierung), Ubiquitinierung, Sumoylierung und Methylierung, nur eine von vielen regulatorischen Histon-Modifikationen dar (Lachner et al., 2003; Mizzen et al., 1998; Spencer and Davie, 1999; Wu and Grunstein, 2000). Die Histon-Methyltransferase MLL wurde im Rahmen dieser Arbeit als erstes Histon-methylierendes Enzym identifiziert, dass auf Expressionsebene durch *Shear Stress* reguliert wird. Dass die Methylierung von Histonen durch die Exposition mit *Shear Stress* direkt induziert wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Diese Möglichkeit liegt jedoch nahe, da bekannt ist, dass bereits acetyliertes Histon H3 bzw. H4 auch präferentielles Ziel für Histon Methylierung ist (Annunziato et al., 1995; Hendzel and Davie, 1991). Umgekehrt konnte am Beispiel des Kollagenase-Gens gezeigt werden, dass hier eine Methylierung an H3K4, mit einer nachgeschalteten Acetylierung einhergeht (Wang et al., 2001). Es wird daher vermutet, dass Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Methyltransferasen (HMTs) einen synergistischen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von Zielgenen ausüben (Annunziato et al., 1995; Hendzel and Davie, 1989; Hendzel and Davie, 1991; Hendzel and Davie, 1992).

4.4.2. Regulation von Hox-Genen durch die Histon-Methyltransferase MLL

Die epigenetische Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren durch die Histon-Methyltransferase MLL ist unter anderem für HoxA7, HoxA9 und HoxA10 sowie HoxC8 während der Embryonalentwicklung bzw. am Beispiel der *ex vivo* Differenzierung embryonaler Stammzellen gezeigt worden (Ernst et al., 2004b;

Milne et al., 2002; Nakamura et al., 2002; Yu et al., 1998). In dieser Arbeit konnte MLL erstmals als Regulator von HoxA9 sowie HoxD3 in differenzierten Endothelzellen beschrieben werden. Dies ist besonders interessant im Hinblick darauf, dass wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, MLL ebenso wie HoxA9 und HoxD3 durch *Shear Stress* reguliert werden.

Es ist bekannt, dass die katalytische SET-Domäne von MLL die Methylierung von Histon H3 an Lysin K4 vermittelt (Milne et al., 2002) und dass die di- oder tri-Methylierung an H3K4 mit einer Aktivierung des transkriptionellen Status von Zielgenen verbunden ist (Sims and Reinberg, 2006). Im Gegensatz zur Acetylierung von Histonen an konservierten Lysin-Resten, die zu einer Verminderung der positiven Ladung und Abnahme der Bindungsaffinität zur negative geladenen DNA einhergeht, hat die Methylierung keinen Einfluss auf die Gesamtladung der Histone (Rice and Allis, 2001). Es wird daher vermutet,

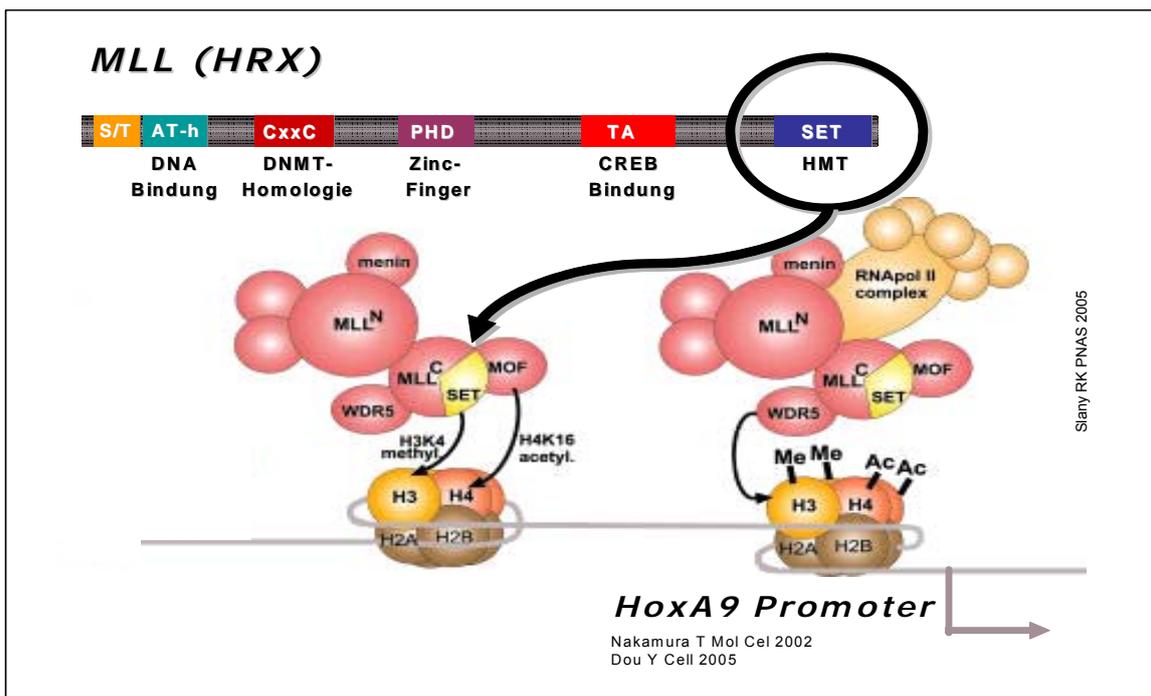


Abb. 4.2. Transkriptionelle Regulation durch den MLL-Superkomplex (modifiziert nach Slany RK, PNAS, 2005)

dass der positive Effekt einer di- oder tri-Methylierung von H3K4 auf den transkriptionellen Status von Zielgenen durch zusätzliche Faktoren vermittelt wird, die solche „Methylierungs-Signale“ selektiv erkennen und binden können

(Wysocka et al., 2005; Wysocka et al., 2006). Wie durch Nakamura et al. aufgezeigt stellt MLL nur einen Anteil eines stabilen Superkomplexes von mindestens 27 Proteinen dar. Dieser Protein-Superkomplex besitzt neben der Fähigkeit zur spezifischen Methylierung von H3K4 auch eine intrinsische Histonacetylierungs- als auch Histon-Deacetylierungs-Aktivität (Nakamura et al., 2002). Abb. 4.2 stellt ein Modell des komplexen Zusammenspiels von Histon-Methylierung und Acetylierung am Beispiel des HoxA9-Promoters dar (Nakamura et al., 2002; Slany, 2005). Die zuvor angesprochene synergistische Wirkung von Methylierung und Acetylierung ist hier am Beispiel der Histon-Methyltransferase MLL und der durch MLL rekrutierten Histon H4 Lysin K16 Acetyltransferase MOF dargestellt (Dou et al., 2005).

4.4.3. Bedeutung der SET-vermittelten Methylierung von H3K4 für die transkriptionelle Regulation von HoxA9 und HoxD3

Die transkriptionelle Kontrolle von HoxA9 und HoxD3 durch MLL wurde im Rahmen dieser Arbeit durch drei verschiedene Untersuchungsansätze analysiert. Durch Suppression der MLL-Expression, konnte die generelle Bedeutung von MLL für diese beiden Hox-Gene nachgewiesen werden, deren transkriptionelle Expression direkt von MLL abhängig war. Hinweise zur funktionellen Relevanz der H3K4 Methylierungskapazität der SET-Domäne von MLL, wurden durch den Nachweis der typischen H3K4 di-Methylierung in den Promotoren von HoxA9 und HoxD3 in HUVEC erbracht, wie sie für HoxA9 in HeLa Zellen bereits gezeigt werden konnte (Nakamura et al., 2002). Die Suppression von MLL hatte eine Inhibition der Migration sowie einen nahezu vollständigen Verlust der Sprouting-Kapazität zur Folge. Diese beobachteten biologischen Effekte nach MLL-Suppression, konnte auch durch die pharmakologische Inhibition der intrinsischen Methyltransferase-Aktivität von MLL simuliert werden, was deren funktionelle Relevanz zusätzlich untermauert. Da der verwendete pharmakologische Inhibitor MTA nicht spezifisch für die katalytische Aktivität der MLL SET-Domäne ist, kann dieser Effekt jedoch auch

durch die Inhibition weiterer Methyltransferasen verursacht worden sein (Song and Ghosh, 2004). Die besondere Sensitivität von HoxA9 bzw. HoxD3, wie sie bereits in geringer Dosierung (1 mM) nach Behandlung mit dem Methyltransferase-Inhibitor MTA gefunden wurde, lässt eine Bedeutung der Methyltransferase-Aktivität von MLL für die beobachteten Effekte jedoch als wahrscheinlich erscheinen. Der Einfluss von hochdosiertem MTA (5 mM) auch auf andere Hox-Transkriptionsfaktoren, reflektiert die zuvor erwähnte Unspezifität des Inhibitors.

Die Bedeutung der katalytischen SET-Domäne für die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Milne et al. konnten zeigen, dass MLL spezifisch an den HoxC8-Promoter bindet und die SET-Domäne dort die Methylierung an H3K4 katalysiert. Die gleiche Gruppe fand jedoch, dass auch ein MLL-Fusionsprotein, ohne katalytische SET-Domäne, zu einer Aktivierung des HoxC8-Promoters in der Lage ist (Milne et al., 2002). Für diese Diskrepanz gibt es verschiedene Erklärungsansätze. So wird z.B. vermutet, dass die transkriptionelle Aktivierung von MLL-Zielgenen auch über Mechanismen reguliert werden kann, die keiner Methylierung an H3K4 bedürfen. Da z.B. die Methylierung an Histon H3 Lysin K9 mit einer Repression der Transkription korreliert (Jenuwein and Allis, 2001), könnte MLL auch als transkriptioneller Aktivator wirken, indem es dieser Methylierung an H3K9 entgegenwirkt (Milne et al., 2002). Zusätzlich ist der bereits erwähnte synergistische Effekt von Histon-Methyltransferasen und Histon-Acetyltransferasen zu nennen, der sich in der Rekrutierung der Histon K4 Lysin K16 Acetyltransferase MOF durch MLL an den HoxA9-Promoter in HeLa-Zellen widerspiegelt (Dou et al., 2005). Die Fähigkeit zur Rekrutierung von MOF in den MLL-Superkomplex, konnte auch für MLL-Fusionsproteine mit trunkierter SET-Domäne nachgewiesen werden (Dou et al., 2005). Argumente für eine wichtige Rolle der H3K4-Methylierung konnten von Dorrance et al. am Beispiel der Promotoren von HoxA7 und HoxA9 aufgezeigt werden (Dorrance et al., 2006). So resultiert die genetische Translokation von MLL auf Chromosom 11q23 durch Fusion mit einem von 40 möglichen Genen, immer in einem Verlust der katalytischen SET-Domäne, die durch den Fusionspartner ersetzt

wird (Zeleznik-Le et al., 1994). Vor diesem Hintergrund wurde eine genetische Mutation des MLL-Gens beschrieben, bei der es zu einer im Leserahmen liegenden partiellen Tandem Duplikation kommt. Im Gegensatz zu den zuvor erwähnten Translokationen führt diese Mutation zu einem verstärkt aktiven MLL-Fusionsprotein, dessen katalytische SET-Domäne erhalten bleibt (Caligiuri et al., 1994). Diese MLL-Mutation resultiert in Mäusen in einer verstärkten Methylierung an H3K4 in den Promotoren von HoxA9 und HoxA7 und stützt somit die Bedeutung der methylierungs-katalysierenden MLL SET-Domäne (Dorrance et al., 2006). Ob die MLL-vermittelte H3K4-Methylierung letztlich ursächlich für die transkriptionelle Regulation von HoxA9 und HoxD3 in HUVEC ist, lässt sich aus den gewonnenen Daten nicht mit Sicherheit schließen.

4.4.4. Funktionelle Bedeutung von MLL für Endothelzell-Funktionen

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Effekte der siRNA-vermittelten Suppression von MLL, konnten erstmals eine direkte Relevanz von MLL für pro-angiogene Endothelzell-Funktionen, wie Migration und Sprouting in vitro aufzeigen. In vivo ist die embryonale Vaskulogenese in MLL-defizienten Mäusen kaum beeinträchtigt (Ernst et al., 2004a), jedoch ist dies möglicherweise auf die frühe embryonale Letalität dieser Tiere zurückzuführen, was eine Detektion möglicher angiogenetischer Defekte in späteren Entwicklungsstadien verhindert. Um die zellulären Mediatoren der beobachteten MLL-Effekte zu identifizieren, wurde die funktionelle Rolle der beiden MLL-Zielgene HoxA9 und HoxD3 und ihrer downstream liegenden Effektoren in HUVEC untersucht. Die besondere Bedeutung von HoxA9 als Regulator verschiedener endothelialer Gene, wie z.B. der eNOS, oder des VEGF-Rezeptor 2 (KDR), ebenso wie die funktionelle Relevanz für Prozesse wie die Endothelzell-Migration oder die Ausbildung Gefäßartiger Strukturen auf Matrigel ist in Vorarbeiten von Brühl et al. und Rössig et al. beschrieben worden (Bruhl et al., 2004; Rossig et al., 2005). Als ein im Kontext der Migration beschriebenes Zielgen von HoxA9 in HUVEC (Bruhl et al., 2004),

erwies sich der EphB4-Rezeptor als besonders interessant. Die Familie von Eph-Rezeptoren und ihrer Ephrin Liganden ist in einer Vielzahl zellulärer Prozessen von funktioneller Bedeutung. Neben der Formierung des vaskulären Netzwerks sind diese z.B. auch von Bedeutung für die synaptische Plastizität, die Proliferation von Stammzellen und Zell-Migration (Bruhl et al., 2004; Palmer and Klein, 2003; Zimmer et al., 2003). Durch gezielte HoxA9 „Rescue“-Experimente konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Suppression von MLL unter anderem in einer Inhibition der HoxA9/EphB4-Achse resultiert und so funktionell in die Migration von Endothelzellen eingreift. Als besonders beeindruckend konnte über dies gezeigt werden, dass die MLL-vermittelte Inhibition der Migration nicht exklusiv über HoxA9 vermittelt zu werden scheint, sondern auch über HoxD3 durch Regulation der Integrin-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 3$. Dieser Befund steht im Einklang mit der funktionellen Rolle von HoxD3, wie sie für die Endothelzell-Migration und die Angiogenese beschrieben ist (Boudreau and Varner, 2004; Chen et al., 2004). Mit HoxA9 und HoxD3 konnten somit 2 Hox-Transkriptionsfaktoren mit funktioneller Bedeutung für den pro-angiogenen Aspekt der Migration, als spezifische MLL-Zielgene in Endothelzellen aufgezeigt werden.

Erstaunlicherweise scheint der Einfluss von MLL auf das Sprouting von Endothelzellen über zusätzliche Mechanismen vermittelt zu werden, die über die Regulation des EphB4-Rezeptors bzw. der Integrine $\alpha V\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ hinausgehen. Während sowohl HoxA9, als auch HoxD3 zu einer partiellen Kompensation der MLL-vermittelten Migrations-Hemmung in der Lage waren, konnte der Verlust der Sprouting-Kapazität nicht kompensiert werden. Auch die Beobachtung, dass die Suppression von HoxA9 zu einer nur etwa 50-prozentigen Hemmung des Sprouting führt, während die Suppression von MLL dieses nahezu vollständig unterbindet, legt Mechanismen nahe, die über HoxA9 und HoxD3 hinausgehen. Die besondere Rolle von HoxA9 und HoxD3 als Mediatoren pro-angiogener Funktionen durch MLL, wird jedoch durch die Beobachtung gestärkt, dass die Hox-Transkriptionsfaktoren HoxB4 und B5 sowie das HoxA9-Paralog HoxB9 bzw. das HoxD3-Paralog HoxB3 keiner Regulation durch MLL unterlagen. Ein interessanter Aspekt zukünftiger Studien

kann in diesem Zusammenhang auch die funktionelle Rolle von HoxC8 sein. HoxC8 wurde als ein direktes Zielgen von MLL beschrieben (Milne et al., 2002) und ist zudem in embryonalen Fibroblasten an der Regulation von Proteinen beteiligt, die in eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z.B. Adhäsion, Migration und Apoptose eingreifen (Lei et al., 2005).

Mögliche zusätzliche Faktoren von Relevanz für das Sprouting neben EphB4 und den durch HoxD3 regulierten Integrinen, finden sich in der Kinase ERK sowie der p38 MAP-Kinase. Wie bereits erwähnt, ist das 3-dimensionale Sprouting von Endothelzellen ein wesentlich komplexerer Vorgang, als die 2-dimensional ausgerichtete Migration *in vitro*, bei der primär das *Spreading* und die Proliferation im Vordergrund stehen (Dimmeler et al., 2000; Tamura et al., 1998). Für das 3-dimensionale Sprouting von Endothelzellen *in vitro* konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess mit einer Transition von Proliferation zu Differenzierung einhergeht. Dieser Übergang ist mit einer funktionellen Veränderung des ERK-Signaltransduktionsweges verbunden, welcher die Viabilität der differenzierenden Endothelzellen aufrechterhält. Zudem kommt

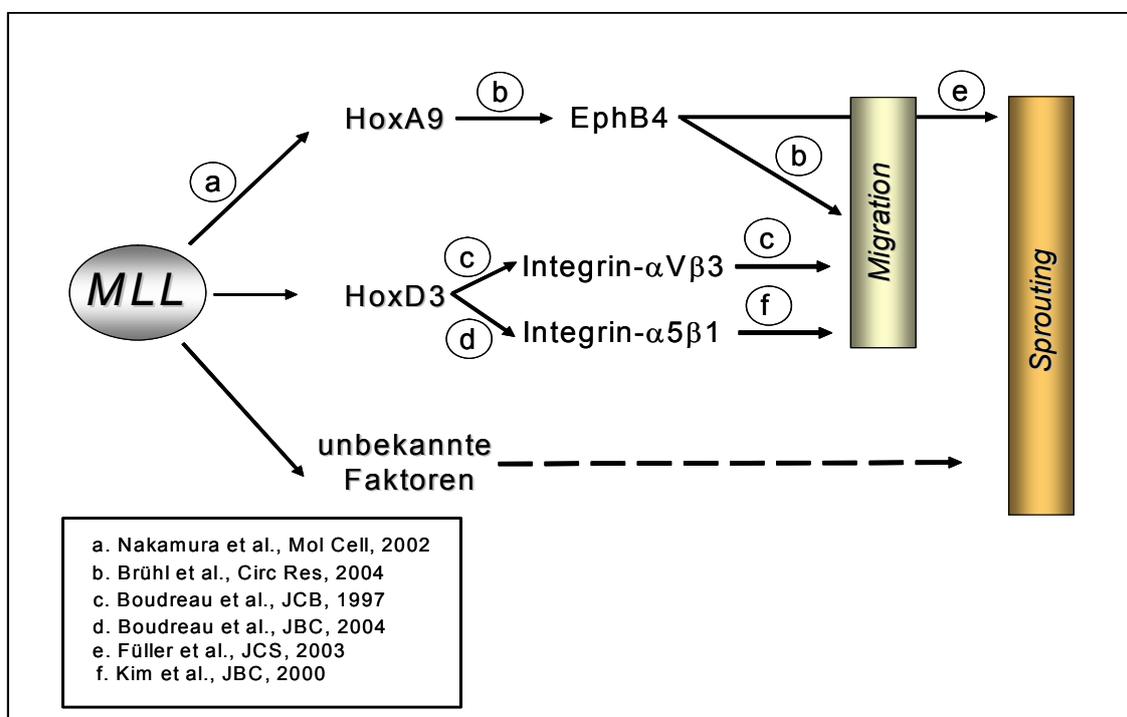


Abb. 4.3. Rolle von MLL für pro-angiogene Endothelzell-Funktionen

es zu einer Modulation der p38 MAP-Kinase, die mutmaßlich für eine Reduktion der Proliferation verantwortlich ist (Yang et al., 2004). Die siRNA-vermittelte Suppression von HoxB4 resultierte in einer ähnlich stark ausgeprägten Inhibition des endothelialen Sprouting, wie es auch nach HoxA9-Suppression der Fall ist. HoxB4 wurde jedoch nicht als von MLL reguliertes Gen gefunden. Dies ist ein zusätzlicher Hinweis auf die notwendige Integrität des komplexen Zusammenspiels verschiedener Signaltransduktionswege während des Sprouting. Ein schematischer Überblick, über die gefundene Rolle von MLL für pro-angiogene Funktionen ist in Abb. 4.3 dargestellt.

5. Zusammenfassung

Die funktionelle Integrität des Endothels ist von essentieller Bedeutung für den Organismus. Die Entstehung und Progression vaskulärer Erkrankungen, wie z.B. der Atherosklerose, ist daher oftmals ursächlich mit einer Dysfunktion des Endothels verbunden. Vor diesem Hintergrund ist insbesondere die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Regulation von Endothelzellfunktionen, ein zentraler Aspekt heutiger Forschung. Homeobox- (Hox) Transkriptionsfaktoren nehmen eine Schlüsselposition bei der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Migration und Gewebe-spezifischer Differenzierung ein. Die Identifikation sowie die Analyse der Funktion und Regulation von Hox-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen, leistet deshalb einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Endothelzellbiologie. Als ein zentraler Befund dieser Arbeit, konnte mit der Histon-Methyltransferase MLL erstmals die funktionelle Rolle eines epigenetischen Hox-Regulators auch in differenzierten Endothelzellen nachgewiesen werden. MLL erwies sich hierbei von essentieller Bedeutung für pro-angiogene Endothelzell-Funktionen. Die bedeutende Rolle von MLL bei der Migration von Endothelzellen konnte mit der transkriptionellen Regulation der beiden Hox-Transkriptionsfaktoren HoxA9 und HoxD3 in Verbindung gebracht werden, die hier erstmals als direkte Zielgene von MLL in Endothelzellen beschrieben wurden. Als funktionelle Mediatoren der MLL-abhängigen Migration konnten zudem der EphB4-Rezeptor sowie die Integrine $\alpha V\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$, als Zielgene von HoxA9 bzw. HoxD3 nachgewiesen werden. Neben der Migration konnte für MLL auch eine essentielle Rolle für das Sprouting von Endothelzellen nachgewiesen werden, die sich im Gegensatz zur Migration, nicht auf die Regulation von HoxA9 oder HoxD3 zurückführen ließ. Diese Beobachtung lässt auf die Involvierung zusätzlicher MLL-abhängiger Faktoren schließen, und verdeutlicht damit die zentrale Rolle von MLL bei der Regulation komplexer, pro-angiogener Prozesse in Endothelzellen. Über die genannte Rolle von MLL hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit das Wissen um Hox-Transkriptionsfaktoren mit funktioneller Relevanz für Endothelzellen, um die beiden Hox-Transkriptionsfaktoren HoxB4 und HoxB5

erweitert werden. Hier konnte für HoxB4 eine Rolle für die Fähigkeit von Endothelzellen zur Ausbildung zwei- und 3-dimensionaler Gefäßstrukturen nachgewiesen werden, während HoxB5 in die Proliferation, die Expression des endothelialen Markergens eNOS sowie die morphologische Beschaffenheit von Endothelzellen eingreift. Zusätzlich konnte die Rolle von transkriptionellen Hox Co-Faktoren, als Modulatoren von Hox-Funktionen, am Beispiel der Interaktion von Meis1 und HoxA9 bei der Transaktivierung des eNOS-Promoters aufgezeigt werden.

Zusammenfassend leisten die hier gezeigten Daten einen Beitrag zum Verständnis der Rolle von Hox-Transkriptionsfaktoren als molekulare Regulatoren endothelialer Zellfunktionen.

6. Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ad	auf
Abd-B	Abdominal-B
Antp	Antennapedia
APS	Ammoniumpersulfat
7-AAD	7-Amino-Actinomycin
bFGF	engl.: basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdeoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw	beziehungsweise
CD	engl.: cluster of differentiation
cDNA	engl.: complementary DNA
DAPI	4,6 Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
dest.	destilliert
DTT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
et al.	und andere
EZ	Endothelzellen
Fa	Firma
FACS	engl.: Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Hox	Homeobox
HUVEC	engl.: Human Umbilical Venous Endothelial Cell
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MP	Milchpulver
n	Anzahl der Versuche
n.s.	nicht signifikant
NF κ B	engl.: Nuclear factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
VE-Cad	eng.: vascular endothelial cadherin
VEGF	engl.: vascular endothelial growth factor
wt	Wildtyp

7. Literatur

Abate-Shen, C. (2002). Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer* **2**, 777-85.

Abu-Shaar, M., Ryoo, H. D. and Mann, R. S. (1999). Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals. *Genes Dev* **13**, 935-45.

Acampora, D., D'Esposito, M., Faiella, A., Pannese, M., Migliaccio, E., Morelli, F., Stornaiuolo, A., Nigro, V., Simeone, A. and Boncinelli, E. (1989). The human HOX gene family. *Nucleic Acids Res* **17**, 10385-402.

Affolter, M., Percival-Smith, A., Muller, M., Leupin, W. and Gehring, W. J. (1990). DNA binding properties of the purified Antennapedia homeodomain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4093-7.

Akam, M. (1989). Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell* **57**, 347-9.

Albuquerque, M. L., Waters, C. M., Savla, U., Schnaper, H. W. and Flozak, A. S. (2000). Shear stress enhances human endothelial cell wound closure in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H293-302.

Amano, M., Chihara, K., Kimura, K., Fukata, Y., Nakamura, N., Matsuura, Y. and Kaibuchi, K. (1997). Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* **275**, 1308-11.

Annunziato, A. T., Eason, M. B. and Perry, C. A. (1995). Relationship between methylation and acetylation of arginine-rich histones in cycling and arrested HeLa cells. *Biochemistry* **34**, 2916-24.

Antonchuk, J., Sauvageau, G. and Humphries, R. K. (2002). HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* **109**, 39-45.

Armstrong, S. A., Staunton, J. E., Silverman, L. B., Pieters, R., den Boer, M. L., Minden, M. D., Sallan, S. E., Lander, E. S., Golub, T. R. and Korsmeyer, S. J. (2002). MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* **30**, 41-7.

Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schattman, G. and Isner, J. M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-7.

- Bai, S., Shi, X., Yang, X. and Cao, X.** (2000). Smad6 as a transcriptional corepressor. *J Biol Chem* **275**, 8267-70.
- Bei, L., Lu, Y. and Eklund, E. A.** (2005). HOXA9 activates transcription of the gene encoding gp91Phox during myeloid differentiation. *J Biol Chem* **280**, 12359-70.
- Belotti, D., Clause, N., Flagiello, D., Alami, Y., Daukandt, M., Deroanne, C., Malfoy, B., Boncinelli, E., Faiella, A. and Castronovo, V.** (1998). Expression and modulation of homeobox genes from cluster B in endothelial cells. *Lab Invest* **78**, 1291-9.
- Benson, G. V., Lim, H., Paria, B. C., Satokata, I., Dey, S. K. and Maas, R. L.** (1996). Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* **122**, 2687-96.
- Bernstein, B. E., Humphrey, E. L., Erlich, R. L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J. S., Kouzarides, T. and Schreiber, S. L.** (2002). Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8695-700.
- Boo, Y. C. and Jo, H.** (2003). Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C499-508.
- Botas, J.** (1993). Control of morphogenesis and differentiation by HOM/Hox genes. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 1015-22.
- Boudreau, N., Andrews, C., Srebrow, A., Ravanpay, A. and Cheresh, D. A.** (1997). Induction of the angiogenic phenotype by Hox D3. *J Cell Biol* **139**, 257-64.
- Boudreau, N. J. and Varner, J. A.** (2004). The homeobox transcription factor Hox D3 promotes integrin alpha5beta1 expression and function during angiogenesis. *J Biol Chem* **279**, 4862-8.
- Bowles, K. M., Vallier, L., Smith, J. R., Alexander, M. R. and Pedersen, R. A.** (2006). HOXB4 overexpression promotes hematopoietic development by human embryonic stem cells. *Stem Cells* **24**, 1359-69.

Brown, J. D., DiChiara, M. R., Anderson, K. R., Gimbrone, M. A., Jr. and Topper, J. N. (1999). MEKK-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad2-mediated transcriptional activation in endothelial cells. *J Biol Chem* **274**, 8797-805.

Bruhl, T., Urbich, C., Aicher, D., Acker-Palmer, A., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2004). Homeobox A9 transcriptionally regulates the EphB4 receptor to modulate endothelial cell migration and tube formation. *Circ Res* **94**, 743-51.

Brun, A. C., Bjornsson, J. M., Magnusson, M., Larsson, N., Leveen, P., Ehinger, M., Nilsson, E. and Karlsson, S. (2004). Hoxb4-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood* **103**, 4126-33.

Caligiuri, M. A., Schichman, S. A., Strout, M. P., Mrozek, K., Baer, M. R., Frankel, S. R., Barcos, M., Herzig, G. P., Croce, C. M. and Bloomfield, C. D. (1994). Molecular rearrangement of the ALL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations. *Cancer Res* **54**, 370-3.

Care, A., Felicetti, F., Meccia, E., Bottero, L., Parenza, M., Stoppacciaro, A., Peschle, C. and Colombo, M. P. (2001). HOXB7: a key factor for tumor-associated angiogenic switch. *Cancer Res* **61**, 6532-9.

Chang, C. P., Brocchieri, L., Shen, W. F., Largman, C. and Cleary, M. L. (1996). Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus. *Mol Cell Biol* **16**, 1734-45.

Chang, C. P., Shen, W. F., Rozenfeld, S., Lawrence, H. J., Largman, C. and Cleary, M. L. (1995). Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev* **9**, 663-74.

Chen, H., Tini, M. and Evans, R. M. (2001). HATs on and beyond chromatin. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 218-24.

Chen, K. D., Li, Y. S., Kim, M., Li, S., Yuan, S., Chien, S. and Shyy, J. Y. (1999). Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J Biol Chem* **274**, 18393-400.

Chen, Y., Xu, B., Arderiu, G., Hashimoto, T., Young, W. L., Boudreau, N. and Yang, G. Y. (2004). Retroviral delivery of homeobox D3 gene induces cerebral angiogenesis in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**, 1280-7.

Chien, S., Li, S. and Shyy, Y. J. (1998). Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension* **31**, 162-9.

Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S. et al. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**, 3527-61.

Coffin, J. D. and Poole, T. J. (1988). Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos. *Development* **102**, 735-48.

Colangelo, S., Langille, B. L. and Gotlieb, A. I. (1994). Three patterns of distribution characterize the organization of endothelial microfilaments at aortic flow dividers. *Cell Tissue Res* **278**, 235-42.

Condie, B. G. and Capecchi, M. R. (1993). Mice homozygous for a targeted disruption of Hoxd-3 (Hox-4.1) exhibit anterior transformations of the first and second cervical vertebrae, the atlas and the axis. *Development* **119**, 579-95.

Daftary, G. S. and Taylor, H. S. (2006). Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr Rev* **27**, 331-55.

Davis, M. E., Grumbach, I. M., Fukai, T., Cutchins, A. and Harrison, D. G. (2004). Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem* **279**, 163-8.

de Groot, C. J., Chao, V. A., Roberts, J. M. and Taylor, R. N. (1995). Human endothelial cell morphology and autacoid expression. *Am J Physiol* **268**, H1613-20.

de Nigris, F., Lerman, L. O., Ignarro, S. W., Sica, G., Lerman, A., Palinski, W., Ignarro, L. J. and Napoli, C. (2003). Beneficial effects of antioxidants and L-arginine on oxidation-sensitive gene expression and endothelial NO synthase activity at sites of disturbed shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1420-5.

Dimmeler, S., Dernbach, E. and Zeiher, A. M. (2000). Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* **477**, 258-62.

Dimmeler, S., Fisslthaler, B., Fleming, I., Hermann, C., Busse, R. and Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells via Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601-605.

- Dimmeler, S., Haendeler, J., Rippmann, V., Nehls, M. and Zeiher, A. M.** (1996). Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett.* **399**, 71-74.
- Dimmeler, S. and Zeiher, A. M.** (2000). Akt takes centre stage in angiogenesis signaling. *Circ Res* **86**, 4-5.
- Dintilhac, A., Bihan, R., Guerrier, D., Deschamps, S. and Pellerin, I.** (2004). A conserved non-homeodomain Hoxa9 isoform interacting with CBP is co-expressed with the 'typical' Hoxa9 protein during embryogenesis. *Gene Expr Patterns* **4**, 215-22.
- Djabali, M., Selleri, L., Parry, P., Bower, M., Young, B. and Evans, G. A.** (1993). A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat Genet* **4**, 431.
- Dorrance, A. M., Liu, S., Yuan, W., Becknell, B., Arnoczky, K. J., Guimond, M., Strout, M. P., Feng, L., Nakamura, T., Yu, L. et al.** (2006). MII partial tandem duplication induces aberrant Hox expression in vivo via specific epigenetic alterations. *J Clin Invest* **116**, 2707-2716.
- Dou, Y., Milne, T. A., Tackett, A. J., Smith, E. R., Fukuda, A., Wysocka, J., Allis, C. D., Chait, B. T., Hess, J. L. and Roeder, R. G.** (2005). Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* **121**, 873-85.
- Du, H., Daftary, G. S., Lalwani, S. I. and Taylor, H. S.** (2005). Direct regulation of HOXA10 by 1,25-(OH)₂D₃ in human myelomonocytic cells and human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* **19**, 2222-33.
- Durston, A. J., Timmermans, J. P., Hage, W. J., Hendriks, H. F., de Vries, N. J., Heideveld, M. and Nieuwkoop, P. D.** (1989). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* **340**, 140-4.
- Ebner, A., Cabernard, C., Affolter, M. and Merabet, S.** (2005). Recognition of distinct target sites by a unique Labial/Extradenticle/Homothorax complex. *Development* **132**, 1591-600.
- Ekker, S. C., Young, K. E., von Kessler, D. P. and Beachy, P. A.** (1991). Optimal DNA sequence recognition by the Ultrabithorax homeodomain of *Drosophila*. *Embo J* **10**, 1179-86.

Ernst, P., Fisher, J. K., Avery, W., Wade, S., Foy, D. and Korsmeyer, S. J. (2004a). Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. *Dev Cell* **6**, 437-43.

Ernst, P., Mabon, M., Davidson, A. J., Zon, L. I. and Korsmeyer, S. J. (2004b). An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Curr Biol* **14**, 2063-9.

Favier, B., Le Meur, M., Chambon, P. and Dolle, P. (1995). Axial skeleton homeosis and forelimb malformations in Hoxd-11 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 310-4.

Fernandez Pujol, B., Lucibello, F. C., Gehling, U. M., Lindemann, K., Weidner, N., Zuzarte, M. L., Adamkiewicz, J., Elsasser, H. P., Muller, R. and Havemann, K. (2000). Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation* **65**, 287-300.

Ferretti, E., Villaescusa, J. C., Di Rosa, P., Fernandez-Diaz, L. C., Longobardi, E., Mazzieri, R., Miccio, A., Micali, N., Selleri, L., Ferrari, G. et al. (2006). Hypomorphic mutation of the TALE gene Prep1 (pKnox1) causes a major reduction of Pbx and Meis proteins and a pleiotropic embryonic phenotype. *Mol Cell Biol* **26**, 5650-62.

Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Hermann, C., Busse, R. and Fleming, I. (2000). Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand* **168**, 81-8.

Fromental-Ramain, C., Warot, X., Lakkaraju, S., Favier, B., Haack, H., Birling, C., Dierich, A., Dollé, P. and Chambon, P. (1996). Specific and redundant functions of the paralogous Hoxa-9 and Hoxd-9 genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development* **122**, 461-72.

Fuller, T., Korff, T., Kilian, A., Dandekar, G. and Augustin, H. G. (2003). Forward EphB4 signaling in endothelial cells controls cellular repulsion and segregation from ephrinB2 positive cells. *J Cell Sci* **116**, 2461-70.

Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A. and Sessa, W. C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**, 597-601.

Garcia-Alai, M. M., Gallo, M., Salame, M., Wetzler, D. E., McBride, A. A., Paci, M., Cicero, D. O. and de Prat-Gay, G. (2006). Molecular basis for phosphorylation-dependent, PEST-mediated protein turnover. *Structure* **14**, 309-19.

Gebelein, B., McKay, D. J. and Mann, R. S. (2004). Direct integration of Hox and segmentation gene inputs during *Drosophila* development. *Nature* **431**, 653-9.

Gerety, S. S., Wang, H. U., Chen, Z. F. and Anderson, D. J. (1999). Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* **4**, 403-14.

Graham, A., Papalopulu, N., Lorimer, J., McVey, J. H., Tuddenham, E. G. and Krumlauf, R. (1988). Characterization of a murine homeo box gene, Hox-2.6, related to the *Drosophila* Deformed gene. *Genes Dev* **2**, 1424-38.

Grimaud, C., Negre, N. and Cavalli, G. (2006). From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Res* **14**, 363-75.

Gu, Y., Nakamura, T., Alder, H., Prasad, R., Canaani, O., Cimino, G., Croce, C. M. and Canaani, E. (1992). The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila* trithorax, to the AF-4 gene. *Cell* **71**, 701-8.

Hansen, S. L., Myers, C. A., Charboneau, A., Young, D. M. and Boudreau, N. (2003). HoxD3 accelerates wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol* **163**, 2421-31.

Harrison, D. G., Widder, J., Grumbach, I., Chen, W., Weber, M. and Searles, C. (2006). Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med* **259**, 351-63.

Harvey, N. L. and Oliver, G. (2004). Choose your fate: artery, vein or lymphatic vessel? *Curr Opin Genet Dev* **14**, 499-505.

Heller, R., Polack, T., Grabner, R. and Till, U. (1999). Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. *Atherosclerosis* **144**, 49-57.

Hendzel, M. J. and Davie, J. R. (1989). Distribution of methylated histones and histone methyltransferases in chicken erythrocyte chromatin. *J Biol Chem* **264**, 19208-14.

Hendzel, M. J. and Davie, J. R. (1991). Dynamically acetylated histones of chicken erythrocytes are selectively methylated. *Biochem J* **273 (Pt 3)**, 753-8.

- Hendzel, M. J. and Davie, J. R.** (1992). Acetylation and methylation of histones H3 and H4 in chicken immature erythrocytes are not directly coupled. *Biochem Biophys Res Commun* **185**, 414-9.
- Hess, J. L., Yu, B. D., Li, B., Hanson, R. and Korsmeyer, S. J.** (1997). Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* **90**, 1799-806.
- Hiramoto, K., Negishi, M. and Katoh, H.** (2006). Dock4 is regulated by RhoG and promotes Rac-dependent cell migration. *Exp Cell Res*.
- Hoang, M. V., Whelan, M. C. and Senger, D. R.** (2004). Rho activity critically and selectively regulates endothelial cell organization during angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1874-9.
- Hoey, T. and Levine, M.** (1988). Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* **332**, 858-61.
- Hsieh, H. J., Li, N. Q. and Frangos, J. A.** (1993). Pulsatile and steady flow induces c-fos expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* **154**, 143-51.
- Huang, J., Kent, J. R., Placek, B., Whelan, K. A., Hollow, C. M., Zeng, P. Y., Fraser, N. W. and Berger, S. L.** (2006). Trimethylation of histone H3 lysine 4 by Set1 in the lytic infection of human herpes simplex virus 1. *J Virol* **80**, 5740-6.
- Hunt, P., Gulisano, M., Cook, M., Sham, M. H., Faiella, A., Wilkinson, D., Boncinelli, E. and Krumlauf, R.** (1991). A distinct Hox code for the branchial region of the vertebrate head. *Nature* **353**, 861-4.
- Illi, B., Nanni, S., Scopece, A., Farsetti, A., Biglioli, P., Capogrossi, M. C. and Gaetano, C.** (2003). Shear stress-mediated chromatin remodeling provides molecular basis for flow-dependent regulation of gene expression. *Circ Res* **93**, 155-61. Epub 2003 Jun 12.
- Illi, B., Scopece, A., Nanni, S., Farsetti, A., Morgante, L., Biglioli, P., Capogrossi, M. C. and Gaetano, C.** (2005). Epigenetic Histone Modification and Cardiovascular Lineage Programming in Mouse Embryonic Stem Cells Exposed to Laminar Shear Stress. *Circ Res*.
- Izon, D. J., Rozenfeld, S., Fong, S. T., Komuves, L., Largman, C. and Lawrence, H. J.** (1998). Loss of function of the homeobox gene *Hoxa-9* perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. *Blood* **92**, 383-93.

Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* **9**, 685-93.

Jalali, S., Li, Y. S., Sotoudeh, M., Yuan, S., Li, S., Chien, S. and Shyy, J. Y. (1998). Shear stress activates p60src-Ras-MAPK signaling pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 227-34.

Jenuwein, T. and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-80.

Kamei, M., Saunders, W. B., Bayless, K. J., Dye, L., Davis, G. E. and Weinstein, B. M. (2006). Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature* **442**, 453-6.

Katoh, H., Hiramoto, K. and Negishi, M. (2006). Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *J Cell Sci* **119**, 56-65.

Kaushansky, K. (2005). Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Ann N Y Acad Sci* **1044**, 139-41.

Kirito, K., Fox, N. and Kaushansky, K. (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**, 6751-62.

Klump, H., Schiedlmeier, B. and Baum, C. (2005). Control of Self-Renewal and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells: HOXB4 on the Threshold. *Ann N Y Acad Sci* **1044**, 6-15.

Knoepfler, P. S. and Kamps, M. P. (1995). The pentapeptide motif of Hox proteins is required for cooperative DNA binding with Pbx1, physically contacts Pbx1, and enhances DNA binding by Pbx1. *Mol Cell Biol* **15**, 5811-9.

Kobayashi, M., Fujioka, M., Tolkunova, E. N., Deka, D., Abu-Shaar, M., Mann, R. S. and Jaynes, J. B. (2003). Engrailed cooperates with extradenticle and homothorax to repress target genes in Drosophila. *Development* **130**, 741-51.

Komuves, L. G., Shen, W. F., Kwong, A., Stelnicki, E., Rozenfeld, S., Oda, Y., Blink, A., Krishnan, K., Lau, B., Mauro, T. et al. (2000). Changes in HOXB6 homeodomain protein structure and localization during human epidermal development and differentiation. *Dev Dyn* **218**, 636-47.

- Korenaga, R., Ando, J., Kosaki, K., Isshiki, M., Takada, Y. and Kamiya, A.** (1997). Negative transcriptional regulation of the VCAM-1 gene by fluid shear stress in murine endothelial cells. *Am J Physiol* **273**, C1506-15.
- Korff, T. and Augustin, H. G.** (1998). Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* **143**, 1341-52.
- Kosaki, K., Kosaki, R., Suzuki, T., Yoshihashi, H., Takahashi, T., Sasaki, K., Tomita, M., McGinnis, W. and Matsuo, N.** (2002). Complete mutation analysis panel of the 39 human HOX genes. *Teratology* **65**, 50-62.
- Kroon, E., Krosl, J., Thorsteinsdottir, U., Baban, S., Buchberg, A. M. and Sauvageau, G.** (1998). Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *Embo J* **17**, 3714-25.
- Krosl, J., Austin, P., Beslu, N., Kroon, E., Humphries, R. K. and Sauvageau, G.** (2003). In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med* **9**, 1428-32.
- Krumlauf, R.** (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* **78**, 191-201.
- Lachner, M., O'Sullivan, R. J. and Jenuwein, T.** (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* **116**, 2117-24.
- Lan, Q., Mercurius, K. O. and Davies, P. F.** (1994). Stimulation of transcription factors NF kappa B and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* **201**, 950-6.
- Lappin, T. R., Grier, D. G., Thompson, A. and Halliday, H. L.** (2006). HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *Ulster Med J* **75**, 23-31.
- LaRonde-LeBlanc, N. A. and Wolberger, C.** (2003). Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes Dev* **17**, 2060-72.
- Laughon, A.** (1991). DNA binding specificity of homeodomains. *Biochemistry* **30**, 11357-67.
- Lawrence, H. J., Helgason, C. D., Sauvageau, G., Fong, S., Izon, D. J., Humphries, R. K. and Largman, C.** (1997). Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood* **89**, 1922-30.

- Lehoux, S., Castier, Y. and Tedgui, A.** (2006). Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med* **259**, 381-92.
- Lei, H., Wang, H., Juan, A. H. and Ruddle, F. H.** (2005). The identification of Hoxc8 target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2420-4.
- Leroy, P., Berto, F., Bourget, I. and Rossi, B.** (2004). Down-regulation of Hox A7 is required for cell adhesion and migration on fibronectin during early HL-60 monocytic differentiation. *J Leukoc Biol* **75**, 680-8.
- Levine, M., Rubin, G. M. and Tjian, R.** (1984). Human DNA sequences homologous to a protein coding region conserved between homeotic genes of Drosophila. *Cell* **38**, 667-73.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature* **276**, 565-70.
- Li, H., Oehrlein, S. A., Wallerath, T., Ihrig-Biedert, I., Wohlfart, P., Ulshofer, T., Jessen, T., Herget, T., Forstermann, U. and Kleinert, H.** (1998). Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* **53**, 630-7.
- Ma, L., Benson, G. V., Lim, H., Dey, S. K. and Maas, R. L.** (1998). Abdominal B (AbdB) Hoxa genes: regulation in adult uterus by estrogen and progesterone and repression in mullerian duct by the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES). *Dev Biol* **197**, 141-54.
- Malek, A. M., Alper, S. L. and Izumo, S.** (1999). Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *Jama* **282**, 2035-42.
- Mann, R. S. and Affolter, M.** (1998). Hox proteins meet more partners. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 423-9.
- Mann, R. S. and Chan, S. K.** (1996). Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet* **12**, 258-62.
- Masood, R., Kumar, S. R., Sinha, U. K., Crowe, D. L., Krasnoperov, V., Reddy, R. K., Zozulya, S., Singh, J., Xia, G., Broek, D. et al.** (2006). EphB4 provides survival advantage to squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer* **119**, 1236-48.
- McGinnis, W. and Krumlauf, R.** (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68**, 283-302.

Merabet, S., Kambris, Z., Capovilla, M., Berenger, H., Pradel, J. and Graba, Y. (2003). The hexapeptide and linker regions of the AbdA Hox protein regulate its activating and repressive functions. *Dev Cell* **4**, 761-8.

Merabet, S., Pradel, J. and Graba, Y. (2005). Getting a molecular grasp on Hox contextual activity. *Trends Genet* **21**, 477-80.

Michell, B. J., Griffiths, J. E., Mitchelhill, K. I., Rodriguez-Crespo, I., Tiganis, T., Bozinovski, S., de Montellano, P. R., Kemp, B. E. and Pearson, R. B. (1999). The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol* **9**, 845-8.

Milne, T. A., Briggs, S. D., Brock, H. W., Martin, M. E., Gibbs, D., Allis, C. D. and Hess, J. L. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* **10**, 1107-17.

Ming, X. F., Viswambharan, H., Barandier, C., Ruffieux, J., Kaibuchi, K., Rusconi, S. and Yang, Z. (2002). Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol* **22**, 8467-77.

Miyake, N., Brun, A. C., Magnusson, M., Miyake, K., Scadden, D. T. and Karlsson, S. (2006). HOXB4-induced self-renewal of hematopoietic stem cells is significantly enhanced by p21 deficiency. *Stem Cells* **24**, 653-61.

Mizzen, C., Kuo, M. H., Smith, E., Brownell, J., Zhou, J., Ohba, R., Wei, Y., Monaco, L., Sassone-Corsi, P. and Allis, C. D. (1998). Signaling to chromatin through histone modifications: how clear is the signal? *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 469-81.

Mlodzik, M., Fjose, A. and Gehring, W. J. (1988). Molecular structure and spatial expression of a homeobox gene from the labial region of the Antennapedia-complex. *Embo J* **7**, 2569-78.

Moens, C. B. and Selleri, L. (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Dev Biol* **291**, 193-206.

Moore, M. S. and Blobel, G. (1994). A G protein involved in nucleocytoplasmic transport: the role of Ran. *Trends Biochem Sci* **19**, 211-6.

Morales-Ruiz, M., Fulton, D., Sowa, G., Languino, L. R., Fujio, Y., Walsh, K. and Sessa, W. C. (2000). Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circ Res* **86**, 892-6.

- Myers, C., Charboneau, A. and Boudreau, N.** (2000). Homeobox B3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis. *J Cell Biol* **148**, 343-51.
- Myers, C., Charboneau, A., Cheung, I., Hanks, D. and Boudreau, N.** (2002). Sustained expression of homeobox D10 inhibits angiogenesis. *Am J Pathol* **161**, 2099-109.
- Nakamura, T.** (2005). NUP98 fusion in human leukemia: dysregulation of the nuclear pore and homeodomain proteins. *Int J Hematol* **82**, 21-7.
- Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C. M. and Canaani, E.** (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* **10**, 1119-28.
- Neuteboom, S. T., Peltenburg, L. T., van Dijk, M. A. and Murre, C.** (1995). The hexapeptide LFPWMR in Hoxb-8 is required for cooperative DNA binding with Pbx1 and Pbx2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9166-70.
- Nieuwkoop, P. D.** (1955). Independent and dependent development in the formation of the central nervous system in amphibians; a review of experimental analysis. *Exp Cell Res*, 262-73.
- Noris, M., Morigi, M., Donadelli, R., Aiello, S., Foppolo, M., Todeschini, M., Orisio, S., Remuzzi, G. and Remuzzi, A.** (1995). Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res* **76**, 536-43.
- Ogura, T. and Evans, R. M.** (1995a). Evidence for two distinct retinoic acid response pathways for HOXB1 gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 392-6.
- Ogura, T. and Evans, R. M.** (1995b). A retinoic acid-triggered cascade of HOXB1 gene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 387-91.
- Oosterveen, T., van Vliet, P., Deschamps, J. and Meijlink, F.** (2003). The direct context of a hox retinoic acid response element is crucial for its activity. *J Biol Chem* **278**, 24103-7.
- Palmer, A. and Klein, R.** (2003). Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. *Genes Dev* **17**, 1429-50.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S.** (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.

Palmqvist, L., Argiropoulos, B., Pineault, N., Abramovich, C., Sly, L. M., Krystal, G., Wan, A. and Humphries, R. K. (2006). The Flt3 receptor tyrosine kinase collaborates with NUP98-HOX fusions in acute myeloid leukemia. *Blood* **108**, 1030-6.

Passner, J. M., Ryoo, H. D., Shen, L., Mann, R. S. and Aggarwal, A. K. (1999). Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex. *Nature* **397**, 714-9.

Patel, C. V., Sharangpani, R., Bandyopadhyay, S. and DiCorleto, P. E. (1999). Endothelial cells express a novel, tumor necrosis factor-alpha-regulated variant of HOXA9. *J Biol Chem* **274**, 1415-22.

Phelan, M. L., Rambaldi, I. and Featherstone, M. S. (1995). Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol Cell Biol* **15**, 3989-97.

Piper, D. E., Batchelor, A. H., Chang, C. P., Cleary, M. L. and Wolberger, C. (1999). Structure of a HoxB1-Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. *Cell* **96**, 587-97.

Rancourt, D. E., Tsuzuki, T. and Capecchi, M. R. (1995). Genetic interaction between *hoxb-5* and *hoxb-6* is revealed by nonallelic noncomplementation. *Genes Dev* **9**, 108-22.

Rice, J. C. and Allis, C. D. (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 263-73.

Ridnour, L. A., Isenberg, J. S., Espey, M. G., Thomas, D. D., Roberts, D. D. and Wink, D. A. (2005). Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13147-52.

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-4.

Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H. G., Sasse, J., Ekblom, P., Kemler, R. and Doetschman, T. (1988). Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* **102**, 471-8.

Ross, R. (1995). Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* **57**, 791-804.

Rossig, L., Urbich, C., Bruhl, T., Dernbach, E., Heeschen, C., Chavakis, E., Sasaki, K., Aicher, D., Diehl, F., Seeger, F. et al. (2005). Histone deacetylase activity is essential for the expression of HoxA9 and for endothelial commitment of progenitor cells. *J Exp Med* **201**, 1825-35.

Rozovskaia, T., Feinstein, E., Mor, O., Foa, R., Blechman, J., Nakamura, T., Croce, C. M., Cimino, G. and Canaani, E. (2001). Upregulation of Meis1 and HoxA9 in acute lymphocytic leukemias with the t(4 : 11) abnormality. *Oncogene* **20**, 874-8.

Saleh, M., Huang, H., Green, N. C. and Featherstone, M. S. (2000a). A conformational change in PBX1A is necessary for its nuclear localization. *Exp Cell Res* **260**, 105-15.

Saleh, M., Rambaldi, I., Yang, X. J. and Featherstone, M. S. (2000b). Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. *Mol Cell Biol* **20**, 8623-33.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bernstein, B. E., Karabetsou, N., Morillon, A., Weise, C., Schreiber, S. L., Mellor, J. and Kouzarides, T. (2003). Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Mol Cell* **12**, 1325-32.

Schiedlmeier, B., Klump, H., Will, E., Arman-Kalcek, G., Li, Z., Wang, Z., Rimek, A., Friel, J., Baum, C. and Ostertag, W. (2003). High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound in vivo competitive growth advantage on human cord blood CD34+ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation. *Blood* **101**, 1759-68.

Schmeisser, A., Garlich, C. D., Zhang, H., Eskafi, S., Graffy, C., Ludwig, J., Strasser, R. H. and Daniel, W. G. (2001). Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* **49**, 671-80.

Schmittwolf, C., Porsch, M., Greiner, A., Avots, A. and Muller, A. M. (2005). HOXB4 confers a constant rate of in vitro proliferation to transduced bone marrow cells. *Oncogene* **24**, 561-72.

Scott, M. P., Tamkun, J. W. and Hartzell, G. W., 3rd. (1989). The structure and function of the homeodomain. *Biochim Biophys Acta* **989**, 25-48.

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L. and Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62-6.

Shen, W. F., Montgomery, J. C., Rozenfeld, S., Moskow, J. J., Lawrence, H. J., Buchberg, A. M. and Largman, C. (1997). AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* **17**, 6448-58.

Shen, W. F., Rozenfeld, S., Kwong, A., Kom ves, L. G., Lawrence, H. J. and Largman, C. (1999). HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Mol Cell Biol* **19**, 3051-61.

Shi, X., Bai, S., Li, L. and Cao, X. (2001). Hoxa-9 represses transforming growth factor-beta-induced osteopontin gene transcription. *J Biol Chem* **276**, 850-5.

Shi, X., Yang, X., Chen, D., Chang, Z. and Cao, X. (1999). Smad1 interacts with homeobox DNA-binding proteins in bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* **274**, 13711-7.

Simon, J. A. and Tamkun, J. W. (2002). Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 210-8.

Sims, R. J., 3rd and Reinberg, D. (2006). Histone H3 Lys 4 methylation: caught in a bind? *Genes Dev* **20**, 2779-86.

Slany, R. K. (2005). Chromatin control of gene expression: mixed-lineage leukemia methyltransferase SETs the stage for transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14481-2.

Song, M. R. and Ghosh, A. (2004). FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat Neurosci* **7**, 229-35.

Spencer, V. A. and Davie, J. R. (1999). Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* **240**, 1-12.

Sprague, E. A., Luo, J. and Palmaz, J. C. (1997). Human aortic endothelial cell migration onto stent surfaces under static and flow conditions. *J Vasc Interv Radiol* **8**, 83-92.

Steinle, J. J., Meininger, C. J., Forough, R., Wu, G., Wu, M. H. and Granger, H. J. (2002). Eph B4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* **277**, 43830-5.

- Strahl, B. D., Ohba, R., Cook, R. G. and Allis, C. D.** (1999). Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14967-72.
- Surapisitchat, J., Hoefen, R. J., Pi, X., Yoshizumi, M., Yan, C. and Berk, B. C.** (2001). Fluid shear stress inhibits TNF-alpha activation of JNK but not ERK1/2 or p38 in human umbilical vein endothelial cells: Inhibitory crosstalk among MAPK family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6476-81.
- Takeda, A., Goolsby, C. and Yaseen, N. R.** (2006). NUP98-HOXA9 induces long-term proliferation and blocks differentiation of primary human CD34+ hematopoietic cells. *Cancer Res* **66**, 6628-37.
- Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parson, R. and Yamada, K. M.** (1998). Inhibition of cell migration, spreading and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* **280**, 1614-1617.
- Tardy, Y., Resnick, N., Nagel, T., Gimbrone, M. A., Jr. and Dewey, C. F., Jr.** (1997). Shear stress gradients remodel endothelial monolayers in vitro via a cell proliferation-migration-loss cycle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 3102-6.
- Taylor, H. S., Arici, A., Olive, D. and Igarashi, P.** (1998). HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest* **101**, 1379-84.
- Terranova, R., Agherbi, H., Boned, A., Meresse, S. and Djabali, M.** (2006). Histone and DNA methylation defects at Hox genes in mice expressing a SET domain-truncated form of Mll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6629-34.
- Thorsteinsdottir, U., Mamo, A., Kroon, E., Jerome, L., Bijl, J., Lawrence, H. J., Humphries, K. and Sauvageau, G.** (2002). Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* **99**, 121-9.
- Topper, J. N., Cai, J., Qiu, Y., Anderson, K. R., Xu, Y. Y., Deeds, J. D., Feeley, R., Gimeno, C. J., Woolf, E. A., Tayber, O. et al.** (1997). Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9314-9.
- Traub, O. and Berk, B. C.** (1998). Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 677-85.
- Turpin, P., Hay, R. T. and Dargemont, C.** (1999). Characterization of IkappaBalpha nuclear import pathway. *J Biol Chem* **274**, 6804-12.

Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M. et al. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **389**, 990-4.

Urbich, C., Dernbach, E., Reissner, A., Vasa, M., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2002). Shear stress-induced endothelial cell migration involves integrin signaling via the fibronectin receptor subunits alpha(5) and beta(1). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 69-75.

Uyeno, L. A., Newman-Keagle, J. A., Cheung, I., Hunt, T. K., Young, D. M. and Boudreau, N. (2001). Hox D3 expression in normal and impaired wound healing. *J Surg Res* **100**, 46-56.

Vijapurkar, U., Fischbach, N., Shen, W., Brandts, C., Stokoe, D., Lawrence, H. J. and Largman, C. (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**, 3827-37.

Wan, M., Shi, X., Feng, X. and Cao, X. (2001). Transcriptional mechanisms of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegerin gene expression. *J Biol Chem* **276**, 10119-25.

Wang, G. G., Pasillas, M. P. and Kamps, M. P. (2006). Persistent transactivation by meis1 replaces hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of meis1-pbx and hox-pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. *Mol Cell Biol* **26**, 3902-16.

Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Borchers, C., Tempst, P. and Zhang, Y. (2001). Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol Cell* **8**, 1207-17.

Wang, N., Butler, J. P. and Ingber, D. E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton [see comments]. *Science* **260**, 1124-7.

Watanabe, M., Fujioka-Kaneko, Y., Kobayashi, H., Kiniwa, M., Kuwano, M. and Basaki, Y. (2005). Involvement of integrin-linked kinase in capillary/tube-like network formation of human vascular endothelial cells. *Biol Proced Online* **7**, 41-7.

Wojciak-Stothard, B., Tsang, L. Y., Paleolog, E., Hall, S. M. and Haworth, S. G. (2006). Rac1 and RhoA as regulators of endothelial phenotype and barrier function in hypoxia-induced neonatal pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**, L1173-82.

- Wong, A. J., Pollard, T. D. and Herman, I. M.** (1983). Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo. *Science* **219**, 867-9.
- Wu, J. and Grunstein, M.** (2000). 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci* **25**, 619-23.
- Wu, M. H., Kouchi, Y., Onuki, Y., Shi, Q., Yoshida, H., Kaplan, S., Viggers, R. F., Ghali, R. and Sauvage, L. R.** (1995). Effect of differential shear stress on platelet aggregation, surface thrombosis, and endothelialization of bilateral carotid-femoral grafts in the dog. *J Vasc Surg* **22**, 382-90; discussion 390-2.
- Wu, Y., Moser, M., Bautch, V. L. and Patterson, C.** (2003). HoxB5 is an upstream transcriptional switch for differentiation of the vascular endothelium from precursor cells. *Mol Cell Biol* **23**, 5680-91.
- Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T. A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A. L., Roeder, R. G., Brivanlou, A. H. and Allis, C. D.** (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* **121**, 859-72.
- Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T. A., Kwon, S. Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A. J., Chait, B. T., Badenhorst, P. et al.** (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* **442**, 86-90.
- Xia, G., Kumar, S. R., Masood, R., Zhu, S., Reddy, R., Krasnoperov, V., Quinn, D. I., Henshall, S. M., Sutherland, R. L., Pinski, J. K. et al.** (2005). EphB4 expression and biological significance in prostate cancer. *Cancer Res* **65**, 4623-32.
- Yagi, H., Deguchi, K., Aono, A., Tani, Y., Kishimoto, T. and Komori, T.** (1998). Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice. *Blood* **92**, 108-17.
- Yamaguchi, T. P., Dumont, D. J., Conlon, R. A., Breitman, M. L. and Rossant, J.** (1993). flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* **118**, 489-98.
- Yang, B., Cao, D. J., Sainz, I., Colman, R. W. and Guo, Y. L.** (2004). Different roles of ERK and p38 MAP kinases during tube formation from endothelial cells cultured in 3-dimensional collagen matrices. *J Cell Physiol* **200**, 360-9.

Yeoh, E. J., Ross, M. E., Shurtleff, S. A., Williams, W. K., Patel, D., Mahfouz, R., Behm, F. G., Raimondi, S. C., Relling, M. V., Patel, A. et al. (2002). Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* **1**, 133-43.

Yu, B. D., Hanson, R. D., Hess, J. L., Horning, S. E. and Korsmeyer, S. J. (1998). MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10632-6.

Yu, B. D., Hess, J. L., Horning, S. E., Brown, G. A. and Korsmeyer, S. J. (1995). Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* **378**, 505-8.

Zachary, I. (2003). VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* **31**, 1171-7.

Zanetti, M., Katusic, Z. S. and O'Brien, T. (2000). Expression and function of recombinant endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. *J Vasc Res* **37**, 449-56.

Zeleznik-Le, N. J., Harden, A. M. and Rowley, J. D. (1994). 11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10610-4.

Zheng, Z. Z. and Liu, Z. X. (2006). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates CD151-induced endothelial cell proliferation and cell migration. *Int J Biochem Cell Biol*.

Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J. and Klein, R. (2003). EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol* **5**, 869-78.

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 28.05.1978
Geburtsort: Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Jens-Florian Diehl

Luxemburgerallee 34
60385 Frankfurt/Main
Tel.: 069-71671612
email: florian.diehl@t-online.de

Lebenslauf

Schulische Ausbildung:

1984 - 1988 Grundschule: Karmeliter-Schule, Frankfurt/Main
1988 - 1997 Gymnasium: Schillerschule, Frankfurt/Main
11.06.1997 Abitur mit der Gesamtnote 1,6

Hochschulausbildung:

WS 1997/98 – SS 1998 Studium der Psychologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
WS 1998/99 – WS 2002 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main
22.01.2003 Abschluss des Biologie-Studiums in den Hauptfächern Zellbiologie, Genetik und Biochemie als Diplom-Biologe mit der Gesamtnote "sehr gut" (1,1). Die Diplomarbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Starzinski-

Powitz zum Thema:“ Struktur-Funktionsanalysen der Interaktion des LIM-only Proteins FHL2 mit dem Armadillo Repeat Protein mARVCF“ angefertigt.

15.03.2003

Beginn der Doktorarbeit in der Abteilung für molekulare Kardiologie des Klinikums der Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Frau Prof. Stefanie Dimmeler. Die Doktorarbeit wird zum Thema: "Regulation und Funktion von Homeobox-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen" angefertigt und voraussichtlich Ende Oktober 2006 eingereicht.

Teilnahme an Kongressen

- 2004 70. Jahrestagung der DGK. Freier Vortrag: "Die Tyrosin-Phosphatase SHP-2 inhibiert den durch oxidativen Stress induzierten Kernexport der Telomerase Reverse Transkriptase (Tert) ".
- 2005 71. Jahrestagung der DGK. Postervortrag: "Role of homeobox transcription factors in vasculogenesis".
- 2006 72. Jahrestagung der DGK. Freier Vortrag: "Rolle verschiedener Homeobox-Transkriptionsfaktoren für die Funktion von Endothelzellen".

Publikationen

- 2004 Haendeler J., Hoffmann J., Diehl J.F., Vasa M., Spyridopoulos I., Zeiher A.M., Dimmeler S.
"Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells". Circ Res. 2004 Apr 2;94(6):768-75.

- 2005 Rössig L., Urbich C., Brühl T., Dernbach E., Heeschen C., Chavakis E., Sasaki K., Aicher D., Diehl F., Seeger F., Potente M., Aicher A., Zanetta L., Dejana E., Zeiher A.M., 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.
- 2006 Diehl F., Rössig L., Zeiher A.M., Dimmeler S., Urbich C. "The histone methyltransferase MLL is an upstream regulator of endothelial cell sprouting". *Blood* .First Edition Paper, prepublished online October 17, 2006; DOI 10.1182/blood-2006-07-036640