

Aus dem Max-Planck-Institut
für physiologische und klinische Forschung, Bad Nauheim
Abt. für Molekulare Zellbiologie
Kommiss. Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Schaper

Untersuchungen zur Funktion endothelialer Transkriptionsfaktoren bei der Angiogenese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Alexander H. Licht
aus Bad Schwalbach

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 10.12.2004.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. Matthias Clauss

1. Co-Referent: Prof. Dr. Guntram Suske

2. Co-Referent: Prof. Dr. Klaus Preissner

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Entwicklung von Blutgefäßen	1
1.2 Signalübertragung durch endotheliale Rezeptor-Tyrosin-Kinasen	4
1.2.1 Die Rolle von VEGF und VEGF-Rezeptoren während der embryonalen Gefäßentwicklung	4
1.2.2 Remodellierung und Stabilisierung von Gefäßen: Die Funktion von Angiopoietinen und Tie Rezeptoren	10
1.3 Die transkriptionelle Kontrolle der Gefäßentwicklung	12
1.4 Hypoxie-induzierbare Faktoren	16
1.4.1 Molekulare Mechanismen der Hypoxie-Antwort	16
1.4.2 Die Rolle von HIFs während der Embryonalentwicklung	19
1.4.3 Zielgene von HIF: Expression der angiogenen Faktoren VEGF und der Angiopoietine	20
1.5 Das Cre-loxP Rekombinationssystem	22
1.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Geräte	25
2.2 Verbrauchsmaterialien	28
2.2.1 Chemikalien und Enzyme	28
2.2.2 Verwendete Primärantikörper	29
2.2.3 Sonstiges	29
2.3 Molekularbiologie	30
2.3.1 Standardlösungen für die Molekularbiologie	30
2.3.2 Verwendete DNA-Plasmide	31
2.3.3 Verwendete Oligonukleotide	33
2.3.4 Verwendete Bakterien	35
2.3.5 Lagerung und Vermehrung von Bakterien	35
2.3.6 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	36
2.3.7 Chemische Transformation von Bakterien	37
2.3.8 Plasmid-Präparation	37
2.3.9 Reinigung von DNA	38
2.3.9.1 Alkoholfällung	38
2.3.9.2 Kieselgel-Adsorbtionschromatographie	38
2.3.9.3 Gelelution	38
2.3.9.4 DNA-Aufreinigung für Oozyten-Mikroinjektion	39
2.3.10 Agarose-Gelelektrophorese	39
2.3.11 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	40
2.3.12 Restriktionsanalyse von DNA	40

2.3.13	Dephosphorylierung von 5'-Enden	41
2.3.14	Konversion von Überhängen in stumpfe Enden	41
2.3.15	Ligation	41
2.3.16	Sequenzierung von DNA	42
2.3.17	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
2.3.18	DNA-Mutagenese mittels PCR	43
2.3.19	Analyse genomischer DNA mittels "Southern-Blot"	44
2.3.19.1	Kapillartransfer von DNA auf Nylonmembranen	44
2.3.19.2	Radioaktive Markierung von DNA	45
2.3.19.3	DNA-DNA Hybridisierung	45
2.3.20	Präparation und Analyse von RNA	46
2.3.20.1	Reinigung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	46
2.3.20.2	Reinigung von Gesamt-RNA aus Gewebe	47
2.3.20.3	Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion	47
2.3.20.4	Semiquantitative RT-PCR	48
2.4	Proteinchemische Methoden	48
2.4.1	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)	48
2.4.2	Immobilisierung von Proteinen	50
2.4.3	Immunochemische Detektion immobilisierter Proteine	50
2.4.4	Herstellung von Proteinlysaten aus Embryonen	51
2.5	Transgene Mäuse	51
2.5.1	Etablierung und Haltung	52
2.5.2	Genotypisierung transgener Mäuse	52
2.5.3	Präparation von Mausembryonen	53
2.5.4	Entnahme von Gewebe	53
2.5.5	LacZ-Färbung von Mausembryonen und ganzen Organen	54
2.5.6	Immunhistochemische Färbung ganzer Embryonen	54
2.5.7	Injektion etablierter Tumorzellen in transgene Mäuse	55
2.6	Histologische Methoden	56
2.6.1	Paraffineinbettung und Anfertigen von Paraffinschnitten	56
2.6.2	Anfertigen von Kryostat-Schnitten	57
2.6.3	Nachweis von Proteinen auf Gefrierschnitten	57
2.6.3.1	Immunhistochemie	57
2.6.3.2	Nachweis des FLAG Epitops durch Immunhistochemie	58
2.6.3.3	LacZ-Färbung	58
2.6.3.4	Doppel-Immunfluoreszenzfärbung	59
2.6.4	Hämatoxylin und Eosin-Färbung	60
2.6.5	Herstellung von Mowiol-Lösung	60

2.7 Zellkultur	61
2.7.1 Lösungen und Medien	61
2.7.2 Verwendete Zellen	62
2.7.3 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	62
2.7.4 Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen	63
2.7.5 Isolation und Kultur von Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene	63
2.7.6 Gelatinisierung von Zellkulturschalen	65
2.7.7 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Liposomen	65
2.7.8 Luziferase-Reportergen-Analyse	65
2.7.9 Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität in transfizierten Zellen	66
2.7.10 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	67
3. Ergebnisse	69
3.1 Etablierung und Charakterisierung von flk-1-Cre transgenen Mauslinien	69
3.1.1 Generierung von flk-1-Cre transgenen Mäusen	69
3.1.2 Charakterisierung der flk-1-Cre transgenen Mauslinien	71
3.1.3 Cre Aktivität im BFS-1 Tumormodell	81
3.2 Die Funktion endothelialer Hypoxie-induzierbarer Faktoren in der Entwicklung von Blutgefäßen	83
3.2.1 Charakterisierung der HIFdn Mutante <i>in vitro</i>	84
3.2.2 Generierung und Analyse flk-1 p/e-HIFdn transgener Embryonen	87
3.3 Die Regulation des humanen VEGF Rezeptor-2 (<i>KDR</i>) Gens	98
3.3.1 Untersuchung des <i>KDR</i> Promotors	98
3.3.2 Einfluss von Hey Faktoren auf die Genregulation von <i>flk-1</i> und <i>KDR</i>	105
3.3.3 Identifizierung eines putativen Enhancer Elements im 1. Intron des <i>KDR</i> Gens	109
4. Diskussion	116
4.1 Etablierung und Charakterisierung von flk-1-Cre transgenen Mäusen	116
4.2 Generierung und Charakterisierung von flk-1 p/e-HIFdn transgenen Embryonen	123
4.3 Die Regulation des humanen VEGF Rezeptor-2 (<i>KDR</i>) Gens	134
4.3.1 Vergleich der Promotoren von <i>flk-1</i> und <i>KDR</i> und Identifizierung eines potentiellen <i>KDR</i> Intron Enhancer	134
4.3.2 Negative Regulation des <i>KDR</i> und <i>flk-1</i> Promotors durch Hey Faktoren	140

5. Zusammenfassung	144
6. Literaturverzeichnis	147
7. Anhang	166
7.1 Abkürzungsverzeichnis	166
7.2 Nukleotidsequenz des KDR Promotors	169
7.3 Nukleotidsequenz des 1. Introns des KDR Gens	170
7.4 Akademische Lehrer	173
7.5 Erklärung	174

1. Einleitung

1.1 Die Entwicklung von Blutgefäßen

Während der Ontogenese muss der schnell heranwachsende Embryo mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Da die Diffusionsstrecke von Sauerstoff limitiert ist (100-200 μm), ist die Entwicklung aller multizellulärer Organismen abhängig von der Versorgung durch Blutgefäße. Daher ist in Vertebraten das kardio-vaskuläre System das erste funktional entwickelte Organsystem. Die Entwicklung der Blutgefäße beginnt mit der Differenzierung von vaskulären Vorläuferzellen im primitiven embryonalen Mesoderm. Diese Differenzierung ist abhängig von Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF)- Signalen (Risau und Flamme, 1995; Poole et al., 2001). Die beginnende vaskuläre Differenzierung führt in einer Subpopulation mesodermaler Zellen zur Expression des Rezeptors für den Wachstumsfaktor für vaskuläre Endothelzellen (VEGF Rezeptor-2), einem der frühesten Marker für Gefäßentwicklung (Millauer et al., 1993; Yamaguchi et al., 1993). Diese Vorläuferzellen gelangen über Migrationsprozesse zum extraembryonalen Dottersack und bilden dort die ersten vaskulären Strukturen, die sogenannten Blutinseln. Im Inneren dieser Zellaggregate differenzieren aus den Vorläufern die hämatopoetischen Zellen, während die Zellen in der Peripherie die Vorläufer von Endothelzellen sind (=Angioblasten). Da in den Blutinseln hämatopoetische und endotheliale Vorläufer so dicht assoziiert sind, wurde postuliert, dass beide von einem gemeinsamen Vorläufer, dem Hämangioblast, gebildet werden (Sabin, 1920; Risau und Flamme, 1995). Endothelzellen und frühe Vorläuferzellen der hämatopoetischen Linie exprimieren VEGF Rezeptor-2, die differenzierten Zellen der hämatopoetischen Linie sind aber nicht mehr VEGF Rezeptor-2 positiv. Die Expression von VEGF Rezeptor-2 in beiden Linien wurde als experimenteller Hinweis für den gemeinsamen Vorläufer von Endothel- und Blutzellen angesehen (Kabrun et al., 1997; Choi et al., 1998). Dies wurde bestätigt, indem aus differenzierenden embryonalen Stammzellen VEGF Rezeptor-2

positive Zellen isoliert wurden und sich aus einzelnen Zellen sowohl Endothel- als auch hämatopoetische Zellen entwickelten (Choi et al., 1998; Chung et al., 2002). Glatte Muskelzellen differenzieren ebenfalls aus den VEGF Rezeptor-2 positiven Vorläufern von hämatopoetischen Zellen und Endothel, so dass die Existenz eines vaskulären Progenitors postuliert wurde, aus dem alle drei Zelltypen hervorgehen können (Yamashita et al., 2000). Im Laufe der weiteren Entwicklung fusionieren Blutinseln, die peripheren Zellen bilden Endothelzellen und ein Lumen wird geformt. Durch Verschmelzen von Blutinseln entsteht schließlich ein erster primitiver Gefäßplexus. Dieses maschenartige Netzwerk ist noch unreif, da noch keine Gefäßwand besteht und es existiert keine hierarchische Gliederung in Arterien und Venen, so dass eine funktionelle Perfusion nicht möglich ist. Kurz nach dem Auftauchen der extraembryonalen Angioblasten werden auch im Embryo Angioblasten gebildet. Diese entstehen ventral der Somiten im engen Kontakt mit dem Entoderm. Eine Ansammlung von angioblastischen Zellen bildet sich entlang der Somiten, welche die Primordia der dorsalen Aortae repräsentiert (Risau und Flamme, 1995). Ein wichtiger Unterschied zwischen extraembryonaler und intraembryonaler Entwicklung von Endothelzellen besteht darin, dass im Embryo die Angioblasten einzeln aus dem Mesoderm differenzieren und es keine parallele Differenzierung von hämatopoetischen Zellen gibt, wie im Dottersack (Pardanaud et al., 1996). Die Angioblasten migrieren zu existierenden Gefäßen und fusionieren mit diesen oder sie bilden neue Gefäßstrukturen *in situ* durch Aggregation. Die Bildung primitiver Gefäßnetzwerke durch Fusion von Angioblasten wird als **Vaskulogenese** bezeichnet (Risau und Flamme, 1995). Diese Form der Gefäßbildung tritt hauptsächlich während der Embryonalentwicklung auf. Allerdings wurden auch im adulten Organismus zirkulierende endotheliale Vorläufer beobachtet, die an Orten der Gefäßneubildung integrieren und zu reifen Endothelzellen differenzieren (Asahara et al., 1997; Asahara et al., 1999). Die weitere Gefäßentwicklung nach der Bildung erster Gefäßnetzwerke verläuft durch den Prozess der **Angiogenese**. Darunter versteht man das Ausprossen von Gefäßen aus schon

bestehenden Gefäßstrukturen. Dies beinhaltet unter anderem Proliferation und Migration von Endothelzellen, sowie Degradation der extrazellulären Matrix (Risau, 1997; Carmeliet, 2000) (Abb. 1.1). In der Embryonalentwicklung führen angiogene Prozesse zu einer Verfeinerung und Remodellierung der schon bestehenden primitiven vaskulären Netzwerke. Die Organe ektodermaler Herkunft (z. B. das Gehirn) werden vorwiegend durch sprossende Angiogenese vaskularisiert, da sie nicht von Angioblasten besiedelt werden bzw. keine enthalten.

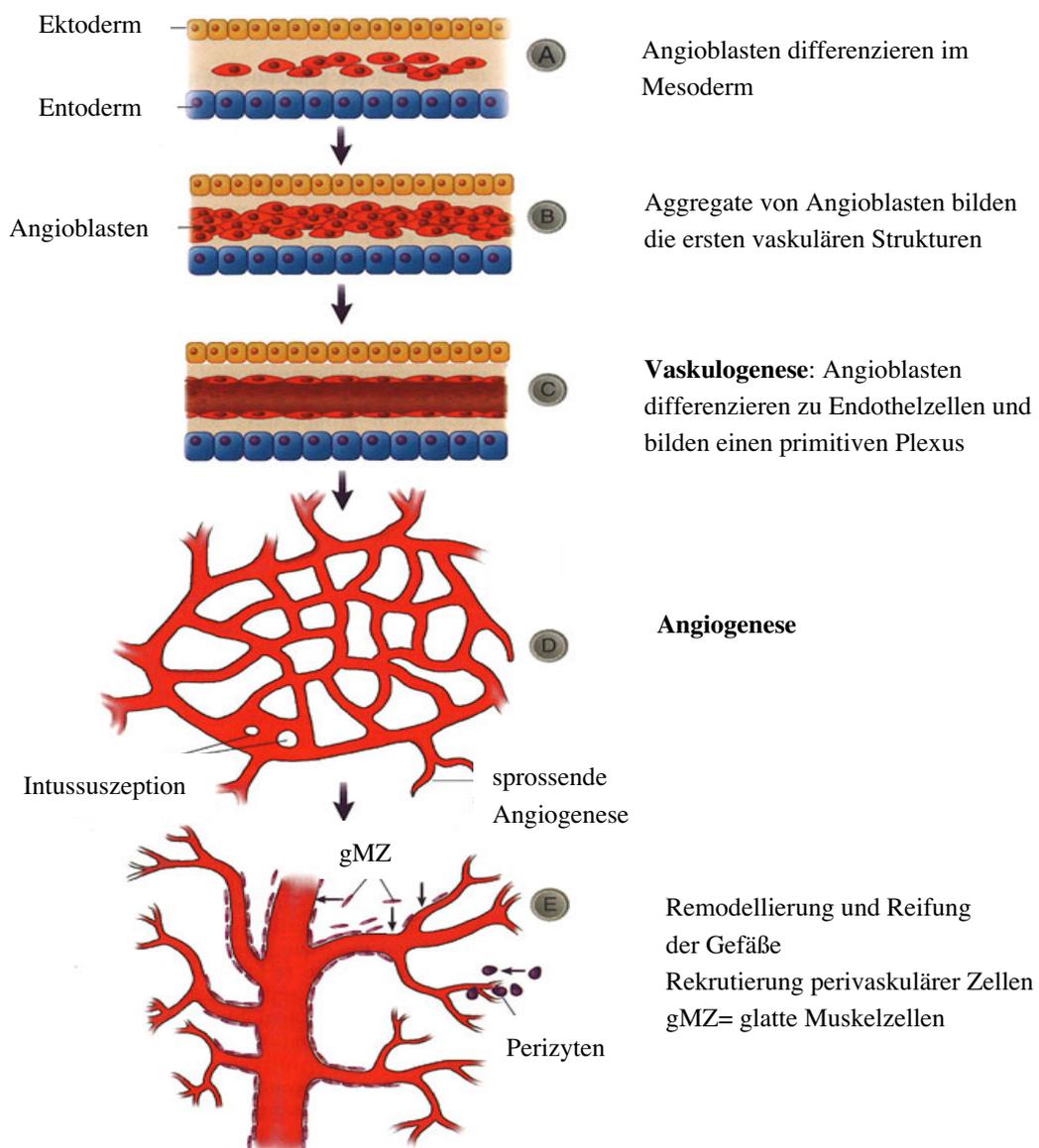


Abb. 1.1 Die einzelnen Schritte der Gefäßentwicklung in der Übersicht

(entnommen aus Cleaver und Krieg, 1999)

Neben der beschriebenen sprossenden Angiogenese werden primitive Gefäße auch über einen zweiten angiogenen Prozess umgebaut, durch die Intussuszeption. Dabei werden trans-kapilläre Wände in bestehenden Gefäßen gebildet, die das Gefäß schließlich teilen (Risau, 1997; Carmeliet, 2000). Mit der Remodellierung setzt die Reifung der Gefäßstrukturen ein. Diese umfasst die Rekrutierung perivaskulärer Zellen, wie Perizyten und glatte Muskelzellen, die eine Gefäßwand aufbauen und so zur Stabilisierung der Gefäße beitragen. Dieser Reifungsvorgang ist unter anderem abhängig von TGF- β und PDGF vermittelten Signalen zwischen Endothel und perivaskulären Zellen (Risau, 1997; Jain, 2003). Letztlich resultiert dies in einem hierarchisch gegliederten und stark verzweigtem Gefäßbaum aus Arterien und Venen.

1.2 Signalübertragung durch endotheliale Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

1.2.1 Die Rolle von VEGF und VEGF Rezeptoren während der embryonalen Gefäßentwicklung

Der Wachstumsfaktor für vaskuläre Endothelzellen (VEGF oder VEGF-A) wurde ursprünglich als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) beschrieben, bevor seine Funktion als erstes spezifisches Mitogen für Endothelzellen erkannt wurde (Senger et al., 1983; Connolly et al., 1989; Ferrara und Henzel, 1989). Eine weitere wichtige Funktion von VEGF ist das Übermitteln von Überlebenssignalen für Endothelzellen (Alon et al., 1995; Benjamin und Keshet, 1997). VEGF gilt als einer der zentralen angiogenen Faktoren, sowohl unter physiologischen Bedingungen, als auch im pathologischen Gefäßwachstum. Dies spiegelt sich in der Expression des VEGF Gens während der Embryonalentwicklung (Breier et al., 1992) und in perinekrotischen Arealen von Tumoren wider (Plate et al., 1992; Shweiki et al., 1992). Funktionelle Untersuchungen stützten diese These, da die Blockierung der VEGF Signalübertragung zu verminderter Gefäßbildung in Tumoren führte und so deren Wachstum gehemmt wurde (Millauer et al., 1994). Weiterhin wurde die zentrale Rolle von VEGF für die

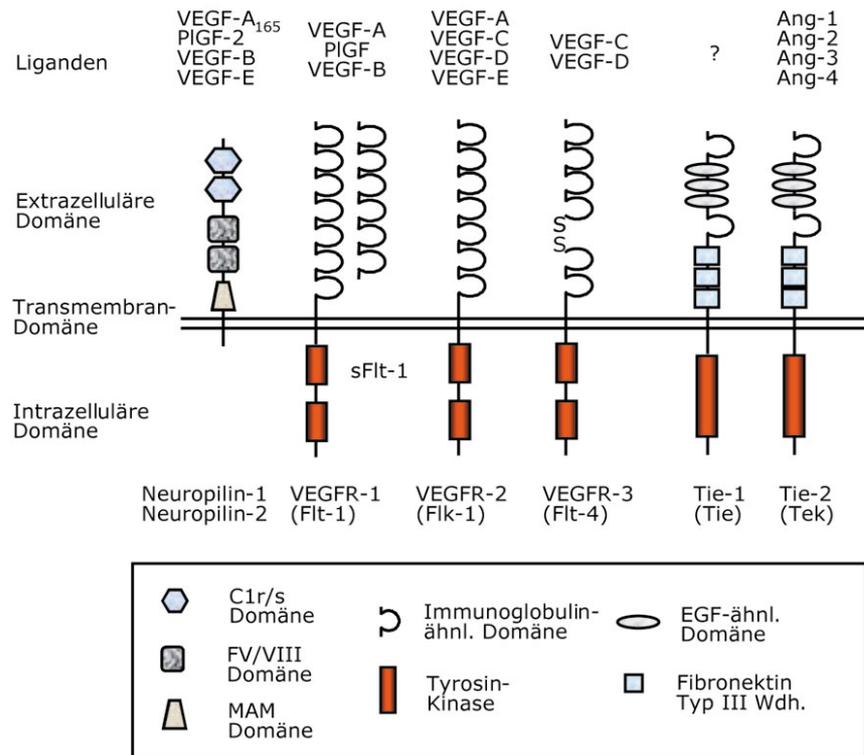


Abb. 1.2 Schematische Darstellung endothelialer Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

(Die Abbildung wurde von G. Breier zu Verfügung gestellt)

Gefäßentwicklung durch Geninaktivierung in der Maus bestätigt. Schon der Verlust eines *VEGF-A* Allels resultierte in reduzierter Bildung von Gefäßen und Absterben der Embryonen (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Die Differenzierung von Angioblasten war nicht beeinträchtigt, aber im Dottersack bildete sich nur ein primitiver Gefäßplexus und die Gefäßbildung im Embryo war massiv gestört. Homozygote *VEGF*-Mutanten wurden durch Aggregation von *VEGF*^{-/-} embryonalen Stammzellen mit tetraploiden Embryonen generiert. Durch diese Technik wurde das Dottersack-Entoderm von Wildtyp-Zellen gebildet, während der Embryo aus "knock-out" Zellen hervorging. In diesen Embryonen war der vaskuläre Defekt noch stärker ausgeprägt als in heterozygoten Mäusen (Carmeliet et al., 1996). Dies wies bereits auf eine Dosisabhängige Wirkung von VEGF hin. Die Überexpression von VEGF im Wachtelembryo führte zu verstärkter Gefäßbildung (Flamme et al., 1995). Hingegen führte die

Überexpression von VEGF in Mausembryonen zu gestörter Herzentwicklung und Tod der Embryonen an Tag E14 (Miquerol et al., 2000). Die konditionale *VEGF*-Geninaktivierung in neonatalen Mäusen resultierte in gestörter Organentwicklung (hauptsächlich von Leber und Nieren) und in erhöhter Mortalität der betroffenen Mäuse (Gerber et al., 1999). Die spezifische Inaktivierung des *VEGF* Gens in Kardiomyozyten von Mäusen führte zur Reduzierung der Koronargefäße und beeinträchtigte die Herzkontraktion (Giordano et al., 2001). Die Inaktivierung des *VEGF* Gens in Neuronen und Astrozyten führte zu verminderter Vaskularisierung des Gehirns und neuronalem Zelltod in neonatalen Mäusen (Raab et al., 2004). Mit diesen Studien wurde gezeigt, dass VEGF Signale auch in späteren Entwicklungsstadien noch essentiell sind.

Die Familie der VEGF Proteine umfasst die Mitglieder VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, den Plazenta Wachstumsfaktor (PlGF), sowie das virale VEGF-E. Die verschiedenen VEGFs sind dimere Glykoproteine. Von VEGF-A werden verschiedene Spleißvarianten von 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäureresten exprimiert. Die Isoformen VEGF-121 und -165 sind in den meisten Organen die am häufigsten vorkommenden Formen. Die VEGF-121 Isoform kann frei diffundieren, während die anderen Varianten extrazellulär an Heparin binden (Ferrara, 2001). Die VEGF Signaltransduktion erfolgt über Bindung des VEGF Rezeptor-1 (Flt-1) und VEGF Rezeptor-2 (Flk-1, KDR). VEGF Rezeptor-1 und -2 werden hauptsächlich auf Endothelzellen von Blutgefäßen exprimiert (Millauer et al., 1993; Yamaguchi et al., 1993; Breier et al., 1995). Der VEGF Rezeptor-3 (Flt-4) bindet VEGF-C und VEGF-D und wird nur während der frühen Embryonalentwicklung in vaskulären Endothelzellen exprimiert. Danach wird er spezifisch im Endothel der lymphatischen Gefäße exprimiert und ist für deren Bildung und Funktion essentiell (Dumont et al., 1998). Die Geninaktivierung des *VEGF Rezeptor-3* in Mäusen führte auch zu einer gestörten Entwicklung von Blutgefäßen (Dumont et al., 1998). Strukturell besitzen alle drei VEGF Rezeptoren einen extrazellulären Anteil mit Immunoglobulin-ähnlichen Domänen, eine Transmembrandomäne und eine geteilte intrazelluläre Kinasedomäne.

VEGF Rezeptor-1 existiert zusätzlich als sezernierte, lösliche Form (sFlt-1), ohne die Transmembran- und Kinasedomänen (Matsumoto und Claesson-Welsh, 2001). Darüber hinaus binden Neuropilin-1 und -2 VEGF und fungieren als Co-Rezeptoren für VEGF Rezeptoren (Soker et al., 1998; Gluzman-Poltorak et al., 2000; Neufeld et al., 2002) (Abb. 1.2).

Die VEGF-Signalübertragung erfolgt in Endothelzellen hauptsächlich über VEGF Rezeptor-2 (Millauer et al., 1993; Millauer et al., 1994). Die Bindung von VEGF führt zur Dimerisierung des VEGF Rezeptor-2 und Autophosphorylierung bestimmter Tyrosinreste in der intrazellulären Domäne. Durch Interaktion mit phosphorylierten Tyrosinresten können verschiedene Adaptermoleküle an den Rezeptor binden und eine Vielzahl von Signalwegen initiieren (Matsumoto und Claesson-Welsh, 2001). Die Aktivierung des p42/44 MAP-Kinase Weges führt zum Beispiel zur Transkription von Genen, die die Proliferation steuern. Über die Phosphatidylinositol-3'-OH Kinase (PI3 Kinase) und den Akt Weg werden Proteine aus dem Apoptoseprogramm gehemmt (Bad, Caspase 9), was das Überleben von Endothelzellen fördert. Außerdem führt dieser Weg zur Aktivierung der endothelialen Nitroxidsynthase (eNOS), was mit erhöhter Permeabilität der Gefäße und mit Migration von Endothelzellen in Verbindung gebracht wurde. Die Aktivierung der p38 MAP-Kinase sowie der Fokaladhäsionskinase (FAK) resultiert in der Reorganisation des Zytoskelett, ist wichtig für Migrationsprozesse und die Steuerung der Permeabilität (Matsumoto et al., 2002; Cross et al., 2003; Issbrucker et al., 2003).

Es besteht eine funktionale Interaktion von VEGF Rezeptor-2 mit anderen endothelialen Rezeptoren. Eine Co-Expression von VEGF Rezeptor-2 und VE-Cadherin wurde beobachtet (Breier et al., 1996). VE-Cadherin ist ein endothelspezifischer Bestandteil von Zell-Zell Kontakten (Zonula adhärens). VEGF induzierte die Phosphorylierung von VE-Cadherin, sowie dessen Bindungspartner β -Catenin, Plakoglobin und p120 (Esser et al., 1998). Außerdem beeinflusste die Aktivität von VE-Cadherin bzw. die Dichte von Endothelzellen in Kultur die Aktivierung des VEGF Rezeptor-2 (Caveda et

al., 1996; Rahimi und Kazlauskas, 1999). Die Geninaktivierung von *VE-cadherin* in der Maus belegte eine *in vivo* Rolle dieser Interaktion. *VE-cadherin* *-/-* Embryonen starben an Tag E11,5 aufgrund von Defekten in der Angiogenese und fehlenden VEGF abhängigen Überlebenssignalen für Endothelzellen (Carmeliet et al., 1999). Endotheliale Rezeptoren der Integrin-Familie modulierten ebenfalls die VEGF Rezeptor-2 Signalübertragung. Es wurde eine direkte Interaktion der extrazellulären Domäne des Integrin $\alpha v\beta 3$ mit dem VEGF Rezeptor-2 beschrieben (Borges et al., 2000). Die Aktivierung des Integrin $\alpha v\beta 3$ führte zu erhöhter Kinaseaktivität von VEGF Rezeptor-2 (Soldi et al., 1999).

Die Rolle von VEGF Rezeptor-1 in der endothelialen Signaltransduktion ist noch unklar. VEGF Rezeptor-1 bindet VEGF-A zwar mit höherer Affinität als VEGF Rezeptor-2, doch zeigte sich nur eine schwache Kinaseaktivität (Waltenberger et al., 1994). Möglicherweise ist seine Rolle die Sequestrierung von VEGF. Darüber hinaus hat VEGF Rezeptor-1 einen negativen modulatorischen Effekt auf VEGF Rezeptor-2 Signalwege. Beispielsweise können PI3 Kinase abhängige VEGF Rezeptor-1 Signale antagonistisch zu mitogenen Signalen von VEGF Rezeptor-2 wirken (Rahimi et al., 2000; Zeng et al., 2001). Eine weitere Funktionen außerhalb von Endothelzellen ist die Steuerung der Migration von Monozyten (Barleon et al., 1996; Clauss et al., 1996). Die Expression des VEGF Rezeptor-1 auf hämatopoetischen Stammzellen wurde festgestellt. Dies vermittelte über eine autokrine Schleife Überlebenssignale (Gerber et al., 2002). Die PlGF abhängige Aktivierung von Flt-1 spielte eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark (Hattori et al., 2002).

Die zentrale Rolle der VEGF Rezeptoren-1 und -2 wurde durch Geninaktivierung in der Maus bestätigt. Die Geninaktivierung von VEGF Rezeptor-1 (*flt-1*) resultierte in früher embryonaler Letalität. Eine Disorganisation und Vergrößerung der primordialen Gefäße wurde beobachtet. Im Lumen von Gefäßen wurden überzählige Endothelzellen gefunden (Fong et al., 1995). Dies resultierte aus gesteigerter Differenzierung von

Vorläuferzellen zu Endothelzellen (Fong et al., 1999). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Flt-1 ein negativer Regulator des VEGF Signalweges ist, indem Flt-1 entweder VEGF bindet oder Flk-1 Signalwege negativ moduliert. Für diese Hypothese sprachen Ergebnisse aus Experimenten mit genetisch veränderten Mäusen, in denen die intrazelluläre Kinasedomäne von Flt-1 deletiert wurde, die extrazelluläre VEGF Bindungsdomäne jedoch erhalten blieb (Hiratsuka et al., 1998). Diese Tiere zeigten keine Störungen in der Gefäßentwicklung.

Die Funktion von VEGF Rezeptor-2 in der Embryonalentwicklung wurde ebenfalls durch Geninaktivierung untersucht. Mausembryonen, die keinen VEGF Rezeptor-2 exprimierten, starben an Tag E9 und bildeten weder Endothelzellen noch Blutzellen (Shalaby et al., 1995). Dies bestätigte die Rolle des VEGF Rezeptor-2 in der Differenzierung vaskulärer Vorläuferzellen. *In vitro* konnten VEGF Rezeptor-2 defiziente Zellen jedoch noch zu einem gewissen Maße hämatopoetische Zellen bilden (Hidaka et al., 1999; Schuh et al., 1999). Das Fehlen hämatopoetischer Zellen in *VEGF Rezeptor-2* "knock-out" Mäusen wurde auf fehlgeleitete Migration der Vorläufer zum Dottersack zurückgeführt (Shalaby et al., 1997). Die VEGF Rezeptor-2 Signalübertragung wird von Neuropilin-1 und -2 moduliert. Neuropiline bilden in Neuronen zusammen mit Plexinen Rezeptorkomplexe für Klasse 3 Semaphorine, die im Nervensystem Signale in der Wegfindung von Axonen liefern (Neufeld et al., 2002). Die Inaktivierung des *neuropilin-1* Gens in Mäusen führte zu einem komplexen vaskulären Phänotyp. Die Angiogenese im Dottersack, die Organisation der Gefäße und die Vaskularisierung des Neuroepithelium waren gestört (Kawasaki et al., 1999). Die Überexpression von Neuropilin-1 in transgenen Mäusen führte zu einem hypervaskulären Phänotyp im Gehirn (Kitsukawa et al., 1995). Die Mutation von *neuropilin-2* in Mäusen führte zu keinem Defekt in Blutgefäßen. Mausembryonen, in denen homozygot eines der *neuropiline* mutiert war und zudem das jeweils andere heterozygot (*nrp-1* *-/-* // *nrp-2* *+/-* oder *nrp-1* *+/-* // *nrp-2* *-/-*), zeigten starke vaskuläre

Defekte. Die Mäuse, bei denen sowohl das *neuropilin-1* als auch das *neuropilin-2* Gen inaktiviert wurde, zeigten nur noch rudimentäre Gefäßbildung (Takashima et al., 2002). Die Ergebnisse der Geninaktivierungen von *VEGF*, den *VEGF Rezeptoren-1* und *-2* sowie der Co-Rezeptoren *neuropilin-1* und *-2* lassen den Schluss zu, dass VEGF Signalwege absolut nötig sind für die Differenzierung, Proliferation und Migration von vaskulären Vorläuferzellen und Endothelzellen.

1.2.2 Remodellierung und Stabilisierung von Gefäßen: Die Funktion von Angiopoietinen und Tie Rezeptoren

Die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Tie-1 und Tie-2 (oder Tek) spielen eine zentrale Rolle bei der Remodellierung von primitiven Gefäßplexus zu organisierten vaskulären Strukturen. Ihre extrazelluläre Domäne zeigt einen komplexen Aufbau aus Immunglobulin-, Fibronectin-, und EGF-ähnlichen Domänen (Abb. 1.2). Beide werden schon früh während der Gefäßentwicklung und im adulten Endothel exprimiert (Wong et al., 1997). Die Inaktivierung des *tie-1* Gens in Mäusen führte zum Absterben der Embryonen an Tag E13,5-14,5 (Puri et al., 1995) oder kurz vor der Geburt (Sato et al., 1995). Es wurden Hämorrhagien sowie Defekte in der vaskulären Integrität und im Überleben von Endothelzellen gefunden (Partanen et al., 1996). Die Inaktivierung des *tie-2* Gens beeinträchtigte nicht die Entwicklung des primären Gefäßnetzwerk, jedoch war die vaskuläre Remodellierung gestört und die Embryonen starben an Tag E10,5. Es zeigten sich Defekte im angiogenen Aussprossen von Gefäßen (z. B. ins Neuroektoderm) und in der Bildung von Trabekeln im Herz. Wahrscheinlich waren für den Phänotyp gestörte Überlebenssignale für Endothelzellen und/ oder Rekrutierung von Perizyten verantwortlich (Dumont et al., 1994; Sato et al., 1995; Patan, 1998; Puri et al., 1999; Jones et al., 2001). Die *tie-1/tie-2* Doppelmutanten zeigten den selben Phänotyp wie *tie-2* defiziente Mäuse (Puri et al., 1999). *In vitro* Studien zeigten, dass die durch Rezeptordimerisierung ausgelöste Autophosphorylierung von Tie-2 zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden führte. Die Aktivierung der

PI3 Kinase führte durch Phosphorylierung von Akt zur Übermittlung von Überlebenssignalen. Die Signale über FAK oder das Protein Dok-R stimulierten die Migration von Endothelzellen (Ward und Dumont, 2002). Ein direkter Effekt von Ang/Tie-2 Signalwegen auf die Proliferationsrate von Endothelzellen wurde jedoch nicht gefunden.

Die Liganden für Tie-1 konnten noch nicht identifiziert werden. Die Liganden von Tie-2 sind die Angiopoietine (Ang). Angiopoietin-1 und -4 sind Agonisten des Tie-2 Rezeptors, die eine Autophosphorylierung und Aktivierung der Signalkaskade auslösten (Davis et al., 1996; Valenzuela et al., 1999). Ang-2 und Ang-3 hingegen lösen nur eine schwache Rezeptoraktivierung aus und können antagonistisch auf Ang-1 vermittelte Aktivierung wirken (Maisonpierre et al., 1997). Ang-1 bildet Homotrimere, während Ang-2 als Homodimer vorliegt (Procopio et al., 1999). Die Geninaktivierung von *ang-1* in Mäusen führte zu fehlender Vaskularisierung des Neuroepithels. Es wurde zwar Gefäßwachstum im Embryo und Dottersack beobachtet, aber die Gefäße bildeten nur einen primitiven Plexus aus. Außerdem zeigten sich Defekte in der Entwicklung der Trabekel in den Herzventrikeln (Suri et al., 1996). Die Vaskulogenese war in den Ang-1 defizienten Mäusen also nicht beeinträchtigt, wogegen die Angiogenese und Remodellierung gestört war. Die Überexpression von Ang-1 in der Haut transgener Mäuse führte zu einem hypervaskulären Phänotyp (Suri et al., 1998; Thurston et al., 1999). *In vitro* Studien bestätigten eine Rolle von Ang-1 in der Angiogenese, da rekombinantes Ang-1 die Bildung von endothelialen Ausprossungen förderte (Koblizek et al., 1998). In Retinagefäßen, denen Perizyten fehlten, wurde eine erhöhte Permeabilität und Remodellierungsdefekte beobachtet. Dieser Defekt konnte durch Gabe von rekombinantem Ang-1 aufgehoben werden, so dass eine hierarchische Gefäßarchitektur ohne Ödeme gebildet wurde (Uemura et al., 2002).

Die Funktion von Ang-2 läßt sich klar gegenüber Ang-1 abgrenzen. Die Überexpression von Ang-2 in Endothelzellen transgener Mäuse inhibierte die embryonale Gefäßentwicklung (Maisonpierre et al., 1997). Nach der Geninaktivierung von *ang-2*

wurden die Mäuse zwar lebend geboren, die meisten überlebten jedoch nur 2 Wochen und zeigten eine chylöse Aszitis in Thorax und Abdomen. Die Hyaloidgefäße im Auge wurden in diesen Tieren nicht zurückgebildet (Gale et al., 2002).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass die Angiopoietine Modulatoren des Gefäßwachstums sind und dabei zumindest Ang-1 und -3 angiogen wirken. Das Ang/Tie-2 Signalsystem ist essentiell für die Remodellierung schon bestehender Gefäßnetzwerke.

1.3 Die transkriptionelle Kontrolle der Gefäßentwicklung

Die transkriptionellen Regulatoren der endothelialen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen stellen Kandidatengene für zentrale Faktoren in der Gefäßentwicklung dar. Vor allem sind die Transkriptionsfaktoren interessant, die in den vaskulären Vorläuferzellen exprimiert werden und somit die Differenzierung von Angioblasten steuern.

Bei der Analyse des humanen *VEGF Rezeptor-1* Promotors wurden Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren gefunden. Für die Expression des Gens waren ein Hypoxie-responsives Element (HRE) und ein cAMP-responsives Element (CRE) nötig (Morishita et al., 1995; Wakiya et al., 1996; Gerber et al., 1997). Außerdem waren Transkriptionsfaktoren der Ets Familie (Morishita et al., 1995; Wakiya et al., 1996) und das Zinkfingerprotein Egr-1 essentiell für die Transaktivierung des *VEGF Rezeptor-1* Gens (Akuzawa et al., 2000; Vidal et al., 2000).

Der humane und der murine *tie-1* Promotor wurden mit dem *lacZ* Reportergen fusioniert und die Expression in transgenen Mäusen untersucht. Beide Promotoren konnten eine endothelspezifische LacZ-Expression *in vivo* vermitteln (Korhonen et al., 1995). Dabei war die endotheliale Reportergenexpression in Embryonen vollständig, während in adulten Tieren nur noch Subpopulationen von Endothelzellen LacZ positiv waren. Eine genauere Untersuchung des *tie-1* Promotors ergab eine essentielle Rolle von zwei doppelten Ets Bindungsstellen, einer oktameren DNA-Sequenz und einer AP-2 Bindungsstelle (Iljin et al., 1999; Boutet et al., 2001).

Ein 1,2 kbp Fragment des *tie-2* Promotors konnte in Endothelzellen transgener Embryonen nur eine unvollständige Expression des *lacZ* Reportergens vermitteln (Schlaeger et al., 1995). Eine vollständige LacZ-Aktivität in Endothelzellen, sowohl im Embryo als auch in adulten Gefäßen wurde nur erreicht, wenn der Promotor und ein Fragment aus dem 1. Intron des *tie-2* Gens (Enhancer) zur Expression des Reportergens eingesetzt wurden. Der Enhancer konnte auf ein 303 bp Fragment eingegrenzt werden. Für seine Funktion waren Bindungsstellen für Ets Faktoren wichtig (Schlaeger et al., 1997). Die 5'UTR des *tie-2* Gens enthält weitere funktionelle Bindungsstellen für Ets Transkriptionsfaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass möglicherweise die Familienmitglieder Nrf2 und Elf1 eine Rolle bei der Transaktivierung von *tie-2* spielten (Dube et al., 1999; Dube et al., 2001). Die zentrale Rolle von Ets Faktoren wurde mit *in vivo* Reporter-gen-Studien bestätigt. Mutationen der Ets Bindungsstellen in der 5'UTR und im Enhancer führten zum Verlust der Reporter-genaktivität in transgenen Embryonen (Minami et al., 2003). Ein oktamer DNA-Motiv im Promotor war ebenfalls für endotheliale Expression des Reportergens nötig (Fadel et al., 1999).

Die Regulation des VEGF Rezeptor-2 (*flk-1*) Gens ist ausführlich in der Maus untersucht worden. Ein 939 bp Promotorfragment wurde charakterisiert, das in Endothelzellen besonders starke Aktivität aufwies (Rönicke et al., 1996). Die funktionelle Analyse zeigte, dass Bindungsstellen für NFκB und CREB für die Promotoraktivität wichtig waren (Illi et al., 2000). Dies erklärte jedoch nicht die Spezifität des Promotors für Endothelzellen. Eine genauere Untersuchung zeigte, dass Bindungsstellen für Ets Familienmitglieder und HIF2α für die Reporter-genexpression in transgenen Mäusen essentiell waren (Kappel et al., 2000; Elvert et al., 2003). Der Promotor alleine konnte in transgenen Mäusen keine Expression des *lacZ* Reportergens in Endothelzellen steuern. Es wurde ein Enhancer Element im 1. Intron des *flk-1* Gens gefunden (Kappel et al., 1999), das zusammen mit dem Promotor eine endothelspezifische LacZ-Expression *in vivo* vermitteln konnte (Kappel et al., 1999). Die Enhancer Funktion wurde bis auf ein 510 bp Fragment eingegrenzt und potentielle

Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert. Die Mutation von einzelnen Ets, SCL/Tal-1, HoxB5 oder GATA Bindungsstellen führte jeweils zum fast kompletten Verlust der Reportergenaktivität (Kappel et al., 2000; Wu et al., 2003). Die Regulation des humanen VEGF Rezeptor-2 (*KDR*) ist ebenfalls untersucht worden. *In vitro* waren Bindungsstellen für SP1/SP3, NFκB und GATA Faktoren für die Transaktivierung des Gens essentiell (Patterson et al., 1995; Patterson et al., 1997; Hata et al., 1998; Minami et al., 2001).

Die Transkriptionsfaktoren der Ets Familie spielen also bei der Regulation von *VEGF* Rezeptoren sowie *tie-1* und *tie-2* eine wichtige Rolle. Bei dieser Familie handelt es sich um eine große Gruppe von Transkriptionsfaktoren mit einer DNA bindenden sogenannten Ets Domäne mit einem "winged helix-turn-helix" Motiv (Lelievre et al., 2001; Sharrocks, 2001). Die Expression von Ets-1 ist konsistent mit einer möglichen Rolle in der Gefäßentwicklung. Ets-1 Transkripte lassen sich in mesodermalen Zellen nachweisen, die zu Blutinseln differenzieren, also in Hämangioblasten (Pardanaud und Dieterlen-Lievre, 1993; Queva et al., 1993). Ets-1 wird in späteren Entwicklungsstadien in der endothelialen Linie exprimiert, aber auch in einigen anderen Geweben. In der gesamten Embryonalentwicklung war Ets-1 in Endothelzellen nachweisbar, die durch Vaskulogenese oder Angiogenese neue Gefäße bildeten (Vandenbunder et al., 1989; Vandenbunder et al., 1994). Überraschenderweise resultierte die Geninaktivierung von *ets-1* in Mäusen nicht in vaskulären Defekten. Ein möglicher Grund hierfür ist die funktionale Redundanz von Ets Faktoren. Möglicherweise konnten Faktoren wie Erg oder Fli den Verlust von Ets-1 kompensieren, da sie ein überlappendes Expressionsmuster zeigten (Maroulakou und Bowe, 2000; Lelievre et al., 2001). Eine Rolle von Ets-1 und Ets-2 während der Gefäßentwicklung wurde im Modell des Hühnerembryo gefunden. Retroviren, die für "antisense" DNA gegen *ets-1* oder *ets-2* kodierten, wurden in den Blutkreislauf von Embryonen injiziert. Dies führte zur Inaktivierung von Ets-1 bzw. Ets-2 in infizierten Endothelzellen und resultierte u. a. in gestörter Entwicklung der Koronargefäße (Lie-Venema et al., 2003).

Ein weiterer wichtiger Faktor in der frühen Gefäßentwicklung ist SCL/Tal-1. Die Expression von SCL/Tal-1 wurde in Hämangioblasten beschrieben und ist später auf Zellen des hämatopoetischen Systems beschränkt. Die Inaktivierung des Gens in Mäusen führte zu Defekten in der Hämatopoese sowie in der Angiogenese (Shivdasani et al., 1995; Porcher et al., 1996; Visvader et al., 1998). Die Überexpression von SCL/Tal-1 in Zebrafischen führte zur Entwicklung von überzähligen Hämangioblasten, was für eine Rolle in der Differenzierung von mesodermalen Vorläuferzellen zu Hämangioblasten sprach (Gering et al., 1998). Die Zebrafisch-Mutante "cloche" entwickelte keine Hämangioblasten (Liao et al., 1997). Dieser Phänotyp konnte teilweise durch Überexpression von SCL/Tal-1 aufgehoben werden (Liao et al., 1998). Die Rolle von SCL-/Tal-1 in der Determination vaskulärer Vorläuferzellen wurde in differenzierenden embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) untersucht. Die Geninaktivierung von *SCL/Tal-1* führte zur vermehrten Bildung der Vorläufer von Endothel- und glatten Muskelzellen (Angioblasten). Die Differenzierung zur hämatopoetischen Linie wurde aber in Abwesenheit von SCL/Tal-1 gehemmt. Wurde hingegen SCL/Tal-1 in ES-Zellen überexprimiert, so wurde die Differenzierung zu Muskelzellen inhibiert, dies führte aber gleichzeitig zur gesteigerten Differenzierung hämatopoetischer Zellen (bzw. Hämangioblasten) (Ema et al., 2003).

Weitere potentielle transkriptionelle Regulatoren der Gefäßentwicklung sind identifiziert worden. Diese Faktoren zeichnen sich aus durch Expression in vaskulären Vorläuferzellen oder ihre Geninaktivierung führte zu Defekten in der Gefäßentwicklung. Dazu gehören Transkriptionsfaktoren der Hox Familie, Fra-1, *gridlock*, *vezf1* und GATA Faktoren (Gorski und Walsh, 2000; Oettgen, 2001), die an dieser Stelle aber nicht genauer besprochen werden.

1.4 Hypoxie-induzierbare Faktoren

1.4.1 Molekulare Mechanismen der Hypoxie-Antwort

Neben den Ets Faktoren stellen auch Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIFs) eine wichtige Gruppe von Kandidatengenen dar, die Gefäßentwicklung steuern könnten.

Die zelluläre Antwort auf niedrige Sauerstoffkonzentration wird auf transkriptioneller Ebene von Hypoxie-induzierbaren Faktoren reguliert. HIFs sind heterodimere Transkriptionsfaktoren mit einem basischen Helix-Schleife-Helix (bHLH) DNA-Bindungsmotiv. Die Heterodimere bestehen aus je einer der drei HIF α Untereinheiten (HIF1 α , HIF2 α , HIF3 α) und der HIF1 β (ARNT) Untereinheit. Die HIF Faktoren besitzen PAS A und PAS B Domänen, die für die Heterodimerisierung und DNA Bindung wichtig sind. Im Carboxyl-Terminus befinden sich die beiden Transaktivierungsdomänen TAD C und TAD N, die für die Interaktion mit dem transkriptionellen Co-Aktivator CBP/p300 essentiell sind (Jiang et al., 1997; Ema et al., 1999; O'Rourke et al., 1999). Die ARNT Untereinheit wird ubiquitär exprimiert und

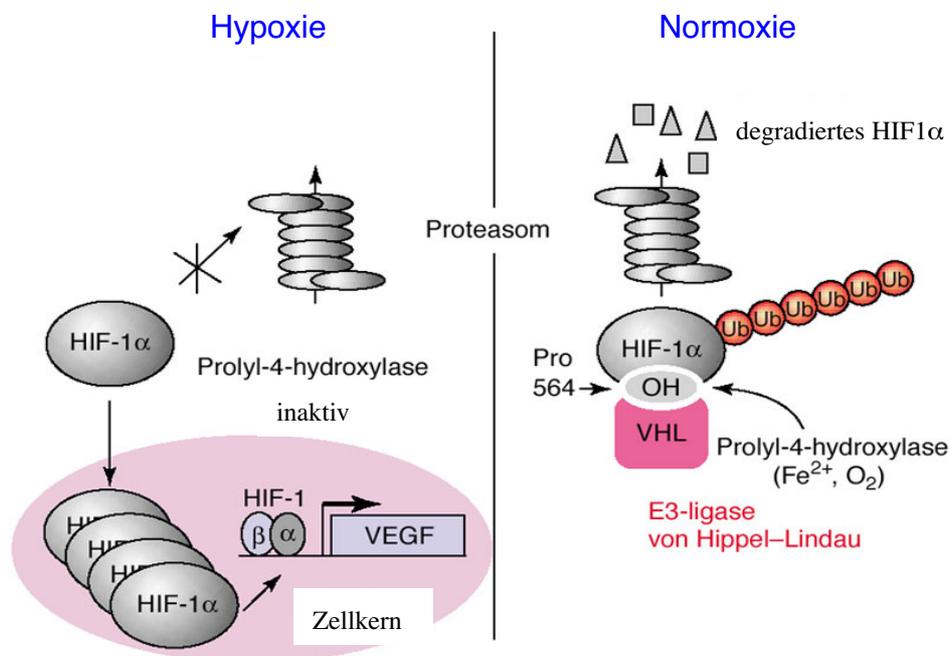


Abb. 1.3 Der molekulare Mechanismus der Hypoxie-Antwort

(entnommen aus Brahim-Horn et al., 2001)

nicht durch Hypoxie reguliert (Brahimi-Horn et al., 2001; Kewley et al., 2004). Die HIF α Untereinheiten zeigen hingegen ein spezifisches Expressionsmuster und auf Proteinebene wird ihre Stabilität durch Hypoxie reguliert (Wang et al., 1995; Wang und Semenza, 1995; Wiesener et al., 1998; Ema et al., 1999; O'Rourke et al., 1999) (Abb. 1.3).

Im Embryo wird HIF1 α ubiquitär exprimiert (Jain et al., 1998). HIF2 α dagegen wird während der Embryonalentwicklung besonders stark in Endothelzellen exprimiert (Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Tian et al., 1997). Das Familienmitglied HIF3 α (Gu et al., 1998) wurde in adulten Ratten unter hypoxischen Bedingungen verstärkt exprimiert und auf Proteinebene stabilisiert (Heidbreder et al., 2003). Unter normoxischen Bedingungen werden die HIF α Untereinheiten durch Bindung des von Hippel-Lindau (VHL) Proteins für die Degradation im Proteasom markiert (Maxwell et al., 1999). Das VHL Protein ist zusammen mit den Co-Faktoren Elongin B und C, Cullin2 und RBX1 eine E3 Ubiquitin Ligase. Die Übertragung einer poly-Ubiquitin-Kette auf HIF α führt zum Abbau des Proteins im Proteasom (Salceda und Caro, 1997; Huang et al., 1998; Kallio et al., 1999). Unter Hypoxie kann VHL hingegen nicht an HIF α Untereinheiten binden. Als Folge dessen werden HIF α Proteine nicht dem Abbau durch das Proteasom ausgesetzt, stattdessen können sie mit ARNT Heterodimere bilden, in den Zellkern translozieren und dort schließlich ihre Zielgene transaktivieren. Der Mechanismus dieses zellulären Sauerstoffsensors wurde erst kürzlich auf molekularer Ebene geklärt. Eine neue Gruppe von Prolylhydroxylasen (PHD1-4) ist für die Modifizierung der HIF α Untereinheiten unter Normoxie verantwortlich (Bruick und McKnight, 2001; Epstein et al., 2001; Oehme et al., 2002). Die Hydroxylierung von zwei Prolinresten in HIF1 α bzw. HIF2 α durch PHD ist Voraussetzung für die Bindung von VHL an die HIF α Untereinheiten und somit für deren Degradation (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Diese Hydroxylierung kann unter hypoxischen Bedingungen nicht stattfinden, da O₂ bei der enzymatischen Reaktion benötigt wird. Neben der Stabilisierung der HIF α Untereinheiten, wird die Aktivität der HIFs über verschiedene posttranslationale

Mechanismen gesteuert. Eine Modifikation, die sich auf die Aktivität von HIFs auswirkt, ist die Hydroxylierung eines Asparaginrestes im C-Terminus von HIF α durch das Enzym FIH ("factor inhibiting HIF") (Lando et al., 2002a; Lando et al., 2002b). Unter normoxischen Bedingungen wird der Asparaginrest hydroxyliert, wodurch der transkriptionelle Co-Aktivat CBP/p300 nicht an die HIF α Untereinheiten binden kann. Unter Hypoxie wird dieser Asparaginrest nicht hydroxyliert, so dass die Interaktion von HIF α mit CBP/p300 möglich ist. Weitere Beispiele für posttranslationale Modifikationen sind die Phosphorylierung und Acetylierung der HIF α Untereinheiten. HIF1 α wird durch p42/44 MAP-Kinase phosphoryliert und die transkriptionelle Aktivität dadurch gesteigert (Richard et al., 1999). Auch HIF2 α wird unter hypoxischen Bedingungen durch p42/p44 MAP-Kinase phosphoryliert. Dies steigerte die Transaktivierung von Zielgenen (Conrad et al., 1999), wahrscheinlich durch erhöhte Affinität des phosphorylierten HIF α zum Co-Aktivat CBP/p300 (Gradin et al., 2002). Eine weitere Modifikation der HIF α Untereinheiten erfolgte durch das Enzym ARD-1. Unter Normoxie wird ein Lysinrest in HIF1 α durch ARD-1 acetyliert, was in der Verstärkung der VHL Bindung resultiert und den proteasomalen Abbau fördert. Unter Hypoxie sinkt zum einen die Expression von ARD-1, gleichzeitig wird auch die Bindung von ARD-1 an HIF1 α schwächer, so dass die Acetylierung von HIF1 α abnimmt (Jeong et al., 2002).

Nicht nur Hypoxie regulierte die Stabilität und Aktivität von HIFs. Verschiedene Wachstumsfaktoren, Zytokine und proto-Onkogene können unter normoxischen Bedingungen zur Stabilisierung von HIF α führen. Dazu gehören *ras*, *v-src*, Diacylglycerol-Kinase, Insulin, IGF-1+2, EGF, FGF-2, NO, TNF, PDGF, Thrombin, Interleukin-1 β und AngiotensinII. Die Signaltransduktion dieser Faktoren und die Modulation von HIF α verläuft größtenteils über den MAP-Kinase Weg (Acker und Plate, 2002; Harris, 2002).

1.4.2 Die Rolle von HIFs während der Embryonalentwicklung

HIF1 α defiziente Mausembryonen zeigten bereits an Tag 8,0 der Embryonalentwicklung morphologische Veränderungen. Die Embryonen waren im Wachstum retardiert, die Bildung der Dottersackgefäße war gestört und es zeigten sich abnormale Kapillarnetzwerke im Embryo. Das Neuralrohr schloss sich nicht vollständig und die *HIF1 α* *-/-* Embryonen starben an Tag 10 der Embryonalentwicklung (Iyer et al., 1998; Ryan et al., 1998; Kotch et al., 1999). Der Phänotyp resultierte wahrscheinlich aus mesenchymalem Zelltod und nicht, wie zunächst vermutet, aus reduzierter VEGF Expression. Die Menge an VEGF war sogar erhöht in *HIF1 α* "knock-out" Embryonen (Kotch et al., 1999). Darüber hinaus wurde eine fehlerhafte Herzentwicklung beobachtet, wahrscheinlich aufgrund gestörter Migration von Zellen aus der Neuralleiste und unvollständiger Bildung der Ventrikel (Compernelle et al., 2003). Die Geninaktivierung von *ARNT* in der Maus zeigte, dass dieser Faktor ebenfalls für die normale Embryonalentwicklung unerlässlich ist. *ARNT* defiziente Embryonen starben an Tag E10,5. Die Embryonen waren kleiner als der Wildtyp, hatten disorganisierte Dottersackgefäße sowie Neuralrohrdefekte und eine schwere Störung in der Plazentabildung (Kozak et al., 1997; Maltepe et al., 1997; Abbott und Buckalew, 2000; Adelman et al., 2000). Im Vergleich zu *HIF1 α* und *ARNT* defizienten Mäusen führte die Geninaktivierung von *HIF2 α* zu mildereren Entwicklungsstörungen. *HIF2 α* "knock-out" Mäuse wurden in mehreren Studien generiert, die festgestellten Defekte waren jedoch nicht konsistent. Eine der Untersuchungen zeigte eine gestörte Biosynthese von Katecholaminen und Bradykardie, was zum Tod der Embryonen nach Tag E12,5 führte (Tian et al., 1998). Eine zweite Studie beschrieb Defekte in der neonatalen Reifung der Lunge und der "Surfactant"-Produktion (Compernelle et al., 2002). In einer dritten Studie führte die Geninaktivierung von *HIF2 α* zu Defekten in der Vaskularisierung des Dottersacks. In einem Teil der Embryonen war die Gefäßbildung ebenfalls gestört, generell war der beschriebene Phänotyp aber sehr variabel (Peng et al., 2000). Diese Ergebnisse sind wahrscheinlich durch Unterschiede in den verwendeten Mausstämmen

zu erklären. Durch Kreuzung von heterozygoten *HIF2 α* Mäusen verschiedener Stämme (129SV-*HIF2 α* +/- und C57/Bl6-*HIF2 α* +/-) gelang es, adulte "knock-out" Tiere zu generieren. Diese *HIF2 α* -/- Mäuse wiesen multiple Organdefekte wie Retinopathie, kardiale Hypertrophie, skelettale Myopathie, hypozelluläres Knochenmark und mitochondriale Defekte auf. Es wurden erhöhte Level von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) festgestellt, was auf reduzierte Expression von primären antioxidanten Enzymen (AOE) zurückgeführt wurde (Scortegagna et al., 2003a). Außerdem zeigten *HIF2 α* "knock-out" Mäuse Panzytopenie. Die Transplantation von *HIF2 α* defizienten Knochenmarkzellen in bestrahlte Wildtyp-Tiere konnte die Hämatopoese vollständig rekonstituieren (Scortegagna et al., 2003b). Daraus wurde geschlossen, dass der Defekt in der Hämatopoese auf *HIF2 α* defiziente Knochenmark-Stromazellen zurückzuführen ist. In einem weiteren genetischen Mausmodell führte die reduzierte *HIF2 α* Expression zu verminderter Neovaskularisierung der Retina in einem experimentellen Modell der Retinopathie (ROP) (Morita et al., 2003).

1.4.3 Zielgene von HIF: Expression der angiogenen Faktoren VEGF und der Angiopoietine

Es wurde eine Vielzahl von Genen beschrieben, die durch Hypoxie bzw. durch Hypoxie-induzierbare Faktoren reguliert werden. Die Zielgene von HIFs lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen. Sie beinhalten Gene aus dem Energiemetabolismus (Glukoseaufnahme, Glykolyse), Erythropoese (EPO), Eisenhomeostase (Transferrin), Zellproliferation (IGF-2), pH Regulation (Carboanhydrase-9,-12), Apoptose (NIX) und Angiogenese (VEGF, Flt-1, PDGF) (Harris, 2002; Wenger, 2002; Pugh und Ratcliffe, 2003). Hier sollen insbesondere einige Zielgenen besprochen werden, die im Zusammenhang mit Angiogenese von zentraler Bedeutung sind.

Eine mögliche Reaktion des Organismus auf Hypoxie ist das kompensatorische Wachstum von Blutgefäßen. Dies stellt sicher, dass hypoxische Gewebe mit Sauerstoff versorgt werden und ist ein zentraler Mechanismus beim Wachstum von Tumoren. Eine

ganze Reihe von Genen, die mit Gefäßwachstum in Verbindung gebracht werden, sind Zielgene der HIFs (Pugh und Ratcliffe, 2003). Eine prominente Rolle nehmen dabei VEGF und Angiopoietine ein. Unter Hypoxie wird die Expression von VEGF über einen HIF1 α abhängigen Mechanismus verstärkt (Liu et al., 1995; Forsythe et al., 1996). Dies erfolgt über Bindung von HIF1 α an das Hypoxie-responsive Element (HRE) im *VEGF* Promotor. Die Überexpression von HIF1 α oder HIF2 α *in vitro* resultierte in einer starken Aktivierung des *VEGF* Promotors (Ema et al., 1997). Daneben wurden noch post-transkriptionelle Mechanismen beschrieben, die zur Regulation von VEGF unter hypoxischen Bedingungen beitragen. Die Stabilität der VEGF mRNA wurde durch Bindung des Proteins HuR in der 3'UTR erhöht (Levy et al., 1998). Die Translation von VEGF unter hypoxischem Stress wird durch eine interne ribosomale Eintrittssequenz (IRES) erleichtert (Stein et al., 1998).

Die Expression von Ang-2 wurde in Endothelzellen durch Hypoxie stimuliert (Mandriota und Pepper, 1998; Oh et al., 1999; Mandriota et al., 2000). Injektion von Adenoviren, die für eine konstitutiv aktive *HIF1 α* Form kodierten, in den Glaskörper des Auge führte zu Neovaskularisierung der Retina in Abwesenheit von Hypoxie oder Ischämie (Kelly et al., 2003). In einer weiteren Studie wurden isolierte humane koronare Endothelzellen mit einem Adenovirus infiziert, der für eine konstitutiv aktive *HIF1 α* Form kodierte. Dies führte zu erhöhter Expression von VEGF, Ang-2 und Ang-4, sowie PlGF und PDGF (Yamakawa et al., 2003). Beide Studien zusammen lassen vermuten, dass HIF1 α ein globaler Mediator der angiogenen Hypoxie-Antwort ist, da multiple angiogene Faktoren gleichzeitig stimuliert werden.

Da angiogene Faktoren wie VEGF und Angiopoietine durch Hypoxie reguliert werden, stellt sich die Frage, ob auch die dazugehörigen Rezeptoren auf Endothelzellen durch Hypoxie stimulierbar sind. Bisher liegen hierzu hauptsächlich *in vitro* Daten vor. Die Expression von Tie-2 wurde unter hypoxischen Bedingungen in isolierten humanen Endothelzellen induziert (Willam et al., 2000). Die Überexpression von HIF2 α *in vitro* stimulierte die Aktivität des *tie-2* Promotors (Tian et al., 1997). Der *flt-1* Promotor

enthält ein Hypoxie-responsives Element und wurde unter Hypoxie verstärkt exprimiert (Tuder et al., 1995; Gerber et al., 1997). Ebenso wurde unter Hypoxie eine Induktion von KDR auf Proteinebene gezeigt (Brogi et al., 1996; Waltenberger et al., 1996) allerdings nicht auf mRNA Ebene (Gerber et al., 1997). Es wurden parakrine Mechanismen postuliert, die bei der gesteigerten Expression von VEGF Rezeptor-2 unter hypoxischen Bedingungen eine Rolle spielten. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass VEGF die Expression des eigenen Rezeptors stimulierte (Kremer et al., 1997). Der *flk-1* Promotor enthält funktionelle Bindungsstellen für HIF2 α und konnte in Reporterstudien durch HIF2 α Expression stimuliert wurde (Kappel et al., 1999; Elvert et al., 2003). Zusammengefasst deuten diese *in vitro* Daten darauf hin, dass *flt-1*, *flk-1* und *tie-2* Zielgene von HIFs sind. Es ist jedoch nicht klar, ob dies *in vivo*, beispielsweise in der Embryonalentwicklung, von Bedeutung ist.

1.5 Das Cre-loxP Rekombinationssystem

Die gezielte Geninaktivierung ("knock-out") ist eine verbreitete Technik, um Genfunktionen *in vivo* zu analysieren. Im Falle einer generellen Inaktivierung ist die Expression des Zielgens in allen Zellen des Embryos betroffen, was zu Entwicklungsstörungen und frühem Absterben führen kann. Eine funktionelle Analyse in späteren Entwicklungsstadien ist dann sehr schwierig. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, ist die konditionale Inaktivierung des Zielgens. Das Zielgen kann entweder gewebespezifisch und/ oder durch Zugabe eines Induktors zeitlich gesteuert inaktiviert werden. Um dies zu verwirklichen, wird das sogenannte Cre-loxP Rekombinationssystem angewendet. Das Enzym Cre Rekombinase (kurz Cre) stammt aus dem Bakteriophagen P1 und katalysiert die Rekombination zwischen zwei spezifischen Erkennungssequenzen, den sogenannten loxP Sequenzen. Beliebige DNA Fragmente, die von zwei loxP Sequenzen flankiert sind (kurz "gefloxt"), können somit deletiert werden. Die loxP Sequenzen sind sehr kurz, und in der Regel flankieren sie Bereiche im Zielgen so, dass die Expression des Gens zunächst nicht beeinträchtigt

wird. Transgene Mäuse, die eine starke zelltypspezifische Cre-Expression aufweisen, können mit transgenen Mäusen gekreuzt werden, die ein beliebiges gefloxtes Zielgen besitzen. Erst wenn in doppelt transgenen Nachkommen die Cre-Expression einsetzt, wird in den Cre exprimierenden Zellen die gefloxtete DNA deletiert und dabei das Zielgen inaktiviert (Rajewsky et al., 1996; Nagy, 2000; van der Weyden et al., 2002) (Abb. 1.4).

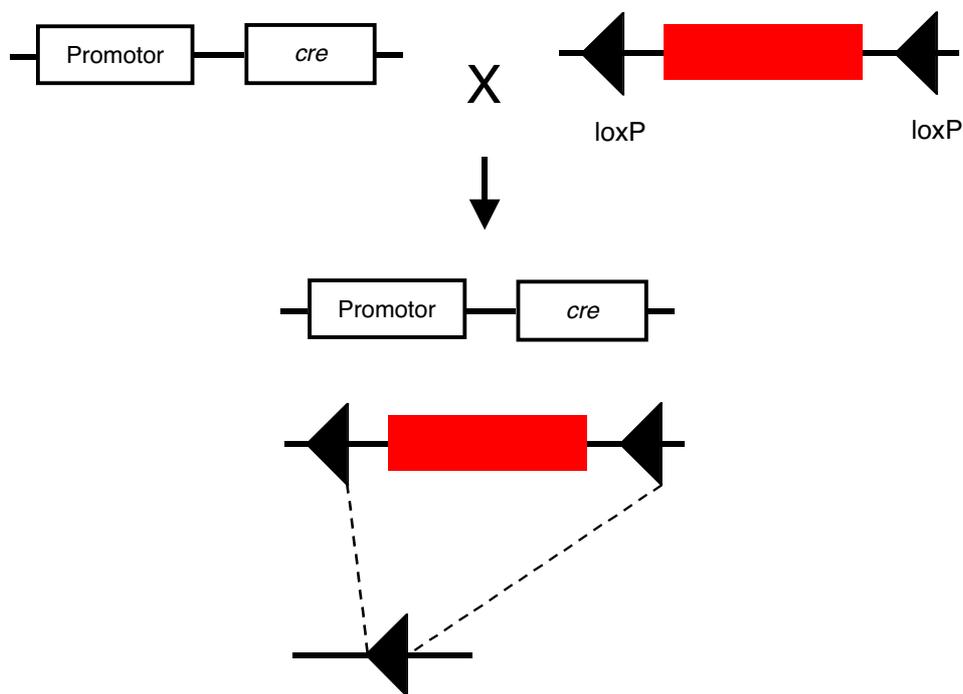


Abb. 1.4 Schema des Cre-loxP Rekombinationssystems

Ein zelltypspezifischer Promotor kontrolliert die Expression des *cre* Gens in transgenen Mäusen. Werden diese Mäuse mit genetisch veränderten Mäusen gekreuzt, bei denen loxP Sequenzen ein DNA-Fragment (rot) flankieren, so wird in doppelt transgenen Nachkommen dieses DNA-Fragment deletiert. Die Deletion findet spezifisch in den Zellen statt, die Cre exprimieren.

1.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten transgene Mauslinien etabliert werden, die die Cre Rekombinase spezifisch in Endothelzellen exprimieren. Diese Mäuse können verwendet werden, um endotheliale Gene zu inaktivieren (z. B. Transkriptionsfaktoren) und so deren Rolle bei der Entwicklung von Gefäßen *in vivo* zu studieren.

Durch *in vitro* Untersuchungen gibt es Hinweise, dass die Expression von endothelialen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen durch Hypoxie stimuliert wird. Dabei ist nicht klar, ob dies über parakrine Signale geschieht, oder ob intrinsische Regulatoren in Endothelzellen daran beteiligt sind. Vor allem gibt es bisher keine ausreichenden Daten über die Rolle endothelialer HIFs *in vivo*. Daher sollte im zweiten Teil dieser Arbeit eine dominant negative HIF Mutante spezifisch in Endothelzellen von transgenen Mäusen exprimiert werden. Dadurch sollten Hypoxie-Signalwege in Endothelzellen blockiert werden und die Auswirkungen auf die Gefäßentwicklung und die Expression endothelialer Gene analysiert werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit sollten die regulatorische Sequenzen des humanen VEGF Rezeptor-2 (*KDR*) Gens identifiziert und analysiert werden. Dies sollte neue Kandidaten für transkriptionelle Regulatoren der Gefäßbildung liefern. Darüber hinaus können die regulatorischen Sequenzen des *KDR* Gens für die endothelspezifische Expression von "Therapiegenen" verwendet werden, was zum Beispiel in der anti-angiogenen Genterapie von Nutzen sein kann.

2. Material und Methoden

Die folgenden Arbeitsprotokolle basieren im wesentlichen auf den Methodensammlungen von Ausubel et al. (1994) und Sambrook et al. (1989).

2.1 Geräte

Zentrifugen: Tischzentrifuge "Centrifuge" 5415 C (Eppendorf, Hamburg)

Tischzentrifuge 4-10 (Sigma, Osterode)

Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

Kühlzentrifuge 4K10 (Sigma, Osterode)

Kühlzentrifuge Centrikon T-124 (Kontron, Zürich, CH)

Rotor A 8.24 (Kontron, Zürich, CH)

Rotor A 6.14 (Kontron, Zürich, CH)

Inkubatoren: CO₂-begasbarer Brutschrank für Zellkultur IR-Autoflow (Nuair über Zapf, Sarstedt)

Brutschrank für Bakterienkultur B5060E (Heraeus, Hanau)

Schüttelinkubator Modell HT (Infors, Bottmingen, CH)

Netzgeräte: Modell E455 (Consort über Fröbel, Wasserburg)

Modell E434 (Consort über Fröbel, Wasserburg)

Photometer: UV/VIS Spectrometer Lambda Bio (Perkin Elmer, Überlingen)

UV/VIS Spectrophotometer DU 530 (Beckman, Krefeld)

VMAX kinetic microplate reader (Molecular Devices, München)

-
- Wasserbäder: Modell U3 (Julabo Labortechnik, Seelbach)
Modell SW-20C (Julabo Labortechnik, Seelbach)
Pharmacia LKB Multi Temp II (Pharmacia, Freiburg)
- Schüttler: Vortex VF2 (Bender und Hobein AG, Zürich, CH)
IKA-Schüttler MTS2 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen)
Rocky (Uniequip Laborgerätebedarf, München)
- Heizblöcke: Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
Thermostat 5320 (Eppendorf, Hamburg)
- Mikroskope: Axiophot (Zeiss, Oberkochen)
Axiovert 135 (Zeiss, Oberkochen)
Stemi SV 11 Präparationsmikroskop (Zeiss, Oberkochen)
Wilovert S (Hund, Wetzlar)
- Waagen: Laborwaage MC1 Laboratory LC4800P (Sartorius, Göttingen)
Feinwaage MC1 Research RC210D (Sartorius, Göttingen)
- Sonstiges: Autoklav Varioklav Typ 300 (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
Digitalkamera DSC-S75 (Sony)
Flachbettgelkammer EasiCast Midi (MWG-Biotech, Ebersberg)
Heizrührer Ikamag RCT (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen)
Homogenisator Ultra-Turrax T8 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen)
Hybridisierungsöfen (Bachofer, Reutlingen)
Hybridisierungsöfen (Biometra, Göttingen)
Hypoxiekammer, thermo-cell system (Labotec, Göttingen)

Kaltlichtlampe KL1500 electronic (Zeiss, Oberkochen)
Kryostat HM 500 OM (Microm, Walldorf)
Liquid Scintillation Analyzer 1600TR (Canberra Packard, Frankfurt)
Luminometer Microlumat LB96P (Berthold, Bad Wildbad)
Mikrotom HM350 (Microm, Walldorf)
Mini PROTEAN II Elektrophorese System (BioRad, München)
Nukleinsäure-Sequenziergerät 373 DNA Sequencer Stretch (Applied Biosystems, Weiterstadt)
PhosphorImager BAS-2500 (Fuji, Raytest, Straubenhardt)
pH-Messgerät 192 (WTW, Weilheim)
Pipetten (Abimed, Langenfeld; Eppendorf, Hamburg)
PCR-Gerät, RoboCycler Gradient 96 (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)
PCR-Gerät GeneAmpPCR System 2400 (Perkin Elmer, Überlingen)
Röntgenfilmentwickler M35 X-OMAT (Kodak)
Sterilbank Class II, Typ A/B3 (Nuaire über Zapf, Sarstedt)
Stickstofftank Chronos Biosafe (Messer Griesheim, Frankfurt)
Ultraschallbad Branson 5210 (Ultrasonic Cleaner Co., Conneticut, USA)
UV-Lichttisch 312 nm (Bachofer, Reutlingen)
UV-Lichttisch 254 nm (Bachofer, Reutlingen)
Video-Bildverarbeitungssystem (Appligene, Pleasanton, CA, USA)
Wasserfiltrations- und Deionisierungsanlage (Seral, Ransbach-Baumbach)

2.2 Verbrauchsmaterialien

2.2.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen im Reinheitsgrad p.A. bezogen, sofern im Text nicht näher bezeichnet:

Difco, Augsburg; Gibco BRL, Eggenstein; J.T. Baker, Griesheim; Fluka, Buchs (CH); Merck, Darmstadt; Riedel-de Haen, Seelze; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen.

Radioaktive Chemikalien wurden von Amersham, Braunschweig bezogen:

α -(³²P)-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)

α -(³²P)-UTP (800 Ci/mmol)

Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Clontech, Heidelberg; Eurogentech, Seraing (B); Gibco BRL, Eggenstein; New England Biolabs, Bad Schwalbach und MBI-Fermentas, St. Leon-Rot bezogen.

Folgende modifizierende Enzyme wurden verwendet:

"Shrimps Alkaline Phosphatase"	USB (Amersham, Braunschweig)
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Boehringer Mannheim
Proteinase K	Boehringer Mannheim
DNase I, RNase frei	Pharmacia, Freiburg
DNase I	Boehringer Mannheim
SAWADY Mid Range PCR Enzym	Peqlab, Erlangen
T4-DNA Ligase	Boehringer Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

2.2.2 Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
anti-Pecam-1 (Mec13.3)	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das endothelspezifische Oberflächenprotein Pecam-1 der Maus	Vecchi et al. (1994)
anti-Flt-1 (MF1)	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen VEGF Rezeptor-1 der Maus	Imclone Systems Inc. New York, USA
anti-Flk-1 (12β11)	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen die Extrazellulärdomäne des VEGF Rezeptor-2 der Maus	Kataoka et al. (1997)
anti-FLAG (M2)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das FLAG Peptid	Sigma, St. Louis, USA
anti-LacZ	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen β-Galaktosidase von <i>E. coli</i>	Europa Bioproducts, Cambridge, USA
anti-Tie-2 (4g8)	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen die Extrazellulärdomäne von Tie-2 der Maus	Silenus Labs, Melbourne, Australien

2.2.3 Sonstiges

DNA-Größenmarker: 1 kbp DNA-Leiter (Gibco BRL, Eggenstein)

Protein-Größenmarker: Prestained SDS-PAGE Standard, (BioRad, München)

Reaktionsgefäße, 0,2-2,0 ml (Eppendorf, Hamburg)

14 ml Zentrifugengefäße (Greiner, Solingen)

15 ml bzw. 50 ml Zentrifugengefäße (Becton-Dickinson, Heidelberg)

Gewebekulturgefäße (Costar, Bodenheim; Greiner, Solingen; Nunc, Wiesbaden)

Pipettenspitzen (Greiner, Solingen; Eppendorf, Hamburg)

Sterilfilter (Pall Filtron, Schleicher und Schuell, Dassel)

Hyperfilm ECL (Amersham, Braunschweig)

Röntgenfilm Xomat (Kodak)

Kunstlichtfilm 64 ASA EPY 5018 (Kodak)

Nitrozellulose Transfermembran Protran BA 83 (Schleicher & Schuell, Dassel)

Nylon Transfermembran Hybond-N⁺ (Amersham, Braunschweig)

2.3 Molekularbiologie

2.3.1 Standardlösungen für die Molekularbiologie

LB-Medium: 20 g LB-Broth (Gibco BRL, Eggenstein)
auf 1 l mit H₂O auffüllen

LB-Agar: 1 l LB-Medium
15 g Bacto-Agar (Difco, Augsburg)

Antibiotikum: Ampicillin (Boehringer Mannheim)
Stammlösung: 100 mg/ml in sterilem Wasser
Endkonzentration: 50-100 mg/ml

10 x PBS: 1,37 M NaCl
27 mM KCl
43 mM Na₂HPO₄
14 mM KH₂PO₄
pH 7,4

1 x TBE (Tris-Borat-EDTA): 90 mM Tris-Base
90 mM Borsäure
2 mM EDTA

6 x DNA-Probenpuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau 40% (w/v) Saccharose 10 mM EDTA
1 x TE (Tris-EDTA):	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA
20 x SSC (NaCl-Natriumcitrat):	175,3 g NaCl 88,2 g Natriumcitrat pH auf 7,0 mit NaOH einstellen mit H ₂ O auf 1 l auffüllen

2.3.2 Verwendete DNA-Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pSLNE4c	Expressionsvektor mit <i>cre</i> Rekombinase Gen	Betz et al. (1996)
pcDNA3	eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen
pSGS-ets-1	CMV Prom c-ets-1(p68)	Wasylyk et al. (1991)
pcDNA-ets-2	CMV Prom ets-2	Kappel et al. (2000)
pcDNA-HIF1 α	CMV Prom- HIF1 α FLAG	Kappel et al. (1999)
pcDNA-HIF2 α	CMV Prom- HIF2 α FLAG	Kappel et al. (1999)
pcDNA-HIFdn	CMV Prom- HIFdn FLAG	Elvert et al. (2003)
pCS2-Hey1	eukaryotischer Expressionsvektor, CMV Prom-Hey1	M. Gessler
pCS2-Hey2	eukaryotischer Expressionsvektor, CMV Prom-Hey2	M. Gessler
plxn-etsdn	retroviraler Expressionsvektor für dominant negatives Ets	A. Nicolaus
pCR2.1	Klonierungsvektor, TA Klonierung	Invitrogen
pSL1190	Klonierungsvektor	Amersham

pSp65	Klonierungsvektor	Promega
flk-1 p/e MCS	flk-1 Prom (-640/+299)/2,3 kbp Enhancer-multiple cloning site	A. Nicolaus
flk-1 p/e-HIFdn	flk-1 Prom (-640/+299)/2,3 kbp Enhancer- dominant negatives HIF2 α	diese Arbeit
flk-1-Cre	flk-1 Prom (-640/+299)/2,3 kbp Enhancer- Cre Rekombinase	diese Arbeit
CMV-LacZ	CMV Prom- β -Galaktosidase	Andersson et al. (1989)
pGL2 Basic	Luziferase Reporter gen	Promega
flk-1- Prom-Luz	flk-1 Prom (-640/+299)- Luziferase Reporter gen	Rönicke et al. (1996)
VEGF Prom-Luz	VEGF Prom (-2848/-984)- Luziferase Reporter gen	Ikeda et al. (1995)
KDR Prom-Luz	KDR Prom (-763/+296)- Luziferase Reporter gen	diese Arbeit
KDR (-110/+296)	KDR Prom (-110/+296)- Luziferase Reporter gen	diese Arbeit
KDR (-110/+296// mutHBS)	KDR Prom (-110/+296//mutHBS)- Luziferase Reporter gen	diese Arbeit
KDR (-110/+69)	KDR Prom (-110/+69)- Luziferase Reporter gen	diese Arbeit
KDR (-110/+69// mutHBS)	KDR Prom (-110/+69//mutHBS)- Luziferase Reporter gen	diese Arbeit
iKDR	pGLbasic-KDR Prom (-252/+20)	Ingo Flamme
pCR2.1 KDR Prom	KDR Prom (-763/+390)	diese Arbeit
pCR2.1 KDR Intron	komplettes 1. Intron (4 kbp) des KDR Gens	diese Arbeit
flk-1-Prom-LacZ	flk-1 Prom (-640/+299)- LacZ	Kappel et al. (1999)
flkLacZ-KDR 4,0	flk-1 Prom (-640/+299)/ 4 kbp KDR 1. Intron- LacZ	diese Arbeit
flkLacZ-KDR 2,7	flk-1 Prom (-640/+299)/ KDR 1. Intron (+1744/+4438)- LacZ	diese Arbeit
flkLacZ-KDR 659	flk-1 Prom (-640/+299)/KDR 1. Intron (+3779/+4438)- LacZ	diese Arbeit
flkLacZ-KDR 523	flk-1 Prom (-640/+299)/ KDR 1. Intron (+3838/+4361)- LacZ	diese Arbeit
flkLacZ-KDR 336	flk-1 Prom (-640/+299)/ KDR 1. Intron (+1744/+2080)- LacZ	diese Arbeit
hets-1-LacZ-KDR 523	humaner ets-1 Prom (1,9 kbp)/ 523 bp KDR Intron- LacZ	diese Arbeit

2.3.3 Verwendete Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Oligonukleotid	Basensequenz (5'-3')	Verwendung
KDR +370 forw/ XhoI	CATACTCGAGGTAAGGAGCCCACTCTGGA	Klonierung, 4 kbp Intron
KDR Intr. rev/ XhoI	CATACTCGAGGCCTGGGCAGATCAAGAGAA	Klonierung, 2,7 und 4,0 kbp
KDR Intr. 2,7 forw/ XhoI	CATACTCGAGGCTGTAATTGGTGCCATCAAAT	Klonierung, 2,7 kbp
KDR Intr 659 bp forw/ BamHI	ATCGGATCCATGCATGTATGTGTGGAATTGG	Klonierung, 659 bp
KDR Intr. 659 bp rev/ BamHI	ATCGGATCCGCCTGGGCAGATCAAGAGAA	Klonierung 659 bp
KDR Intr. 523 bp forw/ BamHI	ATCGGATCCTAATGTACAGTCTTTATGAGCCA	Klonierung, 523 bp Enhancer
KDR Intr. 523 bp rev/ BamHI	ATCGGATCCGACCTAATAGGAAACACCTTC	Klonierung, 523 bp Enhancer
KDR Intr. 336 bp rev/ BamHI	AATGGATCCACTATTCTAGAGACACGTTTACA	Klonierung, 336 bp
KDR Intr. 336 bp forw/ BamHI	ATTGGATCCGCTGTAATTGGTGCCATCAAAT	Klonierung, 336 bp
KDR Intr. 912 forw	TGTAAACGTGTCTCTAGAATAGT	Sequenzierung
KDR Intr. 912 rev	TAAGTTACTGACATAACTGGTCA	Sequenzierung
KDR Intr. 860 forw	TGATATTGACCAGTTATGTCAGT	Sequenzierung
KDR Intr. 860 rev	CCAATTCCACACATACATGCAT	Sequenzierung
KDR Intr. 72346 rev	ATTTGATGGCACCAATTACAGC	Sequenzierung
KDR Intr. 71630 forw	GTAAAGCATTGCACATCTTTCA	Sequenzierung
KDR Intr. 71651 rev	TGAAAGATGTGCAATGCTTTAC	Sequenzierung
KDR Prom forw	CTAAGGATATCTTGGCTGGAAG (-763)	Klonierung
KDR Prom rev	TCCAGAGTGGGCTCCTTAC (+390)	Klonierung
KDR prom (+69) rev /XhoI	AATCTCGAGTTTCTGCGGCGCGCCAAGTGAT	Deletion, KDR Prom 5' Region
pGL1 forw	TGTATCTTATGGTACTGTAAGTGT	Deletion, KDR Prom 5' Region
mutHBS2 forw	GGTGAGGGGGCGGGGCTGGGTCTCTGGGAGAG CCCCCTCCTCC	Mutagenese

mutHBS2 rev	GGAGGAGGGGGCTCTCCAGAGACCCAGCCC CGCCCCTCACC	Mutagenese
LacZ forw	CCGTCACGAGCATCATCCTC	Genotypisierung
LacZ rev	GACGAAACGCCTGCCAGTATTTAG	Genotypisierung
hHey1 forw	GGAGAGGCGCCGCTGTAGTTA	RT-PCR
hHey1 rev	CAGGGCGTGCGCGTCAAAGTA	RT-PCR
hHey2 forw	ATGAAGCGCCCCTGCGAGGA	RT-PCR
hHey2 rev	CAGGAATTCCACGGAGCTCA	RT-PCR
HIFdn forw3	CCACAGCATGGACATGAAGTT	RT-PCR/ Genotypisierung
HIFdn forw4	AGCATCTTTGACTTCACTCATC	RT-PCR/ Genotypisierung
FLAG F rev	CTTATCGTCGTCGTCCTTTGTA	RT-PCR/ Genotypisierung
FLAG F2 rev	CTTATCGTCGTCGTCCTTTGTAATCGA	RT-PCR/ Genotypisierung
AG2 forw	CTGCTAACCATGTTTCATGCC	Rekombina- tionsnachweis
Z3 rev	GGCCTCTTCGCTATTACG	Rekombina- tionsnachweis
tie1 forw	CTCACTGCCCTCCTGACTGG	RT-PCR
tie1 rev	CGATGTACTTGGATATAGGC	RT-PCR
ang-1 forw	CCCTCTGGTGAATATTGGCTC	RT-PCR
ang-1 rev	TGGTGGAACGTAAGGAGTAAC	RT-PCR
ang-2 forw	CAGTGTGGACTTCCAGAGGAC	RT-PCR
ang-2 rev	TGTGGGTAGTACTGTCCATTC	RT-PCR
PIGF forw	GTCGCTGTAGTGGCTGCTGTGGTG	RT-PCR
PIGF rev	CCGTGGCTGGCTTCTTTCTTTCTC	RT-PCR
VEGF forw	CTGCTCTCTT GGGTGCCTGG	RT-PCR
VEGF rev	CACCGCCTTG GCTTGTCACAT	RT-PCR
flk-1 forw	AGAACACCAAAGAGAGGAACG	RT-PCR
flk-1 rev	GCACACAGGCAGAAACCAGTAG	RT-PCR
GAPDH forw	CAGTATGACTCCACTCACGGC	RT-PCR
GAPDH rev	GAGGGGCCATCCACAGTCTTC	RT-PCR
ve-cadherin forw	TTTGCCAGCCCTACGAACCT	RT-PCR
ve-cadherin rev	ACCGCCGTCATTGTCTGCCTC	RT-PCR
flt-1 forw	TTTGACAAGGTCTACAGCACC	RT-PCR
flt-1 rev	CCTCGGCAGATCGGAAAGTCC	RT-PCR
tie-2 forw	CCACTACCTACTAGTGAAGAA	RT-PCR
tie-2 rev	ATGCCCTTCTCCACCCTCTCC	RT-PCR

Pecam-1 forw	GTCATGGCCATGGTCGAGTA	RT-PCR
Pecam-1 rev	CTCCTCGGCATCTTGCTGAA	RT-PCR
β -Aktin forw	GAAACTACCTTCAACTCCATC	RT-PCR
β -Aktin rev	CGAGGCCAGGATGGAGCCGCC	RT-PCR

2.3.4 Verwendete Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien wurde zur Vermehrung rekombinanter DNA in Form von Plasmid-Vektoren eingesetzt. Dabei wurden folgende *E. coli* Bakterienstämme verwendet:

- DH5 α supE44, hsdR17, recA1, Δ lacU169, ϕ 80lacZDM15, endA1, gyrA96, thi-1, relA1
- XL1-Blue recA, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44 relA1 lac (F' proAB, lacI^qZ Δ M15, Tn10 (Tet^r))
- INVaF' F' endA1, recA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, gyrA96, relA1, ϕ 80lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169 λ -

2.3.5 Lagerung und Vermehrung von Bakterien

Zur Vermehrung der Bakterien wurde eine einzelne Kolonie von einer LB-Agar-Platte in ein Volumen von 2-3 ml LB-Medium überimpft und in einem Bakterienrüttler mit 240 rpm bei 37°C für 8-12 Stunden inkubiert. Zum weiteren Wachstum wurde die Vorkultur in einen Erlenmeyer-Kolben mit dem gewünschten Volumen LB-Medium überführt und über Nacht auf die gleiche Weise inkubiert.

Zur Langzeitlagerung von Bakterienstämmen und transformierten Bakterien wurden nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase 750 μ l der Kultur mit 750 μ l einer sterilen Glycerollösung versetzt, auf Eis gekühlt und bei -80°C eingefroren. Zur erneuten Kultivierung wurden Teile der tiefgefrorenen Kultur mit einer Impföse von der Oberfläche abgeschabt und auf eine LB-Agar-Platte ausgestrichen.

Glyzerollösung: 40% (v/v) Glyzerol
 0,1 M (w/v) CaCl₂
 0,1 M (w/v) MgCl₂

2.3.6 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurde eine DH5 α Übernachtskultur in LB-Medium angeimpft, aus der am nächsten Morgen 1 ml auf 100 ml vorgewärmtes 2 x LB-Medium gegeben und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 im Bakterenschüttler inkubiert wurde. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien bei 2500 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Das Sediment wurde vorsichtig in 7,5 ml TSB-Lösung resuspendiert und die Suspension eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien entweder sofort für eine Plasmidtransformation verwendet oder aliquotiert, auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

TSB-Lösung: 5% (v/v) DMSO
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄
 10% (w/v) PEG 6000
 in 2 x LB-Medium

2 x LB-Medium: 20 g Trypton
 10 g Hefeextrakt
 20 g NaCl
 mit H₂O auf 1 l auffüllen
 den pH-Wert auf 7,0 einstellen und autoklavieren

2.3.7 Chemische Transformation von Bakterien

Die DNA wurde mit 20 μ l 5x KCM versetzt, mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 μ l gebracht und auf Eis abgekühlt. Die bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien (siehe 2.3.6) wurden auf Eis aufgetaut, mit der vorgekühlten DNA-Lösung gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die nachfolgende Inkubation in antibiotikafreiem LB-Medium für 30 min bei 37°C ermöglichte den transformierten Bakterien die Expression des Antibiotikum-Resistenzgens. Danach wurden die Bakterien auf einer LB-Agar Platte ausgestrichen, die zur Selektion Ampizillin enthielt.

5 x KCM-Puffer: 500 mM KCl
 150 mM CaCl₂
 250 mM MgCl₂

2.3.8 Plasmid-Präparation

Für die Präparation der Plasmide wurden generell die Puffer und Reaktionsprotokolle der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Eine Bakterienkolonie wurde von einer LB-Agarplatte in 2 ml LB-Medium überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkultur wurden für 10 min bei 4000 x g zentrifugiert, das Sediment in 0,5 ml Puffer 1 (4°C) resuspendiert und mit 0,5 ml Puffer 2 (Raumtemperatur) gemischt. Nach Zugabe von 0,5 ml Puffer 3 (4°C) und erneutem Durchmischen wurde die Lösung für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (Tischzentrifuge, RT, 20 min, 12000 rpm). Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 0,7 Volumenprozent Isopropanol präzipitiert. Nach 20 min Zentrifugation wurde das DNA-Präzipitat einmal mit 70% Ethanol gewaschen, in ddH₂O aufgenommen, und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 2.3.11). Für Transfektionen von

eukaryotischen Zellen erfolgte die DNA-Präparation nach den Plasmid-Midi- oder Maxi-Protokollen der Firma Qiagen (Hilden). Generell wurden für Plasmid-Präparationen 30-100 ml einer ü. N. Bakterienkultur eingesetzt. Die präparierte DNA wurde in ddH₂O aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

2.3.9 Reinigung von DNA

2.3.9.1 Alkoholfällung

Die Alkoholfällung diente der Konzentrierung von wässrigen DNA-Lösungen sowie der Entfernung von Salzen und Resten organischer Lösungsmittel. Hierzu wurde die DNA mit 0,6 Volumen Natriumacetat pH 5,2 und 2,0 Volumen Ethanol vermischt, für 1 Stunde bei -20°C inkubiert und für 15 min bei 13000 x g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde darauf mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in der gewünschten Menge 10 mM Tris pH 8,0 aufgenommen.

2.3.9.2 Kieselgel-Adsorptionschromatographie

Bei hohen Salzkonzentrationen adsorbieren Nukleinsäuren an eine stationäre Matrix aus Kieselsäure. Die Elution erfolgt durch einen Niedrigsalzpuffer. Auf diesem Prinzip beruhen die Qiaquick-Säulen (Qiagen, Hilden), die häufig zur Reinigung kleiner Mengen (bis zu 10 µg) DNA bis 10 kbp dienen. Die DNA wurde nach Angaben des Herstellers gereinigt und mit ddH₂O eluiert.

2.3.9.3 Gelelution

Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die gewünschten DNA-Fragmente aus Agarosegelen isoliert. Die Banden wurden auf dem UV-Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 10 kbp wurden dann mit dem Qiaquick-Gel-Extraction-Kit (Qiagen, Hilden) nach den Anweisungen des Herstellers isoliert (siehe 2.3.9.2).

2.3.9.4 DNA-Aufreinigung für Oozyten-Mikroinjektion

Mittels QiaexII (Qiagen, Hilden) wurden DNA Fragmente für Oozyten-Mikroinjektionen aufgereinigt. Die DNA Reinigung erfolgte nach Empfehlung des Herstellers mit den mitgelieferten Puffern (Qiagen, Hilden).

Es wurden je 25 μg des verwendeten Plasmids durch Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert. Die zu isolierenden DNA Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.3.10). Die DNA wurde aus den Gel ausgeschnitten und gewogen. Pro Gelvolumen wurden 3 Volumen Puffer QX1 und 2 Volumen H_2O , sowie 120 μl QiaexII Suspension pro 25 μg Ausgangsplasmid dazugegeben. Die Probe wurde für 10-15 min bei 50°C inkubiert und dabei mehrfach geschüttelt. Nach 30 sec Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13000 rpm) wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit 500 μl Puffer QX1 gewaschen. Danach wurde 30 sec zentrifugiert der Überstand verworfen und mit 500 μl Puffer PE resuspendiert. Der letzte Schritt wurde wiederholt. Das Sediment wurde 20 min luftgetrocknet, in 30 μl 10 mM Tris, pH 8,0 resuspendiert und für 5 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde für 1 min zentrifugiert, der DNA-haltige Überstand abgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

2.3.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in horizontalen Agarosegelen. Als Elektrophorese- und Agarosegelpuffer wurde grundsätzlich 1 x TBE verwendet. Der Agaroselösung wurde nach dem Erhitzen 3,5 μg Ethidiumbromid pro 100 ml zugesetzt. Generell wurden für DNA-Fragmente mit einer Größe von über 4 kbp Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,7% (w/v) und für DNA-Fragmente mit einer Größe von 100 bp bis 4 kbp Gele mit einer Agarosekonzentration von 1 bis 2% (w/v) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 10 V pro cm Elektrodenabstand durchgeführt, und als Größenstandard ein kommerziell erhältlicher 1 kbp Marker der

Firma Gibco BRL (Eggenstein) eingesetzt. Die im Gel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

2.3.11 Bestimmen der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch durch Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge. Erstere gibt den Gehalt an Nukleinsäuren (aromatische Ringe von Purinen und Pyrimidinen) in der Lösung an, letztere misst den Proteinanteil (aromatische Ringe der Seitenketten). Somit ist der Quotient aus der Absorption bei diesen Wellenlängen ein Maß für die Reinheit der DNA-Präparation. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Nukleinsäure	OD $\lambda=260$ nm ($\mu\text{g/ml}$)
DNA, doppelsträngig	50
DNA, einzelsträngig	ca. 30
RNA	40

2.3.12 Restriktionanalyse von DNA

Für analytische Restriktionsansätze wurden 20 μl , für quantitative Restriktionsspaltungen 50 bis 100 μl Reaktionsvolumina eingesetzt. Die verwendeten Plasmidkonzentrationen wurden so gewählt, dass bei analytischen Restriktionsanalysen das gesuchte Fragment in einer Konzentration von mindestens 200 ng vorlag; bei quantitativen Restriktionsspaltungen mit anschließender Gelelektion betrug die Konzentration des benötigten Fragments mindestens 500 ng. Die Spaltung der DNA erfolgte durch 5-10 Einheiten Enzym für mindestens 1 h bei den vom Hersteller empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen. Bei Mehrfachspaltungen mit Enzymen, die unterschiedliche Pufferpräferenzen besaßen, wurde die DNA zwischen den einzelnen Spaltungen mit Ethanol gefällt (siehe 2.3.9.1). Ein Aliquot des

Restriktionsansatzes wurde mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.3.10) die Qualität der DNA-Spaltung überprüft.

2.3.13 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um die Effizienz intermolekularer Ligationen zu erhöhen, wurden die 5'-Phosphatreste von Vektor-DNA mit kompatiblen Enden entfernt. Hierzu wurde die DNA (etwa 5 μg) in einem Volumen von 30 μl mit 0,6 μl Shrimps Alkaline Phosphatase im mitgelieferten Reaktionspuffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reinigung erfolgte dann wie in Abschnitt 2.3.9.2 beschrieben.

2.3.14 Konversion von Überhängen in stumpfe Enden

Sollte nach der Restriktion eine Verknüpfung zwischen zwei DNA-Molekülen hergestellt werden, die nicht-kompatible Enden aufwiesen, wurden 5' Überhänge durch Inkubation mit dem Klenow-Fragment der bakteriellen DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte in Anwesenheit eines Desoxynukleosid-Triphosphat-Gemischs (Enkonzentration 50 μM aller 4 dNTPs) und 1-2 U Klenow-Fragment für 15 min bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde in dem Restriktionspuffer durchgeführt, der für die folgende Restriktion benötigt wurde.

2.3.15 Ligation

Für die Ligation wurden 50 ng Vektor-DNA sowie, bei einer Ligation von DNA-Fragmenten mit Basenüberhängen, ein fünfmaliger Überschuss an Insert-DNA eingesetzt. Bei der Ligation von DNA-Fragmenten ohne Basenüberhänge wurde ein zwanzigfacher Überschuss an Insert-DNA verwendet. Die Ligation erfolgte durch 1 Einheit T4-Ligase bei 15°C über Nacht in 20 μl ddH₂O, versetzt mit 2 μl 10 x Ligasepuffer.

2.3.16 Sequenzierung von DNA

(Sanger et al., 1977)

Die DNA-Sequenzierungen wurde durch nicht-radioaktive Markierung mit dem automatischen Sequenzierapparat 373A (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden im Max-Planck-Institut Bad Nauheim als Serviceleistung nach den Protokollen der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt.

2.3.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Saiki et al., 1988)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basiert auf der exponentiellen Amplifikation von DNA-Molekülen mittels spezifischer Oligonukleotide und einer thermostabilen DNA-Polymerase in Anwesenheit von Desoxyribonukleosid-Triphosphaten. Hierbei wird der Matrizen-DNA-Doppelstrang zusammen mit den spezifischen Oligonukleotiden bei 95°C denaturiert und dann auf eine Temperatur abgekühlt, die unterhalb der Schmelztemperatur der Oligonukleotide liegt. Bei diesem Schritt können die Oligonukleotide mit dem komplementären Sequenzen der nun einzelsträngigen DNA hybridisieren. Als nächster Schritt folgt eine Inkubation bei 72°C, was der thermostabilen DNA-Polymerase die Synthese der zur Matrize komplementären DNA-Sequenzen ermöglicht. Diese Temperaturabfolge wird mehrfach wiederholt und führt bei jedem Zyklus zu einer Verdopplung der vorliegenden DNA-Moleküle.

Die PCR wurde in 20 μl Ansätzen durchgeführt. Dabei wurde 1 μl der DNA-Probe in ein 200 μl PCR-Reaktionsgefäß mit 19 μl des Reaktionsgemisch (2,0 μl 10 x PCR-Puffer (Promega); 1,2 μl 25 mM MgCl_2 (Promega); 0,8 μl 5 mM dNTPs (MBI Fermentas); je 0,25 μl Oligonukleotide (100 μM) 1+2; 0,2 μl Taq-Polymerase (Promega); Wasser *ad* 19 μl) gemischt. Die PCR wurde durchgeführt und anschließend der Reaktionsansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.3.10) analysiert.

Genotypisierung/ RT-PCR: Cre

1x 5 min 94°C
35x 1 min 94°C
1 min 67°C
1 min 72°C
1x 5 min 72°C

Genotypisierung: LacZ

1x 4 min 94°C
35x 30 sec 94°C
45 sec 60°C
45 sec 72°C
1x 4 min 72°C

Genotypisierung/RT-PCR: HIFdn

1x 5 min 94°C
35x 1 min 94°C
1 min 56°C
1 min 72°C
1x 5 min 72°C

2.3.18 DNA-Mutagenese mittels PCR

Mittels ortsgerichteter Mutagenese ist es möglich, bestimmte Basenpaare in einer Nukleotidsequenz gezielt auszutauschen. In dieser Arbeit wurde dafür das QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verwendet und dabei gemäß den Angaben des Herstellers verfahren. Es wurden zwei Oligonukleotide (mutHBS2 forw und rev) verwendet, die im KDR Promotor (-110/+296)-Luziferase

Plasmid an der Stelle hybridisierten, wo die Mutation erzeugt werden sollte. Durch eine PCR wurde das mutierte Plasmid amplifiziert. Danach wurde das Amplifikat mit dem Restriktionsenzym DpnI für 1 h bei 37°C inkubiert, wobei selektiv das parentale Plasmid zerstört wurde. Das mutierte Plasmid wurde in kompetente *E. coli* Bakterien transformiert und aufgereinigt (siehe 2.3.8).

2.3.19 Analyse genomischer DNA mittels "Southern-Blot"

(Southern, 1975)

Die Identifizierung gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente ist durch eine DNA-DNA-Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde möglich. Hierzu wurden die DNA-Fragmente nach der Agarose-Gelelektrophorese mittels Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen und mit der jeweiligen radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert. Durch Autoradiographie konnte das gesuchte Fragment sichtbar gemacht und dessen Größe bestimmt werden.

2.3.19.1 Kapillartransfer von DNA auf Nylonmembranen

Die verdaut DNA wurde vollständig auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen und bei 5 V/cm Gellänge für 3 h elektrophoretisch getrennt. Danach wurde das Gel auf dem UV-Transilluminator mit einem Lineal photographiert, um später die Signale auf dem Röntgenfilm einer Position im Gel zuordnen zu können. Dann wurde das Gel für 15 min in 0,25 N HCl-Lösung in einer Wanne unter leichtem Schütteln inkubiert. Dieser Schritt diente der Depurinierung der DNA, was nachfolgend Strangbrüche bewirkte, die einen effektiven Transfer von DNA-Molekülen einer Länge von mehr als 5 kbp möglich machten. Die Absenkung des pH-Werts bei dieser Reaktion konnte am Farbumschlag des Bromphenolblaus des Probenpuffers beobachtet werden. Es folgte eine 30 min Inkubation in der Transferlösung (0,4 N NaOH). Dann wurde die Blotapparatur wie bei Ausubel et al. (1994) beschrieben aufgebaut. Nach einer Transferzeit von 12-18 h wurde die Blotapparatur wieder abgebaut, dabei wurden die Positionen der Auftragstaschen

des Gels mit Bleistift auf der Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham, Braunschweig) markiert. Die Membran wurde für 5 min in 2 x SSC auf dem Schüttler inkubiert, um sie zu neutralisieren und Gelreste zu entfernen. Dann wurde sie entweder an der Luft getrocknet und zwischen Whatman-Papieren aufbewahrt oder direkt für eine Hybridisierung eingesetzt (siehe 2.3.19.3).

2.3.19.2 Radioaktive Markierung von DNA

Zur Herstellung gleichmäßig markierter radioaktiver Sonden wurden rediprime II (Amersham, Braunschweig) Reagenzien verwendet. Hierzu wurden 30 ng des DNA-Sonden-Fragments mit TE-Puffer in einem Volumen von 45 μ l für 5 min auf 100°C erhitzt. Die denaturierte DNA wurde dann für 5 min auf Eis inkubiert. Die Zugabe von rediprime II-Reaktionsgemisch und 40 μ Ci (α^{32} P)-dCTP erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Nach einer 30 min Inkubation bei 37°C wurden die nicht eingebauten Nukleotide mit einer Probe Quant G-50 Säule (Amersham, Braunschweig) entfernt. Die Einbaurrate wurde durch Szintillationsmessung von 1 μ l des Eluats bestimmt.

2.3.19.3 DNA-DNA-Hybridisierung

Zur Hybridisierung der transferierten DNA wurde eine Hybond N⁺ Membran (Amersham, Braunschweig) für 1 Stunde mit 10 ml Prähybridisierungslösung in einer Glasröhre im Hybridisierungssofen bei 65°C inkubiert. Dann wurde die Prähybridisierungslösung abgegossen und durch 10 ml Hybridisierungslösung ersetzt. Letzterer wurden 1 x 10⁷ cpm der radioaktiv markierten Sonde zugesetzt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 65°C. Anschließend wurde zweimal 10 min mit Waschlösung I bei RT, einmal 30 min mit Waschlösung II bei 65°C und zweimal 10 min mit Waschlösung III bei 65°C gewaschen. Die autoradiographische Auswertung erfolgte mit dem Phosphoimager.

Prähybridisierungslösung:	2 x SSC 1% (w/v) SDS 0,5% (w/v) Magermilchpulver 50 μ l/10 ml t-RNA (50 mg/ml)
Hybridisierungslösung:	2 x SSC 1% (w/v) SDS 0,5% (w/v) Magermilchpulver 10% (w/v) Dextransulfat 50 μ l/10 ml t-RNA (50 mg/ml)
Waschlösung I:	2 x SSC 0,1% (w/v) SDS
Waschlösung II:	1 x SSC 0,1% (w/v) SDS
Waschlösung III:	0,1 x SSC 0,1% (w/v) SDS

2.3.20 Präparation und Analyse von RNA

2.3.20.1 Reinigung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde der RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Zellen wurden auf 35 mm-Schalen bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert. Danach wurden sie einmal mit PBS gewaschen und in 350 μ l Lysepuffer mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst. Die weitere

200 Einheiten SuperScriptII Reverse Transkriptase

(Gibco BRL, Eggenstein)

1 x RT Reaktionspuffer (Gibco BRL, Eggenstein)

2.3.20.4 Semiquantitative RT-PCR

Um die Menge einer bestimmten mRNA in einer Probe zu quantifizieren, wurde die Gesamt-RNA-Konzentration photometrisch (siehe 2.3.11) bestimmt und von jeder Probe die gleiche Menge RNA für die reverse Transkription eingesetzt. Zur zusätzlichen Kontrolle wurde parallel zur PCR-Amplifikation der zu untersuchenden cDNA ein PCR-Ansatz mit Oligonukleotiden für ein "Haushaltgen" durchgeführt. In diesem Falle wurden Oligonukleotide für GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) oder β -Aktin verwendet.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Durch das Detergenz SDS denaturieren die Proteine und erhalten eine negative Überschussladung mit konstantem Ladungs-Massenquotient, so dass die Auftrennung nach dem Molekulargewicht und unabhängig von der Aminosäurezusammensetzung ermöglicht wird. Das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol löst zusätzlich inter- und intramolekulare Disulfidbrücken. Die Elektrophorese erfolgte in Minigel-Apparaturen (Protean II, Biorad, München). Für Trenngele der Polyacrylamidkonzentration von 15% wurden 3,0 ml H₂O; 5,0 ml 30% PAA; 1,95 ml Trenngelpuffer, 40,0 μ l 10% APS und 6,0 μ l TEMED gemischt, zwischen die Glasplatten gegossen und mit H₂O überschichtet. Nach Polymerisation des

Trenngels wurde das Wasser entfernt, ein Probenaschenkamm in die Gelkammer eingesetzt und das Sammelgel, bestehend aus 3,45 ml H₂O; 0,85 ml PAA; 0,65 ml Sammelgelpuffer; 40,0 μ l 10% APS und 6,0 μ l TEMED, gegossen. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde das Pufferreservoir mit Elektrodenpuffer gefüllt, der Kamm gezogen und die Probenaschen ausgespült. Die Proteinproben wurden mit 2x bzw. 4x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte mit 20 mA/Gel für 2 h bei Raumtemperatur. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein definiertes, vorgefärbtes Proteingemisch (low range, BioRad, München) mit aufgetrennt.

Probenpuffer (2 x, reduzierend):	100 mM Tris-HCl 100 mM SDS 16 mM DTT 15% (v/v) Glyzerin 0,05 (w/v) Bromphenolblau
Sammelgelpuffer:	1 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
Trenngelpuffer:	2 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
Elektrodenpuffer:	25 mM Tris-HCl pH 8,6 190 mM Glyzin 0,1% (w/v) SDS
PAA-Stammlösung:	30 % (w/v) Polyacrylamid 0,8% (w/v) Bisacrylamid

2.4.2 Immobilisierung von Proteinen

Nach SDS-PAGE wurden die Proteine mit einem als Semidry-Blot bezeichneten Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,2 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Hierzu wurden ein Membranfilter und sechs Whatman 3MM Filter (Schleicher & Schuell, Dassel) auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und in Semi-Dry-Blotting-Puffer getränkt. Zwischen zwei Graphitelektroden wurden beginnend auf der Anodenseite der Blotapparatur 3 x Whatman-Papier, die Nitrozellulose-Membran, das Proteingel und nochmals 3 x Whatman-Papier luftblasenfrei aufeinander gelegt. Der Transfer erfolgte für 90 min bei 2,5 mA/cm².

Blotpuffer: 48 mM Tris-HCl pH 8,3
 39 mM Glycin
 0,038% (w/v) SDS
 20% (v/v) Methanol

PBST: 1x PBS
 0,1% (v/v) Tween20

2.4.3 Immunochemische Detektion immobilisierter Proteine

Unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran wurden durch Inkubation in 5% (w/v) Magermilchpulver/ PBS unter Schütteln über Nacht bei 4°C abgesättigt. Anschließend wurde die Membran einmal kurz in PBS gewaschen. Der anti-FLAG M2 Antikörper (Sigma, St. Louis, USA) wurde in 1:1500 Verdünnung in 3% (w/v) BSA/ PBS angesetzt und für 1 h bei RT unter Schütteln mit der Membran inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch fünfmaliges Waschen mit PBST für je 10 min unter Schütteln entfernt. Die Membran wurde anschließend mit Peroxidase-gekoppeltem, Ziege-anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg) in einer

1:2000 Verdünnung in 3% (w/v) BSA/ PBS für 1-2 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal mit PBST gewaschen, danach folgte dreimaliges Waschen mit PBS, um das Detergenz vollständig zu entfernen. Die Detektion erfolgte mit dem "Enhanced chemiluminescence"-System (ECL, Amersham, Braunschweig) nach den Angaben des Herstellers. Durch die Peroxidase wird mit Hilfe von Wasserstoffperoxid eine Chemilumineszenz von Luminol ausgelöst. Die Lichtemission wurde durch Exposition der Nitrozellulose-Membran auf einem Röntgenfilm detektiert.

2.4.4 Herstellung von Proteinlysaten aus Embryonen

Embryonen wurden an Tag E13,5 präpariert, in PBS gewaschen und mit einem Skalpell zerkleinert. Das Gewebe wurde mit 650 μ l T-Per Lysepuffer (Pierce, Rockford, USA) versetzt, mit dem Ultra-Turrax homogenisiert und anschließend bei 4°C für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge). 30 μ l des Überstands wurden mit 10 μ l 4x reduzierendem Probenpuffer (Roth, Karlsruhe) versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.4.1).

2.5 Transgene Mäuse

(Palmiter et al., 1982; Hogan et al., 1994)

Durch Mikroinjektion kann linearisierte DNA in einen der Vorkerne einer befruchteten Mausoozyte gebracht werden und in das Genom an zufälligen Stellen integrieren. Wird die Oozyte anschließend in einen Eileiter einer pseudoschwangeren Maus transferiert, kann sich ein transgenes Tier entwickeln, das zu einem bestimmten Anteil aus Zellen besteht, welche die fremde DNA in ihrem Genom integriert haben. Durch Kreuzung kann das Transgen an Nachkommen weitergegeben werden, welche dann heterozygot für das Transgen sind.

2.5.1 Etablierung und Haltung

Zur Herstellung der transgenen Mäuse wurde das entsprechende Konstrukt angefertigt und das Injektionsfragment wie in 2.3.12 beschrieben aufgereinigt. Die Mikroinjektion der DNA und die Etablierung der transgenen F₀-Mäuse wurde als Serviceleistung von N. Rink und F. Müller-Holtkamp im Max-Planck-Institut Bad Nauheim durchgeführt.

Tiere der F₁-Generation des Hybridstamms C57Bl/6 x C3H/He wurden zur Gewinnung von befruchteten Oozyten herangezogen. Als pseudoträchtige Weibchen wurden CD1 Mäuse eingesetzt, die aus Verpaarungen mit vasktomierten CD1 Männchen gewonnen wurden. Die Erhaltung transgener Linien erfolgte durch Rückkreuzung mit Tieren des Stamms C57Bl/6. Die Tiere wurden in einem separaten Tierstall bei einer Raumtemperatur von 22°C und 55% Luftfeuchtigkeit gehalten. Der Tag-Nacht-Zyklus hatte eine Hell-Phase von 07.00 bis 19.00 Uhr.

2.5.2 Genotypisierung transgener Mäuse

Nach einer Mikroinjektion wurde untersucht, ob die geborenen Tiere das jeweilige Transgen ins Genom integriert hatten. Hierzu wurde die genomische DNA aus den Schwanzspitzen von 14 Tage alten Mäusen präpariert und mittels PCR analysiert. Jedes transgene Tier wurde als Gründer einer neuen Mauslinie betrachtet. Die Nachkommen dieser Linien wurden routinemäßig mit Hilfe der PCR auf ihre Transgenität hin überprüft. Dazu wurden Schwanzspitzen in 400 µl oder Dottersäcke von Embryonen in 100 µl PCR-Lysepuffer über Nacht bei 56°C schüttelnd inkubiert. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei 95°C, um die Proteinase K zu inaktivieren. Danach wurden die Proben für 3 min bei 13000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert und 1 µl des Überstandes für eine PCR eingesetzt (siehe 2.3.17).

PCR-Lysepuffer: 50 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
10 mM Tris-HCl, pH 8,3
0,45% (v/v) Nonidet-P40
0,45% (v/v) Tween 20
100 µg/ml Proteinase K (kurz vor Gebrauch zugesetzt)

2.5.3 Präparation von Mausembryonen

Für die Präparation von Embryonen eines bestimmten Stadiums der Embryonalentwicklung wurden die Elterntiere über mehrere Tage zusammen in einem Käfig gehalten und das Weibchen jeden Morgen auf einen Vaginalpfropf als Zeichen der erfolgten Befruchtung hin untersucht. Trat ein Vaginalpfropf auf, so wurde der Zeitpunkt als Tag 0,5 der Embryonalentwicklung angesehen. Zur Präparation der Embryonen wurden trächtige Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und der Bauchraum eröffnet. Dann wurde der Uterus entnommen und in eiskaltes PBS überführt. Die Embryonen wurden in PBS unter einem Stereomikroskop von allen embryonalen Membranen befreit. Der Dottersack wurde zur PCR-Analyse verwendet und die Embryonen entweder für die histologische Analyse in Tissue Tek (Sakura) bei -80°C eingefroren oder für die RNA-Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

2.5.4 Entnahme von Gewebe

Zur Präparation von Mausorganen oder Tumoren wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die Organe freipräpariert und kurz in eiskaltem PBS gewaschen. Für histologische Analysen wurden die Organe dann in Tissue Tek (Sakura) eingebettet und bei -80°C eingefroren. Für RNA-Präparationen wurden die Organe bzw. Tumore nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

2.5.5 LacZ-Färbung von Mausembryonen und ganzen Organen

Das Prinzip der Färbung beruht darauf, dass die in dieser Arbeit als Reporter gen verwendete β -Galaktosidase das synthetische Substrat X-Gal (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) zu einem blauen Farbstoff umsetzt. Die Embryonen oder Organe wurden je nach Größe für 60-120 min bei 4°C in Fixierlösung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden sie über Nacht bei 30°C in der Färbelösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Embryonen oder Organe durch eine jeweils 30 min Inkubation in einer Glycerolreihe (50%, 70% Glycerol) für die Photographie vorbereitet.

Fixierlösung: 2% (w/v) Paraformaldehyd
 5 mM EGTA
 2 mM MgCl₂
 in PBS

Färbelösung: 5 mM K₃Fe(CN)₆
 5 mM K₄Fe(CN)₆
 2 mM MgCl₂
 0,02% Nonidet P-40
 0,01% Natriumdesoxycholat
 0,1% (w/v) X-Gal/ Dimethylformamid
 (kurz vor Gebrauch zugeben)
 in PBS

2.5.6 Immunhistochemische Färbung ganzer Embryonen

Embryonen wurden am Tag 10,5 der Entwicklung präpariert, in kaltem PBS gewaschen und anschließend in 4% (w/v) Paraformaldehydlösung/ PBS fixiert (bei 4°C über Nacht). Die Embryonen wurden dreimal in PBS gewaschen und in einer steigenden

Methanolreihe jeweils für 15 min bei Raumtemperatur dehydriert (25, 50, 75, 100% Methanol). Zum Bleichen erfolgte eine Inkubation in 5% (v/v) H₂O₂ für 4 h, danach wurde in 100% Methanol gewaschen und die Embryonen durch die Methanolreihe rehydriert. Um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen erfolgte eine Blockierung in 3% (w/v) Magermilchpulver/ 0,1% (v/v) Triton X-100/ PBS (=PBSMT) für zweimal 1 h bei Raumtemperatur. Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Dazu wurde monoklonaler Ratte-anti-Pecam-1 Antikörper 1:10 in PBSMT verdünnt. Danach wurden die Embryonen fünfmal für je 1 h in PBSMT gewaschen, bevor sie mit dem Zweitantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Hierzu wurde biotinylierter Ziege-anti-Ratte IgG (Vector Laboratories, Burlingame, USA) 1:200 verwendet. Die Embryonen wurden fünfmal für 1 h gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C mit ABC Komplex (Vector Laboratories) inkubiert (1:50). Die Embryonen wurden fünfmal in PBSMT für 1 h gewaschen und dann in 0,2% (w/v) BSA/ 0,1% (v/v) Triton X-100 für 20 min inkubiert. Zur Farbentwicklung wurden sie für 15 min in AEC Peroxidase Substratlösung (Vector Laboratories) inkubiert. Die Reaktion wurde durch viermaliges Waschen für je 5 min in PBS gestoppt. Zur Nachfixierung erfolgte eine Inkubation in 2% (w/v) Paraformaldehyd/ 0,1% (v/v) Glutaraldehyd über Nacht bei 4°C. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Embryonen für je 1 h in 50% und 70% (v/v) Glycerollösung inkubiert. Darauf erfolgte die photographische Dokumentation.

2.5.7 Injektion etablierter Tumorzellen in transgene Mäuse

Adhärente BFS-1 Fibrosarkomzellen wurden nach Erreichen der Konfluenz mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml/ 75 cm² Kulturflasche Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, bis sich die Zellen von der Kulturschale ablösten. Die Zellen wurden in 5 ml Wachstumsmedium aufgenommen, durch Zentrifugation (250 x g, 5 min, RT) sedimentiert und in 10-20 ml frischem Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl/ ml durch Auszählen in einer Neubauer-Kammer bestimmt, die erforderliche

Menge der Zellsuspension entnommen und erneut sedimentiert. Die Zellen wurden danach in sterilem PBS aufgenommen und subkutan in Mäuse injiziert, nachdem die Tiere zuvor mit Forene (Abbott, Wiesbaden) narkotisiert worden waren. Es wurden $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen/ 50 μ l Injektionsvolumen eingesetzt, wobei jedem Tier zwei Injektionen nebeneinander verabreicht wurden. Sieben Tage nach Injektion der Tumorzellen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Danach wurden die Tumore präpariert und für spätere histologische Analyse in Tissue Tek (Sakura) überführt, in einem Trockeneis/Isopentan-Bad eingefroren und bei -80°C gelagert. Für spätere RNA Präparation wurde das Tumorgewebe sofort nach der Präparation in ein Reaktionsgefäß überführt, in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.6 Histologische Methoden

2.6.1 Paraffineinbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Embryonen wurden nach der *in toto* LacZ-Färbung (siehe 2.5.5) dreimal 20 min in PBS gewaschen und über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert (20 min 70%, je 10 min 85%, 95% und zweimal 100% Ethanol). Anschließend wurden die Embryonen dreimal 10 min in Roticlear (Roth, Karlsruhe) bei Raumtemperatur und daraufhin zweimal für 24 h bei 63°C in Paraffin inkubiert. Die Paraffineinbettung erfolgte mit Hilfe der Ausgießstation 710101 (Medax, Kiel). Nach Aushärtung der Paraffinblöckchen wurden von diesen mit dem Mikrotom HM350 (Microm, Walldorf) 6-12 μ m dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden über Nacht luftgetrocknet und anschließend für 15 min bei 60°C inkubiert. Danach wurden die Schnitte in Roticlear dreimal 10 min entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Nach 5 min Inkubation in Leitungswasser wurden die Schnitte für 1 min in 1% Neutralrot-Lösung (in 0,1 M Natriumacetat, pH 4,8) gefärbt. Danach wurden die Schnitte dreimal kurz in Leitungswasser gewaschen

und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (75%, 85%, 95% für je 20 sec, zweimal 5 min 100% Ethanol für je 5 min) dehydriert. Die Schnitte wurden dreimal 5 min in Roticlear inkubiert und dann mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

2.6.2 Anfertigung von Kryostat-Schnitten

Die bei -80 °C gelagerten, in Tissue Tek (Sakura) eingebetteten Gewebe wurden in der temperierten Kammer des Mikrotoms auf eine Temperatur von -20 °C gebracht. Es wurden Gefrierschnitte einer Dicke von 8-12 μm angefertigt und auf kommerziell erhältliche silanisierte Objektträger gebracht (SuperfrostPlus, Menzel, Braunschweig). Nachdem die Schnitte gut getrocknet waren, wurden sie in mit Kieselgelsäckchen (Merck/Fischer, Frankfurt) bestückten Einfrierboxen bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.3 Nachweis von Proteinen auf Gefrierschnitten

2.6.3.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wird zum spezifischen Nachweis von Proteinen auf Gewebeschnitten durch die Verwendung spezifischer Antikörper eingesetzt. Die Gefrierschnitte wurden zuerst 30-60 min bei Raumtemperatur aufgetaut, 10 min bei -20°C in Aceton fixiert und luftgetrocknet. Das Gewebe wurde anschließend mit einem Fettstift umrahmt, um ein Vermischen von Inkubationslösungen zu vermeiden. Die nachfolgenden Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden in PBS gewaschen, 15 min mit 10% (v/v) Ziegen Serum/ PBS zur Blockierung unspezifischer Bindungen und anschließend 1 h mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (in PBS) inkubiert. Zur Entfernung überschüssigen Antikörpers wurden die Schnitte dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Die Reaktion des biotinylierten Zweitantikörpers, des mit Peroxidase gekoppelten Avidin-Komplexes sowie die Färbung erfolgten mit Hilfe des Vectastain-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, USA) und des AEC-Substrat-Kits (Vector Laboratories) nach Angaben des

Herstellers. Nach Erreichen der gewünschten Färbungsintensität wurde die Reaktion durch Waschen der Schnitte mit Leitungswasser gestoppt. Danach erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin Gill Nr. 1 (Sigma, Deisenhofen). Die Schnitte wurden erneut mit Leitungswasser gewaschen und mit dem wässrigen Einbettmedium Aquatex (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

2.6.3.2 Nachweis des FLAG Epitops durch Immunhistochemie

Zum Nachweis des FLAG Peptids auf Gefrierschnitten von Mausembryonen wurde der monoklonale Maus-Antikörper M2 (Sigma, St. Louis, USA) verwendet. Um unspezifische Bindungen des Zweitantikörper auf Mausgewebe zu minimieren, wurde zur immunhistochemischen Färbung das Mouse-on-Mouse Kit (MOM, Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet.

Gefrierschnitte wurden aufgetaut, in Aceton fixiert und rehydriert (siehe 2.6.3.1). Sie wurden dann bei Raumtemperatur für 1 h mit MOM Blockierungslösung inkubiert. Die Schnitte wurden zweimal 5 min mit PBS gewaschen und dann für 5 min mit MOM-Diluent inkubiert. Danach wurde der Erstantikörper (1:500 in MOM Diluent) bei 4°C über Nacht auf die Schnitte gegeben. Am nächsten Tag wurde dreimal für 15 min in PBS gewaschen und anschließend der Zweitantikörper (biotinylierter anti-Maus IgG, 1:250 in MOM) für 20 min bei Raumtemperatur daraufgegeben. Die Schnitte wurden dreimal 15 min in PBS gewaschen und dann für 10 min mit dem ABC Komplex inkubiert (1:30 in PBS). Die Färbereaktion wurde mit dem AEC Peroxidase Kit (Vector Laboratories) durchgeführt.

2.6.3.3 LacZ-Färbung

Gefrierschnitte wurden luftgetrocknet (für 3 h bis über Nacht) oder bereits bei -20°C gelagerte Schnitte wurden ca. 1 h lang aufgetaut, bevor die LacZ-Färbung durchgeführt wurde. Die Schnitte wurden in 2% (w/v) Paraformaldehyd/ PBS für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal 5 min in PBS

gewaschen und bei 30°C im dunkeln über Nacht in der LacZ-Färbelösung (siehe 2.5.5) inkubiert. Danach wurden die Schnitte zweimal 5 min in PBS und einmal in Leitungswasser gewaschen und dann für 1 min in 1% Neutralrot-Lösung (in 0,1 M Natriumacetat, pH 4,8) gefärbt. Nach zweimaligem kurzen Waschen in Leitungswasser wurden die Schnitte in 75%, 85%, 95% für je 15 sec und zweimal 5 min in 100% Ethanol dehydriert. Darauf folgte eine zweimalige 10 min Inkubation in Roticlear (Roth, Karlsruhe), bevor die Schnitte in Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckelt wurden.

2.6.3.4 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Kryostatschnitte wurden 20 min aufgetaut und anschließend für 10 min in 10% (v/v) Formalinlösung/ PBS fixiert. Danach wurden die Schnitte in PBS gewaschen und für 1 h in 10% (v/v) Ziegen Serum/ PBS inkubiert. Beide Erstantikörper wurden gemeinsam in 10% (v/v) Ziegen Serum/ 0,2% (v/v) NP-40 verdünnt: monoklonaler Ratte anti-Flk-1 Hybridomüberstand 1:10 und polyklonaler Kaninchen anti-LacZ Antikörper (Europa Bioproducts, Cambridge, USA) 1:500. Die Erstantikörper wurden für 1 h auf die Schnitte gegeben, danach dreimal mit PBS gewaschen und für 30 min in 10% (v/v) Ziegen Serum/ PBS blockiert. Als Zweitantikörper wurden verwendet Ziege-anti-Ratte-Alexa488 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) und Ziege-anti-Kaninchen-Alexa594 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Die beiden Zweitantikörper wurden je 1:1000 in 10% (v/v) Ziegen Serum/ PBS verdünnt und die Schnitte anschließend mit diesem Gemisch für 1 h im dunkeln inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen und mit Mowiol eingedeckelt (siehe 2.6.5).

2.6.4 Hämatoxylin und Eosin-Färbung

Diese histologische Färbung basiert auf der Oxidation von Hämatoxylin zu dem blauen Farbstoff Hämatein, der in der Lage ist, mit Aluminiumionen positiv geladene Komplexe zu bilden, die ihrerseits mit basophilen Strukturen interagieren, etwa den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA im Zellkern. Azidophile Zell- und Gewebestrukturen wie das Zytoplasma oder Interzellulärsubstanzen werden rot gefärbt. Die aufgetauten Gefrierschnitte wurden für 1 min in PBS rehydriert und 2 min in Hämatoxylin Lösung Gill Nr.1 (Sigma, Deisenhofen) gefärbt. Während einer 10 min Inkubation unter fließendem Leitungswasser wurde überschüssiger Farbstoff entfernt. Das Zytoplasma wurde durch 1 min Inkubation mit Eosin Y-Lösung (Sigma, Deisenhofen) angefärbt und anschließend durch kurzes Eintauchen in 70% Ethanol differenziert. Dann wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (90%, 96%, 100%) entwässert, zweimal 8 min in Roticlear (Roth, Karlsruhe) inkubiert und abschließend in Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

2.6.5 Herstellung von Mowiol-Lösung

Mowiol wurde als Eindeckmedium für Fluoreszenzfärbungen verwendet, da es lichtempfindliche Fluoreszenzfarbstoffe konserviert, so dass Präparate über einen Zeitraum von etwa drei Monaten analysiert werden können. Zur Herstellung der Mowiol-Lösung wurden 6 g Glycerol mit 2,4 g Mowiol 4-88 (Merck, Darmstadt) und 6 ml H₂O auf einem Drehrad für 2 h gemischt. Danach wurden 12 ml 200 mM Tris pH 8,5 zugefügt und die Suspension für 30 min bei 50-60°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur schloss sich eine 15 min Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C an. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurde die Mowiol-Lösung bei 37°C aufgetaut und 10 mg/ml DABCO (Sigma, Deisenhofen) darin gelöst.

2.7 Zellkultur

2.7.1 Lösungen und Medien

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium: DMEM⁺ mit 4,5 g/l Glukose (Gibco BRL, Eggenstein)

RPMI 1640 (Gibco BRL, Eggenstein)

MCDB 131 (CC Pro, Neustadt)

Fötales Kälberserum (FCS) (CC Pro, Neustadt)

Penizillin/Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung (PAA, Cölbe)

Glutamin (200 mM) (PAA, Cölbe)

Trypsin (0,5 mg/ml)/EDTA (0,2 g/l)-Lösung (PAA,Cölbe)

Verwendete Medien:

Nr.	Basis	Serum	Glutamin	Pen/Strep
1	DMEM+	10% FCS	1%	1%
2	RPMI1640	10% FCS	2%	1%
3	MCDB131	8% FCS	2%	1%
4	MCDB131	10% FCS	1%	1%

2.7.2 Verwendete Zellen

Zellen/ Zelllinie	Beschreibung	Referenz	Medium
A293	Humane, embryonale Nierenepithelzellen, durch Adenovirus 5 DNA transformiert	Graham et al. (1977), ATTC CRL-1573	1
HUVEC	Primärkultur von Endothelzellen aus humaner Nabelschnurvene	Jaffe et al. (1973); Thornton et al., (1983)	4 + siehe 2.7.5
HUE	spontan immortalisierte humane Endothelzellen	ATCC	3
BFS-1	Durch Methylcholanthrene A Transformation hergestellte Maus-Fibrosarkomzellen	Hafner et al. (1996)	2

2.7.3 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen wurden in entsprechenden Wachstumsmedien in einer wassergesättigten Atmosphäre und 5-7% CO₂ bei 37°C kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen zweimal mit PBS, pH 7,4 gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro 75 cm² inkubiert, bis sie sich von der Gewebekulturflasche ablösten und vereinzeln. Die Zellen wurden anschließend in 10 ml Medium aufgenommen, durch Zentrifugation (250 x g, 5 min, RT) sedimentiert und in frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einer 1/3 bis 1/10 Verdünnung (je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen) in neue Gewebekulturflaschen ausgesät.

2.7.4 Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen

Die Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen erfolgte in der Gasphase über flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden die Zellen wie im vorigen Abschnitt beschrieben von der Gewebekulturflasche abgelöst und abzentrifugiert. Das Sediment wurde in Wachstumsmedium mit 8% (v/v) Dimethylsulfoxid (Merck, Darmstadt) und 42% (v/v) FCS resuspendiert, in Kryoröhrchen (Greiner, Solingen) überführt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Am nächsten Morgen wurden sie in einen Tank mit flüssigem Stickstoff eingelagert. Zur erneuten Kultivierung wurden die Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37°C möglichst schnell aufgetaut, die Zellsuspension in 10 ml vorgewärmtem Wachstumsmedium aufgenommen und für 5 min bei 250 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in einer 25 cm² Gewebekulturflasche ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium noch einmal gewechselt.

2.7.5 Isolation und Kultur von Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene (HUVEC)

(Jaffe et al., 1973; Thornton et al., 1983)

Für die Präparation der Endothelzellen wurden grundsätzlich sterile Lösungen und Instrumente sowie humane Nabelschnüre verwendet, die nach der Geburt maximal zwei Tage bei 4°C gelagert wurden. Die Nabelschnur wurde äußerlich mit PBS von Blutresten gereinigt und die Nabelschnurvene mit 50 ml PBS gespült (Knopfkanüle). Nach einer erneuten Spülung der Vene mit 5 bis 10 ml Kollagenase-Lösung wurde das untere Ende der Nabelschnur mit einer Aderklemme verschlossen, und die Vene mit Kollagenase-Lösung gefüllt, bis eine deutlich sichtbare Aderdehnung auftrat. Anschließend wurde auch das obere Ende der Vene mit einer Aderklemme verschlossen. Die mit Kollagenase-Lösung gefüllte Nabelschnur wurde für 20 min bei 37°C inkubiert, die Endothelzellen durch leichte Massage der Nabelschnur in Suspension gebracht und das Zellgemisch in ein Falcon-Reaktionsgefäß, welches 3 ml

FCS enthielt, überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 250 x g wurde das Zellsediment in 4 ml Wachstumsmedium resuspendiert und auf eine gelatinisierte Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 6 cm ausgesät (Passage 0). Eventuell kontaminierende Blutzellen wurden nach 2 Tagen durch Waschen des Zellrasens mit PBS entfernt.

Die Kultur der HUVEC erfolgte auf gelatinisierten Schalen in Wachstumsmedium bei 37°C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Nach Erreichen der Zellkonfluenz wurden die HUVEC mit 2x 5 ml PBS/ 75 cm² Kulturfläche gewaschen, in 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden bei 37°C abgelöst und in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die Endothelzellen wurden bei 250 x g durch Zentrifugation sedimentiert (5 min), erneut in Wachstumsmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1/3 (Zellen/ cm² Kulturfläche) auf gelatinisierte Zellkulturschalen ausgesät. In den in dieser Arbeit geschilderten Experimenten wurden HUVEC der Passagen 1 bis 4 verwendet.

Kollagenase-Lösung: 0,03% (w/v) Kollagenase in PBS (CLS3, 180 U/mg,
Chargen Nr. 43D684, PAN Systems, Aidenbach)
aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren

HUVEC-Medium: MCDB131 (CC Pro, Neustadt)
10% (v/v) FCS (PAA, Cölbe)
1% (v/v) Penizillin/Streptomycin (PAA, Cölbe)
1% (v/v) Amphotericin B (PAN Systems, Aidenbach)
2 mM Glutamin (PAA, Cölbe)
10 µg/ml Heparin (Sigma, St. Louis, USA)
1 Einheit "Endothelial Cell Growth Supplement"
(Promocell, Heidelberg)

2.7.6 Gelatinisierung von Zellkulturschalen

Der Boden der Zellkulturschale wurde mit 1% (w/v) Gelatinelösung bedeckt, und die Schale für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Gelatinelösung wurde abgesaugt und die beschichtete Schale sofort verwendet.

2.7.7 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Liposomen

Zur Transfektion von Zellen wurde das Superfect Reagenz (Qiagen, Hilden) nach Vorschriften des Herstellers verwendet. Dabei handelt es sich um positiv geladene Liposomen, die mit DNA Komplexe bilden. Werden Zellen mit diesen Komplexen inkubiert, kann die DNA von den Zellen aufgenommen werden. Entsprechend der Anzahl der zu transfizierenden Zellen, wurde eine bestimmte DNA Menge mit dem Superfect Reagenz und Medium (ohne Zusätze) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem DNA-Liposomen-Komplex für 2-3 h im Brutschrank bei 37°C und inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit neuem Wachstumsmedium für 24-48 h im Brutschrank belassen. Danach wurden weitere Experimente wie Immunfluoreszenzfärbung (siehe 2.7.10) oder Luziferase-Reporter-Gen-Analyse (siehe 2.7.8) durchgeführt.

2.7.8 Luziferase-Reporter-Gen-Analyse

Dabei wurden DNA Konstrukte verwendet, bei denen die Expression des Luziferase Reporter-Genes von verschiedenen Promotoren reguliert wurde. Durch Co-Expression von Transkriptionsfaktoren konnte deren Einfluss auf die Promotoraktivität untersucht werden. Die Expression des Reporter-Genes diente als Maß für die Aktivität der genregulatorischen Elemente, unter deren Kontrolle es exprimiert wurde. Da Transfektionseffizienzen gewöhnlich Schwankungen unterliegen, wurde zusammen mit dem Luziferase-Reporter-Konstrukt auch ein zweites Reporter-Gen-Konstrukt mit konstitutiv aktivem Promotor und dem *lacZ*-Gen (CMV-LacZ) transfiziert, dessen

Aktivität zur Normalisierung verwendet wurde. Für die vom Luziferase- sowie vom *lacZ*-Gen kodierten Enzyme gab es spezifische chemilumineszente Analysesysteme, die die Quantifizierung der Enzyme in Zellextrakten erlaubten. 24-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und für die luminometrische Analyse aufgearbeitet. Dabei wurde der Dual Light Kit (Tropix, Bedford, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Luziferase- und LacZ-Aktivitäten wurden nacheinander im Luminometer gemessen und der Quotient der erhaltenen relativen Licht-Einheiten (RLU) gebildet. Innerhalb eines Reporter-Experiments wurden die Werte in Triplikaten gemessen und der Mittelwert bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms InStat 2.01 (T-Test für unverbundene Stichproben).

In einem typischen Experiment wurden je 1 μg Luziferase Reporterplasmid, 0,5 μg β -Galaktosidase Reporter und je 1 μg Expressionsplasmide von Transkriptionsfaktoren co-transfiziert. Es wurde pcDNA3 Vektor co-transfiziert, um in jedem Ansatz identische DNA Mengen zu erhalten. Die DNA wurde mit 100 μl Medium (ohne Serum oder Zusätze) und 10 μl Superfect (Qiagen, Hilden) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mixtur wurde dann auf ca. 70% konfluente A293 oder HUE Zellen in 6-Loch-Kulturplatten gegeben und für 3 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Wachstumsmedium weiter kultiviert. 24-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Lyse-Puffer geerntet (Dual Light Kit), 10 min bei 11000 rpm sedimentiert (Tischzentrifuge) und 5 μl des Überstandes für die luminometrische Messung von Luziferase- und β -Galaktosidase-Aktivität eingesetzt. Jedes Experiment wurde mindestens dreifach durchgeführt.

2.7.9 Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität in transfizierten Zellen

Der Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität in transfizierten Zellen diente in dieser Arbeit zur Kontrolle der Expression verschiedener LacZ-Reportergenkonstrukte *in vitro*. Dazu wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion für 10 min bei

Raumtemperatur in 1% (v/v) Glutaraldehyd/ PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit Färbelösung für 90 min bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen der Färbelösung wurde die Farbentwicklung durch Waschen der Zellen mit 20 mM EDTA/ PBS gestoppt.

Färbelösung: 3 mM $K_3Fe(CN)_6$
 3 mM $K_4Fe(CN)_6$
 1 mM $MgCl_2$
 0,1% Triton X100
 0,5% (w/v) X-Gal (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)/
 Dimethylformamid
 in 0,1 M Natriumphosphatpuffer/10 mM KCl pH 7,5

2.7.10 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Sterile Deckgläser (22 mm x 22 mm) wurden auf den Boden von 6-Loch Kulturplatten gelegt und darauf HUE Zellen ausgesät. Die Zellen wurden transient transfiziert (siehe 2.7.7) und danach 24-48 h weiter kultiviert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 20 min bei Raumtemperatur mit 3% (w/v) Paraformaldehydlösung fixiert. Die Zellen wurden zweimal 5 min in PBS gewaschen, zur Permeabilisierung für 10 min mit 0,2% (v/v) Triton X-100/ PBS inkubiert und erneut zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Es folgte eine 20 min Inkubation mit 3% (w/v) BSA-Lösung, bevor der 1. Antikörper auf die Zellen gegeben wurde. Der anti-FLAG M2 Antikörper (Sigma, St. Louis, USA) wurde 1:500 in 0,5% (w/v) BSA/ 0,5% (v/v) Tween20/ PBS verdünnt und die Zellen damit für 90 min inkubiert. Dann wurde dreimal mit PBS gewaschen und als Zweitantikörper der Ziege-anti-Maus-Alexa594 Antikörper (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in einer Verdünnung von 1:2000 für 1 h im dunkeln auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit Hoechst 33258 (Sigma, Deisenhofen) inkubiert (1:2000), um die Zellkerne zu

färben. Nach dreimal Waschen mit PBS wurden die Deckgläser kurz in ddH₂O eingetaucht und mit Mowiol auf einen Objektträger eingedeckelt (siehe 2.6.5). Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung und Charakterisierung von *flk-1*-Cre transgenen Mauslinien

3.1.1 Generierung von *flk-1*-Cre transgenen Mäusen

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe wurde die Genregulation des murinen VEGF Rezeptor-2 (*flk-1*) untersucht. Es konnten regulatorische Regionen des Gens identifiziert werden, die eine endothelspezifische Expression des Reportergens *lacZ* in transgenen Mäusen steuerten (Kappel et al., 1999). Diese Sequenzen bestanden aus dem *flk-1* Promotor (-640/+299) und einem 2,3 kbp Fragment am 3' Ende des 1. Introns des *flk-1* Gens. Diese genregulatorischen Elemente des *flk-1* Gens wurden eingesetzt, um die Cre Rekombinase spezifisch in Endothelzellen von transgenen Mäusen zu exprimieren. Die Rekombinationsaktivität des Transgens sollte durch Einkreuzen von Reporter-mäusen charakterisiert werden.

Ausgehend von dem *flk-1* Promotor/Enhancer (p/e)-LacZ Konstrukt (Kappel et al., 1999) wurde ein neuer Vektor generiert, in dem die Expression der Cre Rekombinase von den genregulatorischen Elementen des *flk-1* Gens gesteuert wurde. Ein 1,4 kbp DNA Fragment, das für die Cre Rekombinase kodierte, wurde durch Sall Restriktionsverdau aus dem pSLNE4c Vektor ausgeschnitten (Betz et al., 1996) und mit dem Sp65 Vektor (Promega) ligiert. Aus diesem wurde die *cre* Sequenz mittels SacI und PstI Verdau ausgeschnitten und in den pSL1190 Vektor (Amersham) eingesetzt. Aus diesem Vektor wurde das *cre* Gen durch EcoRI und HindIII Restriktionsverdau ausgeschnitten und mit dem *flk-1* p/e-LacZ ligiert, aus dem zuvor das *lacZ* Gen durch EcoRI und HindIII Restriktionsverdau ausgeschnitten wurde. Das resultierende Konstrukt wurde mit EcoRI und NotI verdaut, um Reste des pSL1190 Vektors zu eliminieren. Die 5' überhängenden Nukleotide an den Schnittstellen der Restriktionsenzyme wurden mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt und

die so entstandenen stumpfen Enden religiert. Diese Plasmid-DNA wurde durch KpnI Verdau linearisiert und für die Oozyten-Mikroinjektion aufgereinigt. Eine schematische Darstellung des DNA-Konstrukts ist in Abbildung 3.1.1 A gezeigt. Die gereinigte DNA wurde in befruchtete Mauseizellen injiziert und diese in den Uterus von CD1 Ammenweibchen transplantiert. Von den geborenen Mäusen wurde ein Schwanzspitzenbiopsie durchgeführt, daraus genomische DNA isoliert und mittels PCR und spezifischer Oligonukleotide untersucht, ob das *cre* Transgen ins Genom der betreffenden Maus integriert wurde. Hierbei wurden insgesamt 10 transgene Mäuse identifiziert, die als Gründer einer transgenen Mauslinie (F₀) angesehen wurden. Die Tabelle 1 zeigt einen Überblick der Gründertiere. Die Gründer wurden zur Zucht mit C57/Bl6 Wildtyp-Mäusen verpaart. Die resultierenden transgenen Mauslinien wurden nach der Inventarisierungsnummer der Gründer im Tierstall des Max-Planck-Institut Bad Nauheim benannt. Das Weibchen 13073 verstarb, ohne dass Nachkommen gezüchtet werden konnten, so dass im weiteren 9 verbleibende Mauslinien untersucht wurden.

Tabelle 1 Übersicht der generierten transgenen flk-1-Cre Mauslinien

Linie/ Gründer Nr.	Anzahl Würfe aus Verpaarung mit Reportermäusen	untersuchte Embryonen	Cre+LacZ Transgene	LacZ-Färbung positiv
12964 m	3	19	3	0
12965 m	2 (nur Gründer)	17	1	0
13073 w	0	0	-	-
15776 w	2	14	3	0
15780 w	transmut. nicht	0	-	-
15793 m	5	35	5	0
15959 m	1	10	1	0
15962 w	7	44	11	11
15964 m	9	57	13	13
15969 m	1	8	3	0

3.1.2 Charakterisierung der flk-1-Cre transgenen Mauslinien

Um die Aktivität der Cre Rekombinase zu testen, wurden Mäuse der einzelnen Linien mit sogenannten Reporter-mäusen gekreuzt. Diese transgenen Mäuse besaßen ein *lacZ* Reporter-gen, dessen Expression von einem ubiquitär aktiven Promotor gesteuert wurde. Die Expression wurde allerdings durch ein blockierendes DNA Fragment unterbunden, das von loxP Sequenzen flankiert war. Durch Cre-vermittelte Rekombination wurde das Fragment deletiert, so dass das *lacZ* Reporter-gen exprimiert wurde. Die LacZ-Expression sollte also in allen Zellen nachweisbar sein, in denen auch Cre Aktivität vorhanden war. Hier wurden zwei verschiedene Reporter-mauslinien verwendet, die beide auf dem beschriebenen Prinzip beruhen, zum einen die Linie Rosa26R (Soriano, 1999) und zum anderen die Linie CAG-CAT-LacZ (Akagi et al., 1997).

Durch Kreuzen von flk-1-Cre Mäusen mit den Reporter-mäusen wurden doppelt transgene Mäuse generiert. Aus Schwanzspitzen wurde genomische DNA isoliert und mittels PCR und spezifischer Oligonukleotide für *lacZ* das Reporter-gen nachgewiesen. Mittels LacZ-Färbung wurde die Expression des Reporter-gens in *lacZ+cre* doppelt transgenen Mäusen in verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung und in adulten Tieren bis zu einem Alter von 13 Monaten untersucht. Die Tabelle 1 zeigt, wie viele Mäuse aus Verpaarungen von flk-1-Cre Transgenen mit Reporter-mäusen untersucht wurden. Da flk-1-Cre und Reporter-mäuse das jeweilige Transgen heterozygot vererbten, waren nach den Vererbungssätzen von Mendel mit einer Wahrscheinlichkeit von jeweils $p=0,25$ flk-1-Cre, Reporter-mäuse, doppelt transgene und Wildtyp-Mäuse zu erwarten. Dies wurde auch so beobachtet, wie in Abb. 3.1.1 B an einem Beispiel verdeutlicht. Von den 9 Mäusen waren 3 doppelt transgen (Nr. 1, 2, 9), 3 waren Cre positiv (Nr. 3, 6, 7), 2 LacZ positiv (Nr. 4, 5) und eine Wildtyp (Nr. 8).

Von den 9 untersuchten Linien wurde nur in den doppelt transgenen Embryonen von zwei Linien das Reporter-gen mittels LacZ-Färbung nachgewiesen: in 15962 und 15964. In einer weiteren Linie wurde das Transgen nicht an die Nachkommen vererbt (Linie 15780). Die doppelt transgenen Embryonen der verbleibenden 6 Linien zeigten keine

LacZ-Färbung, d. h. sie exprimierten das Transgen nicht bzw. nur in geringem Maße, so dass keine Rekombination in Reportermausen stattfinden konnte. In den beiden Linien 15962 und 15964 wurde das Transgen mit der nach Mendel zu erwartenden Häufigkeit

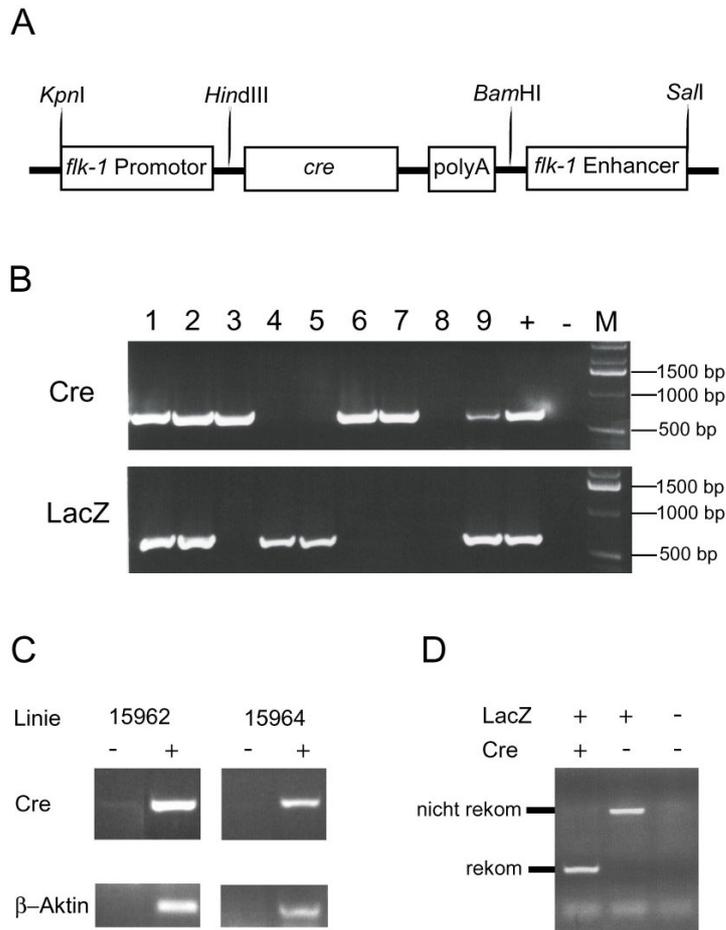


Abb. 3.1.1 Generierung *flk-1-Cre* transgener Mauslinien

A. Schematische Darstellung des DNA Konstruktes, mit dem transgene *flk-1-Cre* Mäuse generiert wurden. **B.** Zur Genotypisierung der Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzspitzen isoliert und PCRs mit spezifischen Oligonukleotiden für das *cre* oder *lacZ* Gen durchgeführt. M=Marker, +=pos. Kontrolle, -=neg. Kontrolle (H₂O). **C.** Reverse Transkriptase (RT)-PCR zum Nachweis der Cre-Expression in Linie 15962 und 15964. Mittels einer RT-Reaktion wurde die RNA in cDNA umgeschrieben (+) und diese für eine PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für das *cre* Gen bzw. β -Aktin eingesetzt. Eine Kontrollreaktion ohne RT wurde durchgeführt, um Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen (-). **D.** Untersuchung des Reporterallels in transgenen Mäusen. In CAG-CAT-LacZ Mäusen war das Signal des nicht rekombinierten Reporterallels detektierbar. In *flk-1-Cre/CAG-CAT-LacZ* Mäusen zeigte sich ein kleineres PCR Produkt, was aus der Rekombination des Reporterallels resultierte. In Wildtyp-Tieren zeigte sich kein Amplifikat (neg. Kontrolle).

von $p=0,5$ an die Nachkommen vererbt. Die Tiere zeigten zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung oder im adulten Organismus phänotypische Abnormalitäten im Vergleich zum Wildtyp. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die zufällige Integration des Transgens ins Genom der Gründer die Expression oder Funktion wichtiger Gene beeinträchtigte. Zum direkten Nachweis der Cre-Expression wurde aus Dottersackgewebe von flk-1-Cre Embryonen an Tag E13,5 RNA isoliert. Mittels Reverser Transkriptase (RT)-PCR und unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide für die *cre* Amplifikation wurde die *cre* cDNA sowohl in Linie 15962 als auch in Linie 15964 nachgewiesen (Abb. 3.1.1 C). Genomische DNA wurde aus Dottersäcken von flk-1-Cre/CAG-CAT-LacZ Embryonen an Tag E13,5 isoliert, um mittels PCR das rekombinierte Reporterallel nachzuweisen. Mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden, die flankierend der beiden loxP Sequenzen hybridisierten, konnte der transgene Locus in CAG-CAT-LacZ Reportermäusen mittels PCR amplifiziert werden. In flk-1-Cre/CAG-CAT-LacZ Mäusen wurde ein deutlich kleineres PCR Produkt detektiert, was aus dem rekombinierten Reporterallel resultierte. Im Wildtyp zeigte sich kein Amplifikat. Damit wurde gezeigt, dass durch Cre Aktivität eine Rekombination im Reporterallel von doppelt transgenen Mäusen stattgefunden hatte (Abb. 3.1.1 D).

Um die Cre Aktivität im Verlauf der Embryonalentwicklung genauer zu untersuchen, wurden flk-1-Cre/CAG-CAT-LacZ und flk-1-Cre/Rosa26R Embryonen zwischen Tag 9,5 und 16,5 der Embryonalentwicklung präpariert. Zur Genotypisierung wurde genomische DNA aus Dottersäcken isoliert und je eine PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für *cre* oder *lacZ* durchgeführt. Die Embryonen wurden fixiert und einer *in toto* LacZ-Färbung unterzogen. Nach der Kreuzung der beiden flk-1-Cre Linien 15962 und 15964 mit Reportermäusen ließ sich eine gefäßassoziierte Färbung der doppelt transgenen Embryonen nachweisen. Dabei wurde jedoch deutlich, dass es Unterschiede in den Reportermauslinien gab.

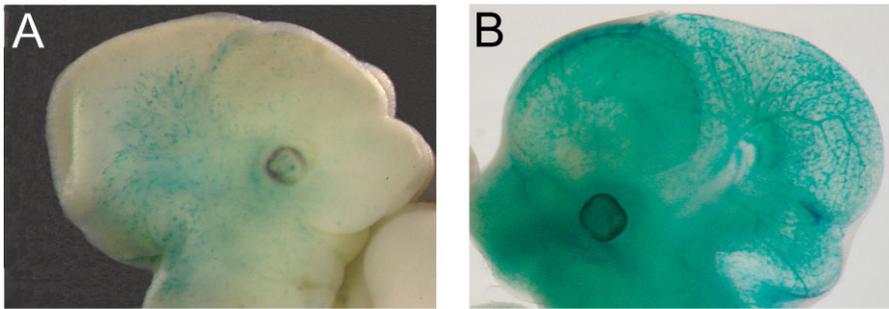


Abb. 3.1.2 Vergleich der Reportermauslinien CAG-CAT-LacZ und Rosa26R

A. und B. LacZ-Färbung transgener flk-1-Cre Embryonen der Linie 15964, die in CAG-CAT-LacZ oder Rosa26R Reportermause eingekreuzt wurden. **A.** Flk-1-Cre/CAG-CAT-LacZ transgener Embryo an E11,5. Es zeigte sich eine gefäßassoziierte Färbung, die aber unvollständig war. **B.** In flk-1-Cre/Rosa26R Embryonen war eine starke und komplette Färbung der Blutgefäße an Tag E11,5 detektierbar.

Die LacZ-Färbung in flk-1-Cre (15964)/CAG-CAT-LacZ Embryonen war zwar mit Blutgefäßen assoziiert, aber die Gefäße waren nur schwach und nicht vollständig angefärbt (Abb. 3.1.2 A). Dagegen zeigten flk-1-Cre (15964)/Rosa26R Embryonen an Tag E11,5 eine komplette LacZ-Färbung der Blutgefäße im Kopfbereich (Abb. 3.1.2 B). Die Rekombination des Reporterallels in flk-1-Cre/CAG-CAT-LacZ Embryonen trat offenbar nicht in allen Zellen mit Cre Aktivität auf. Daraus wurde geschlossen, dass die flk-1-Cre/Rosa26R einen sensitiveren Nachweis der Cre Aktivität ermöglichten. Daher wurden für die nachfolgenden morphologischen Analysen nur flk-1-Cre/Rosa26R Mäuse verwendet.

In beiden flk-1-Cre Linien wurden nach der Kreuzung mit Rosa26R Mäusen Gefäßstrukturen mittels LacZ-Färbung dargestellt. Die LacZ-Färbung von Rosa26R Embryonen diente als Kontrolle der Spezifität der Färbung, dabei wurden keine LacZ positiven Zellen detektiert (Abb. 3.1.3 A). An Tag E9,5 zeigten beide Linien im Kopfbereich und im oberen Rumpf LacZ-Aktivität in Gefäßen. Kaudal wurde die Färbung jedoch schwächer, so dass der distale Teil der Embryonen keine LacZ positiven Zellen zeigte (Abb. 3.1.3 B und Daten nicht gezeigt). In späteren Stadien der

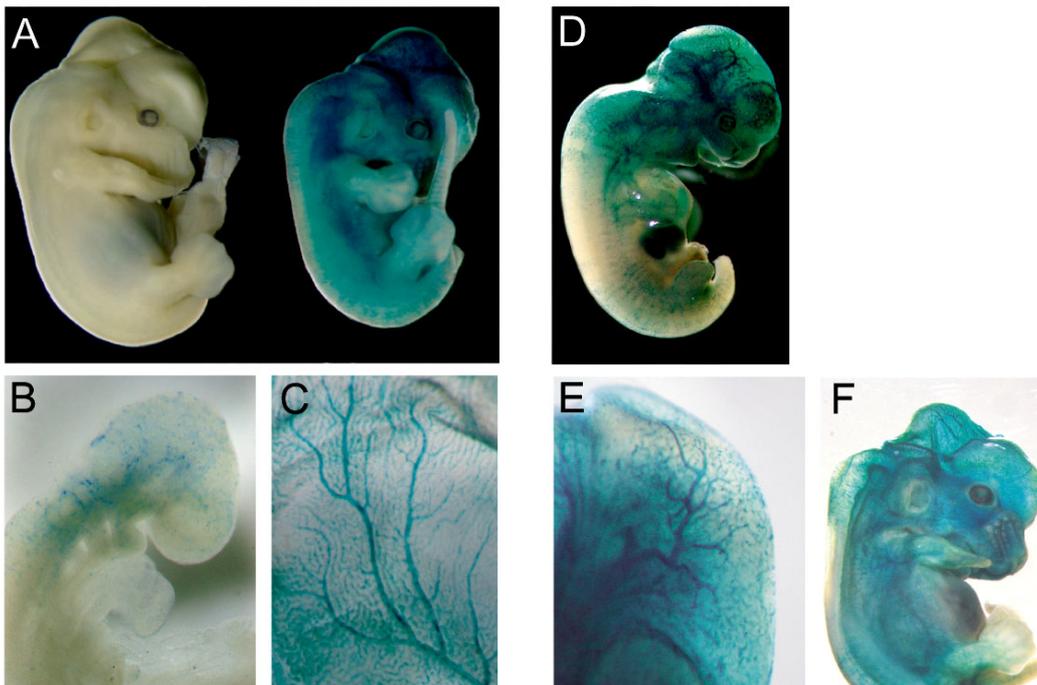


Abb. 3.1.3 *In toto* LacZ-Färbung von *flk-1-Cre/Rosa26R* Embryonen

A.-C. Linie 15962. **A.** An Tag E11,5 zeigte sich eine komplette Färbung der Blutgefäße in *flk-1-Cre/Rosa26R* Embryonen (rechts), während *Rosa26R* Embryonen keine LacZ positive Zellen aufwiesen (links). **B.** An Tag E9,5 war eine spezifische Färbung von Gefäßen im Kopf und oberen Rumpf detektierbar. **C.** Dottersäcke der *flk-1-Cre/Rosa26R* Embryonen an E16,5 zeigten eine spezifische LacZ-Expression in den Blutgefäße. D.-F. Linie 15964. **D.** An Tag E11,5 zeigten *flk-1-Cre/Rosa26R* Embryonen eine gefäßassoziierte Färbung im Kopfbereich, die aber nach kaudal abnahm. **E.** Vergrößerung des Kopfes an E11,5. Die *A. carotis int.* und Kapillargefäße waren LacZ positiv. **F.** An Tag E13,5 zeigten *flk-1-Cre/Rosa26R* Embryonen eine vollständige Färbung der Gefäße.

Embryonalentwicklung nahm die Färbung nach kaudal zu. An Tag E11,5 war eine komplette LacZ-Expression der Blutgefäße in Embryonen der Linie 15962 detektierbar (Abb. 3.1.3 A). Eine spezifische LacZ-Aktivität wurde auch in den Gefäßen des Dottersacks nachgewiesen (Abb. 3.1.3 C). Embryonen der Linie 15964 zeigten an Tag E11,5 LacZ positive Gefäße im Kopfbereich und Rumpf, die Färbung wurde nach kaudal jedoch schwächer (Abb. 3.1.3 D). Eine Vergrößerung des Kopfes zeigte die spezifische Färbung von Blutgefäßen, wie zum Beispiel die Verzweigungen der *A. carotis interna* (Abb. 3.1.3 E). Eine komplette vaskuläre LacZ-Färbung war erst an Tag

E13,5 sichtbar (Abb. 3.1.3 F). An späteren Zeitpunkten war kein Unterschied zwischen beiden Linien feststellbar.

Die gefärbten Embryonen wurden in Paraffin eingebettet und histologische Schnittpräparate hergestellt. Embryonen, die älter als Tag E13,5 waren, wurden sofort nach der Präparation in Tissue-Tek eingebettet und bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden Kryostat-Schnitte angefertigt und diese einer LacZ-Färbung unterzogen. Im Gehirn zeigte sich LacZ positive Zellen in den Gefäßen des perineuralen vaskulären Plexus (PNV) und in Gefäßen, die vom PNV in das Neuroektoderm einwanderten. Es wurden keine LacZ positiven Neuronen gefunden. Außerdem zeigte sich eine starke LacZ-Färbung der Kapillaren in der Haut (Abb. 3.1.4 A). Im Herz war das Endokard von Ventrikeln und Atria LacZ positiv, aber es wurde keine Färbung von Myozyten in der Ventrikelwand detektiert (Abb. 3.1.4 C). Gefäßendothel und Endothelzellen in den Sinusoiden der Leber waren LacZ positiv (Abb. 3.1.4 D), ebenso die Kapillarnetzwerke von Darm und Mesenterien (Abb. 3.1.4 E). Intersomitische Gefäße zeigten eine starke LacZ-Färbung (Abb. 3.1.4 F), während in der Lunge nur eine schwache Färbung des Kapillarnetzwerkes detektierbar war und keine Färbung im Bronchialepithel beobachtet wurde (Abb. 3.1.4 G). Während der Augenentwicklung bilden sich Gefäße um die Linse, die Tunica vasculosa lentis, und im Glaskörper die Hyaloideagefäße. Beide Gefäßstrukturen sowie der Gefäßplexus der Chorioidea waren stark LacZ positiv (Abb. 3.1.4 H). Im Blut und blutbildenden System wurden ebenfalls LacZ gefärbte Zellen gefunden. So war die Mehrzahl der zirkulierenden Blutzellen LacZ positiv (Abb. 3.1.4 B) und im Knochenmark wurden LacZ positive Zellen gefunden (Abb. 3.1.4 I). Um die Co-Lokalisation von Gefäßen und LacZ positiven Zellen zu untersuchen, wurden Gefrierschnitte von *flk-1-Cre/Rosa26R* Embryonen an Tag E16,5 hergestellt. Die Schnitte wurden einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen Flk-1 und LacZ unterzogen. Dabei wurden beispielsweise in der Haut und im Gehirn Flk-1 positive Gefäße detektiert (Abb. 3.1.5 A und D). Eine etwas schwächere

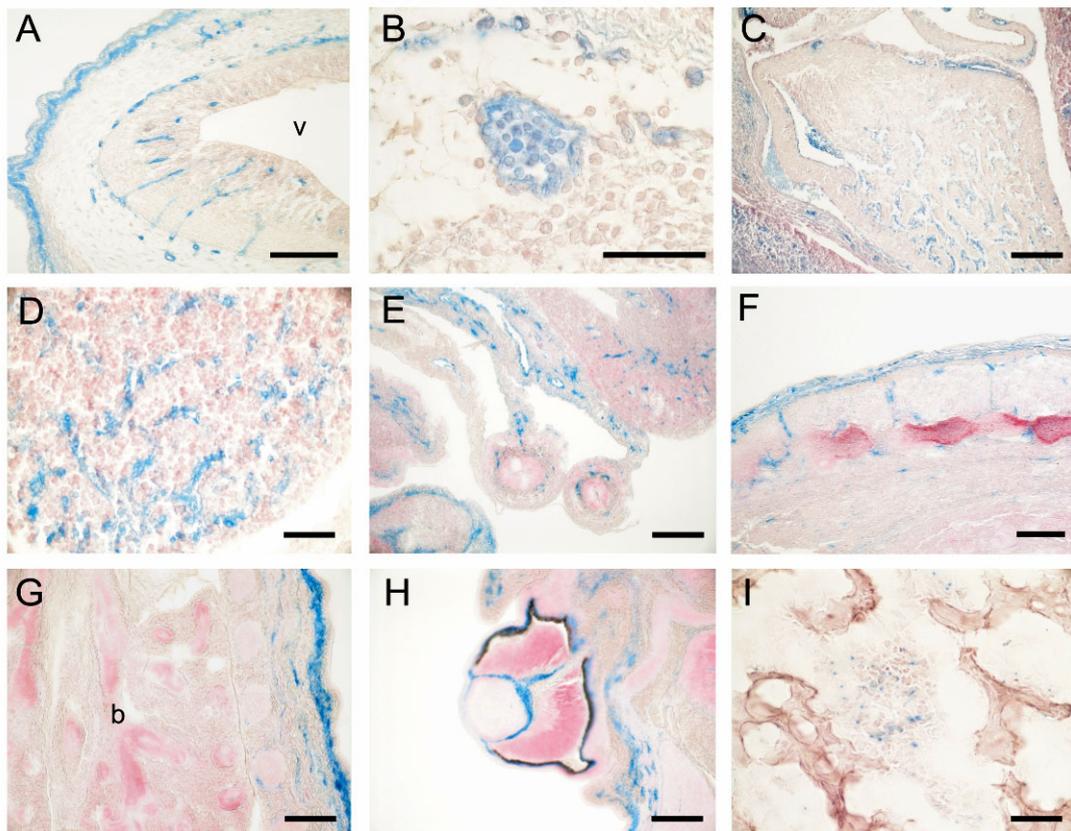


Abb. 3.1.4 Gewebeschnitte von flk-1-Cre/Rosa26R Embryonen

(Linie 15962, außer A = 15964), Paraffinschnitte, außer I = Kryostat-Schnitt

LacZ-Färbung von flk-1-Cre/Rosa26R Embryonen. **A.** LacZ positive Gefäße im perineuralen vaskulären Plexus und im Neuroektoderm. Die Kapillaren der Haut waren ebenfalls gefärbt. **B.** Endothelzellen der luminalen Gefäßwände und zirkulierende Blutzellen exprimierten LacZ. **C.** Im Herz war das Endokardium von Atria und Ventrikeln LacZ positiv. **D.** In der Leber exprimierten Endothelzellen LacZ. **E.** Im Darm und den Mesenterien wurden LacZ positive Blutgefäße detektiert. **F.** Die intersomitischen Gefäße zeigten starke LacZ-Expression. **G.** Die Lungenkapillaren zeigten eine kaum detektierbare LacZ-Färbung. **H.** Blutgefäße im Auge zeigten ein starkes LacZ Signal. **I.** LacZ positive Zellen wurden im Knochenmark detektiert. A-D: E11,5, E-H: E13,5, I: E16,5 v= Gehirnventrikel, b= Bronchus

Balken: 200µm in G, 100µm in A, C, E, F, H, 50µm in B, D, I

Intensität zeigte sich bei der LacZ-Färbung (Abb. 3.1.5 B und E), die Überlagerung beider Färbungen zeigte jedoch eine Co-Lokalisation der Flk-1 und LacZ Signale (Abb. 3.1.5 C und F), so dass hier die Spezifität der Cre Aktivität bestätigt wurde. Dies traf für alle untersuchten Organsysteme mit Ausnahme der Lunge zu. In der Lunge wurde ein dichtes Kapillarnetzwerk mittels Flk-1 Reaktivität dargestellt (Abb. 3.1.5 G). In der

LacZ-Färbung war nur eine sehr schwache diffuse Färbung zu sehen (Abb. 3.1.5 H) und in der Überlagerung von Flk-1 und LacZ zeigte sich keine Co-Expression (Abb. 3.1.5 I). Somit wurde in den Gefäßen der Lunge keine nennenswerte Cre Aktivität beobachtet.

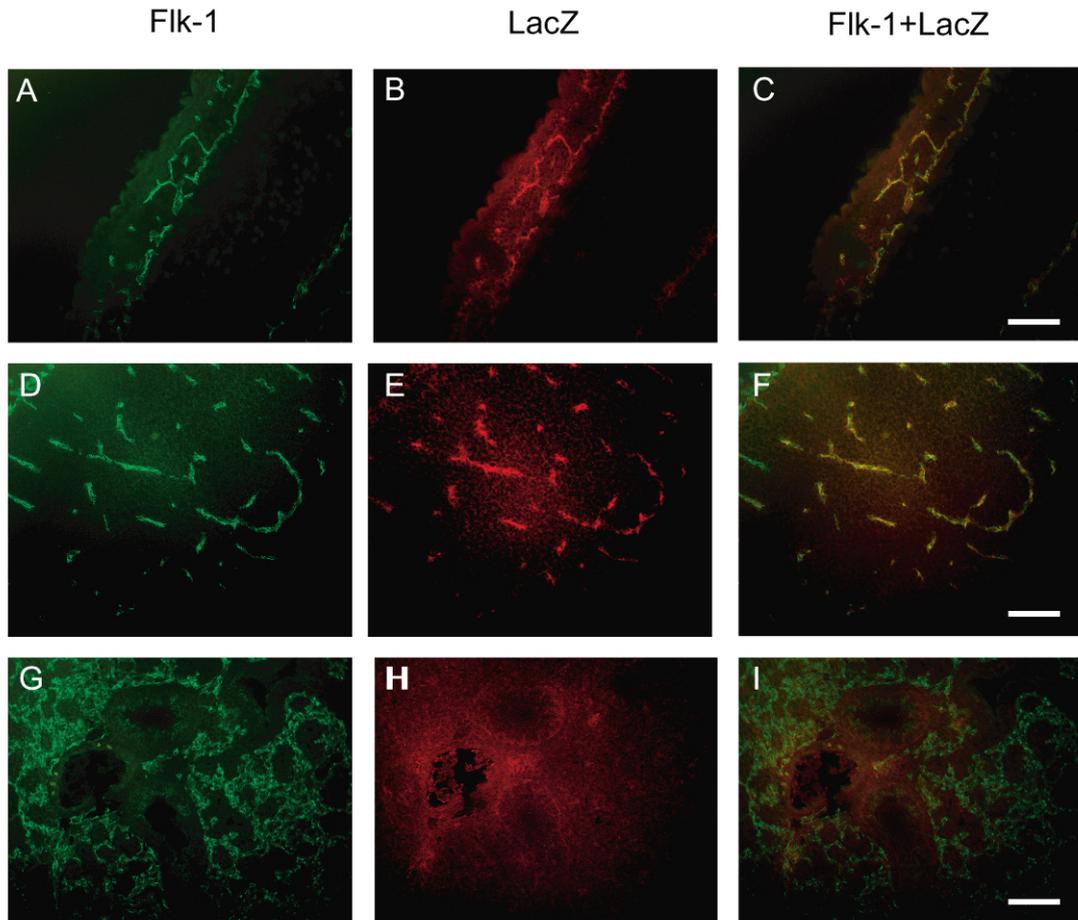


Abb. 3.1.5 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung von flk-1-Cre/Rosa26R Embryonen

Flk-1-Cre/Rosa26R Embryonen wurden an E16,5 präpariert, Gefrierschnitte angefertigt und Immunfluoreszenzfärbungen gegen Flk-1 (A, D, G) und LacZ (B, E, H) durchgeführt. **A.-C.** Kapillargefäße in der Haut zeigten Flk-1 Reaktivität (A). Die LacZ Immunfärbung war mit Gefäßstrukturen assoziiert (B) und die Überlagerung beider Färbungen zeigte eine Co-Lokalisation von Flk-1 und LacZ positiven Gefäßen (C). **D.-F.** Gehirnkapillaren waren Flk-1 positiv (D) und LacZ Reaktivität war in gefäßartigen Strukturen zu finden (E). Die Überlagerung von Flk-1 und LacZ-Färbung zeigte eine Co-Lokalisation der Strukturen (F). **G.-I.** Kapillarnetzwerk der Lunge. Die Gefäße der Lunge waren stark Flk-1 positiv (G). Nur eine schwache diffuse LacZ Reaktivität wurde in der Lunge gefunden (H). Überlagerung der Färbungen zeigte keine Co-Lokalisation der Flk-1 und LacZ positiven Strukturen (I).

Balken: 100 μ m

Um die Cre Aktivität in adulten Mäusen zu untersuchen, wurden die Organe von flk-1-Cre/Rosa26R präpariert, in Tissue-Tek eingebettet und Kryostat-Schnitte angefertigt oder sie wurden zerkleinert und Organstücke einer LacZ-Färbung unterzogen. Die Gefäße der Meningen zeigten eine komplette und starke LacZ-Färbung, wogegen neuronales Gewebe LacZ negativ war (Abb. 1.6. A). Die großen Sammelgefäße des Herzens und die Koronargefäße waren LacZ positiv, es zeigte sich aber keinerlei Färbung von Muskelzellen (Abb. 3.1.6 B). In der Niere zeigte sich eine starke LacZ-Expression der Kapillaren in den Glomeruli und von Gefäßen zwischen den Nierentubuli (Abb. 3.1.6 C). Die luminale Zellschicht von Gefäßen war LacZ positiv, während abluminale Zellen der Gefäßwand, Muskelzellen und Perizyten, keine LacZ-Färbung aufwiesen (Abb. 3.1.6 D). Im Pankreas fanden sich LacZ positive Zellen in großen Gefäßen und in Kapillaren zwischen den Pankreas-Läppchen (Abb. 3.1.6 E). In der Milz wurden zahlreiche Gefäße in den Follikeln sowie die Zentralarterien angefärbt. Ebenso zeigten sich LacZ positive Endothelzellen in den venösen Sinus der roten Milzpulpa (Abb. 3.1.6 F). In der Leber wurden Gefäßstrukturen, nicht aber Hepatozyten gefärbt (Daten nicht gezeigt), und in der Lunge war nur eine schwache Färbung von Kapillaren erkennbar. Die Kapillarfärbung in der Lunge war in Linie 15964 etwas stärker als in Linie 15962, in beiden aber unvollständig (Abb. 3.1.6 G und H). In Lungen von Rosa26R Kontrolltieren wurden keine LacZ positiven Zellen gefunden (Abb. 3.1.6 I). Ebenso waren alle untersuchten Organsysteme in diesen Kontrolltieren LacZ negativ (Daten nicht gezeigt). Insgesamt wurde eine sehr spezifische LacZ-Aktivität im Endothel von Blutgefäßen beobachtet und zwar in allen untersuchten Entwicklungsstadien und in Organsystemen adulter Mäuse. Mit Ausnahme der Blutzellen fielen keine nicht-endothelialen oder ektopischen Färbungen auf.

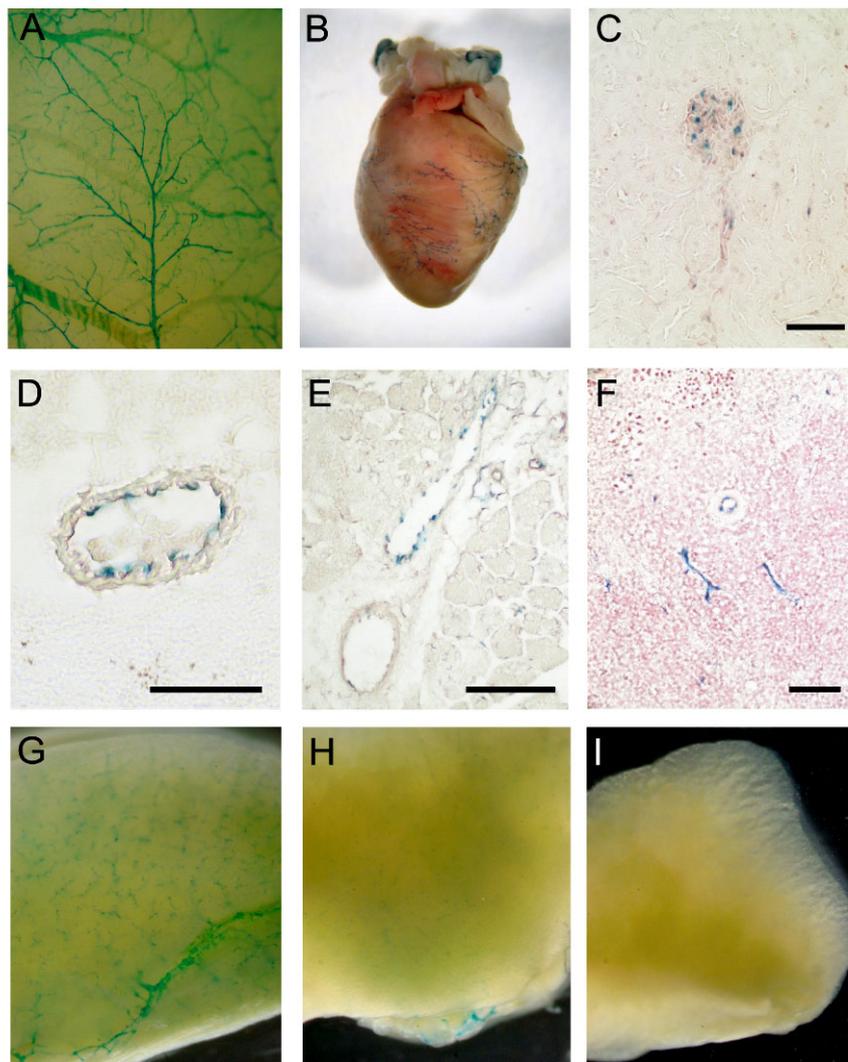


Abb. 3.1.6. Organe von adulten *flk-1-Cre/Rosa26R* transgenen Mäusen

Organe von adulten *flk-1-Cre/Rosa26R* Mäusen wurden einer *in toto* LacZ-Färbung unterzogen (A, B, G-I) oder Gefrierschnitte der Organe hergestellt und LacZ gefärbt (C-F). **A.** Färbung einer Gehirnhemisphäre. Die Blutgefäße der Meningen zeigten eine starke, komplette LacZ-Färbung. **B.** Färbung eines Herzens. Während das Muskelgewebe keine Färbung aufwies, waren die Koronargefäße und die Sammelgefäße LacZ positiv. **C.** In der Niere wiesen die Kapillaren der Glomeruli und Gefäße zwischen den Nierentubuli LacZ-Färbung auf. **D.** Die Vergrößerung einer Arteriole im Gehirn zeigte LacZ-Expression der luminalen Gefäßschicht, es war aber keine Färbung der Zellen in der Gefäßwand zu detektieren. **E.** Im Pankreas wurden LacZ positive Zellen in Gefäßen gefunden. **F.** In der Milz zeigten sich LacZ positive venöse Sinus und arterielle Gefäße. **G.-I.** LacZ-Färbung der Lunge. Eine unvollständige Färbung der Lungengefäße war in *flk-1-Cre/Rosa26R* der Linie 15964 zu erkennen (G). *flk-1-Cre/Rosa26R* der Linie 15962 zeigten eine kaum detektierbare Färbung der Lungenkapillaren (H). In Lungen aus Wildtyp-Tieren wurden keine LacZ positiven Zellen detektiert (I). Balken: E, 100 μ m C,D,F, 50 μ m

3.1.3 Cre Aktivität im BFS-1 Tumormodell

Um die Cre Aktivität in einem pathophysiologischen Modell näher zu untersuchen, wurden in *flk-1-Cre/Rosa26R* und *Rosa26R* Mäusen experimentelle Tumore erzeugt. BFS-1 Fibrosarkomzellen (Hafner et al., 1996) wurden kultiviert und anschließend je $1,5 \times 10^6$ Zellen pro $50 \mu\text{l}$ Injektionsvolumen subkutan in adulte Mäuse injiziert. Nach 7 Tagen Inokulation waren sichtbare Tumore gewachsen. Diese wurden präpariert und daraus RNA isoliert oder Kryostat-Schnitte davon angefertigt. Anschließend wurde eine Doppel-Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Flk-1 und anti-LacZ Antikörpern durchgeführt. Die Flk-1 Färbung zeigte, dass die Tumore sowohl von *flk-1-Cre/Rosa26R* als auch *Rosa26R* Tieren reich an Gefäßen waren (Abb. 3.1.7 A und D). Die LacZ-Färbung zeigte, dass die neugebildeten Tumorgefäße von *flk-1-Cre/Rosa26R* Mäusen stark LacZ positiv waren (Abb. 3.1.7 B), nicht aber die Tumorzellen selbst. Die Überlagerung beider Färbungen ergab eine komplette Deckung der Flk-1 und LacZ positiven Gefäße (Abb. 3.1.7 C). In *Rosa26R* Mäusen konnten hingegen keine LacZ positiven Zellen detektiert werden (Abb. 3.1.7 E und F). Die beobachtete LacZ-Färbung könnte möglicherweise aus konstitutiver LacZ-Expression in Endothelzellen resultieren, da die Rekombination des Reporterallels schon während der Embryonalentwicklung erfolgte. Daher wurde die Cre-Expression in den Tumoren untersucht. Aus den Tumoren wurde RNA isoliert und eine RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für *cre* durchgeführt. Die Expression der Cre Rekombinase in den neugebildeten Gefäßen des Tumors konnte so bestätigt werden (Abb. 3.1.7 G).

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass zwei neue transgene *flk-1-Cre* Mauslinien erzeugt wurden, die beide eine starke endothelspezifische Cre Rekombinase Aktivität aufwiesen. Die vollständige Färbung des Gefäßsystems wurde an Tag 11,5 (Linie 15962) bzw. 13,5 (Linie 15964) der Embryonalentwicklung detektiert. An späteren Zeitpunkten, bis hin zu 13 Monate alten Tieren, blieb die Färbung sehr spezifisch in Endothelzellen zu beobachten. Als einzige nicht endotheliale Zellen

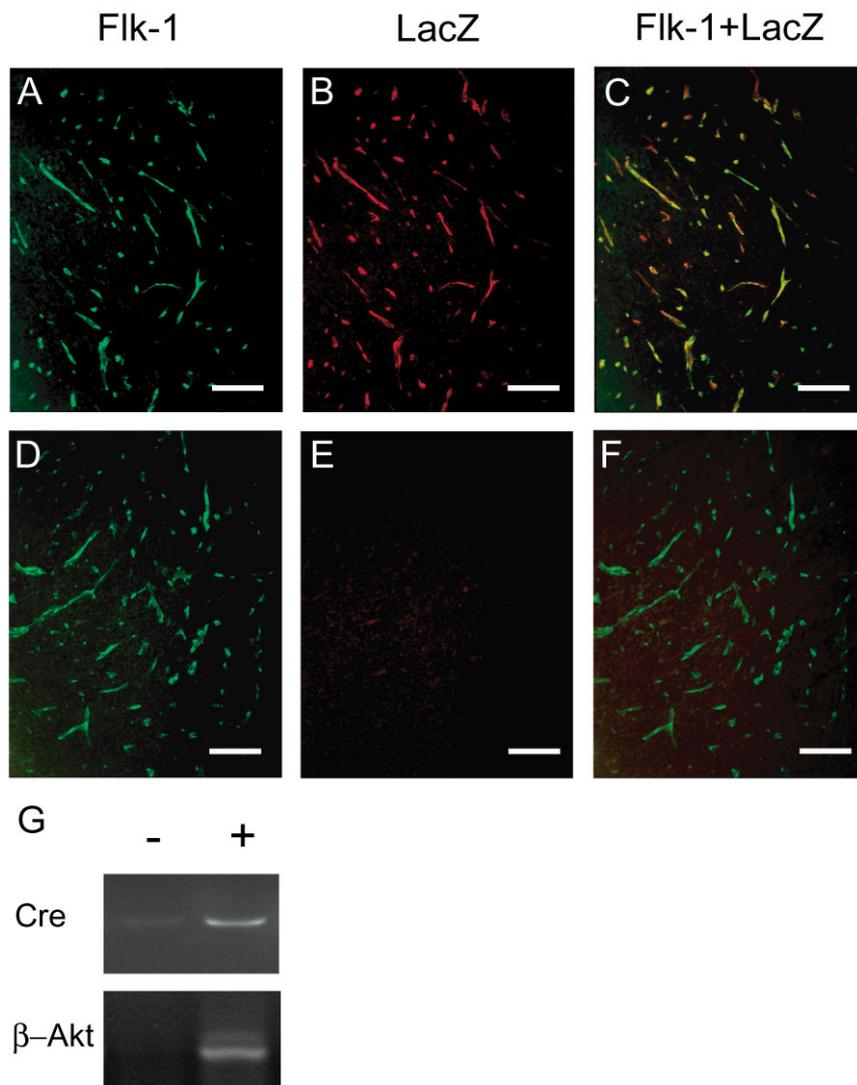


Abb. 3.1.7 Cre Aktivität in BFS-1 Tumoren

BFS-1 Fibrosarkomzellen wurden subkutan in *flk-1-Cre/Rosa26R* oder *Rosa26R* Mäuse injiziert. Nach 7 Tagen wurden Gefrierschnitte der Tumore angefertigt oder RNA aus dem Tumorgewebe isoliert. Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gegen Flk-1 und LacZ wurde durchgeführt. **A.-C.** Tumore aus *flk-1-Cre/Rosa26R* Mäusen zeigten eine spezifische Flk-1 Färbung der Tumorgefäße (A) und eine gefäßassoziierte LacZ-Färbung (B). In der Überlagerung beider Färbungen wurde eine komplette Co-Lokalisation der Färbungen deutlich (C). **D.-F.** Tumore aus *Rosa26R* Mäusen waren gut vaskularisiert, wie anhand Flk-1 positiver Gefäße gezeigt (D). Es wurde jedoch keine LacZ-Reaktivität in den Tumoren gefunden (E und Überlagerung F). **G.** Reverse-Transkriptase (RT)-PCR zum Nachweis der Cre-Expression. RNA wurde aus Tumoren isoliert und eine RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für den Cre Nachweis durchgeführt (+). Eine Kontrollreaktion wurde ohne RT Enzym durchgeführt (-), um Kontamination von genomischer DNA auszuschließen. Eine PCR für β-Aktin diente als Kontrollreaktion. Balken: 100 μ m

wurden zirkulierende Blutzellen mit Cre-Aktivität beobachtet. Lediglich die Gefäße der Lunge zeigten eine schwache LacZ-Aktivität in beiden Linien. In einem Tumormodell konnte gezeigt werden, dass Cre-Aktivität auch in neugebildeten Gefäßen bei pathologischer Angiogenese im adulten Tier nachweisbar war.

3.2 Die Funktion endothelialer Hypoxie-induzierbarer Faktoren in der Entwicklung von Blutgefäßen

Die Familie der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF1, HIF2, HIF3) reguliert die zelluläre Antwort auf niedrige Sauerstoffkonzentration. HIF1 spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Blutgefäßen. Die Stabilisierung der HIF1 α Untereinheit in hypoxischen Zellen führt zur gesteigerten Expression und Freisetzung des angiogenen Faktors VEGF. Dieser stimuliert das kompensatorische Wachstum von Blutgefäßen in das hypoxische Gewebe (Pugh und Ratcliffe, 2003). Die VEGF Signalübertragung in Endothelzellen erfolgt über die VEGF Rezeptoren-1 und -2. Es ist nicht klar, ob die Expression dieser Rezeptoren *in vivo* durch Hypoxie-Signalwege in Endothelzellen reguliert wird. Im Gegensatz zur ubiquitär exprimierten HIF1 α Untereinheit wird das Familienmitglied HIF2 α hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert (Jain et al., 1998) und gilt daher als ein potentieller intrinsischer Vermittler der Hypoxie-Antwort in Endothelzellen. Die Geninaktivierung von *HIF2 α* in Mäusen führte in zwei Studien zu keiner Beeinträchtigung der Gefäßentwicklung (Tian et al., 1998; Compernelle et al., 2002). In einer dritten Studien wurden Remodellierungsdefekte in den Dottersackgefäßen gefunden, der Phänotyp zeigte dabei große Variabilität (Peng et al., 2000). Die Zielgene von HIF2 wurden nicht identifiziert. Es wurde zum Beispiel keine Veränderung in der Expression von VEGF Rezeptor-2 oder Tie-2 beobachtet (Peng et al., 2000). Die Rolle von HIFs in Endothelzellen blieb also ungeklärt. Der fehlende vaskuläre Phänotyp in diesen Studien kann möglicherweise mit einer funktionellen Redundanz von HIF Faktoren in Endothelzellen erklärt werden. Der Verlust von HIF2 α

konnte möglicherweise von den Untereinheiten HIF1 α und/ oder HIF3 α kompensiert werden. In der folgenden Studie sollte daher die Rolle von endothelialen HIFs in der embryonalen Gefäßentwicklung untersucht werden. Dazu sollte eine Deletionsmutante von HIF2 α in Gefäßen transgener Mäuse überexprimiert werden.

3.2.1 Charakterisierung der HIFdn Mutante *in vitro*

In vorangegangenen Arbeiten wurde eine Deletionsmutante des Transkriptionsfaktors HIF2 α hergestellt. Dabei wurden die Transaktivierungsdomänen TAD N und TAD C, sowie ein Teil der DNA bindenden Domäne deletiert. Die resultierende cDNA (955 bp) wurde als dominant negatives HIF (HIFdn) bezeichnet und kodierte für die Aminosäuren 24-325 von HIF2 α (Abb. 3.2.1 A) (Elvert et al., 2003). Alle HIF α Untereinheiten bilden mit ARNT Heterodimere, die dann aktivierend auf Promotoren von Zielgenen wirken. HIFdn besitzt noch die beiden PAS A und B Domänen, die zur Bildung von Heterodimeren mit HIF1 β (ARNT) notwendig sind. Wenn HIFdn im Überschuss vorhanden ist, bindet und sequestriert es möglicherweise ARNT, so dass es nicht mehr für die Bildung funktioneller Heterodimere mit den Wildtyp-HIF α Faktoren zu Verfügung steht. Um die HIFdn Mutante funktional zu charakterisieren, wurden transiente Transfektionen von A293 Zellen durchgeführt und die Mutante unter Kontrolle des *CMV* Promotors überexprimiert. Es wurden Reporterplasmide co-transfiziert, die das Reportergen Luziferase unter Kontrolle von HIF induzierbaren Promotoren exprimierten, um den Einfluss der HIFdn Mutante auf die Promotoraktivität zu untersuchen. Die Zellen wurden 24-48 h nach der Transfektion lysiert und die Luziferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Die basale Aktivität der verwendeten Promotoren wurde gleich 1 gesetzt, so dass alle weiteren Werte relativ zu diesem Basalwert dargestellt wurden. Die Luziferase-Aktivität diente als Maß für die Aktivität der vorgeschalteten Promotoren. Als HIF1 α aktivierbarer Promotor wurde der humane *VEGF* Promotor-Luziferase Vektor (Ikeda et al., 1995) in A293 Zellen transfiziert. Die basale Aktivität dieses Reportergens wurde durch Expression von CMV-HIFdn um 58%

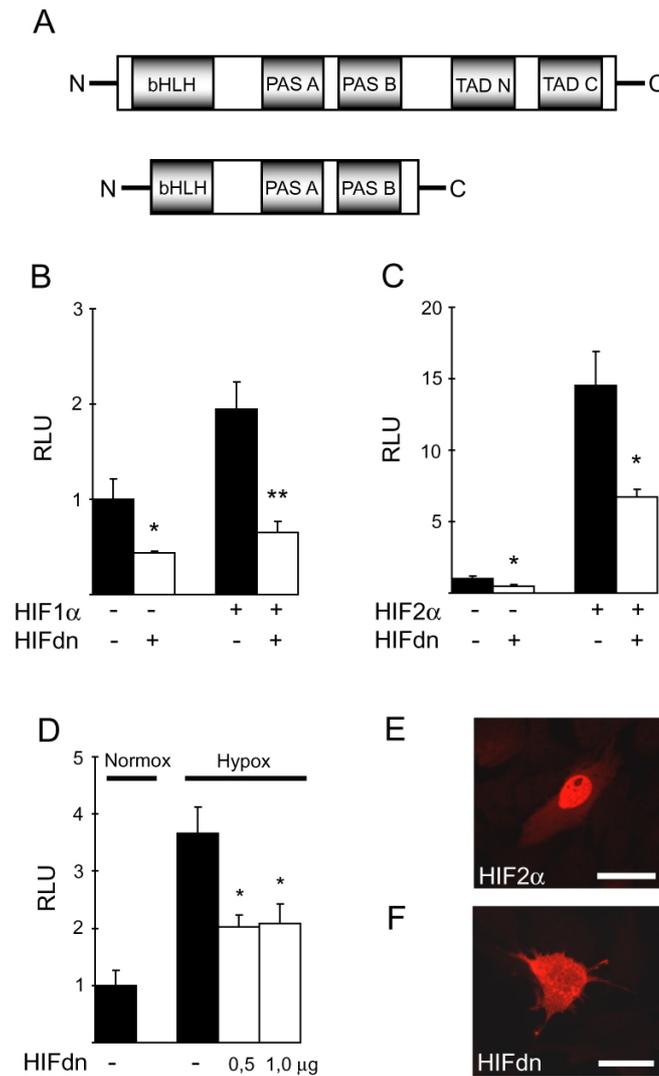


Abb. 3.2.1 Struktur und Funktion der HIFdn Mutante *in vitro*

A. Domänenstruktur von HIF2α und HIFdn. Die Transaktivierungsdomänen (TAD N und C) und die bHLH Domäne wurden in HIFdn deletiert. **B.-D.** Luziferase-Reportergen-Experimente. **B.** *VEGF* Promotor-Luziferase wurde in A293 Zellen transfiziert. Co-Transfektion mit HIFdn reduzierte die Promotoraktivität. Durch Expression von HIF1α wurde der *VEGF* Promotor stimuliert, durch Co-Expression von HIFdn wurde die Stimulation auf basales Niveau inhibiert. **C.** *flk-1* Promotor-Luziferase wurde in A293 Zellen transfiziert. Expression von HIFdn senkte die *flk-1* Promotoraktivität signifikant. HIF2α Expression resultierte in einer Aktivierung des *flk-1* Promotors. Co-Transfektion mit HIFdn inhibierte die HIF2α Stimulation. **D.** *VEGF* Promotoraktivität in A293 Zellen. Die Zellen wurden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert. Hypoxie steigerte die Aktivität des *VEGF* Promotors. Expression von HIFdn reduzierte diese Stimulation. **E.-F.** Lokalisation von HIF2α und HIFdn in HUE Zellen. Die Zellen wurden mit HIF2α oder HIFdn transfiziert und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen das FLAG Epitop durchgeführt. HIF2α war ausschließlich im Zellkern lokalisiert (E), während HIFdn im Zytoplasma der Zellen nachweisbar war (F). * $p < 0,03$ ** $p < 0,005$ Balken: 50 μm

reduziert. Die Transfektion von CMV-HIF1 α (Kappel et al., 1999) stimulierte die Aktivität des Promotors um das 2-fache. Durch Co-Transfektion von CMV-HIFdn und CMV-HIF1 α wurde diese Stimulation bis auf die basale Reporteraktivität reduziert (Abb. 3.2.1 B). Als HIF2 α stimulierbarer Reporter wurde der murine VEGF Rezeptor-2 (*flk-1*) Promotor-Luziferase Vektor (Kappel et al., 1999) in A293 Zellen transfiziert. Die Transfektion von CMV-HIFdn senkte die basale Aktivität des *VEGF Rezeptor-2* Promotors um 50%. Wurde CMV-HIF2 α in diesen Zellen überexprimiert, so resultierte dies in einer 15-fachen Stimulation der basalen Aktivität. Durch Co-Transfektion gleicher Mengen CMV-HIF2 α und CMV-HIFdn Expressionsplasmid wurde die HIF2 α abhängige Stimulation stark reduziert (44% der Stimulation) (Abb. 3.2.1 C). Selbst durch Überschuss von CMV-HIFdn konnte jedoch keine vollständige Reduzierung auf basales Level erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Diese *in vitro* Experimente ließen den Schluss zu, dass die generierte HIFdn Mutante die Aktivierung von HIF Zielgenen blockieren konnte. Dies traf für beide HIF Familienmitglieder HIF1 α und HIF2 α zu, so dass die Mutante einen dominant negativen Effekt hatte. Die Mutante blockierte also nicht selektiv nur einen HIF Signalweg, etwa HIF2 α , aus dessen cDNA sie erzeugt wurde. Um zu untersuchen, inwiefern die HIFdn Mutante die transkriptionelle Hypoxie-Antwort beeinflusst, wurden A293 Zellen mit dem *VEGF* Promotor-Luziferase Vektor transfiziert und unter Normoxie oder Hypoxie (1% pO₂ für 12 h) kultiviert. In hypoxischen Zellen zeigte sich gegenüber normoxischen Zellen eine 4-fache Stimulation des *VEGF* Promotors. Dies wurde größtenteils durch das Hypoxie-responsive Element (HRE) im *VEGF* Promotor vermittelt, da Promotorfragmente, in denen das HRE mutiert war, nicht durch Hypoxie stimulierbar waren (Daten nicht gezeigt). Wurden A293 Zellen mit HIFdn co-transfiziert und unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, so wurde die Hypoxie-abhängige Stimulation des *VEGF* Promotors um 45% reduziert (Abb. 3.2.1 D).

Um die Expression und zelluläre Lokalisation der HIFdn Mutante zu untersuchen, wurden humane Endothelzellen (HUE) mit CMV-HIFdn Expressionsplasmid

transfiziert und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen das FLAG Epitop durchgeführt. Zum Vergleich wurde HIF2 α ebenfalls in HUE Zellen exprimiert. Der Transkriptionsfaktor HIF2 α konnte in den transfizierten Zellen ausschließlich im Zellkern lokalisiert werden (Abb. 3.2.1 E). Die Mutante HIFdn hingegen zeigte eine zytoplasmatische Lokalisierung (Abb. 3.2.1 F). Daher ist es möglich, dass die Mutante ARNT im Zytoplasma der Zelle abfängt, so dass keine funktionalen Heterodimere gebildet werden können.

3.2.2 Generierung und Analyse *flk-1* p/e-HIFdn transgener Embryonen

Um den Einfluss der HIFdn Mutante auf die Entwicklung des Gefäßsystems zu untersuchen, sollten transgene Mäuse generiert werden, die HIFdn spezifisch im Endothel von Blutgefäßen exprimieren. Dazu eigneten sich die schon beschriebenen regulatorischen Elemente des *flk-1* Gens (diese Arbeit 3.1). Es wurde ein Konstrukt kloniert, in dem der 939 bp *flk-1* Promotor und ein 2,3 kbp Fragment aus dem 1. Intron des *flk-1* Gens die Expression von HIFdn steuerten. Die HIFdn cDNA wurde samt C-terminalem FLAG Signal durch XhoI und HindIII Restriktionsverdau aus dem pcDNA3/HIFdn-FLAG Vektor (Elvert et al., 2003) ausgeschnitten. Das Fragment wurde in einen Vektor mit den *flk-1* regulatorischen Elementen eingesetzt. Durch SalI und PvuI Verdau wurde der entstandene Vektor *flk-1* p/e-HIFdn linearisiert und für die DNA Mikroinjektion aufgereinigt (Schema in Abb. 3.2.2 A). Die DNA wurde in befruchtete Oozyten von C57/Bl6 Mäusen injiziert und die Zellen danach in den Uterus von CD1 Mäusen transplantiert. Zwischen Tag E10,5 und E14,5 wurden die Embryonen präpariert und genomische DNA aus Dottersackgewebe isoliert, um mittels PCR das Transgen nachzuweisen. Von insgesamt 660 präparierten Embryonen konnte in 63 die Integration des Transgens nachgewiesen werden (siehe Tabelle 2). An Tag E10,5 waren die *flk-1* p/e-HIFdn Embryonen zwar noch am Leben, aber bei etwa 30% der transgenen Embryonen fiel eine Wachstumsretardierung auf. An späteren Entwicklungstagen wurde eine zunehmende Zahl von Embryonen tot aufgefunden, besonders deutlich wurde dies

am Tag E13,5 und E14,5. Zu diesem Zeitpunkt waren 30% der Embryonen tot und schon teilweise resorbiert worden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 2 Überblick der untersuchten flk-1 p/e-HIFdn transgenen Embryonen

Tag der Embryonalentwicklung (E)	Transgene Embryonen (PCR)	Retardierter Phänotyp
E 10,5	39	10
E 11,5	14	5
E 12,5	2	1
E 13,5	2	1*
E 14,5	6	2*
total	63	19 (30%)

* Embryonen waren tot und teilweise resorbiert

Die Expression des Transgens wurde durch RNA Isolierung und anschließende RT-PCR überprüft. Dabei wurden spezifische Oligonukleotide verwendet, die eine Unterscheidung von endogener HIF2 α cDNA und transgener HIFdn cDNA ermöglichen. Das reverse Oligonukleotid wurde so gewählt, dass es im FLAG Signal hybridisierte. Ein PCR Produkt ließ sich in Transgenen amplifizieren, nicht aber im Wildtyp. Eine Kontrollreaktion ohne reverse Transkriptase schloss Kontamination mit genomischer DNA als Ursache für die detektierte Bande aus (Abb. 3.2.2 B). Auf Proteinebene wurde die Expression des Transgens mittels Western-Blot Analyse oder durch Immunhistochemie auf Kryostat-Schnitten von Embryonen untersucht. Es wurden Proteinlysate von Embryonen an Tag E13,5 hergestellt und mittels SDS-Polyacrylamid-

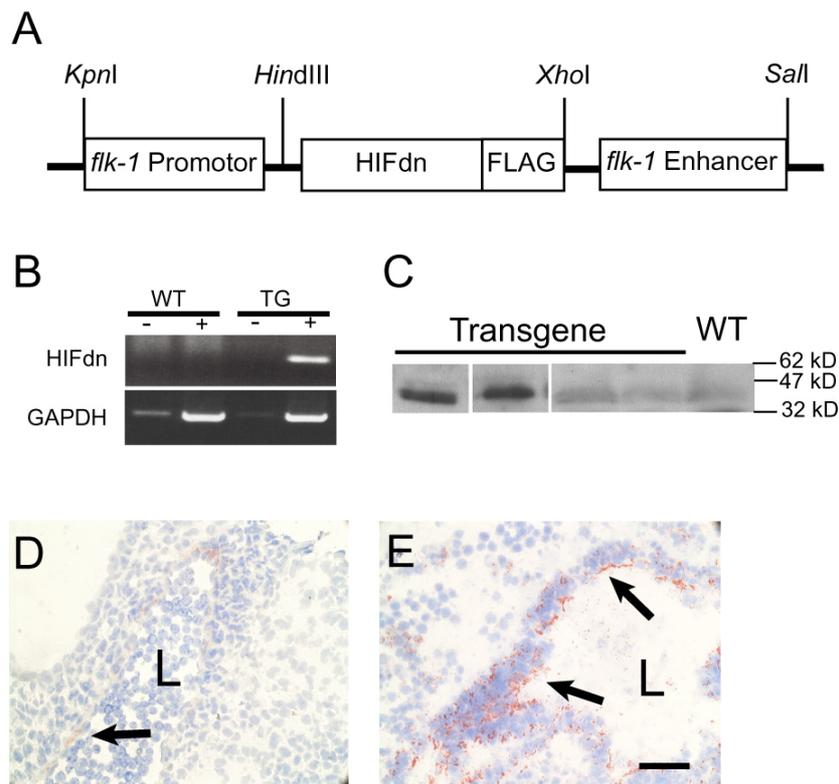


Abb. 3.2.2 Herstellung flk-1 p/e-HIFdn transgener Mäuse

A. Schematische Darstellung des DNA Konstrukts, mit dem flk-1 p/e-HIFdn transgene Mäuse generiert wurden. Ein FLAG Signal befand sich am C-Terminus von HIFdn. **B.** Aus Wildtyp- (WT) oder flk-1 p/e-HIFdn transgenen (TG) Embryonen wurde an Tag E11,5 RNA isoliert. Es wurde durch Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion cDNA synthetisiert (+) und eine PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für HIFdn durchgeführt. Eine Kontrollreaktion ohne RT Enzym diente als Kontrolle (-), um Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen. **C.** Western-Blot Analyse. Aus Embryonen wurden an Tag E13,5 Proteinlysate hergestellt. Diese wurden mittels 15%iger SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Zur Detektion des FLAG Epitop wurde der anti-FLAG M2 Antikörper verwendet. **D.** und **E.** Immunhistochemische Färbung gegen das FLAG Epitop. Gefrierschnitte von WT (**C**) und TG (**D**) Embryonen an E11,5. Auf WT Schnitten war eine geringe Hintergrundreaktivität zu beobachten (Pfeil in **C**). Gefäße von TG Embryonen zeigten FLAG Reaktivität (Pfeile in **D**). L =Lumen von Blutgefäß, Balken: 50 μ m

Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert und das FLAG Epitop mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Einige der transgenen Embryonen zeigten ein Signal mit der erwarteten molekularen Masse von ca. 38 kD (Abb. 3.2.2 C). Durch Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen das FLAG Peptid konnte das Transgen spezifisch in Gefäßen

lokalisiert werden (Abb. 3.2.2 E). Gefrierschnitte von Wildtyp-Embryonen dienten als negative Kontrolle. Hier konnte in Blutgefäßen nur eine geringe Hintergrundreaktivität beobachtet werden (Abb. 3.2.2 D). Wie erwartet exprimierten nicht alle flk-1 p/e-HIFdn Embryonen das Transgen. Die Expression wurde nur in etwa einem Drittel der Transgenen detektiert. Dies korrelierte mit dem Auftreten des retardierten Phänotyps. Nicht-exprimierende Embryonen zeigten auch keinerlei morphologische Auffälligkeiten. Wenn im Weiteren der Ausdruck "HIFdn Transgene" verwendet wird, so sind damit die 30% der flk-1 p/e-HIFdn Embryonen bezeichnet, die den abnormen Phänotyp zeigten.

Die erste Auffälligkeit bei den HIFdn Transgenen war in den Dottersackgefäßen zu sehen. Während Wildtyp-Embryonen eine gut durchblutete und reich verzweigende Gefäßstruktur entwickelten, waren Dottersäcke von HIFdn Embryonen schlecht durchblutet und fielen auf durch eine disorganisierte Gefäßarchitektur. Großkalibrige Gefäße wurden nicht beobachtet (Abb. 3.2.3 A und B). Die Embryonen erschienen blass und zeigten Anzeichen von Hämorrhagien. Im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.2.3 C) waren die HIFdn Transgenen an Tag E10,5 kleiner und deutlich in der Entwicklung zurück (Abb. 3.2.3 D). Die Blutgefäße waren disorganisiert, speziell in der Kopffregion wurde dies deutlich, da die Abzweigungen der Aa. carotis int. nicht zu sehen waren. Das Perikardium war bei vielen HIFdn transgenen Embryonen ödematös erweitert, was ein weiterer Hinweis auf das Vorliegen von kardio-vaskulären Störungen in der Entwicklung war (Abb. 3.2.3 E). Um das Gefäßsystem und die Endothelzellen besser darzustellen, wurden Wildtyp- und transgene Embryonen am Tag E10,5 einer *in toto* immunhistochemischen Färbung gegen Pecam-1 unterzogen (Abb. 3.2.4). Die Färbung zeigte, dass vaskuläre Strukturen und Endothelzellen in den HIFdn Transgenen gebildet wurden. Während Wildtyp-Embryonen jedoch ein hierarchisch organisierten und fein verzweigenden Gefäßbaum im Kopfbereich besaßen (Abb. 3.2.4 A), zeigte sich in HIFdn Transgenen nur ein primitives maschenartiges Netzwerk von Gefäßen (Abb. 3.2.4 B). Dieser einfache Gefäßplexus entspricht der frühen Gefäßbildung durch Vasku-

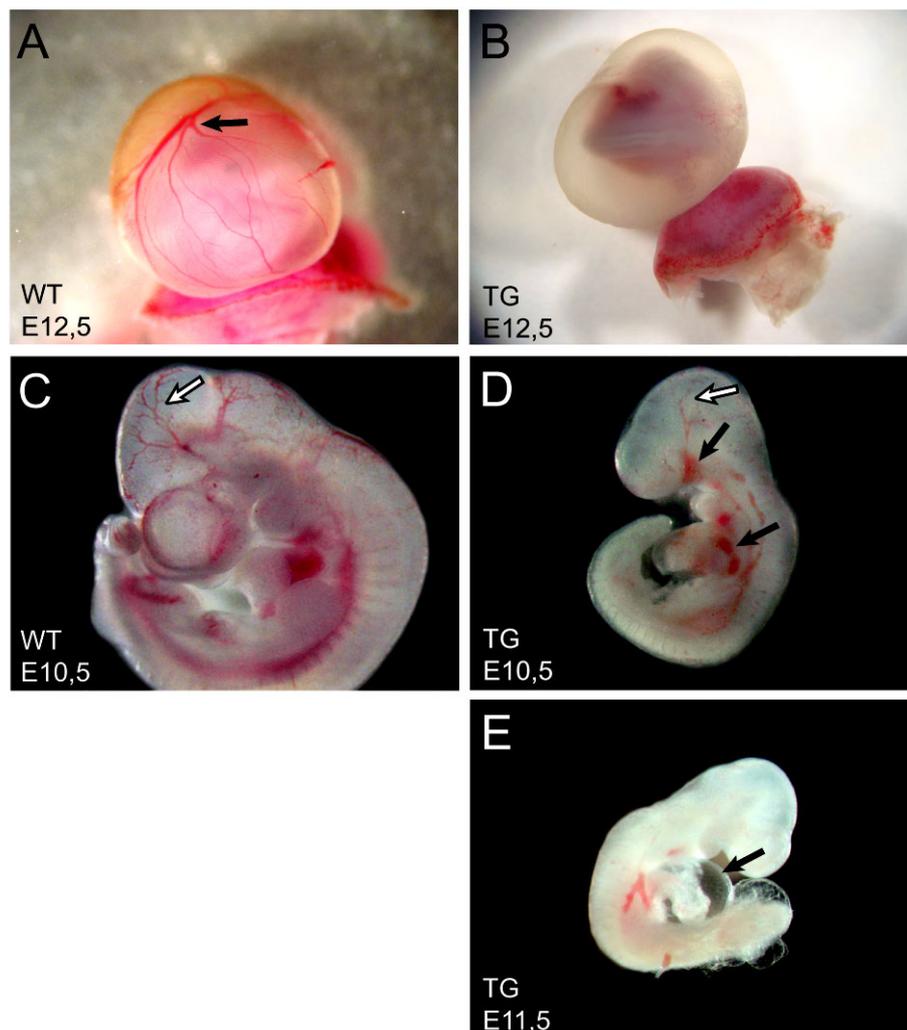


Abb. 3.2.3 Makroskopische Untersuchung der *flk-1* p/e-HIFdn Embryonen

A. Dottersäcke von Wildtyp-Embryonen (WT) an E12,5 zeigten eine verzweigte Gefäßstruktur (Pfeil) und waren gut durchblutet. **B.** Dottersackgefäße von *flk-1* p/e-HIFdn transgenen (TG) Embryonen waren disorganisiert und wiesen keine Zirkulation auf. **C.** WT Embryonen an E10,5 zeigten einen verzweigten Gefäßbaum im Kopfbereich (Pfeil). **D.** TG Embryonen an E10,5 waren kleiner als WT Embryonen, zeigten disorganisierte Gefäße (leerer Pfeil) und Hämorrhagien (schwarzer Pfeil). **E.** An Tag E11,5 waren TG Embryonen blass und bildeten perikardiale Ödeme (Pfeil).

logenese. Die von diesem Plexus normalerweise ausgehende sprossende Angiogenese war in HIFdn transgenen Mäusen nicht zu beobachten. Die großen Gefäße im Rumpfbereich, wie die dorsale Aorta und Kardinalvene, entwickelten sich in Wildtyp- und HIFdn transgenen Mausembryonen normal. Die intersomitischen Gefäße waren ebenfalls vorhanden. In der Herzentwicklung von HIFdn transgenen Embryonen

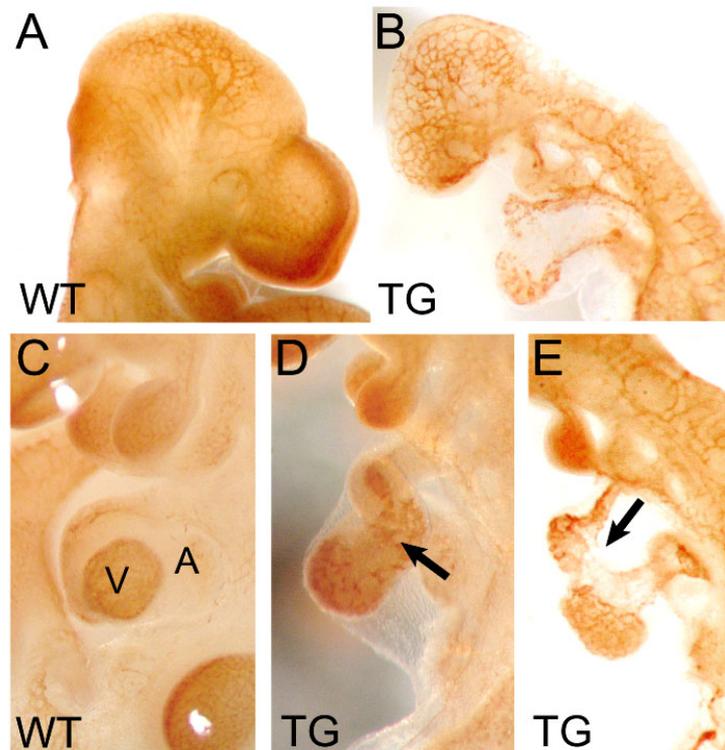


Abb. 3.2.4 Immunhistochemische Pecam-1 Färbung ganzer Embryonen

Wildtyp (WT) und *flk-1 p/e-HIFdn* transgene (TG) Embryonen wurden an Tag E10,5 präpariert und eine *in toto* immunhistochemische Färbung gegen Pecam-1 durchgeführt. **A.** Im Kopfbereich von WT Embryonen waren der Gefäßbaum der A. carotis int., sowie Kapillargefäße Pecam-1 positiv. **B.** In TG Embryonen war ein Pecam-1 positiver primitiver vaskulärer Plexus angefärbt, anstatt der organisierten Gefäßstruktur im WT. **C.** Das Herz hatte eine Schleife gebildet, so dass Atrium und Ventrikel nebeneinander lagen. **D.** und **E.** In TG Embryonen hatte sich aus dem primitiven linearen Herzschlauch nur eine inkomplette Schleife gebildet (Pfeile in D und E).

wurden Störungen festgestellt. Wildtyp-Embryonen hatten an Tag E10,5 schon eine S-förmige Herzschleife entwickelt, so dass primitive Atria und Ventrikel nebeneinander lagen, wie es für Herzkammerformung nötig ist (Abb. 3.2.4 C). Im Gegensatz dazu konnte in HIFdn Transgenen nur ein primitiver mehr oder weniger linear verlaufender Herzschlauch gefunden werden (Abb. 3.2.4 D und E). Die Pecam-1 Färbung des Endokardium war sehr regelmäßig in Wildtyp-Embryonen, wogegen in HIFdn Transgenen eine irreguläre, Plaque-förmige Färbung zu beobachten war. Um die gefundenen morphologischen Auffälligkeiten weiter zu untersuchen, wurden

Gefrierschnitte von Embryonen angefertigt und mittels Immunohistochemie angefärbt. Die Vaskularisierung des Gehirns beginnt mit der Bildung des perineuralen vaskulären Plexus (PNV), der durch Vaskulogenese entsteht. Die Gefäßversorgung des Neuroektoderm erfolgt dann durch Aussprossung aus dem PNV. Die neuen Blutgefäße wandern ins Neuroepithel ein und verzweigen sich dort. Das Wachstum folgt dabei einem Gradienten von VEGF, das in der ventrikulären Zone ausgeschüttet wird (Breier et al., 1992; Raab et al., 2004). In der immunhistochemischen Färbung von Wildtyp-Embryonen zeigten die Gefäße des PNV und die von hier aus ins Neuroektoderm einwandernden Kapillaren Flk-1 und Pecam-1 Reaktivität (Abb. 3.2.5 A, C und Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war in HIFdn Transgenen nur der PNV ausgebildet, aber keine Einwanderung von Gefäßen in neuronales Gewebe zu beobachten (Abb. 3.2.5 B und D). Durch Serienschnitte von kompletten Embryonen konnte gezeigt werden, dass das Neuroepithel von Gehirn und Rückenmark völlig avaskulär blieb (Daten nicht gezeigt).

Die Herzen von Wildtyp-Embryonen entwickelten ein solides, aus mehreren Schichten von Muskelzellen bestehendes Myokardium (Abb. 3.2.5 E). Die luminal Seite des Myokard bildete zahlreiche Muskelbälkchen (Trabekulae) aus, die mit Pecam-1 positiven endokardialen Zellen überzogen waren. Die HIFdn Transgenen hingegen zeigten nur eine sehr dünne ein- bis zweischichtige Ventrikelwand. Anstelle der Trabekel waren nur schwach Pecam-1 positive Strukturen zu erkennen (Abb. 3.2.5 F).

Die Plazentas von Wildtyp-Embryonen und HIFdn Transgenen wurden geschnitten und mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung und Immunhistochemie untersucht. Beide zeigten den charakteristischen Schichtaufbau aus Chorionplatte, Labyrinthschicht und mütterlicher Dezidua. Embryonale Gefäße sind mit Endothel ausgekleidet und enthalten primitive kernhaltige Erythroblasten. Die mütterlichen Gefäße im Labyrinth lassen sich davon unterscheiden, da sie lakunär sind, kein Endothel besitzen und kernlose Erythrozyten enthalten. Beide Gefäßarten treten zum Austausch von Gasen und Nähr-

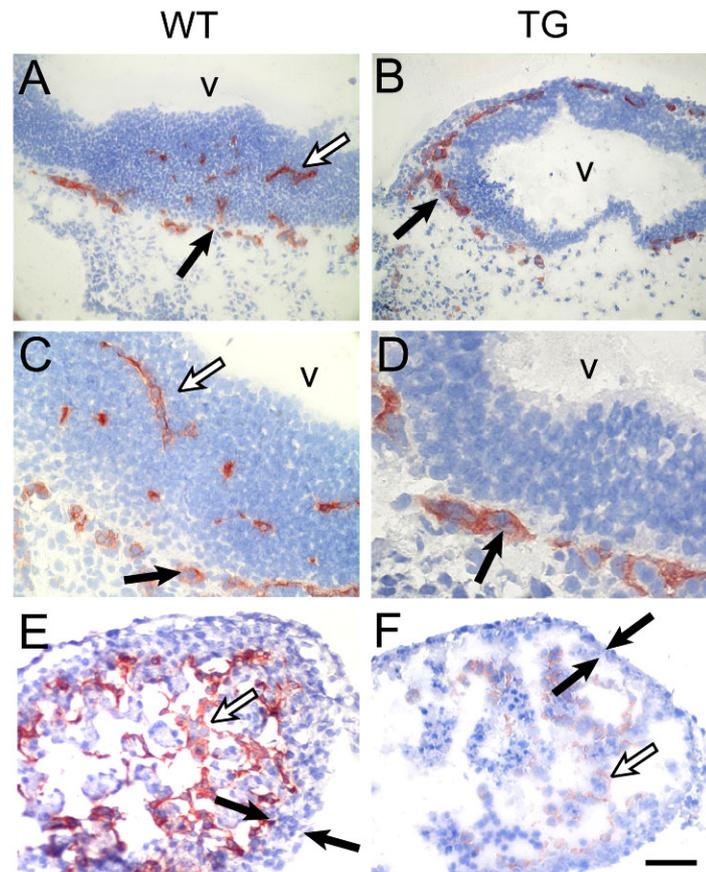


Abb. 3.2.5 Defekte in Gefäß- und Herzentwicklung in *flk-1* p/e-HIFdn Embryonen

Wildtyp- (WT) und *flk-1* p/e-HIFdn transgene (TG) Embryonen wurden an Tag E10,5 präpariert, Gefrierschnitte angefertigt und eine immunhistochemische Färbung gegen Pecam-1 durchgeführt. **A.** und **C.** Im Kopfbereich von WT Embryonen hatte sich der perineurale vaskuläre Plexus (PNV) gebildet (schwarze Pfeile). Vom PNV ausgehend wanderten Pecam-1 positive Gefäße ins Neuroektoderm ein (leere Pfeile). **B.** und **D.** In TG Embryonen waren Pecam-1 positive Endothelzellen vorhanden. Der PNV wurde ausgebildet (Pfeile), von ihm sprossen aber keine Gefäße in das Neuroektoderm ein. **E.** Herz eines WT Embryos an E11,5. Eine mehrschichtige Ventrikelwand hatte sich ausgebildet (schwarze Pfeile) und an der luminalen Seite fanden sich Trabekulae, die mit Pecam-1 positiven Endokardzellen bedeckt waren (leerer Pfeil). **F.** Im Herz von TG Embryonen wurde nur eine dünne Ventrikelwand gebildet (schwarze Pfeile). Die Trabekel fehlten, das Endokard war schwach positiv für Pecam-1 und disorganisiert (leerer Pfeil). v= Gehirnventrikel, Balken: A,B,E,F, 100 μ m C,D, 50 μ m

stoffen in engen Kontakt. Wildtyp- und transgene Embryonen zeigten keine auffälligen Unterschiede in der Plazentabildung. Die Organe zeigten keinen Größenunterschied und waren gut vaskularisiert. Embryonale Gefäße, die in die Labyrinthenschicht eindringen und mit den mütterlichen Gefäßen in Kontakt traten, ließen sich durch die kernhaltigen

Erythroblasten in der HE Färbung und mittels des Pecam-1 positiven Endothels deutlich identifizieren (Abb. 3.2.6).

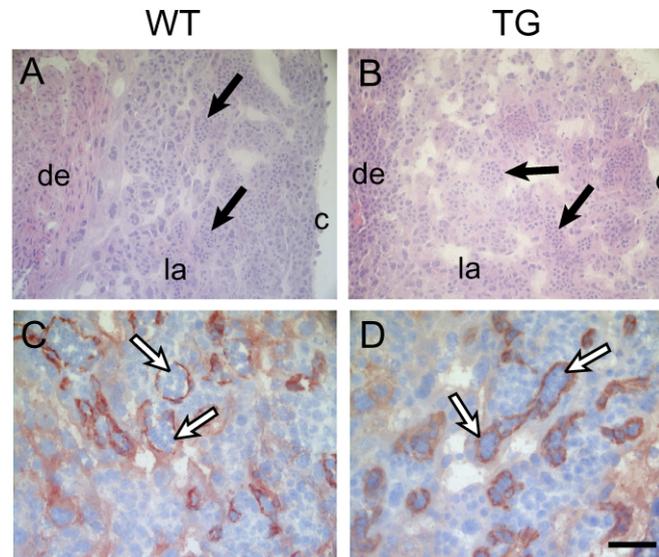


Abb. 3.2.6 Bildung einer normalen Plazenta in *flk-1* p/e-HIFdn Embryonen

Die Plazentas von Wildtyp- (WT) und *flk-1* p/e-HIFdn transgenen (TG) Embryonen wurden an Tag E10,5 präpariert und Gefrierschnitte angefertigt. **A.** und **B.** Hämatoxylin und Eosin Färbung von WT (A) und TG (B) Plazenta. Das Organ war mehrschichtig aufgebaut (c=Chorionplatte, la=Labyrinthenschicht und de=mütterliche Dezidua). Im Labyrinth traten embryonale Gefäße, die kernhaltige Erythroblasten enthielten (Pfeile), mit den Blutlakunen der Mutter in engen Kontakt. **C.** und **D.** Immunhistochemische Färbung gegen Pecam-1 von WT und TG Plazenta. Die Endothelzellen der embryonalen Blutgefäße (Pfeile) in der Labyrinthenschicht waren positiv für Pecam-1. Balken: A,B, 100 μ m C,D, 50 μ m

Um eine mögliche Erklärung für den hier beschriebenen Phänotyp auf molekularer Ebene zu erhalten, wurde aus Wildtyp und HIFdn Transgenen an Tag E10,5 RNA isoliert und semiquantitative RT-PCRs durchgeführt. Damit wurde die Expression verschiedener endothelialer Marker untersucht. Es wurden jeweils 1,5 μ g RNA für die RT Reaktion eingesetzt, und eine PCR mit 25 Zyklen für das Haushaltsgen GAPDH bestätigte, dass jeweils gleiche Mengen cDNA in den Reaktionen von Wildtyp- und transgenen Embryonen eingesetzt wurde (Abb. 3.2.7). Im Vergleich zeigten sich keine Unterschiede in den Transkripten von VE-Cadherin, Pecam-1 und Tie-1. In transgenen Mausembryonen war die Expression von Flk-1 sichtbar reduziert und die Transkripte

von Tie-2 und Flt-1 waren unter der Nachweisgrenze, sogar nach 35 PCR Zyklen (n=4). Es war also selektiv die Expression einiger endothelialer Markergene in den Transgenen reduziert. Die Expression der entsprechenden Liganden VEGF, Ang-1, Ang-2 zeigte keinen Unterschied in Wildtyp und Transgenen (Abb. 3.2.7 und Daten nicht gezeigt).

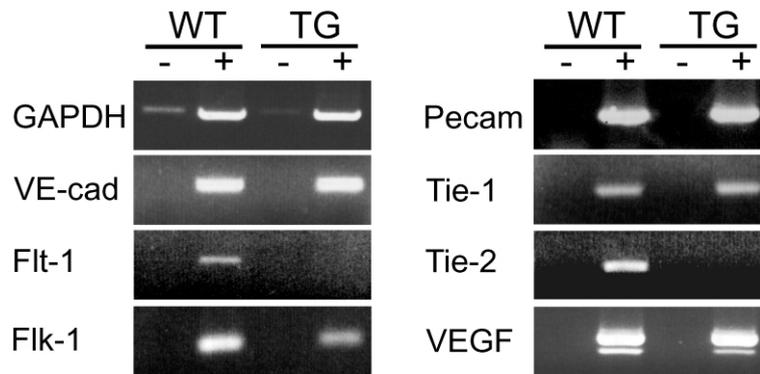


Abb. 3.2.7 Expression endothelialer Marker

Wildtyp- (WT) und flk-1 p/e-HIFdn transgenen (TG) Embryonen wurden an Tag E11,5 präpariert und RNA isoliert. Durch semiquantitative Reverse Transkriptase (RT)-PCR wurde die Expression von endothelialen Marker Genen untersucht (+). Gleiche Mengen eingesetzter cDNA wurde bestätigt durch 25 PCR Zyklen für GAPDH. Es wurden Kontrollreaktionen ohne RT Enzym durchgeführt (-). In WT und TG Embryonen waren gleiche Mengen von GAPDH, Tie-1, VE-cadherin, Pecam-1 und VEGF vorhanden. Dagegen waren Tie-2, Flt-1 und im geringeren Maße Flk-1 im TG gegenüber WT Embryonen reduziert.

Die Expression von Flt-1 und Tie-2 wurde mittels Immunohistochemie auf Proteinebene untersucht (Abb. 3.2.8). In Wildtyp-Embryonen wurde eine deutliche Flt-1 Reaktivität der Blutgefäße festgestellt (Abb. 3.2.8 A und C). In HIFdn Transgenen dagegen wurde keine Flt-1 Expression beobachtet, wie am Beispiel des PNV in Abb. 3.2.8 B und D gezeigt. Auch Tie-2 ließ sich im Gefäßendothel von Wildtyp-Embryonen nachweisen (Abb. 3.2.8 E). In den HIFdn Transgenen zeigten Gefäße jedoch keinerlei Tie-2 Färbung (Abb. 3.2.8 F). Gefäße waren deutlich anhand kernhaltiger Erythroblasten im Lumen zu erkennen.

Diese Befunde legen nahe, dass der schwere kardio-vaskuläre Defekt in HIFdn Transgenen durch Beeinflussung des Angiopoietin/Tie-2 und VEGF Rezeptor Systems verursacht wurde.

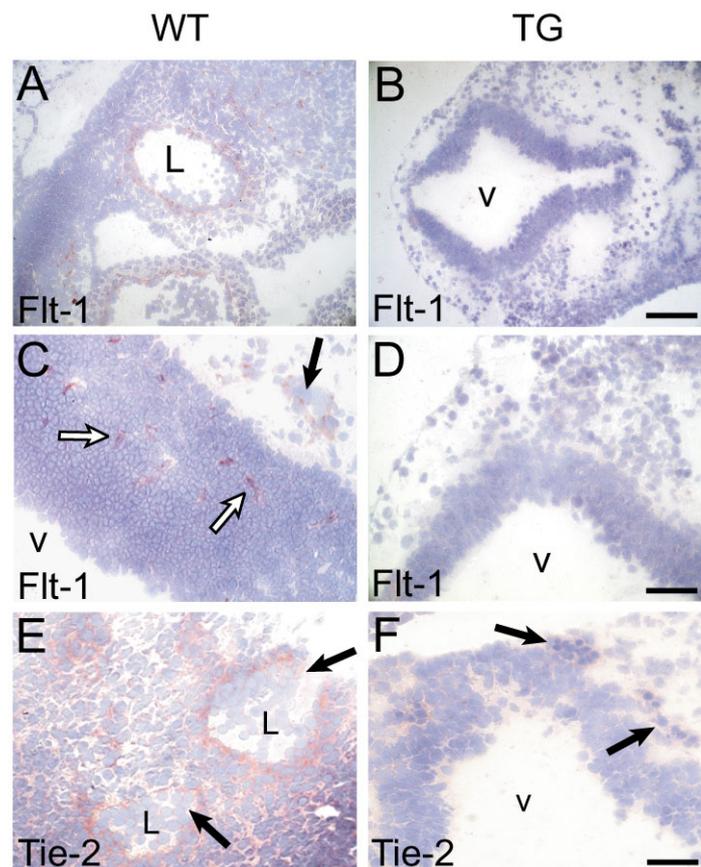


Abb. 3.2.8 Fehlende Flt-1 und Tie-2 Expression in flk-1 p/e-HIFdn Embryonen

Wildtyp- (WT) und flk-1 p/e-HIFdn transgenen (TG) Embryonen wurden an Tag E10,5 präpariert, Gefrierschnitte hergestellt und immunhistochemische Färbungen gegen Flt-1 (A-D) oder Tie-2 (E und F) durchgeführt. **A.** In WT Embryonen waren Blutgefäße Flt-1 positiv. **B.** In TG Embryonen wurden keine Flt-1 positiven Gefäße angefärbt. **C.** Flt-1 positive Gefäße in perineuralen vaskulären Plexus (PNV, schwarzer Pfeil) oder im Neuroepithel (leere Pfeile) von WT Embryonen. **D.** Im PNV von TG Embryonen wurden keine Flt-1 positiven Gefäße detektiert. **E.** WT Embryonen zeigten Tie-2 Reaktivität in Blutgefäßen (Pfeile). **F.** Dagegen war in TG Embryonen nur eine schwache Hintergrundreaktivität in Gefäßen des PNV zu beobachten (Pfeile).

v= Gehirnvtrikl, L=Lumen des Blutgefäßes,

Balken: A,B, 100 μ m C-F, 50 μ m

3.3 Die Regulation des humanen VEGF Rezeptor-2 (*KDR*) Gens

Der VEGF Rezeptor-2 ist einer der ersten Marker für differenzierende vaskuläre Vorläuferzellen im primitiven Mesoderm. Die Untersuchung der Genregulation von VEGF Rezeptor-2 kann daher wichtige Kandidaten liefern, die bei der Differenzierung von vaskulären Zellen eine Rolle spielen. Die Genregulation des murinen VEGF Rezeptor-2 (*flk-1*) ist bereits ausführlich *in vitro* und *in vivo* dokumentiert worden. Der Promotor enthielt funktionale Bindungsstellen für HIF2 α , Ets-1, NF κ B und CREB (Rönicke et al., 1996; Kappel et al., 1999; Illi et al., 2000). Der Promotor alleine reichte jedoch nicht aus, um die Expression von Reportergenen in transgenen Mäusen zu induzieren (Kappel et al., 1999). Dafür waren zusätzlich noch Enhancer Elemente aus dem 1. Intron des *flk-1* Gens nötig (Kappel et al., 1999). Diese Enhancer Elemente wurden bis auf ein 510 bp Fragment am 3' Ende des 1. Introns eingegrenzt und beinhalteten funktionelle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der Ets, SCL/Tal-1, GATA und Hox Familien (Kappel et al., 2000; Wu et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit sollte eine vergleichende Untersuchung die Regulation des humanen VEGF Rezeptor-2 (*KDR*) Gens klären. Im *KDR* Promotor sind Sp1, NF κ B und GATA Bindungsstellen charakterisiert worden (Patterson et al., 1995; Minami et al., 2001). Diese Faktoren erklärten aber nicht die spezifische Aktivität des Promotors in Endothelzellen. Daher sollte hier untersucht werden, ob Ets und HIF Familienmitglieder Regulatoren des *KDR* Gens sind, wie bereits für *flk-1* gezeigt werden konnte. Insbesondere sollte untersucht werden, ob es im *KDR* Gen dem *flk-1* Gen homologe Intron Enhancer Elemente gibt, die die endothelspezifische Expression des *KDR* Gens *in vivo* vermitteln.

3.3.1 Untersuchung des *KDR* Promotors

Zunächst wurden drei Klone einer humanen genomischen DNA Bibliothek (P1 Bakteriophagen, Genome Sys.) charakterisiert. Diese drei Klone sollten den 5' Bereich des *KDR* Gens enthalten (Yin et al., 1998). Die DNA der drei Klone wurde mit den

Restriktionsenzymen XhoI, SmaI oder beiden zusammen verdaut. Die DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend durch einen Kapillartransfer auf einer Nylonmembran immobilisiert. Ein kurzes Fragment des *KDR* Promotors wurde mittels PCR amplifiziert (-252/+20), radioaktiv markiert und mit der immobilisierten DNA hybridisiert. Ein spezifisches Hybridisierungssignal wurde in einem DNA-Fragment von über 12 kbp detektiert (Abb. 3.3.1 A). Zwei der Klone enthielten den *KDR* Promotor: 1-0748-G6 und 1-0094-H8. Der dritte Klon (1-0032-F7) zeigte kein Hybridisierungssignal. Diese beiden positiven Klone wurden in den nachfolgenden Experimenten für die Klonierung des *KDR* Promotors verwendet. Zur Charakterisierung der Klone wurde die DNA mit weiteren Restriktionsenzymen verdaut und eine Southern-Blot Analyse durchgeführt (Abb. 3.3.1 B). Es zeigte sich jeweils ein spezifisches Hybridisierungssignal im BamHI (6,6 kbp), EcoRI (11 kbp) und HindIII (10 kbp) Verdau. Nach Restriktionsverdau mit BamHI und einem zweiten Enzym wurden Hybridisierungssignale von je einem DNA-Fragment detektiert (mit EcoRI 6,8 kbp, HindIII 6,3 kbp, XhoI 4,9 kbp). Mittels spezifischer Oligonukleotide und PCR wurde ein 1,2 kbp großes *KDR* Promotorfragment (-763/+390, relativ zum Transkriptionsstart) amplifiziert (Abb. 3.3.1 C) und in den pCR2.1 Vektor (Invitrogen) kloniert (Nukleotidsequenz siehe Anhang 7.2). Aus diesem Plasmid wurde ein 1,1 kbp Fragment (-763/+296) durch SacI und XhoI Verdau ausgeschnitten und mit dem pGL2basic Vektor (Promega) ligiert. In diesem Reporterplasmid steuerte der *KDR* Promotor die Expression des Luziferase Reportergens. Dieses Reporterplasmid wurde in A293 Zellen transfiziert, nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luziferase-Aktivität als Maß für die Aktivität des Promotors im Luminometer gemessen. Die transiente Co-Transfektion mit CMV-HIF2 α resultierte in einer starken Aktivierung des *KDR* Promotors (Abb. 3.3.2 A). Um zu untersuchen, ob andere Familienmitglieder der HIF bzw. Ets Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf den *KDR* Promotor hatten, wurden HIF1 α , Ets-1 oder Ets-2 in A293 Zellen exprimiert. Außer HIF2 α war kein Effekt der transfizierten Faktoren auf den *KDR* Promotor zu beobachten (Abb. 3.3.2 A).

Um zu überprüfen, ob die Stimulation des *KDR* Promotors durch HIF2 α ein spezifischer Effekt war, wurde das *KDR* Promotor-Luziferase Konstrukt oder ein *SV40* Promotor-Luziferase Reporterplasmid in A293 Zellen transfiziert. Die basale Aktivität der Promotoren war vergleichbar, die Co-Transfektion von HIF2 α stimulierte den *KDR* Promotor sehr stark, den *SV40* Promotor aber nur schwach (Abb. 3.3.2 B).

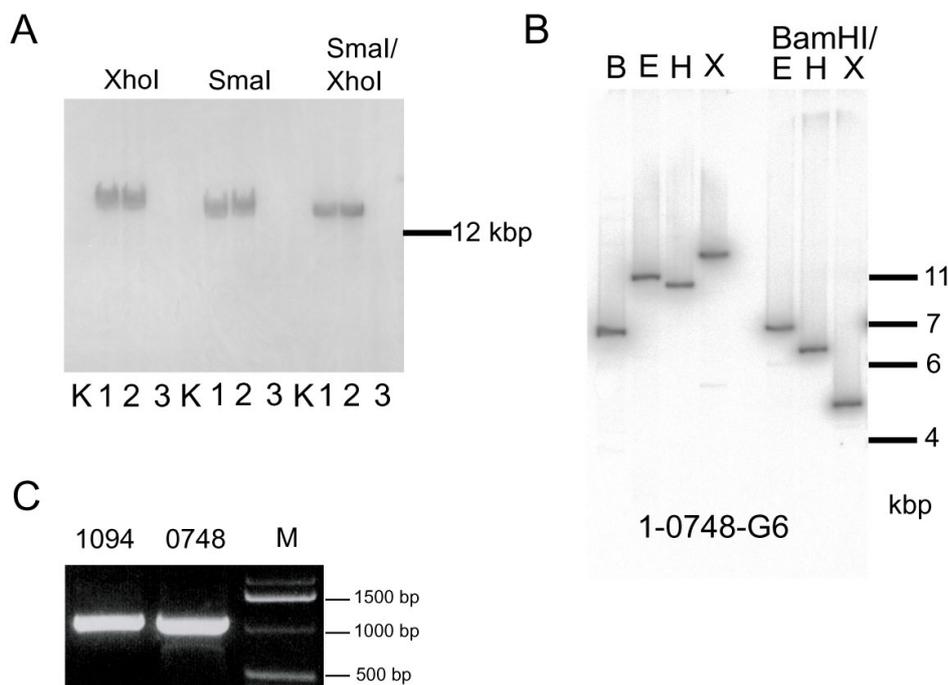


Abb. 3.3.1 Klonierung des *KDR* Promotor

A. Southern-Blot Analyse. Humane genomische DNA wurde aus P1 Klonen isoliert. Die DNA wurde jeweils mit den Restriktionsenzymen XhoI, SmaI oder SmaI+XhoI verdaut und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA wurde auf eine Nylonmembran immobilisiert. Ein Fragment aus dem *KDR* Promotor (-252/+20) wurde mittels PCR amplifiziert, radioaktiv markiert und mit der immobilisierten DNA hybridisiert. Die DNA-Sonde hybridisierte mit Restriktionsfragmenten über 12 kbp von Klon 1-0748-G6 und 1-1094-H8. **B.** Genomische DNA des P1 Klons 1-0748-G6 wurde jeweils mit den Restriktionsenzymen BamHI (=B), EcoRI (=E), HindIII (=H), XhoI (=X) oder BamHI+EcoRI, BamHI+HindIII, BamHI+XhoI verdaut. Die DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran immobilisiert. Die DNA wurde mit der radioaktiven Sonde aus A hybridisiert. Es wurde in den einzelnen Spuren spezifisch jeweils ein Restriktionsfragment unterschiedlicher Größe detektiert. **C.** PCR Amplifikation eines Fragmentes des *KDR* Promotors (-763/+390) aus der DNA der P1 Klone. M=Marker, K=Kontrolle (DNA die den *KDR* Locus nicht enthielt)

1= Klon Nr. 1-0748-G6, 2= Klon Nr. 1-1094-H8, 3= Klon Nr. 1-0032-F7

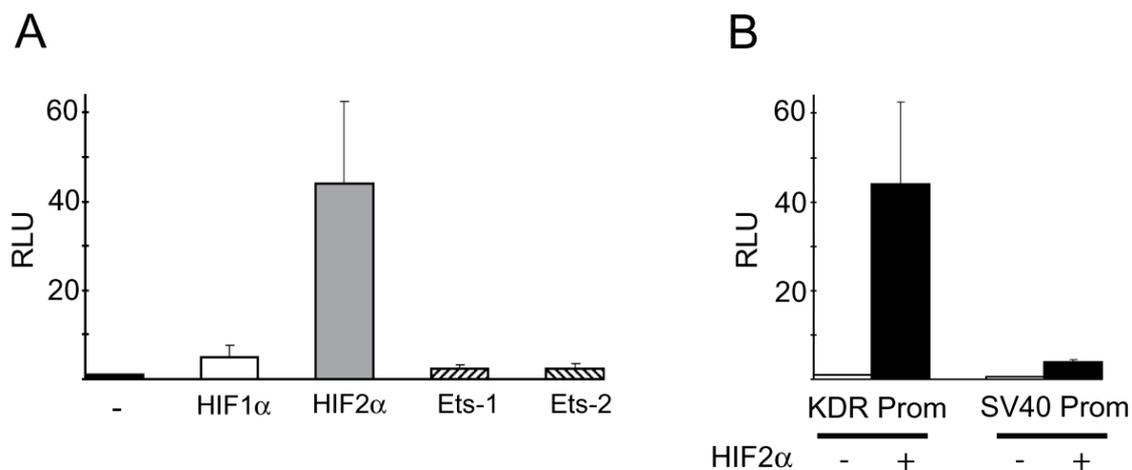


Abb. 3.3.2 HIF2 α Expression stimuliert die Aktivität des *KDR* Promotors

A. Ein 1,1 kbp *KDR* Promotorfragment (-763/+296) wurde mit dem Luziferase Reportergen fusioniert. Dieses Konstrukt wurde für transiente Transfektion von A293 Zellen verwendet und die Luziferase-Aktivität in Zelllysaten bestimmt. HIF1 α , HIF2 α , Ets-1 oder Ets-2 wurden co-transfiziert und der Einfluss auf die Luziferase-Aktivität bestimmt. Nur HIF2 α konnte den *KDR* Promotor stark aktivieren. **B.** Das *KDR* Promotor-Luziferase Konstrukt (siehe A) oder ein *SV40* Promotor-Luziferase Reporterplasmid wurde mit oder ohne HIF2 α in A293 Zellen transfiziert. Im Vergleich zum *KDR* Promotor resultierte dies in einer schwachen Aktivierung des *SV40* Promotors durch HIF2 α .

Eine Co-Expression von CMV-HIF2 α und CMV-Ets-1 resultierte in einer gleich starken Aktivierung wie durch HIF2 α alleine (Abb. 3.3.3 A). Es war also keine kooperative Wirkung von HIF2 α und Ets-1 zu beobachten. Dieser Befund ließ Unterschiede in der Regulation von *KDR* und *flk-1* vermuten. Zur internen Kontrolle des Experiments wurde der *flk-1* Promotor mit CMV-Ets-1 in A293 Zellen co-transfiziert (Abb. 3.3.3 B). Dies führte zu einer starken Stimulation des *flk-1* Promotors, wie bereits beschrieben (Elvert et al., 2003). Luziferase Reporter-Experimente wurden auch in der endothelialen Zelllinie HUE durchgeführt. Wiederum wurde der *KDR* Promotor stark durch Überexpression von HIF2 α stimuliert, während Expression von Ets-1 keinen Einfluss auf den Promotor ausübte (Abb. 3.3.3 C). Um den Effekt von HIF2 α näher zu charakterisieren, wurde die dominant negative HIF2 α Mutante (HIFdn) eingesetzt (Elvert et al., 2003 und diese Arbeit 3.2). Die Expression von HIFdn in HUE Zellen reduzierte die basale Aktivität des *KDR* Promotors. Wurde der Promotor durch

HIF2 α stimuliert, so konnte diese Aktivierung durch Co-Expression von HIFdn stark inhibiert werden (ca. um 50%) (Abb. 3.3.3 D).

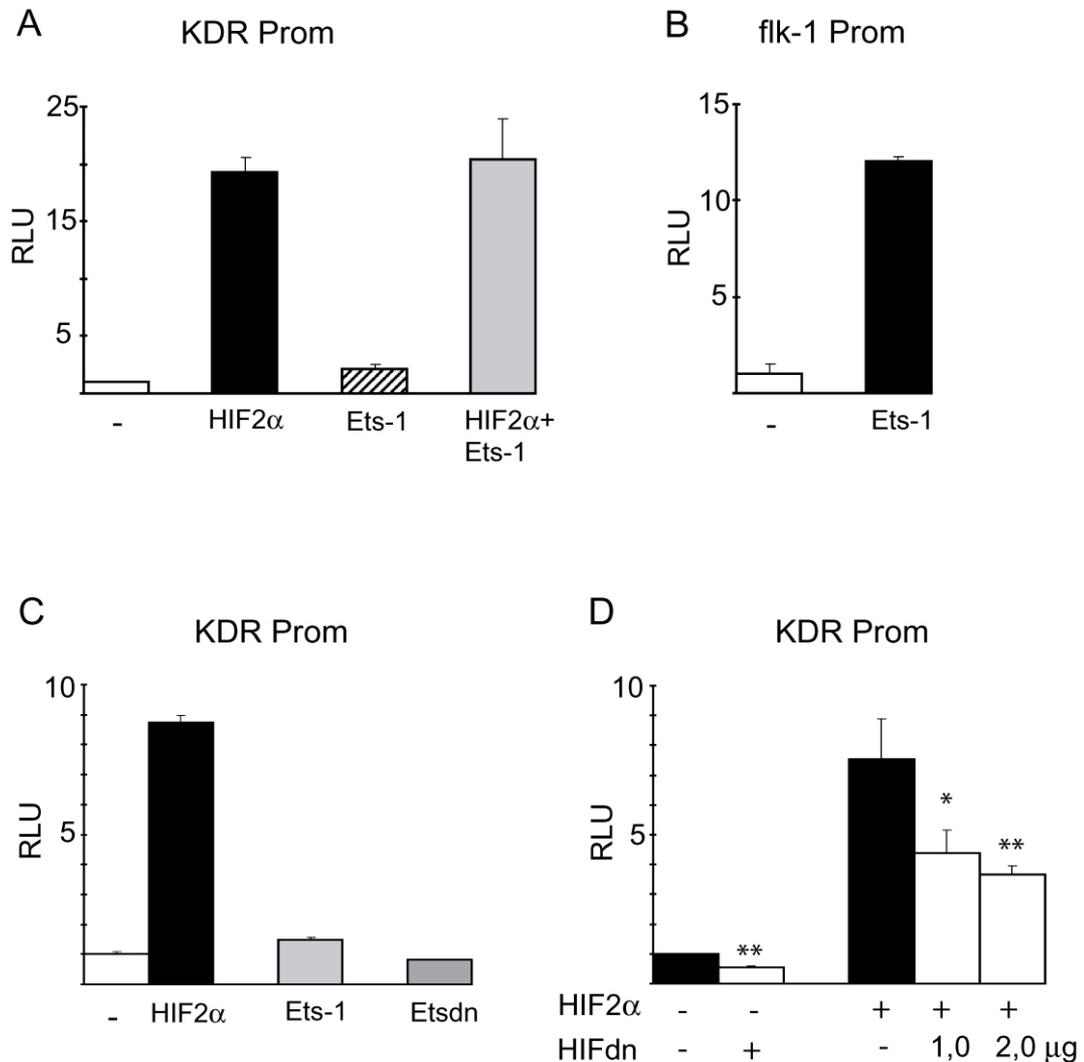


Abb. 3.3.3

A. Transfektion von A293 Zellen mit *KDR* Promotor-Luziferase und Co-Transfektion mit HIF2 α , Ets-1 oder HIF2 α +Ets-1. **B.** Ein *flk-1* Promotor (-640/+299)-Luziferase Konstrukt wurde in A293 Zellen transfiziert. Co-Transfektion mit Ets-1 führte zu einer starken Stimulation der *flk-1* Promotoraktivität. **C.** *KDR* Promotor-Luziferase Aktivität in HUE Zellen. HIF2 α stimulierte den *KDR* Promotor, während Co-Transfektion mit Ets-1 keinen Einfluss hatte. Co-Transfektion der dominant negativen Mutante Etsdn hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Aktivität des *KDR* Promotors. **D.** In transfizierten HUE Zellen wurde die basale Aktivität des *KDR* Promotors durch Expression der dominant negativen Mutante HIFdn signifikant reduziert. Stimulation des *KDR* Promotors durch HIF2 α konnte durch Co-Expression von HIFdn inhibiert werden. ** $p < 0,03$ * $p < 0,05$

Um zu untersuchen, ob die basale Aktivität des *KDR* Promotors von endogenen Ets Faktoren in Endothelzellen abhängig war, wurde eine dominant negative Ets Mutante in HUE Zellen exprimiert (Etsdn). Dieser Mutante fehlte die Transaktivierungsdomäne und Stimulation des *flk-1* Promotors mit Wildtyp Ets Faktoren konnte durch Co-Expression von Etsdn unterdrückt werden (A. Nicolaus, nicht publiziert). Hier wurde ein Vektor eingesetzt, bei dem retrovirale Elemente die Expression von Etsdn steuerten (plxs-Etsdn, A. Nicolaus, nicht publiziert). Die Expression von Etsdn beeinflusste die Aktivität des *KDR* Promotors nicht (Abb. 3.3.3 C).

Der Sequenzvergleich des 939 bp (-640/+299) *flk-1* Promotor und dem 1,1 kbp *KDR* Promotor zeigte nur eine geringe Sequenz-Übereinstimmung von 48% (Daten nicht gezeigt). Allerdings waren einige cis-aktive Elemente in beiden Promotoren konserviert. Die funktionellen Sp1/Sp3 (Patterson et al., 1997; Hata et al., 1998) und die GATA Bindungsstelle in der 5'UTR (+110) (Minami et al., 2001) des *KDR* Promotors waren auch im *flk-1* Promotor zu finden (Daten nicht gezeigt). Das CREB Bindungsmotiv (+10), welches im *flk-1* Promotor untersucht wurde (Illi et al., 2000), war im *KDR* Promotor konserviert. Der *flk-1* Promotor enthielt zwei Tandem HIF2 α /Ets-1 Elemente. Die Bindungsstellen von HIF2 α und Ets-1 lagen dicht beieinander und es wurde gezeigt, dass diese Transkriptionsfaktoren auch direkt interagieren (Elvert et al., 2003). Im *KDR* Promotor fanden sich zwei potentielle HIF2 α Bindungsstellen an der gleichen Position wie im *flk-1* Promotor. Die erste HIF2 α Bindungsstelle des *KDR* Promotors (HBS1, -144) enthielt einen Basenaustausch gegenüber der HBS1 im *flk-1* Promotor (GGCTTG statt GGCGTG). Die HBS2 (-88) war erhalten (in reverser Orientierung, CCGCAC). Die beiden Bindungsstellen für Ets Faktoren im *flk-1* Promotor (EBS3+6) (Kappel et al., 2000) waren im *KDR* Promotor nicht vorhanden (Daten nicht gezeigt). Es fanden sich im hier untersuchten 1,1 kbp *KDR* Promotorfragment zwar einige konsensus EBS Motive (GGAA/T), doch die flankierenden Nukleotide passten nicht zu Bindungsstellen eines bekannten Ets Faktors, wie die Analyse mit dem MatInspector Algorithmus zeigte (Quandt et al., 1995, Daten nicht gezeigt).

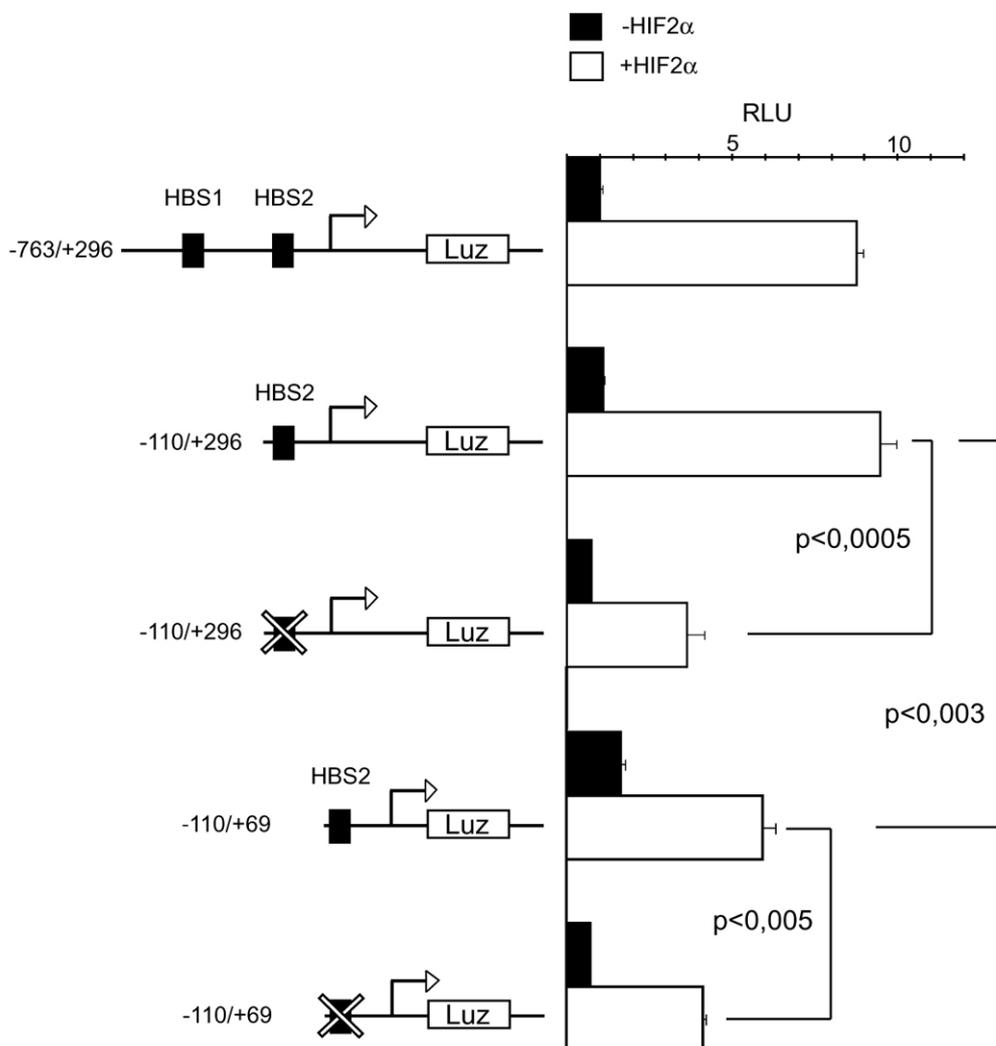


Abb. 3.3.4 Charakterisierung potentieller HBS im *KDR* Promotor

Transiente Transfektionen von HUE Zellen mit verschiedenen *KDR* Promotor-Luziferase Konstrukten (links). Die Luziferase-Aktivität wurde nach Co-Transfektion von HIF2α (offene Balken) oder ohne (schwarze Balken) bestimmt. Mutation einer DNA-Bindungsstelle für HIF2α (HBS2) im *KDR* Promotor führte zu signifikanter Reduzierung der Luziferase-Aktivität. Deletion der 5'UTR reduzierte die Promotoraktivität ebenfalls. HBS=HIF2α DNA-Bindungsstelle, Luz=Luziferase, Pfeil= Transkriptionsstart

Um die Bereiche des *KDR* Promotors weiter einzugrenzen, die für die Aktivierung durch HIF2α nötig waren, und um zu untersuchen, ob die potentiellen HBS funktionell waren, wurde eine Serie von Mutanten des *KDR* Promotors hergestellt. Die Promotorfragmente steuerten jeweils die Expression des Luziferase Reportergens. Ausgehend vom -763/+296 Fragment wurde durch KpnI Verdau und Religation eine

Deletionsmutante hergestellt, die am 5' Ende 650 bp kürzer war (-110/+296) und der somit HBS1 fehlte. In einem weiteren Konstrukt wurde mittels ortsgerichteter Mutation die potentielle HBS2 mit der Sequenz CCGCAC zu der Sequenz GTCTCT mutiert (-110/+296//mutHBS). Desweiteren wurde mittels PCR ein Promotorfragment amplifiziert, in dem ein Teil der 5' untranslatierten Region (5'UTR) fehlte (-110/+69). In diesem Konstrukt wurde zusätzlich die HBS2 mutiert (-110/+69//mutHBS). Diese Reporterplasmide wurden in HUE Zellen transfiziert und die ihre Aktivität mit und ohne HIF2 α Co-Expression getestet (Abb. 3.3.4). Die Deletion der Region -763 bis -110 zeigte keinen Einfluss auf die Stimulierbarkeit des *KDR* Promotors. HBS1 hatte also keinen Einfluss auf den Promotor. Wurde im -110/+296 Fragment jedoch die HBS2 mutiert, so resultierte dies in einem signifikanten Verlust an Promotoraktivität. Die Deletion der 5'UTR (-110/+69) führte ebenfalls zu einer signifikanten, wenn auch geringeren Reduzierung. Wurde in dem -110/+69 Fragment noch das HBS2 mutiert, so wurde die Stimulation noch stärker inhibiert. Die HBS2 war also von Bedeutung für die Stimulierbarkeit des *KDR* Promotors. In der 5'UTR wurde kein HBS Motiv gefunden. Dort befand sich ein konserviertes GATA cis-aktives Element (+110). Möglicherweise hatte dies einen Einfluss auf die Aktivierbarkeit des *KDR* Promotors (mögliche Interaktion mit HIF2 α).

3.3.2 Einfluss von Hey Faktoren auf die Genregulation von *flk-1* und *KDR*

Hey Faktoren sind transkriptionelle Repressoren, die in Blutgefäßen exprimiert werden. Bisher sind die Familienmitglieder Hey1 (HESR, HRT1, CHF2), Hey2 (HRT2, CHF1, gridlock) und HeyL (HRT3) bekannt. Es ist gezeigt worden, dass Hey Faktoren mit ARNT interagieren und dadurch die HIF vermittelte Genexpression inhibieren. Da *flk-1* und *KDR* Zielgene von HIF2 α sind, sollte hier untersucht werden, ob Hey Faktoren die Expression von *flk-1* und *KDR* beeinflussen. Dazu wurden Luziferase-Reportergen

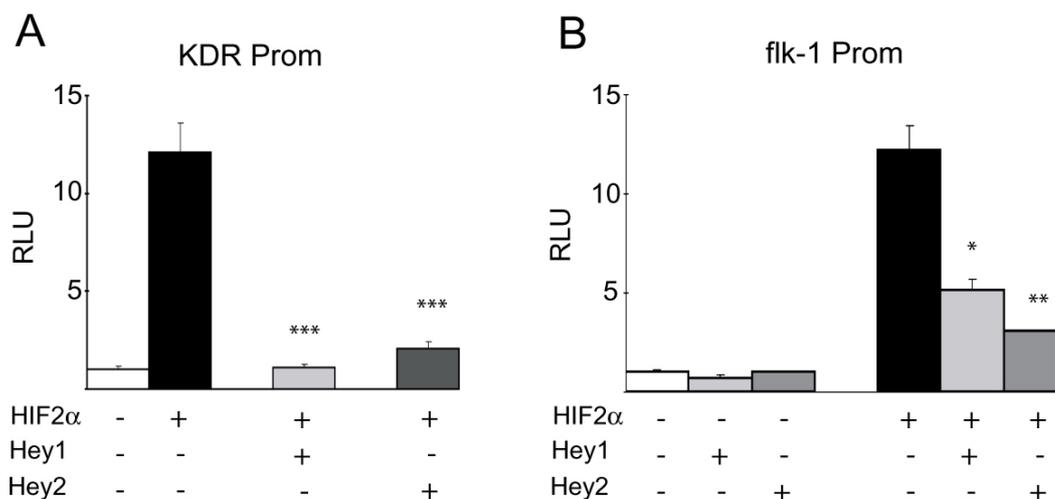


Abb. 3.3.5 HIF2 α vermittelte Aktivierung des *flk-1* und *KDR* Promotors wird durch Hey Faktoren inhibiert

A. A293 Zellen wurden mit *KDR* Promotor-Luziferase transfiziert. Co-Transfektion mit HIF2 α stimulierte den Promotor. Durch Co-Expression von Hey1 oder Hey2 wurde die HIF2 α Stimulation vollständig inhibiert. **B.** Der *flk-1* Promotor-Luziferase wurde durch HIF2 α Expression stimuliert. Co-Transfektion von Hey1 oder Hey2 inhibierte diese Stimulation signifikant. Die basale *flk-1* Promotoraktivität wurde durch Expression von Hey1 oder Hey2 nicht beeinflusst. ***p<0,0005, **p<0,001, *p<0,003

Experimente durchgeführt. Die Aktivität des *KDR* Promotors (-763/+296) wurde in A293 Zellen untersucht. Die Expression von HIF2 α stimulierte den *KDR* Promotor stark und eine Co-Expression von CMV-Hey1 oder CMV-Hey2 (M. Gessler, Universität Würzburg) inhibierte diese Stimulation vollständig (Abb. 3.3.5 A). Die Untersuchung der Aktivität des *flk-1* Promotors in A293 Zellen ergab einen ähnlichen Befund. Eine starke Stimulation durch HIF2 α wurde durch Co-Transfektion von CMV-Hey1 oder CMV-Hey2 stark reduziert (Abb. 3.3.5 B). Die Hey1 und Hey2 Expression wirkte sich aber nicht signifikant auf die basale Aktivität des *flk-1* Promotors aus (Abb. 3.3.5 B). Dasselbe Ergebnis wurde in HUE Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt).

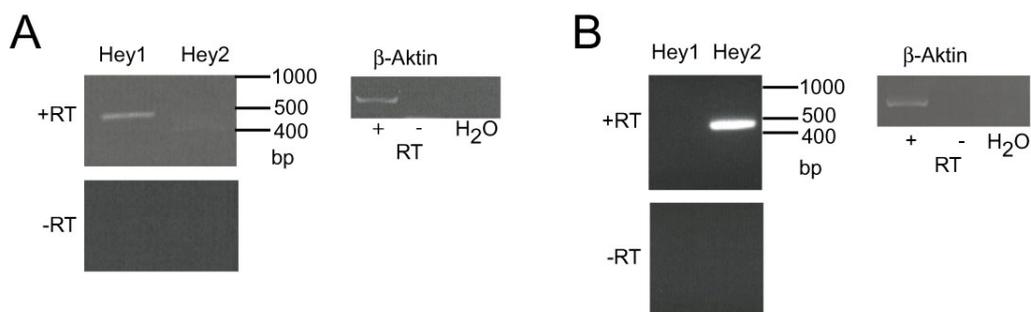


Abb. 3.3.6 Hey Faktoren werden in Endothelzellen exprimiert

Humane Endothelzellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert (HUVEC in **A** oder HUE in **B**). RNA wurde isoliert und eine Reverse Transkriptase (RT)-PCR durchgeführt (+). Dabei wurden spezifische Oligonukleotide für humanes Hey1, Hey2 oder β -Aktin verwendet. Eine Kontrollreaktion ohne RT wurde durchgeführt (-RT). Hey1 wurde in HUVEC exprimiert, während Hey2 in HUE Zellen nachgewiesen wurde.

Obwohl Hey Faktoren in Gefäßen exprimiert werden, ist nicht ganz klar, welcher Hey Faktor in den verschiedenen Zelltypen, die am Aufbau von Gefäßen beteiligt sind, exprimiert wird. HeyL wird in Perizyten und glatten Muskelzellen exprimiert (Leimeister et al., 2000), während für Hey1 und Hey2 nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, ob sie in Endothelzellen und/ oder glatten Muskelzellen der Gefäßwand exprimiert werden (Nakagawa et al., 1999; Leimeister et al., 2000). Daher wurde hier zunächst die Expression von Hey1 und Hey2 in kultivierten Endothelzellen untersucht. HUE Zellen und HUVEC wurden kultiviert bis die Zellen Konfluenz erreichten und dann wurde RNA aus den Zellen isoliert. Eine RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für Hey1 und Hey2 wurde durchgeführt. Dabei zeigte sich ein komplementäres Expressionsmuster. Hey1 wurde in HUVEC exprimiert, war aber nicht in HUE Zellen nachweisbar. Umgekehrt wurde Hey2 in HUE Zellen exprimiert, aber nicht in HUVEC (Abb. 3.3.6). Diese Befunde sprachen dafür, dass beide Faktoren in Endothelzellen exprimiert wurden, wobei nicht geklärt werden konnte, ob die komplementäre Expression ein Artefakt durch die Kultivierung der Zellen war, oder ob dies tatsächlich unterschiedliche Subpopulationen von Endothelzellen markierte. Hey Faktoren sind Kandidaten für negative Regulatoren des *VEGF Rezeptor-2* Gens. Um

diese Funktion *in vivo* zu erfüllen, müssen Hey Faktoren und VEGF Rezeptor-2 in derselben Zelle co-exprimiert werden. Ein Modell um dies zu untersuchen ist das neonatale Mausgehirn. Es ist gut dokumentiert, dass Flk-1 neonatal in Blutgefäßen im Gehirn exprimiert wird. Beginnend am postnatalen Tag (P) 10 läßt die Expression von

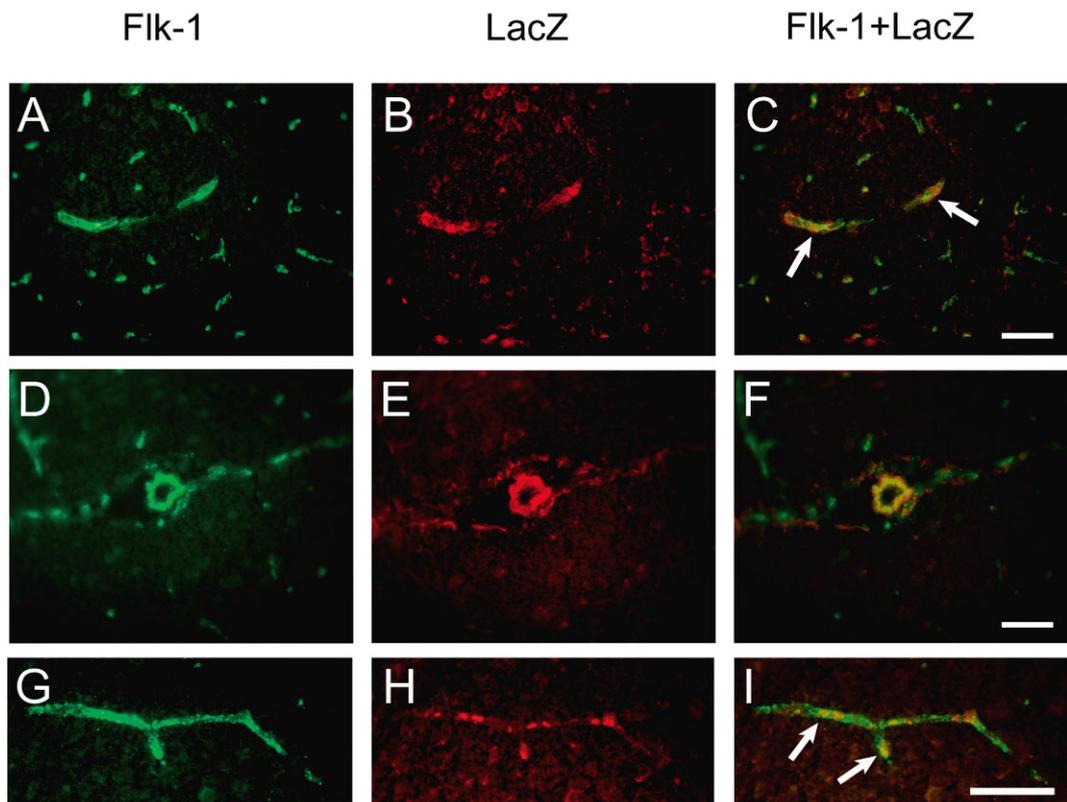


Abb. 3.3.7 Co-Expression von Hey2 und Flk-1

Gehirne von *hey2* +/-LacZ transgenen Mäusen wurden am Tag P10 präpariert. Es wurden Kryostat-Schnitte angefertigt und Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gegen Flk-1 (A, D, G) und LacZ (B, E, H) durchgeführt. Überlagerung der Färbungen (C, F, I) zeigte eine Co-Lokalisation von Flk-1 und LacZ positiven Zellen (Pfeile). Balken: 100 μ m

Flk-1 nach, so dass an P30 das Protein schließlich nicht mehr nachweisbar ist (Kremer et al., 1997). Daher sollte hier die Expression von Flk-1 und Hey Faktoren an P10 untersucht werden. Dazu wurden transgene Mäuse verwendet, bei denen heterozygot das *lacZ* Gen in den *hey2* Locus inseriert wurde (*hey2* +/-LacZ). Die Expression des *lacZ* Reportergens zeigte dasselbe Muster wie die endogene Hey2 Expression (Gessler

et al., 2002). Die Gehirne von heterozygoten und Wildtyp-Mäusen wurden an Tag P10 präpariert und auf Gefrierschnitten eine Doppel-Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von LacZ und Flk-1 durchgeführt. Alle Blutgefäße zeigten eine starke Expression von Flk-1 (Abb. 3.3.7 A, D, G). Das LacZ Signal war schwächer, aber mit Gefäßstrukturen assoziiert (Abb. 3.3.7 B, E, H). Die Überlagerung von Flk-1 und LacZ Färbung zeigte eine eindeutige Co-Lokalisation von LacZ positiven Zellkernen in Flk-1 positiven Gefäßen (Pfeile in Abb. 3.3.7 C, F, I). Nicht alle Flk-1 positiven Gefäße zeigten auch LacZ positive Zellen. Es konnte also eine teilweise Co-Expression der beiden Proteine festgestellt werden. In Gehirnen von Wildtyp-Kontrolltieren wurde keine LacZ Reaktivität festgestellt (Daten nicht gezeigt).

3.3.3 Identifizierung eines putativen Enhancer Elements im 1. Intron des *KDR* Gens

Es wurde untersucht, ob die humane DNA aus den P1 Klonen (siehe 3.3.1) dem *flk-1* Enhancer homologe Sequenzen enthält. Dazu wurde ein 430 bp Fragment des *flk-1* Enhancer (Kappel et al., 2000) mittels PCR amplifiziert, radioaktiv markiert und als Sonde für eine Southern-Blot Analyse verwendet. Die Hybridisierung der murinen Sonde mit der humanen DNA der Klone ergab ein spezifisches Signal eines Restriktionsfragmentes von 6,0 kbp nach SmaI oder SmaI/XhoI Verdau. Nach Verdau mit XhoI war ein Fragment von ca. 7 kbp detektierbar (Abb. 3.3.8 A). Dies stimmt mit der Restriktionskarte von Yin et al. (1998) überein. Dies war der erste Hinweis auf das Vorhandensein homologer Sequenzen im humanen Intron. Der Verdau mit weiteren Restriktionsenzymen und Southern-Blot Analyse diente zur weiteren Kartierung des Introns (Abb. 3.3.8 B). Es wurde jeweils ein Hybridisierungssignal im HindIII (5,5 kbp), EcoRI (5 kbp) und BamHI (2,7 kbp) Verdau detektiert. Im Doppelverdau mit BamHI/HindIII wurde ein positives DNA-Fragment von 2,1 kbp und im BamHI/EcoRI Verdau ein 2,2 kbp Fragment nachgewiesen.

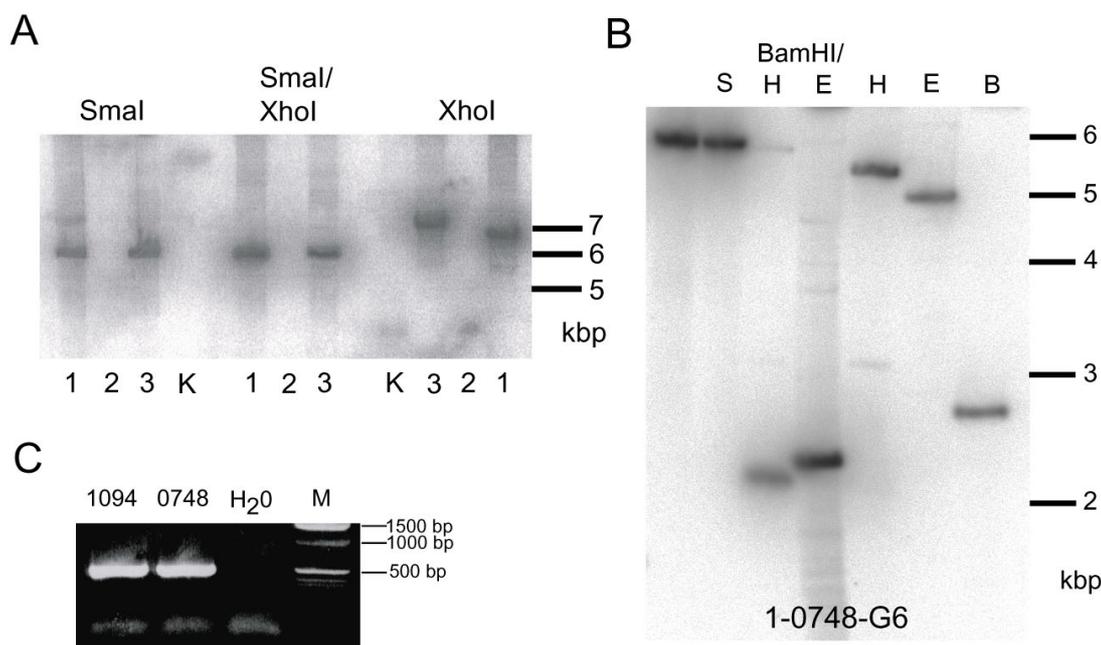


Abb. 3.3.8 Identifizierung putativer Enhancer Elemente im 1. *KDR* Intron

A. und B. Southern-Blot Analyse. **A.** Humane genomische DNA wurde aus P1 Klonen isoliert. Die DNA je wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI, SmaI oder SmaI+XhoI verdaut und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA wurde auf eine Nylonmembran immobilisiert. Ein Fragment aus dem *flk-1* Intron Enhancer (430 bp) wurde mittels PCR amplifiziert, radioaktiv markiert und mit der immobilisierten DNA hybridisiert. Die DNA-Sonde hybridisierte mit Restriktionsfragmenten von 6 kbp im SmaI und SmaI+XhoI Verdau und ca. 7 kbp Fragmenten im XhoI Verdau. **B.** Genomische DNA des P1 Klon 1-0748-G6 wurde jeweils mit den Restriktionsenzymen SmaI (=S), HindIII (=H), EcoRI (=E), BamHI (=B) oder BamHI+HindIII, BamHI+EcoRI verdaut. Es wurde eine Southern-Blot Analyse wie in A durchgeführt. In den verschiedenen Spuren hybridisierte die Sonde spezifisch mit jeweils einem Restriktionsfragment. **C.** PCR Amplifikation eines 523 bp Fragment aus dem 1. *KDR* Intron. M=Marker, K=Kontrolle (DNA, die den *KDR* Locus nicht enthielt)

1= Klon Nr. 1-1094-H8, 2= Klon Nr. 1-0032-F7, 3= Klon Nr. 1-0748-G6

Mittels PCR und spezifischer Oligonukleotide wurde das komplette 4,0 kbp große 1. Intron des *KDR* Gens amplifiziert und in den pCR2.1 Vektor (Invitrogen) kloniert. Die Nukleotidsequenz des 1. Introns wurde vollständig bestimmt (siehe Anhang 7.3) und ein Sequenzvergleich mit dem 1. Intron des *flk-1* Gens durchgeführt. Dies zeigte eine große Ähnlichkeit des funktionellen 510 bp *flk-1* Enhancer zu einer 523 bp langen Sequenz am 3' Ende des 1. Introns von *KDR*. Die 523 bp Sequenz im *KDR* Intron enthielt eine

Insertion von 14 Nukleotiden gegenüber dem *flk-1* Enhancer. Eine Sequenzidentität von 82% wurde zwischen dem 510 bp *flk-1* Enhancer und dem 523 bp *KDR* Intronfragment festgestellt. Dieses Fragment wurde mittels PCR amplifiziert und in den pCR2.1 Vektor (Invitrogen) kloniert (Abb. 3.3.8 C). Im *flk-1* Enhancer wurden bereits funktionelle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren gefunden. Ets, GATA und SCL/Tal-1 Bindungsstellen sind essentiell für die endothelspezifische Aktivität des murinen Enhancer (Kappel et al., 2000). Der vorliegende Sequenzvergleich zeigte, dass diese Bindungsstellen zwischen Maus und Mensch konserviert sind. Ebenfalls konserviert ist die funktionale Bindungsstelle für HoxB5 (Wu et al., 2003) (Abb. 3.3.9).

Eine Analyse der *KDR* Sequenz mit dem MatInspector Algorithmus (Quandt et al., 1995) ergab weitere potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Abb. 3.3.10). Dabei handelt es sich um AP1, NFAT und Nkx2.5, die somit neue Kandidaten für Regulatoren der *KDR* Expression darstellten. Interessanterweise war die 14 bp Insertion im *KDR* Intron genau eine mögliche NFAT Bindungsstelle. Am 5' Ende des *KDR* 1. Introns befand sich ein weiterer etwa 330 bp langer Bereich, der mit 80% Sequenzidentität konserviert war. Dessen Funktion ist bisher unbekannt, mögliche Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP1, NFAT und Ets Familie sind vorhanden. Außer diesen beiden Bereichen gab es keine längeren Sequenzübereinstimmungen zwischen dem 1. Intron von *flk-1* und dem von *KDR* (Daten nicht gezeigt).

Wie bereits beschrieben ist der murine *flk-1* Promotor alleine nicht in der Lage die Reporter-gen-Expression *in vivo* zu vermitteln, sondern benötigt dazu den *flk-1* Enhancer (Kappel et al., 1999). Die Funktion der putativen Enhancer Elemente im 1. Intron des *KDR* Gens wurde durch Reporter-gen-Analysen in transgenen Mausembryonen untersucht. Dazu wurden mehrere Reporterplasmide hergestellt, in denen das *lacZ* Reporter-gen unter der Kontrolle des murinen *flk-1* Promotors (-640/+299) sowie verschiedener Fragmente des humanen *KDR* 1. Introns (3' des *lacZ* Gens) stand (Abb. 3.3.11).

```

Mensch TAATGTACAGTC'TTTATGAGCCATTAT'TTCAGCTGTGGCAGT'TTGGTTACCA 52
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Maus   AAATGTGCTGTC'TTTAGAAAGCCACTGCCTCAGCT'TCTGCAGCTCAGATACCA 52

      GATA
GGGGAAGCGCAC'TAGAAAAT-TGATAAAGGAAAATGAGACAAGGTCATAGAT 103
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AAGGAAGTC'TGGTACACAGCATGATAAAAAGACAATGGGACGGGGTCACAGTG 104

TCTCTCACTCCC'TTCAGGG-TACGTAGATGAACTATATAAAAAATCCGTCTAA 154
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
GCTCCCCTCCC'TTTCAGGGGTATGGAGACGAGCTGTAGAGAGATGTCTCCAG 156

      HoxB5
GTGGGATTCGTTAATCAGCAATTTAGTCAAATGTGTACATCCTATGTTCTAT 206
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
GGAGTTTTCATTAATCAGCAATTTAGTCAATCTGTGCATCCTATGCTTTAC 208

      SCL/Tal-1
AAGAAATGTCAGTGGGTCC'TTCCCAAGGGAGTGAGATCATCAGATGAAGGT 258
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AAGAAATGTCAGTGGGCC-----TGAGATCATCAGATGGAGGT 246

      Ets-1
TCATTTGGTTTCAATGTCCCGTATCC'TTTGTAAAGCCTTGAAGTTGGCAAT 310
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TCATCGGGTTTCAATGTCCCGTATCC'TTTGTAAAGCCTTGAAGTTGGCAAC 298

      Ets-1
GCAGGAAAACAGGAAC'TCCACCC'TAGCTCCATGAATTGCAGAACTGTTGTGT 362
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
GCAGGAAAACAGGAAC'TCCACCC'TGGTGCCGTGAATTGCAGAGCTGTTGTGT 350

      SCL/Tal-1
TGGTTTATGACCATCTGCCCATTC'TTCCGTATGACACAGCTTGTGAACTT 414
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TGGTTTGTGACCATCTGCCCATTC'TTCCGTATGACACAGCTTGTGAACTT 402

TTACTGAGAATGGTGAAAAGTAAAT'TCCAGTTTTATACAATGAATTGCTGA 466
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TAAC'TGGGACTGGGGCAAAGTCAAT-CCCAC'TTATACAATGAATTGCTGA 453

AGAGGCC'TTTTAAAGTATAGAGTATGCATTGTTTATGGAAGGTGTTTCCTAT 518
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AGAGGCC'TTTTAAAC'TGGAGTGTGCATTGTTTATGGAAGGGCTTTCCTAT 505

TAGGT 523
* * *
TGGAT 510

```

Abb. 3.3.9 Homologie des *flk-1* Enhancer mit dem 1. Intron des *KDR* Gens

Der Sequenzvergleich des 510 bp *flk-1* Enhancer mit dem 1. Intron des *KDR* Introns zeigte eine große Ähnlichkeit des *flk-1* Enhancer und einem 523 bp Fragment am 3' Ende des 1. *KDR* Introns. Es wurde eine Sequenzidentität von 82% ermittelt (*=Übereinstimmung). Durch Analyse der Sequenz mit dem MatInspector Algorithmus wurden potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ermittelt. Einige Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren sind in Maus und Mensch konserviert (unterlegt).

TAATGTACAGTCTTTATGAGCCATTATTTTCAGCTGTGGCAGTTTGGTTACCAGGGGAAGCGCACTA
 GAAAATTGATAAAGGAAAATGAGACAAGGTCATAGATTCTCTCACTCCCTTCAGGGTACGTAGAT
 GATA API
 GAACTATATAAAAATCCGTCTAAGTGGGATTCGTTAATCAGCAATTTAGTCAAATGTGTACATCCT
 Nkx2.5 API
 ATGTTCTATAAGAAATGTCAGTGGGTCCTTTCCCAAGGGAGTGAGATCATCAGATGAAGTTCAT
 NFAT SCL/Tal-1
 TTGGTTTCAATGTCCCGTATCCTTTTGTAAAGACCTGAAGTTGGCAATGCAGGAAAACAGGAACTC
 Ets Ets
 CACCCTAGCTCCATGAATTGCAGAACTGTTGTGTGGTTTATGACCATCTGCCCATTTCTCCTGTTA
 SCL/Tal-1
 TGACACAGCTTGTGAACTTTTACTGAGAATGGTGAAAAGTAAATCCCAGTTTTATACAATGAATT
 GCTGAAGAGGCCTTTTAAAGTATAGAGTATGCATTGTTTATGGAAGGTGTTTCCTATTAGGTC

Abb. 3.3.10 Der potentielle *KDR* Enhancer (523 bp)

Die Sequenz wurde mit dem MatInspector Algorithmus untersucht, um Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zu identifizieren. Neben konservierten Stellen (vgl. Maussequenz) wurden potentielle Bindungsstellen für AP1, NFAT und Nkx2.5 identifiziert.

Die 659 bp, 523 bp und 336 bp Fragmente wurden mittels PCR synthetisiert, so dass Schnittstellen für das Restriktionsenzym BamHI an den Enden der Amplifikate entstanden. Die Fragmente wurden mit dem zuvor BamHI geschnittenen *flk-1*-Prom-LacZ Plasmid ligiert. Die 4,0 kbp und 2,7 kbp Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert, so dass Schnittstellen für das Restriktionsenzym XhoI entstanden. Diese Fragmente wurden in die SalI Schnittstelle im *flk-1*-Prom-LacZ Vektor eingesetzt. Die DNA wurde linearisiert und für die Mikroinjektion gereinigt. Die DNA wurde in befruchtete Mausoozyten (C57/Bl6) injiziert und diese durch Uterustransfer in Ammenmütter übertragen (CD1). Zwischen dem 10. und 12. Tag der Embryonalentwicklung wurden die Ammentiere getötet und die Embryonen präpariert. Die Integration des Transgens in das Genom der Embryonen wurde mittels PCR in Lysaten der Dottersäcke nachgewiesen. Die Embryonen wurden fixiert und eine enzymatische Farbreaktion zum Nachweis der LacZ-Aktivität durchgeführt. Insgesamt wurden 39 transgene Embryonen untersucht, bei denen das *lacZ* Gen vom *flk-1* Promotor in Kombination mit einem der Fragmente des 1. *KDR* Introns gesteuert wurde (siehe Abb.

3.3.11 A). In allen untersuchten Embryonen wurde dabei keine gefäßspezifische Expression des Reportergens beobachtet. Um zu kontrollieren, dass die generierten Reporterplasmide LacZ exprimieren konnten, wurden HUE Zellen mit diesen Plasmiden transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und einer LacZ-Färbereaktion unterzogen. Dabei konnte die LacZ-Expression von allen getesteten Reporterplasmiden detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

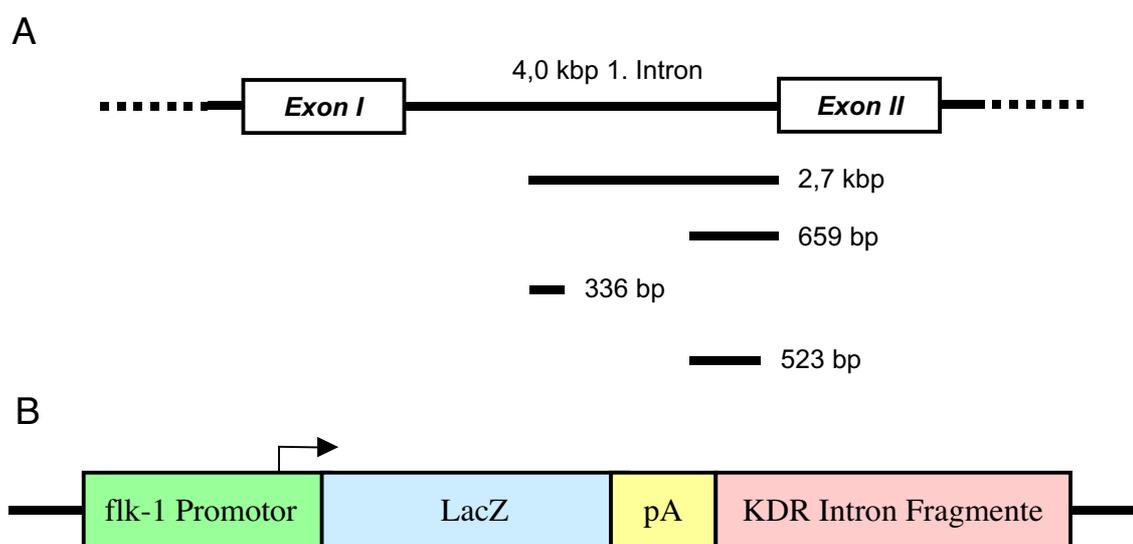


Abb. 3.3.11 Übersicht der verwendeten flk-1-Prom-LacZ-KDR Intron Fragmente Reporterplasmide

A. Die verwendeten Fragmente des 1. Introns des *KDR* Gens und ihre Position im genomischen *KDR* Locus. B. Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts.

Da die Möglichkeit bestand, dass der murine Promotor nicht mit dem humanen Enhancer kooperierte, wurde in einem zweiten experimentellen Ansatz der humane *ets-1* Promotor (*hets-1*) verwendet. Von dem *hets-1* Promotor ist bekannt, dass er mit dem murinen *flk-1* Enhancer kooperiert, um eine endothelspezifische Expression von Reportergenen zu vermitteln (C. Kaletta und G. Breier, nicht publiziert). Die Expression

des *lacZ* Reportergens wurde unter die Kontrolle des humanen *ets-1* Promotors und des 523 bp *KDR* Intronfragmentes gestellt. Erste Befunde weisen darauf hin, dass mit dem *hets-1-LacZ-523 bp KDR Intron* -Konstrukt eine endothelspezifische Reportergen-Expression in transgenen Mäusen erreicht wird. Die *KDR* Enhancer-Aktivität konnte bisher aber nur in transient transgenen Embryonen gezeigt werden. Die Ergebnisse müssen noch in etablierten transgenen Mauslinien reproduziert werden. Daher sind diese vorläufigen Ergebnisse hier nicht gezeigt.

4. Diskussion

4.1 Etablierung und Charakterisierung von *flk-1*-Cre transgenen Mäusen

Das Cre-loxP Rekombinationssystem bietet eine effiziente Möglichkeit zur konditionalen Geninaktivierung und somit zur spezifischen Analyse von Genfunktionen *in vivo*. Bereiche von Zielgenen, die von loxP Erkennungssequenzen flankiert sind, können mittels Cre Rekombinase deletiert werden. Dazu werden transgene Mäuse benötigt, die Cre zelltypspezifisch exprimieren. In der vorliegenden Arbeit wurden regulatorische Elemente des murinen VEGF Rezeptor-2 Gens (*flk-1*) verwendet, um die Cre Rekombinase spezifisch im Gefäßendothel von transgenen Mäusen zu exprimieren. Die verwendeten Regionen bestanden aus einem 939 bp Promotorfragment und einem 2,3 kbp Fragment aus dem 1. Intron des *flk-1* Gens (*flk-1* p/e) (Abb. 3.1.1 A). Diese Elemente wurden bereits verwendet, um das *lacZ* Reportergen (*flk-1*-LacZ) und das grün fluoreszierende Protein (*flk-1*-GFP) in transgenen Mäusen und differenzierenden embryonalen Stammzellen zu exprimieren (Kappel et al., 1999; Hirai et al., 2003). Die Analyse der *flk-1*-LacZ Mäuse zeigte, dass die Expression des Transgens etwa an Tag 7,8 der Embryonalentwicklung begann, also kurz später als das endogene Flk-1. Die Expression beschränkte sich auf Endothelzellen von Blutgefäßen und war nicht in hämatopoetischen Zellen oder in mesodermalen Vorläuferzellen zu sehen, die endogenes Flk-1 exprimieren. In adulten Tieren wurde das Transgen außer in den Milzgefäßen nicht mehr exprimiert (Kappel et al., 1999). Diese Befunde wurden mit *flk-1*-GFP Mäusen bestätigt und Experimente in differenzierenden embryonalen Stammzellen zeigten, dass *flk-1* p/e nur in reifen, VE-Cadherin positiven Endothelzellen aktiv war, nicht aber in deren Vorläufern (Hirai et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei *flk-1*-Cre transgene Mauslinien etabliert (Linie 15962 und 15964), die das *cre* Transgen laut RT-PCR exprimierten (Abb. 3.1.1 C). Die

flk-1-Cre Mäuse wurden mit Reporterstäusen gekreuzt und die Rekombination des Reportergens mittels PCR nachgewiesen (Abb. 3.1.1 D). Das nicht rekombinierte Allel wurde in flk-1-Cre/CAG-CAT-LacZ Mäusen nicht detektiert, möglicherweise weil unter den verwendeten PCR-Bedingungen das kürzere deletierte Allel effizienter amplifiziert wurde. Die LacZ-Färbung von flk-1-Cre/CAG-CAT-LacZ Embryonen bestätigte, dass die Rekombination nicht in allen Zellen stattfand, sondern auf Blutgefäße beschränkt war. Um die Aktivität der Cre Rekombinase genauer zu analysieren, wurden die flk-1-Cre/Rosa26R oder flk-1-Cre/CAG-CAT-LacZ doppelt transgenen Mäuse in verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung sowie Organe adulter Tiere untersucht. In flk-1-Cre/Rosa26R Mäusen wurde eine vollständige LacZ-Färbung von Blutgefäßen an Tag 11,5 der Embryonalentwicklung (Linie 15962) bzw. Tag E13,5 (Linie 15964) beobachtet (Abb. 3.1.3 bis 3.1.5). Danach war das Expressionsmuster in beiden Linien gleich. Lediglich die Kapillaren der Lunge färbten sich stärker in Linie 15964 als in 15962, in beiden Linien jedoch nicht vollständig (Abb. 3.1.6). Die Unterschiede in der Expression sind wahrscheinlich durch die zufällige Integration des Transgens ins Genom der Gründer zu erklären. Die Anzahl der integrierten Kopien des Transgens kann variieren, ebenso der Integrationsort, wodurch die Expression des Transgens von benachbarten endogenen DNA regulatorischen Elementen beeinflusst werden kann. So kann das Transgen unter die Kontrolle regionaler Silencer-Elemente geraten oder in Regionen dichter Chromatinstruktur, die schlecht transkribiert werden.

In Organen adulter flk-1-Cre/Rosa26R waren die Endothelzellen in fast allen Organsystemen LacZ positiv. So konnte eine gefäßspezifische LacZ-Färbung in Herz, Niere, Milz, Leber, Pankreas und Gehirn gezeigt werden (Abb. 3.1.6). Dabei ist aber zu beachten, dass der *flk-1* p/e im adulten, nicht aktivierten Endothel keine Aktivität zeigte (Kappel et al., 1999). Da im Embryo bereits Cre Aktivität in allen Gefäßen vorhanden war, führte dies wahrscheinlich zur Rekombination des Reportergens und somit zur konstitutiven LacZ-Expression in Endothelzellen. Die beobachtete Cre Aktivität

stimmte größtenteils mit den Befunden der Reportergenexpression in *flk-1-LacZ* und *flk-1-GFP* Mäusen überein (Kappel et al., 1999; Hirai et al., 2003). Ein Unterschied war jedoch die Cre Aktivität in hämatopoetischen Zellen von *flk-1-Cre* Mäusen, während keine Expression in Blutzellen von *flk-1-LacZ* Mäusen beobachtet wurde. Da das in beiden *flk-1-Cre* Linien der Fall war, scheint die Expression in hämatopoetischen Zellen nicht aus dem Integrationsort des Transgens zu resultieren. Eine Erklärungsmöglichkeit ist die Expression des Transgens in gemeinsamen Vorläuferzellen von endothelialen und hämatopoetischen Zellen, wie den Hämangioblasten (Risau und Flamme, 1995). Dadurch würden alle Nachkommen dieser Zellen das Reportergen konstitutiv exprimieren, auch wenn die Expression von Cre abgeschaltet wird. Die Aktivität des *flk-1* p/e in Hämangioblasten ist bisher nicht beschrieben worden.

Kürzlich wurde eine *flk-1-Cre* Mauslinie beschrieben (Motoike et al., 2003), bei der die Cre Rekombinase in den endogenen *flk-1* Locus inseriert wurde. Somit steht die Cre-Expression unter der Kontrolle sämtlicher endogener regulatorischer Elemente des *flk-1* Gens und rekapituliert die Flk-1 Expression vollständig. Diese Mäuse wurden mit Rosa26R Mäusen gekreuzt und es zeigte sich, dass Endothel, hämatopoetische Zellen, aber auch Muskelzellen Cre Aktivität aufwiesen. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den postulierten vaskulären Vorläuferzellen, die Flk-1 exprimieren und Vorläufer sind für Endothelzellen, hämatopoetische Zellen und Muskelzellen (Yamashita et al., 2000). In den hier generierten *flk-1-Cre* Mäusen ist keine Cre Aktivität in Herzmuskel-, Skelettmuskel- oder glatten Muskelzellen beobachtet worden. Daraus läßt sich schließen, dass Cre nicht in den vaskulären Vorläuferzellen aktiv ist. Dieser Befund ist nicht unerwartet, da bereits gezeigt wurde, dass *flk-1* p/e nicht in frühen Flk-1 positiven mesodermalen Vorläufern aktiv sind (Kappel et al., 1999; Hirai et al., 2003). Das bedeutet, die Cre vermittelte Rekombination ereignet sich zu einem Zeitpunkt, an dem die Muskellinie sich bereits von der endothelialen und hämatopoetischen Linie abgespalten hat. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich von vaskulären Vorläufern zum einen der Hämangioblast als Vorläufer von Endothel und hämatopoetischen Zellen

abspaltet und zum anderen die Muskellinie. Kürzlich wurde von Ema et al. (2003) ein Modell postuliert, wonach sich mesodermale, Flk-1 positive vaskuläre Vorläuferzellen in zwei Richtungen entwickeln. Erstens den Hämangioblast, also den Vorläufer von Endothel und hämatopoetischen Zellen, zweitens den (Mes-)Angioblast, der Vorläufer von Endothelzellen und glatten Muskelzellen ist. Die Aufspaltung der Entwicklungswege in Hämangioblast und Angioblast wurde von dem Transkriptionsfaktor SCL/Tal-1 gesteuert. Das Fehlen von SCL/Tal-1 förderte die Differenzierung zum Angioblast, während gleichzeitig weniger Hämangioblasten gebildet wurden. Wenn umgekehrt SCL/Tal-1 überexprimiert wurde, bildeten sich vermehrt Hämangioblasten und gleichzeitig weniger Angioblasten. Diese Experimente wurden größtenteils in differenzierenden embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) durchgeführt. Es ist zur Zeit nicht klar, inwieweit die artifiziellen Kulturbedingungen die *in vivo* Situation während der Embryonalentwicklung wiedergeben. In der vorliegenden Studie konnte anhand der flk-1-Cre transgenen Mäuse jedenfalls eine klare Trennung von Muskel- und Endothelzelllinie während der Embryonalentwicklung gezeigt werden. Im ES-Zellen Modell wurde darüber hinaus die Transdifferenzierung von Endothelzellen zu glatten Muskelzellen beobachtet (Ema et al., 2003). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Gefäße umgebenden glatten Muskelzellen aus Transdifferenzierung der Endothelzellen hervorgehen. Dem gegenüber steht die mögliche Rekrutierung glatter Muskelzellen aus umgebenden mesenchymalen Zellen und der Neuralleiste (Le Lievre und Le Douarin, 1975; Thayer et al., 1995). Die Differenzierung von Endothelzellen zu Muskelzellen wurde schon vorher in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen beschrieben (DeRuiter et al., 1997; De Angelis et al., 1999; Frid et al., 2002; Minasi et al., 2002). Während einige dieser Gruppen davon ausgehen, dass reife Endothelzellen zu Muskelzellen transdifferenzieren, geht eine andere Hypothese davon aus, dass multipotente Vorläuferzellen im oder nahe am Endothel existieren. Diese Vorläufer könnten sich in unterschiedliche Linien entwickeln, wenn sie mit den Gefäßen in ein bestimmtes

Gewebe einwachsen, d. h. das umgebende Gewebe determiniert die Entwicklungsrichtung. Die hier vorliegenden Daten sprechen allerdings dafür, dass während der Ontogenese keine nennenswerte Transdifferenzierung von Endothel zu Herzmuskel, Skelett- oder glatter Muskulatur auftritt, da keine LacZ positiven Muskelzellen beobachtet wurden (Abb. 3.1.4-3.1.6). Trotzdem könnten Endothelzellen unter bestimmten Voraussetzungen das Potential zur Transdifferenzierung haben. Ein Beispiel hierfür ist die Geweberegeneration nach Ischämie, wie am Herzmuskel gezeigt werden konnte (Condorelli et al., 2001).

Während die hier vorgestellten flk-1-Cre Mäuse analysiert wurden, sind regulatorische Regionen anderer endothelialer Gene ebenfalls benutzt worden, um die Cre Rekombinase im embryonalen Gefäßsystem zu exprimieren. Dafür sind tie-1-Cre (Gustafsson et al., 2001) und tie-2-Cre (Kisanuki et al., 2001) transgene Mauslinien etabliert und für konditionale Geninaktivierung im Endothel eingesetzt worden. Diese Tiere zeigten einige Unterschiede in der Cre Aktivität verglichen mit den flk-1-Cre Mäusen. In tie-1-Cre/Rosa26R Mäusen wurde ab Tag E8,0 LacZ-Aktivität in den meisten Endothelzellen beobachtet. Darüber hinaus waren 20% der hämatopoetischen Zellen und Neuronen in der Großhirnrinde und im Hippokampus LacZ positiv (Gustafsson et al., 2001). In den tie-2-Cre Mäusen wurde die Cre Aktivität bereits an Tag E7,5 in mesodermalen Zellen nachgewiesen. In späteren Entwicklungsstadien war LacZ-Aktivität im Endothel von Blutgefäßen und einem Teil der zirkulierenden Blutzellen detektierbar. In Embryonen, die älter als Tag E12,5 waren, wurde nur noch eine schwache LacZ-Färbung festgestellt (Kisanuki et al., 2001). Dies ist verwunderlich, da das rekombinierte Reporterallel zu konstitutiver LacZ-Expression führen müsste, was von den Autoren aber nicht diskutiert wurde. Die flk-1-Cre Mauslinien haben gegenüber den angeführten tie-1-Cre und tie-2-Cre Linien den Vorteil, dass vollständige vaskuläre Cre Aktivität erst an Tag E11,5 bzw. E13,5 erreicht wird. Somit kann die Funktion von Genen in reifen Endothelzellen untersucht werden, ohne dass frühe Differenzierungsschritte von endothelialen Vorläuferzellen beeinträchtigt werden.

Ein weiterer Vorteil der *flk-1-Cre* Mäuse zeigte sich in den Tumor Experimenten (Abb. 3.1.7). Im Gegensatz zu den endothelialen Markern Tie-1 und Tie-2, sind die *flk-1* p/e Sequenzen nur in aktivierten Endothelzellen, nicht aber in normalen adulten Gefäßen aktiv. Die *flk-1* p/e sind im Endothel von Tumorgefäßen aktiv, wie die Expression des *lacZ* Reportergens belegte (Heidenreich et al., 2000). Um die Cre Aktivität in Tumoren von *flk-1-Cre* Mäusen zu untersuchen, wurden BFS-1 Fibrosarkomzellen (Hafner et al., 1996) in *flk-1-Cre/Rosa26R* Mäuse subkutan injiziert. Nach 7 Tagen hatten sich solide Tumore gebildet. Die Doppel-Immunfluoreszenzfärbung gegen Flk-1 und LacZ zeigte, dass die Tumore stark vaskularisiert waren, und dass alle Gefäße auch LacZ exprimierten. Eine vollständige Co-Expression von Flk-1 und LacZ wurde in der Überlagerung der beiden Färbungen bestätigt. Da mit diesem Experiment jedoch nicht zwischen konstitutiver LacZ-Expression des rekombinierten Reporteralleles und tatsächlicher Cre-Expression unterschieden werden konnte, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dies ergab, dass Cre in Tumorgefäßen exprimiert wurde, während die Tumorzellen selbst LacZ negativ waren, also kein Cre exprimierten. Dieser Befund ist besonders relevant für die mögliche induzierbare Expression des *flk-1-Cre* Transgens. Mit einer solchen Technik wäre es möglich, die Cre-Expression und damit die Rekombination in der Embryonalentwicklung zu unterdrücken. Durch Zugabe eines Induktors könnte dann die Cre-Expression im adulten Organismus angeschaltet werden. Es ist zu erwarten, dass normale adulte Endothelzellen das Transgen dann nicht exprimieren, dafür aber wachsende Gefäße in Tumoren. Somit könnten gefloخته Gene selektiv in Tumorgefäßen inaktiviert werden und so ihre Funktion während der pathologischen Angiogenese studiert werden. Die Generierung solcher induzierbarer Systeme sollte Ziel weiterer Studien sein. Es sind bereits mehrere Systeme in transgenen Mäusen beschrieben worden, die nach Gabe eines Induktors die Expression eines Transgens ermöglichen, die sonst blockiert ist. Es wurden Systeme entwickelt, die auf Fusionsproteinen aus der Cre Rekombinase und der Liganden-Bindungsdomänen von Steroidhormonrezeptoren beruhen. Das Prinzip beruht darauf, dass die

Steroidhormonrezeptoren erst vom Zytoplasma in den Zellkern translozieren, wenn sie ihre Liganden gebunden haben. Das Fusionsprotein bleibt solange im Zytoplasma, bis durch Gabe des Steroidhormon-Analogen Tamoxifen der Transport in den Kern induziert wird, wo Cre dann seine Aktivität entfalten kann (Feil et al., 1997; Indra et al., 1999; Nagy, 2000; Imai et al., 2001). Ein weiteres System ist das Tetrazyklin-Resistenz-Operon. Es beruht auf einem Fusionsprotein aus der Transaktivierungsdomäne VP16 des Herpes Simplex Virus und des Tetrazyklin Repressors (tTA). tTA bindet an den tet Operator und aktiviert die Transkription von beliebigen Zielgenen. Bei Gabe von Doxyzyklin (Dox) kann tTA nicht mehr binden und Gene unter der Kontrolle des tet Operators werden nicht weiter transkribiert (Gossen und Bujard, 1992; Furth et al., 1994; Gossen et al., 1995; Kistner et al., 1996). Der reverse Transaktivator rtTA bindet an den tet Operator in Gegenwart von Dox. Durch Gabe von Dox wird die Expression beliebiger Zielgene also induziert (van der Weyden et al., 2002).

Zusammenfassend sind durch die Generierung und Charakterisierung der flk-1-Cre Mäuse folgende Ziele erreicht worden. Erstens wurden gefloxt Gene im Endothel transgener Mäuse spezifisch und vollständig rekombiniert. Es wurde also ein neues Modell für die konditionale Geninaktivierung in Endothelzellen geschaffen. Zweitens kann anhand der Rekombination die Linienentwicklung/Differenzierung von vaskulären Zellen verfolgt werden. Es wurde gezeigt, dass die Muskellinie sich schon vor Entstehung des Hämangioblasten abspaltet. Durch Transplantation von flk-1-Cre/Rosa26R Zellen in Empfängerermäuse ließe sich beispielsweise das Schicksal der transplantierten Zellen im Organismus leicht nachvollziehen. Drittens ist gezeigt worden, dass die flk-1-Cre Mäuse prinzipiell dazu eingesetzt werden können, gefloxt Gene im Modell pathologischer Angiogenese zu inaktivieren. Dies sollte durch induzierbare flk-1-Cre Expression in Zukunft ausgenutzt werden, um die spezifische Funktion von Genen während der Tumorangio-genese zu untersuchen.

4.2 Generierung und Charakterisierung von flk-1 p/e-HIFdn transgenen Embryonen

Es wurde postuliert, dass während der embryonalen Gefäßentwicklung Regionen relativer Hypoxie im Embryo auftreten und dies das Wachstum von Blutgefäßen stimuliert (Lee et al., 2001). Hypoxische Regionen co-lokalisierten mit VEGF und HIF1 α Expression und in diesen Bereichen wurde auch starkes Gefäßwachstum beobachtet (Lee et al., 2001). Kompensatorisches Wachstum von Gefäßen als Reaktion auf Hypoxie wird auf transkriptioneller Ebene von Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs) gesteuert. Die HIF α Faktoren werden unter normoxischen Bedingungen für die proteasomale Degradation markiert und rasch abgebaut. Unter Hypoxie entkommen HIFs jedoch dem Abbau im Proteasom. HIF Transkriptionsfaktoren werden unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert, translozieren in den Zellkern und können ihre Zielgene transaktivieren, wie beispielsweise den potenten angiogenen Faktor VEGF (Kewley et al., 2004). Kürzlich wurde gezeigt, dass adenovirale Überexpression von HIF1 α zur verstärkten Expression von VEGF, aber auch anderer angiogener Faktoren, wie Angiopoietin Familienmitgliedern führte (Kelly et al., 2003; Yamakawa et al., 2003). Es ist jedoch unklar, ob während der Angiogenese eine Hypoxie-Antwort in den Endothelzellen selbst ausgelöst wird, indem Rezeptoren für angiogene Faktoren wie VEGF und Angiopoietine exprimiert werden. *In vitro* Daten zeigten unter Hypoxie eine Stimulierung der VEGF Rezeptoren auf Proteinebene (Waltenberger et al., 1996), aber dieser Befund wurde auf mRNA Ebene nur für VEGF Rezeptor-1 bestätigt (Gerber et al., 1997). Darüber hinaus wurden parakrine Mechanismen postuliert, die an der Regulierung von VEGF Rezeptoren unter Hypoxie beteiligt sein könnten. Es wurde gezeigt, dass der Medienüberstand von hypoxischen glatten Muskelzellen die Expression von VEGF Rezeptor-2 in Endothelzellen stimulierte (Brogi et al., 1996). Rekombinantes VEGF konnte in kultivierten Hirnschnitten ebenfalls die VEGF Rezeptor-2 Expression stimulieren, so dass der stark Hypoxie regulierte Faktor VEGF

wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der parakrinen Regulation seines eigenen Rezeptors spielt (Kremer et al., 1997). Auch die Expression des Rezeptors für Angiopoietine, Tie-2, wird *in vitro* durch Hypoxie reguliert. So wurde in isolierten Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen eine gesteigerte Expression von Tie-2 beobachtet (Willam et al., 2000). Außerdem konnte die *tie-2* Promotoraktivität in Luziferase Reporterexperimenten durch Überexpression von HIF2 α , aber nicht durch HIF1 α stimuliert werden (Tian et al., 1997).

Die Mitglieder der Familie der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs) sind Kandidaten für intrinsische Hypoxie-Regulatoren in Endothelzellen. Eine besondere Rolle nimmt dabei HIF2 α ein, da es hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert wird, während HIF1 α ubiquitär exprimiert wird (Jain et al., 1998). Die *HIF2 α* Geninaktivierung führte zu leichten Defekten in den Dottersackgefäßen von Mausembryonen. Die intraembryonalen Gefäße zeigten keine Anomalien. Durch Tetraploiden-Aggregation konnte der Dottersackdefekt aufgehoben werden und Remodellierungsdefekte der Gefäße konnten auch im Embryo festgestellt werden. Es wurde keine Veränderung in der Expression von möglichen HIF2 α Zielgenen wie *flk-1* oder *tie-2* festgestellt (Peng et al., 2000). Diese Defekte in der embryonalen Gefäßentwicklung konnten jedoch in zwei weiteren *HIF2 α* "knock-out" Studien nicht bestätigt werden (Tian et al., 1998; Compennolle et al., 2002). Die Unterschiede waren möglicherweise auf den genetischen Hintergrund der verwendeten Mausstämmen zurückzuführen. Kürzlich wurde gezeigt, dass pathologisches Gefäßwachstum im Modell der Retinopathie (ROP) in Mäusen, die weniger HIF2 α exprimierten wesentlich schlechter erfolgt (Morita et al., 2003). Nach diesen widersprüchlichen Ergebnissen blieb die Rolle von HIF2 α und endothelialen HIF Signalwegen während der Ontogenese unklar. Eine mögliche Erklärung für den milden bzw. fehlenden vaskulären Phänotyp in den HIF2 α defizienten Mäusen ist die Redundanz von HIF Faktoren im Endothel. Die HIF1 α Untereinheit könnte zum Beispiel die Funktionen von HIF2 α teilweise übernehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Strategie entwickelt, um die endotheliale Funktion von HIFs *in vivo* zu

untersuchen. Dabei wurde eine dominant negative HIF Mutante spezifisch im Endothel von transgenen Mäusen exprimiert, um so den Hypoxie-Signalweg zu blockieren.

Es wurde eine Deletionsmutante von HIF2 α verwendet, der die C-terminalen Transaktivierungsdomänen TAD N und TAD C, die sauerstoffabhängige Zerstörungsdomäne (ODD) und ein Teil der DNA bindenden Domäne (bHLH) fehlten (Abb. 3.2.1 A). Durch das Fehlen der ODD sollte das Transgen der Degradation unter Normoxie durch das Proteasom entgehen. Es wurde *in vitro* getestet, ob die Mutante auch tatsächlich den Hypoxie-Signalweg inhibieren konnte. Dazu wurden HIF stimulierbare Promotoren verwendet, die die Expression des Luziferase Reportergens steuerten. Die basale *flk-1* Promotoraktivität wurde durch HIFdn Expression in A293 Zellen stark herabgesetzt. Ebenso wurde die HIF2 α vermittelte Aktivierung des *flk-1* Promotors durch HIFdn inhibiert (Abb. 3.2.1 C). Die basale Aktivität des *VEGF* Promotors in A293 Zellen wurde durch Transfektion mit HIFdn reduziert. Die HIF1 α abhängige Stimulation des *VEGF* Promotors wurde durch Co-Expression von HIFdn bis auf basale Promotoraktivität gehemmt (Abb. 3.2.1 B). Wurden A293 Zellen unter Hypoxie kultiviert, so zeigte sich eine etwa 4-fache Stimulation des *VEGF* Promotors gegenüber Zellen unter normoxischen Bedingungen. Diese Stimulierung wurde durch HIFdn Expression auf 50% reduziert (Abb. 3.2.1 D). Maemura et al. (1999) analysierten bereits eine HIF2 α Deletionsmutante, der der C-Terminus und somit die beiden Transaktivierungsdomänen fehlte (HIF2 α Aminosäuren 1-485). Es wurde gezeigt, dass die Aktivität des *VEGF* Promotors durch HIF1 α und HIF2 α stimuliert und durch die Co-Expression der Mutante stark reduziert wurde. Die zelluläre Lokalisation der hier verwendeten Mutante wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung überprüft. Dies zeigte, dass HIFdn im Zytoplasma von HUE Zellen lokalisiert war. Im Unterschied dazu war Wildtyp HIF2 α exklusiv nukleär zu finden (Abb. 3.2.1 E und F). Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Lokalisation von HIF2 α Mutanten, die mit GFP fusioniert wurden, um ihre zelluläre Lokalisation zu untersuchen (Luo und Shibuya, 2001). Ein möglicher Mechanismus, wie HIFdn den Hypoxie-Signalweg blockiert, ist die Bindung

an die HIF1 β Untereinheit (ARNT). Die HIFdn Mutante besitzt die beiden PAS Domänen A und B, so dass sie wahrscheinlich über diese noch ARNT binden kann. Damit könnte ARNT im Zytoplasma zurückgehalten werden und nicht mehr in den Kern translozieren. Da den HIF α Untereinheiten im Zellkern die zur Transaktivierung der Zielgene nötige β -Untereinheit fehlt, könnte dies der Mechanismus der Blockierung sein. Diese Daten zeigten *in vitro*, dass die HIFdn Mutante einen dominant negativen Effekt auf die Wildtyp HIF α Faktoren ausübte. Interessanterweise wurde kürzlich ein endogener negativer Regulator von Hypoxie-induzierbarer Genexpression gefunden. Dieses Molekül wurde als IPAS (Inhibitorisches PAS Domänen-Protein) bezeichnet und besaß hohe Homologie zu den bHLH und PAS A und B Domänen von HIF1 α und HIF2 α , allerdings fehlte IPAS im Vergleich zu den HIF α Untereinheiten der C-Terminus mit den Transaktivierungsdomänen. IPAS ist in der Struktur der Domänen also der hier verwendeten HIF2 α Mutante sehr ähnlich. Die IPAS Expression zeigte einen dominant negativen Effekt über HIF1 α und HIF2 α Genaktivierung und IPAS exprimierende Tumore waren im Wachstum verlangsamt und hatten eine geringere Gefäßdichte (Makino et al., 2001). Es stellte sich heraus, dass IPAS eine Spleißvariante von HIF3 α war (Makino et al., 2002).

Um nun zu untersuchen, ob endotheliale HIFs eine Rolle in der Gefäßentwicklung *in vivo* spielen, wurde die dominant negative HIF Mutante spezifisch im Endothel transgener Mäuse exprimiert und auf diese Weise die Endothelzellen intrinsische HIF Funktion untersucht (Abb. 3.2.2 A). Da mit der HIFdn Mutante wie gezeigt HIF1 α und HIF2 α Funktionen blockiert wurden, konnte mit diesem Ansatz eine mögliche Redundanz von HIF α Faktoren im Endothel umgangen werden. Etwa ein Drittel der flk-1 p/e-HIFdn transgenen Embryonen waren im Wachstum retardiert, zeigten schwere Gefäßdefekte und starben um Tag 11,5 der Embryonalentwicklung (Abb. 3.2.3 C-E). Dieser Phänotyp war reproduzierbar und korrelierte mit der Expression des Transgens. Der Rest der Transgenen exprimierte HIFdn entweder gar nicht oder in so geringem Maße, dass keine phänotypischen Veränderungen zu beobachten waren. Die

festgestellte Anzahl von transgenen Embryonen, die Expression des Transgens aufwiesen, stimmt mit Daten aus vorherigen Studien mit den *flk-1* p/e Regionen überein (Kappel et al., 1999; Hirai et al., 2003 und diese Arbeit 3.1). Es sei darauf hingewiesen, dass die 19 HIFdn Transgenen mit abnormaler Gefäßentwicklung alle individuelle "Gründertiere" darstellen, d. h. das Transgen war wahrscheinlich bei allen in unterschiedliche Bereiche des Genoms integriert und dennoch zeigten sie alle starke Übereinstimmung im Phänotyp. Die hier verwendeten *flk-1* p/e zeigten Aktivität in reifen Endothelzellen, aber nicht in hämatopoetischen Zellen oder Vorläufern der Endothelzelllinie (Kappel et al., 1999; Hirai et al., 2003). Daher konnte in der vorliegenden Arbeit die Rolle von HIFs in der frühen Differenzierung von vaskulären Vorläuferzellen (z. B. den Hämangioblasten) oder in der Hämatopoese nicht untersucht werden. Es gibt allerdings Hinweise, dass HIF2 α eine wichtige Rolle in der Hämatopoese einnimmt (Scortegagna et al., 2003b).

Die hier generierten *flk-1* p/e-HIFdn Embryonen zeigten multiple kardio-vaskuläre Defekte. Es wurden zwar Gefäße und Endothelzellen gebildet, aber das Gefäßnetzwerk blieb unreif und schlecht organisiert. Die beobachteten phänotypischen Anomalien umfassten Defekte in der Dottersackzirkulation, der sprossenden Angiogenese und dem vaskulären Remodellieren, besonders im Kopfbereich (Abb. 3.2.3-3.2.5). Außerdem war die Herzentwicklung gestört, was deutlich wurde anhand des unregelmäßigen Endokardium, den dünnen Wänden der Ventrikel und der schlecht ausgeformten Trabekulae. Insgesamt war die Gefäßbildung durch Vaskulogenese nicht beeinträchtigt, da primitive Gefäßnetzwerke sowie die dorsale Aorta und die Kardinalvenen gebildet wurden. Allerdings war die Gefäßsprossung über Mechanismen der Angiogenese gestört.

Außer der Blockierung von HIF Zielgenen könnten allerdings auch noch epigenetische Faktoren zu diesem morphologischen Befund beitragen. Es ist beschrieben worden, dass der Blutfluss, bzw. die dadurch entstehenden Scherkräfte die Genexpression von Endothelzellen beeinflussen (Topper und Gimbrone, 1999; Shyy und Chien, 2002).

Außer dem Transport von Nährstoffen und Sauerstoff, stellt der Blutfluss auch einen physikalischen Faktor dar, der Herzmorphogenese und Angiogenese beeinflusst. Dies ist kürzlich im Modell der "myosin light chain 2a" (MLC2a) defizienten Mäusen untersucht worden (Huang et al., 2003). Die Inaktivierung dieses Strukturgens hatte den Verlust der Herzfunktion im Atrium zur Folge. Die *MLC2a* "knock-out" Mäuse wiesen Defekte in der Morphogenese des Herzens und der Angiogenese auf. Beispielsweise war die Gefäßstruktur des Dottersacks und die intraembryonale Gefäßremodellierung gestört. Daraus wurde geschlossen, dass die Störung in der Gefäßentwicklung auch ein sekundärer Effekt der gestörten Herzfunktion sein könnte und nicht ein intrinsischer Effekt in Endothel- oder glatten Muskelzellen (Huang et al., 2003). Daher ist Vorsicht geboten bei der Interpretation von früh embryonalen kombinierten Defekten in Angiogenese und Herzentwicklung. Dies wurde zum Beispiel bei der Geninaktivierung von *MEF2C* (Lin et al., 1997; Lin et al., 1998; Bi et al., 1999), *ephrinB2* (Gerety und Anderson, 2002), *endoglin* (Li et al., 1999) und *erk5* (Regan et al., 2002) in Mäusen beobachtet. Die in der vorliegenden Arbeit postulierte Rolle von HIFs in der Regulation von endothelialen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ist durch umfangreiche *in vitro* Daten gestützt. Der Phänotyp der HIFdn Embryonen resultiert höchstwahrscheinlich aus der Reduzierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und nicht aus sekundären Effekten aufgrund der gestörten Herzentwicklung. Trotzdem könnte die Schwere des Phänotyps zumindest teilweise auch aus sekundären Folgen des fehlenden Blutfluss resultieren.

Plazentadefekte werden häufig als Ursache früher embryonaler Letalität in "knock-out" Modellen gefunden (Rossant und Cross, 2001; Conway et al., 2003). Die Geninaktivierung der AP1 Faktoren *junB* oder *fra-1* (Schorpp-Kistner et al., 1999; Schreiber et al., 2000), *Foxf1* (Mahlapuu et al., 2001), *Foxc1* and -2 (Kume et al., 2001), $\beta 8$ Integrinen (Zhu et al., 2002), *frizzled5* (Ishikawa et al., 2001), *VE-cadherin* (Carmeliet et al., 1999; Gory-Faure et al., 1999) sowie die endothelspezifische Inaktivierung von *E-cadherin* (Cattellino et al., 2003) zeigten alle ähnliche Phänotypen, vorallem fehlende Vaskularisierung der plazentalen Labyrinthenschicht. Die Bildung und

Vaskularisierung der Plazenta war durch HIFdn nicht beeinträchtigt. Im Labyrinth waren eindeutig embryonale Gefäße zu erkennen, die in die Plazenta einwanderten und in engen Kontakt mit den mütterlichen Blutlakunen traten (Abb. 3.2.6). Daher kann ausgeschlossen werden, dass der beschriebene Phänotyp einen sekundären Effekt, resultierend aus fehlender Plazentafunktion darstellt. Plazentadefekte waren auch die Ursache der Letalität ARNT defizienten Mäusen. In diesen Tieren war die Plazenta kleiner als die vom Wildtyp und es fehlten die embryonalen Gefäßen. Durch Tetraploiden-Aggregation konnte der Plazentadefekt in ARNT defizienten Embryonen kompensiert werden. In diesem Modell produzierte nur das Dottersack-Entoderm normale Mengen an ARNT, da es aus Wildtyp-Zellen hervorgegangen war, während der Embryo aus "knock-out" Zellen gebildet wurde. Die Embryonen starben zwar etwa in der Mitte der Gestation an intraembryonalen kardio-vaskulären Defekten, aber die Plazentaentwicklung verlief normal. Daraus wurde geschlossen, dass ein Endothelzellen extrinsischer Mechanismus für die gestörte Plazentation entscheidend war (Adelman et al., 2000). Die hier gezeigten Daten unterstützen die Hypothese, dass der HIF Signalweg keine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Plazenta spielt. Von einer anderen Gruppe wurde in der Plazenta von ARNT "knock-out" Embryonen eine lokale Reduzierung von VEGF Rezeptor-2, Ang-1 und Tie-2 festgestellt. Dabei war der VEGF Rezeptor-2 außer in Trophoblastzellen und plazentalen Riesenzellen auch im embryonalen Endothel im Labyrinth reduziert (Abbott und Buckalew, 2000).

Interessanterweise gleicht der hier gezeigte Phänotyp der flk-1 p/e-HIFdn Embryonen sehr den Defekten von *tie-2* und *angiopoietin-1* "knock-out" Mäusen. Tie-2 defiziente Embryonen waren in der Ontogenese retardiert, es war keine sprossende Angiogenese vom perineuralen vaskulären Plexus ins Neuroektoderm zu beobachten und die Herzen wiesen keine Trabekulae auf. Dieser Phänotyp resultierte aus Defekten in der vaskulären Organisation und Remodellierung, gestörter Rekrutierung von perivaskulären Zellen (Dumont et al., 1994; Sato et al., 1995; Patan, 1998) und/ oder fehlenden Überlebenssignalen für Endothelzellen (Dumont et al., 1994; Puri et al.,

1999; Jones et al., 2001). Der *ang-1* *-/-* Phänotyp war derselbe, trat aber etwas später in der Ontogenese auf (Suri et al., 1996). In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde in *flk-1* p/e-HIFdn Transgenen eine starke Reduzierung von Tie-2 auf mRNA und Proteinebene festgestellt, während die Expression anderer endothelialer Markergene wie Pecam-1, Tie-1 und VE-Cadherin nicht verändert war im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.2.7 und 3.2.8). Somit konnte erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass es sich bei *tie-2* um ein Zielgen von HIFs im Endothel handelt. Dies konnte weder in *HIF1 α* , *HIF2 α* oder *ARNT* defizienten Mäusen gezeigt werden, da die entsprechenden Gene nicht zelltypspezifisch ausgeschaltet wurden. Die Embryonen verstarben infolge von nicht primär vaskulären Defekten, wie mesenchyalem Zelltod oder Störung der Plazentaentwicklung.

Das zweite Gen, das in HIFdn Transgenen in seinem Expressionsniveau stark reduziert war, ist VEGF Rezeptor-1 (*flt-1*). Es konnte bereits gezeigt werden, dass der *flt-1* Promotor ein Hypoxie-responsives Element (HRE) enthält und die Expression des Rezeptors durch Hypoxie stimulierbar ist (Tuder et al., 1995; Gerber et al., 1997). Dies ließ vermuten, dass *flt-1* ein Zielgen von HIFs sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig *in vivo* gezeigt, dass *flt-1* ein Zielgen endothelialer HIFs ist.

Die Analyse von *flt-1* defizienten Embryonen zeigte eine disorganisierte Gefäßbildung und erweiterte Blutgefäße. Im Lumen der Gefäße waren Endothelzellen in zu großer Zahl vorhanden waren, die mehrschichtig übereinander wuchsen (Fong et al., 1995). Dieser Defekt entstand wahrscheinlich durch erhöhte Differenzierung von mesodermalen Vorläuferzellen zu Hämangioblasten (Fong et al., 1999). Die physiologische Funktion von Flt-1 ist noch immer unklar. Es ist zwar eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase mit sehr hoher Affinität zu VEGF, aber im Gegensatz zur kompletten Geninaktivierung, die embryonal letal war, führte die Deletion der intrazellulären Kinasedomäne zu keinem veränderten Phänotyp in genetisch veränderten Mäusen (Hiratsuka et al., 1998). Ob Flt-1 direkt Signalwege stimuliert oder nur modulierend auf andere einwirkt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Flt-1 kann beispielsweise den

VEGF/Flk-1 Signalweg negativ beeinflussen (Rahimi et al., 2000; Bussolati et al., 2001; Zeng et al., 2001). Daher zeigten *flt-1* defiziente Endothelzellen einen erhöhten mitotischen Index *in vitro* und *in vivo* (Kearney et al., 2002). In den hier untersuchten HIFdn Transgenen wurden keine Anzeichen des *flt-1* ^{-/-} Phänotyps entdeckt. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Reduzierung von Tie-2 schwerwiegender war bzw. früher zu Defekten führte, was die Folgen des Verlusts von Flt-1 überdeckte. Die frühe Funktion von Flt-1 bei der Differenzierung von Vorläuferzellen war wahrscheinlich nicht beeinträchtigt, da das HIFdn Transgen erst später exprimiert wurde, in bereits reifen Endothelzellen (Kappel et al., 1999; Hirai et al., 2003).

Darüber hinaus wurde in HIFdn Transgenen eine reduzierte Expression von VEGF Rezeptor-2 (*flk-1*) festgestellt. Dies war allerdings nur in der Hälfte der untersuchten Embryonen der Fall und meist war auch kein völliger Verlust von Flk-1 festzustellen. Flk-1 ist bereits als Zielgen von HIFs beschrieben worden (Kappel et al., 1999; Elvert et al., 2003). Die Expression von Flk-1 ist auf Proteinebene durch Hypoxie stimulierbar (Waltenberger et al., 1996), auf mRNA Ebene konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (Gerber et al., 1997). Die Aktivität des *flk-1* Promotors wird *in vitro* durch Überexpression von HIF2 α , nicht jedoch von HIF1 α stimuliert (Kappel et al., 1999; Elvert et al., 2003). HIF1 α und HIF2 α defiziente embryonale Stammzellen zeigten eine reduzierte Stimulation der Flk-1 mRNA infolge von Hypoxie oder Hypoglykämie (Brusselmans et al., 2001). *In vitro* Daten aus vorherigen Arbeiten zeigten, dass HIF2 α und der Transkriptionsfaktor Ets-1 kooperierend den *flk-1* Promotor transaktivierten. In diesen Arbeiten wurde gezeigt, dass Ets-1 alleine auch ein starker Stimulator von *flk-1* ist (Elvert et al., 2003). Weitere Kandidaten, die die Flk-1 Expression stimulierten sind die Transkriptionsfaktoren SCL/Tal-1, GATA Faktoren (Kappel et al., 1999; Kappel et al., 2000) und HoxB5 (Wu et al., 2003). Möglicherweise setzt das Fehlen von HIF2 α in einem Transkriptionskomplex aus mehreren Faktoren die Transkriptionseffizienz herab, reicht aber nicht aus, um Flk-1 unter einen kritischen Schwellenwert zu reduzieren. Außerdem könnte die Expressionsstärke der HIFdn Mutante nicht ausreichen, um die

Flk-1 Expression komplett zu hemmen. Da das HIFdn Transgen von *flk-1* p/e Sequenzen gesteuert wird, die selbst auch HIF2 α Bindungsstellen enthalten (Elvert et al., 2003), kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Transgen seine eigene Expression negativ reguliert. Dies würde dann aber nicht nur die Reduzierung von Flk-1, sondern auch Tie-2 und Flt-1 betreffen. Da letztere jedoch stets vollständig in ihrer Expression gehemmt wurden, scheint dies nicht zuzutreffen.

Es wurden keine Veränderungen in der Expression von VEGF, Ang-1 und Ang-2 festgestellt. Diese Faktoren können zwar durch Hypoxie stimuliert werden, sie werden jedoch nicht endothelspezifisch exprimiert. Daher hat die endotheliale HIFdn Expression keinen detektierbaren Einfluss auf die Expression dieser Faktoren in embryonalen Geweben insgesamt. Darüber hinaus könnten bisher nicht identifizierte HIF Zielgene im Endothel durch die Expression von HIFdn beeinträchtigt sein. Um dieser Frage nachzugehen, müssten weitere Studien in zellulären Modellen durchgeführt werden. Die Verwendung muriner embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) ist ein gutes Modell für die vaskuläre Entwicklung. Unter bestimmten Kulturbedingungen differenzieren ES-Zellen zu Endothelzellen und können dreidimensionale, gefäßähnliche Netzwerke ausbilden, die endotheliale Markergene exprimieren. So kann die Vaskulogenese und Angiogenese untersucht werden (Feraud et al., 2003). Für diese Analysen wurden bereits stabil transfizierte ES-Zellklone etabliert, die *flk-1* p/e-HIFdn stabil ins Genom integrierten (Daten nicht gezeigt). Die Differenzierung zu Endothelzellen sowie die Analyse der Morphologie und der Expression endothelialer Gene steht noch aus. In diesem Modell könnten auf zellulärer Ebene die Effekte der HIFdn Expression auf Apoptose, Proliferation von Endothelzellen und die Rekrutierung perivaskulärer Zellen untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit, die hier gemachten Befunde in zellulären Modellen weiter auszubauen, ist die Generierung adenoviraler Vektoren zur Überexpression von HIFdn oder HIF2 α . Endothelzellen können mit entsprechenden Adenoviren infiziert, die Veränderung der Genexpression untersucht (Real-time PCR, DNA Microarrays) und ihre angiogene Kapazität getestet werden.

Dafür stehen eine Reihe von experimentellen Systemen zur Auswahl, wie Migrations- und Proliferationstest oder die Analyse der Invasion der Zellen in Matrices und die Bildung von endothelialen Ausprossungen. Transgene Mausmodelle können angewendet werden, um die Folgen einer endothelspezifischen Überexpression von HIF2 α zu untersuchen. Zur Zeit werden transgene Mäuse charakterisiert, die eine induzierbare, endothelspezifische Überexpression von HIFdn und HIF2 α erlauben, so dass der Einfluss von HIF Faktoren auf die Gefäßbildung im adulten Organismus und in pathologischen Situationen wie Tumorangiogenese untersucht werden kann (Kooperation mit K. Plate, Universität Frankfurt).

Die hier gezeigten Befunde haben möglicherweise auch Relevanz für pathophysiologische Fragestellungen. Die hier benutzten *flk-1* p/e können das *lacZ* Reporter gen spezifisch in Gefäßen von Tumoren exprimieren, sind aber im normalen ausgereiften Endothel nicht aktiv. In *flk-1-LacZ* transgenen Mäusen wurden experimentelle Tumore erzeugt und die LacZ-Expression in den Tumorgefäßen gezeigt (Heidenreich et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine dominant negative HIF Mutante verschieden endotheliale Rezeptor-Tyrosin-Kinasen *in vivo* hemmt. Es muss noch geprüft werden, ob die Expression von HIFdn in Tumorgefäßen ausreicht, um das Wachstum von soliden Tumoren einzuschränken. Eine Möglichkeit dies zu testen ist die Co-Injektion von Tumorzellen und Retrovirus produzierenden Zellen, die für HIFdn kodieren. Es ist gezeigt worden, dass selektiv die entstehenden Tumorgefäße, nicht aber BFS-1 Tumorzellen infiziert werden (Heidenreich et al., 2004). Zusammenfassend wurde hier gezeigt, dass die HIF Signalwege im Endothel essentiell sind für eine normale Gefäß- und Embryonalentwicklung. Durch endothelspezifische Überexpression der dominant negativen HIF Mutante wurde die Angiogenese und die Herzentwicklung in den Embryonen gestört. Die Expression der VEGF Rezeptoren und des Tie-2 Rezeptors war stark reduziert. HIF Signalwege haben wahrscheinlich eine duale Rolle in der Gefäßentwicklung. Wie von anderen Gruppen bereits gezeigt wurde, können durch Aktivierung der HIF Signalwege angiogene Faktoren verstärkt produziert

werden (VEGF, Angiopoietine, etc.). Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen zum anderen darauf hin, dass auch die Rezeptoren für angiogene Faktoren auf den Endothelzellen (Flk-1, Flt-1, Tie-2) durch HIF Faktoren reguliert werden. So kann die Hypoxie-Antwort effizient in kompensatorisches Gefäßwachstum umgesetzt werden. Die endothelspezifische Geninaktivierung von *ARNT* oder *HIF1 α* könnte dazu beitragen, neue Erkenntnisse zur spezifischen Rolle von *HIF1 α* und *HIF2 α* zu gewinnen.

4.3 Die Regulation des humanen VEGF Rezeptor-2 (*KDR*) Gens

4.3.1 Vergleich der Promotoren von *flk-1* und *KDR* und Identifizierung eines potentiellen *KDR* Intron Enhancer

Der VEGF Rezeptor-2 ist ein Marker für differenzierende und proliferierende Endothelzellen. Die Faktoren, die an der Regulation von VEGF Rezeptor-2 beteiligt sind, stellen somit potentielle Ziele für anti-angiogene Therapiemaßnahmen dar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genregulation des humanen VEGF Rezeptor-2 (*KDR*) untersucht und mit der Regulation des murinen VEGF Rezeptor-2 (*flk-1*) Gens verglichen. Dieser Vergleich ist wichtig, um zu verstehen, welche Regulationselemente für die endothelspezifische Genexpression von Bedeutung sind. Dabei wurde untersucht, ob bestimmte Elemente in der Evolution konserviert wurden, und ob andere möglicherweise Spezies spezifisch sind. Dies hat praktische Bedeutung, da die Maus als Modellorganismus für die Entwicklung anti-angiogener Therapien verwendet wird und geklärt werden muss, inwiefern Erkenntnisse aus dem Mausmodell auf den Menschen übertragbar sind. Genregulatorische Elemente des *VEGF Rezeptor-2* Gens könnten direkt therapeutischen Nutzen haben, indem sie die endothelspezifische Expression von "Therapie"-Genen vermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit und in vorherigen Studien (Heidenreich et al., 2000) ist gezeigt worden, dass mit Hilfe von *flk-1* regulatorischen Elementen Gene im Endothel von Tumoren exprimiert werden können. Die Expression

therapeutischer Genprodukte im Endothel könnte für Gentherapie-Ansätze wichtig sein, um Gefäßwachstum z. B. in soliden Tumoren zu hemmen. Um Patienten behandeln zu können, müssen aber die humanen *VEGF Rezeptor-2* genregulatorischen Sequenzen bekannt sein und charakterisiert werden.

Mittels spezifischer Oligonukleotide wurde ein 1,2 kbp *KDR* Promotorfragment kloniert (Abb. 3.3.1 C). Reporterplasmide wurden hergestellt, in denen der *KDR* Promotor die Expression des Luziferase-Gens steuerte. Die transiente Transfektion von A293 Zellen zeigte, dass die Überexpression von HIF2 α den *KDR* Promotor stark aktivierte (Abb. 3.3.2 A). Die Luziferase-Aktivität unter der Kontrolle des *SV40* Promotors ließ sich im Vergleich nur in sehr geringem Maße stimulieren, so dass von einem spezifischen Effekt von cis-aktiven Elementen im *KDR* Promotor ausgegangen werden konnte (Abb. 3.3.2 B). Es wurde somit ausgeschlossen, dass das Luziferase-Gen kryptische Bindungsstellen für HIF2 α enthielt. Im Gegensatz zu HIF2 α hatte die Überexpression von HIF1 α nur einen geringen stimulatorischen Effekt auf den *KDR* Promotor. Der positive Effekt von HIF2 α auf den *KDR* Promotor wurde auch in der Endothelzelllinie HUE beobachtet (Abb. 3.3.3 C und D). Die Expression der dominant negativen Mutante HIFdn in Endothelzellen senkte die basale Aktivität des *KDR* Promotors um 50%. Der stimulatorische Effekt von HIF2 α in HUE Zellen wurde durch Expression von HIFdn stark inhibiert. Steigende Mengen des transfizierten HIFdn Plasmids konnten allerdings die Aktivität des *KDR* Promotors nicht auf basales Niveau senken (Abb. 3.3.3 D). Im *flk-1* Promotor befinden sich zwei Bindungsstellen für HIF2 α (HBS1+2) (Elvert et al., 2003). Diese unterscheiden sich in der Sequenz vom klassischen Hypoxie-responsiven Element (HRE), an das HIF1 α bindet (ACGTGC/G). Im *KDR* Promotor ist die HBS1 zwar vorhanden, ein Nukleotid ist jedoch ausgetauscht. Die zweite HBS ist in reverser Orientierung im *KDR* Promotor konserviert. Außer diesen HBS wurden im *KDR* Promotor keine weiteren potentiellen HBS gefunden (Daten nicht gezeigt). Es wurde eine Serie von Mutanten des *KDR* Promotors hergestellt und deren Aktivität mit und ohne Co-Expression von HIF2 α in HUE Zellen untersucht (Abb. 3.3.4). Die Deletion

der potentiellen HBS1 hatte keinen Einfluss auf die Stimulierbarkeit durch HIF2 α und das basale Level der *KDR* Promotoraktivität (-110/+296). Die HBS1 ist also aufgrund des Basenaustauschs im Vergleich zum *flk-1* Promotor nicht mehr funktionell. Die Mutation der HBS2 führte zu einer starken Inhibierung der HIF2 α vermittelten Aktivität. Der Bereich zwischen der HBS2 und dem Transkriptionsstart des *KDR* Gens wurde nicht weiter verkürzt, da neben der HBS2 eine funktionelle NF κ B Bindungsstelle liegt und anschließend repetetive GC reiche Sp1 Bindungsstellen vorhanden sind (Patterson et al., 1995; Patterson et al., 1997; Minami et al., 2001), die für die basale Aktivität des Promotors nötig sind. Durch Deletion wurde der Einfluss der 5'UTR näher analysiert. Das -110/+69 *KDR* Promotorfragment zeigte einen signifikanten Aktivitätsverlust gegenüber -110/+296. Wurde zusätzlich die HBS2 mutiert (-110/+69//mutHBS2), so reduzierte sich die Aktivität des -110/+69 Fragments nochmals und zwar auf dasselbe Niveau wie -110/+296//mutHBS2. Diese Daten ließen den Schluss zu, dass die HBS2 eine wichtige Rolle bei der Transaktivierung des *KDR* Promotors spielt. Die Aktivierung durch HIF2 α konnte in Abwesenheit von beiden HBS nicht auf "Null" reduziert werden. Dies zeigte, dass HIF2 α außer durch direkte DNA-Bindung den *KDR* Promotor noch über Rekrutierung von Co-Faktoren wie CBP/p300 stimulieren kann. Anhand des *flk-1* Promotors konnte gezeigt werden, dass die Mutation der DNA-Bindungsdomäne von HIF2 α (HIFdnb) die Aktivierung durch diesen Faktor zwar abschwächt, aber nicht vollends beseitigt (Elvert et al., 2003). Die DNA-Bindung von HIF2 α scheint also für die Transaktivierung von Zielgenen nicht essentiell zu sein. Auffällig ist weiterhin der Einfluss der 5'UTR des *KDR* Gens, die keine potentielle HBS enthält. Möglicherweise bindet HIF2 α noch andere cis-aktive Elemente, was durch Gel-Retardierungsstudien und DNA-"footprint"-Analysen untersucht werden kann. Außerdem ist eine funktionelle Interaktion von HIF2 α mit GATA Faktoren denkbar, da der deletierte Bereich in der 5'UTR eine GATA Bindungsstelle enthält, die den *KDR* Promotor positiv beeinflusst (Minami et al., 2001).

Der *flk-1* Promotor enthält mehrere Bindungsstellen für Ets Faktoren (EBS), von denen mindestens zwei funktionell sind (EBS3 und EBS6), wie DNA-"footprint" und Mutationsanalysen zeigten (Kappel et al., 2000; Elvert et al., 2003). Die Analyse des 1,2 kbp *KDR* Promotors zeigte, dass diese EBS nicht konserviert sind (Daten nicht gezeigt). Es finden sich zwar noch weitere Ets Kernmotive (GGAA/T), doch sind diese nicht flankiert von Nukleotiden, die die Bindung eines bekannten Ets Faktors vorhersagen lassen (MatInspector Analyse, Daten nicht gezeigt). Um dies experimentell zu überprüfen, wurden die Mitglieder der Ets Familie Ets-1 und Ets-2 mit dem *KDR* Promotor in A293 Zellen co-transfiziert. Beide hatten keinen Einfluss auf die Aktivität des Promotors (Abb. 3.3.2 A). Auch in HUE Zellen konnte die Ets-1 Expression den *KDR* Promotor nicht aktivieren. Damit ist ausgeschlossen, dass endotheliale Kofaktoren nötig sind, damit Ets-1 seine Wirkung entfalten kann. Die dominant negative Mutante Etsdn konnte die Stimulation des *flk-1* Promotors durch Ets-1 inhibieren (A. Nicolaus, nicht publiziert). Die Expression von Etsdn in HUE Zellen senkte die Aktivität des *KDR* Promotors nicht signifikant unter basales Level (Abb. 3.3.3 C). Die Co-Expression von Ets-1 und HIF2 α resultierte in einer genauso starken Aktivierung des *KDR* Promotors wie HIF2 α alleine. Es gab also auch keinen kooperativen Effekt der beiden Transkriptionsfaktoren (Abb. 3.3.3 A). Diese Ergebnisse zeigten Unterschiede in der Regulation von *KDR* und *flk-1* auf. Der *flk-1* Promotor war zwar durch HIF2 α stimulierbar, aber ebenfalls durch Ets-1 (Kappel et al., 1999; Elvert et al., 2003). Zudem wurde ein kooperativer Effekt von HIF2 α und Ets-1 durch direkte Interaktion dieser Transkriptionsfaktoren gefunden (Elvert et al., 2003). Dies konnte am *KDR* Promotor nicht gezeigt werden. Für die Aktivität des *KDR* Promotors scheinen Ets Faktoren also keine Rolle zu spielen. Es besteht zwar die Möglichkeit, dass ein anderes Mitglied der großen Ets Familie den *KDR* Promotor transaktiviert, allerdings hat die Expression der dominant negativen Ets Mutante keinen Effekt auf die basale Promotoraktivität gezeigt, woraus sich schließen läßt, dass Ets Faktoren hierfür nicht essentiell sind. Weiterhin könnten außerhalb des hier untersuchten Promotors noch EBS liegen, die trotz großer

Entfernung zum Transkriptionsstart einen Einfluss haben könnten. *In vivo* sind für die *flk-1* Expression außer im Promotor noch weitere EBS im Intron Enhancer notwendig (Kappel et al., 2000), daher enthält dieser Bereich im *KDR* Gen möglicherweise ebenfalls Bindungsstellen für Ets Faktoren (siehe unten).

Für die endotheliale Expression von Transgenen *in vivo* ist neben dem *flk-1* Promotor noch ein Enhancer Element aus dem 1. Intron des Gens notwendig (Kappel et al., 2000). Hier wurde das Vorhandensein homologer Sequenzen im *KDR* Gen untersucht. Ein 430 bp Fragment aus dem murinen *flk-1* Enhancer wurde radioaktiv markiert und mit humaner DNA hybridisiert. Dabei wurde ein spezifisches Hybridisierungssignal detektiert, was ein erster Hinweis auf das Vorhandensein homologer Sequenzen war (Abb. 3.3.8 A und B). Das gesamte 1. Intron des *KDR* Gens wurde kloniert und die Sequenz mit dem 1. Intron des *flk-1* Gens verglichen. Am 3' Ende des Introns besteht eine große Sequenzübereinstimmung zwischen dem 510 bp *flk-1* Enhancer und dem *KDR* Intron. Eine Identität von 82% wurde in der Nukleotidsequenz des 510 bp *flk-1* Enhancer mit einem 523 bp Fragment des *KDR* Introns festgestellt. Das 510 bp *flk-1* Fragment enthielt funktionelle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der GATA, SCL/Tal-1, Ets und Hox Familien (Kappel et al., 2000, Wu et al., 2003). Diese Bindungsstellen waren im *KDR* Intron konserviert (Abb. 3.3.9). Dies war ein wichtiges Indiz, dass das identifizierte 523 bp Fragment möglicherweise eine homologe Funktion zum *flk-1* Enhancer hat. Die Analyse des 523 bp Fragments mit dem MatInspector Algorithmus (Quandt et al., 1995) ergab weitere potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Abb. 3.3.10). Kandidaten für Regulatoren des *KDR* Gens sind danach AP1, NFAT und Nkx2.5. Das 523 bp *KDR* Fragment enthielt gegenüber dem *flk-1* Enhancer eine Insertion von 14 bp. Diese entspricht genau einer Bindungsstelle für NFAT. Die Blockierung des NFAT Signalweges in der Embryonalentwicklung führte zum Absterben der Embryonen und Defekten im organisierten Gefäßwachstum. In diesen Mäusen war die Flk-1 und VEGF Expression stark reduziert (Graef et al., 2001). Transkriptionsfaktoren der AP1 Familie sind ebenfalls wichtig für die Gefäßentwicklung,

wie die Genaktivierung von *fra1* und *junB* zeigte (Schorpp-Kistner et al., 1999; Schreiber et al., 2000). Außer dem 510 bp Minimal-Enhancer fand sich nur noch eine weitere Region von 336 bp im 5' Bereich des *KDR* Introns, die große Sequenzidentität zu dem *flk-1* Intron zeigte. Eine 80%ige Sequenzidentität bestand hier und potentielle Bindungsstellen für NFAT, Ets und AP1 waren vorhanden. Über die Funktion dieses Elements ist allerdings noch nichts bekannt.

Die Funktion des putativen *KDR* Enhancers wurde durch Reporteranalysen in transgenen Mäusen untersucht. Dabei wurde die Expression des *lacZ* Reportergens unter die Kontrolle des murinen *flk-1* Promotor (-640/+299) und verschiedener Fragmente des 1. *KDR* Introns gestellt. Der humane *KDR* Promotor wurde nicht benutzt, weil er nicht durch Ets Faktoren stimulierbar war, was in transgenen Mäusen für die Reporterexpression essentiell war (Kappel et al., 2000). Keines der verwendeten Konstrukte vermochte in transgenen Embryonen eine gefäßassoziierte Expression des Reportergens zu induzieren. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund sind eventuell vorhandene negative regulatorische Elemente im *KDR* Intron, das Fehlen trans-aktiver Faktoren in Mausendothelzellen oder fehlende Kooperativität zwischen dem Maus-Promotor und dem humanen Intron. Die prinzipielle Funktionalität der Konstrukte wurde überprüft, indem sie in HUE Zellen transfiziert wurden und die Zellen einer LacZ-Färbung unterzogen wurden. Alle in transgenen Mäusen verwendete Konstrukte zeigten LacZ-Expression in HUE Zellen (Daten nicht gezeigt). Daher wurde ein zweiter Ansatz zur Analyse des putativen *KDR* Enhancer gewählt. Es wurde bereits vorher gezeigt, dass der humane *ets-1* Promotor zusammen mit dem *flk-1* Enhancer in transgenen Mäusen Reporterexpression induzieren konnte. Der humane *ets-1* Promotor alleine war dazu aber nicht in der Lage (C. Kaletta und G. Breier, nicht publiziert). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Reporterkonstrukt generiert, indem die LacZ-Expression unter der Kontrolle des humanen *ets-1* Promotor und dem 523 bp *KDR* Intron Fragment stand. Die Expression des Reportergens wurde in transgenen Embryonen untersucht (Daten nicht gezeigt). Erste Befunde zeigten, dass mit diesem

Transgen eine endothelspezifische Expression in transgenen Mäusen erreicht wird. Diese vorläufigen Ergebnisse lassen vermuten, dass der identifizierte *KDR* Enhancer *in vivo* funktionell ist. Diese transgenen Mäuse stellen somit das erste Modell für endothelspezifische Genexpression mittels humaner DNA regulatorischer Elemente dar. Diese Sequenzen könnten verwendet werden, um in pathologischen Angiogenese-Modellen die Expression von therapeutischen Genen zu induzieren. Um eine endgültige Aussage über die *in vivo* Funktionalität des *KDR* Enhancers zu treffen, müssen die Ergebnisse allerdings noch wiederholt, bzw. transgene Mauslinien etabliert werden.

4.3.2 Negative Regulation des *KDR* und *flk-1* Promotors durch Hey Faktoren

Hey Faktoren gehören zur Familie der "Hairy/Enhancer of split" Gene (Davis und Turner, 2001) und werden in der Embryonalentwicklung im Herz und in Gefäßen exprimiert (Leimeister et al., 1999; Nakagawa et al., 1999). Die Hey Faktoren sind transkriptionelle Repressoren mit bHLH Motiv und ihre Expression wird durch Aktivierung des Notch Signalweges induziert (Maier und Gessler, 2000; Nakagawa et al., 2000). Die Genaktivierung von verschiedenen Komponenten des Notch Signalweges in der Maus resultierte in abnormaler Gefäßentwicklung. Der *notch-1*, *notch1+notch4* und *jagged-1* "knock-out" führte zum Absterben der Embryonen aufgrund von Remodellierungsdefekten der Blutgefäße. Die Vaskulogenese in den mutierten Embryonen war unverändert (Xue et al., 1999; Krebs et al., 2000; Iso et al., 2003). Die endotheliale Überexpression von Notch4 führte ebenfalls zu gestörter Gefäßentwicklung und Absterben der Mausembryonen (Uyttendaele et al., 2001). Weitere Hinweise für eine Rolle von Notch Signalwegen in der Gefäßbiologie lieferten Patienten mit zerebraler autosomal dominanter Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukoenzephalopathie (CADASIL, OMIM Nr. 125319). Bei diesen Patienten wurde eine Mutation im *notch3* Gen als Ursache der Erkrankung gefunden (Joutel et al., 1996). *In vitro* Studien zeigten, dass die Expression von konstitutiv aktiven Notch Fragmenten (Notch1 IC und Notch4 IC) die Aktivität des *KDR*

Promotors hemmten (Taylor et al., 2002). Möglicherweise wird dies über Hey Faktoren vermittelt, deren Expression in reifenden Endothelzellen mit gleichzeitigem Verlust der KDR Expression einherging (Henderson et al., 2001; Taylor et al., 2002). In einem "two hybrid screen" wurde gezeigt, dass Hey2 mit ARNT interagiert. Durch Expression von Hey2 wurde die HIF vermittelte Aktivierung des *VEGF* Promotors blockiert (Chin et al., 2000), wahrscheinlich durch kompetitive Heterodimerisierung von Hey2 und ARNT. Außerdem wurde gezeigt, dass die Überexpression von Hey1 in Endothelzellen den KDR Rezeptor auf mRNA Ebene negativ regulierte (Henderson et al., 2001). Dabei wurde aber nicht untersucht, ob dieser Effekt auf transkriptioneller Ebene stattfand. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Hey Faktoren die Aktivität des *flk-1* und *KDR* Promotors regulieren und ob dies die HIF2 α vermittelte Aktivierung betrifft. Die basale Aktivität des *flk-1* Promotors wurde in A293 Zellen durch Co-Expression von Hey1 oder Hey2 nicht beeinflusst (Abb. 3.3.5 B). Wurde der *flk-1* Promotor durch HIF2 α stimuliert, so ließ sich diese Stimulation durch Co-Expression von Hey1 oder Hey2 inhibieren (Abb. 3.3.5 B). Die HIF2 α vermittelte Aktivierung des *KDR* Promotors wurde durch Hey1 oder Hey2 vollständig gehemmt (Abb. 3.3.5 A). Die DNA-Bindungssequenz für Hey Faktoren ist das E-Box verwandte Motiv CACGTG (Nakagawa et al., 2000), das jedoch weder im *flk-1* Promotor noch im *KDR* Promotor gefunden wurde (Daten nicht gezeigt). Daher ist der inhibitorische Effekt von Hey Faktoren auf den *flk-1/KDR* Promotor nicht über DNA-Bindung, sondern wahrscheinlich über kompetitive Bindung an ARNT zu erklären. Eine weitere Möglichkeit ist die Rekrutierung von Histon Deacetylasen, die an Hey Faktoren binden, wie SIRT1 (Takata und Ishikawa, 2003). Durch eine kondensierte Chromatinstruktur könnte so die *flk-1/KDR* Expression negativ beeinflusst werden. Die Expression der Hey Faktoren wurde in kultivierten Endothelzellen untersucht (Abb. 3.3.6). Hey1 wurde in HUVEC nachgewiesen, während Hey2 in HUE Zellen exprimiert wurde. Es ist nicht klar, ob diese komplementäre Expression tatsächlich verschiedene Subpopulationen von Endothelzellen markiert. Allerdings ist die Expression von Hey Faktoren in bestimmten

Subtypen von Gefäßen ist *in vivo* beobachtet worden. Das Zebrafisch Ortholog von *hey2* (*gridlock*) wird in arteriellen Gefäßen exprimiert, nicht aber in Venen. Die gezielte Degradation der *gridlock* RNA führte in Zebrafischen zum Verlust der Aorta (Zhong et al., 2000). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass *gridlock* eine instruktive Rolle bei der Entwicklung des arteriellen Phänotyps von vaskulären Vorläuferzellen spiele (Zhong et al., 2001). Die Expression von murinem Hey2 war besonders stark im Herzventrikel und in der Aorta. Die Expression von Hey1 war hingegen schwach in der Aorta und besonders stark im Atrium des Herzens bzw. dem Sinus Venosus (Leimeister et al., 1999; Nakagawa et al., 1999). Zudem wurde in DNA-Microarray Analysen von verschiedenen Subpopulationen humaner Endothelzellen gezeigt, dass Hey2 in Arterien exprimiert wurde und Hey1 ein komplementäres Expressionsmuster in mikrovaskulären Zellen zeigte (Chi et al., 2003). Möglich wäre auch, dass die Endothelzellen in Kultur ihr Expressionsmuster verändert haben.

Zusammengefasst lassen diese Daten vermuten, dass Hey Faktoren negative Regulatoren des *flk-1/KDR* Gens sind. Eine Voraussetzung, um diese Funktion *in vivo* zu erfüllen ist die zeitliche und örtliche Co-Expression von Hey Faktoren und Flk-1. Ein Modell dies zu untersuchen, ist das neonatale Mausgehirn. Flk-1 wird in Blutgefäßen des neonatalen Gehirns stark exprimiert. An Tag P10 läßt die Expression von Flk-1 allmählich nach und an P30 ist das Protein schließlich nicht mehr nachweisbar (Kremer et al., 1997). Es ist bereits gezeigt worden, dass HIF2 α und Flk-1 in diesem Modell co-exprimiert und auf RNA- und Proteinebene koordiniert herunterreguliert wurden (Elvert et al., 2003). Hier wurde die Expression mit Hilfe von *hey2 +/-LacZ* Mäusen untersucht. In diesen transgenen Tieren wurde das *lacZ* Reportergen in den endogenen *hey2* Locus inseriert. Die Expression des Reportergens rekapituliert die endogene Hey2 Expression (Gessler et al., 2002). Die Gehirne von Wildtyp und heterozygoten *hey2 +/-LacZ* Mäusen wurden am Tag P10 präpariert und die Expression von LacZ und Flk-1 mittels Doppel-Immunfluoreszenzfärbung untersucht (Abb. 3.3.7). Es wurde eine starke Flk-1 Expression in allen Gefäßen gefunden. Die LacZ Reaktivität war generell schwächer,

aber ebenfalls mit Gefäßstrukturen assoziiert. Die Überlagerung von Flk-1 und LacZ-Färbung zeigte eine eindeutige Co-Lokalisation der Färbungen. Nur ein Teil der Flk-1 positiven Gefäße war dabei auch LacZ positiv. In diesem Modell konnte also eine Co-Expression von Hey2 und Flk-1 gefunden werden. Interessanterweise zeigten *hey2* defiziente Mäuse keinen abnormalen vaskulären Phänotyp (Gessler et al., 2002). Wahrscheinlich konnte ein anderes Familienmitglied, z. B. Hey1, den Verlust von Hey2 kompensieren.

Hey Faktoren sind somit Kandidaten für negative Regulatoren des *VEGF Rezeptor-2* Gens. Die Inhibierung der Expression des *VEGF Rezeptor-2* geschieht wahrscheinlich über Blockierung der HIF2 α vermittelten Stimulation des *VEGF Rezeptor-2* Promotors.

5. Zusammenfassung

Mit Hilfe des Cre-loxP Rekombinationssystem können Gene zelltypspezifisch inaktiviert werden. Die genregulatorischen Elemente des *flk-1* Gens wurden mit dem Cre Rekombinase Gen fusioniert und transgene Mauslinien etabliert. Zwei der transgenen *flk-1*-Cre Mauslinien (15962 und 15964) exprimierten die Cre Rekombinase. Diese Mäuse wurden mit der Reportermauslinie Rosa26R gekreuzt, so dass in doppelt transgenen Nachkommen die Cre Aktivität durch LacZ-Färbung analysiert werden konnte. Die Untersuchung von *flk-1*-Cre/Rosa26R Embryonen zeigte eine spezifische Färbung der Endothelzellen von Blutgefäßen in allen untersuchten Organsystemen, außer der Lunge. In den Organen von adulten Tieren wurde ebenfalls eine gefäßspezifische Cre Aktivität festgestellt. In experimentellen BFS-1 Tumoren konnte gezeigt werden, dass Cre in Tumorgefäßen exprimiert wurde. Die *flk-1*-Cre Mauslinien können in Zukunft verwendet werden, um gefloxe Zielgene spezifisch in embryonalen Endothelzellen zu inaktivieren.

Die Rolle von Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) in der embryonalen Gefäßentwicklung wurde untersucht, indem HIF Signalwege im Endothel blockiert wurden. Dazu wurde eine dominant negative HIF2 α Mutante verwendet (HIFdn), die in transfizierten Zellen die Aktivierung von HIF1 und HIF2 responsiven Promotoren stark inhibierte. Mittels der genregulatorischen Elemente des *flk-1* Gens wurden transgene Mausembryonen generiert, die HIFdn spezifisch in Endothelzellen exprimierten. Die HIFdn transgenen Embryonen zeigten eine Wachstumsretardierung und starben an Tag E11,5. Es fielen verschiedene kardio-vaskuläre Defekte auf. So war der Dottersack nicht durchblutet und zeigte keine hierarchische Gefäßarchitektur. Im Embryo wurde ein primitiver Gefäßplexus gebildet, was auf eine normale Vaskulogenese hinwies. Wie die Untersuchung des perineuralen vaskulären Plexus zeigte, konnten unreife Gefäße nicht remodelliert werden, da keine sprossende Angiogenese auftrat. Darüber hinaus wurden Defekte in der Herzentwicklung festgestellt, da die Trabekel kaum ausgebildet wurden

und sich eine unvollständige Herzschleife entwickelte. Eine Analyse der Expression endothelialer Gene wurde durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Tie-2, Flt-1 und Flk-1 in HIFdn transgenen Embryonen gegenüber dem Wildtyp stark reduziert waren, während Pecam-1, VE-Cadherin und Tie-1 unverändert waren. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass endotheliale HIFs eine wichtige Rolle bei der embryonalen Gefäßentwicklung bzw. deren Remodellierung spielen, indem sie die Expression der VEGF Rezeptoren und des Tie-2 Rezeptors regulieren.

Die Genregulation des humanen VEGF Rezeptor-2 (*KDR*) wurde charakterisiert. Der Promotor konnte durch Expression von HIF2 α , aber nicht HIF1 α , stimuliert werden. Die Expression von HIFdn führte zur starken Inhibierung der Promotoraktivität. Es wurden potentielle Bindungsstellen für HIF2 α im *KDR* Promotor identifiziert. Eine Mutationsanalyse zeigte, dass eine davon (HBS2) essentiell war für die Stimulierbarkeit des *KDR* Promotors durch HIF2 α . Die Mitglieder der Ets Familie Ets-1 und Ets-2 hatten keinen Einfluss auf den *KDR* Promotor und die Expression der dominant negativen Mutante Etsdn konnte die basale Promotoraktivität nicht senken.

Es wurde überprüft, ob es im 1. Intron des *KDR* Gens Enhancer Elemente gibt. Am 3' Ende des Introns wurde ein 523 bp Fragment gefunden, das 82% Sequenzidentität zum *flk-1* Enhancer zeigte. Die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der Ets, GATA, SCL/Tal-1 und Hox Familie, die für die Funktion des *flk-1* Enhancer essentiell waren, sind im putativen *KDR* Enhancer konserviert. In transgenen Mäusen, in denen das *lacZ* Reportergen unter Kontrolle des *flk-1* Promotors und des 1. *KDR* Introns stand, wurde keine LacZ-Aktivität beobachtet, folglich steht der funktionale Nachweis des potentiellen *KDR* Enhancers noch aus.

Der Einfluss von transkriptionellen Repressoren der Hey Familie auf die HIF2 α vermittelte Aktivierung des *flk-1* und *KDR* Promotors wurde untersucht. Die Expression von Hey Faktoren führte zu einer starken Reduzierung der Aktivität des *flk-1* und des *KDR* Promotors. Im neonatalen Mausgehirn wurde eine Co-Expression von Hey2 und Flk-1 in Blutgefäßen festgestellt. Die Expression von Hey1 und Hey2 wurde überdies in

kultivierten humanen Endothelzellen nachgewiesen. Die Hey Faktoren stellen somit mögliche Regulatoren des *flk-1* und *KDR* Gens dar.

6. Literaturverzeichnis

- Abbott BD, Buckalew AR. 2000. Placental defects in ARNT-knockout conceptus correlate with localized decreases in VEGF-R2, Ang-1, and Tie-2. *Dev Dyn* 219:526-538.
- Acker T, Plate KH. 2002. A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J Mol Med* 80:562-575.
- Adelman DM, Gertsenstein M, Nagy A, Simon MC, Maltepe E. 2000. Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes Dev* 14:3191-3203.
- Akagi K, Sandig V, Vooijs M, Van der Valk M, Giovannini M, Strauss M, Berns A. 1997. Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res* 25:1766-1773.
- Akuzawa N, Kurabayashi M, Ohyama Y, Arai M, Nagai R. 2000. Zinc finger transcription factor Egr-1 activates Flt-1 gene expression in THP-1 cells on induction for macrophage differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:377-384.
- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. 1995. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1:1024-1028.
- Andersson S, Davis DN, Dahlbäck H, Jörnvall H, Russell DW. 1989. Cloning, structure and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J. Biol. Chem.* 264:8222-8229.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. 1999. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-228.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Eds). 1994. *Current protocols in molecular biology*. Indianapolis: Wiley & Sons, Inc.
- Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87:3336-3343.
- Benjamin LE, Keshet E. 1997. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8761-8766.
- Betz UA, Vosschenrich CA, Rajewsky K, Muller W. 1996. Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination. *Curr Biol* 6:1307-1316.
- Bi W, Drake CJ, Schwarz JJ. 1999. The transcription factor MEF2C-null mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac expression of angiopoietin 1 and VEGF. *Dev Biol* 211:255-267.
- Borges E, Jan Y, Ruoslahti E. 2000. Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *J Biol Chem* 275:39867-39873.

- Boutet SC, Quertermous T, Fadel BM. 2001. Identification of an octamer element required for in vivo expression of the TIE1 gene in endothelial cells. *Biochem J* 360:23-29.
- Brahimi-Horn C, Berra E, Pouyssegur J. 2001. Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends Cell Biol* 11:S32-36.
- Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. 1992. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 114:521-532.
- Breier G, Breviario F, Caveda L, Berthier R, Schnurch H, Gotsch U, Vestweber D, Risau W, Dejana E. 1996. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* 87:630-641.
- Breier G, Clauss M, Risau W. 1995. Coordinate expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development. *Dev Dyn* 204:228-239.
- Brogi E, Schatteman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, Isner JM. 1996. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest* 97:469-476.
- Bruick RK, McKnight SL. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294:1337-1340.
- Brusselmans K, Bono F, Maxwell P, Dor Y, Dewerchin M, Collen D, Herbert JM, Carmeliet P. 2001. Hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia. *J Biol Chem* 276:39192-39196.
- Bussolati B, Dunk C, Grohman M, Kontos CD, Mason J, Ahmed A. 2001. Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *Am J Pathol* 159:993-1008.
- Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertszenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435-439.
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98:147-157.
- Cattelino A, Liebner S, Gallini R, Zanetti A, Balconi G, Corsi A, Bianco P, Wolburg H, Moore R, Oreda B, Kemler R, Dejana E. 2003. The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J Cell Biol* 162:1111-1122.
- Caveda L, Martin-Padura I, Navarro P, Breviario F, Corada M, Gulino D, Lampugnani MG, Dejana E. 1996. Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J Clin Invest* 98:886-893.
- Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, Jahnsen FL, Troyanskaya OG, Chang DS, Wang Z, Rockson SG, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. 2003. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10623-10628.

- Chin MT, Maemura K, Fukumoto S, Jain MK, Layne MD, Watanabe M, Hsieh CM, Lee ME. 2000. Cardiovascular basic helix loop helix factor 1, a novel transcriptional repressor expressed preferentially in the developing and adult cardiovascular system. *J Biol Chem* 275:6381-6387.
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. 1998. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125:725-732.
- Chung YS, Zhang WJ, Arentson E, Kingsley PD, Palis J, Choi K. 2002. Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development* 129:5511-5520.
- Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, Risau W. 1996. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 271:17629-17634.
- Cleaver O, Krieg PA. Molecular mechanisms of vascular development. in: Harvey RP, Rosenthal N. (Eds) 1999. *Heart Development*. 221-252. San Diego: Academic Press.
- Compernelle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, Van Veldhoven P, Plate K, Moons L, Collen D, Carmeliet P. 2002. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med* 8:702-710.
- Compernelle V, Brusselmans K, Franco D, Moorman A, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. 2003. Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cardiovasc Res* 60:569-579.
- Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, Cusella De Angelis MG, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Naldini L, Vescovi A, Dejana E, Cossu G. 2001. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10733-10738.
- Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. 1989. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84:1470-1478.
- Conrad PW, Freeman TL, Beitner-Johnson D, Millhorn DE. 1999. EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J Biol Chem* 274:33709-33713.
- Conway SJ, Kruzynska-Frejtak A, Kneer PL, Machnicki M, Koushik SV. 2003. What cardiovascular defect does my prenatal mouse mutant have, and why? *Genesis* 35:1-21.
- Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. 2003. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 28:488-494.
- Davis RL, Turner DL. 2001. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20:8342-8357.
- Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. 1996. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning [see comments]. *Cell* 87:1161-1169.
- De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, Ponzetto C, Cossu G. 1999. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal

- aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* 147:869-878.
- DeRuiter MC, Poelmann RE, VanMunsteren JC, Mironov V, Markwald RR, Gittenberger-de Groot AC. 1997. Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circ Res* 80:444-451.
- Dube A, Akbarali Y, Sato TN, Libermann TA, Oettgen P. 1999. Role of the Ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific Tie2 gene. *Circ Res* 84:1177-1185.
- Dube A, Thai S, Gaspar J, Rudders S, Libermann TA, Iruela-Arispe L, Oettgen P. 2001. Elf-1 is a transcriptional regulator of the Tie2 gene during vascular development. *Circ Res* 88:237-244.
- Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML. 1994. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* 8:1897-1909.
- Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. 1998. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 282:946-949.
- Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Acker T, Rauter M, Plate K, Sieweke M, Breier G, Flamme I. 2003. Cooperative interaction of hypoxia inducible factor (HIF)-2 α and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem* 278:7520-7530.
- Ema M, Faloon P, Zhang WJ, Hirashima M, Reid T, Stanford WL, Orkin S, Choi K, Rossant J. 2003. Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev* 17:380-393.
- Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y. 1999. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *Embo J* 18:1905-1914.
- Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. 1997. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:4273-4278.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. 2001. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107:43-54.
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. 1998. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 111:1853-1865.
- Fadel BM, Boutet SC, Quertermous T. 1999. Octamer-dependent in vivo expression of the endothelial cell-specific TIE2 gene. *J Biol Chem* 274:20376-20383.

- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. 1997. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237:752-757.
- Feraud O, Prandini MH, Vittet D. 2003. Vasculogenesis and angiogenesis from in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 365:214-228.
- Ferrara N. 2001. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C1358-C1366.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380:439-442.
- Ferrara N, Henzel WJ. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 161:851-858.
- Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. 1997. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev* 63:51-60.
- Flamme I, von Reutern M, Drexler HCA, Syed-Ali S, Risau W. 1995. Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation. *Dev Biol.* 171:399-414.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376:66-70.
- Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. 1999. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 126:3015-3025.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular & Cellular Biology* 16:4604-4613.
- Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. 2002. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ Res* 90:1189-1196.
- Furth PA, St Onge L, Boger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H, Hennighausen L. 1994. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9302-9306.
- Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte C, Witte MH, Jackson D, Suri C, Campochiaro PA, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. 2002. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 3:411-423.
- Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. 1997. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 272:23659-23667.
- Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. 1999. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 126:1149-1159.

- Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N. 2002. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417:954-958.
- Gerety SS, Anderson DJ. 2002. Cardiovascular ephrinB2 function is essential for embryonic angiogenesis. *Development* 129:1397-1410.
- Gering M, Rodaway AR, Gottgens B, Patient RK, Green AR. 1998. The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *Embo J* 17:4029-4045.
- Gessler M, Knobloch KP, Helisch A, Amann K, Schumacher N, Rohde E, Fischer A, Leimeister C. 2002. Mouse gridlock: no aortic coarctation or deficiency, but fatal cardiac defects in Hey2 ^{-/-} mice. *Curr Biol.* 12(18)::1601-1604.
- Giordano FJ, Gerber HP, Williams SP, vanBruggen N, Bunting S, Ruiz-Lozano P, Gu Y, Nath AK, Huang Y, Hickey R, Dalton N, Peterson KL, Ross J, Chien KR, Ferrara N. 2001. A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5780-5785.
- Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y, Neufeld G. 2000. Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 [corrected]. *J Biol Chem* 275:18040-18045.
- Gorski DH, Walsh K. 2000. The role of homeobox genes in vascular remodeling and angiogenesis. *Circ Res* 87:865-872.
- Gory-Faure S, Prandini MH, Pointu H, Roullot V, Pignot-Paintrand I, Vernet M, Huber P. 1999. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development* 126:2093-2102.
- Gossen M, Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547-5551.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-1769.
- Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, Sogawa K. 2002. The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem* 277:23508-23514.
- Graef IA, Chen F, Chen L, Kuo A, Crabtree GR. 2001. Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* 105:863-875.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74.
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. 1998. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 7:205-213.
- Gustafsson E, Brakebusch C, Hietanen K, Fassler R. 2001. Tie-1-directed expression of Cre recombinase in endothelial cells of embryoid bodies and transgenic mice. *J Cell Sci* 114:671-676.
- Hafner M, Orosz P, Kruger A, Mannel DN. 1996. TNF promotes metastasis by impairing natural killer cell activity. *Int J Cancer* 66:388-392.
- Harris AL. 2002. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2:38-47.

- Hata Y, Duh E, Zhang K, Robinson GS, Aiello LP. 1998. Transcription factors Sp1 and Sp3 alter vascular endothelial growth factor receptor expression through a novel recognition sequence. *J Biol Chem* 273:19294-19303.
- Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S. 2002. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 8:841-849.
- Heidbreder M, Frohlich F, Jöhren O, Dendorfer A, Qadri F, Dominiak P. 2003. Hypoxia rapidly activates HIF-3 α mRNA expression. *Faseb J* 17:1541-1543.
- Heidenreich R, Kappel A, Breier G. 2000. Tumor endothelium-specific transgene expression directed by vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences. *Cancer Res* 60:6142-6147.
- Heidenreich R, Machein M, Nicolaus A, Hilbig A, Wild K, Clauss M, Plate KH, Breier G. 2004. Inhibition of solid tumor growth by gene transfer of VEGF Receptor-1 mutants. *Int J Cancer*: im Druck.
- Henderson AM, Wang SJ, Taylor AC, Aitkenhead M, Hughes CC. 2001. The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation. *J Biol Chem* 276:6169-6176.
- Hidaka M, Stanford WL, Bernstein A. 1999. Conditional requirement for the Flk-1 receptor in the in vitro generation of early hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7370-7375.
- Hirai H, Ogawa M, Suzuki N, Yamamoto M, Breier G, Mazda O, Imanishi J, Nishikawa SI. 2003. Hemogenic and non-hemogenic endothelium can be distinguished by the activity of fetal liver kinase (Flk)-1 promoter/enhancer during mouse embryogenesis. *Blood* 101:886-893.
- Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. 1998. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9349-9354.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. 1994. *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Huang C, Sheikh F, Hollander M, Cai C, Becker D, Chu PH, Evans S, Chen J. 2003. Embryonic atrial function is essential for mouse embryogenesis, cardiac morphogenesis and angiogenesis. *Development* 130:6111-6119.
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7987-7992.
- Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. 1995. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 270:19761-19766.
- Iljin K, Dube A, Kontusaari S, Korhonen J, Lahtinen I, Oettgen P, Alitalo K. 1999. Role of ets factors in the activity and endothelial cell specificity of the mouse Tie gene promoter. *Faseb J* 13:377-386.
- Illi B, Puri P, Morgante L, Capogrossi MC, Gaetano C. 2000. Nuclear factor-kappaB and cAMP response element binding protein mediate opposite transcriptional effects on the Flk-1/KDR gene promoter. *Circ Res* 86:E110-117.

- Imai T, Jiang M, Chambon P, Metzger D. 2001. Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:224-228.
- Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, Metzger D. 1999. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 27:4324-4327.
- Ishikawa T, Tamai Y, Zorn AM, Yoshida H, Seldin MF, Nishikawa S, Taketo MM. 2001. Mouse Wnt receptor gene *Fzd5* is essential for yolk sac and placental angiogenesis. *Development* 128:25-33.
- Iso T, Hamamori Y, Kedes L. 2003. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:543-553.
- Issbrucker K, Marti HH, Hippenstiel S, Springmann G, Voswinckel R, Gaumann A, Breier G, Drexler HC, Suttorp N, Clauss M. 2003. p38 MAP kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *Faseb J* 17:262-264.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. 2001. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292:464-468.
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. 1998. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12:149-162.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. 2001. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468-472.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52:2745-2756.
- Jain RK. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9:685-693.
- Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA. 1998. Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech Dev* 73:117-123.
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. 2002. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111:709-720.
- Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. 1997. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *Journal of Biological Chemistry* 272:19253-19260.
- Jones N, Voskas D, Master Z, Sarao R, Jones J, Dumont DJ. 2001. Rescue of the early vascular defects in *Tek/Tie2* null mice reveals an essential survival function. *EMBO Rep* 2:438-445.
- Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. 1996. Notch3

- mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383:707-710.
- Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G. 1997. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* 124:2039-2048.
- Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. 1999. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274:6519-6525.
- Kappel A, Ronicke V, Damert A, Flamme I, Risau W, Breier G. 1999. Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice. *Blood* 93:4284-4292.
- Kappel A, Schlaeger TM, Flamme I, Orkin SH, Risau W, Breier G. 2000. Role of SCL/Tal-1, GATA, and ets transcription factor binding sites for the regulation of flk-1 expression during murine vascular development. *Blood* 96:3078-3085.
- Kataoka H, Takakura N, Nishikawa S, Tsuchida K, Kodama H, Kunisada T, Risau W, Kita T, Nishikawa SI. 1997. Expressions of PDGF receptor alpha, c-Kit and Flk1 genes clustering in mouse chromosome 5 define distinct subsets of nascent mesodermal cells. *Dev Growth Differ* 39:729-740.
- Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H. 1999. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126:4895-4902.
- Kearney JB, Ambler CA, Monaco KA, Johnson N, Rapoport RG, Bautch VL. 2002. Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division. *Blood* 99:2397-2407.
- Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA, Semenza GL. 2003. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res* 93:1074-1081.
- Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A. 2004. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 36:189-204.
- Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. 2001. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol* 230:230-242.
- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lubbert H, Bujard H. 1996. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10933-10938.
- Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H. 1995. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 121:4309-4318.
- Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W. 1998. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol* 8:529-532.
- Korhonen J, Lahtinen I, Halmekyto M, Alhonen L, Janne J, Dumont D, Alitalo K. 1995. Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo. *Blood* 86:1828-1835.

- Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL. 1999. Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol* 209:254-267.
- Kozak KR, Abbott B, Hankinson O. 1997. ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev Biol* 191:297-305.
- Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, Gallahan D, Closson V, Kitajewski J, Callahan R, Smith GH, Stark KL, Gridley T. 2000. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 14:1343-1352.
- Kremer C, Breier G, Risau W, Plate KH. 1997. Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res* 57:3852-3859.
- Kume T, Jiang H, Topczewska JM, Hogan BL. 2001. The murine winged helix transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are both required for cardiovascular development and somitogenesis. *Genes Dev* 15:2470-2482.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. 2002a. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16:1466-1471.
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. 2002b. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295:858-861.
- Le Lievre CS, Le Douarin NM. 1975. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 34:125-154.
- Lee YM, Jeong CH, Koo SY, Son MJ, Song HS, Bae SK, Raleigh JA, Chung HY, Yoo MA, Kim KW. 2001. Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. *Dev Dyn* 220:175-186.
- Leimeister C, Externbrink A, Klamt B, Gessler M. 1999. Hey genes: a novel subfamily of hairy- and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 85:173-177.
- Leimeister C, Schumacher N, Steidl C, Gessler M. 2000. Analysis of HeyL expression in wild-type and Notch pathway mutant mouse embryos. *Mech Dev* 98:175-178.
- Lelievre E, Lionneton F, Soncin F, Vandenbunder B. 2001. The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 33:391-407.
- Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP. 1998. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 273:6417-6423.
- Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP. 1999. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284:1534-1537.
- Liao EC, Paw BH, Oates AC, Pratt SJ, Postlethwait JH, Zon LI. 1998. SCL/Tal-1 transcription factor acts downstream of cloche to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes Dev* 12:621-626.
- Liao W, Bisgrove BW, Sawyer H, Hug B, Bell B, Peters K, Grunwald DJ, Stainier DYR. 1997. The Zebrafish Gene Cloche Acts Upstream Of a Flk-1 Homologue to Regulate Endothelial Cell Differentiation. *Development* 124:381-389.

- Lie-Venema H, Gittenberger-de Groot AC, van Empel LJ, Boot MJ, Kerkdijk H, de Kant E, DeRuiter MC. 2003. Ets-1 and Ets-2 transcription factors are essential for normal coronary and myocardial development in chicken embryos. *Circ Res* 92:749-756.
- Lin Q, Lu J, Yanagisawa H, Webb R, Lyons GE, Richardson JA, Olson EN. 1998. Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development. *Development* 125:4565-4574.
- Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. 1997. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 276:1404-1407.
- Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circulation Research* 77:638-643.
- Luo JC, Shibuya M. 2001. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha). *Oncogene* 20:1435-1444.
- Maemura K, Hsieh CM, Jain MK, Fukumoto S, Layne MD, Liu Y, Kourembanas S, Yet SF, Perrella MA, Lee ME. 1999. Generation of a dominant-negative mutant of endothelial PAS domain protein 1 by deletion of a potent C-terminal transactivation domain. *J Biol Chem* 274:31565-31570.
- Mahlapuu M, Ormestad M, Enerback S, Carlsson P. 2001. The forkhead transcription factor Foxf1 is required for differentiation of extra-embryonic and lateral plate mesoderm. *Development* 128:155-166.
- Maier MM, Gessler M. 2000. Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. *Biochem Biophys Res Commun* 275:652-660.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277:55-60.
- Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L. 2001. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414:550-554.
- Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. 2002. Inhibitory PAS Domain Protein (IPAS) Is a Hypoxia-inducible Splicing Variant of the Hypoxia-inducible Factor-3alpha Locus. *J. Biol. Chem.* 277:32405-32408.
- Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. 1997. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 386:403-407.
- Mandriota SJ, Pepper MS. 1998. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res* 83:852-859.
- Mandriota SJ, Pyke C, Di Sanza C, Quinodoz P, Pittet B, Pepper MS. 2000. Hypoxia-inducible angiopoietin-2 expression is mimicked by iodonium compounds and occurs in the rat brain and skin in response to systemic hypoxia and tissue ischemia. *Am J Pathol* 156:2077-2089.
- Maroulakou IG, Bowe DB. 2000. Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene* 19:6432-6442.

- Matsumoto T, Claesson-Welsh L. 2001. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE* 2001:RE21.
- Matsumoto T, Turesson I, Book M, Gerwins P, Claesson-Welsh L. 2002. p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *J Cell Biol* 156:149-160.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis [see comments]. *Nature* 399:271-275.
- Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. 1994. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 367:576-579.
- Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. 1993. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72:835-846.
- Minami T, Kuivenhoven JA, Evans V, Kodama T, Rosenberg RD, Aird WC. 2003. Ets motifs are necessary for endothelial cell-specific expression of a 723-bp Tie-2 promoter/enhancer in Hprt targeted transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:2041-2047.
- Minami T, Rosenberg RD, Aird WC. 2001. Transforming growth factor-beta 1-mediated inhibition of the flk-1/KDR gene is mediated by a 5'-untranslated region palindromic GATA site. *J Biol Chem* 276:5395-5402.
- Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A, Caprioli A, Sirabella D, Baiocchi M, De Maria R, Boratto R, Jaffredo T, Broccoli V, Bianco P, Cossu G. 2002. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* 129:2773-2783.
- Miquerol L, Langille BL, Nagy A. 2000. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* 127:3941-3946.
- Morishita K, Johnson DE, Williams LT. 1995. A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial-specific gene expression. *J Biol Chem* 270:27948-27953.
- Morita M, Ohneda O, Yamashita T, Takahashi S, Suzuki N, Nakajima O, Kawauchi S, Ema M, Shibahara S, Udono T, Tomita K, Tamai M, Sogawa K, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y. 2003. HLF/HIF-2alpha is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *Embo J* 22:1134-1146.
- Motoike T, Markham DW, Rossant J, Sato TN. 2003. Evidence for novel fate of Flk1+ progenitor: contribution to muscle lineage. *Genesis* 35:153-159.
- Nagy A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109.
- Nakagawa O, McFadden DG, Nakagawa M, Yanagisawa H, Hu T, Srivastava D, Olson EN. 2000. Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13655-13660.

- Nakagawa O, Nakagawa M, Richardson JA, Olson EN, Srivastava D. 1999. HRT1, HRT2, and HRT3: a new subclass of bHLH transcription factors marking specific cardiac, somitic, and pharyngeal arch segments. *Dev Biol* 216:72-84.
- Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y. 2002. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 12:13-19.
- O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ, Pugh CW. 1999. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* 274:2060-2071.
- Oehme F, Ellinghaus P, Kolkhof P, Smith TJ, Ramakrishnan S, Hutter J, Schramm M, Flamme I. 2002. Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 296:343-349.
- Oettgen P. 2001. Transcriptional regulation of vascular development. *Circ Res* 89:380-388.
- Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda Y. 1999. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 274:15732-15739.
- Palmiter RD, Chen HY, Brinster RL. 1982. Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* 29:701-710.
- Pardanaud L, Dieterlen-Lievre F. 1993. Expression of C-ETS1 in early chick embryo mesoderm: relationship to the hemangioblastic lineage. *Cell Adhes Commun* 1:151-160.
- Pardanaud L, Luton D, Prigent M, Bourcheix LM, Catala M, Dieterlen-Lievre F. 1996. Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development* 122:1363-1371.
- Partanen J, Puri MC, Schwartz L, Fischer KD, Bernstein A, Rossant J. 1996. Cell autonomous functions of the receptor tyrosine kinase TIE in a late phase of angiogenic capillary growth and endothelial cell survival during murine development. *Development* 122:3013-3021.
- Patan S. 1998. TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc Res* 56:1-21.
- Patterson C, Parrella MA, Hsieh CM, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E. 1995. Cloning and Functional Analysis Of the Promoter For Kdr/Flk-1, a Receptor For Vascular Endothelial Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry* 270:23111-23118.
- Patterson C, Wu Y, Lee ME, DeVault JD, Runge MS, Haber E. 1997. Nuclear protein interactions with the human KDR/flk-1 promoter in vivo. Regulation of Sp1 binding is associated with cell type-specific expression. *J Biol Chem* 272:8410-8416.
- Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH. 2000. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2 α plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8386-8391.
- Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. 1992. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359:845-848.
- Poole TJ, Finkelstein EB, Cox CM. 2001. The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev Dyn* 220:1-17.

- Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH. 1996. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86:47-57.
- Procopio WN, Pelavin PI, Lee WM, Yeilding NM. 1999. Angiopoietin-1 and -2 coiled coil domains mediate distinct homo- oligomerization patterns, but fibrinogen-like domains mediate ligand activity. *J Biol Chem* 274:30196-30201.
- Pugh CW, Ratcliffe PJ. 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9:677-684.
- Puri MC, Partanen J, Rossant J, Bernstein A. 1999. Interaction of the TEK and TIE receptor tyrosine kinases during cardiovascular development. *Development* 126:4569-4580.
- Puri MC, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J. 1995. The receptor tyrosine kinase tie is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J.* 14:5884-5891.
- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. 1995. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Research* 23:4878-4884.
- Queva C, Leprince D, Stehelin D, Vandembunder B. 1993. p54c-ets-1 and p68c-ets-1, the two transcription factors encoded by the c-ets-1 locus, are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene* 8:2511-2520.
- Raab S, Beck H, Gaumann A, Yüce A, Gerber HP, Plate K, Hammes HP, Ferrara N, Breier G. 2004. Impaired brain angiogenesis and neuronal apoptosis induced by conditional homozygous inactivation of vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost* 91:595-605.
- Rahimi N, Dayanir V, Lashkari K. 2000. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 275:16986-16992.
- Rahimi N, Kazlauskas A. 1999. A role for cadherin-5 in regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 activity in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 10:3401-3407.
- Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F. 1996. Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98:600-603.
- Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, Kuida K. 2002. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9248-9253.
- Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J. 1999. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 274:32631-32637.
- Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674.
- Risau W, Flamme I. 1995. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:73-91.
- Rönicke V, Risau W, Breier G. 1996. Characterization of the endothelium-specific murine vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) promoter. *Circ Res* 79:277-285.
- Rossant J, Cross JC. 2001. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2:538-548.
- Ryan HE, Lo J, Johnson RS. 1998. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 17:3005-3015.

- Sabin F. 1920. Studies on the origin of blood vessels and of red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Contrib. Embryol. Carnegie Inst. Washington* 9:214-262.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Salceda S, Caro J. 1997. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *Journal of Biological Chemistry* 272:22642-22647.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. 1995. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 376:70-74.
- Schlaeger TM, Bartunkova S, Lawitts JA, Teichmann G, Risau W, Deutsch U, Sato TN. 1997. Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3058-3063.
- Schlaeger TM, Qin Y, Fujiwara Y, Magram J, Sato TN. 1995. Vascular endothelial cell lineage-specific promoter in transgenic mice. *Development* 121:1089-1098.
- Schorpp-Kistner M, Wang ZQ, Angel P, Wagner EF. 1999. JunB is essential for mammalian placentation. *Embo J* 18:934-948.
- Schreiber M, Wang ZQ, Jochum W, Fetka I, Elliott C, Wagner EF. 2000. Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1. *Development* 127:4937-4948.
- Schuh AC, Faloon P, Hu QL, Bhimani M, Choi K. 1999. In vitro hematopoietic and endothelial potential of flk-1(-/-) embryonic stem cells and embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2159-2164.
- Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ, Marck BT, Matsumoto AM, Shelton JM, Richardson JA, Bennett MJ, Garcia JA. 2003a. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nat Genet* 35:331-340.
- Scortegagna M, Morris MA, Oktay Y, Bennett M, Garcia JA. 2003b. The HIF family member EPAS1/HIF-2alpha is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood* 102:1634-1640.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219:983-985.
- Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J. 1997. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89:981-990.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376:62-66.

- Sharrocks AD. 2001. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:827-837.
- Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH. 1995. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373:432-434.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845.
- Shyy JY, Chien S. 2002. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res* 91:769-775.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735-745.
- Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. 1999. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Embo J* 18:882-892.
- Soriano P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21:70-71.
- Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517.
- Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E. 1998. Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol* 18:3112-3119.
- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis [see comments]. *Cell* 87:1171-1180.
- Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. 1998. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 282:468-471.
- Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Tashiro F, Niwa H, Miyazaki Ji J, Hirota S, Kitamura Y, Kitsukawa T, Fujisawa H, Klagsbrun M, Hori M. 2002. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3657-3662.
- Takata T, Ishikawa F. 2003. Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression. *Biochem Biophys Res Commun* 301:250-257.
- Taylor KL, Henderson AM, Hughes CC. 2002. Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. *Microvasc Res* 64:372-383.
- Thayer JM, Meyers K, Giachelli CM, Schwartz SM. 1995. Formation of the arterial media during vascular development. *Cell Mol Biol Res* 41:251-262.
- Thornton SC, Mueller SN, Levine EM. 1983. Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science* 222:623-625.
- Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. 1999. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 286:2511-2514.

- Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. 1998. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev* 12:3320-3324.
- Tian H, McKnight SL, Russell DW. 1997. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & Development* 11:72-82.
- Topper JN, Gimbrone MA, Jr. 1999. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol Med Today* 5:40-46.
- Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF. 1995. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/flk and flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia - modulation of gene expression by nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 95:1798-1807.
- Uemura A, Ogawa M, Hirashima M, Fujiwara T, Koyama S, Takagi H, Honda Y, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Nishikawa S. 2002. Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J Clin Invest* 110:1619-1628.
- Uyttendaele H, Ho J, Rossant J, Kitajewski J. 2001. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5643-5648.
- Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, McClain J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Huang T, Papadopoulos N, Maisonpierre PC, Davis S, Yancopoulos GD. 1999. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1904-1909.
- van der Weyden L, Adams DJ, Bradley A. 2002. Tools for targeted manipulation of the mouse genome. *Physiol Genomics* 11:133-164.
- Vandenbunder B, Pardanaud L, Jaffredo T, Mirabel MA, Stehelin D. 1989. Complementary patterns of expression of c-ets 1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development* 107:265-274.
- Vandenbunder B, Queva C, Desbiens X, Wernert N, Stehelin D. 1994. Expression of the transcription factor c-Ets1 correlates with the occurrence of invasive processes during normal and pathological development. *Invasion Metastasis* 14:198-209.
- Vecchi A, Garlanda C, Lampugnani MG, Resnati M, Matteucci C, Stoppacciaro A, Schnurch H, Risau W, Ruco L, Mantovani A, Dejana E. 1994. Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *European Journal of Cell Biology* 63:247-254.
- Vidal F, Aragonés J, Alfranca A, de Landazuri MO. 2000. Up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 after endothelial denudation: role of transcription factor Egr-1. *Blood* 95:3387-3395.
- Visvader JE, Fujiwara Y, Orkin SH. 1998. Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev* 12:473-479.
- Wakiya K, Begue A, Stehelin D, Shibuya M. 1996. A cAMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene. *J Biol Chem* 271:30823-30828.

- Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 269:26988-26995.
- Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V. 1996. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia [see comments]. *Circulation* 94:1647-1654.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:5510-5514.
- Wang GL, Semenza GL. 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry* 270:1230-1237.
- Ward NL, Dumont DJ. 2002. The angiopoietins and Tie2/Tek: adding to the complexity of cardiovascular development. *Semin Cell Dev Biol* 13:19-27.
- Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R, Wasylyk B. 1991. The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *Embo J* 10:1127-1134.
- Wenger RH. 2002. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J* 16:1151-1162.
- Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. 1998. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood* 92:2260-2268.
- Willam C, Koehne P, Jurgensen JS, Grafe M, Wagner KD, Bachmann S, Frei U, Eckardt KU. 2000. Tie2 receptor expression is stimulated by hypoxia and proinflammatory cytokines in human endothelial cells. *Circ Res* 87:370-377.
- Wong AL, Haroon ZA, Werner S, Dewhirst MW, Greenberg CS, Peters KG. 1997. Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res* 81:567-574.
- Wu Y, Moser M, Bautch VL, Patterson C. 2003. HoxB5 is an upstream transcriptional switch for differentiation of the vascular endothelium from precursor cells. *Mol Cell Biol* 23:5680-5691.
- Xue Y, Gao X, Lindsell CE, Norton CR, Chang B, Hicks C, Gendron-Maguire M, Rand EB, Weinmaster G, Gridley T. 1999. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* 8:723-730.
- Yamaguchi TP, Dumont D, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. 1993. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118:489-498.
- Yamakawa M, Liu LX, Date T, Belanger AJ, Vincent KA, Akita GY, Kuriyama T, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C. 2003. Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circ Res* 93:664-673.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K. 2000. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408:92-96.

-
- Yin LY, Wu Y, Ballinger CA, Patterson C. 1998. Genomic structure of the human KDR/flk-1 gene. *Mamm Genome* 9:408-410.
- Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. 2001. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) peceptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 276:26969-26979.
- Zhong TP, Childs S, Leu JP, Fishman MC. 2001. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* 414:216-220.
- Zhong TP, Rosenberg M, Mohideen MA, Weinstein B, Fishman MC. 2000. gridlock, an HLH gene required for assembly of the aorta in zebrafish. *Science* 287:1820-1824.
- Zhu J, Motejlek K, Wang D, Zang K, Schmidt A, Reichardt LF. 2002. beta8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Development* 129:2891-2903.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Ang	Angiopoietin
AP1	Aktivatorprotein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	nukleärer Translokator des Aryl-hydrocarbon Rezeptors
Abb.	Abbildung
bHLH	basisches Helix-Schleife-Helix Motiv
BSA	Albumin aus Rinderserum
CBP	CREB bindendes Protein
CMV	Cytomegalievirus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CRE	zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) responsives Element
CREB	CRE bindendes Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Tag der Embryonalentwicklung
EBS	Ets Bindungsstelle
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epithelialer Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykol-bis(beta-aminoethylether)-N, N, N, N - tetraessigsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FAK	Fokalkinasen
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor

FLAG	Phenylalanin, Leucin, Alanin, Glycin
flk-1	f tale Leberkinase
flt-1	fms verwandte Tyrosin-Kinase
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/sec}^2$), Gamm
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phospho-Dehydrogenase
GFP	gr n fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
HE	H matoxylin und Eosin
HBS	HIF2 Bindungsstelle
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HRE	Hypoxie-responsives Element
HUE	humane Endothelzellen der Nabelschnur
HUVEC	humane Endothelzellen der Nabelschnurvene
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin hnlicher Wachstumsfaktor
bp	Basenpaare
kD	Kilodalton
KDR	Rezeptor mit inserierter Kinasedom ne
Luz	Luziferase
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mA	Milliamp re
mRNA	Boten-Ribonukleins ure
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NFAT	nukle rer Faktor von aktivierten T-Zellen
NFκB	nukle rer Faktor κB
OD	Optische Dichte
ODD	sauerstoffabh ngige Zerst rungsdom ne
OMIM	"Online Mendelian Inheritance In Man" Datenbank
P	postnataler Tag
p/e	Promotor und Enhancer des flk-1 Gens
PAA	Polyacrylamid
PAS	Per-ARNT-Sim Homologie

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzl sung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	"Platelet Derived Growth Factor"
PHD	Prolylhydroxylase
PI3 Kinase	Phosphatidylinositol-3'-OH Kinase
PIGF	Plazenta Wachstumsfaktor
PNV	perineuraler vaskul rer Plexus
RLU	relative Lichteinheiten
RT	Reverse Transkriptase
rpm	Rotationen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat Puffer
t-RNA	Transfer-RNA
TAD	Transaktivierungsdom ne
TBE	Tris-Bors ure-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethyldiamin
TG	transgen
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
tie	Tyrosin-Kinase mit Ig und EGF Homologie-Dom nen
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Aminoethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
UTR	nicht translatierte Region
UV	ultraviolett
. N.	ber Nacht
V	Volt
VE-Cadherin	Cadherin vaskul rer Endothelzellen
VEGF	Wachstumsfaktor f r vaskul re Endothelzellen
VHL	von-Hippel-Lindau Protein
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid

7.2 Die Nukleotidsequenz des KDR Promotors (-763/+390)

CTAAGGATAT CTTGGCTGGA AGCTCTGCTC TGAAAAGGGG CATGGCCAAA
 CTTTCACTAG GGCTCTTCGT TGGGGAGCAC GATGGACAAA AGCCTTCTTG
 GGGCTAGGCA GGTCAC TTCA AACTTGGAGC CGCCAAATAT TTTGGGAAAT
 AGCGGGAATG CTGGCGAACT GGGCAAGTGC GTTTTCTGAT TAAGAGCAAC
 CAGATTCAGC TTTTTAAACT ACAATTATAC TGGCCAAACA AAATACCCTT
 ATACAAAAC CAAAAC TACT GGCAGGAGTC GCTGCCAGCT TGCGACCCGG
 CATACTTGGC TGAGTATCCG CTTCTCCCTT GTGGCTCCAA ACTGCTGCAG
 ATTCTCGGCC ACTTCAGACG CGCGCGATGG CGAAGAGAGT CCTGCACTTT
 GACGCGCCTG GTGAGGGAGC GGTGCTCTTC GCAGCGCTCC TGGTGATGCT
 CCCCAAATTC CGGGGACCGG CAAGCGATTA AATCTTGGAG TTGCTCAGCG
 CTCGTTACCG AGTACTTTTT ATTTACACCA GAAACAAAGT TGTTGCTCTG
 GGATGTTCTC TCCTGGGCGA CTTGGGGCCC AGCGCAGTCC AGTTGTGTGG
 GGAAATGGGG AGATGTAAAT GGGCTTGGGG AGCTGGAGAT CCCC GCCGGG
 TACCCGGGTG AGGGGCGGGG CTGGCCGCAC GGGAGAGCCC CTCCTCCGCC
 CCGGCCCGC CCCGCATGGC CCCGCCTCCG CGCTCTAGAG TTTCGGCTCC
 AGCTCCCACC CTGCACTGAG TCCC GGGACC CCGGGAGAGC GGTCAATGTG
 TGGTCGCTGC GTTTCCTCTG CCTGCGCCGG GCATCACTTG CGCGCCGCAG
 AAAGTCCGTC TGGCAGCCTG GATATCCTCT CCTACCGGCA CCCGCAGACG
 CCCCTGCAGC CGCGGTCGGC GCCCGGGCTC CCTAGCCCTG TGCGCTCAAC
 TGTCTGCGC TGCGGGGTGC CGCGAGTTCC ACCTCCGCGC CTCCTTCTCT
 AGACAGGCGC TGGGAGAAAG AACCGGCTCC CGAGTTCTGG GCATTTCGCC
 CGGCTCGAGG TGCAGGATGC AGAGCAAGGT GCTGCTGGCC GTCGCCCTGT
 GGCTCTGCGT GGAGACCCGG GCCGCCTCTG TGGGTAAGGA GCCCACTCTG

G

7.3 Die Nukleotidsequenz des 1. Introns des KDR Gens

GTAAGGAGCC CACTCTGGAG GAGGAAGGCA GACAGGTCGG GTGAGGGCGG
 AGAGGACCTG AAAGCCAGAT CTAACTCGGA ATCGTAGAGC TGGAGAGTTG
 GACAGGACTT GACATTTTGC GATCTTTCAT TTACCAGTGG GGAAACTGAG
 GCTCAGAGAC TGGCCCAAGA TTACCCAGCG AGTCTGTGGT CGCCTGTGCT
 CTAGCCCAGT TCCTTTTCTA GGACTCTGGT TTGCGACAGG GACCTCGGCT
 GGAGCGTGTC CTGAGATGCC GACACACCCT CAGGCTCTTG GGAGGCTGGG
 GTGGGAAGGC GCCTGGGGTT GGCAGGCAGG AAGTGCCTCC GCAGGCGAGA
 AAAGGCGGTG AAAAGTTGTC TGGCTGCGCG CAACATCCTA GTCCGGGCCC
 GGGGAAGAAA ACCTTGCCGG AATCTCAGGC CGGGTCTCCC GGATCGGACG
 GTACACTCGG TTCTGCCTCT TTGCGGGACC CGGCCGTTG TTGTCTTCAT
 GCTCGAACAC ACTTGCACAC CCACTGTGTG AAGTGGGGTC TGGAGCGGAG
 AGAAACTTTT TTTCCTTCCT TGGTGCAGGA CGCCGCTCTC CTTGCAGAGC
 GAAGAAGGGG GGAATAGGG ACTTGTCTTG GGGGCTTTGA CAGCTTCCCC
 AAGGGTCTCC AAGTAACAGC CAACTGTCCT GCGTAAAGCA TTGCACATCT
 TTCAAAGCGC TGTGGTCCTT GGTGTAAGCG CATAGTCAGA AGTTCAAGCT
 CCGAAAACCT TTCCTGTGGG CCTTGGTACC TAGCTTTAGT GCCATTCTTT
 CCTCTCCCTG CCGCCTAAAA TTTCCGTCTC CTTCAATTAG GAACACACAC
 GTTCTTCATG CAATAGCTGT CTGTCTTTTC TTCCTCACTT TCCTTTCTCT
 CTCAACCCCT TAGATAATAT TTCTTTCCTG CAGCCAGTTT GCTGATATCC
 AGATTTCCAC CCTTTGCAGG GTGAGAAAGG GGAAAGGGTC AGAGAAAGAA
 AAAAAAAAAAG TCGAATAATT CAGGGAAAAA AATTTCTTAC TTCCTAAGAC
 AAGAATCACA TGTCTTAGAA GACACTCACA CCCACATACA GTACCAGGAT
 CATCTGTCCA TGGTTACTGA ATTTTCTTTA TAATGACTTG GTTCAACGGG
 TCCAGTCCAC CATGGACACT CATTGTGCC AGACAAGCCC TCTCTCTCCC
 CCTTTCTGGG CAGAGAATGA AAGTCTGGAA CATGTGGTTG CTCTGTATTC
 CACAAAGAAG TGAGTTGCTT TTAAGCCTGG GGTGTTTCCT AGCGTAGTAG
 TAACGGCAGG CCGGTCGCCC TGAATATAAT GGTGAACTTG CCCTTTTGGA
 GTGCATTACT TGCTTAATTG GATTGGGCTG TAATTGGTGC CATCAAATTC
 TAGAGACAGA GGCACGTGTT TTTTTCCTTC CCGTCTTTGA GCTGGAAGGG

TAACAGTGCA	CAAATTAATT	AATATTGGTT	ATGGGATTTG	AACATAGAAG
GGCTTTTTTAT	TGAGTAGTAG	CATATGTACC	TCTTACAGTT	ATTTCTTTAG
AACTTTCTGA	AGAGTCCAGC	TCAAGCTTGC	CAATGAAAAC	GAATGACATT
TAATGGAGCA	AAAACAAAAA	ACAAAAAACT	ATGTTGGTCT	ACAAATATGA
ATTTGAAGTT	ATTGAGAGCC	TTGTTGAATA	GATTTTTTGT	GTAAACGTGT
CTCTAGAATA	GTATGGCATT	GTCTCAGCTT	CCTATGAATG	AAGGACATAC
CTTTTCTTTT	TTAAAATATT	TGTTACACAG	GAAAGTGTGT	CTAGAATGTG
ATCTGTGGCA	ATAAATTATG	AGAGACCTTC	AAGAGTTTCT	GATTTTGGTA
GCCGAGTGGG	CACAGTTTAT	TGAGAATCAT	TTTTACTGCC	ATTTGTTTTC
TCACAAGAAT	GTGCCCAAAT	AATGGTTTTT	TTCTCATTTG	GATGGCAGTG
TGAATTGTAC	ATCATGTTTT	CAGCATCTTT	CTCAACCTAG	TGTTCCCCAG
TCAAGTTTGA	AATCTGTGTT	ATCCAAATGA	ATTGTTTTCA	TTTTCCTTTT
CTTAGACAAA	GTGGGACTCC	AGGTTTCATT	TTGCTTTTAA	ACATTTTGGT
TTTTTGTTTTG	CCTGTTTTGG	GGGCAGTTAT	TTCTTTCATA	TTAAAAAGTA
CTGTGCAGGC	TGGGTGCAGT	GGCTCATTC	TGTAATCCCA	GCACTTAGGG
AAGCAGAGGC	AGGAGGATCG	CTTGAGTCCA	GGAGTTCAAG	AAGTGCCTGG
GCAACATAGC	GAGACCCCAT	TCTCTATTTA	AAACATAAAT	GTAACCCCCG
TTCCACGCAC	AAAGTACTGT	GCAAATTAAT	TAAACATGAC	CACCCAGACC
AGCAACTGTC	CAAGAGTGGC	CCATAGACCA	TCTGTGGTAG	GATAATTTGA
AATGCTTGTT	AAAATGCAGA	TTTGTAGACC	CAGGGATATT	CTGACAGAGT
CTAAAGTCTT	AAGAACAAAA	CTGTTCTAAA	CATAAGTCAG	TACCAATGCC
AGTTAATTTT	TGAGATATAT	TGATATAACT	TAGTTTCCAG	TTTTTTAAAA
ACCATATTAT	TGACTTAAAA	ACCATGATAT	TGACCAGTTA	TGTCAGTAAC
TTATTTTGCA	CATCTGTGTG	GTGTGTGAGA	ACATGTGCAG	TCACTTATTC
ATTTTGCCTG	CATTTGTTCA	TATTGGGATC	CTCAGATTCA	ATGCACTGGA
TGTTTGCAC	GGGTATTTAC	TTATACTCTC	TCTATTTATT	CCGTCTCATA
CTTCGTCCTA	TTTGTTTATA	CTCTCTTATT	TGCCCAGCAA	GGTCAATGCC
AGTTTAGGCC	TAGGGAGTCA	TTTTTTCTTA	GTTGATATGA	CTTAGAAAGC
TTGGGTGCCT	GCCCAACATC	AATTACTTTT	TTAAAGCTGG	TATTTTCTAG
GTCTTGATAT	TTATTAAGAC	CCTAGCATAG	TGGACAATTT	TTCTTTCTCT
CATGCTTTTT	CAACACCTCA	TAGCTCTTCA	CATTTAGTTG	ACAGAGAATT

CAGTTATCTT GCTGTAGAGT GACCCATGGT GAGGAATCTA TGCCATGGTA
CTTTTCTGGT TCTTATCCCT TATAGGTAAA GACAAGTTTC TTATGTCTGA
AGCTTGATGT CAGGATGAGT TCAGGGCTTT GATGAATAAG TTCAGATCTC
CCAATTGTAA TTCATTAGCA TTGCACTTAA AAAAATTTAT ATACGTTTTT
AAAAAAGGGT AATGCTAATG AATTACAATA GAGAGAAAAG TACATTAGTT
TGCATGTATG TGTGAAACTG GGAAAATTTT TCACGAAAAT ATTCATATAC
TTTTTAAAAA AAGGGTAATG CTAATGAATT ACAGTAGACA GAAAAGTATA
TTAATTTGCA CATATGTGTA AAATTGGGAA AATTCCACAC ATACATAAAA
GTATATTAAT ATGCATGTAT GTGTGGAATT GGGGAATGTT TTCTCTTCT
CAGTTTCTCT CCCTTGCTTT **TAATGTACAG TCTTTATGAG CCATTATTTT**
AGCTGTGGCA GTTTGGTTAC CAGGGGAAGC GCACTAGAAA ATTGATAAAG
GAAAATGAGA CAAGGTCATA GATTCTCTCA CTCCCTTCAG GGTACGTAGA
TGAACTATAT AAAAATCCGT CTAAGTGGGA TTCGTTAATC AGCAATTTAG
TCAAATGTGT ACATCCTATG TTCTATAAGA AATGTCAGTG GGTCCTTTCC
CAAGGGAGTG AGATCATCAG ATGAAGGTTT ATTTGGTTTC AATGTCCCGT
ATCCTTTTGT AAGACCTTGA AGTTGGCAAT GCAGGAAAAC AGGAACTCCA
CCCTAGCTCC ATGAATTGCA GAACTGTTGT GTTGGTTTAT GACCATCTGC
CCATTCTTCC TGTTATGACA CAGCTTGTGA ACTTTTACTG AGAATGGTGA
AAAGTAAATT CCCAGTTTTA TACAATGAAT TGCTGAAGAG GCCTTTTAAA
GTATAGAGTA TGCATTGTTT ATGGAAGGTG TTTCCCTATTA GGTCTAACTC
AGTGGCAACT ACATTCATTT ATTTAATTTG TTTCTAGGTT TGCCTAGTGT
TTCTCTTGAT CTGCCCAGGC

7.4 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Aurich, Barth, Bestgen, Clauss, Daut, Elsässer, Feuser, Grzeschik, Habermehl, Hartmann, Junclas, Kern, Kirchner, Knöller, Koch, Koolman, Lammel, Lill, Löffler, von Löw, Müller, Niessing, Röhm, Schäfer, Schulz, Seifart, Seitz, J., Seitz, K. A., Steinmetz, Westermann

7.5 Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die am Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur Funktion endothelialer Transkriptionsfaktoren bei der Angiogenese“ im Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung unter der Leitung von Prof. Georg Breier und Prof. Matthias Clauss ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischem medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bzw. werden in folgenden Fachartikeln veröffentlicht:

Alexander H. Licht, Sabine Raab, Ursula Hofmann, Georg Breier: Endothelium-specific Cre recombinase activity in flk-1-Cre transgenic mice,
Developmental Dynamics, 229, 312-318, 2004

Alexander H. Licht, Marcel Groot, Felix Müller-Holtkamp, Ingo Flamme, Georg Breier: Endothelial hypoxia-inducible factors control cardio-vascular development by regulating Tie-2 and VEGF receptor expression,
2004, *Manuskript in Vorbereitung*

Marburg, den 07.04.2004

Alexander H. Licht