

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologe **Oliver Tobias Pein**  
aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung: .....

**Der Transkriptionsfaktor JunB in der zellulären  
Hypoxie-Antwort und in der Angiogenese:  
Entschlüsselung der übergeordneten Signalwege und  
Identifizierung und funktionelle Analyse des  
JunB-Zielgens CBF $\beta$**

Gutachter: Prof. Dr. Peter Angel  
Prof. Dr. Peter Lichter

*meinen Eltern*

---

## Abstract

Induction of angiogenesis and dysregulation of signal transduction pathways regulating cell proliferation and viability are hallmarks of cancer. Angiogenesis is primarily activated by VEGF, whose expression is induced by hypoxia via the transcription factor HIF. Several vascular and angiogenic defects account for an early embryonic lethality of JunB-deficient mice between E 8.5 and E 10.5. The striking phenotypic similarities between JunB-knock out embryos and embryos lacking VEGF, VEGFR-1, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  and ARNT prompted us to investigate the underlying molecular mechanisms of JunB regulation under hypoxic conditions. Therefore, a comparative analysis of murine wildtype, *junB*<sup>-/-</sup> and HIF-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> fibroblasts as well as fibroblasts with repressed NF $\kappa$ B activity was performed. Expression analysis revealed that the *junB* gene itself is rapidly induced under hypoxic conditions. This observed induction requires NF $\kappa$ B and neither depends on the activity of the MAP kinases JNK, ERK or p38 nor on the Hypoxia inducible factor HIF-1 $\alpha$ . Loss of JunB strongly decreases basal transcription of VEGF and abolishes VEGF induction in hypoxia almost completely, suggesting that JunB is an important activator of VEGF transcription. On the other hand, JunB is not required for the induction of its own gene, but rather modulates its transcription under hypoxic conditions since induction of the *junB* promoter in JunB-deficient cells takes place and is induced even to a higher level compared to the induction of endogenous *junB* in wildtype cells.

In order to identify novel JunB target genes that are involved in the cellular hypoxia response and in angiogenesis, we performed a DNA-chip based large scale comparative gene profiling analysis using heterozygous and JunB knock out endothelioma cells that were incubated either under normoxic or hypoxic conditions. JunB-deficient endothelioma cells mimic in an *in vitro* angiogenesis model the vascular phenotype of *junB*<sup>-/-</sup> embryos *in vivo*. The comparative gene profiling analysis revealed 46 genes to be differentially expressed in a JunB dependent manner under hypoxic conditions. The  $\beta$  subunit of the Core binding factor, CBF $\beta$  was investigated in more detail. Reporter gene analysis with a newly cloned reporter containing 1600 bp upstream of the CBF $\beta$  gene demonstrated that CBF $\beta$  is strongly induced upon coexpression of JunB and c-Fos. RT-PCR and IHC analyses in mice with either deficient or compromised expression of JunB in the hematopoietic compartments of the spleen and the bone marrow showed that CBF $\beta$  is indeed a JunB target gene *in vivo*. The transgenic expression of CBF $\beta$  in *junB*<sup>-/-</sup> endothelioma cells rescued the angiogenic defect observed in the *in vitro* matrigel angiogenesis model almost completely, suggesting that the JunB-dependent expression of CBF $\beta$  is a major event in angiogenesis and leads, when dysregulated, to a disturbed angiogenesis as observed in JunB-deficient mice.

## Zusammenfassung

Die Induktion von Angiogenese und fehlregulierte Signaltransduktionswege, die Proliferation und Überleben von Zellen beeinflussen, sind essentiell bei der Entstehung von Krebs. Angiogenese wird hauptsächlich durch VEGF aktiviert, dessen Expression unter hypoxischen Bedingungen über den Transkriptionsfaktor HIF induziert wird. JunB-defiziente Mäuse zeigen einen vaskulären Phänotyp und sterben zwischen Tag 8,5 und 10,5 der Embryonalentwicklung. Die auffallenden phänotypischen Übereinstimmungen zwischen JunB-defizienten Embryonen und Mäusen ohne funktionellem VEGF, VEGFR-1, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und ARNT haben uns veranlasst, die molekularen Mechanismen der JunB-Regulation unter hypoxischen Bedingungen zu untersuchen. Expressionsanalysen zeigen, dass unter hypoxischen Bedingungen das *junB*-Gen selbst induziert wird. Diese Induktion verläuft über NF $\kappa$ B und ist unabhängig von den MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 sowie von HIF-1 $\alpha$ . Das Fehlen von JunB führt zu einer verminderten basalen Transkription von VEGF und verhindert die Hypoxie-vermittelte VEGF-Induktion fast vollständig, was bedeutet, dass JunB ein wichtiger Aktivator der VEGF-Transkription ist. Andererseits wird JunB nicht für die Transkription seines eigenen Gens benötigt, sondern scheint eher seine Transkription unter hypoxischen Bedingungen zu modulieren.

Zur Identifizierung neuer JunB-Zielgene, die an der zellulären Hypoxie-Antwort beteiligt sind, wurde eine DNA-Microarray Expressionsanalyse mit heterozygoten und JunB-defizienten Endothelioma-Zellen durchgeführt, die entweder unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden. In einem *in vitro* Angiogenese-Modell zeigen diese JunB-defizienten Endothelioma-Zellen Defekte in der Röhrenbildung und imitieren den Phänotyp JunB-defizienter Embryonen. Nach Auswertung des DNA-Microarray Experiments konnten 46 Gene identifiziert werden, die unter hypoxischen Bedingungen eine JunB-abhängige Expression aufweisen. Der Transkriptionsfaktor CBF $\beta$ , der im Verlauf der Arbeit genauer untersucht wurde, wird durch JunB und c-Fos induziert, wie Kotransfektionsanalysen mit einem Reporterkonstrukt zeigen, welches unter der Kontrolle des 1600 bp langen stromaufwärts von CBF $\beta$  gelegenen Sequenzbereichs steht. RT-PCR- und IHC-Analysen in der Milz und dem Knochenmark von Mäusen mit defizienter oder stark verminderter JunB-Expression belegen, dass die Transkription von CBF $\beta$  auch *in vivo* durch JunB reguliert wird. Die transgene Expression von JunB hebt den Angiogenesedefekt in *junB*<sup>-/-</sup>- Endothelioma-Zellen, der im *in vitro* Angiogenese-Modell beobachtet wurde, fast vollständig auf. Die JunB-abhängige Transkription von CBF $\beta$  ist demnach ein wichtiger Bestandteil der Gefäßbildung und resultiert, wenn fehlreguliert, zu einer gestörten Angiogenese, wie sie in JunB-defizienten Embryonen beobachtet werden kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zum ersten Mal die molekularen Mechanismen, die zur Hypoxie-vermittelten Induktion von *junB* führen. Die Identifikation von CBF $\beta$  als JunB-Zielgen eröffnet die Möglichkeit, dass die JunB-abhängige CBF $\beta$ -Expression nicht nur in der Angiogenese eine wichtige Rolle spielt, sondern auch bei Knochenerkrankungen und myeloiden Leukämien von entscheidender Bedeutung ist.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau Dr. Marina Schorpp-Kistner, für die Bereitstellung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft sowie die intensive Betreuung und ihre Geduld.

Herrn Prof. Dr. P. Angel danke ich für die Möglichkeit, dass ich meine Doktorarbeit in seiner Abteilung durchführen konnte. Weiterhin möchte ich mich für seine stetige Unterstützung bei der Durchführung des Projekts bedanken.

Herrn Prof. Dr. P. Lichter möchte ich für die Übernahme des Korreferats danken.

Ein herzlicher Dank geht an Melanie Sator-Schmidt für die technische Unterstützung im Labor.

Bei Herrn Prof. Dr. P. Lichter und Lars Hummerich möchte ich mich für die Herstellung der DNA-Microarray-Chips bedanken.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. C. Scheidereit für die Bereitstellung der NF $\kappa$ B Super Repressor Zellen, bei Prof. Dr. R. Johnson für die HIF-1 $\alpha$ -defizienten Mausfibroblasten und bei Dr. A. Cerwenka für den pMX-pie Vektor.

Ich möchte mich bei Sibylle Teurich, Dr. Bettina Hartenstein und Dr. Lore Florin für die Gewebeschnitte bzw. die Gewebeproben der JunB-defizienten Mäuse bedanken.

Bei Björn Textor bedanke ich mich für die Zusammenarbeit bei der Klonierung der *junB*-Reporterkonstrukte.

Ein Dank geht an Dr. Alexander Licht für die Hilfe bei den *in vitro* Angiogenese-Modellen und die Diskussionen auf dem Gebiet der Angiogenese.

Frau Dr. Lore Florin bin ich für die Hilfe bei der Auswertung der Microarray-Daten sowie für die Ratschläge bei diversen Softwareprogrammen sehr dankbar.

Für die kritische und konstruktive Durchsicht dieses Manuskriptes bedanke ich mich bei Dr. Marina Schorpp-Kistner, Dr. Lore Florin, Dr. Alexander Licht und Dr. Jochen Hess.

Für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie für die angenehme Atmosphäre möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung A100 bedanken.

Mein allergrößter Dank geht an meine Eltern Renate und Ronald sowie an meine Geschwister Carolin und Bettina mit Marc und Lea.

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaar(e)
bFGF	basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bZip	basische Region und "Leucine-Zipper"
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-3'-Monophosphat
CBF $\beta$	"Core Binding Factor $\beta$ "
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CMV	Zytomegalovirus
cpm	counts per minute
CRE	"cAMP responsive element"
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
ddH <sub>2</sub> O	steriles destilliertes Wasser
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonalentwicklung
ECL	"enhanced chemoluminescence"-Lösung
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
END	Endothelioma-Zellen
ERK	"Extracellular signal regulated kinase", MAP-Kinase p42/p44
FCS	fötales Kälberserum

---

g	Erdbeschleunigung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanosulfonsäure
HIF	"Hypoxia inducible factor"
HRE	"Hypoxia respnsice element"
HX	Hypoxie
IHC	Immunhistochemie
JNK	Jun-N-terminale-Kinase
k	kilo
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
M	molar (Mol/Liter)
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEF	Embryonale Mausfibroblasten
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NF $\kappa$ B	"Nuclear factor $\kappa$ B"
NX	Normoxie
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std.	Stunde(n)
Tab.	Tabelle
TCF	"Ternary complex factor", Transkriptionsfaktor
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
TRE	"TPA responsive element"



Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit (unit)
UE	Untereinheit
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolette Strahlung
VEGFR	Rezeptor von VEGF
v/v	Volumen-Volumenverhältnis
w/v	Gewichts-Volumenverhältnis
wt	Wildtyp

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABSTRACT</b>	<b>II</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>III</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>IV</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>VIII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Entstehung des Blutgefäßsystems</b>	<b>1</b>
1.1.1 Vaskulogenese	2
1.1.2 Angiogenese	4
<b>1.2 Physiologische Bedeutung von Hypoxie</b>	<b>8</b>
1.2.1 HIF -1	8
1.2.2 Zelluläre Mechanismen der Hypoxieantwort	11
<b>1.3 Der Transkriptionsfaktor AP-1</b>	<b>13</b>
1.3.1 Regulation der AP-1-Aktivität	14
1.3.2 <i>in vivo</i> Funktion der AP-1 Mitglieder Fos, FosB, Fra-1, c-Jun und JunD	16
1.3.3 <i>in vivo</i> Funktion von JunB	17
<b>1.4 Fragestellung</b>	<b>20</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>22</b>
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3 Enzyme	26
2.1.4 Radiochemikalien	26
2.1.5 Kits	26
2.1.6 Antikörper	27
2.1.7 Oligonukleotide	27
2.1.8 Sonden für Northern Blot Expressionsanalysen	28
2.1.9 Vektoren	28
2.1.10 Bakterienmedien	28
2.1.11 Bakterienstämme	28

2.1.12	Zellkultur	29
2.1.13	Eukaryotische Zelllinien	29
2.1.14	Puffer und Lösungen	30
2.1.15	Molekulargewichtsmarker	30
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>31</b>
2.2.1	Molekularbiologische DNA Methoden	31
2.2.1.1	Schnellisolierung genomischer DNA	31
2.2.1.2	Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Minipräp)	31
2.2.1.3	Plasmidpräparation im großen Maßstab (Maxipräp)	31
2.2.1.4	Spezifischer Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme	32
2.2.1.5	Auffüllen von 5'-Überhängen	32
2.2.1.6	Dephosphorylierung von DNA	32
2.2.1.7	Ligation von DNA	32
2.2.1.8	Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese	33
2.2.1.9	Aufreinigung von DNA aus Agaraosegelen	33
2.2.1.10	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	33
2.2.1.11	Ethanolpräzipitation von DNA	33
2.2.1.12	Spektrophotometrische Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration in Lösung	33
2.2.1.13	Sequenzierung von DNA	34
2.2.1.14	Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.2.1.15	Quantitative RT-PCR	34
2.2.1.16	Herstellung von chemisch kompetenten <i>E.coli</i> Bakterien	35
2.2.1.17	Transformation von chemisch kompetenten <i>E.coli</i> Bakterien	35
2.2.2	Molekularbiologische RNA-Methoden	36
2.2.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA	36
2.2.2.2	Synthese von cDNA	37
2.2.2.3	Elektrophorese von RNA	37
2.2.2.4	Transfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern Blot)	37
2.2.2.5	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	38
2.2.2.6	Hybridisierung von RNA	39
2.2.2.7	Fluoreszenzmarkierung und Hybridisierung von Proben für den DNA-Microarray	39
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	40
2.2.3.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten	40
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	41
2.2.3.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.2.3.4	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot)	42
2.2.3.5	Bestimmung der Luziferaseaktivität	42
2.2.4	Histologische Methoden	43
2.2.4.1	Fixierung von Gewebe und Einbettung in Paraffin	43
2.2.4.2	Anfertigung von Paraffingewebeschnitten	43
2.2.4.3	Immunhistochemie (IHC)	44

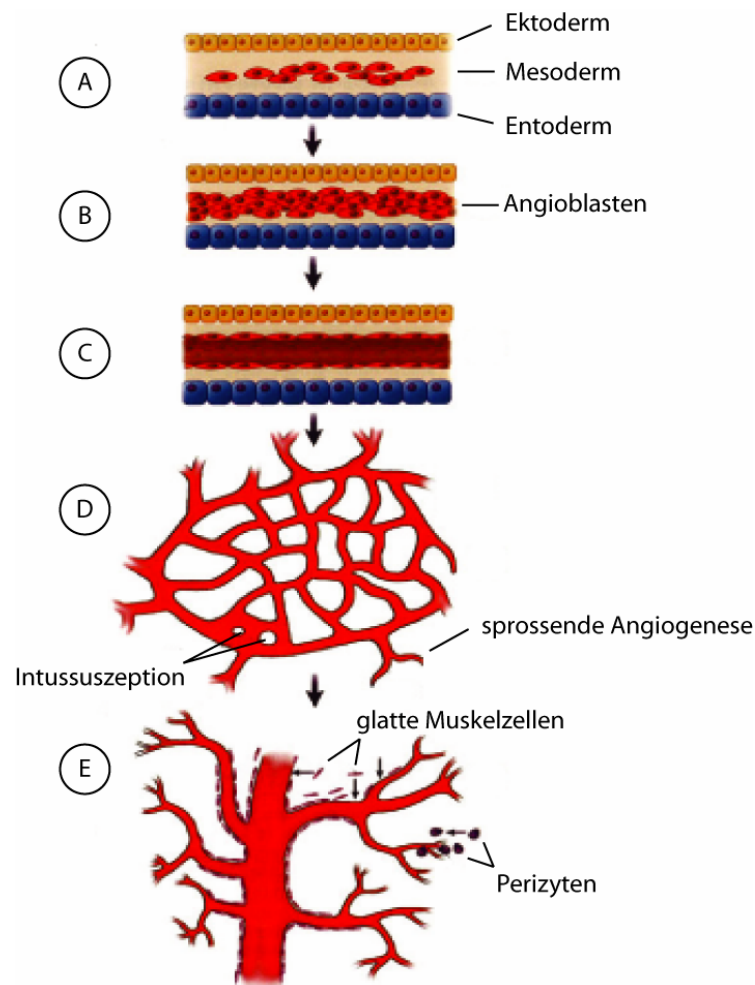
2.2.4.4	Immunfluoreszenz auf kultivierten Zellen	44
2.2.5	Zellkulturmethoden	45
2.2.5.1	Kulturbedingungen	45
2.2.5.2	Passagieren von Zellen	45
2.2.5.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	46
2.2.5.4	Mykoplasmen-Test	46
2.2.5.5	Induktion von Hypoxie	47
2.2.5.6	Kalzium-Phosphat-Transfektion	47
2.2.5.7	Retrovirale Infektion von Endothelioma-Zellen	47
2.2.5.8	<i>in vitro</i> Angiogenese Studie (Röhrenbildung im Matrigel)	48
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Regulation von JunB unter hypoxischen Bedingungen</b>	<b>49</b>
3.1.1	Hypoxie induziert die Transkription von <i>junB</i> in Fibroblasten	49
3.1.2	Hypoxie-induzierte <i>junB</i> -Transkription ist unabhängig von HIF-1 $\alpha$	50
3.1.3	MAP-Kinasen sind nicht an der Hypoxie-induzierten <i>junB</i> -Transkription beteiligt	51
3.1.4	NF $\kappa$ B vermittelt die Hypoxie-induzierte Transkription von <i>junB</i>	53
<b>3.2</b>	<b>Identifizierung neuer JunB-Zielgene in der zellulären Hypoxie-Antwort</b>	<b>57</b>
3.2.1	Endothelzellen exprimieren JunB <i>in vivo</i>	58
3.2.2	JunB-defiziente Endothelioma Zellen zeigen Angiogenese-Defekte <i>in vitro</i>	59
3.2.3	Hypoxie induziert <i>junB</i> -Transkription in Endothelioma Zellen	61
3.2.4	cDNA Microarray zur Identifikation neuer JunB-Zielgene in der zellulären Hypoxie-Antwort	62
3.2.5	Validierung der Microarray-Ergebnisse für JunB-abhängige/Hypoxie-induzierte Gene	66
3.2.6	CBF $\beta$ – ein JunB-Zielgen	66
3.2.7	JunB und c-Fos vermitteln CBF $\beta$ Expression <i>in vitro</i>	67
3.2.8	JunB reguliert CBF $\beta$ Expression <i>in vivo</i>	70
3.2.9	Angiogenese-Defekte in JunB-defizienten Endothelioma-Zellen können durch transgene Expression von CBF $\beta$ rückgängig gemacht werden	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>Aktivierung des <i>junB</i>-Gens unter hypoxischen Bedingungen</b>	<b>77</b>
<b>4.2</b>	<b>Der NF<math>\kappa</math>B-Signalweg ist für die Hypoxie-abhängige Induktion von <i>junB</i> verantwortlich</b>	<b>78</b>
<b>4.3</b>	<b>Regulation von <i>VEGF</i> durch JunB</b>	<b>81</b>
<b>4.4</b>	<b>Identifizierung neuer JunB-Zielgene in der Hypoxie-Antwort von Endothelzellen</b>	<b>83</b>
<b>4.5</b>	<b>CBF<math>\beta</math> – ein Zielgen von JunB</b>	<b>86</b>
		X

4.5.1	CBF $\beta$ und JunB in myeloiden Leukämien	87
4.5.2	CBF $\beta$ und JunB in der Knochenentwicklung	89
4.5.3	CBF $\beta$ und JunB in der Angiogenese	90
<b>4.6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>92</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>94</b>
	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>115</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Entstehung des Blutgefäßsystems

Das Blutgefäßsystem ist ein hierarchisches, weit verzweigtes Netzwerk, dessen komplexe Organisation garantiert, dass alle Zellen eines höheren Organismus mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Die komplexe Organisation des Blutgefäßsystems gewährleistet auch, dass Zellen des Immunsystems an die Infektionsorte betroffener Regionen gelangen. Ferner dient das Blutgefäßsystem als Transportweg für die Hormone des endokrinen Systems und sichert so die Kommunikation zwischen entfernten Geweben. Schon während der frühen Embryonalentwicklung ist der wachsende Embryo auf eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung angewiesen, weswegen das kardiovaskuläre System das erste funktionelle Organ in unserem Körper darstellt. Für die Entwicklung des Blutgefäßsystems sind zwei unterschiedliche, aufeinander folgende Prozesse notwendig: die Vaskulogenese und die Angiogenese (Abb. 1). Beide Vorgänge finden hauptsächlich während der Embryonalentwicklung statt. Aber auch im adulten Organismus können unter bestimmten physiologischen Bedingungen neue Gefäße entstehen (Jain, 2003). Im Rahmen des weiblichen Menstruationszyklus spielt die Gefäßneubildung bei der Reifung des Follikels und der Entstehung des Corpus luteum eine wichtige Rolle (Plendl, 2000). In der Schwangerschaft führt eine starke Neovaskularisierung zur Durchblutung des sich schnell vergrößernden Uterus. Weiterhin besteht eine Hälfte des plazentalen Gefäßnetzwerks aus neu gebildeten maternalen Endothelzellen (Findlay, 1986). In der Wundheilung muss der Ausfall beschädigter Gefäße durch das Wachstum neuer Gefäße kompensiert werden, um einen angemessenen Blutfluss des verletzten Gewebes zu gewährleisten (Jain, 2003). Die Gefäßbildung unterliegt sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus einer strengen Regulation. Gerät diese Regulation jedoch außer Kontrolle, so kann unkontrolliertes Gefäßwachstum zum Fortschreiten einer Reihe von Erkrankungen beitragen, so z.B. bei Psoriasis, Arthritis, Retinopathie und zu Tumorgenese (Carmeliet, 2003).



**Abb. 1: Übersicht über die einzelnen Schritte der Gefäßentwicklung (Clever und Krieg, 1999).** (A): Angioblasten differenzieren im Mesoderm. (B): Angioblasten aggregieren und bilden erste vaskuläre Strukturen. (C): Vaskulogenese: Angioblasten differenzieren zu Endothelzellen und bilden einen primitiven Plexus. (D): sprossende Angiogenese und Intussuszeption. (E): Modellierung und Reifung der Gefäße, Rekrutierung perivaskulärer Zellen.

### 1.1.1 Vaskulogenese

Die Entstehung eines einfachen Gefäßplexus im Embryo wird als Vaskulogenese bezeichnet. Sie findet sowohl im Embryo als auch im extraembryonalen Dottersack statt. Im Embryo ist sie für die Bildung des primitiven Herzens und des primären vaskulären Netzwerks verantwortlich, im extraembryonalen Dottersack für die Entstehung der Blutgefäße des Dottersacks (Patan, 2000). Grundsätzlich kann der Vorgang der Vaskulogenese in zwei unterschiedliche Schritte unterteilt werden: Der erste Schritt beinhaltet die Differenzierung von Vorläuferzellen aus dem mesodermalen Gewebe in Angioblasten, die dann im zweiten Schritt die ersten vaskulären Strukturen bilden (Abb. 1; Risau und Flamme, 1995).

Im ersten Schritt der Vaskulogenese differenziert eine Subpopulation von mesodermalen Zellen im extraembryonalen Dottersack zu Vorläuferzellen, die Hämangioblasten genannt werden. Diese Vorläufer aggregieren *in situ* zu den ersten erkennbaren vaskulären Strukturen, den Blutinseln. Durch Proliferation und Differenzierung entstehen aus den äußeren Zellen der Blutinseln die endothelialen Vorläuferzellen der Gefäßwände (die so genannten Angioblasten) und aus den inneren Zellen die hämatopoetischen Vorläuferzellen (Risau und Flamme, 1995; Patan, 2000). Im weiteren Verlauf der Entwicklung fusionieren die Blutinseln miteinander, wodurch im Dottersack ein primitiver vaskulärer Plexus gebildet wird (Risau und Flamme, 1995). Kurz nach dem Auftreten der extraembryonalen Angioblasten differenzieren innerhalb des Embryos Zellen des proximalen lateralen Mesoderms zu Angioblasten, welche sich in engem Kontakt mit dem Entoderm entlang der Somiten anlagern und röhrenförmige Strukturen ausbilden. Durch Fusion dieser röhrenförmigen Strukturen zu größeren Gefäßen entsteht das primitive Herz sowie die dorsale Aorta (Patan, 2000).

Die Vaskulogenese tritt hauptsächlich in der frühen Embryonalentwicklung auf, ist aber auch bei der Vaskularisierung von Organen mesodermalen und entodermalen Ursprungs wie Lunge, und Niere beteiligt (Drake, 2003). Weiterhin wurden auch im adulten Organismus zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen beobachtet, die an Orten der Gefäßneubildung integrieren und differenzieren (Asahara et al., 1999).

Die Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Mesoderm wird durch Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGF-2) induziert (Risau und Flamme, 1995; Poole et al., 2001). Diese Differenzierung führt in den Vorläuferzellen zu der Expression des Rezeptor 2 des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGFR-2), einem der frühesten Marker für die Gefäßentwicklung (Millauer et al., 1993; Yamaguchi et al., 1993). Zellen des extraembryonalen viszeralen Entoderms exprimieren den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) zum gleichen Zeitpunkt, zu dem die ersten Blutinseln im Dottersack erscheinen. An Tag 8,5 der Embryonalentwicklung, dem Zeitpunkt der Entstehung des primären vaskulären Plexus im Embryo, weisen Zellen des intraembryonalen Entoderms eine starke VEGF Expression auf (Breier et al., 1992). So scheint das vom Entoderm exprimierte VEGF die von mesodermalen Vorläufern abstammenden Zellen, die VEGFR-2 exprimieren, zur Proliferation und Migration anzuregen (Vokes und Krieg, 2002; Saha et al., 2004).

Schon während der Vaskulogenese beginnt die Unterscheidung in arterielle Gefäße und venöse Gefäßen (Adams, 2003; Carmeliet, 2003). Im kardiovaskulären System exprimieren



nur arterielle Endothelzellen Ephrin-B2, wohingegen die Expression des EphB4 Rezeptors, ein Rezeptor von Ephrin-B2, ausschließlich auf venöse Endothelzellen beschränkt ist (Adams, 2003; Carmeliet, 2003). Die arteriell-venös-spezifische Expression von Ephrin-B2 und seinem Rezeptor bleibt auch während der weiteren Entwicklung des Blutgefäßsystems, der Angiogenese, aufrecht erhalten (Adams, 2003).

### **1.1.2 Angiogenese**

Der primäre Gefäßplexus expandiert und reift während der Angiogenese in ein weit verzweigtes, hoch organisiertes hierarchisches Gefäßsystem aus Arterien und Venen heran. In angiogenen Umstrukturierungsprozessen wird das primäre vaskuläre Netzwerk umgebaut, erweitert und verfeinert. Bei der Angiogenese unterscheidet man zwischen der aussprossenden Angiogenese und dem intussuszeptiven mikrovaskulären Wachstum (Abb. 1; Patan, 2000; Carmeliet, 2003). Die für die Reifung des Endothels wichtige Stabilisierung wird durch die Rekrutierung von perivaskulären Zellen wie Perizyten und glatten Muskelzellen gewährleistet, die die Gefäße mit einer stabilen Gefäßwand verstärken (Jain, 2003).

Damit Endothelzellen aus den bestehenden Gefäßen aussprossen können, müssen erst interendotheliale Zellkontakte und Kontakte mit stabilisierenden Zellen der Gefäßwand gelockert werden (Patan, 2000). Es kommt zu einer lokalen Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) und die Endothelzellen werden durch angiogene Stimuli zu Proliferation und Migration angeregt. Die aussprossenden Endothelzellen lagern aneinander an und bilden intra- oder interzelluläre Lumen. Durch die Verknüpfung dieser "endothelialen Triebe" entstehen Gefäßschlaufen, die dann wieder von perivaskulären Zellen stabilisiert werden (Patan, 2000). Während der Embryonalentwicklung wachsen Gewebe schnell über die Größe der Diffusionsweite von Sauerstoff hinaus. Somit kommt es zu einer Sauerstoffunterversorgung in den Teilen des Gewebes, die der Sauerstoff nicht mehr per Diffusion erreichen kann (Carmeliet, 2003). Diese Sauerstoffunterversorgung, auch Hypoxie genannt, führt dazu, dass Gefäße in die betroffenen Gewebsregionen einwachsen. Sie ist ein wichtiger Stimulus für den Ausbau des vaskulären Systems durch sprossende Angiogenese (Carmeliet, 2003). Die Organe ektodermaler Herkunft, wie das Gehirn und das Neuroektoderm werden durch sprossende Angiogenese vaskularisiert (Patan, 2000; Drake, 2003). Im Gegensatz zur sprossenden Angiogenese ist der vorrangige Prozess des intussuszeptiven mikrovaskulären Wachstums nicht die Proliferation und Migration einzelner Endothelzellen, sondern die lokale Einfaltung der endothelialen Zellschicht in das Gefäßlumen (Patan, 2000). Dadurch entstehen zuerst transvaskuläre Gewebsstrukturen oder

auch transvaskuläre Pfeiler, die zu transkapillaren Wänden erweitert werden und schließlich das Gefäßlumen teilen. Intussuszeptives mikrovaskuläres Wachstum findet hauptsächlich bei der Bildung der Blutgefäße in der Lunge statt (Patan, 2000). Die Vorgänge der sprossenden Angiogenese und auch das intussuszeptive mikrovaskuläre Wachstum werden durch das Gleichgewicht von angiogenen Aktivatoren und Inhibitoren reguliert (Carmeliet, 2003).

Parakrin wirkendes VEGF spielt sowohl bei den Prozessen der Vaskulogenese als auch der Angiogenese eine zentrale Rolle (Yancopoulos et al., 2000), in dem er für die Permeabilisierung des Endothels und die Proliferation und Migration der Endothelzellen bei den Modullierungsprozessen verantwortlich ist (Dvorak et al., 1995; Ferrara, 1999). Die VEGF-Familie besteht aus fünf Mitgliedern (VEGF oder VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, den Plazentalen Wachstumsfaktor (PlGF)), welche als dimere Glykoproteine die Rezeptortyrosinkinase VEGFR-1 (früher Flt-1 genannt), VEGFR-2 (früher Flk-1) und VEGFR-3 (früher Flt-4) binden können (Yancopoulos et al., 2000). VEGFR-1 und VEGFR-2 werden hauptsächlich von den Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert (Millauer et al., 1993; Yamaguchi et al., 1993; Breier et al., 1995), während VEGFR-3 insbesondere auf Endothelzellen lymphatischer Gefäße zu finden ist (Taipale et al., 1999). Die Signalübertragung durch VEGFR-2 löst in den Zielzellen angiogene Effekte wie Permeabilisierung, Proliferation und Migration aus (Yancopoulos et al., 2000). VEGFR-1 und seine sezernierte lösliche Spleißvariante sflt-1 binden VEGF mit hoher Affinität. Der löslichen Spleißvariante fehlt eine intrazelluläre Kinasedomäne und VEGFR-1 besitzt nur eine schwache Kinaseaktivität (Hiratsuka et al., 1998; Kearney et al., 2004). Die Bindung von VEGF an VEGFR-1 löst demzufolge wahrscheinlich keine intrazelluläre Signalkaskade aus. Die regulatorische Rolle von VEGFR-1 bei der Angiogenese besteht vielmehr in der Modulation der Konzentration von extrazellulärem VEGF (Kearney et al., 2004). Durch die Bindung von VEGF durch VEGFR-1 und sflt-1 wird ein Gradient aufgebaut, der das Aussprossen und die Migration von Endothelzellen reguliert (Kearney et al., 2004).

Dass VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 eine zentrale Rolle in der Gefäßentwicklung einnehmen, zeigen Studien, bei denen die Gene für VEGF oder einer der beiden Rezeptoren inaktiviert wurde. Schon das Fehlen nur eines *VEGF* Allels führt zu einer stark abgeschwächten Ausbildung des Gefäßsystems und zum Absterben der Embryonen zwischen Tag E 11 und E 12 (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Eine genaue Steuerung der VEGF Dosis ist also Voraussetzung für die Entwicklung eines funktionellen Gefäßsystems (Yancopoulos et al., 2000). VEGFR-2 Mäuse sterben zwischen Tag E 8,5 und E 9,5. Sie bilden weder Blutinseln im Dottersack noch organisierte Gefäßstrukturen im Embryo. Die

Anzahl der hämatopoetischen Vorläuferzellen und Endothelzellen ist stark reduziert (Shalaby et al., 1995). VEGFR-1 defiziente Mäuse sterben ebenfalls zwischen Tag E 8,5 und E 9,5 (Fong et al., 1995). Sie zeichnen sich durch eine gesteigerte Differenzierung in Angioblasten aus, welche allerdings keine funktionellen vaskulären Strukturen ausbilden (Fong et al., 1999). Transgene Mäuse mit deletierter VEGFR-1 Kinasedomäne hingegen zeigen eine normale Gefäßentwicklung (Hiratsuka et al., 1998). Diese beiden Untersuchungen zeigen, dass die für die Gefäßentwicklung wichtige Domäne von VEGFR-1 die Liganden-Bindedomäne ist und nicht die intrazelluläre Kinasedomäne (Hiratsuka et al., 1998).

Ein weiterer Signalweg, der am Wachstum, an der Instandhaltung und der Stabilisierung des Blutgefäßsystems beteiligt ist, wird über die Rezeptortyrosinkinase Tie-2 vermittelt. Tie-2 wird hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert und bindet die beiden Liganden Angiopoetin-1 und Angiopoetin-2 (Jain, 2003). Ang-1, welches von perivaskulären Zellen exprimiert wird, stabilisiert wachsende Gefäße und inhibiert die Permeabilisierung existierender Gefäße (Thurston et al., 2000). Die Stabilisierung ist auf verstärkte Interaktionen zwischen Endothelzellen und Perizyten zurückzuführen (Jain, 2003). Ang-1- oder Tie-2-defiziente Embryonen entwickeln zwar einen normalen primären Gefäßplexus, die weitere Reifung ist jedoch gestört, da die Endothelzellen mit den perivaskulären Zellen nicht angemessen assoziieren können (Dumont et al., 1994; Sato et al., 1995; Suri et al., 1996). Ang-2 wird von den Endothelzellen exprimiert und inhibiert durch autokrine Signalübertragung den konstitutiv stabilisierenden Effekt des parakrin wirkenden Ang-1 (Maisonpierre et al., 1997). Die destabilisierende Wirkung von Ang-2 initiiert die Gefäßumstrukturierungen reifer Gefäße. Durch synergistische Effekte mit proangiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF sprossen die Gefäße aus, fehlen hingegen solche proangiogenen Faktoren, bilden sich die Gefäße zurück (Yancopoulos et al., 2000). Die Überexpression von Ang-2 im Endothel transgener Mäuse inhibiert die Stabilisierung des Gefäßplexus und ähnelt dem Phänotyp, welcher in Ang-1- oder Tie-2 defizienten Embryonen beobachtet werden kann (Maisonpierre et al., 1997).

Die Differenzierung von mesenchymalen Zellen in Perizyten und glatte Muskelzellen hängt hauptsächlich von Signalwegen des Transformierenden Wachstumsfaktors  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) und der Platelet Derived Growth Factor (PDGF) Familie ab (Hirschi et al., 1999; Jain, 2003). Neben der Differenzierung ist PDGF noch an der Rekrutierung der Perizyten und glatten Muskelzellen durch das Endothel beteiligt. Die Endothelzellen exprimieren das PDGF-Mitglied PDGFB und stimulieren perivaskuläre Zellen, die den Rezeptor für PDGFB

(PDGFR- $\beta$ ) tragen, zu Proliferation und Migration (Hirschi et al., 1999; Hellstrom et al., 2001).

Die mit der sprossenden Angiogenese einhergehenden Umstrukturierung der extrazellulären Matrix (ECM) beinhaltet deren Degradation durch Proteasen wie z.B. den Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP-2, MMP-3, MMP-9) und ihren gewebspezifischen Inhibitoren (Gewebspezifische Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen; TIMPs) sowie den Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und seinen Inhibitor (Plasminogen Aktivator Inhibitor; PAI-1) (Carmeliet, 2003). Die Aktivität der Proteinasen erleichtert außerdem das Aussprossen von Endothelzellen, indem sie in der ECM gebundene angiogene Faktoren wie bFGF, VEGF und TGF- $\beta$  frei setzen und angiogene Chemokine wie z.B. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) aktivieren (Carmeliet, 2003).

Im adulten Organismus ist die Ausbildung des Blutgefäßsystems abgeschlossen. Unter physiologischen Bedingungen findet Angiogenese nur noch in bestimmten Fällen wie im Menstruationszyklus der Frau, in der Schwangerschaft und in der Wundheilung statt. Die Homöostase des Blutgefäßsystems wird durch die Balance von den oben teilweise beschriebenen pro- und antiangiogenen Faktoren kontrolliert. Diese Balance ist aber in vielen Krankheiten wie z.B. bei Psoriasis, Arthritis, Retinopathie und bei der Tumorgenese gestört (Carmeliet, 2003). Da auch das Tumorwachstum von ausreichender Sauerstoff- und Nährstoffversorgung abhängig ist, muss der Tumor Blutgefäße rekrutieren, wenn er über eine kritische Größe von wenigen Millimetern hinauswächst (Folkman, 1971). Allerdings unterscheiden sich die Blutgefäße von Tumoren von denen normaler Gewebe und sind in ihrer Struktur und Funktionalität gestört. Tumorgefäße befinden sich in ständigen Umstrukturierungsprozessen und es fehlen ihnen funktionale perivaskuläre Zellen, die die Gefäße stabilisieren (Carmeliet und Jain, 2000). Zudem bestehen Gefäße von Tumoren teilweise auch aus Tumorzellen, weisen also eine Mosaikstruktur aus Endothelzellen und aus Zellen, die vom Tumorgewebe abstammen, auf (Carmeliet und Jain, 2000). Die Tumorgefäße sind hochgradig unorganisiert, was zu einem gestörten Blutfluss führt. Dadurch können im Tumor Areale mit verminderter Sauerstoff- und Nährstoffversorgung entstehen. Die daraus resultierende verminderte Sauerstoffversorgung (Hypoxie) kann zudem zur weiteren Vaskularisierung, Progression und Metastasierung des Tumors beitragen (Carmeliet und Jain, 2000).

## 1.2 Physiologische Bedeutung von Hypoxie

Hypoxie besitzt aber nicht nur pathologische Relevanz, wie beim Tumorwachstum und der Tumorprogression, sondern spielt schon von der frühen Embryonalentwicklung bis hin zur Regulation vieler Stoffwechselprozesse im adulten Organismus eine zentrale Rolle (Giaccia et al., 2004). Für alle aeroben Organismen ist Sauerstoff notwendig für die Energieproduktion. Daher ist es für multizelluläre Organismen lebensnotwendig, einen bestimmten Sauerstoffpartialdruck in der Zellen aufrecht zu erhalten. Deswegen haben sie besondere Mechanismen entwickelt, um Veränderungen der Sauerstoffkonzentration auf zellulärer Ebene wahrzunehmen und darauf mit der Aktivierung verschiedener biologischer Programme zu reagieren (Giaccia et al., 2004). Bei Säugetieren wird z.B. schon die Plazentaentwicklung durch Hypoxie beeinflusst. So stimuliert das hypoxische Milieu des endometrialen Stromas die fötalen Zytotrophoblasten zur Proliferation und zur Fusion zum Synzytium (Land, 2003). Nicht-synzytiale Trophoblasten werden zur Ausbildung von Chorionzotten angeregt, welche in die maternale Dezidua, das Myometrium und in die maternalen Blutgefäße einwandern und somit die ersten plazentalen Strukturen ausbilden, die die Sauerstoffversorgung des Embryos garantieren (Land, 2003). Organe ektodermaler Herkunft werden durch sprossende Angiogenese vaskularisiert (Patan, 2000). Der physikalische Stimulus für die Aktivierung der sprossenden Angiogenese ist die in den avaskulären Geweben vorherrschende Hypoxie. Die Endothelzellen des embryonalen Blutgefäßsystems nehmen den verringerten Sauerstoffpartialdruck wahr und wachsen in die hypoxischen Gewebe hinein, um diese mit Sauerstoff zu versorgen (Faller, 1999). Im adulten Organismus beeinflusst die Hypoxie das für die Gefäßhomöostase wichtige Gleichgewicht aus pro- und antiangiogenen Faktoren und kann ferner wichtige biologische Prozesse wie z.B. die Eisenhomöostase, die Blutbildung sowie zelluläre Stressantworten aktivieren (Harris, 2002). In den letzten Jahren wurden große Fortschritte bei der Aufklärung der Mechanismen erzielt, über die Zellen Sauerstoffschwankungen wahrnehmen können, sowie der molekularen Programme, mit denen sie darauf reagieren.

### 1.2.1 HIF -1

Die Mitglieder der HIF-Proteine stellen ein wichtige Gruppe von Faktoren dar, die die zelluläre Hypoxieantwort steuern können. Die Regulation dieser Proteine unter hypoxischen Bedingungen, sowie ihr Beitrag zur zellulären Hypoxieantwort sind sehr gut untersucht (Semenza, 2003).

HIFs sind dimere Transkriptionsfaktoren der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteinfamilie und bestehen aus einer  $\alpha$ -Untereinheit, die unter Normoxie degradiert, unter Hypoxie aber stabilisiert wird, und aus einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\beta$ -Untereinheit (HIF-1 $\beta$  oder ARNT) kann mit einer der drei  $\alpha$ -Untereinheiten HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  oder HIF3- $\alpha$  dimerisieren. Für die Dimerisierung der beiden Untereinheiten sind die PAS-Domänen essentiell. Im carboxyterminalen Teil von HIF- $\alpha$  wurden zwei Transaktivierungsdomänen (TAD) identifiziert, die N-terminale TAD (N-TAD) und die C-terminale TAD (C-TAD) (Jiang et al., 1997). Diese interagieren mit dem transkriptionellen Co-Aktivatoren p300/CBP und aktivieren die Transkription von Genen, die ein Hypoxie-responsives Element (HRE) in ihrem Promoter aufweisen (Semenza, 2003; Brahimi-Horn et al., 2005).

Die hypoxieabhängige Regulation der HIF- $\alpha$  Untereinheiten beruht hauptsächlich auf posttranslationalen Modifikationen in der Sauerstoff-abhängigen Degradierungsdomäne (Oxygen-Dependent Degradation Domain, ODDD) und der Transaktivierungsdomäne. Unter normoxischen Bedingungen werden die  $\alpha$ -Untereinheiten durch Prolylhydroxylasen (PHDs) an zwei Prolinresten in der ODDD hydroxyliert (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Die hydroxylierten  $\alpha$ -Untereinheiten werden vom Von-Hippel-Lindau Protein erkannt und polyubiquitiniert und schließlich im Proteasom degradiert. Unter hypoxischen Bedingungen kann die Hydroxylierung nicht mehr stattfinden, da molekularer Sauerstoff bei der enzymatischen Reaktion benötigt wird (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Aber nicht nur die Stabilität von HIF-1 $\alpha$  wird durch Hypoxie reguliert, sondern auch seine Aktivität. Unter normoxischen Bedingungen wird ein Asparaginrest in der Transaktivierungsdomäne von HIF-1 $\alpha$  hydroxyliert (Lando et al., 2002), wodurch der transkriptionelle Co-Aktivatoren CBP/p300 nicht mehr binden kann und somit die Transaktivierung durch HIF inhibiert wird. Verantwortlich für diese Modifikation ist der inhibierende Faktor von HIF (FIH), eine Asparaginylhydroxylase, deren Aktivität ebenfalls von der Verfügbarkeit von molekularem Sauerstoff und 2-Oxoglutarat abhängt (Mahon et al., 2001; Lando et al., 2002a; Lando et al., 2002b).

Die HIF-Transkriptionsfaktoren spielen schon in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle. HIF-1 $\alpha$  defiziente Mäuse sind im Wachstum retardiert, die Bildung der Dottersackgefäße und der Kapillarnetze im Embryo ist gestört. Weiterhin schließt sich das Neuralrohr nicht vollständig und die Embryonen sterben an Tag 10 der Embryonalentwicklung (Iyer et al., 1998; Ryan et al., 1998; Kotch et al., 1999). Wahrscheinlich ist mesenchymaler Zelltod für diesen Phänotyp verantwortlich und nicht, wie

zunächst angenommen, reduzierte VEGF Expression (Kotch et al., 1999). HIF-1 $\beta$  defiziente Embryonen sterben an Tag 10,5. Sie besitzen unorganisierte Dottersackgefäße, eine erhöhte Anzahl an Trophoblastenriesenzellen, sowie ein verkümmertes plazentales Labyrinth (Kozak et al., 1997; Maltepe et al., 1997; Abbott und Buckalew, 2000; Adelman et al., 2000). Für HIF-2 $\alpha$  liegen mehrere Studien vor, bei denen das Gen inaktiviert wurde. Allerdings sind diese Studien untereinander nicht konsistent. So zeigt die erste Studie eine gestörte Biosynthese von Katecholaminen und Bradykardie in HIF-2 $\alpha$  defizienten Mäusen (Tian et al., 1998), in einer zweiten Studie führt die Geninaktivierung zu Defekten in der neonatalen Reifung der Lunge (Compernelle et al., 2002). In einer dritten Studie zeigen HIF-2 $\alpha$  defiziente Embryonen eine abnormale Vaskularisierung im Embryo und auch im Dottersack. Die Embryonen sterben zwischen Tag 9,5 und Tag 12,5 (Peng et al., 2000). Diese unterschiedlichen Phänotypen sind wahrscheinlich auf die Verwendung verschiedener Mausstämme zurückzuführen.

HIF-1 reguliert eine Gruppe von mehr als 70 Genen, deren Proteine bei den Hypoxie-induzierten biologischen Programmen wie Erythropoese (EPO), Angiogenese (VEGF, VEGFR-1, PDGF, Ang-2, Tie-2), Glykolyse (GLUT1 und GLUT3 für den Glukosetransport in die Zelle, sowie zahlreiche Enzyme, die direkt in der Glykolyse involviert sind), Apoptose (NIP3, NIX), Zellproliferation (IGF-2) und verschiedenen Metabolismen (Eisenmetabolismus, pH Regulation) beteiligt sind (Harris, 2002). Neben Erythropoetin (EPO), dem ersten bekannten HIF-1 Zielgen, nimmt VEGF eine bedeutende Rolle als reguliertes Gen von HIF ein. Die Bindung von HIF-1 an das HRE im VEGF Promoter induziert die Expression von VEGF unter hypoxischen Bedingungen (Liu et al., 1995; Forsythe et al., 1996). Allerdings scheint die maximale Transkription von VEGF unter Hypoxie noch von der Bindung anderer Transkriptionsfaktoren abzuhängen. So ist gezeigt worden, dass die Bindung des Aktivator Proteins-1 (AP-1) im VEGF-Promoter die HIF-1-vermittelte Hypoxieinduktion noch potenziert (Damert et al., 1997). Die mRNA von VEGF wird durch Bindung des Proteins Hu Antigen R (HuR) in der 3' nicht translatierten Region (3' UTR) in hypoxischen Zellen stabilisiert (Levy et al., 1998) und die Translation des Proteins über eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) in der 5'UTR von VEGF verstärkt (Stein et al., 1998). Zusätzlich wird die Faltung und Sekretion von VEGF Protein unter hypoxischen Bedingungen durch die Oxidoreduktase Ero1-L $\alpha$  gewährleistet (May et al., 2005).

### 1.2.2 Zelluläre Mechanismen der Hypoxieantwort

Die Regulation des für die Vaskulogenese und Angiogenese wichtigen Schlüsselmoleküls VEGF und seines Regulators HIF erfolgt auf verschiedenen molekularen Ebenen und zeigt somit beispielhaft, dass die zelluläre Antwort auf den physikalischen Stress Hypoxie äußerst komplex ist. Neben den für die HIF-Aktivität erforderlichen Hydroxylasen gibt es noch eine Reihe weiterer Enzyme und Signalwege, die in dieser Stressantwort involviert sind. Ferner ist HIF nicht der einzige Transkriptionsfaktor, welcher für die Hypoxie-induzierte Transkription verantwortlich ist.

Die Mitogen Aktivierten Protein Kinase (MAPK) Signalwege spielen eine wichtige Rolle bei der Umsetzung extrazellulärer Stimuli in zelluläre Reaktionen. Die Familie der MAPK Signalwege ist in drei unterschiedliche und unabhängige Signalwege unterteilt: den Signalweg der Extrazellulär regulierten Kinasen ERK, der c-Jun N-terminalen Kinasen JNK und der p38 Kinasen (Chang und Karin, 2001; Kyriakis und Avruch, 2001). Eine Reihe extrazellulärer Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und chemischer und physikalischer Stress aktivieren eine Signalkaskade, an deren Ende die jeweiligen MAPK ihre Zielproteine phosphoryliert. Zu diesen Zielproteinen gehören unter anderem Transkriptionsfaktoren aber auch zytoplasmatische Proteine. Auf diese Art und Weise steuern die MAPK zelluläre Programme wie Proliferation, Differenzierung, Inflammation und Apoptose (Chang und Karin, 2001; Weston und Davis, 2002). Durch Hypoxie-Stress konnten für alle MAPK Mitglieder eine Aktivierung in bestimmten Zelltypen beschrieben werden. ERK wurde in HeLa Zellen (Muller et al., 1997), in Pheochromocytoma Zellen aus Ratten (Conrad et al., 1999a), in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (Minet et al., 2000), murinen Fibroblasten (Sodhi et al., 2000) und in murinen Endothelzellen (Zhu et al., 2003) durch Hypoxie induziert. Die Phosphorylierung von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  durch ERK führte unter anderem zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität von HIF (Richard et al., 1999; Conrad et al., 1999a; Minet et al., 2000). JNK Aktivität konnte in Mammakarzinomzellen (Le und Corry, 1999), in humanen Nierenzellen (Garay et al., 2000), in einer humanen Leberzelllinie (Minet et al., 2001), in Herzmyozyten aus Ratten (Dougherty et al., 2002) und in murinen embryonalen Fibroblasten (Laderoute et al., 2004) nachgewiesen werden. Die Hypoxie-induzierte Phosphorylierung und Aktivierung von p38 wurde für PC12 Zellen (Conrad et al., 1999b), für Fibroblasten aus Lungenarterien von Ratten (Welsh et al., 2001), für eine humane Neuroblastoma Zelllinie (Webster et al., 2004) und für murine Endothelzellen (Zhu et al., 2003) gezeigt. Die Beteiligung dieser MAP-Kinasen an der zellulären Hypoxie-Antwort scheinen sehr vom Zelltyp und von der Länge der Hypoxie-



Exposition abzuhängen und werden in der Literatur zum Teil kontrovers diskutiert (Minet et al., 2001; Seta und Millhorn, 2004). Die Aktivierung der MAPK-Signalwege hatte in diesen Studien meist eine Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und somit die Aktivierung genetischer Programme zur Folge (Minet et al., 2001).

Bisher gilt der Transkriptionsfaktor HIF als Hauptregulator der Hypoxie-Antwort. Doch neben HIF sind jedoch noch eine Reihe anderer Transkriptionsfaktoren an der zellulären Antwort auf verringerten Sauerstoffdruck beteiligt (Faller, 1999; Harris, 2002). Zu ihnen gehören das "cAMP response element"-Bindeprotein (CREB), der Early Growth Response 1 Faktor (EGR-1), der Metall-Transkriptionsfaktor-1, Ets-Transkriptionsfaktoren, der Nukleäre Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) und AP-1 (Faller, 1999; Harris, 2002).

NF $\kappa$ B und AP-1 regulieren viele Gene, die an wichtigen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Entzündungsprozessen und Tumorgenese beteiligt sind. Beide Transkriptionsfaktoren können durch eine Vielzahl von physiologischen, chemischen und physikalischen Stimuli induziert werden. Die Familie der NF $\kappa$ B Proteine besteht aus den Proteinen RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 und p52/p100. Im unstimulierten Zustand bindet der Inhibitor I $\kappa$ B das NF $\kappa$ B-Dimer im Zytoplasma und verhindert dessen Translokation in den Zellkern. Die Stimulation z.B. durch Zytokine oder chemischen und physikalischen Stress führt zur Phosphorylierung von I $\kappa$ B, woraufhin I $\kappa$ B von NF $\kappa$ B dissoziiert. Das freie NF $\kappa$ B Dimer transloziert in den Zellkern und bindet spezifische Sequenzen im Promotor seiner Zielgene (Hayden und Ghosh, 2004). Unter hypoxischen Bedingungen konnte I $\kappa$ B in Jurkat T-Zellen phosphoryliert werden und aktiviertes NF $\kappa$ B die Transkription eines  $\kappa$ B-Gen-Reporters induzieren (Koong et al., 1994a). In humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) führte Hypoxie-induzierte NF $\kappa$ B Aktivität zu Expression des Cyclooxygenase-2 Gens (Cox-2) (Schmedtje et al., 1997). Ferner wurde gezeigt, dass NF $\kappa$ B bei der Regulation des Erythropoetin Gens in humanen Zelllinien aus Lebertumoren unter hypoxischen Bedingungen beteiligt ist (Figueroa et al., 2002). Eine weitere Studie belegt, dass die Genexpression des Makrophagen Inflammatorischen Proteins-2 (MIP-2) in hypoxischen murinen Makrophagen über NF $\kappa$ B induziert wird (Zampetaki et al., 2004).

AP-1 ist ein dimerer Transkriptionsfaktor, der aus unterschiedlichen AP-1 Untereinheiten zusammengesetzt werden kann. Die Beteiligung von AP-1 an der Hypoxie-regulierten Genexpression konnte in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden. So korrelierte Hypoxie-induzierte AP-1 Transaktivierungsaktivität in HUVEC Zellen mit der Expression von Endothelin-1 und PDGF-B (Bandyopadhyay et al., 1995). Die Expression des

Tyrosin Hydroxylase (TH) Gens in hypoxischen PC12 Zellen wurde durch die Bindung von AP-1 an den TH Promoter induziert (Norris und Millhorn, 1995) und die Hypoxie-induzierte Transkription von VEGF in C6 Glioma Zellen konnte durch AP-1 verstärkt werden (Damert et al., 1997). Die Transkription des Gens der Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) in Fibroblasten aus Rattenherzen wurde unter hypoxischen Bedingungen induziert und diese Induktion wurde durch die Bindung von AP-1 an den MMP-2 Promoter vermittelt (Bergman et al., 2003). Weitere Studien zeigten die transkriptionelle Induktion einzelner AP-1 Mitglieder in HeLa Zellen (Muller et al., 1997) und in murinen Fibroblasten (Laderoute et al., 2002). In Studien mit hypoxischen F9 Teratokarzinom Zellen und HUVECs wurde eine funktionelle Zusammenarbeit von AP-1 und HIF-1 diskutiert (Alfranca et al., 2002).

Die Aktivierung von AP-1 in der zellulären Hypoxie-Antwort und die Beteiligung der einzelnen AP-1 Untereinheiten scheint allerdings stark Zelltyp-abhängig zu sein und ist im Detail noch nicht vollständig aufgeklärt. So müssen weitere Untersuchungen klären, welchen Beitrag der Transkriptionsfaktor AP-1 bei Regulation der Hypoxie-vermittelten Zellantwort sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Prozessen leistet.

### **1.3 Der Transkriptionsfaktor AP-1**

AP-1 steuert die Genexpression AP-1 abhängiger Gene als Reaktion auf eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Stresssignale, Tumorpromotoren sowie genotoxischen Agenzien (Angel und Karin, 1991; Hess et al., 2004).

AP-1 besteht aus Proteindimeren und setzt sich aus Mitgliedern der Jun- und Fos-Proteinfamilien zusammen. Die Jun-Proteinfamilie umfasst Jun (früher als c-Jun beschrieben), JunB und JunD, die der Fos-Familie Fos (früher als c-Fos beschrieben), FosB, Fra-1 und Fra-2. Zusätzlich können strukturell verwandte Proteine der ATF- (ATFa, ATF-2 und ATF-3) und der JDP- (JDP-1 und JDP-2) Unterfamilie heterodimere Komplexe mit Jun- und Fos-Proteinen bilden (Hess et al., 2004). Charakteristisches gemeinsames Strukturmerkmal dieser Proteine ist die evolutiv konservierte bZIP-Domäne. Sie besteht aus einer basischen DNA-Bindungsregion und einer daran anschließenden, so genannten "Leucine-Zipper" Region, die für die Dimerisierung der einzelnen Untereinheiten verantwortlich ist (Landschulz et al., 1988; O'Shea et al., 1989). Aufgrund dieser Strukturmerkmale wird AP-1 zu der Familie der "bZIP"-Transkriptionsfaktoren gerechnet. Über die aminoterminal gelegene Trans-aktivierungsdomäne interagiert AP-1 mit der basalen

Transkriptionsmaschinerie und steuert so die Genexpression seiner Zielgene (Angel und Karin, 1991).

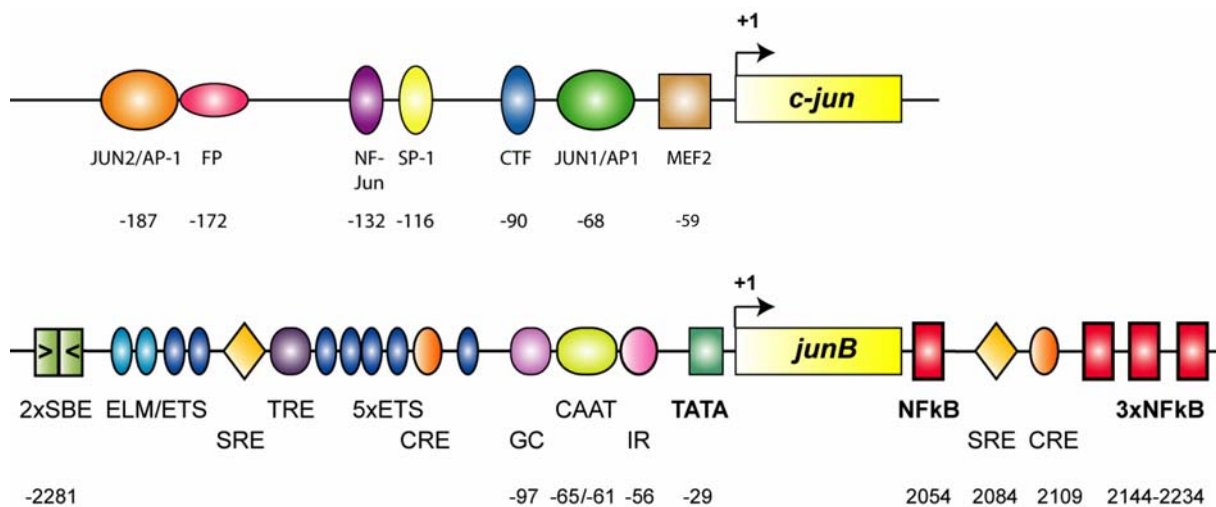
Die Proteine der Jun-Familie können entweder Homodimere oder Heterodimere mit den Mitgliedern der Fos- und ATF-Familie bilden. Fos-Proteine hingegen können nicht homodimerisieren, sondern nur stabile heterodimere Komplexe mit Jun-Mitgliedern bilden (Smeal et al., 1989; Hai und Curran, 1991; Dorsey et al., 1995). Durch die vielfältigen Dimerisierungsmöglichkeiten ergibt sich eine Vielzahl unterschiedlicher AP-1 Kombinationen, die sich in ihrer Stabilität, ihren Transaktivierungseigenschaften und ihrer Spezifität für die DNA-Bindestellen unterscheiden. Während die meisten Jun:Fos-Dimere das aus 7 Basenpaaren bestehende, so genannte TPA-responsive Element (TRE, Konsensussequenz: 5'-TGA<sup>C</sup>/GTC A-3') binden, erkennen Jun:ATF-Dimere bevorzugt das um ein Basenpaar längere cAMP-responsive Element (CRE, Konsensussequenz: TGACGTCA) (Hai und Curran, 1991; Chinenov und Kerppola, 2001; van Dam und Castellazzi, 2001). Die DNA-Bindestelle von AP-1 wurde ursprünglich in der Promotorregion des humanen Kollagenasegens identifiziert (Angel et al., 1987a; Angel et al., 1987b), mittlerweile ist aber eine Vielzahl verschiedener Zielgene von AP-1 bekannt. Dazu gehören Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, unterschiedliche Metalloproteinasen, Zellzyklusregulatoren, zelltypspezifische Genprodukte und Apoptoseregulatoren (Shaulian und Karin, 2001; Florin et al., 2004; Hess et al., 2004).

### 1.3.1 Regulation der AP-1-Aktivität

AP-1 wird durch eine Fülle physiologischer und pathologischer Stimuli reguliert und vermittelt durch Expression seiner Zielgene eine spezifische zelluläre Antwort. Die Spezifität dieser Antwort beruht auf einer komplexen Regulation von AP-1, die sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranslationaler Ebene stattfindet und auch Interaktionen mit anderen nukleären Proteinen beinhaltet (Whitmarsh und Davis, 1996; Karin et al., 1997; Wisdom, 1999; Hess et al., 2004).

AP-1 gehört zu den "immediate early genes", d.h. die Transkription seiner Untereinheiten wird schon kurze Zeit nach Beginn des Stimulus ohne vorherige Proteinsynthese induziert (Karin et al., 1997). Die oben erwähnten Stimuli schalten eine Reihe verschiedener Signalkaskaden an, zu welchen auch die Signalwege der MAP-Kinasen gehören. Die MAP-Kinasen regulieren unter anderem zahlreiche Transkriptionsfaktoren, die Erkennungssequenzen in den AP-1-Genen binden und deren Transkription induzieren können (Kyriakis und Avruch, 2001). Die Mitglieder von AP-1 besitzen jeweils unterschiedliche,

charakteristische Promotorregionen, die zahlreiche Erkennungssequenzen für andere Transkriptionsfaktoren aufweisen. Im *c-jun*-Promotor finden sich zwei TRE-ähnliche Sequenzen (Jun1/AP1 und Jun2/AP1), die von Jun:ATF2-Dimeren gebunden werden können. Somit kann Jun autoregulatorisch die Expression seines eigenen Gens verstärken (Angel et al., 1988). Die 5'-flankierende Region von *junB* enthält Erkennungssequenzen für Smad- und Ets-Transkriptionsfaktoren, die wiederum über MAP-Kinasen reguliert werden können. Wie in Abb. 2 zu sehen, weist die 3'-flankierende Region des *junB*-Gens unter anderem mehrere Bindestellen für NFκB auf (Kitabayashi et al., 1993; Nakajima et al., 1993; Lopez-Rovira et al., 2000).



**Abb. 2:** Schematische Abbildung der Promotoren von *c-jun* und *junB* (Abbildung nicht maßstabsgetreu)

Die posttranslationale Regulation der AP-1-Mitglieder geschieht hauptsächlich über Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse. Diese Modifikationen beeinflussen das Transaktivierungspotential, die Stabilität sowie die DNA-Bindeigenschaften der Proteine (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992; Treier et al., 1994). Im unstimulierten Zustand wird Jun durch die Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) an Serin- und Threoninresten im Bereich der DNA-Bindedomäne phosphoryliert, was zu einer Abnahme der DNA-Bindeaktivität von Jun führt. In stimulierten Zellen werden diese Aminosäurereste dephosphoryliert und somit die Affinität von Jun zur DNA gesteigert (Boyle et al., 1991; Lin et al., 1992). Darüber hinaus nehmen die MAP-Kinasen eine wichtige Rolle bei Phosphorylierungen von AP-1 ein (Davis, 2000). JNK phosphoryliert Jun an den Aminosäureresten Serin 63 und Serin 73. Das führt zu einem gesteigerten Transaktivierungspotential (Smeal et al., 1992) und zu einer verlängerten Halbwertszeit des Jun-Proteins (Treier et al., 1994). JNK kann neben Jun noch JunD und ATF-2 phosphorylieren und somit deren Transkriptionspotential steigern (Kyriakis und

Avruch, 2001). JunB kann während der Mitose an Serin 23 und 186 und an Threonin 150 phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung wird durch p34<sup>cdc2</sup> vermittelt und führt zum Abbau des JunB-Proteins (Bakiri et al., 2000).

Die Regulation der AP-1-Aktivität durch Protein-Protein-Interaktionen ergibt sich hauptsächlich über die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten der AP-1 Untereinheiten, funktionelle Dimere zu bilden. Zudem kann AP-1 noch mit anderen Transkriptionsfaktoren am gleichen Promotor interagieren, wodurch seine Aktivität synergistisch verstärkt oder inhibiert wird (Chinenov und Kerppola, 2001). Solche Interaktionen sind für AP-1 mit NFAT (Peterson et al., 1996; Chen et al., 1998), mit Smad (Zhang et al., 1998), mit Ets (Martin et al., 1988) und mit CBF $\alpha$ /Runt (Hess et al., 2001) bekannt. Weiterhin kann AP-1 mit dem Glukokorticoide-Rezeptor (GR) interagieren, wodurch es zu einer Hemmung der TPA-induzierten Transkriptionsaktivität von AP-1 kommen kann (Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990; Miner und Yamamoto, 1992; Teurich und Angel, 1995). Diese Hemmung ist unabhängig von der Bindung von GR an die DNA (Reichardt et al., 1998; Tuckermann et al., 1999).

### 1.3.2 *in vivo* Funktion der AP-1 Mitglieder Fos, FosB, Fra-1, c-Jun und JunD

Die Inaktivierung von Genen in Mäusen mittels homologer Rekombination liefert wichtige Erkenntnisse bei der Aufklärung der spezifischen Funktionen von AP-1. Das Ausschalten der einzelnen AP-1-Mitglieder resultiert in verschiedenen Phänotypen und zeigt, dass die einzelnen AP-1-Untereinheiten *in vivo* unabhängige Aufgaben übernehmen. Während Fos, FosB und JunD entbehrlich für die Embryonalentwicklung sind, sind c-Jun, JunB und Fra-1 essentiell (Jochum et al., 2001; Hess et al., 2004).

Fos-defiziente Mäuse sind lebensfähig und fortpflanzungsfähig, allerdings sind diese Tiere im Wachstum verlangsamt und entwickeln Osteopetrose aufgrund einer fehlenden terminalen Differenzierung von Osteoklasten (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992). FosB-defiziente Mäuse entwickeln sich normal, die Weibchen zeigen aber eine Störung im Aufzuchtverhalten, was wohl auf fehlende FosB Expression im Hypothalamus zurückzuführen ist (Brown et al., 1996; Gruda et al., 1996). Fra-1 ist das einzige Mitglied der Fos-Proteine, welches eine essentielle Rolle in der Embryonalentwicklung spielt. Fra-1-defiziente Embryonen sterben an Tag 10,0 der Embryonalentwicklung. Sie zeigen schwere Störungen in der Plazenta und im Dottersack (Schreiber et al., 2000).

Die Inaktivierung des *jun*-Gens resultiert in embryonaler Letalität um Tag 13. Die Embryonen zeigen Defekte in der Leber und im Herzen (Hilberg et al., 1993; Johnson et al.,

1993; Eferl et al., 1999). Mäuse mit inaktiviertem *junD* sind lebensfähig und nur Männchen zeigen Wachstumsstörungen, einen gestörten Hormonhaushalt und altersabhängige Störungen in der Fortpflanzung, die durch verminderte Spermatogenese zustande kommen (Thepot et al., 2000).

	<b>Phänotyp</b>	<b>betroffene Organe - Zelltypen</b>
<b>Fos</b>	Osteopetrose	Knochen - Osteoklasten
<b>Fos-B</b>	Aufzuchtdefekt	Hirn – Hypothalamus
<b>Fra-1</b>	Embryonal letal (E9,5)	extraembryonales Gewebe – Dottersack
<b>Fra-2</b>	nicht bekannt	
<b>Jun</b>	Embryonal letal (E 13)	Herz, Leber - Hepatoblasten
<b>JunB</b>	Embryonal letal (E 8,5-10)	extraembryonales Gewebe – Trophoblasten Dottersack - Gefäßbildung Plazenta – Labyrinthschicht
<b>JunD</b>	Sterilität bei Männchen	Testis - Spermatogenese

**Tab. 1: Übersicht über die verschiedenen Phänotypen AP-1-defizienter Mäuse (Jochum et al., 2001)**

### 1.3.3 *in vivo* Funktion von JunB

Embryonen ohne funktionelles JunB Protein sterben zwischen Tag 8,5 und 10,0 der Embryonalentwicklung aufgrund vaskulärer Defekte im extraembryonalen Gewebe (Schorpp-Kistner et al., 1999). Der letale Phänotyp von JunB-defizienten Mäusen kann durch transgene Expression von *junB* unter dem humanen Ubiquitin C Promotor (Schorpp et al., 1996) rückgängig gemacht werden. Adulte *junB*<sup>-/-</sup> Ubi-*junB* Mäuse zeigen jedoch in verschiedenen Geweben eine stark verminderte *junB*-Expression (Passegue et al., 2001; Hartenstein et al., 2002; Hess et al., 2003). Dieses Mausmodell ermöglicht es, die Rolle von JunB bei Prozessen in Geweben im adulten Tier zu untersuchen. So konnte gezeigt werden, dass JunB durch Regulation spezifischer Cytokine die Differenzierung von Zellen des T-Helfer 2 Typs (Th2) kontrolliert. JunB aktiviert die Expression von Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 5 (IL-5) und vermittelt dadurch die Differenzierung von naiven T-Zellen in Th2 Zellen (Hartenstein et al., 2002).

Zusätzlich zeigen *junB*<sup>-/-</sup> Ubi-*junB* transgene Mäuse eine gestörte endochondrale Ossifikation. Die Mäuse weisen starke Wachstumsstörungen mit verkürzten Längsknochen, eine schwere Osteoporose und einen Hypochondrodysplasie-ähnlichen Phänotyp auf, der mit

verminderter Proliferation von Stromazellen aus dem Knochenmark *in vitro* sowie von Osteoblasten und Chondrozyten der Wachstumsplatte *in vivo* einher geht (Hess et al., 2003). *junB*<sup>-/-</sup> Ubi-*junB* Knochenmarkzellen und *junB*<sup>-/-</sup> Ubi-*junB* Chondrozyten und Osteoblasten zeigen eine deregulierte Expression der Zellzyklusregulatoren *cyclin D1*, *cyclin A* und *p16<sup>INK4a</sup>*, womit die gestörte Proliferation in diesen Zellen zu erklären ist (Hess et al., 2003). Untersuchungen mit murinen *junB*<sup>-/-</sup> Fibroblasten unterstreichen diesen Zellzyklusdefekt. So führt der Verlust von funktionellem JunB in diesen Zellen zu verstärkter Expression von *cyclin D1* und *p16<sup>INK4a</sup>* sowie einer reduzierten Expression von *cyclin A* (Bakiri et al., 2000; Passegue und Wagner, 2000; Andrecht et al., 2002).

Transgene Mäuse, denen JunB spezifisch in der myeloiden Zelllinie fehlt, entwickeln eine transplantierbare myeloproliferative Erkrankung, die bis zur Blastenkrise fortschreiten kann und so dem Krankheitsbild der Chronischen Myeloiden Leukämie (CML) im Menschen ähnelt. Das Fehlen von JunB führt zu einer erhöhten Anzahl an Granulozytenvorläufern. Eine veränderte Expression von GM-CSF $\alpha$ -Rezeptor, den anti-apoptotischen Proteinen Bcl2 und Bclx<sub>L</sub> sowie von p16<sup>INK4a</sup> und c-Jun resultiert in gesteigerter Proliferation und Überleben der JunB-defizienten Granulozytenvorläufer einher. Der unreife und hyperproliferative Phänotyp kann durch ektopische Expression von JunB in diesen Zellen wieder rückgängig gemacht werden (Passegue et al., 2001).

Mit der Technik der konditionalen Geninaktivierung kann ein Zielgen gewebspezifisch inaktiviert werden. Dazu müssen zwei Mausstämme generiert werden. Bei dem ersten wird der zu inaktivierende Genlokus zunächst durch spezifische Erkennungssequenzen, den so genannten loxP-Sequenzen, flankiert. Der zweite Mausstamm exprimiert das Enzym Cre Rekombinase unter einem gewebspezifischen Promotor. Die Cre Rekombinase katalysiert die Rekombination zwischen zwei loxP-Sequenzen. Durch Kreuzung der beiden Mausstämme wird somit der von loxP-Sequenzen flankierte DNA-Abschnitt deletiert (Rajewsky et al., 1996; Nagy, 2000; van der Weyden et al., 2002).

MORE-Cre-Mäuse exprimieren die Cre Rekombinase ausschließlich unter dem Epiblast-spezifischen *Mox2*-Lokus (Tallquist und Soriano, 2000). Aus Kreuzungen dieser MORE-Cre-Mäuse mit Mäusen, welche ein von loxP-Sequenzen flankiertes *junB*-Allel tragen, gehen lebensfähige Nachkommen hervor (Kenner et al., 2004). Die Nachkommen entwickeln neben einer CML-ähnlichen Erkrankung eine Osteopenie aufgrund von Defekten in der Proliferation und Differenzierung in der Osteoblasten- und Osteoclasten-Zelllinie (Kenner et al., 2004).

Diese Mausmodelle zeigen, dass JunB eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen spielt. Konditionale Inaktivierung von JunB in Endothelzellen (durch Tie2-vermittelte Cre-Aktivität) führt ebenfalls zu embryonaler Letalität, wie bei der Inaktivierung von JunB in allen Geweben (Marina Schorpp-Kistner, persönliche Mitteilung). Dies bedeutet, dass JunB-Expression in den Endothelzellen schon in der Embryonalentwicklung eine essentielle Rolle einnimmt. Der letale Phänotyp von JunB-defizienten Mäusen beschränkt sich aber nicht nur auf fehlende JunB-Expression in Endothelzellen sondern beruht auf einer gestörten Trophoblastendifferenzierung, einer gestörten Entwicklung der Blutgefäße des Dottersackgewebes und auf dem Fehlen eines funktionellen Labyrinths in der Plazenta (Schorpp-Kistner et al., 1999).

JunB-defiziente Embryonen sind stark wachstumsgestört und sterben zwischen Tag 8,5 und 10,0 der Embryonalentwicklung. Die Wachstumsstörungen und die Letalität beruhen auf der Tatsache, dass JunB-defiziente Embryonen keine funktionellen vaskulären Interaktionen mit dem maternalen Blutkreislauf aufbauen können. Diese Fehlentwicklungen werden durch verschiedene Defekte im extra-embryonalen Gewebe hervorgerufen. Der Eintritt dieses Phänotyps korreliert mit der hohen *junB*-Expression in extraembryonalen Gewebe von *Wild-Typ* Embryonen. Die gestörte Genregulation von Proliferin, Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) und Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) in mutanten Trophoblasten führt zu einer defekten Neovaskularisierung der Dezidua. Der Dottersack der *junB*<sup>-/-</sup>-Embryos kennzeichnet sich durch stark erweiterte Blutgefäße aus, was auf verminderte Expression vom VEGF-Rezeptor-1 zurückzuführen ist. JunB-defiziente Embryonen, die diese frühen Defekte überleben, sterben schließlich an einem Ausbleiben des fötalen-maternalen Austauschs an Sauerstoff und Nährstoffen. Dieser Austausch kann nicht stattfinden, da die hierfür benötigte Labyrinthschicht in der Plazenta nicht ausgebildet wird (Schorpp-Kistner et al., 1999). Durch Injektion von mutierten *junB*<sup>-/-</sup> embryonalen Stammzellen in tetraploide Blastozysten kann der Plazenta-Phänotyp aufgehoben werden. Diese Embryonen sind weder im Wachstum retardiert noch zeigten sie Vaskularisierungsdefekte im plazentalen Labyrinth, was bestätigt, dass die Wachstumsstörungen und der letale Phänotyp in JunB-defizienten Embryonen auf Defekte in den extraembryonalen Geweben zurückzuführen ist (Schorpp-Kistner et al., 1999).



	Vaskularisierung des Dottersacks	Trophoblasten	Plazentales Labyrinth	Knochenentwicklung
<b>JunB</b>	Störung der Vaskularisierung des Dottersacks	Funktion der Trophoblasten-Riesenzellen gestört	Labyrinth fehlt	Endochondrale Ossifikation
<b>ARNT</b>	Störung der Vaskularisierung des Dottersacks	Vermehrte Anzahl an Trophoblasten-Riesenzellen	verkleinertes Labyrinth	
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Fortschreiten der Vaskularisierung gestört			Kontrolle des Wachstumarrests und Überleben von Chondrozyten gestört
<b>HIF-2<math>\alpha</math></b>	Störung der Remodullierung des Gefäßsystems			
<b>VEGF</b>	Dosisabhängige Störung der Gefäßentwicklung			Störung der endochondralen Knochenbildung
<b>VEGFR-1</b>	gesteigerte Differenzierung zu Angioblasten, Fehlbildung funktionaler Gefäße			

**Tab. 2: Ähnlichkeiten der Phänotypen JunB-, ARNT-, HIF-1-, VEGF- und VEGFR-1-defizienter Mäuse.**

JunB: (Schorpp-Kistner et al., 1999); ARNT: (Kozak et al., 1997); HIF1- $\alpha$ : (Iyer et al., 1998; Kotch et al., 1999; Schipani et al., 2001); HIF-2 $\alpha$ : (Peng et al., 2000); VEGF: (Ferrara et al., 1996); VEGFR-1: (Fong et al., 1995; Fong et al., 1999).

Diese Ergebnisse weisen JunB eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung zu. HIF-1 $\alpha$ , ARNT-, VEGF- und VEGFR-1 stellen eine Gruppe von Molekülen dar, die bei den Prozessen der Gefäßentstehung und dem Aufbau fötaler-maternaler Interaktionen in der Embryonalentwicklung und auf zellulärer Ebene bei der Antwort auf hypoxische Bedingungen eine zentrale Rolle spielen (Harris, 2002; Carmeliet, 2003; Ferrara et al., 2003; Jain, 2003). Die Defekte in JunB-defizienten Embryonen zeigen zum Teil sehr starke Ähnlichkeiten zu den Störungen, die in Mutanten mit inaktivierten *HIF-1 $\alpha$* , *ARNT*-, *VEGF*- und *VEGFR-1*-Gen zu beobachten sind (siehe Tab. 2) und lassen daher vermuten, dass JunB an der Steuerung molekularer Mechanismen wie der Gefäßentwicklung und der zellulären Hypoxie-Antwort beteiligt sein könnte.

## 1.4 Fragestellung

Der Aufbau eines funktionellen Blutgefäßsystems sowie die Bildung eines Netzwerks, der den fötalen-maternalen Austausch von Sauerstoff und Nährstoffen sichert, ist schon in der

frühen Embryonalentwicklung von essentieller Bedeutung. Defekte in diesen Prozessen führen häufig zu embryonaler Letalität und manifestieren sich auch in Krankheitsbildern wie z.B. der Präeklampsie, des so genannten schwangerschaftsbedingten Bluthochdrucks, bei der die Betroffene während der Schwangerschaft unter Bluthochdruck leidet und über ihren Harn zu viel Eiweiß ausscheidet. Der Aufbau der Plazenta ist durch eine streng regulierte Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen charakterisiert, was zu einer umfangreichen Vaskularisierung der Plazenta führt und somit den für die Entwicklung des Embryos essentiellen Austausch fötaler und maternaler Stoffe sichert. Im Verlauf der Embryonalentwicklung gewährleistet das Blutgefäßsystem des Dottersacks über die Versorgung von Sauerstoff und Nährstoffen das Überleben des Embryos. Die Differenzierung von Trophoblasten bei der Plazentaentwicklung sowie die Bildung eines Gefäßnetzwerkes in intra- und extraembryonalen Geweben sind Prozesse, die maßgeblich durch Hypoxie beeinflusst werden (Land, 2003). Die Inaktivierung von Genen, die eine wichtige Rolle bei der zellulären Hypoxieantwort spielen, wie z.B. *HIF-1 $\alpha$* , *HIF-2 $\alpha$* , *ARNT*, *VEGF* und *VEGFR-1*, führen zum Teil zu Defekten in der Plazentaentwicklung und zum Teil zu Störungen im Aufbau des intra- und extraembryonalen Blutgefäßsystems. Die Tatsache, dass JunB sowohl in den Prozessen der Trophoblastendifferenzierung, der Ausbildung vaskulärer Strukturen in extraembryonalen Geweben als auch der Plazentaentwicklung eine essentielle Rolle einnimmt, lässt vermuten, dass JunB solche Prozesse über die Kontrolle der zellulären Hypoxieantwort reguliert. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass JunB bei der Regulation der Hypoxie-abhängigen Transkription von TH in PC12-Zellen und von MMP-2 in Fibroblasten aus Rattenherzen beteiligt ist (Norris und Millhorn, 1995; Bergman et al., 2003). Weiterhin reguliert JunB *in vivo* Proteinasen, wie MMP-9, uPA und MMP-13 (Schorpp-Kistner et al., 1999). Noch nicht veröffentlichte Untersuchungen an unterschiedlichen JunB-defizienten Zellsystemen aus der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Schorpp-Kistner zeigen, dass JunB in Fibroblasten und Endothelzellen für die maximale Hypoxie-induzierte Transkription von VEGF notwendig ist (Schmidt, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen folgende Fragen geklärt werden:

- Wird *junB* selbst nach Hypoxie aktiviert?
- Welche Signalwege sind für die Aktivierung von JunB unter Hypoxie verantwortlich?
- Reguliert JunB weiter Zielgene, die in der zellulären Hypoxieantwort und Prozessen der Gefäßbildung beteiligt sind?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Fisher Scientific, England
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar für Bakteriologie	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roche, Mannheim
Borsäure	Fluka Chemicals, Schweiz
Bisbenzimid H33342 Fluorochrom	Calbiochem, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Casaminsäuren	Becton Dickinson, Heidelberg
Chloroform	J.T.Baker, USA
Chloroquin	Sigma, Deisenhofen
Deoxycholsäure Na <sup>+</sup> -Salz	Fluka Chemicals, Schweiz
2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate	Promega, Mannheim
Dextransulfat	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Riedel-de Haën, Seelze
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Entellan	Merck, Darmstadt
Enhanced Chemoluminescence Lsg.	Perkin Elmer LAS, Rodgau-Jügesheim
Entwickler-Lösung	Kodak, Stuttgart
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure	J.T.Baker, USA
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fixier-Lösung	Kodak, Stuttgart
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt

---

Gelatine	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	AppliChem, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Harnstoff (Urea)	Fluka Chemicals, Schweiz
Hefeextrakt für Bakteriologie	GERBU Biotechnik, Gaiberg
HEPES	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Isopropanol (2-Propanol)	J.T.Baker, USA
Kaliumchlorid	Acros Organics, Belgien
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
Mayer's Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel-de Haën, Seelze
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumkarbonat	AppliChem, Darmstadt
Natriumcitrat	Fluka Chemicals, Schweiz
Natriumchlorid	Fluka Chemicals, Schweiz
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Natriumhydroxid	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Natrium-Kalium-Tartrat	Fluka Chemicals, Schweiz
Nonidet (NP-40)	Fluka Chemicals, Schweiz
Paraformaldehyd	AppliChem, Darmstadt
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Phosphataseinhibitor Cocktail I + II	Sigma, Deisenhofen
Photoemulsion	Kodak, Stuttgart
Ponceau-S	Sigma, Deisenhofen
Proteaseinhibitor Cocktail	Sigma, Deisenhofen
Rinder Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Rubidiumchlorid	Merck, Darmstadt
Ploybren	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure	Riedel-de Haën, Seelze
TEMED	Roth, Karlsruhe

TPA	Sigma, Deisenhofen
Triethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Tris-base	Roth, Karlsruhe
Tris-hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
tRNA	Sigma, Deisenhofen
Trypsin (IHC)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-Inhibitor (IHC)	Sigma, Deisenhofen
Trypton für Bakteriologie	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	Fluka Chemicals, Schweiz
Wasserstoffperoxid	AppliChem, Darmstadt
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Xylol	Fluka Chemicals, Schweiz

Weitere allgemein gebräuchliche Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### 2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Abi prism 310 Genetic Analyser	Abi prism, Darmstadt
Bakterienplatten	Greiner, Frickenhausen
Bakterienschüttler	Infors AG, Schweiz
Begasungsbrutschrank (Zellkultur)	Heraeus, Hanau
Begasungsbrutschrank mit O <sub>2</sub> -Regulation	Binder, Tuttlingen
Brutschrank (Bakterien)	Heraeus, Hanau
Drehrad	cti, Idstein
Einbettungsmaschine Tissue Tek TES	Vogel, Giessen
Eismaschine	Scotsman, Ice Systems, USA
Elektrophoresekammer	BioRad, München
Elisa-Reader	Titertek, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Greiner, Frickenhausen
FACScan/FACScalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Feinwaage	Ohaus, Giessen
Fettstift	Kisker-Biotech, Mühlhausen
Filmkassetten	Rego, Augsburg
GenePix 4100A Microarray Scanner	Axon Instruments, USA
Heizblock	Grant, UK
Horizontal-Elektrophoresekammer	Stratagene, Niederlande

Hybridisierungsöfen	Bachhofer, Reutlingen
Kamera (Mikroskop DMIL)	Leica, Bensheim
Kryoröhrchen Lip Seal 2 ml	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman, München
Kühlzentrifuge 2K-15	Sigma, München
Küvetten	Hellma, Müllheim/Baden
Hell-Dunkelfeld-Mikroskop	Leica, Bensheim
Mikrotom RM 2155	Leica, Bensheim
Mikrowellengerät	Bosch, Karlsruhe
Northern blot Membran	Perkin Elmer LAS, Rodgau-Jügesheim
Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	American National Can, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
PCR-Gefäße	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
pH-Messgerät	Knick, Berlin
Photometer GeneQuant pro	Pharmacia, Freiburg
Pipettierhilfe	BrandTech, USA
Pipetten	Gilson, USA
Pipettenspitzen	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach
Pipettenspitzen, gestopft	Axygen, USA
Plastik-Kassetten (Paraffineinbettung)	Polysciences, USA
Protein-Gelkammern	Sigma-Aldrich, München
RNA-Gelkammern	Kodak, Stuttgart
Röntgenfilme Fuji RX	Fuji, Düsseldorf
Röntgenfilm-Entwickler	Optimax Protec, Oberstenfeld
Sephadex-G50-Säule	Stratagene, Niederlande
Sicherheitswerkbank	The BAKER Company, USA
Sirius Luminometer	Berthold, Bad Wildbad
Spannungsgerät	BioRad, München
Szintillationszähler	Beckman, München
PCR-Thermocycler PTC-200	Biozym, Oldendorf
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Tomy Kogyo Co. Ltd, Japan
Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Ultra-Turrax T25	Ika Labortechnik, Staufen
UV-Leuchttisch	Stratagene, Niederlande
UV-Stratalinker	Stratagene, Niederlande
Waage	Sartorius, Göttingen

Wasserheizbäder	GFL, Burgwedel
Western blot-Apparatur	BioRad, München
Western blot-Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
Whatman 3 MM-Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Zellzählgerät Coulter Counter	Beckman, USA
Zellkulturartikel	Greiner, Frickenhausen
Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge J2-HS	Beckman, München
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Varifuge 3.OR	Heraeus, Hanau

### 2.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (+ Puffer)	Roche, Mannheim
AMV Reverse Transkriptase (+ Puffer)	Promega, Mannheim
DNase I (+ Puffer)	Promega, Mannheim
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsenzyme (+ Puffer)	New England Biolabs, USA
	Promega, Mannheim
	Roche, Mannheim
Taq DNA-Polmerase (+ Puffer)	Sigma, Deisenhofen
T4 Ligase (+ Puffer)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.4 Radiochemikalien

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$	Amersham, Freiburg
---	--------------------

### 2.1.5 Kits

Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, USA
DAB Substrat System	Vector Laboratories, USA
Dual Luciferase Kit	Promega Mannheim
Plasmid Aufreinigungs-Kit	Promega, Mannheim
OmniScript RT Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraktions-Kit	Qiagen, Hilden
SYBR Green PCR Kit	ABgene, Hamburg
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, USA
Wizard-Plasmid-Midi Aufreinigungs-Kit	Promega Mannheim

## 2.1.6 Antikörper

### *Primärantikörper*

anti- $\beta$ -Aktin (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-ERK1,2 (Kaninchen)	Cell Signaling, USA
anti-JNK1 (F-3; Maus)	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-JNK2 (D-2; Maus)	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-JunB (N-17; Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-p38 (C-20; Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-p65 (C-20; Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-PEBP2 $\beta$ (CBF $\beta$ ; E-20; Ziege)	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-phospho-ERK-1,2 (Kaninchen)	Cell Signaling, USA
anti-phospho-JNK 1,2 (Kaninchen)	Cell Signaling, USA
anti-phospho-p38 (Kaninchen)	Promega, Mannheim

### *Sekundärantikörper*

anti-Kaninchen IgG (Ziege); HRP-gekoppelt	DAKO, Dänemark
anti-Maus IgG (Ziege); HRP-gekoppelt	DAKO, Dänemark
anti-Ziege IgG (Kaninchen); Cy3 gekoppelt	Dianova, Hamburg
anti-Ziege IgG (Kaninchen); HRP-gekoppelt	Sigma, Deisenhofen

## 2.1.7 Oligonukleotide

### Oligonukleotide für semi-quantitative und quantitative RT-PCR

<b>CBF<math>\beta</math>:</b>	forward	5'-ACA AAA TTG GGT GAT GAA GAT GAG-3'
	reverse	5'-ACG ACC ACG GAA AGT ATT GTA AGC-3'
<b>Kif5b:</b>	forward	5'-ACT GCG GCC CTG TTT GTT AC-3'
	reverse	5'-AGC CAT CCA TCT GCC TCT GC-3'
<b>junB:</b>	forward	5'-CCC GTC TAC ACC AAC CTC AGC-3'
	reverse	5'-GGG GGC CAT GTA AAC CT-3'
<b>Nix:</b>	forward	5'-CGG CAT CTA TAT TGG AAA ACG ACT-3'
	reverse	5'-TTA CAG GCC AAA AAG GGA ACA A-3'
<b>Phf17:</b>	forward	5'-TGT TCT GTT TTT GCA CTC CTC ATA-3'
	reverse	5'-AAT AAG CCT TTT CTG TTG TT-3'
<b><math>\beta</math>-tubulin:</b>	forward	5'-GCG ACC TGC AGC TGG ACC GAA TCT-3'
	reverse	5'-GGG CGA GGG CAC CAC ACT GAA GG-3'
<b>Tram1:</b>	forward	5'-CTC TGG GCA GTT CTT TTT GTT TTG-3'
	reverse	5'-ACG GCC GGT TTC CTT TTC A-3'



**Oligonukleotide zum Klonieren der pMX-pie-Konstrukte****junB ATG-Bgl II:** 5'-CCA GAG ATC TCG GAT GTG CAC GAA AAT G-3'**junB-Stop-EcoRI:** 5'-GCA AGA ATT CGG AGG CTC TCA GAA GG-3'**CBF $\beta$  ORF Bgl II:** 5'-AGA TCT CCA AGC ACA CGG CCG CAC CTC A-3'**CBF $\beta$  ORF EcoRI:** 5'-GAA TTC GCA GTC CCT CCA GTT GTC A-3'**Oligonukleotide zum Klonieren der CBF $\beta$ -Reportergen-Konstrukte****CBFbprom+500aa:** 5'-CCG GTA CCT CCC CAG GGC CAT CTT TGA GGT TT-3'**CBFbprom+500aas:** 5'-TCC CCA GCC AGC CAC GCA GAG T-3'**2.1.8 Sonden für Northern Blot Expressionsanalysen**

Für die Herstellung der Hybridisierungssonden wurden die Fragmente mit den angegebenen Restriktionsenzymen aus Plasmiden herausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gelextraktions-Kits aufgereinigt.

Sonde	Verdau	Fragment
<i>junB</i>	Xba I/Eco RI	(+175/+1074)
<i>VEGF</i>	Not I	(+243/+999)

**2.1.9 Vektoren**

pBluescript II SK (+)	Stratagene, Niederlande
pcDNA3.1 <sup>®</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
pMX-pie	freundlicherweise von Dr. A. Cerwenka bereitgestellt
pGL2tata luc	freundlicherweise von Dr. H. van Dam bereitgestellt

**2.1.10 Bakterienmedien****TY-Medium:** 1% Trypton; 1% Hefeextrakt; 0,1% Casaminsäuren; 0,5% NaCl**TY-Amp-Medium:** TY-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin**Agarplatten:** TY-Amp-Medium mit 2% (w/v) Agar**2.1.11 Bakterienstämme***E.coli* XL1 blueGenotyp: F'<sup>+</sup>::Tn10 *proAB+lacI<sup>q</sup> $\Delta$ ZM15, recA1, endA1, gyrA96, (Nal<sup>r</sup>), thi, hsdR17 (r $\kappa$ -, m $\kappa$ +), supE44, relA1, lac*

### 2.1.12 Zellkultur

DMEM (4,5 g/l Glucose)	Cambrex, Belgien
DMSO	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma, Deisenhofen
HAM's F12	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	PAA Laboratories, Österreich
$\beta$ -Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat-Lösung (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Cambrex, Belgien
Trypsin/EDTA	BioWhittaker, Belgien

### 2.1.13 Eukaryotische Zelllinien

#### ***junB* wt (MEF 7) und *junB*<sup>-/-</sup> Fibroblasten (MEF 10)**

Fibroblasten wurden aus Wildtyp- und JunB-defizienten Embryonen isoliert und nach dem 3T3 Protokoll von Todaro und Green (1963) immortalisiert (Andrecht et al., 2002).

#### **HIF-1 $\alpha$ wt (HIF 39) und HIF-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> Fibroblasten (HIF 39;Cre)**

Fibroblasten wurden aus Embryonen mit geflochten HIF-1 $\alpha$  Allelen isoliert und durch die stabile Transfektion mit dem großen SV40 T-Antigen immortalisiert und zusätzlich mit H-ras transfiziert. Durch die transiente Transfektion der Cre-Rekombinase wurde das zweite Exon der HIF-1 $\alpha$  Allele deletiert (Ryan et al., 2000). Fibroblasten mit geflochten HIF-1 $\alpha$  Allelen wurden als Wildtyp-Fibroblasten bezeichnet, Zellen mit deletiertem HIF-1 $\alpha$  als HIF-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>. Beide Zelllinien wurden von Randall S. Johnson zur Verfügung gestellt.

#### **NF $\kappa$ B wt und N $\Delta$ + Fibroblasten (I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N, NF $\kappa$ B Super Repressor Zellen)**

Primäre Fibroblasten aus Wildtyp-Embryonen oder Embryonen, die eine Deletionsmutante des Inhibitors von NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B) unter der Kontrolle des  $\beta$ -Catenin-Promotors exprimieren (Schmidt-Ullrich et al., 2001), wurden von Claus Scheidereit zur Verfügung gestellt. Diese Fibroblasten wurden nach dem 3T3 Protokoll von Todaro und Green (1963) immortalisiert und von Marina Schorpp-Kistner zur Verfügung gestellt.

#### **F9 Zellen**

F9 Zellen sind undifferenzierte Maus-Teratokarzinom-Zellen, die aus einem Testis-Teratokarzinom einer Maus des Stammes 129 isoliert wurden (Berstine et al., 1973).

### ***junB*<sup>+/-</sup> und *junB*<sup>-/-</sup> Endothelioma-Zellen**

Die in dieser Arbeit benutzten Endothelioma-Zellen stammen aus heterozygoten bzw. homozygoten *junB*-Embryonen, welche an Tag 9 der Embryonalentwicklung isoliert und durch Transfektion mit dem endothelspezifischen mittleren T-Antigen des murinen Polyomavirus immortalisiert wurden (Schmidt, 2001).

### **Phoenix Zellen**

Phoenix Zellen sind Derivate der mit dem Adenovirus Ad5 transformierten humanen embryonalen Nierenzelllinie 293T, die zusätzlich stabil mit zwei Verpackungsgenen aus dem Moloney murinen Leukämie Virus (MoMLV) transfiziert wurden: CMV-Env-PolyA und RSV-Gag/Pol-Tyt2-PolyA. Die Transfektion von Phoenix-Zellen mit retroviralen Vektoren erlaubt die Herstellung von infektiösen aber nicht selbst replizierenden ekotrophen Retroviren, mit denen schwer transfizierbare Zelllinien mit hoher Effizienz infiziert werden können ([www.stanford.edu/group/nolan](http://www.stanford.edu/group/nolan)).

### **2.1.14 Puffer und Lösungen**

<b>1x MOPS</b>	20 mM Morpholinopropansulfonsäure; 5 mM NaOAc; 0,5 mM EDTA; pH 7,0
<b>1x PBS</b>	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7.6
<b>1x SSC</b>	150 mM NaCl; 12,5 mM Na-Citrat; pH 6,5
<b>1x TBE</b>	90 mM Tris-HCl; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA
<b>TE</b>	10 mM Tris; 1 mM EDTA

### **2.1.15 Molekulargewichtsmarker**

Gene Ruler Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Prestained Protein Marker	New England Biolabs, USA

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische DNA Methoden**

#### **2.2.1.1 Schnellisolierung genomischer DNA**

Zur Isolierung genomischer DNA wurden die Zellen in 500 µl Zell-Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS; 25 µl 10mg/ml Proteinase K) bei 55°C für 3 Std. lysiert. Danach wurden 200 µl 6 M NaCl zugegeben. Nach Mischen der lysierten Zellen für 5 Minuten erfolgte deren Zentrifugation bei 13000 x g für 10 Minuten. Der erhaltene Überstand wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und im Anschluss an sorgfältiges Mischen wiederum bei 13000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### **2.2.1.2 Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Minipräp)**

Zur Routine-Analyse von Klonierungen wurden Bakterien in 2 ml TY-Medium, dem 100 µg/ml Ampicillin (TY-Amp-Medium) hinzugefügt wurden, bei 37°C im Schüttelinkubator über Nacht angezogen. Die Resuspension der durch Zentrifugation (4000 upm; 3 Minuten) sedimentierten Bakterien erfolgte in 200 µl Lösung I (50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A). Die Bakterien wurden anschließend durch 200 µl Lyse-Puffer (200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS) lysiert und vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 200 µl Neutralisierungspuffer (3 M Kaliumazetat pH 5,5) und sorgfältigem Mischen wurde das Lysat bei 13000 upm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit Chloroform extrahiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und die DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Das durch Zentrifugation bei 13000 upm für 10 Minuten erhaltene DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 30 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### **2.2.1.3 Plasmidpräparation im großen Maßstab (Maxipräp)**

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, wurden 200 ml TY-Amp-Medium mit 500 µl einer Bakterienvorkultur angeimpft und über Nacht auf einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden am darauf folgenden Tag bei 5000 x g für 10 Minuten bei 4°C sedimentiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des Wizard-Plasmid-Midi Aufreinigungs-Kits (Promega, Mannheim) nach den Vorschriften des Herstellers präpariert.

#### **2.2.1.4 Spezifischer Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme**

Restriktionsendonukleasen wurden zur Analyse von klonierter DNA oder zur Generierung von DNA-Fragmenten aus Plasmid-DNA unter den von den Herstellerfirmen angegebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Um 1 µg Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen zu schneiden, wurde die DNA mit der zwei- bis fünffachen Enzymmenge (2–5 U) für 1–2 Std. in der entsprechenden Verdünnung der Restriktionspuffer inkubiert. Die Inkubationstemperatur richtete sich dabei nach dem angegebenen Wirkungsoptimum der Restriktionsenzyme.

#### **2.2.1.5 Auffüllen von 5'-Überhängen**

Die DNA wurde mit 2 µl 10 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix (je 10 mM dATP;dCTP, dGTP und dTTP in 10 mM Tris pH 7,5), 2 µl 10 x Polymerasepuffer (70 mM Tris pH 7,5; 70 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM NaCl) und 1 µl *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5 U/µl) in einem Endvolumen von 20 µl versetzt. Nach 30 Minuten Reaktion bei Raumtemperatur erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation.

#### **2.2.1.6 Dephosphorylierung von DNA**

Um die Religation eines linearisierten Vektors zu unterbinden, wurde nach beendetem Restriktionsverdau des Vektors dem Ansatz 1/10 Volumen 10x Dephosphorylierungs-Puffer und 1 µl 1 U/µl Alkalische Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) zugegeben. Die Reaktion wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Vektor-DNA über ein Agarosegel aufgetrennt, das gewünschte Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt und schließlich für die Ligation verwendet.

#### **2.2.1.7 Ligation von DNA**

Die Ligation kompatibler DNA-Enden wurde durch T4 DNA-Ligase katalysiert. Neben 0,5 U des Enzyms sowie 1x Ligationspuffer (24 mM Tris-HCl, pH 6,8; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT; 0,8 mM ATP; 2,5% Polyethylen-Glyzol) enthielten die Reaktionsansätze in einem Gesamtvolumen von 5 µl die entsprechenden Nukleinsäuren, wobei 20–50 ng Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 zu dem zu klonierenden Molekül eingesetzt wurden. Der Ansatz wurde 1 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Transformation von chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien erfolgte mit der Hälfte der Ligationsreaktion.

### **2.2.1.8 Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese**

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden für die Analyse von DNA horizontale Agarosegele mit 0,7% bis 2% Agarosegehalt und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid eingesetzt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer diente 1x TBE. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x DNA-Ladepuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol FF; 30% (v/v) Glycerin) versetzt und zusammen mit einem DNA-Molekulargewichtsstandard bei 5–10 V/cm gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und zur Dokumentation photographiert.

### **2.2.1.9 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen**

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem QIAquick Gelextraktions-Kits von (Qiagen, Hilden) entsprechend der Angaben des Herstellers ausgeführt.

### **2.2.1.10 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA**

Um Proteinverunreinigungen aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurde die DNA mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) gut vermischt und für 3 Minuten bei 12000 upm zentrifugiert. Danach wurde die wässrige Phase zweimal mit einem Volumen eines Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Gemisches extrahiert.

### **2.2.1.11 Ethanol-Präzipitation von DNA**

Zu einem Volumen DNA-Suspension wurde 1/10 Volumen einer 3 M NaOAc-Lösung pH 5,2 und 2,5 Volumen 100% (v/v) Ethanol zugegeben, gemischt und 15 Minuten bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde die Mischung 15 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert und das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### **2.2.1.12 Spektrophotometrische Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration in Lösung**

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm im Abgleich gegen das verwendete Lösungsmittel. Hierzu wurde eine 1:250 Verdünnung der DNA-Lösung, bzw. eine 1:50 Verdünnung der RNA-Lösung in einer Quarzküvette bei OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> in einem Spektrophotometer (Pharmacia Biotec) vermessen.

Allgemein gilt:

für doppelsträngige DNA: OD<sub>260</sub> von 1 entspricht eine Konzentration von 50 µg/ml

für RNA: OD<sub>260</sub> von 1 entspricht eine Konzentration von 40 µg/ml

für einzelsträngige Oligonukleotide: OD<sub>260</sub> von 1 entspricht eine Konzentration von 33 µg/ml

Eine Kontamination mit Proteinen (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren bei 280 nm) lässt sich durch Erstellen des Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> erkennen. Reine DNA und RNA ist charakterisiert durch einen Quotienten von 1,8–2,0.

#### **2.2.1.13 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten dNTPs. In einem Standardansatz für die Sequenzierungsreaktion wurden ca. 0,8 µg Plasmid-DNA, das entsprechende Oligonukleotid (2 pmol) und 2 µl "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems, USA) mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt, gemischt und in einem Thermo-Cycler folgenden Temperaturzyklen ausgesetzt: [96°C, 15 Sekunden; 55°C, 8 Sekunden; 60°C, 4 Sekunden] x 30. Zur weiteren Aufarbeitung wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt und das Pellet in 20 µl TSR-Puffer (Applied Biosystems, USA) resuspendiert. Der Ansatz wurde nun 3 Minuten bei 90°C erhitzt, 5 Minuten auf Eis gekühlt und im *AbiPrism*<sup>®</sup> 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) analysiert.

#### **2.2.1.14 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Eine Standard-Reaktion zur Amplifikation von DNA wurde unter den folgenden Bedingungen in einem Thermo-Cycler durchgeführt: 1/10 Volumen 10x Taq-Puffer bzw. 10x GB-Puffer (166 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 670 mM Tris-HCl pH 8,8; 67 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM β-Mercaptoethanol; 67 µM EDTA), 2,5mM dNTP-Lösung (jeweils 2,5 mM dATP; dCTP; cGTP; dTTP; pH 7,0), je 0,4µM Oligonukleotide, 1-2 U Taq-Polymerase und 10–500 ng Matrizen-DNA wurden mit dH<sub>2</sub>O auf das entsprechende Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 1 Minute, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Oligonukleotide optimalen Temperatur und die DNA-Synthese bei 72°C (Taq-Puffer) bzw. 65°C (GB-Puffer) für 0,5–1,5 Minuten abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Produktes. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte durch 25 bis 30-malige zyklische Wiederholung der Temperaturschritte.

#### **2.2.1.15 Quantitative RT-PCR**

Die quantitative RT-PCR wurde im "MyIQ Real-Time PCR" Detektionssystem (BioRad, München) durchgeführt. Die PCR-Reaktion wurde in 25µl Gesamtvolumen

durchgeführt. 12,5 µl der "SYBR Green"-Lösung (SYBR Green PCR Kit; ABgene, Hamburg) wurden mit jeweils 0,4 µM Oligonukleotiden und der zu bestimmenden cDNA versetzt und der Ansatz mit ddH<sub>2</sub>O auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Vor den Amplifikationszyklen wurde die in der "SYBR-Green"-Lösung enthaltene "Hot-Start"-Taq-Polymerase durch Erhitzen auf 95°C für 15 Minuten aktiviert. Die Temperaturbedingungen richteten sich nach den zuvor etablierten Standard-PCR-Bedingungen. Die Synthesetemperatur betrug 72°C. Die DNA-Fragmente wurden in 40 Zyklen amplifiziert und der Verlauf der Reaktion mit dem Programm "MyIQ" (BioRad; München) verfolgt und aufgezeichnet. Zur Erstellung der Standardkurve wurde ein β-Tubulin-PCR-Produkt verwendet und in einem Konzentrationsbereich von 0,1 pg/µl bis 0,01 fg/µl eingesetzt. Zum Abgleich der eingesetzten cDNA wurden die Mengen an cDNA in einer β-Tubulin-PCR und in der PCR des zu bestimmenden Zielgens eingesetzt. Mit Hilfe der Standardreihe wurden die Mengen an β-Tubulin-cDNA und cDNA des Zielgens in der Probe zu Beginn der Reaktion berechnet. Aus diesen Mengenangaben wurde das Verhältnis von β-Tubulin zum Zielgen bestimmt.

#### **2.2.1.16 Herstellung von chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien**

100 ml TY-Medium wurde mit dem Bakterienstamm *XL-1 blue* angeimpft und unter Schütteln bei 180 upm und 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in zwei sterile 50 ml Röhren überführt und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (3000 upm; 10 Minuten; 4°C) wurden die Sedimente in eiskalter Lösung I (100 mM RbCl<sub>2</sub>; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 30 mM KAc; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% (v/v) Glycerol; pH 5,8) resuspendiert und für 3 Std. auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (3000 x g; 10 Minuten; 4°C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml eisgekühlter Lösung II (10 mM MOPS; 10 mM RbCl<sub>2</sub>; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% (v/v) Glycerol; pH 7) resuspendiert. 100 µl Aliquots wurden angefertigt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

#### **2.2.1.17 Transformation von chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien**

30 µl chemisch kompetente *E.coli* Bakterien wurden zu der Hälfte des eisgekühlten DNA-Ligationsansatzes (50–100 ng DNA) gegeben. Nach Inkubation auf Eis für 20 Minuten wurde ein 90 Sekunden langer Hitzeschock bei 42°C durchgeführt und die Bakterien 5 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 200 µl TY-Medium wurde die Suspension 30 Minuten bei 37°C und 180 upm geschüttelt. 100 µl Aliquots wurden auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.



## 2.2.2 Molekularbiologische RNA-Methoden

Sämtliche Arbeiten mit RNA sowie alle Zentrifugationsschritte erfolgten stets auf Eis bzw. bei 4°C in einer Kühlzentrifuge.

### 2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

#### **RNA-Isolierung mit Lösung D**

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 2,5 ml Lösung D (4M Guanadithiocyanat; 25mM Na-Citrat pH 7,0; 0,5% Na-Sarcosyl; 0,1% Antifoam; 100mM 2-Mercaptoethanol) auf Eis lysiert. Mit einem Gummischaber wurden die lysierten Zellen von der Gewebekulturschale abgelöst. Mittels einer Injektionsspritze wurde durch mehrmaliges Auf- und Abziehen, die genomische DNA geschert und in ein steriles 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Pro ml Zellysate wurden 100 µl 3M NaAc (pH 4,8), 1 ml wassergesättigtes Phenol und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben und die Proben kräftig gemischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 20 Minuten bei 4000 upm. Die wässrige, RNA-haltige Phase wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Der Ansatz wurde kurz gemischt und die RNA anschließend auf -20°C für eine Stunde gefällt. Die präzipitierte RNA wurde dann bei 4000 upm für 45 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat mit 75%igem Ethanol gewaschen. Die gefällte RNA wurde anschließend bei Raumtemperatur trocknen gelassen und schließlich in 100 µl RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt.

#### **RNA-Isolierung mit TRIzol<sup>®</sup>**

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 2,5 ml TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz auf Eis lysiert. Die lysierten Zellen wurden mit einem Gummischaber geerntet und die genomische DNA mit einer Injektionsspritze durch mehrmaliges Auf- und Abziehen geschert. Nach Transfer in ein 15 ml Falcon-Röhrchen wurde dem Zellysate 500 µl Chloroform zugesetzt und kräftig geschüttelt. Nach einer 2-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4000 upm für 15 Minuten bei 4°C. Die wässrige, RNA-haltige Phase wurde in ein frisches 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und die RNA mit 1,5 ml Isopropanol für 10 Minuten bei 4°C gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 4000 upm für 10 Minuten bei 4°C sedimentiert und das gelartige RNA-Pellet zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen. Nach Absaugen des Ethanols wurde das RNA-Sediment an der Luft bei Raumtemperatur trocknen gelassen und in 100 µl RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O

aufgenommen. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt und die RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **2.2.2.2 Synthese von cDNA**

Um Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden, wurden  $5\ \mu\text{g}$  der isolierten Gesamt-RNA mit 2 U DNase in 1/10 Volumen 10x DNase-Puffer für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Gesamtvolumen von  $20\ \mu\text{l}$  inkubiert. Der Reaktion wurden 1,5 U RNase-Inhibitor zugesetzt, um einen Verdau der RNA zu verhindern. Nach der sich anschließenden Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation wurden  $2\ \mu\text{g}$  Gesamt-RNA bei  $70^{\circ}\text{C}$  für 3 Minuten denaturiert und in einem Volumen von  $25\ \mu\text{l}$  unter Zugabe folgender Reagenzien revers transkribiert: 1/5 Volumen 5x AMV-Puffer, 1 mM Desoxynukleotid-Triphosphate, 100 ng Oligo dT, 20 U AMV-Reverse Transkriptase sowie 1,5 U RNase-Inhibitor. Der Ansatz wurde 40 Minuten bei  $41^{\circ}\text{C}$  inkubiert und die Reaktion nachfolgend durch eine 10-minütige Inkubation bei  $65^{\circ}\text{C}$  abgestoppt. Der Reaktionsansatz wurde dann mit ddH<sub>2</sub>O auf  $100\ \mu\text{l}$  Gesamtvolumen aufgefüllt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die anschließende Amplifikation per PCR wurden  $2\ \mu\text{l}$  einer 1:10-Verdünnung dieses Ansatzes für die Mengenbestimmung der cDNA eingesetzt.

### **2.2.2.3 Elektrophorese von RNA**

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden 1%-ige Agarosegele mit 1/6 Volumen 37% (v/v) Formaldehyd-Lösung sowie 1/50 Volumen 50x MOPS-Puffer hergestellt. Die Vorbereitung der Proben umfasste die Denaturierung von  $25\text{--}30\ \mu\text{g}$  RNA in  $20\ \mu\text{l}$  1x Denaturierungspuffer (50% Formamid; 18% Formaldehyd (37%); 1x MOPS). Nach Erwärmung für 15 Minuten auf  $65^{\circ}\text{C}$  wurden die Proben unverzüglich auf Eis gestellt, mit 10x RNA-Ladepuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol FF; 30% (v/v) Glycerin,  $0,05\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$  Ethidiumbromid (v/v)) versetzt und in die Geltaschen überführt. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer. Der Einlauf der RNA in das Gel erfolgte für 30 Minuten bei 100 V, die Auftrennung der RNA bei konstanten 150 V für ca. fünf bis sechs Stunden. Zum Schluss wurde die Qualität der RNA unter UV-Durchlicht kontrolliert und photographisch festgehalten.

### **2.2.2.4 Transfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern Blot)**

Das RNA-Gel wurde nach beendeter Elektrophorese unter UV-Licht mit einem Längenstandard photographiert. Anschließend wurde das Gel auf einer Glasplatte über einem 10x SSC Pufferreservoir platziert, worauf sich ein in das Pufferreservoir hineinragende

Whatman 3 MM-Papier befand. Auf das Gel wurde luftblasenfrei die Nylon-Membran "Gene Screen plus" gelegt und darauf wiederum drei Lagen mit 10x SSC getränktem Whatman 3 MM-Papier. Darüber wurde ein Stapel Papiertücher geschichtet, der mit einem Gewicht beschwert wurde. Über Kapillarkräfte wurde die Flüssigkeit über Nacht nach oben gesaugt und somit die RNA auf die Membran transferiert. Am nächsten Tag wurde die Membran in 2x SSC gewaschen und danach für 1 Stunde bei 80°C inkubiert. Zur kovalenten Fixierung der RNA an die Membran, wurde die Membran kurzzeitig UVC-Strahlung (254nm, 1200 Joule; Stratagene, Niederlande) exponiert.

### 2.2.2.5 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die DNA-Sonden wurden mit der "Random Primer"-Methode nach Feinberg und Vogelstein (1983) radioaktiv markiert. Bei dieser Methode wird das zu markierende DNA-Fragment durch Erhitzen denaturiert, so dass an einzelsträngige DNA-Fragmente kurze, zufällige DNA-Sequenzen (= random primer) binden können, welche nach Zugabe von Nukleotiden als Startstelle für die anschließende Verlängerung durch das Klenow-Fragment, eine Untereinheit der DNA-Polymerase I, dienen. Durch den Einbau eines radioaktiv markierten Nukleotid-Triphosphates werden die entstehenden Doppelstränge radioaktiv markiert. Hierbei wurden 50 ng des zu markierenden DNA-Fragmentes in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit 10 µl Random Nonamer Primer versetzt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz 5 Minuten auf Eis abgekühlt und 10 µl dCTP-Puffer, 5 µl  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (50µCi) und 1 µl Klenow Fragment hinzu gegeben. Der Ansatz wurde 15 Minuten bei 37°C inkubiert, um die radioaktiv markierten Nukleotid-Triphosphate in die entstehenden Doppelstränge einzubauen. Nach der Inkubation wurde das Volumen der Probe auf 80 µl mit TE aufgefüllt und die Probe über eine mit 2x80 µl TE äquilibrierte Nuc Trap<sup>®</sup> Säule der Firma Stratagene aufgereinigt, um freie Radioaktivität von der Probe zu trennen. Die radioaktive Sonde wurde hierbei mit Hilfe der Stratagene Apparatur („Push column beta shield device“) durch die Säule gedrückt, wobei freie Nukleotide von der Säule zurück gehalten werden und die radioaktiv markierte RNA die Säule ohne Bindungsmöglichkeit passiert. Das Volumen der radioaktiv markierten Sonde lag nach der Säulenaufreinigung bei 140 bis 160µl. 2 µl der radioaktiv markierten Probe wurden in einem Szintillationszähler (LS5000TD, Beckman) gemessen und ihre Aktivität bestimmt. Um eine spezifisch markierte Sonde bei der Hybridisierung einzusetzen, wurden nur Sonden verwendet die eine spezifischen Akitvität von  $2,1 \times 10^7$  cpm ( $> 1,5 \times 10^5$  cpm/µl) aufweisen konnten.

### 2.2.2.6 Hybridisierung von RNA

Die auf die Membran fixierte RNA wurde in einer Glasröhre mit 30 ml Churchpuffer (0,25 M NaPi; 7% SDS; 1 mM EDTA) in einem Hybridisierungssofen bei 65°C für mindestens 1 Stunde unter Rotation vorhybridisiert. Von der radioaktiv markierten Sonde wurden  $1,05 \times 10^7$  cpm mit einem Viertel Volumen 2N NaOH versetzt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert, was zur Denaturierung der Sonde führte. Anschließend wurde die Probe in 7 ml Church Puffer überführt und in die Hybridisierungsröhre gegeben. Die Hybridisierung mit der Sonde erfolgte bei 65°C über Nacht. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität wurde die Membran unter Rotation der Röhre zweimal für 15 Minuten mit Northern Waschlösung (20 mM NaPi; 1% SDS) bei 65°C gewaschen und in Frischhaltefolie eingepackt. Zum Schluss wurde in einer Belichtungskassette ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und dieser je nach Stärke des Signals unter Verwendung zweier Verstärkerfolien bei -80°C belichtet.

Bis zu vier Hybridisierungen konnten auf der gleichen Membran durchgeführt werden, wenn das ursprüngliche Hybridisierungssignal durch Inkubation der Membran in kochendem Strip-Puffer (0,5% SDS) für 5 Minuten entfernt wurde. Die erneute Hybridisierung erfolgte wie oben beschrieben.

### 2.2.2.7 Fluoreszenzmarkierung und Hybridisierung von Proben für den DNA-Microarray

Die RNA von Endothelioma-Zellen wurde mit TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz isoliert. Für die Hybridisierung wurden DNA-Chips verwendet, die die 15K Klonsammlung des NIA enthielten (Ko et al., 1998; Tanaka et al., 2000). Die DNA-Chips wurden von der Abteilung Molekulare Genetik des DKFZ hergestellt. Die in modifizierte pSPORT1-Vektoren klonierten cDNAs wurden mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Nach der Präzipitation wurden sie in "Spotting"-Puffer (3 x SSC; 1,5 M Betain) aufgenommen und mit Hilfe des OmniGrid Microarrayers (Gene Machines, San Carlos, USA), welche mit "Stealth SMP3 Micro Spotting" Nadeln ausgestattet waren, auf eine "QF Epoxy substrate" Glasoberfläche aufgetragen (Florin et al., 2004).

Zur Herstellung der Fluoreszenz-markierten c-DNA wurden 40 µg Gesamt-RNA mit dem Omniscript RT Kit (QIAGEN) in zwei Ansätzen mit Cy3- bzw. mit Cy5-markierten dUTPs (NEN Life Science Products, Köln) revers transkribiert. Die Cy3- und Cy5- markierte cDNA-Proben aus den zu vergleichenden Inkubationsansätzen wurde vereinigt, aufgereinigt und mit Hilfe einer Microcon YM-30 PCR Filtereinheit aufkonzentriert. Die Proben wurden

mit "Dig Easy Hyb"-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim) verdünnt und auf den DNA-Microarrays für 16 Stunden bei 37°C unter leichtem Schütteln hybridisiert. Überschüssige bzw. ungebundene Proben wurden anschließend bei Raumtemperatur durch folgende Waschschrte von den Microarrays entfernt: 1 x SSC/0,1% (w/v) SDS und 0,1 x SSC/0,1% SDS für 5 Minuten, 70% Ethanol für 30 Sekunden, 100% Ethanol für 30 Sekunden. Anschließend wurden die DNA-Chips an der Luft getrocknet. Die Hybridisierungen wurden immer doppelt ausgeführt, jeweils unter Austausch der die cDNA markierenden Fluoreszenzfarbstoffe ("colour switch), um den systemischen Fehler auszugleichen, der durch unterschiedliche Eigenschaften der Farbstoffe beim Einbau in die cDNA und durch unterschiedliche der Fluoreszenzintensitäten sowie Hintergrundintensitäten zustande kam.

Die DNA-Microarrays wurden mit dem GenePix 4100A Microarray Scanner (Axon Instruments Inc., USA) eingelesen und mit dem dazugehörigen GenePix Pro 3.0 Softwareprogramm bearbeitet. Die folgende Analyse der Daten erfolgte im Programm Microsoft Excel. Der lokale Hintergrund wurde von jedem Spot individuell abgezogen und der Mittelwert der Signalintensitäten und das logarithmische Verhältnis der Fluoreszenz von Cy5 zu Cy3 von den Signalen, die ein identisches Gen auf einem Chip repräsentieren, berechnet. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Cy5 zu Cy3 repräsentiert die Menge an RNA in Probe 1 zu Probe 2. Für jede Hybridisierung wurde eine Normalisierung der gemittelten Verhältnisse mit Hilfe des Medians der logarithmischen Verhältnisse aller Gene in einem Hybridisierungsexperiment durchgeführt. Gene mussten eine mehr als 2-fache differentielle Expression aufweisen (logarithmisches Verhältnis > 1), um als differentiell exprimiert angesehen zu werden.

### **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

Zur Unterbindung von Protease- und Phosphataseaktivitäten wurden sämtliche Arbeiten mit Proteinen stets auf Eis und mit eisgekühlten Lösungen bzw. in Gegenwart von Protease- und Phosphatase-Inhibitoren durchgeführt, sowie zur Zentrifugation stets eine Kühlzentrifuge bei 4°C verwendet.

#### **2.2.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten**

Zur Isolierung der Gesamt-Proteine wurden die Zellen mit eiskaltem Wasch-PBS (PBS; 1,0 mM NaF; 0,5 mM PMSF) gewaschen und anschließend in 1ml Ernte-PBS (1,0 mM NaF; 0,5 mM PMSF, 1 mM NaVO<sub>3</sub>) von der Zellkulturschale vorsichtig abgeschabt, in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 4000 upm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Sediment in 200 µl Protein Lysepuffer PP (25 mM HCl, pH

7,8; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM KCl; 10% Glyzerin; 0,1% NP-40; 1 mM NaF; 1 mM NaVO<sub>3</sub>; jeweils 1% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail, Phosphatase Inhibitor Cocktail I und II (alle Sigma) aufgenommen. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis, wurden die Zellen bei 15000 upm für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. 5 µl der Proteinsuspension wurden anschließend zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry verwendet, der Rest bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry**

Die Proteinkonzentration wurde entsprechend der klassischen Methode nach Lowry bestimmt (Lowry et al., 1951). Dazu wurden je 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung auf 150 µl mit Lowry-Lösung I (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0,1 N NaOH) aufgefüllt und dann mit 250 µl einer frisch hergestellten Lowry-Lösung IV (2% Na-K-Tartrat/1% CuSO<sub>4</sub>x5H<sub>2</sub>O/ Lowry-Lösung I im Verhältnis von 1 : 1 : 100) gemischt. Nach einer Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 100 µl Lowry-Lösung III (50% Folin-Reagenz in Wasser verdünnt) zugegeben und für 30–90 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zur Quantifizierung wurden Eichlösungen mit bekannten BSA-Konzentrationen parallel dazu verarbeitet. Je 100 µl des Reaktionsansatzes wurden in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei 660 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgte anhand der Regressionsgeraden der Eichkurve.

### **2.2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) analysiert. Dabei richtete sich die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels nach dem Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins.

Für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde die entsprechende Acrylamid-Lösung (Trenngel-Lösung: 10%-12% Acrylamid/Bisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,05% TEMED) zwischen zwei mit Abstandhaltern fixierte Glasplatten luftblasenfrei bis ca. 4 cm zum oberen Glasrand ausgegossen, mit Isopropanol überschichtet und bis zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Nach Entfernen des Isopropanols wurde das Sammelgel (Sammelgel-Lösung: 4% Acrylamid/Bisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED) gegossen und ein entsprechender Kamm eingesetzt.

50 µg Proteinextrakt wurden mit 1x SDS-Protein-Ladepuffer (10 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 mM DTT; 0,4% SDS; 0,02% Bromphenolblau; 2% Glyzerin) mit 1,5% β-Mercaptoethanol versetzt und nach Aufkochen (95°C; 5 Minuten) in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgels

pipettiert. Als Laufpuffer für die SDS-Gelelektrophorese diente 1x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-base; 192 mM Glyzin; 0,1% SDS; pH 8,7). Der Sammelgellauf erfolgte bei konstanter Stromstärke von 20 mA, der anschließenden Trenngellauf bei einer Stromstärke von 30 mA. Die Länge des Trenngellaufs richtete sich nach Größe und Auftrennung des zu analysierenden Proteins.

#### **2.2.3.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot)**

Der Transfer der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulose-Membran Optitran BA-S 83 erfolgte mittels einer "semi-dry" Western Blot-Apparatur in der folgenden Weise: drei Lagen Whatman 3 MM-Papier, die Nitrozellulose-Membran, Trenngel und wiederum drei Lagen Whatman 3 MM-Papier wurden mit Western blot-Puffer (20 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20% Methanol) getränkt und luftblasenfrei aufeinander gelegt. Der elektrophoretische Transfer wurde bei Raumtemperatur und bei einer Spannung von 18 V sowie einer entsprechenden Stromstärke, die sich aus der Größe des Gels ergab (pro cm<sup>2</sup> Gel: 2–3 mA), für etwa 1–2 Std. durchgeführt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran wurde durch eine Färbung mit Ponceau-S-Lösung überprüft. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran 30 Minuten in Blockierungs-Puffer (5% (w/v) BSA; 0,1% Tween 20 in PBS) inkubiert. Die Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers in Blockierungs-Puffer erfolgte über Nacht bei 4°C in der entsprechenden Verdünnung (1:1000 anti-phospho-JNK1,2; 1:1000 anti-JNK1; 1:1000 anti-JNK2; 1:1000 anti-ERK1,2; 1:1000 anti-phospho-p38; 1:1000 anti-p38; 1:500 anti-JunB; 1:500 anti-PEBP2β; 1:2000 anti-Aktin). Im Anschluss wurde die Membran mit Waschpuffer (0,1% Tween 20 in PBS) jeweils dreimal für 10 Minuten gewaschen und mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist, ebenfalls in Blockierungs-Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (1:2500 anti-Kaninchen; 1:2500 anti-Ziege; 1:2000 anti-Maus). Zum Schluss wurde die Membran mit Waschpuffer erneut dreimal für 10 Minuten gewaschen. Die Membran wurde auf der Proteinoberseite mit 2 ml einer frisch zubereiteten 1:1-Mischung der beiden ECL-Detektlösungen für etwa 1 Minuten bedeckt. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgetropft und die Membran, geschützt durch eine Frischhaltefolie, in eine Filmkassette gelegt. Die Exposition des Films richtete sich nach der jeweiligen Signalintensität.

#### **2.2.3.5 Bestimmung der Luziferaseaktivität**

Die Zellen einer Zellkulturschale (35 mm) wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 200 µl Extraktionspuffer (100 mM Kaliumphosphat pH 7,6; 0,2% Triton-X-

100; 1 mM DTT) auf Eis geerntet und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten auf Eis lysiert. Die Zelltrümmer wurden bei 10000 x g und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand mit den zellulären Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die Messung der Luziferaseaktivität eingesetzt.

Für die Bestimmung der Luziferaseaktivität der Reporterkonstrukte wurde das "Dual Luziferase Kit" der Firma Promega verwendet. Hierbei wurden 50 µl LARII Puffer ("Luziferase aktivierendes Reagenz") mit 10 µl Zelllysat versetzt und im Luminometer die Aktivität der *Photinus*-Luziferase bestimmt. Anschließend wurden dem Gemisch 50 µl "Stop and Glow" Puffer zugefügt. Durch diesen Puffer wurde die Reaktion der *Photinus*-Luziferase abgestoppt und zusätzlich die *Renilla*-Luziferase aktiviert. Die Aktivität der *Renilla*-Luziferase wurde durch eine erneute Messung im Luminometer bestimmt.

## **2.2.4 Histologische Methoden**

### **2.2.4.1 Fixierung von Gewebe und Einbettung in Paraffin**

Die Milzen von 12 Wochen alten Mäusen wurden nach der Präparation über Nacht bei 4°C mit 4% Paraformaldehyd pH 7,2 fixiert und am nächsten Tag bei 4°C für 30 Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurden die Präparate 30 Minuten in einer 0,85%igen NaCl-Lösung bei 4°C und anschließend zweimal 15 Minuten in 0,85% NaCl/Ethanol (1:1) bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 15 Minuten und schließlich 30 Minuten in 70% Ethanol/PBS bei Raumtemperatur. Das Gewebe wurde weiterhin durch 85% und 95% Ethanol/PBS für jeweils 30 Minuten entwässert und dann dreimal in 100% Ethanol für jeweils 1 Std. gegeben. Nach zweimaliger Inkubation in Xylol für 30 Minuten und einer Inkubation in Xylol über Nacht wurde das Material für die Einbettung in ein Paraffin/Xylol (1:1)-Gemisch überführt und 1 Stunde bei 56°C inkubiert. Schließlich wurden die Präparate mit Hilfe des Einbettungsgerätes "Tissue Tek TES" in ein Bad mit flüssigem Paraffin gegeben. Aus dem Bad entnommen wurden die Präparate in Plastik-Kassetten mit Paraffin eingegossen und bei 4°C gelagert.

### **2.2.4.2 Anfertigung von Paraffingewebeschnitten**

Mit Hilfe des Weichschnittmikrotoms RM 2155 wurden von den Paraffinblöcken 6 µm Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht und im 42°C-Wasserbad geglättet. Diese wurden danach zum Trocknen der Schnitte über Nacht bei 42°C inkubiert.



### 2.2.4.3 Immunhistochemie (IHC)

Zunächst wurden die Gewebeschnitte zweimal in Xylol inkubiert und dann durch eine absteigende Ethanolreihe mit jeweils 100%, 95%, 90%, 80% und 70% Ethanol für je 2 Minuten rehydratisiert. Nach dem Waschen der Präparate für 5 Minuten in PBS wurden die Schnitte für 1 Std. bei 65°C inkubiert und wiederum 5 Minuten mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Die Objekte auf den Schnitten wurden mit einem Fettstift umrandet und für 10–12 Minuten mit 0,1% Trypsin/PBS behandelt, das anschließend wieder durch Inkubation für 5 Minuten mit 0,1 µg/ml Trypsin-Inhibitor/PBS inaktiviert wurde. Zur Blockierung endogener Peroxidaseaktivität wurden die Gewebeschnitte 10 Minuten mit frisch hergestelltem 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ddH<sub>2</sub>O bedeckt und im Anschluss daran zweimal mit PBS für jeweils 2 Minuten gewaschen. Für die folgenden Schritte wurden die Komponenten des "Vectastain ABC Kits" verwendet. Um unspezifische Bindungskapazitäten abzusättigen, wurden die Präparate mit Blockierungslösung (bestehend aus einer Verdünnung des Serums der Spezies, aus der der 2. Antikörper gewonnen wurde, in 1% BSA/PBS) für 30 Minuten inkubiert. Der Primärantikörper wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur in der Blockierungslösung in der entsprechenden Konzentration (1:100 bzw. 1:300 anti-PEBP2β) eingesetzt, wobei in einem Kontrollansatz kein Primärantikörper zu der Blockierungslösung gegeben wurde. Es folgten drei Waschschrte für 3 Minuten in PBS. Der entsprechende biotinylierte Sekundärantikörper (anti-Ziege aus Pferd) wurde in einer 1:200 Verdünnung in der Blockierungslösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf den Präparaten inkubiert. Zur Verstärkung des Signals wurden die Präparate für 30 Minuten mit ABC-Reagenz (5 ml Blocklösung; 2 Tropfen Reagenz A; 2 Tropfen Reagenz B), welche 30 Minuten vor dem Auftragen vorbereitet werden musste, inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte dreimal für jeweils 3 Minuten in PBS gewaschen. Für die Substratreaktion wurden die Präparate mit DAB (Diaminobenzidin)-Lösung (DAB Substrat Kit: 5 ml dH<sub>2</sub>O; 2 Tropfen Pufferkonzentratlösung; 4 Tropfen DAB-Konzentratlösung; 2 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung) lichtgeschützt angefärbt. Die Färbereaktion wurde durch Überführen der Schnitte in dH<sub>2</sub>O abgebrochen. Im Anschluss an die DAB-Färbung erfolgte eine Gegenfärbung mit 0,1% Hämatoxylin für 5 Minuten bzw. mit 0,5%iger Eosin-Lösung für 20 Sekunden. Überschüssiges Hämatoxylin bzw. Eosin wurde für 10 Minuten mit dH<sub>2</sub>O ausgewaschen und die Objekte mit Mowiol eingedeckt.

### 2.2.4.4 Immunfluoreszenz auf kultivierten Zellen

Die zu analysierenden Zellen wurden auf Deckgläschen in Zellkulturschalen kultiviert, zweimal mit PBS gespült und dann mit 2% PFA/PBS für 20 Minuten fixiert. Anschließend

wurden die Zellen dreimal kurz mit PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen sowie zur Membranperforierung erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten in der Blockierungslösung (0,5% BSA/0,2% Triton-X-100 in PBS). Nach einem kurzen Waschschrift in 0,2% Tween 20/PBS wurde der Primärantikörper in der Blockierungslösung entsprechend verdünnt (1:100 anti-p65) und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert. Im Anschluss daran wurde dreimal für 3 Minuten mit PBS gewaschen. Der Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper wurde ebenfalls in der entsprechenden Verdünnung in Blockierungslösung (1:200 anti-Kaninchen, Cy3) vorbereitet und zusammen mit 1 µg/ml Bisbenzimid H33342 Fluorochrom zur Gegenfärbung der Zellkerne auf die Zellen pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation wurde dreimal für 3 Minuten mit PBS gewaschen und die Deckgläschen auf Objektträgern mit Mowiol eingedeckt.

## 2.2.5 Zellkulturmethoden

### 2.2.5.1 Kulturbedingungen

Sämtliche Arbeitsgänge wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt. Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> inkubiert.

junB wt und junB<sup>-/-</sup> sowie HIF-1α wt und HIF-1α<sup>-/-</sup> Fibroblasten wurden routinemäßig in DMEM mit 10% FCS und 2 mM L-Glutamin in Zellkulturschalen kultiviert.

NFκB wt und ΔN+ Fibroblasten (NFκB Super Repressor Zellen) wurden routinemäßig in DMEM mit 15% FCS, 2 mM L-Glutamin, 10 U Penicillin, 10 µg Streptomycin und 1x MEM-Nicht-essentiellen-Aminosäuren in Zellkulturschalen kultiviert.

F9 Zellen wurden in 1:1 DMEM/Ham's F12 Medium mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin und 5µM β-Mercaptoethanol kultiviert.

junB<sup>+/-</sup> und junB<sup>-/-</sup> Endothelioma-Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 10 Einheiten Penicillin, 10µg Streptomycin, 1x Natriumpyruvat-Lösung und 1x MEM-Nicht-essentiellen-Aminosäuren und 0,1mM β-Mercaptoethanol in Zellkulturschalen kultiviert, welche vorher mit 1% Gelatine beschichtet worden waren.

Phoenix-Zellen wurden routinemäßig in DMEM mit 10% FCS und 2mM L-Glutamin in Zellkulturschalen kultiviert.

### 2.2.5.2 Passagieren von Zellen

Zellen wurden passagiert, wenn sie eine Konfluenz von etwa 80% erreicht hatten. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Dann

wurden die Zellen, mit Ausnahme von F9 Zellen, mit 1 ml 0,25% Trypsin/EDTA überschichtet und bis zum beginnenden Ablösen bei 37°C inkubiert. F9 Zellen wurden mit 1 ml 0,05% Trypsin/EDTA abgelöst. Durch Zugabe von Medium mit 10% FCS wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (1000 upm; 3 Minuten) sedimentiert und nach Absaugen des Überstands in einem entsprechenden Volumen an Medium resuspendiert und die Zellzahl mit dem Zellzählgerät "Coulter Counter" in einer Verdünnung von 1:200 bestimmt. Danach wurden die Zellen in der gewünschten Zellzahl ausgesät.

### **2.2.5.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden durch Trypsinieren geerntet und gezählt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 3 Minuten bei 1000 upm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellsediment mit ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Einfriermedium (Medium; 10% FCS; 10% DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen transferiert. Die Zellen wurden anschließend für 1,5 Stunden auf Eis inkubiert und dann bei -80°C gelagert. Die langfristige Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Einfrierröhrchen zügig auf 37°C erwärmt bis die Flüssigkeit mit einem restlichen Eiskern in ein Falcon-Röhrchen mit 10 ml vorgewärmtem Vollmedium überführt werden konnte. Nach Zentrifugation (1000 upm; 3 Minuten) wurden die Zellen in Vollmedium aufgenommen und in eine Kulturschale transferiert.

### **2.2.5.4 Mykoplasmen-Test**

Um eine Kontamination der verwendeten Zelllinien mit Mykoplasmen auszuschließen, wurden in regelmäßigen Abständen Kontrollen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen alle zwei Monate durch eine Färbung mit Bisbenzimid H33342 Fluorochrom überprüft. Nachdem sich die Zellen mindestens eine Woche in Abwesenheit von Antibiotika in Kultur befanden, wurden sie auf Deckgläschen ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 10 Minuten in Methanol fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte das Anfärben mit 1 µg/ml Bisbenzimid H33342 Fluorochrom (1:1000 in PBS verdünnt) für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Zum Schluss wurden die Zellen dreimal in PBS überführt und mit Mowiol eingedeckt. Mykoplasmen-freie Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop durch einen klar abgegrenzten Kern ohne Punktmuster, welches im Falle einer Kontamination auftritt und die DNA der Bakterien widerspiegelt, identifiziert. Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden ausschließlich Kulturen ohne Mykoplasmen eingesetzt.

### 2.2.5.5 Induktion von Hypoxie

Für die Northern Blot und Western Blot-Analysen wurden pro Zelllinie und Zeitwert  $1,5 \times 10^6$  Fibroblasten in 20 ml Medium in einer 15 cm Zellkulturschale ausplattiert und über Nacht adhärent wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen unter Serumentzug (0,5% FCS) kultiviert und nach 24 Stunden für die jeweiligen Zeitwerte in einem Brutschrank mit hypoxischen Bedingungen inkubiert. Hypoxische Bedingungen wurden dadurch erreicht, dass im Brutschrank (Binder CB mit  $N_2$ -Zufluss) der atmosphärische Sauerstoffgehalt von 20% durch zusätzliche Stickstoffbegasung auf 1,0 bis 1,5% reduziert wurde.

Endothelioma-Zellen wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen in 20 ml Medium auf einer mit 1% Gelatine beschichteten 15 cm Zellkulturschale ausgesät und über Nacht adhärent wachsen gelassen. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen für die jeweiligen Zeitwerte im Hypoxie-Brutschrank kultiviert.

### 2.2.5.6 Kalzium-Phosphat-Transfektion

$1,5 \times 10^5$  Zellen wurden in 2 ml Medium in 35 mm Zellkulturschalen ausplattiert und über Nacht adhärent wachsen gelassen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit einem DNA-Gemisch aus insgesamt 2  $\mu$ g Plasmid-DNA transfiziert. Das DNA-Gemisch setzte sich aus 1  $\mu$ g Reporterplasmid-DNA (CBF $\beta$  prom tata luc- bzw. *junB*-Reporterkonstrukte), 0,5  $\mu$ g der jeweiligen kotransfizierten Expressionsplasmide (RSV-*junB*, RSV-*c-fos*, RSV-ATF2 bzw. pcDNA-p65 oder leere Expressionsvektoren) und 0,05  $\mu$ g des Normalisierungsplasmids (CMV-Renilla) zusammen. Die DNA-Menge wurde mit leeren Expressionsplasmiden (RSV-0 bzw. pcDNA3.1) auf eine Gesamtmenge von 2  $\mu$ g DNA und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 90  $\mu$ l aufgefüllt. Diese DNA-Lösung wurde mit 10  $\mu$ l 2,5 M CaCl<sub>2</sub> versetzt und dann tropfenweise unter Schütteln zu 100  $\mu$ l 2xHBS-Puffer (50 mM Hepes, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,05) zugegeben. Anschließend wurde das Gemisch für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit sich ein Kalzium-Phosphat-Präzipitat bilden konnte. Dieses Präzipitat wurde anschließend vorsichtig auf die Zellen gegeben. Das Präzipitat wurde nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C durch Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit frischem Medium versorgt. Nach weiteren 16 Stunden wurden die Zellen in 200  $\mu$ l Extraktionspuffer geerntet. Das Lysat wurde schließlich zur Bestimmung der Reporteraktivität verwendet.

### 2.2.5.7 Retrovirale Infektion von Endothelioma-Zellen

An Tag 1 wurden  $4 \times 10^6$  ekotrophe Phoenix Zellen in 10 ml Medium auf einer 10 cm Zellkulturschale ausplattiert und über Nacht adhärent wachsen gelassen. Am nächsten

Morgen (Tag 2) wurde das Medium mit 4 ml 25  $\mu$ M Chloroquin enthaltendem Medium ersetzt. Die Zellen wurden mit 28  $\mu$ g Plasmid-DNA (pMXpie; pMXpie-CBF $\beta$ ; pMXpie-JunB) nach der Kalzium-Phosphat Methode transfiziert. Sechs Stunden nach der Transfektion wurde das Präzipitat von den Zellen gewaschen und die Zellen in DMEM mit 10% FCS und 2 mM L-Glutamin in 37°C inkubiert. An Tag 3 wurden  $8 \times 10^4$  Endothelioma-Zellen in 500  $\mu$ l Medium in 24-well Platten (mit 1% Gelatine beschichtet) ausgesät. An Tag 4 wurde der virushaltige Überstand der Phoenix-Zellen geerntet und durch einen Filtrationsschritt mit einem 0,45  $\mu$ m Filter von Zellen oder Zellresten getrennt. Dem viralen Überstand wurde Polybren in einer Endkonzentration von 8  $\mu$ g/ml zugesetzt und dieser auf die Endothelioma-Zellen gegeben. Die Zellen wurden 3 Stunden bei 2000 upm bei Raumtemperatur zentrifugiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag (Tag 5) wurde das Medium erneuert und an Tag 8 wurden die Zellen 1:4 auf 6-well Platten expandiert. An Tag 9 wurden die Zellen unter Puromycin (3  $\mu$ g/ml) selektioniert. Nach 8 Tagen Puromycin-Selektion wurden die Zellen im per FACS ("Fluorescence Activated Cell Sorter"; FACScan/FACSCalibur der Firma Becton Dickinson, Heidelberg) auf Expression von EGFP überprüft.

#### **2.2.5.8 *in vitro* Angiogenese Studie (Röhrenbildung im Matrigel)**

Das Matrigel (Matrigel™ Basement Membrane Matrix; BD Biosciences, USA) wurde langsam auf Eis in 4°C auftauen gelassen und dann mit dem gleichen Volumen an eiskaltem DMEM versetzt. Es wurden jeweils 150  $\mu$ l der Matrigel:DMEM-Mischung in 48-well Platten vorgelegt und für eine Stunde in 37°C inkubiert, damit sich das Matrigel verfestigt. Die Endothelioma-Zellen wurden abtrypsiniert und in einer Konzentration von  $3,5 \times 10^4$  Zellen/250  $\mu$ l DMEM mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 10 Einheiten Penicillin, 10  $\mu$ g Streptomycin und 1x MEM-Nicht-essentiellen-Aminosäuren und 0,1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol auf dem Matrigel ausgesät und in 37°C inkubiert. Nach vier Stunden wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop photographiert und der Grad der vaskulären Organisation bestimmt.

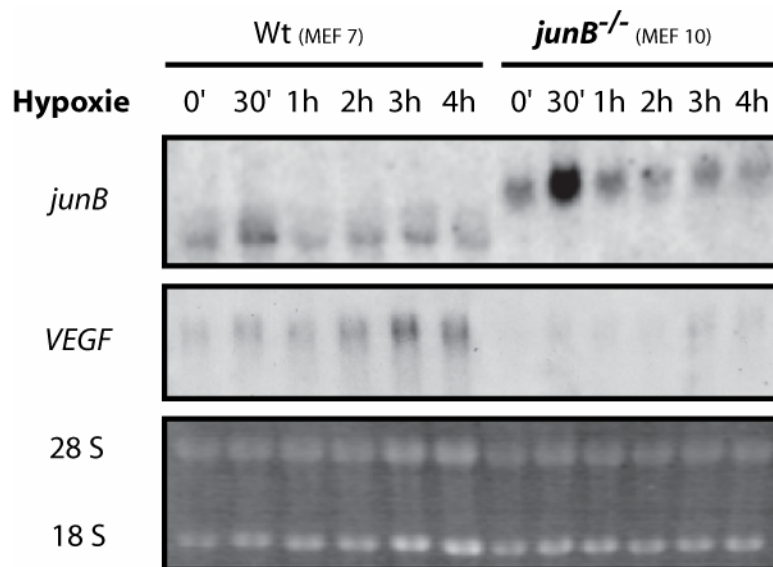
## 3 Ergebnisse

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Regulation von JunB unter hypoxischen Bedingungen sowie die Aufklärung der Mechanismen, die für eine solche Aktivierung verantwortlich sind. Weiterhin sollen Gene identifiziert werden, die in der zellulären Hypoxieantwort durch JunB reguliert werden und an Prozessen der Blutgefäßbildung beteiligt sind.

### 3.1 Regulation von JunB unter hypoxischen Bedingungen

#### 3.1.1 Hypoxie induziert die Transkription von *junB* in Fibroblasten

Zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation von *junB* wurden Wildtyp- und JunB-defiziente Fibroblasten (Andrecht et al., 2002) 0,5, 1, 2, 3 und 4 Stunden unter verminderter Sauerstoffkonzentration (1,5% O<sub>2</sub>) inkubiert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, die RNA extrahiert und die Expression von *junB* und *VEGF* mittels Northern-Blot Methode analysiert. *VEGF* diente als Positivkontrolle für das Auslösen der zellulären Hypoxieantwort. Die Expressionsstudien zeigen, dass die Inkubation unter hypoxischen Bedingungen bereits nach 30 Minuten zu gesteigerten *junB*-mRNA Mengen führt, welche zu den späteren Zeitpunkten wieder abnimmt (Abb. 3). Die eingesetzte spezifische Sonde für *junB* erkennt neben dem Wildtyp-Transkript auch das Transkript des Fusionskonstruktes aus *junB* und dem Gen für die Neomycinresistenz (*junB-neo*), welches für die Generierung von Mausembryonen mit inaktivem JunB-Protein verwendet wurde (Schorpp-Kistner et al., 1999). Die für die Transkription relevanten regulatorischen Regionen des Promotors und der 3'-flankierenden Region von *junB* sind auf diesem *junB-neo*-Konstrukt noch vorhanden, das ebenfalls eine maximale Induktion nach 30 Minuten aufweist. Somit ist JunB für die Induktion seines eigenen Gens nicht essentiell. Die Expression von *VEGF* steigt in hypoxischen Wildtyp-Zellen nach 2 Stunden an und erreicht nach 3 Stunden seine maximale Induktion. Im Gegensatz dazu bleibt die *VEGF*-Transkription in *junB*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten nahezu vollständig aus (Abb. 3). Folglich werden in Wildtyp-Fibroblasten sowohl *junB* als auch *VEGF* durch Hypoxie induziert. Das Fehlen von JunB führt zu einer stark verminderten Expression von *VEGF*, jedoch nicht zu einer verminderten Aktivität des *junB*-Promotors.



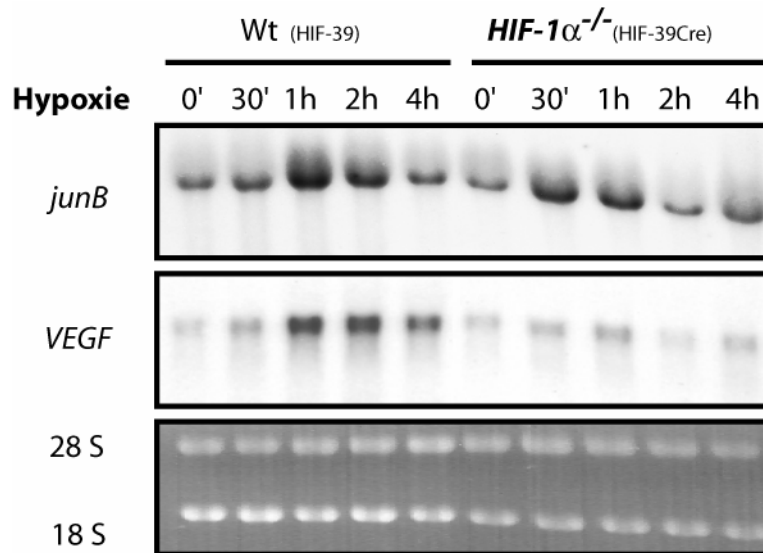
**Abb. 3: *junB* und *VEGF* mRNA wird durch Hypoxie induziert. Das Fehlen von JunB führt zu stark verminderter *VEGF*-Expression.** Wildtyp (MEF 7) und JunB-defiziente (MEF 10) Fibroblasten wurden unter hypoxischen Bedingungen (1,5% O<sub>2</sub>) kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Zur Northern Blot Analyse wurden 25µg Gesamt-RNA eingesetzt und spezifische Sonden für *junB* (+243/+999) und *VEGF* (+137/+784) verwendet. Als Kontrolle für Menge und Qualität der eingesetzten RNA diente die Ethidiumbromid-gefärbte RNA.

### 3.1.2 Hypoxie-induzierte *junB*-Transkription ist unabhängig von HIF-1α

Als zelluläre Antwort auf hypoxischen Stress wird eine Vielzahl von Signalwegen angeschaltet, die zu der Aktivierung verschiedener molekularer Mechanismen auf transkriptioneller und posttranslationaler Ebene führen (Harris, 2002), wobei HIF als transkriptioneller Hauptregulator für die Induktion Hypoxie-regulierter Gene angesehen wird (Semenza, 2003).

Um aufzuklären, ob HIF für die gesteigerte Transkription von *junB* in hypoxischen Fibroblasten verantwortlich ist, wurde die Expression von *junB* in hypoxischen Wildtyp- und HIF-1α-defizienten Fibroblasten (Ryan et al., 2000) analysiert. Die Kultivierung unter vermindertem Sauerstoffdruck führt in beiden Zelllinien zu einer gesteigerten *junB*-Transkription, die im Wildtyp nach 1h und in den HIF-1α<sup>-/-</sup>-Fibroblasten nach 30 Minuten ihren Maximalwert erreicht. In HIF-1α-Mutanten wird *junB* annähernd so stark induziert wie in Wildtyp-Fibroblasten, wodurch geschlossen werden kann, dass die *junB*-Induktion nicht über HIF-1α verläuft (Abb. 4). Die *VEGF*-mRNA erreicht im Wildtyp nach 1 bis 2 Stunden

ein Maximum. Obwohl die Gesamtmenge an *VEGF*-mRNA in HIF-1 $\alpha$ -defizienten Fibroblasten stark reduziert ist, ist sie dennoch in abgeschwächtem Ausmaß induziert. Demnach muss außer dem Transkriptionsfaktor HIF noch ein weiterer Faktor, aufgrund der Daten dieser Arbeit sehr wahrscheinlich JunB, existieren, der für die beobachtete Restaktivierbarkeit verantwortlich ist.



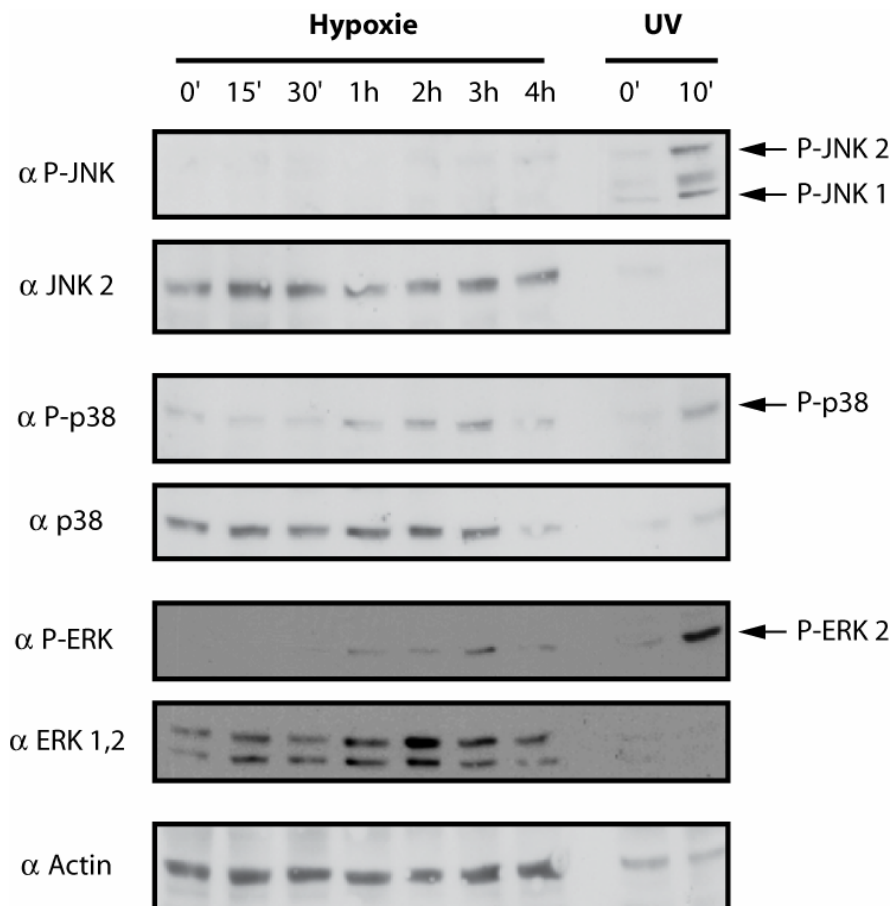
**Abb. 4: Im Gegensatz zu *VEGF* ist die *junB*-Induktion nach Hypoxie unabhängig von HIF-1 $\alpha$ .** Wildtyp- (HIF-39) und HIF-1 $\alpha$ -defiziente (HIF-39;Cre) Fibroblasten wurden unter hypoxischen Bedingungen inkubiert (1,5% O<sub>2</sub>) und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. 25 $\mu$ g Gesamt-RNA wurden für die Northern-Blot Analyse eingesetzt. Die Nitrozellulosemembran wurde mit spezifischen Sonden für *junB* (+243/+999) und *VEGF* (+137/+784) hybridisiert, die Ethidiumbromid-gefärbte RNA diente als Ladekontrolle für Gesamt-RNA Mengen sowie RNA-Qualität.

### 3.1.3 MAP-Kinasen sind nicht an der Hypoxie-induzierten *junB*-Transkription beteiligt

Eine genauere Analyse der regulatorischen Sequenzen des *junB*-Gens lässt vermuten, dass seine Transkription über eine Vielzahl regulatorischer Elemente im 5' und 3' flankierenden Bereich der kodierenden Sequenz aktiviert werden kann (Abb. 2). So finden sich in beiden Abschnitten Serum Responsive Elemente (SRE), die nach Serumstimulation den Ternary Complex Factor (TCF) rekrutieren können (Kitabayashi et al., 1993; Perez-Albuerne et al., 1993). Weiterhin enthält der *junB*-Promotor Erkennungssequenzen für Ets-Transkriptionsfaktoren (Nakajima et al., 1993; Coffey et al., 1994). Die CRE-ähnliche Bindestellen im *junB*-Promotor sowie in der 3'UTR können von Mitgliedern der AP-1-



Familie wie z.B. ATF gebunden werden (Nakajima et al., 1993; Perez-Albuerne et al., 1993). Bei der Aktivierung von TCF, Ets und ATF spielen die MAP-Kinasen eine wichtige Rolle (Coffer et al., 1994; Kyriakis und Avruch, 2001; Chen et al., 2005). Die Tatsache, dass Hypoxie-Stress sowohl den ERK-, als auch den JNK- und den p38-Signalweg in unterschiedlichen Zelltypen aktiviert (Haddad, 2004), deutet darauf hin, dass diese Kinasen auch an der Induktion von *junB* in Fibroblasten beteiligt sein könnten.



**Abb. 5: Die MAP-Kinasen p38 und ERK-2, nicht aber JNK werden in Hypoxie-behandelten Fibroblasten aktiviert.** Wildtyp-Fibroblasten (MEF 7) wurden bei einer Sauerstoffkonzentration von 1,5% inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Es wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt, die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Western Blot Analysen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen die phosphorylierten und somit aktivierten Formen von JNK, p38 und ERK durchgeführt. Proteinextrakte UV-behandelter Fibroblasten dienten als Positivkontrolle für die phosphospezifischen Antikörper. Antikörper, die sowohl die inaktiven als auch phosphorylierten Formen der Kinasen erkennen, dienten zur Überprüfung von Schwankungen der Kinase-Expression durch die Hypoxie-Behandlung.  $\beta$ -Aktin diente als interne Kontrolle für Qualität und Quantität der Proteinextrakte.

Um der Frage nachzugehen, ob bzw. welche der MAPK-Signalwege unter hypoxischen Bedingungen in den murinen Fibroblasten aktiviert werden und somit an der gesteigerten *junB*-Transkription beteiligt sein könnten, wurden Gesamtproteinextrakte von hypoxischen Wildtyp-Fibroblasten mittels Western Blot analysiert. Hierbei sollten die phosphorylierten und somit aktivierten Formen der jeweiligen Kinasen mittels phosphospezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Da MAP-Kinasen sehr stark nach UV-Behandlung aktiviert werden, dienten Proteinextrakte von UV-behandelten Fibroblasten als Positivkontrolle für die verwendeten phosphospezifischen Antikörper.

Während für JNK-1 und -2 zu keinem Zeitpunkt unter hypoxischen Bedingungen eine Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte, stieg die Menge an phosphoryliertem p38 kontinuierlich bis zu einer maximalen Aktivierung bei 3 Stunden an (Abb. 5). Ein ähnliches jedoch deutlich schwächeres Aktivierungsprofil zeigte ERK-2 (Abb. 5). Die Expression der Kinasen selbst war durch andauernde Hypoxie-Inkubation für JNK und p38 unbeeinflusst, während die Menge an ERK -1 und -2 Protein bis zu einem Maximum bei 2 Stunden anstieg (Abb. 5).

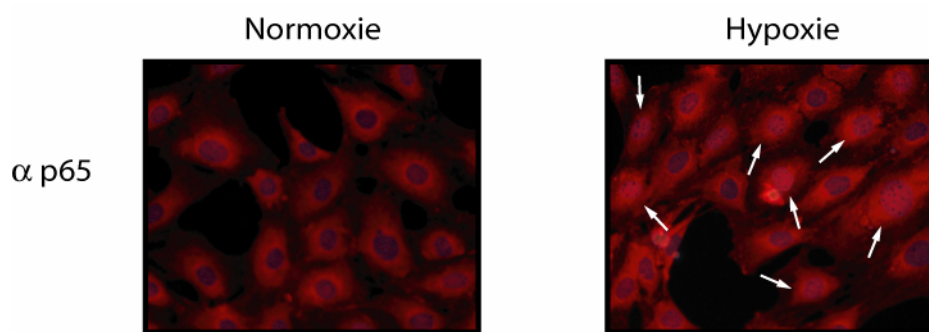
Da unter hypoxischen Bedingungen die transkriptionelle Induktion von *junB* bereits sehr früh erfolgt (Abb. 3), kann eine Beteiligung der MAPK-Signalwege aufgrund deren späten (p38 und ERK) bzw. ausbleibenden Aktivierung (JNK) für die Regulation der *junB*-Transkription ausgeschlossen werden (Abb. 5).

### **3.1.4 NFκB vermittelt die Hypoxie-induzierte Transkription von *junB***

Da sowohl HIF-1 $\alpha$  als auch die MAP-Kinasen als Vermittler für die Hypoxie-abhängige Aktivierung von *junB* ausgeschlossen werden können, muss ein alternativer Mechanismus zu einer erhöhten *junB*-Expression führen. Ein weiterer Signalweg, dessen Aktivierung eine gesteigerte Transkription von Zielgenen nach sich zieht, ist der NFκB-Signalweg. Verschiedene Aspekte weisen auf NFκB als potentiellen Faktor in der Hypoxie-abhängigen *junB*-Regulation hin. Zum einen resultierte die Aktivierung des NFκB-Signalweges durch Hypoxie in unterschiedlichen Zelltypen in einer erhöhten Expression von NFκB-Zielgenen (Koong et al., 1994a; Schmedtje et al., 1997; Figueroa et al., 2002; Zampetaki et al., 2004); zum anderen konnten durch Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation einer murinen Makrophagenzelllinie funktionelle Bindestellen für NFκB in der 3' flankierenden Region von *junB* identifiziert werden (Frazier-Jessen et al., 2002).

Im inaktiven Zustand wird NF $\kappa$ B im Zytoplasma von seinem Inhibitor I $\kappa$ B gebunden, wodurch seine Translokation in den Zellkern verhindert wird. Durch eine Reihe extrazellulärer Stimuli wird I $\kappa$ B phosphoryliert und dissoziiert von NF $\kappa$ B. Freigesetztes NF $\kappa$ B kann nun in den Nukleus translozieren, wo es durch Bindung an spezifische  $\kappa$ B-Erkennungssequenzen die Transkription von Zielgenen vermittelt (Hayden und Ghosh, 2004).

Transkriptionell aktiviertes NF $\kappa$ B findet sich nach erfolgter Translokation nur im Zellkern. Zum Nachweis der Translokation von NF $\kappa$ B in den Nukleus wurden Fibroblasten unter hypoxischen Bedingungen inkubiert und die subzelluläre Lokalisation von NF $\kappa$ B mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode nachgewiesen.

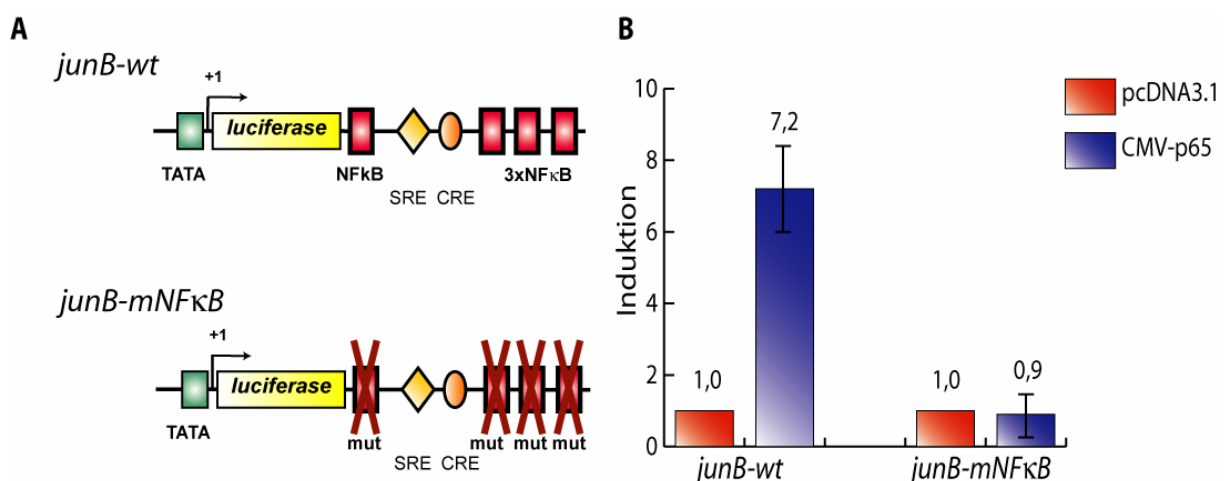


**Abb. 6: NF $\kappa$ B transloziert in den Zellkern von Hypoxie-behandelten Fibroblasten.** Wildtyp-Fibroblasten (MEF 7) wurden auf Objektträgern ausgesät und am nächsten Tag für 20 Minuten unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) oder hypoxischen (1,5% O<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden mit 4% PFA fixiert und anschließend mit einem polyklonalen  $\alpha$ -p65 Antikörper (Santa Cruz) inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy3-gekoppelter  $\alpha$ -Kaninchen-Antikörper benutzt. Die Kerne wurden mit Hoechst-Farbstoff angefärbt. Die Pfeile kennzeichnen Zellen mit nukleärem p65-Signal.

Abb. 6 zeigt, dass die NF $\kappa$ B-Untereinheit p65 unter normoxischen Bedingungen ausschließlich im Zytoplasma vorzufinden ist, wohingegen bereits nach 20 Minuten Hypoxie p65 verstärkt in den Zellkern lokalisiert. Aufgrund des Zeitpunktes der Aktivierung nach 20 Minuten kommt der NF $\kappa$ B-Signalweg als potentieller Vermittler der Hypoxie-induzierten *junB*-Transkription in Frage.

Der funktionelle Beweis dafür, dass die Bindung von NF $\kappa$ B die Transkription von *junB* regulieren kann, sollte durch Kotransfektionsanalysen mit *junB*-Reporter-Konstrukten erbracht werden, bei denen das Luziferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* mit regulatorischen Sequenzen des *junB*-Gens flankiert wurde. Das Wildtyp-*junB*-Reporterkonstrukt wurde so konzipiert, dass es im 5'-Bereich einen Abschnitt der 5'-*junB*-Sequenz (-46/+31, relativ zum Transkriptionsstart) trägt und im 3'-Bereich die stromabwärts

von *junB* gelegene Sequenz, die vier Bindestellen für NFκB enthält. Im *junB-mutNFκB*-Reporterkonstrukt ist das Luziferasegen von den gleichen Sequenzen wie im Wildtyp-Konstrukt flankiert, jedoch wurden hier die vier NFκB-Bindestellen durch gerichtete Mutagenese inaktiviert (Abb. 7 A; Björn Textor, Diplomarbeit 2004). Die Reporterkonstrukte wurden jeweils entweder mit dem Expressionsvektor für p65 unter der Kontrolle eines Zytomegalie-Virus Promotors (CMV-p65) oder mit einem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1) in F9 Zellen kotransfiziert. Für die Normalisierung der transfizierten DNA-Menge wurde zusätzlich noch das Luziferasegen der Weichkoralle *Renilla reniformis* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors kotransfiziert. Die beiden verwendeten Luziferasen besitzen unterschiedliche Substratspezifitäten, womit die Messung der spezifischen Luziferaseaktivität im gleichen Proteinextrakt durch sequentielle Zugabe der Substrate ermöglicht wird. Die relative Luziferaseaktivität errechnete sich aus dem Verhältnis zwischen der *Photinus*- und der *Renilla*-Aktivität.



**Abb. 7: Transaktivierung nach Kotransfektion mit p65. (A):** Schematische Übersicht der benutzten *junB*-Reporterkonstrukte. **(B):** F9 Zellen wurden transient mit den Reporterkonstrukten mit regulatorischen Sequenzen von des Wildtyps von *junB* (*junB-wt*) bzw. den vier mutierten NFκB-Bindestellen (*junB-mNFκB*) und dem p65-Expressionsvektor oder dem Leervektor (pcDNA3.1) kotransfiziert. Die Induktion der Reportergene ist in Relation zur Transaktivierung durch den Leervektor angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchsansätzen.

Die Kotransfektion von CMV-p65 mit dem Wildtyp-*junB*-Reporterkonstrukt führte zu einer siebenfachen Induktion der relativen Luziferaseaktivität im Vergleich zu der Kotransfektion mit dem Leervektor. Die basale Luziferaseaktivität des *junB-mutNFκB*-Reporterkonstrukts erreichte nach Kotransfektion des Leervektors vergleichbare Werte wie die des Wildtyp-Reporterkonstruktes (Abb. 7 B). Allerdings konnte diese nicht mehr durch

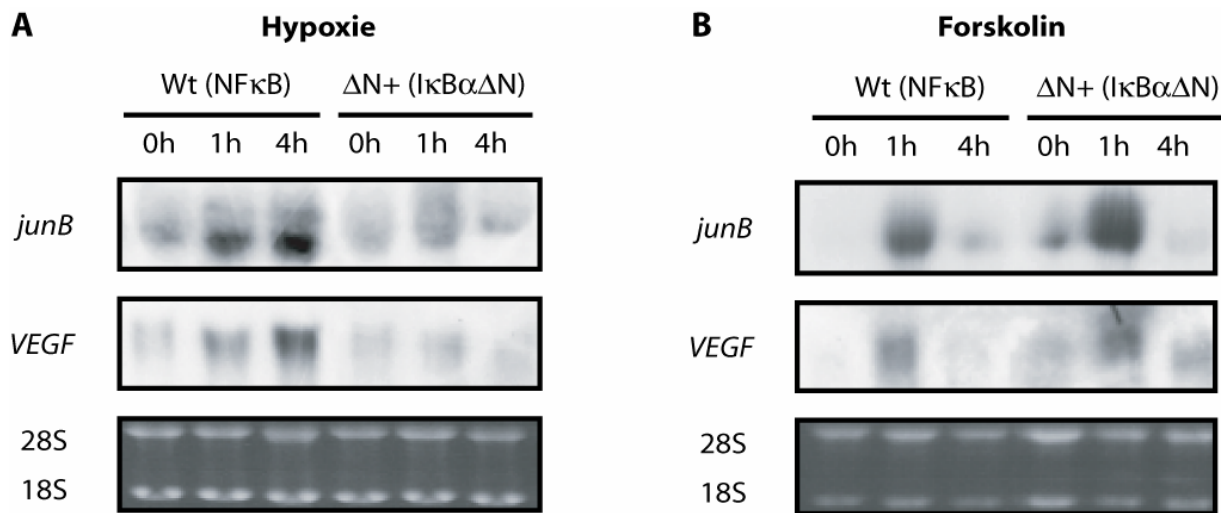
die Kotransfektion von CMV-p65 induziert werden, was zeigt, dass die NF $\kappa$ B-Bindestellen in der 3'UTR von *junB* verantwortlich für dessen Induktion sind.

Da NF $\kappa$ B zum einen durch Hypoxie aktiviert wird (Abb. 6) und zum anderen für die Induktion des Wildtyp-*junB*-Reporterkonstrukts verantwortlich ist (Abb. 7), sollte als nächstes untersucht werden, ob die NF $\kappa$ B-Bindestellen für die Aktivierung der *junB*-Reporterkonstrukte essentiell sind. Zu diesem Zweck wurde die relative Luziferaseaktivität der beiden Reporterkonstrukte in F9 Zellen, in einer murinen Fibroblastenzelllinie (C 243) und in zwei humanen Leberzelllinien (HepG2 und Hep3B) unter verschiedensten hypoxischen Bedingungen analysiert. Jedoch konnte in keiner der vier verwendeten Zelllinien eine Induktion der Reporterkonstrukte unter hypoxischen Bedingungen erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich führte die Transfektion der Zellen zu einer stark erhöhten NF $\kappa$ B-Aktivierung, so dass in Folge keine weitere Hypoxie-Induktion mehr erzielt werden konnte.

Da diese Reporterstudien keine eindeutigen Aussagen bezüglich der Rolle von NF $\kappa$ B bei der *junB*-Regulation zuließen, wurde der Einfluss von NF $\kappa$ B auf die Hypoxie-induzierte *junB*-Transkription mit Hilfe genetisch veränderten Fibroblasten untersucht, deren NF $\kappa$ B-Aktivität durch die konstitutive Expression einer nicht-phosphorylierbaren I $\kappa$ B-Mutante inhibiert ist (NF $\kappa$ B-Super-Repressor Zellen,  $\Delta$ N+; (Schmidt-Ullrich et al., 2001).

Die Expressionsstudien zeigten nach einer und nach vier Stunden Hypoxie-Exposition eine erhöhte Transkription von *junB* und *VEGF* in den Wildtyp-Fibroblasten (Abb. 8 A). Im Gegensatz dazu konnte in den NF $\kappa$ B-Super-Repressor Zellen nur noch eine stark abgeschwächte Expression von *junB* und auch *VEGF* beobachtet werden. Daraus ist zu schließen, dass NF $\kappa$ B-Aktivität für die Induktion von *junB*- und *VEGF*-mRNA notwendig ist.

Zur Kontrolle wurden die gleichen Fibroblasten mit dem Phosphodiesterasehemmer Forskolin stimuliert. Forskolin-Behandlung führt zu einem intrazellulären Anstieg des sekundären Botenstoffs zyklisches AMP (cAMP), was zu einer Induktion von *junB* führt, die nicht über NF $\kappa$ B sondern über den PKA-Signalweg verläuft (Angel und Karin, 1992; Perez-Albuerna et al., 1993). Die Forskolin-Stimulation resultierte sowohl im Wildtyp als auch in den I $\kappa$ B-Mutanten in einer Aktivierung von *junB* und *VEGF* (Abb. 8 B). Die Behandlung dieser Zellen mit TPA führte ebenfalls zu einer *junB*- und *VEGF*-Induktion (Daten nicht gezeigt). Somit kann die Transkription von *junB* in NF $\kappa$ B-Super-Repressor Zellen durch Stimuli wie Forskolin und TPA über den PKA- bzw. PCK-Signalweg, unabhängig von NF $\kappa$ B, induziert werden, wohingegen die Hypoxie-induzierte *junB*-Expression spezifisch über NF $\kappa$ B verläuft.



**Abb. 8: Die Hypoxie-vermittelte Induktion von *junB* und *VEGF* ist in Fibroblasten mit reprimierter NFκB-Aktivität stark reduziert.** Wildtyp und NFκB-Super-Repressorzellen (ΔN+) wurden (A) unter Hypoxie-Bedingungen (1,5% O<sub>2</sub>) kultiviert oder (B) mit 10μM Forskolin behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Northern Blot Analysen von 30μg Gesamt-RNA wurden mit spezifischen Sonden für *junB* (+243/+999) und *VEGF* (+137/+784) durchgeführt. Die Ethidiumbromid-gefärbte RNA diente als Ladekontrolle für Gesamt-RNA Mengen sowie RNA-Qualität.

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass die transkriptionelle Induktion von *junB* weder über HIF-1α noch über die MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 gesteuert wird, sondern über NFκB erfolgt.

### 3.2 Identifizierung neuer JunB-Zielgene in der zellulären Hypoxie-Antwort

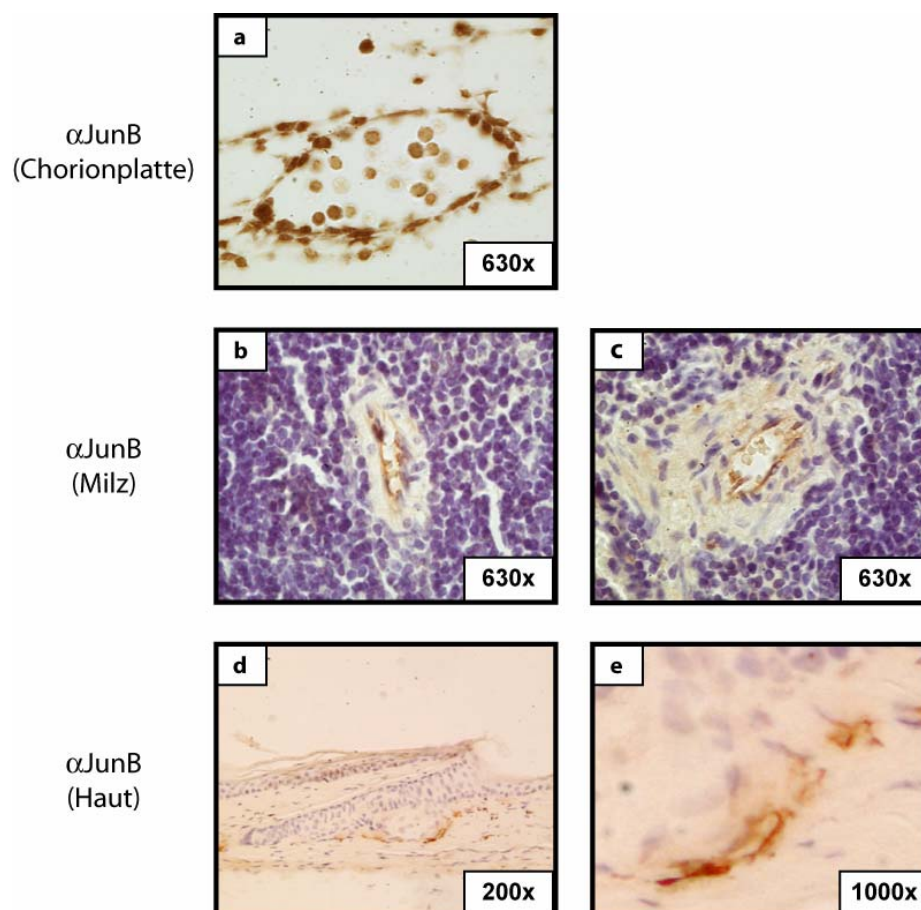
JunB spielt sowohl bei der Transkription Hypoxie-induzierbarer Gene (Norris und Millhorn, 1995; Bergman et al., 2003) als auch bei der Entwicklung des Blutgefäßsystems eine wichtige Rolle (Schorpp-Kistner et al., 1999). Endothelzellen, die das Lumen von Blutgefäßen auskleiden, aktivieren als Antwort auf hypoxischen Stress verschiedene biologische Programme wie die sprossende Angiogenese oder die Umstrukturierung bereits bestehender Gefäße und deren umliegenden Gewebe (Faller, 1999).

Wie im ersten Teil der Arbeit gezeigt, wird JunB unter hypoxischen Bedingungen induziert. Des Weiteren ist JunB an der Regulation von VEGF, einem zentralen Faktor in der Gefäßentstehung, beteiligt. Um zu untersuchen, ob JunB unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck für die Aktivierung oder Repression weiterer Zielgene verantwortlich

ist, sollte im folgenden Teil der Arbeit eine differentielle Genexpressionsanalyse (Microarray-Screen) durchgeführt werden, womit Gene identifiziert werden können, die unter hypoxischen Bedingungen in Endothelzellen eine JunB-abhängige Expression aufweisen.

### 3.2.1 Endothelzellen exprimieren JunB *in vivo*

Um zunächst zu prüfen, ob JunB in Endothelzellen exprimiert wird und dort an der Genregulation beteiligt sein kann, wurde JunB auf Proteinebene über immunhistochemische Methoden nachgewiesen. Hierzu wurden Gewebeschnitte aus der embryonalen Chorionplatte, aus adulter Milz und adulter Haut mit einem Antikörper gegen JunB angefärbt. Sowohl in embryonalem Gewebe (Chorionplatte, Abb. 9 a; Milz, Abb. 9 b,c; Haut Abb. 9 d,e) adulter Mäuse konnte eine deutliche JunB-Expression in den Endothelzellen nachgewiesen werden. Somit war die Grundvoraussetzung, nämlich dessen Expression, für eine mögliche Rolle vom JunB bei der Regulation genetischer Programme in Endothelzellen erfüllt.



**Abb. 9: Sowohl embryonale als auch adulte Endothelzellen exprimieren JunB.** Immunhistochemische Überprüfung der JunB-Expression auf Gewebeschnitten der Chorionplatte aus Mausembryonen (a), sowie der Milz (b,c) und der Haut (e,f) adulter Mäuse mittels JunB-spezifischem Antikörper (Santa Cruz).

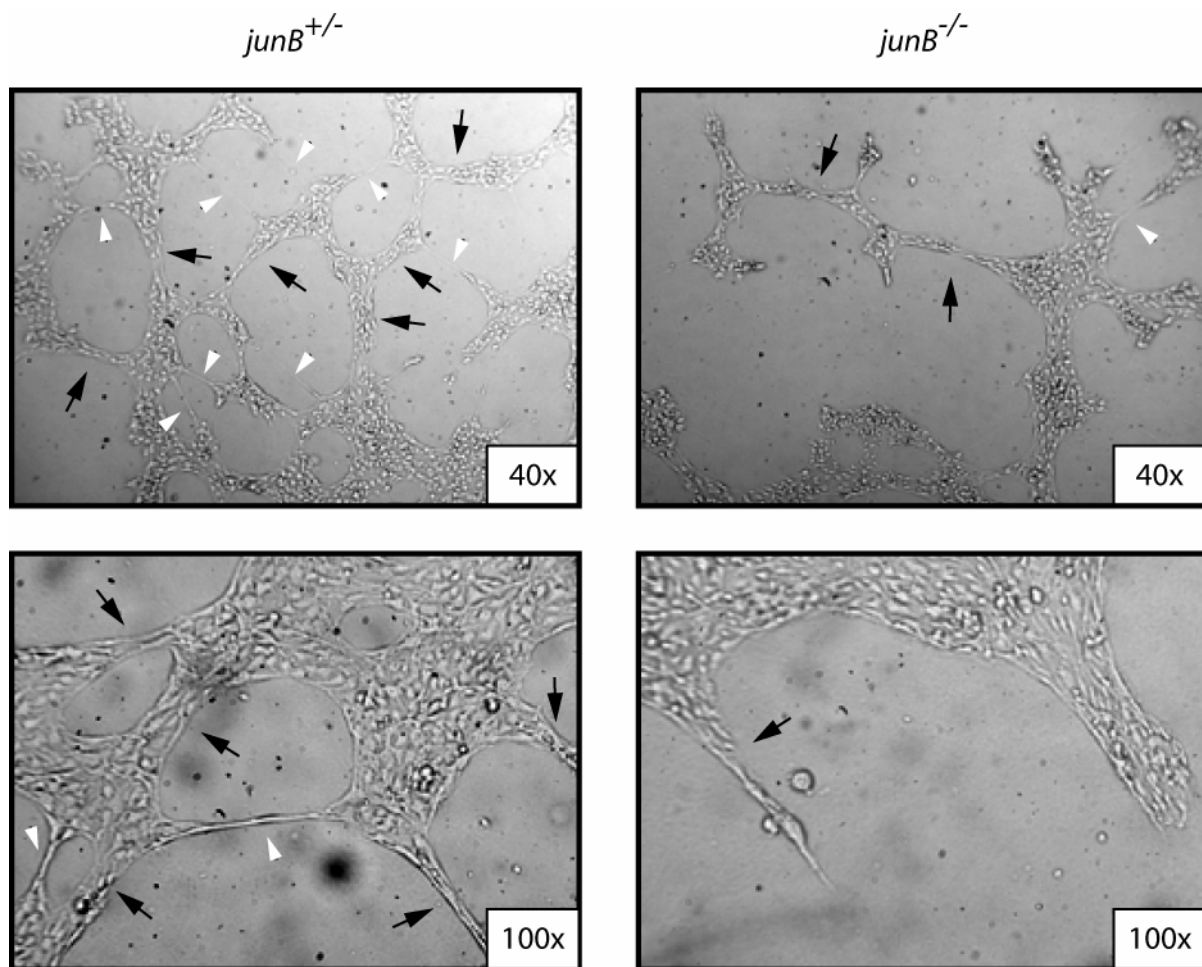
### 3.2.2 JunB-defiziente Endothelioma Zellen zeigen Angiogenese-Defekte *in vitro*

Die molekularen Mechanismen, welche die Angiogenese regulieren, können mit Hilfe verschiedener *in vivo* und *in vitro* Modelle untersucht werden. Das *in vitro* Matrigel-Angiogenese Modell beruht auf der Fähigkeit von Endothelzellen, in einem festen Gel aus Tumor-Matrixkomponenten röhrenförmige kapillarartige Strukturen auszubilden (Vailhe et al., 2001; Segura et al., 2002). Dieses Modell, welches Aspekte der *in vivo* Angiogenese nachahmt, wurde benutzt, um die in den JunB-defizienten Embryonen beobachteten Defekte der Gefäßbildung *in vitro* zu imitieren.

*junB*<sup>-/-</sup>-Embryonen sterben jedoch schon zwischen Tag 8,5 und 10 der Embryonalentwicklung (Schorpp-Kistner et al., 1999), weswegen die Isolierung ausreichender Mengen an primären JunB-defizienten Endothelzellen unmöglich ist. Aus diesem Grund wurden in unserem Labor so genannte Endothelioma-Zelllinien etabliert, die kontinuierlich wachsen und die Eigenschaften primärer Endothelzellen aufweisen (Schmidt, 2001). Hierfür wurden Endothelzellen aus *junB*-heterozygoten und *junB*<sup>-/-</sup>-Embryonen durch die Infektion des mittleren T-Antigens des murinen Polyomavirus transformiert (Kiefer et al., 1994). Da heterozygote JunB-Mäuse keinen plazentalen oder vaskulären Phänotyp aufweisen und sich nicht von Wildtyp-Mäusen unterscheiden (Schorpp-Kistner et al., 1999), dienen Endothelioma-Zellen aus heterozygoten Embryonen als Kontroll-Zelllinie für die JunB-defizienten Zellen.

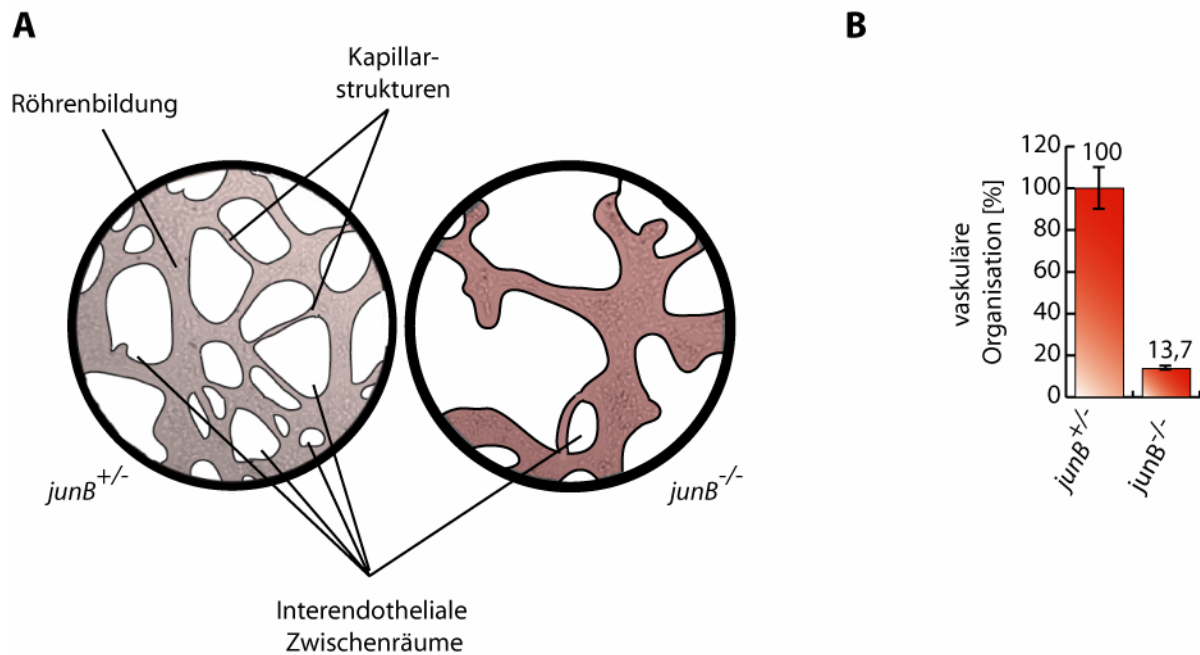
Heterozygote und JunB-defiziente Endothelioma Zellen wurden in gleicher Zellzahl auf dem soliden Matrigel ausgesät und nach vier Stunden auf ihre angiogene Aktivität hin analysiert. Während sich die Kontroll-Zellen zu einem maschenähnlichen Netz aus röhrenförmigen Strukturen organisierten, war die Netzwerkbildung in den *junB*<sup>-/-</sup>-Zellen stark vermindert (Abb. 10). Zwar bildeten JunB-defiziente Zellen noch dreidimensionale Röhrenstrukturen (schwarze Pfeile) und kapillarähnliche Auswüchse (weiße Pfeilspitzen), erreichten aber nicht die Komplexität und den Organisationsgrad, wie er bei den Kontrollzellen beobachtet werden konnte.





**Abb. 10: JunB-defiziente Endothelioma Zellen wachsen nicht zu röhrenförmigen Strukturen aus.** *In vitro* Angiogenese-Studie: Kontroll- und  $junB^{-/-}$ -Endothelioma Zellen wurden in gleicher Zellzahl auf solidem Matrigel ausgesät und nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C fotografiert.

Für die statistische Auswertung der angiogenen Aktivität wurde zunächst ein Index für die vaskuläre Organisation bestimmt. Grundlage für die Auswertung war die Beobachtung, dass je mehr röhrenförmige und kapillarartige Strukturen ausgebildet werden, desto mehr interendotheliale Zwischenräume entstehen. Interendotheliale Zwischenräume wurden als zellfreie, vollständig von Endothelzellen abgegrenzte Bereiche definiert. Je mehr solcher Bereiche entstehen, desto höher ist der Grad der vaskulären Organisation. Die interendothelialen Zwischenräume aus vier unterschiedlichen Matrigel-Angiogenese Versuchen wurden gezählt und die vaskuläre Organisation von Kontroll- und  $junB^{-/-}$ -Zellen verglichen (Abb. 11). So zeigen die JunB-defizienten Endothelioma Zellen im Vergleich zum Wildtyp eine vaskuläre Organisation von nur 13,7% (Abb. 11).



**Abb. 11: Statistische Auswertung der angiogenen Aktivität.** (A) Zellfreie, von Endothelzellen umschlossene Bereiche wurden als interendotheliale Zwischenräume definiert. (B) Interendotheliale Zwischenräume aus vier unabhängigen Matrigel-Angiogenese Versuchen wurden gezählt und somit der Grad der vaskulären Organisation bestimmt. Der Grad der vaskulären Organisation der verschiedenen Genotypen ist in Prozent dargestellt und bezieht sich jeweils auf den Wert der Kontroll-Zellen.

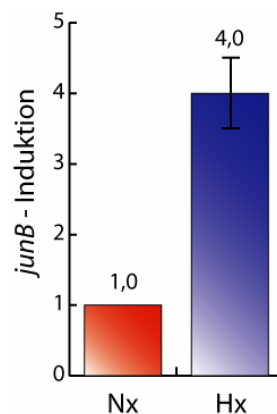
Die Ergebnisse dieses *in vitro*-Angiogenese Modells zeigen, dass JunB eine wichtige Rolle bei der intrinsischen angiogenen Aktivität von Endothelzellen spielt und dass der Verlust von JunB zu einer stark abgeschwächten Fähigkeit von Endothelzellen führt, vaskuläre Strukturen auszubilden.

### 3.2.3 Hypoxie induziert *junB*-Transkription in Endothelioma Zellen

Für die Identifizierung JunB-abhängiger Zielgene sollte die Genexpression von heterozygoten Endothelioma-Zellen mit JunB-defizienten Zellen verglichen werden. Quantitative Expressionsstudien haben gezeigt, dass nach 16 Stunden unter hypoxischen Bedingungen das Fehlen von JunB in Endothelioma-Zellen zu einer stark verminderten Induktion von *VEGF* führt (Schmidt, 2001).

Bevor das Expressionsprofil der Endothelioma-Zellen mittels DNA-Chiphybridisierung erstellt wurde, wurde zunächst bestätigt, dass *junB* ähnlich wie in Fibroblasten (Abb. 3, Abb. 4, Abb. 8) auch in diesen Zellen durch Hypoxie induziert wird. Hierzu wurde die RNA aus

normoxischen und hypoxischen Kontroll-Zellen einer quantitativen RT-PCR-Analyse unterzogen (Abb. 12).

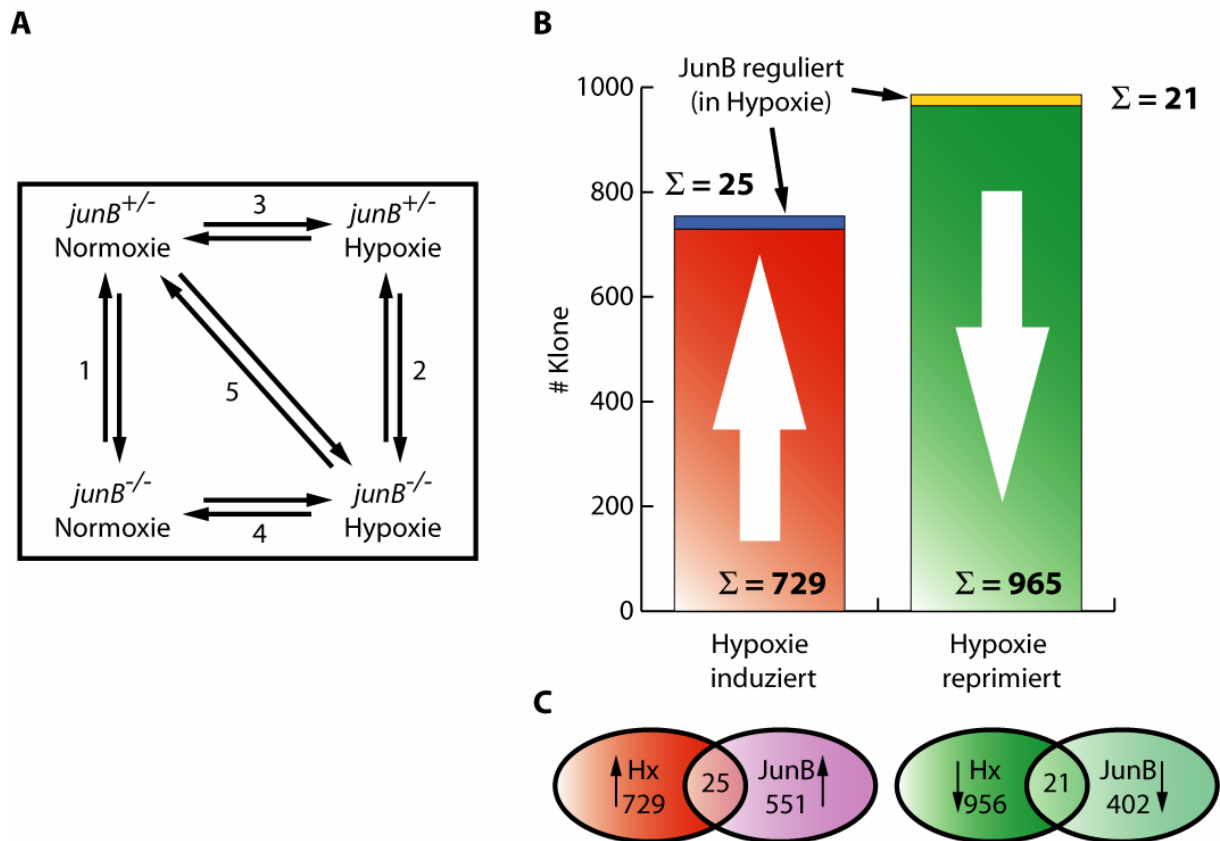


**Abb. 12: Hypoxie induziert *junB*-Expression in Endothelioma-Zellen.** Heterozygote Endothelioma-Zellen wurden für 16 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert. Gesamt-RNA wurde extrahiert und die Expression von *junB* mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Das Balkendiagramm gibt die relative Induktion der *junB*-Expression aus hypoxischen Zellen gegenüber normoxischen Zellen an. Spezifische Oligonukleotide für  $\beta$ -Tubulin wurden als interner Standard verwendet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei unterschiedlichen PCR-Reaktionen.

Die Ergebnisse aus drei unterschiedlichen PCR-Reaktionen ergaben, dass *junB* in den Endothelioma-Zellen nach 16 Stunden Hypoxie-Inkubation vierfach induziert wurde. Zu diesem Zeitpunkt weist auch *VEGF* die maximale Induktion auf (Schmidt, 2001), weswegen die Dauer der Hypoxie-Inkubation für das folgenden Microarray-Experiment auf 16 Stunden festgelegt wurde.

### 3.2.4 cDNA Microarray zur Identifikation neuer JunB-Zielgene in der zellulären Hypoxie-Antwort

Zur Identifizierung neuer JunB-Zielgene wurden heterozygote und *junB*<sup>-/-</sup>-Endothelioma-Zellen unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen inkubiert und nach 16 Stunden die Gesamt-RNA isoliert, welche unter Einbau Fluoreszenz-markierter Nukleotide in cDNA umgeschrieben wurde. Für die Hybridisierung der cDNA wurde ein DNA-Microarray Chip verwendet, der die Sequenzen der Klonkollektion des National Institute of Aging (NIA) enthielt (15K NIA-Chip). Die Klonkollektion des NIA umfasst 15.247 cDNA Sequenzen von Genen, die während der Embryonalentwicklung der Maus exprimiert werden (Ko et al., 1998; Tanaka et al., 2000). Insgesamt wurden 10 Hybridisierungen durchgeführt (Abb. 13 A).



**Abb. 13: DNA-Microarray zu Identifikation JunB-abhängiger Hypoxie-induzierter Gene.** (A) Schematische Übersicht für das experimentellen Design. Zum einen wurde in normoxischen oder hypoxischen Bedingungen die Genexpression der heterozygoten Zellen gegen die von JunB-defizienten Zellen verglichen (1 und 2). Zum anderen wurde die Transkription aus normoxischen gegen die aus hypoxischen Kontroll- bzw. JunB-defizienten Zellen verglichen (3 und 4) sowie die aus normoxischen Kontroll-Zellen gegen die aus hypoxischen *junB*<sup>-/-</sup>-Zellen (5). Alle Hybridisierungen wurden in Duplikaten unter Austausch der Fluoreszenzfarbstoffe ("colour switch") durchgeführt. (B) Durch die Auswertung der Microarray-Chip-Daten konnten 729 Klone identifiziert werden, deren Expression durch Hypoxie induziert wurde, sowie 965 Sequenzen, die unter hypoxischen Bedingungen reprimiert wurden. Durch die Bildung der Schnittmengen aus den Hypoxie-regulierten Genen mit den Genen, die unter Hypoxie eine JunB-abhängige Expression zeigten, konnten 25 Klone ermittelt werden, die in einer JunB-abhängigen Weise durch Hypoxie induziert bzw. 21 Klone, die durch JunB reprimiert wurden (C).

Für die Identifizierung JunB-regulierter Gene wurde die Transkription von heterozygoten Kontroll- mit *junB*<sup>-/-</sup>-Endothelioma-Zellen zum einen unter Normoxie-Bedingungen (1: Kontroll-Zellen/Normoxie ↔ *junB*<sup>-/-</sup>/Normoxie) und zum anderen unter Hypoxie-Bedingungen (2: Kontroll-Zellen/Hypoxie ↔ *junB*<sup>-/-</sup>/Hypoxie) verglichen. Der Effekt der Hypoxie wurde durch den Vergleich der Genexpression unter normoxischen gegenüber hypoxischen Bedingungen in Kontroll-Zellen (3: Kontroll-Zellen /Normoxie ↔ Kontroll-Zellen /Hypoxie) bzw. JunB-defizienten Endotheliomazellen (4: *junB*<sup>-/-</sup>/Normoxie

↔ *junB*<sup>-/-</sup>/Hypoxie) analysiert. Durch die Hybridisierung von cDNA aus normoxischen Kontroll-Zellen gegen cDNA aus hypoxischen *junB*<sup>-/-</sup>-Zellen konnten Gene ausgeschlossen werden, die trotz Abwesenheit von JunB noch Hypoxie-induzierbar waren (5: Kontroll-Zellen/Normoxie ↔ *junB*<sup>-/-</sup>/Hypoxie). Alle Hybridisierungen wurden in doppelten Ansätzen durchgeführt, wobei jeweils der Fluoreszenzfarbstoff für die Markierung der cDNAs ausgetauscht wurde ("colour switch"; Abb. 13 A).

Von den insgesamt 15248 Genen, die auf dem 15K NIA-Chip enthalten sind, konnte mit diesem experimentellen Ansatz die Genexpression von 9543 Klonen (63%) nachgewiesen werden. Die restlichen 5705 Klone zeigten keine detektierbare Expression und werden vermutlich in Endothelioma Zellen nicht oder in nur sehr schwachem Ausmaß exprimiert. Sequenzen, die eine mindestens 2-fache Induktion oder Reprimierung durch JunB bzw. Hypoxie zeigte, wurden als differentiell exprimiert angesehen. Die Klone mussten folgende Hybridisierungskriterien erfüllen, damit sie als Hypoxie-regulierte, JunB-abhängige Gene bezeichnet wurden:

- keine JunB-abhängigen Unterschiede in der basalen Expression (Hybridisierung 1)
- JunB-abhängige Regulation unter hypoxischen Bedingungen (Hybridisierung 2)
- differentielle Transkription durch Hypoxie in Kontroll-Zellen
- keine Regulierung in *junB*<sup>-/-</sup>-Zellen (Hybridisierung 4)
- keine differentielle Expression zwischen normoxischen Kontroll-Zellen und hypoxischen *junB*<sup>-/-</sup>-Zellen (Hybridisierung 5)

Es konnten 729 Hypoxie-induzierte und 956 -reprimierte Klone identifiziert werden. Insgesamt zeigten 953 Sequenzen eine JunB-abhängige Regulation, 551 davon wurden aktiviert und 402 Sequenzen reprimiert (Abb. 13 B und C).

Durch diesen kombinatorischen Ansatz konnten 25 Gene identifiziert werden, die in JunB-abhängiger Art und Weise durch Hypoxie aktiviert wurden (Abb. 13 B und C; Tab. 3 A), darunter Gene für Transkriptionsfaktoren (Cbfb, LBP-1a, Creb3l2) und Translations-Initiationsfaktoren (Eif3s10, Arid2) sowie für Proteine, die am intrazellulären Transport beteiligt sind (Ncald, Tram1, Kif5b) oder bei apoptotischen Prozessen (Tpt1, Nix) und der Neurogenese (Top2b, Nestin) eine Rolle spielen (NCBI; <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>). Unter den insgesamt 956 Hypoxie-reprimierten Klonen zeigten 21 Gene eine JunB-abhängige Repression (Abb. 13 B und C; Tab. 3 B). Die Gene dieser Gruppe kodieren unter anderem für Transkriptionsfaktoren (Pou6f1, Klf16, FoxJ2), für Bestandteile des Zytoskeletts (Tbcd, Myo1d) sowie Faktoren der Proteinsynthese (Farsla, Aars) und des Kohlehydrat- bzw. Steroid-Metabolismus (Aldh1b1, Fdft1).

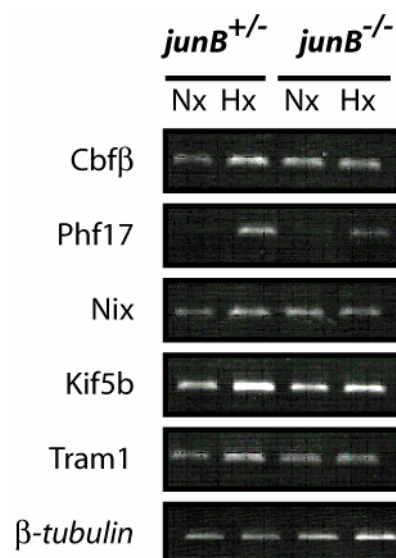
<b>A</b>			
Gen	Unigene	JunB abhängige Induktion	Hypoxie abhängige Induktion
Mospd1	Mm.28236	6,5	2,9
Cbfβ	Mm.2018	6,5	2,0
Cnot6l	Mm.28374	6,1	2,6
Wdr26	Mm.289082	4,6	4,1
Acsl4	Mm.143689	4,2	3,1
Rbmxrt	Mm.24718	3,6	5,0
D530031C13R ik	Mm.6488	3,5	3,9
LBP-1a	Mm.28052	3,5	2,6
Mm.43939	Mm.43939	3,4	2,0
Tpt1	Mm.296922	3,3	3,2
Eif3s10	Mm.2238	3,2	2,3
Ncald	Mm.283370	2,9	4,6
Creb3l2	Mm.169929	2,9	4,2
Top2b	Mm.130362	2,9	2,3
Phf17	Mm.286285	2,8	14,0
Rhpn2	Mm.286600	2,5	2,9
Nes	Mm.23742	2,5	2,5
Scmh1	Mm.208924	2,4	3,8
Tram1	Mm.28765	2,4	2,1
A1848100	Mm.170002	2,4	3,2
Arid2	Mm.17166	2,3	2,3
Mm.32430	Mm.32430	2,3	2,8
Nix	Mm.29820	2,2	2,4
Kif5b	Mm.223744	2,2	4,5
Btbd1	Mm.71103	2,1	3,7
<b>B</b>			
Gen	Unigene	JunB abhängige Repression	Hypoxie abhängige Repression
Tbcd	Mm.23686	-11,2	-2,2
2810428115R ik	Mm.28242	-7,7	-3,0
AU040403	Mm.46716	-6,1	-2,5
Myo1d	Mm.151948	-5,9	-2,6
MNI14441		-5,5	-2,5
Pou6f1	Mm.28825	-5,3	-4,0
Aldh1b1	Mm.331583	-4,5	-29,8
Klf16	Mm.41513	-4,4	-3,3
ESTs	Mm.44322	-4,2	-2,5
MNI10981		-4,1	-2,5
FoxJ2	Mm.87142	-3,9	-4,7
2900070E19Rik	Mm.29128	-3,0	-2,2
Tgm2	Mm.18843	-3,0	-2,4
Fdft1	Mm.371560	-2,8	-2,8
Farsla	Mm.292517	-2,6	-2,1
AU022706	Mm.87142	-2,6	-2,5
MNI02806		-2,5	-5,3
2810408B13Rik	Mm.102840	-2,3	-7,4
Aars	Mm.24174	-2,1	-4,0
MNI02771		-2,1	-2,6
A1314175	Mm.325827	-2,1	-2,8

**Tab. 3** Sequenzen mit JunB-abhängiger Hypoxie-Induktion (A) bzw. JunB-abhängiger Hypoxie-Repression (B)

### 3.2.5 Validierung der Microarray-Ergebnisse für JunB-abhängige/Hypoxie-induzierte Gene

Um die Ergebnisse der Chip-Analysen zu bestätigen, wurde die Expression von fünf Sequenzen aus der Gruppe der Hypoxie-induzierten, JunB-abhängigen Gene mittels semiquantitativer RT-PCR überprüft. Hierfür wurden der Transkriptionsfaktor CBF $\beta$ , das im Microarray Screen am stärksten Hypoxie-induzierte Gen Phf17, das proapoptische Protein Nix, welches in der Literatur als Hypoxie-induziert beschrieben wurde (Sowter et al., 2001) sowie Kif5b und Tram1 ausgewählt, die beiden Klone, die in den verschiedenen Hybridisierungen mit "Colour switch" am stärksten repräsentiert waren.

In den Kontroll-Zellen konnten alle fünf Gene durch Hypoxie induziert werden, während sie in den JunB-defizienten Zellen bis auf Phf17 nicht mehr differentiell exprimiert wurden. Die Induktion von Phf17 ist jedoch im Vergleich zur Kontrolle stark vermindert. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten aus der Microarray-Analyse für Gene, die eine JunB-abhängige Hypoxie-Induktion aufweisen.



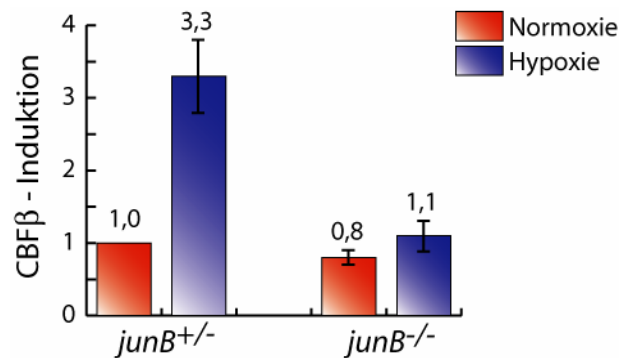
**Abb. 14: Überprüfung der Genotyp-abhängigen differentiellen Expression.** Semiquantitative RT-PCR mit Oligonukleotiden spezifisch für CBF $\beta$ , Phf17, Nix, Kif5b und Tram1. Die RT-PCR für  $\beta$ -Tubulin diente als interner Standard für den Abgleich der eingesetzten cDNA-Mengen.

### 3.2.6 CBF $\beta$ – ein JunB-Zielgen

Der Transkriptionsfaktor CBF $\beta$ , der in der Knochenentwicklung, der Hämatopoese und der Angiogenese eine wichtige Rolle spielt (Namba et al., 2000; Speck und Gilliland, 2002), stellt in aufgrund seiner funktionellen Übereinstimmungen mit JunB einen interessanten

Kandidaten als JunB-Zielgen dar, weswegen im folgenden Verlauf dieser Arbeit die JunB-abhängige von CBF $\beta$ -Expression genauer untersucht wurde.

Um als erstes das Ergebnis aus dem Microarray-Screen zu reproduzieren, wurde die Expression von CBF $\beta$  in Endothelioma Zellen in einem unabhängigen Experiment überprüft. Kontroll- und *junB*<sup>-/-</sup>-Zellen wurden für 16 h unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck inkubiert und die RNA einer quantitativen RT-PCR unterzogen (Abb. 15).



**Abb. 15: Quantitative Bestimmung der JunB-abhängigen Hypoxie-Induktion von CBF $\beta$  in Endothelioma Zellen.** Die relative Induktion von CBF $\beta$  wurde mittels quantitativer RT-PCR mit CBF $\beta$ -spezifischen Oligonukleotiden ermittelt. Die basale Expression in normoxischen Kontroll-Zellen galt als Referenzwert für die Berechnung der relativen Induktion. Die RT-PCR-Reaktion mit spezifischen Oligonukleotiden für  $\beta$ -Tubulin diente als interne Kontrolle für die eingesetzten cDNA-Mengen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei unterschiedlichen PCR-Reaktionen.

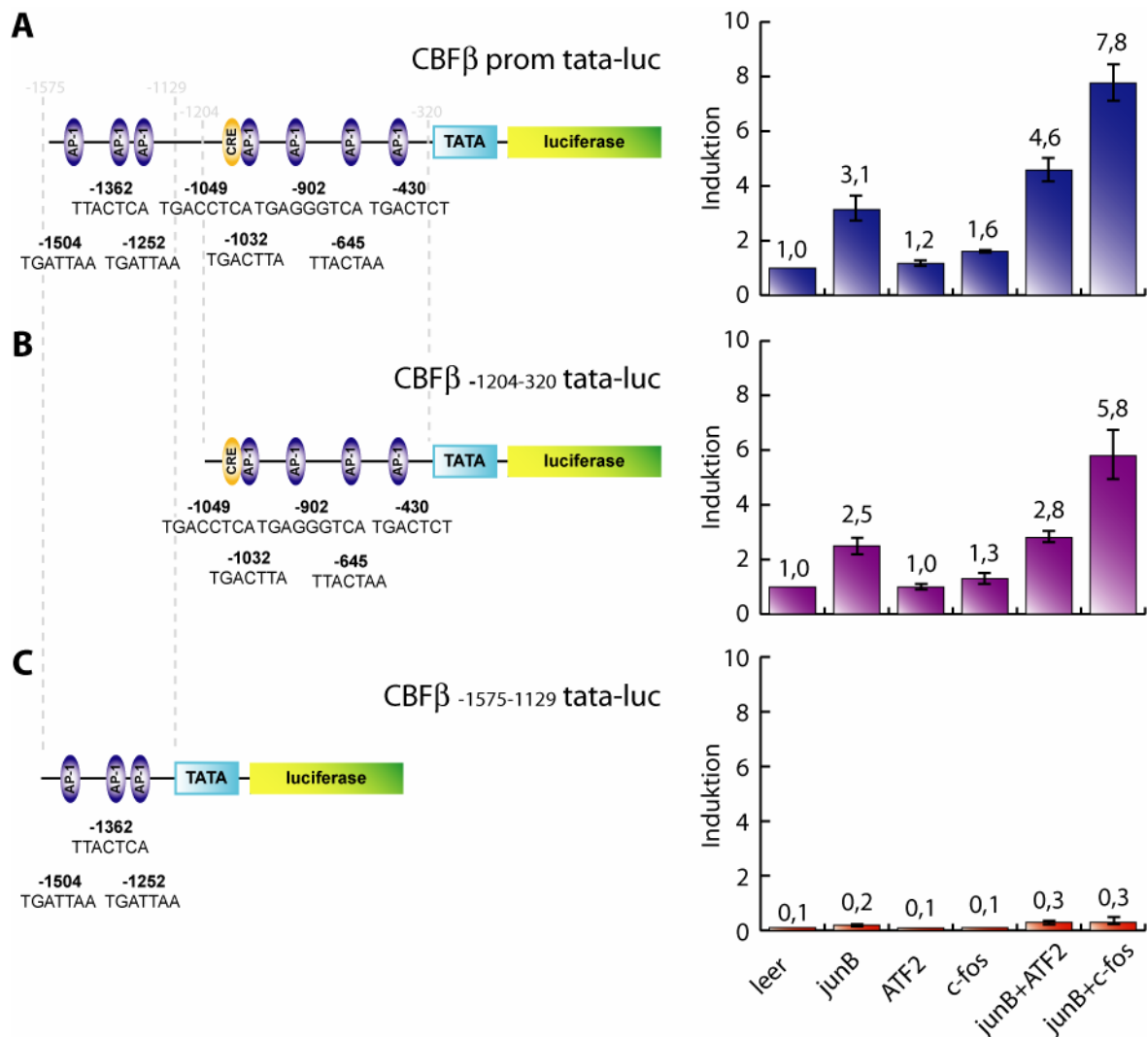
Während in den Kontroll-Zellen die CBF $\beta$ -Expression unter hypoxischen Bedingungen um das 3,3-fache anstieg, erreichte sie in *junB*<sup>-/-</sup>-Zellen sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen maximal die basalen Werte, die für die Kontroll-Zellen gemessen wurden. Dadurch konnte das Ergebnis aus dem Microarray-Screen sowohl durch semi-quantitative, als auch durch quantitative PCR reproduziert werden.

### 3.2.7 JunB und c-Fos vermitteln CBF $\beta$ Expression *in vitro*

Die Genregulation von CBF $\beta$  ist bisher noch nicht näher beschrieben. Daher wurde die Promotorsequenz mit Hilfe von TESS, einer Datenbank zur Identifikation potentieller Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren (University of Pennsylvania, 1997; <http://www.cbil.upenn.edu/tess/>), untersucht. Die Analyse einer 1600 bp langen Sequenz oberhalb des Transkriptionsstarts des murinen CBF $\beta$ -Gens identifizierte sieben AP-1-



Konsensus Sequenzen und eine CRE-ähnliche Sequenz, welche für eine Regulation von CBF $\beta$  über JunB in Frage kommen könnten (Abb. 16 A).



**Abb. 16: JunB und c-Fos aktivieren den CBF $\beta$ -Promotor.** Schematische Übersicht der benutzten CBF $\beta$ -Reporterkonstrukte (links) und relative Induktion der Reporteraktivitäten (rechts). (A) CBF $\beta$  prom tata-luc. (B) CBF $\beta$  -1204-320 tata-luc. (C) CBF $\beta$  -1575-1129 tata-luc. Die Reporterkonstrukte wurden mit Expressionsvektoren für *junB*, ATF-2, *c-fos* oder einem Leervektor in F9 Zellen kotransfiziert. Die Induktion der Reporteraktivität ist in Relation zur Basalaktivität (Leervektor) angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchsansätzen.

Um zu ermitteln, ob dieser Sequenzabschnitt bei der JunB-vermittelten Aktivierung eine Rolle spielt, wurde der Sequenzbereich von -1575 bis -320 relativ zum Transkriptionsstart von CBF $\beta$  mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide aus genomischer DNA amplifiziert und vor das Luziferasegen aus *Photinus pyralis* kloniert. Unmittelbar vor dem Transkriptionsstart von CBF $\beta$  konnte keine TATA-Box für die Bindung der basalen Transkriptionsmaschinerie

identifiziert werden, sondern nur eine ausgedehnte GC-reiche Sequenz, die zudem noch mehrere potentielle Sp-1-Bindestellen aufweist. Dieser GC-reiche Abschnitt wurde durch einen Minimalpromotor, welcher eine TATA-Box enthält, ersetzt (van Dam et al., 1998). Dieses Konstrukt erlaubt die Bindung der basalen Transkriptionsmaschinerie, verhindert jedoch eine zu hohe Basalaktivität des Reporters (Abb. 16 A links). Das CBF $\beta$ -Reporterkonstrukt wurde dann mit Expressionsvektoren für JunB, und ATF-2 und c-Fos als potentielle Dimer-Partner unter der Kontrolle des Rous-Sarkoma-Virus Promotors oder mit einem leeren Expressionsvektor in F9 Zellen kotransfiziert. Für die Normalisierung der transfizierten DNA-Menge wurde wieder zusätzlich das Luziferasegen von *Renilla reniformis* kotransfiziert.

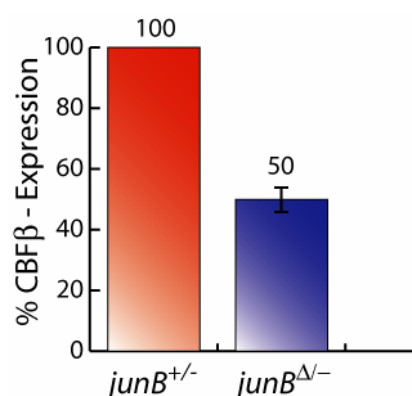
Während ATF-2 oder c-Fos allein das vollständige Reporter-Gen-Konstrukt nur schwach aktivierten, führte die Transfektion von JunB allein zu einer 3,1-fachen Luziferaseaktivität des Reporters (Abb. 16 A rechts). Diese Induktion konnte sogar noch gesteigert werden, wenn JunB in Kombination mit ATF-2 (4,6-fach) oder mit c-Fos (7,8-fach) kotransfiziert wurde (Abb. 16 A rechts). Um den Bereich einzugrenzen, welcher für die Aktivität des CBF $\beta$ -Reporters verantwortlich ist, wurden Kotransfektionen mit zwei verschiedenen Reporterkonstrukten durchgeführt, bei denen jeweils ein Teilstück der Promotorsequenz deletiert worden war (Abb. 16 B und C links). Der Bereich, der die drei distalen AP-1-Bindestellen enthält (CBF $\beta$ <sub>-1575-1129</sub>tata-luc), zeigte eine 10-fach schwächere Basalaktivität und erreichte durch die Kotransfektion von JunB, ATF-2 oder c-Jun maximal 30% der Basalaktivität des kompletten Promotors (Abb. 16 C). Im Gegensatz dazu verhielt sich der proximale Promotorbereich mit einer CRE- und vier AP-1-Konsensussequenzen (CBF $\beta$ <sub>-1204-320</sub>tata-luc) ähnlich wie das Ausgangskonstrukt CBF $\beta$  prom tata-luc. Während nach Kotransfektion von ATF-2 und c-Fos das Reporterkonstrukt nur sehr schwach aktiviert werden, resultierte die Expression von JunB alleine in einer 2,5-fachen Induktion und die Koexpression von JunB in Kombination mit ATF-2 bzw. c-Fos in einer 2,8-fachen bzw. 5,8-fachen Aktivierung (Abb. 16 B). Diese Reporterstudien zeigen, dass der Promotor von CBF $\beta$  *in vitro* schon allein durch die Expression von JunB aktiviert werden kann, wobei darüber hinaus durch die Kotransfektion von JunB und c-Fos eine verstärkte Transaktivierung erzielt werden konnte.

Zum Nachweis der Induzierbarkeit durch Hypoxie wurden HEK 293-, Hep3B-, HepG2- oder C243-Zellen jeweils mit den drei CBF $\beta$ -Reportern transfiziert und nach 24 Stunden für unterschiedliche Zeitpunkte unter hypoxischen Bedingungen inkubiert. Aber ähnlich wie für

die JunB-Reporterkonstrukte in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, konnte keines der CBF $\beta$ -Reporterkonstrukte in diesen Zellen durch Hypoxie induziert werden (Daten nicht gezeigt).

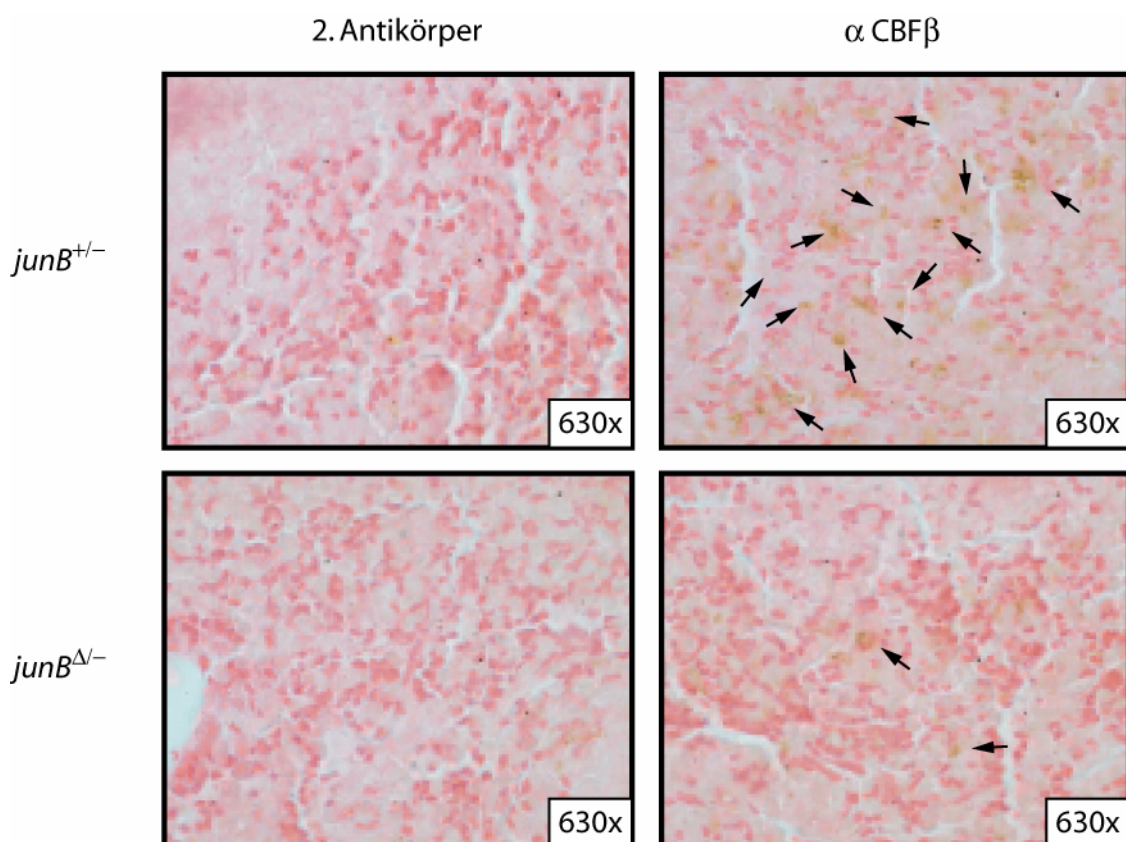
### 3.2.8 JunB reguliert CBF $\beta$ Expression *in vivo*

Nachdem in verschiedenen *in vitro* Ansätzen gezeigt wurde, dass CBF $\beta$  durch JunB reguliert wird, sollte nun untersucht werden, ob die Regulation von CBF $\beta$  auch *in vivo* von JunB abhängt. Hierzu wurden zwei verschiedene JunB-Mausmodelle verwendet. Bei *Coll1 $\alpha$ 2Cre;junB<sup>>/-</sup>* (*junB $\Delta$ <sup>-/-</sup>*) Mäusen wurde der Genlocus von JunB durch die Expression der Cre-Rekombinase unter dem Promoter des Kollagen1 $\alpha$ 2-Gens unter anderem im Knochenmark und in der Milz deletiert. Als Kontrolle dienten heterozygote Mäuse, ohne das gefloxtete *junB*-Allel *Coll1 $\alpha$ 2Cre;junB<sup>+/-</sup>* (Florin et al., 2005). Im zweiten Modell wurden JunB-defiziente Mäuse verwendet, die das Ubi-*junB*-Transgen tragen und in verschiedenen Geweben wie z.B. der Milz eine stark verminderte *junB*-Transgen-Expression aufweisen (Hartenstein et al., 2002; Hess et al., 2003). Da die Hämatopoese, bei der CBF $\beta$  eine wichtige Rolle spielt (Speck und Gilliland, 2002), in adulten Mäusen hauptsächlich im Knochenmark stattfindet, sollte zunächst überprüft werden, ob der Verlust von JunB in diesem Gewebe einen Einfluss auf die Expression von CBF $\beta$  hat. Hierzu wurde die RNA aus Wildtyp und JunB-defizientem Knochenmark isoliert (*Coll1 $\alpha$ 2Cre;junB<sup>>/-</sup>*) und einer quantitativen RT-PCR-Analyse unterzogen (Abb. 17). Die Expressionsstudie zeigt, dass das Fehlen von JunB in Knochenmarkszellen zu einer verminderten Expression von CBF $\beta$  führt.

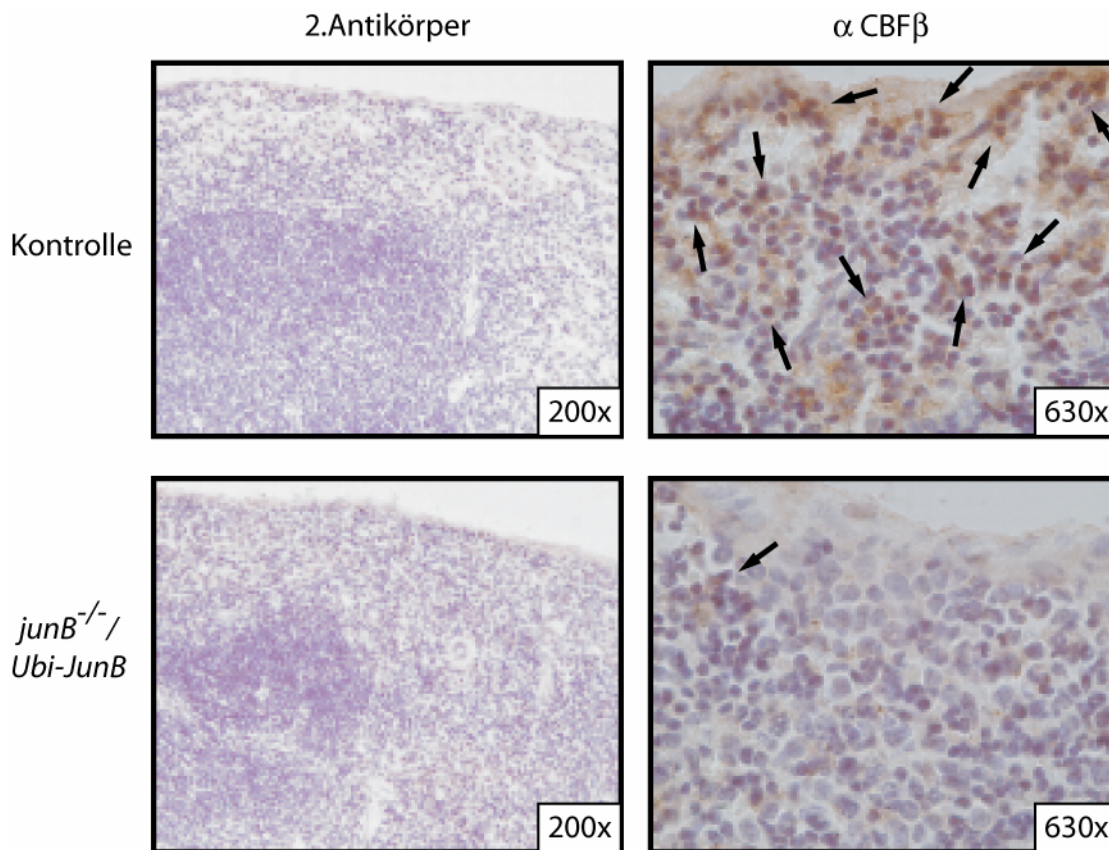


**Abb. 17: Verminderte CBF $\beta$ -Expression in JunB-defizienten Knochenmarkszellen.** Knochenmarkszellen aus Kontroll- und JunB $\Delta$ <sup>-/-</sup> Mäusen wurde isoliert, die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Quantitative RT-PCR wurde mit Hilfe von CBF $\beta$ -spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei unabhängigen PCR-Reaktionen.

Frühere Studien zeigen, dass CBF $\beta$  nicht nur im Knochenmark sondern in allen größeren hämatopoetischen Geweben, wie dem Thymus, den Lymphknoten und der Milz exprimiert wird (Kundu et al., 2002). Um der Frage nachzugehen, ob CBF $\beta$  auch in der Milz über JunB reguliert wird, wurden Gewebeschnitte von Wildtyp Mäusen und Mäusen mit stark verminderter *junB*-Transgen-Expression angefertigt und die Expression von CBF $\beta$  mittels immunhistochemischer Methoden überprüft. In den Wildtypen beider Mausmodelle konnten hohe Level an CBF $\beta$ -Protein detektiert werden, wohingegen der Verlust von JunB zu einer drastisch verminderten CBF $\beta$ -Expression führte (Abb. 18 und Abb. 19).



**Abb. 18: Reduzierte CBF $\beta$  Expression in der Milz von JunB $\Delta/−$  Mäusen.** Immunhistochemischer Nachweis der CBF $\beta$  Expression auf Gewebeschnitte der Milz aus drei Monate alten Mäusen mit einem spezifischen Antikörper gegen CBF $\beta$ . Zellen wurden mit Eosin gegengefärbt. Zur Verdeutlichung sind die bräunlichen positiven Signale mit einem schwarzen Pfeil markiert.



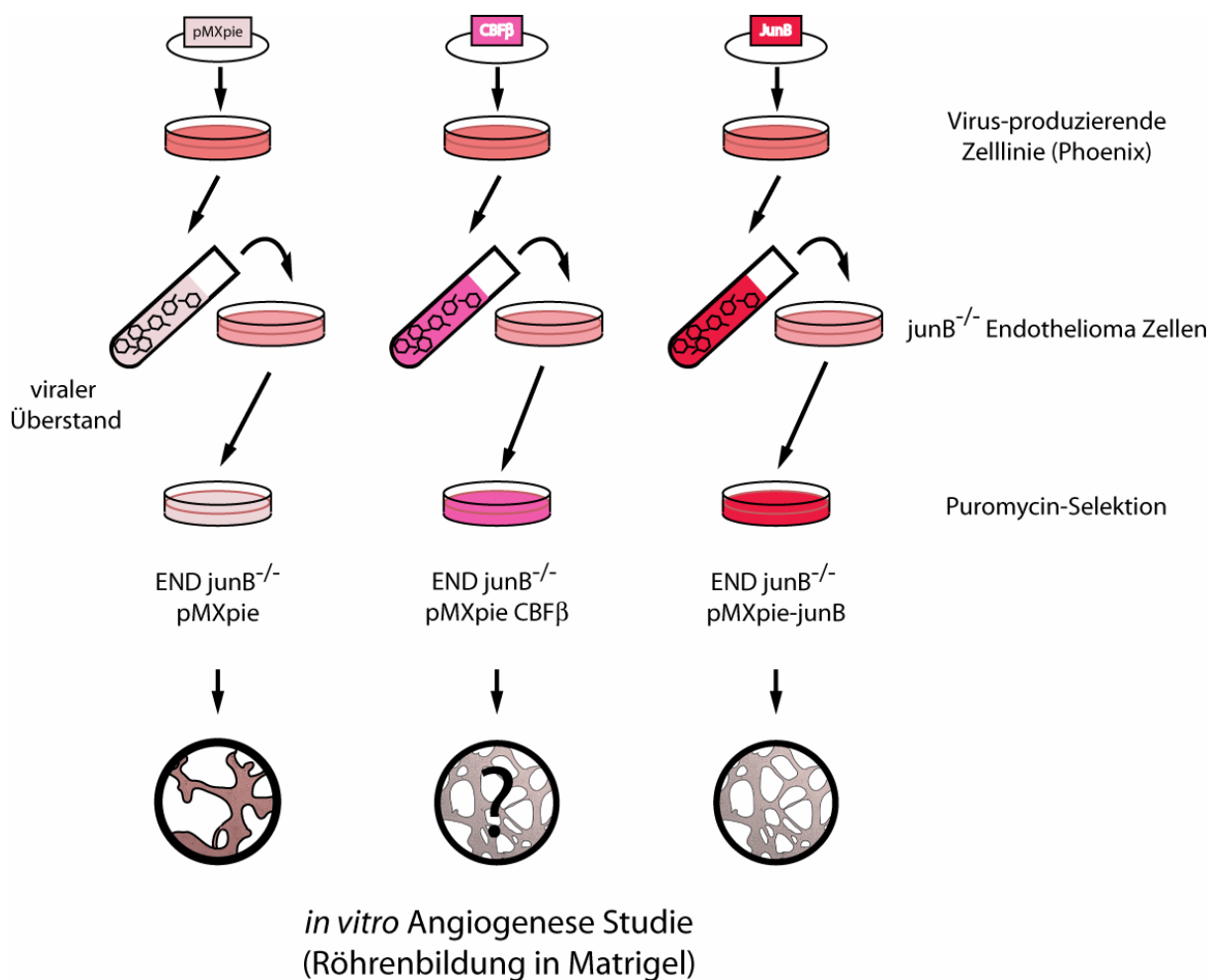
**Abb. 19: Reduzierte CBFβ-Expression in der Milz von *junB*<sup>-/-</sup> Ubi-*junB* transgenen Mäusen.** Für den immunhistochemischen Nachweis der CBFβ Expression auf Gewebeschnitten der Milz aus drei Monate alten Mäusen wurde ein spezifischer Antikörper gegen CBFβ benutzt. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Zur Verdeutlichung sind die bräunlichen positiven Signale mit einem schwarzen Pfeil markiert.

Somit konnte in drei unabhängigen experimentellen Ansätzen gezeigt werden, dass JunB die Expression von CBFβ nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo*, nämlich im Knochenmark und in Milzen von zwei unterschiedlichen Mausmodellen, positiv reguliert.

### 3.2.9 Angiogenese-Defekte in JunB-defizienten Endothelioma-Zellen können durch transgene Expression von CBFβ rückgängig gemacht werden

Um der Frage nachzugehen, ob die in Abschnitt 3.2.2 beobachteten Angiogenese-Defekte in JunB-defizienten Endothelioma Zellen auf die verminderte Expression von CBFβ zurückzuführen sind, sollte versucht werden, die angiogene Aktivität durch die transgene Expression von CBFβ zumindest teilweise wiederherzustellen. Da Endothelioma Zellen mit herkömmlichen Methoden sehr schwer und nur mit einer geringen Effizienz transfiziert werden können, wurde ein retrovirales System benutzt, um die transgene Expression von CBFβ in den JunB-defizienten Endothelioma Zellen zu ermöglichen. Die retroviral infizierten

*junB*<sup>-/-</sup>-Zellen sollten nachfolgend in *in vitro* Angiogenese-Studien auf deren Fähigkeit, vaskuläre Strukturen auszubilden, untersucht werden (Abb. 20).



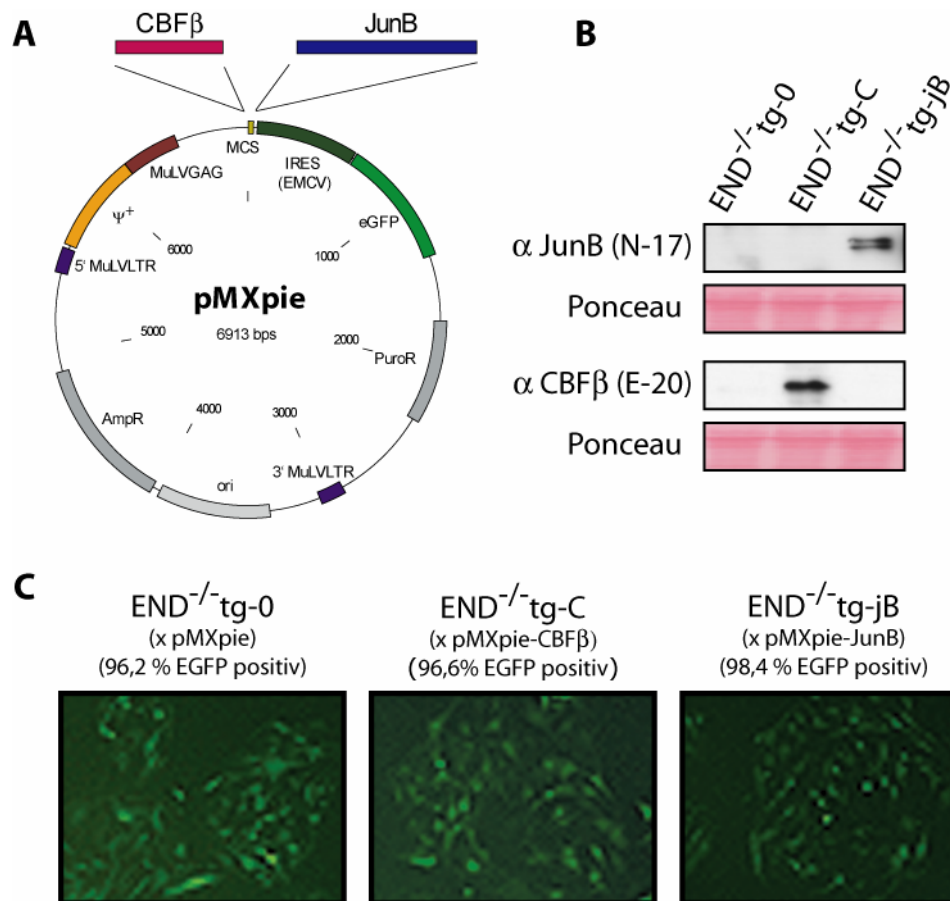
**Abb. 20: Übersicht über den experimentellen Aufbau der Virusinfektion und *in-vitro* Angiogenese Studie von *junB*<sup>-/-</sup>-Endothelioma Zellen.** Die Virus-produzierende Zelllinie Phoenix wurde mit den viralen Vektoren pMXpie-CBFβ, pMXpie-JunB oder mit dem leeren Vektor pMXpie transfiziert. Nach 48 Stunden wurde der virale Überstand auf JunB-defiziente Endothelioma Zellen transferiert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen für 8 Tage unter Puromycin-Selektion (3μg/ml) genommen. Die Transgen exprimierenden Zellen wurden dann auf solidem Matrigel ausgesät und nach 4 h auf deren angiogene Aktivität hin untersucht.

Das retrovirale System beruht auf der Transfektion eines viralen Vektors in Zellen, die stabil virale Strukturproteine exprimieren, so genannte Virus-produzierende Zellen. Der virale Vektor enthält Sequenzen, die vom Moloney murinen Leukämie Virus (MoMuLV) abstammen, und trägt eine multiple Klonierungsstelle, in die das zu transduzierende Gen eingesetzt werden kann (Morgenstern und Land, 1990). Durch die Transfektion des Vektors in die Virus-produzierenden Zellen werden Viruspartikel, die die RNA des gewünschten Gens beinhalten, verpackt und in den Überstand abgegeben. Die Zielzellen werden durch den

Transfer des virushaltigen Überstandes infiziert und das zuvor in den Vektor klonierte Gen stabil in deren Genom integriert (Morgenstern und Land, 1990; Kitamura et al., 1995; Onishi et al., 1996).

Für die transgene Expression von CBF $\beta$  in den JunB-defizienten Endothelioma Zellen wurde die cDNA für CBF $\beta$  und JunB mittels RT-PCR aus Hypoxie-induzierten Wildtyp-Endothelioma-Zellen amplifiziert und in den retroviralen Vektor pMX-pie kloniert (Kitamura et al., 1995; Cerwenka et al., 2000). pMX-pie enthält zusätzlich noch das Gen für EGFP, welches hinter einer Internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES) liegt, und erlaubt so die bicistronische Expression von dem gewünschten Gen und von EGFP. Die Effizienz der Infektion bzw. der Anteil der infizierten Zellpopulation kann so über die Expression von EGFP entweder im Mikroskop oder per FACS-Analyse überprüft werden. Das Puromycin-Resistenzgen ermöglicht die Selektion erfolgreich infizierter Zielzellen (Abb. 21 A). Die Virus-produzierende Zelllinie Phoenix (Grignani et al., 1998) wurde mit pMXpie-CBF $\beta$ , pMXpie-JunB oder dem leeren pMXpie-Vektor transfiziert und der Überstand nach zwei Tagen auf *junB*<sup>-/-</sup>-Endothelioma Zellen transferiert. Nach 8 Tagen Puromycin-Selektion waren >96% der überlebenden Zellen EGFP-positiv (Abb. 21 C) und exprimierten entweder nur EGFP (END<sup>-/-</sup>-tg-0) oder EGFP und CBF $\beta$  (END<sup>-/-</sup>-tg-C) bzw. JunB (END<sup>-/-</sup>-tg-jB) (Abb. 21 B).

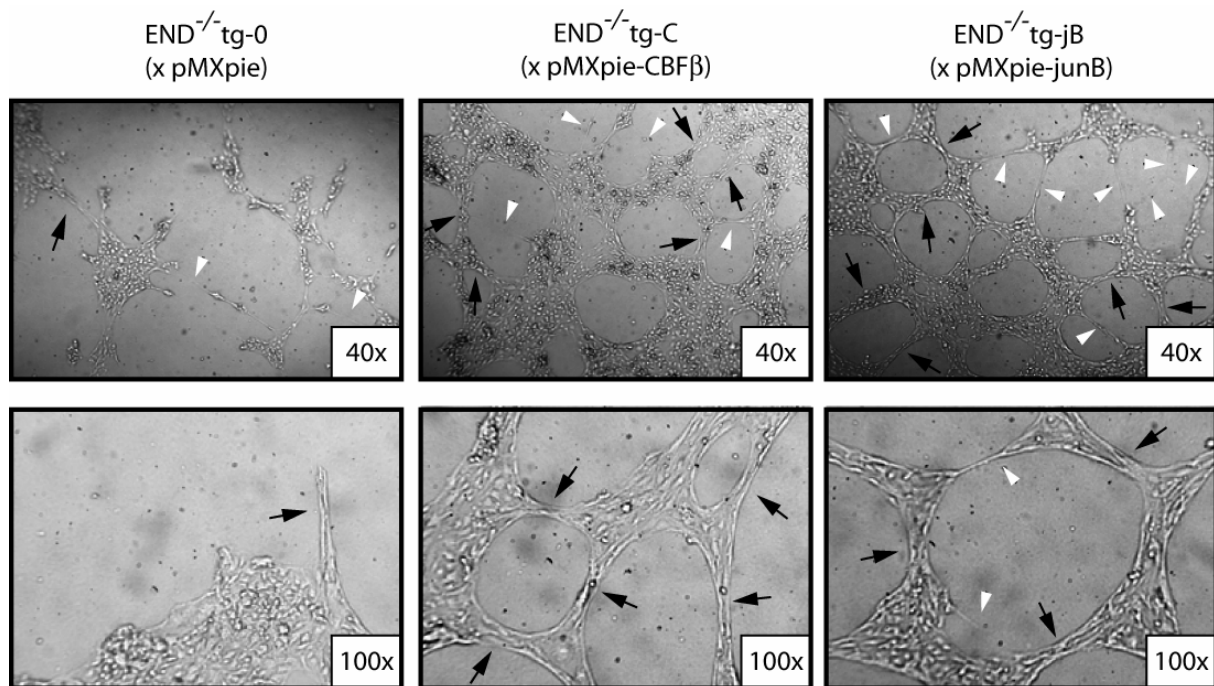




**Abb. 21: Retrovirale Infektion von *junB*<sup>-/-</sup>-Endothelioma Zellen.** (A) Schematische Übersicht über den pMXpie Vektor. (B) Infizierte Zellen wurden mittels Western Blot auf CBFβ- und JunB-Expression überprüft. Gesamtproteinextrakte wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und CBFβ- und JunB-Protein mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Ponceau-Färbung diente als Kontrolle der geladenen Proteinnengen. (C) EGFP-Expression der infizierten Zellen. Der in Prozent angegebene Anteil EGFP-positiver Zellen wurde per FACS-Analyse ermittelt.

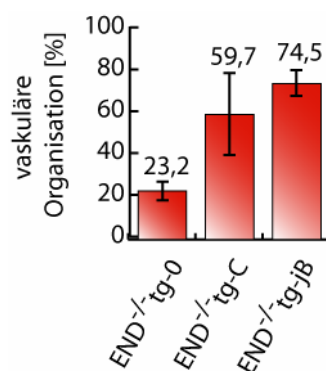
Die drei transgenen Zelllinien END<sup>-/-</sup>-tg-0, END<sup>-/-</sup>-tg-C und END<sup>-/-</sup>-tg-jB wurden nun in Matrigel ausgesät und nach vier Stunden analysiert. Wie erwartet, bildeten END<sup>-/-</sup>-tg-0-Zellen, die den leeren viralen Vektor exprimierten nur wenige tubuläre Strukturen aus und ähnelten *junB*<sup>-/-</sup>-Zellen in Matrigel. END<sup>-/-</sup>-tg-jB-Zellen, welche transgenes JunB exprimierten, organisierten sich in einem Netz aus kapillarartigen Röhren und erreichten 74,5% der vaskulären Organisation der Kontrolle (Abb. 22 und Abb. 23). Somit konnte der Angiogenese-Defekt der *junB*<sup>-/-</sup>-Zellen durch die transgene Expression von JunB zu einem überwiegenden Teil aufgehoben werden, was beweist, dass ausschließlich das Fehlen von JunB für die verminderte angiogene Aktivität verantwortlich ist und der Phänotyp nicht auf einer Sekundärmutation beruht, die eventuell bei der Etablierung der *junB*<sup>-/-</sup>-Endothelioma Zellen aufgetreten sein könnte.





**Abb. 22: Angiogenese-Defekte von *junB*<sup>-/-</sup>-Zellen können durch transgene Expression von CBFβ bzw. JunB rückgängig gemacht werden.** Die Zelllinien END<sup>-/-</sup>-tg-0, END<sup>-/-</sup>-tg-C und END<sup>-/-</sup>-tg-jB wurden in Matrigel ausgesät und nach 4h auf deren angiogene Aktivität hin untersucht.

Ähnlich wie in den END<sup>-/-</sup>-tg-jB-Zellen konnte der Angiogenese-Defekt in JunB-defizienten Zellen durch die transgene Expression von CBFβ (END<sup>-/-</sup>-tg-C-Zellen) zum großen Teil wieder rückgängig gemacht werden (Abb. 22 und Abb. 23). Die END<sup>-/-</sup>-tg-C-Zellen erreichten fast 60% der vaskulären Organisation des Wildtyps. Dies zeigt, dass der durch das Fehlen von JunB hervorgerufene Angiogenese-Defekt in diesem System durch das JunB-Zielgen CBFβ weitgehend kompensiert werden kann.



**Abb. 23: Statistische Auswertung der angiogenen Aktivität der Transgen exprimierenden Endothelioma-Zellen.**

## 4 Diskussion

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die transkriptionelle Regulation von JunB in der zellulären Hypoxie-Antwort untersucht. Der identifizierte Regulationsmechanismus, die JunB-Regulation über NFκB, spielt eine wichtige Rolle für die maximale transkriptionelle Regulation des JunB Zielgens VEGF und weist JunB eine essentielle Rolle bei der Angiogenese zu. In einem *in vitro* Angiogenese Modell zeigten JunB-defiziente Endothelioma Zellen einen Defekt in der Angiogenese und imitierten den vaskulären Phänotyp von JunB-defizienten Embryonen. Da JunB selbst in Endothelzellen mit am stärksten exprimiert ist, sollten im zweiten Teil neue Hypoxie-induzierte JunB-abhängige Zielgene identifiziert werden, die in Endothelioma-Zellen exprimiert werden, um die Ursachen sowohl der angiogenen Defekte in den JunB-defizienten Endothelioma-Zellen als auch des vaskulären Phänotyps von *junB*<sup>-/-</sup>-Embryonen aufklären zu können. Der mittels Microarray als differentiell reguliertes Gen identifizierte Transkriptionsfaktor CBFβ zeigte unter hypoxischen Bedingungen eine JunB-abhängige Transkription und erwies sich *in vitro* als ein wichtiger angiogener Faktor, über den JunB die Funktionen von Endothelzellen regulieren könnte.

### 4.1 Aktivierung des *junB*-Gens unter hypoxischen Bedingungen

In der Vergangenheit wurde mehrfach gezeigt, dass AP-1 neben HIF an der Regulation Hypoxie-induzierter Gene beteiligt sein kann (Norris und Millhorn, 1995; Alfranca et al., 2002; Bergman et al., 2003). Die Hypoxie-induzierte Aktivierung von VEGF ist in JunB-defizienten Fibroblasten und Endothelioma Zellen stark reduziert, was auf eine Beteiligung von JunB bei der transkriptionellen Induktion von VEGF zurückzuführen ist (vorliegende Arbeit; (Schmidt, 2001). Allerdings ist bisher nicht untersucht worden, ob und wie *junB* selbst durch Hypoxie reguliert werden kann. Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass die Inkubation von Fibroblasten unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck zu einem sehr raschen Anstieg der *junB*-mRNA führt. Der Zeitpunkt der maximalen Aktivierung variiert in den drei unterschiedlichen Wildtyp-Fibroblasten-Zelllinien zwischen 0,5 bis 1 bzw. 4 Stunden. Diese unterschiedlichen Induktionsmaxima sind höchstwahrscheinlich auf verschiedene genetische Hintergründe der Zelllinien bzw. unterschiedliche Immortalisierungsprozeduren zurückzuführen. Da unter Hypoxie auch in den JunB-defizienten Zellen selbst noch das *junB*-

*neo*-Fusionstranskript induziert wird, kann davon ausgegangen werden, dass JunB für die Induktion seines eigenen Gens nicht erforderlich ist. Allerdings führt die Inkubation von JunB-defizienten Fibroblasten unter hypoxischen Bedingungen zu einer verstärkten Induktion des Fusionstranskriptes von JunB. Dies lässt vermuten, dass JunB inhibierend bzw. modulierend auf die Expression seines eigenen Gens wirken könnte. Sowohl positive als auch negative Autoregulation wurde vor allem für die Gene der AP-1 Mitglieder c-Jun (Angel et al., 1988) und c-Fos (Sassone-Corsi et al., 1988; König et al., 1989; Schönthal et al., 1989) gezeigt. Für JunB wurden basierend auf Transfektionsstudien positiv transaktivierende und auch reprimierende Eigenschaften in Abhängigkeit vom Promotorkontext des untersuchten Gens oder Reporters berichtet. So hemmt JunB die c-Jun-abhängige Transaktivierung von Promotoren mit einer singulären TRE-Stelle (Chiu et al., 1989; Schutte et al., 1989), während es Promotoren mit multiplen TRE-Stellen transaktiviert (Chiu et al., 1989; Li et al., 1999). Da der *junB*-Promotor eine singuläre AP-1-Bindestelle enthält (Abb. 2), ist es durchaus möglich, dass die beobachtete verstärkte Induktion des *junB-neo*-Fusionstranskriptes über eine autoregulatorische Derepression des *junB* Gens zustande kommen könnte. Die Fähigkeit, die Transkription seines eigenen Gens zu beeinflussen, entweder positiv, wie im Falle von c-Jun bezüglich des *c-jun* Gens, oder inhibierend wie im Falle von Fos und c-Jun:Fos bezüglich des *c-fos* Gens oder modulierend, wie es in der vorliegenden Arbeit für JunB und sein Gen beobachtet wurde, ist möglicherweise eine wichtige gemeinsame regulatorische Eigenschaft von JunB und c-Jun, um die eigene Aktivität in Antwort auf zellulären Stress zu kontrollieren.

#### **4.2 Der NFκB-Signalweg ist für die Hypoxie-abhängige Induktion von *junB* verantwortlich**

Der Transkriptionsfaktor HIF ist einer der Hauptregulatoren der zellulären Hypoxie-Antwort. Er bindet an ein Hypoxie-responsives Element (HRE) mit der Konsensus-Sequenz 5'-ACGTG<sup>C</sup>/<sub>G</sub>-3' (O'Rourke et al., 1997) und reguliert eine Gruppe von mehr als 70 Genen, die in der Angiogenese, in Prozessen des Energiestoffwechsels, der Erythropoese, der Zellproliferation sowie der Apoptose beteiligt sind (Harris, 2002). Im proximalen Bereich des *junB*-Promotors sind keine HREs zu finden, was eine direkte Regulation über HIF-1 unwahrscheinlich macht. Zudem kann man eine Regulation über eventuelle distale HREs ausschließen, da die Induktion von *junB* in hypoxischen HIF-1α-defizienten Fibroblasten nicht beeinträchtigt wird. Die Hypoxie-Induktion von *junB* verläuft demnach nicht über den

Hauptregulator der zellulären Hypoxie-Antwort HIF-1, sondern erfordert die Aktivierung anderer Signalwege.

Die MAPK-Signalwege, insbesondere JNK und p38, spielen eine wichtige Rolle bei der zellulären Antwort auf extrazelluläre Stresszustände. Die Beteiligung dieser MAP-Kinasen in der zellulären Hypoxie-Antwort wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert und scheint ferner einer stark Zelltyp-abhängigen Regulation unterworfen zu sein (Seta und Millhorn, 2004). Mit den in dieser Arbeit verwendeten Wildtyp-MEFs wurde JNK gar nicht und p38 und ERK frühestens nach einer bzw. drei Stunden unter hypoxischen Bedingungen aktiviert. Da *junB* in diesem Zelltyp nach 30 Minuten maximal induziert wurde, können weder JNK, noch ERK bzw. p38 für die Aktivierung von *junB* verantwortlich sein.

Im Gegensatz zu den MAPK-Signalwegen wurde NFκB in den Fibroblasten bereits nach 20 Minuten Hypoxie aktiviert. In Koexpressions-Studien mit *junB*-Reporterkonstrukten erwiesen sich die NFκB-Bindestellen in der 3'-flankierenden Region als essentiell für die Transaktivierung des Reporters. Expressionsanalysen in hypoxischen Fibroblasten mit inhibierter NFκB-Aktivität erbrachten schließlich den Beweis dafür, dass die Hypoxie-induzierte *junB*-Transkription über NFκB erfolgt. In Zellen mit stark gehemmter NFκB-Aktivität konnte nur eine minimale Menge an JunB-Transkript in Folge der Hypoxie-Inkubation detektiert werden. Eine generelle Hemmung der *junB*-Transkription in den NFκB-Mutanten konnte ausgeschlossen werden, da die Induktion von JunB über den PKA-Signalweg, ausgelöst durch die Behandlung der Zellen mit Forskolin, zu einer transkriptionellen Aktivierung führt, die dem Wildtyp entspricht. So resultiert der Verlust der NFκB-Aktivität spezifisch in einer Hemmung der Hypoxie-induzierten *junB*-Transkription, womit postuliert werden kann, dass *junB* in hypoxischen Fibroblasten ein direktes Zielgen von NFκB ist.

NFκB ist hauptsächlich dafür bekannt, Immun- und Entzündungsprozesse zu steuern (Bonizzi und Karin, 2004). So kann die Bindung von Lipopolysacchariden (LPS) aus gramnegativen Bakterien an den "Toll-like-receptor 4" (TLR4) intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzen, die die Phosphorylierung und den Abbau von IκB auslösen. Daraus folgt eine Aktivierung von NFκB (Bonizzi und Karin, 2004). In LPS-stimulierten murinen Makrophagen aber auch Pre-B-Zellen konnte eine NFκB-abhängige JunB-Expression gezeigt werden (Frazier-Jessen et al., 2002; Krappmann et al., 2004). Durch Reporterstudien konnten vier κB-Bindestellen in der 3' flankierenden Region des *junB*-Gens identifiziert werden, die für die LPS-Induktion von *junB* benötigt werden (Frazier-Jessen et al., 2002). Die

in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Koexpressionsstudien mit einem ähnlichen Reporterkonstrukt mit *junB* Wildtyp Sequenzen bzw. mit mutierten NFκB-Bindestellen und der p65 Untereinheit von NFκB kamen zu ähnlichen Ergebnissen und untermauern die Bedeutung von NFκB für die Regulation von JunB nicht nur nach LPS Stimulation, sondern auch unter hypoxischen Stressbedingungen. So ist die Regulation von JunB durch NFκB ein gängiger Mechanismus in Prozessen der angeborenen Immunantwort (LPS-Stimulation), aber auch in malignen Reed-Sternberg Zellen aus Hodgkin Lymphomen, in denen der Verlust der NFκB Bindeaktivität aufgrund der Anwesenheit einer dominant negativen Mutante von IκBα in einer stark abgeschwächten Expression von JunB resultiert (Mathas et al., 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser regulatorische Mechanismus auch für die Hypoxie-induzierte *junB*-Expression gilt.

Die Bedeutung von NFκB als entscheidender Faktor in der Transkription von Hypoxie-induzierten Genen ist in einer Anzahl an Arbeiten in verschiedenen Zelltypen beschrieben worden. So spielt NFκB bei der Hypoxie-abhängigen Expression von Cox-2 in HUVEC Zellen (Schmedtje et al., 1997), von Erythropoetin in Hep3B Zellen (Figuroa et al., 2002) und von MIP-2 in Makrophagen der Maus (Zampetaki et al., 2004) eine zentrale Rolle. Die Aktivierung von NFκB führt unter hypoxischen Bedingungen zur Tyrosinphosphorylierung des Inhibitors IκBα und zur anschließenden Dissoziation des IκBα/NFκB-Komplexes und somit zur Aktivierung von NFκB (Koong et al., 1994a). Diese Tyrosinphosphorylierung kann durch dominant negative Mutanten der Kinasen Ha-Ras und Raf-1 gehemmt werden, womit postuliert wurde, dass die Hypoxie-induzierte NFκB-Aktivierung von der Ras- bzw. Raf-1 Kinaseaktivität abhängt (Koong et al., 1994b). Obwohl in vielen Zelltypen die Aktivierung der ERK-MAP-Kinasen über Ras und Raf-1 verläuft (Chang et al., 2003), wird NFκB unter hypoxischen Bedingungen nicht über ERK aktiviert (Koong et al., 1994b).

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine Beteiligung der ERK-MAP-Kinase ausgeschlossen werden, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass die in dieser Arbeit beschriebene Hypoxie-induzierte Aktivierung von *junB* in Fibroblasten über den Mechanismus der Tyrosin-spezifischen IκBα Phosphorylierung und nachfolgenden NFκB-Translokation in den Kern erfolgt und dass *junB* in der zellulären Hypoxie-Antwort ein direktes Zielgen von NFκB ist.

### 4.3 Regulation von *VEGF* durch JunB

VEGF ist ein zentrales Molekül in der Vaskulogenese und Angiogenese und wird durch verminderten Sauerstoffpartialdruck induziert. Diese Induktion wird hauptsächlich über die Bindung des Hypoxie-induzierbaren Faktor HIF-1 $\alpha$  an Hypoxie-responsive Elemente im *VEGF*-Promotor vermittelt (Ferrara et al., 2003). Allerdings wurde beobachtet, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 Sequenzbereiche stromaufwärts der HIF-1 Bindestelle im *VEGF*-Promotor binden kann und erst ein komplexes Zusammenwirken dieser Transkriptionsfaktoren zur maximalen Induktion der *VEGF*-Transkription führt (Damert et al., 1997). Die Zusammensetzung des AP-1 Komplexes konnte in diesem Zusammenhang bisher aber nicht eindeutig geklärt werden. Bisher wurde hauptsächlich c-Jun als zentrales AP-1-Mitglied bei der Hypoxie-Antwort diskutiert, jedoch lassen die verwendeten experimentellen Ansätze keine Aussage bezüglich der Komposition des AP-1 Komplexes am TRE im *VEGF*-Promotor zu. So wurden in "Supershift"-DNA-Bindestudien Antikörper eingesetzt, die alle drei Jun-Proteine erkennen (Damert et al., 1997), und in Reporterstudien wurden die transdominanten Negativmutanten A-Fos (Salnikow et al., 2002) bzw. TAM67 (Alfranca et al., 2002) eingesetzt, welche beide nicht spezifisch die Aktivität von c-Jun hemmen, sondern generell die Aktivität von allen AP-1 Mitgliedern inhibieren.

Die Tatsache, dass die Phänotypen von JunB-, *VEGF*- und HIF-1 $\alpha$ -defizienten Mäusen übereinstimmende Defekte in der Angiogenese und Knochenentwicklung aufweisen (siehe Tab. 2 in Einleitung), ist es wahrscheinlich, dass JunB an der Steuerung der molekularen Mechanismen der Gefäßentwicklung sowie der zellulären Hypoxie-Antwort beteiligt ist. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Expressionsstudien bestätigen noch nicht veröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Schorpp-Kistner, in denen berichtet wurde, dass JunB für die maximale Hypoxie-induzierte Transkription von *VEGF* in Fibroblasten sowie Endothelioma-Zellen unbedingt erforderlich ist (Schmidt, 2001), und zeigen außerdem, dass JunB auch für die basale Expression von *VEGF* verantwortlich ist. Die basale Expression von *VEGF* ist in JunB-defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtyp- aber auch zu HIF-1 $\alpha$ -defizienten Zellen deutlich vermindert und auch die Hypoxie-induzierte Expression von *VEGF* ist in *junB*<sup>-/-</sup>-Zellen kaum detektierbar. Im Gegensatz dazu ist gerade diese in HIF-1 $\alpha$ -defizienten Fibroblasten stark vermindert aber immer noch deutlich vorhanden und wird somit wahrscheinlich durch die HIF-1 $\alpha$ -unabhängige Aktivität von JunB vermittelt. Entsprechend kann man argumentieren, dass in NF $\kappa$ B Super Repressor Zellen

unter hypoxischen Bedingungen die *VEGF*-Transkription aufgrund der verminderten Induktion von JunB abgeschwächt ist. Allerdings kann eine direkte Beteiligung von NFκB bei der *VEGF*-Transkription nicht ausgeschlossen werden, da neben Bindestellen für HIF-1 und AP-1 auch NFκB-Erkennungssequenzen im Promoter von *VEGF* identifiziert worden sind (Shima et al., 1996). So wurde ein indirekte Einfluss von NFκB auf die Expression von *VEGF* unter hypoxischen Bedingungen beobachtet, bei dem die NFκB-abhängige Expression von Cox-2 und nachfolgende Bildung von Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) neben HIF die Transkription von *VEGF* unter hypoxischen Bedingungen steuert (Lukiw et al., 2003). Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die *VEGF*-Expression in allen drei benutzten Fibroblastenmutanten (*junB*<sup>-/-</sup>, *HIF-1α*<sup>-/-</sup>, ΔN +) stark vermindert ist, und somit jeder der drei Transkriptionsfaktoren entweder direkt oder indirekt an der Hypoxie-induzierten *VEGF*-Transkription beteiligt sein muss.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich folgendes Modell für die Aktivierung von *junB* unter hypoxischen Bedingungen aufstellen: Hypoxie führt in Fibroblasten über den NFκB-Signalweg zu einer raschen Induktion von *junB*. Sowohl die Aktivität von HIF-1 als auch von den drei untersuchten MAP-Kinasen JNK, p38 und ERK kann für diese Induktion ausgeschlossen werden. Die verstärkte Transkription von *junB* und die daraus resultierenden erhöhten Mengen an JunB-Protein können nun die Transkription weiterer Hypoxie-induzierbarer Gene wie *VEGF*, *TH* oder dem in der vorliegenden Arbeit als JunB-Zielgen identifizierten CBFβ regulieren (Abb. 24).

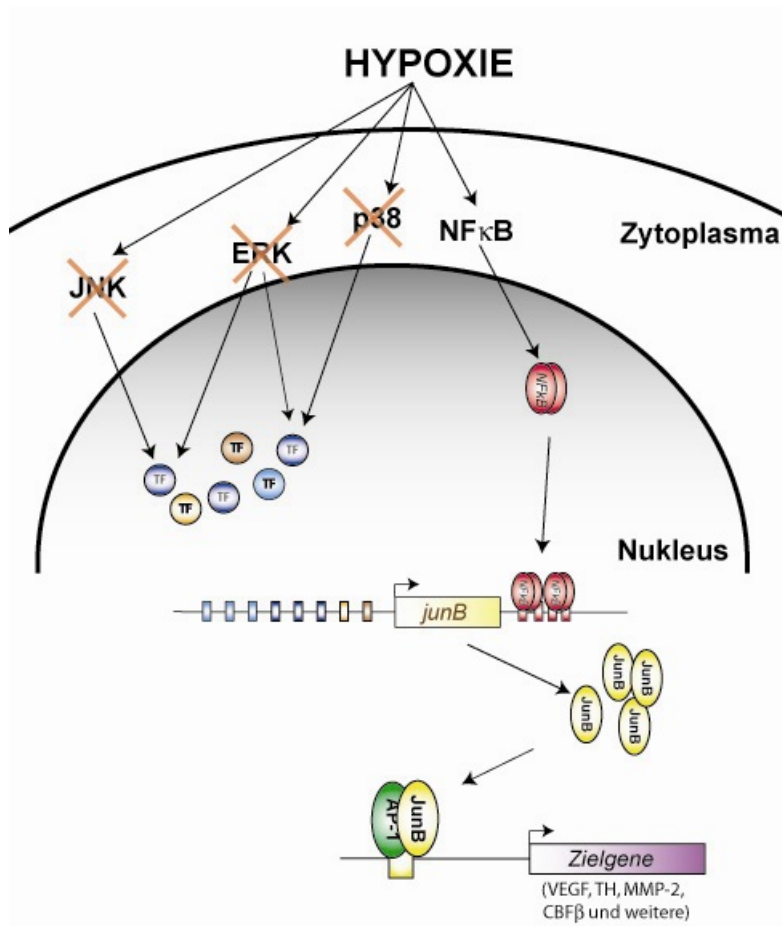


Abb. 24: Mögliches Modell der Regulation von JunB in der zellulären Hypoxie-Antwort.

#### 4.4 Identifizierung neuer JunB-Zielgene in der Hypoxie-Antwort von Endothelzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass JunB in Endothelzellen *in vivo* stark exprimiert wird. In einem *in vitro* Angiogenese Modell führt der Verlust von JunB zu einer stark verminderten angiogenen Aktivität von Endothelioma-Zellen, was beweist, dass JunB essentiell bei der Regulation der Funktion von Endothelzellen ist. Dies steht im Einklang mit dem vaskulären Phänotyp von JunB-defizienten Embryonen (Schorpp-Kistner et al., 1999) und lässt vermuten, dass JunB in Endothelzellen vor allem solche Gene reguliert, die bei der Funktion von Endothelzellen bzw. bei der Angiogenese eine Rolle spielen. Die angiogene Aktivität ist durch ein Zusammenspiel von Migration und Proliferation von Endothelzellen charakterisiert (Vailhe et al., 2001). Da JunB-positiven Zellen im Gegensatz zu JunB-defizienten Endothelioma-Zellen bereits nach vier Stunden eine erhöhte angiogene Aktivität



aufweisen, scheinen hauptsächlich migratorische und nicht proliferative Prozesse für den beobachteten Unterschied zwischen den beiden Zelllinien verantwortlich zu sein. Die Abwesenheit von JunB hat demnach wahrscheinlich eine verminderte Transkription von Wachstumsfaktoren und Matrixproteinen zu Folge, die zur Umstrukturierung von Gefäßen notwendig sind (Cleaver und Melton, 2003).

Wie im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt wurde, ist JunB sowohl für die basale als auch für die Hypoxie-vermittelte Transkription von VEGF in Fibroblasten verantwortlich. Das vom hypoxischen Tumorgewebe sezernierte VEGF gilt als einer der Schlüsselfaktoren, die die Homöostase bzw. die Aktivität von Endothelzellen bei Prozessen der Angiogenese steuern (Carmeliet und Jain, 2000). Hypoxie beeinflusst aber auch direkt die Aktivität von Endothelzellen in der Embryonalentwicklung und in der Tumorangio-genese und potenziert über einen autokrinen Mechanismus die Effekte, die durch das umliegende hypoxische Gewebe hervorgerufen werden (Faller, 1999; Cleaver und Melton, 2003). Die in avaskulären Geweben vorherrschende Hypoxie veranlasst umliegende Blutgefäße, durch sprossende Angiogenese diese Gewebe zu vaskularisieren und mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (Patan, 2000). So induziert Hypoxie in Endothelzellen eine Reihe von Genen, deren Proteine auf Endothelzellen und auf perivaskuläre Zellen in Prozessen der Angiogenese wirken können, wie z.B. Cox-2 (Schmedtje et al., 1997), PDGF-B (Michiels et al., 1994) und VEGF (Shweiki et al., 1995). Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, verläuft die Regulation von VEGF unter hypoxischen Bedingungen über JunB.

Zur Identifizierung weiterer JunB-Zielgene wurde die Genexpression von JunB-positiven mit JunB-defizienten Endothelioma-Zellen unter hypoxischen Bedingungen verglichen. Die kombinatorische Auswertung der DNA-Microarray Daten ergab, dass von diesen Genen 46 Sequenzen eine Hypoxie-regulierte und zugleich eine JunB-abhängige Regulation aufwiesen, 25 davon zeigten eine JunB-abhängige Induktion, 21 dagegen eine Repression. Durch diese geringe Überlappung an Hypoxie- und JunB-gesteuerten Genen ist anzunehmen, dass JunB nur auf einen kleinen Teil der komplexen Hypoxie-Antwort in Endothelioma Zellen Einfluss nimmt, und dass der Großteil der Gene unabhängig von JunB höchstwahrscheinlich über den Hypoxie-induzierbaren Faktor HIF reguliert wird. Von den 46 identifizierten Genen ist bisher nur das proapototische Protein NIX als Hypoxie-induziert beschrieben worden, welches über HIF reguliert wird (Bruick, 2000; Sowter et al., 2001). Daraus lässt sich ableiten, dass JunB unter hypoxischen Bedingungen nur einige wenige Gene in Kooperation mit HIF koreguliert (*VEGF*, *Nix*) und den größeren Anteil der Gene HIF-1-unabhängig reguliert. Dies steht auch im Einklang mit den Ergebnissen aus dem ersten Teil

dieser Arbeit, in dem bewiesen wurde, dass die *junB*-Transkription unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck durch einen HIF-1 unabhängigen Mechanismus induziert wird.

Jeder DNA-Chip enthielt das 15.000 Sequenzen umfassende Klonset in zweifacher Ausführung und jede Hybridisierung wurde doppelt unter Austausch der Fluoreszenzfarbstoffe ("Colour switch") durchgeführt. Somit konnten theoretisch pro Hybridisierung maximal vier auswertbare Hybridisierungssignale pro Sequenz erwartet werden. Diese maximale Anzahl an Signalen konnte aber aufgrund von Schwankungen in der Hybridisierungsqualität nicht immer erreicht werden. Demnach war zu erwarten, dass je häufiger ein Gen durch Hybridisierungssignale in den verschiedenen Hybridisierungen vertreten war, desto breiter sollte auch die Datenbasis der Chip-Vorhersage und desto gesicherter die Reproduzierbarkeit sein. Die beiden Klone "Kinesin family member 5b" (Kif5b) und "Translocating chain-associating membrane protein 1" (Tram1) waren in den unterschiedlichen Hybridisierungen mit "Colour switch" am häufigsten, d.h. mit den meisten Hybridisierungssignalen vertreten.

Durch die semiquantitative RT-PCR-Analyse der ausgewählten Gene konnten die Expressionsmuster aus dem DNA-Microarray validiert werden. In Abwesenheit von JunB wiesen diese Kandidaten bis auf Phf17 keine Hypoxieinduktion mehr auf. Phf17 war in den *junB*<sup>-/-</sup>-Zellen zwar noch induziert, jedoch im Vergleich mit den Kontroll-Zellen in einem stark abgeschwächten Ausmaß. So scheint die Hypoxie-induzierte Transkription von Phf17 zum Teil von JunB abzuhängen, jedoch scheint ein weiterer Mechanismus für die Restinduktion verantwortlich zu sein.

Nix, ein proapoptotisches Protein, wurde in der Literatur bereits als Hypoxie-induziert beschrieben. Untersuchungen in HIF-1 $\alpha$  defizienten "Chinese Hamster Ovary" (CHO)-Zellen ergaben, dass diese Hypoxie-Induktion abhängig von HIF ist (Sowter et al., 2001). Wie die RT-PCR-Analyse für Nix zeigen, führte der Verlust von JunB auch zum Verlust der Hypoxie-Induzierbarkeit, wonach JunB essentiell für die differentielle Expression zu sein scheint. Man kann vermuten, dass Nix eines der wenigen Gene darstellt, welche unter hypoxischen Bedingungen durch JunB und HIF-1 koreguliert werden. Die Apoptose endothelialer Zellen spielt bei der sprossenden Angiogenese eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Apoptose *in vitro* die Bildung von vaskulären röhrenartigen Strukturen verhindert und auch *in vivo* die Angiogenese beeinträchtigen kann (Segura et al., 2002). So könnte JunB durch die Regulation von apoptotischen Genen wie Nix Einfluss auf Teilprozesse der Angiogenese nehmen.

## 4.5 CBF $\beta$ – ein Zielgen von JunB

CBF $\beta$ , eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors CBF, ging ebenfalls aus der Microarray-Analyse als JunB-abhängiges unter hypoxischen Bedingungen differentiell exprimiertes Gen hervor. CBF $\beta$  weist etliche phänotypische Übereinstimmungen mit JunB auf (Tab. 4), weswegen die JunB-abhängige CBF $\beta$ -Expression in dieser Arbeit detailliert untersucht wurde. CBF $\beta$  bildet zusammen mit seinen Dimerisierungspartnern RUNX1, RUNX2 oder RUNX3 den heterodimeren Transkriptionsfaktor CBF (Core Binding Factor) und ist essentiell in der Hämatopoese, der Knochenentwicklung und der Angiogenese (Namba et al., 2000; Speck und Gilliland, 2002).

	CBF $\beta$	JunB
<b>Phänotyp des "Knockouts"</b>	embryonal letal (E 11,5-13,5) gestörte Hämatopoese	embryonal letal (E 8,5-10,5) Störung der Gefäßentwicklung
<b>Knochenentwicklung</b>	Reversion des letalen Phänotyps durch transgene Expression von CBF $\beta$ resultiert in gestörter Knochenentwicklung	gestörte Knochenbildung in Mäusen mit stark verminderter JunB-Expression
<b>Leukämie/Hämatopoese</b>	chromosomale Translokation steht in direkter Verbindung mit myeloiden Leukämien	-Mäuse mit fehlender JunB-Expression in der myeloiden Zelllinie zeigen myeloproliferatives Krankheitsbild -in CML-Patienten ist das JunB-Gen durch Hypermethylierung inaktiviert
<b>Angiogenese</b>	essentiell in <i>in vitro</i> Angiogenese-Modell	Störung der Gefäßentwicklung in JunB-defizienten Embryonen

**Tab. 4: Übersichtstabelle der Übereinstimmungen bezüglich der beschriebenen Funktionen für CBF $\beta$  und JunB.**

In einem unabhängigen Versuchsansatz konnte das Ergebnis aus der Microarray-Analyse für CBF $\beta$  mittels quantitativer RT-PCR verifiziert werden. Hypoxie induziert die CBF $\beta$ -Expression in Kontroll-Endothelioma-Zellen, wohingegen der Verlust von JunB zugleich zum Ausbleiben der Hypoxie-Induzierbarkeit von CBF $\beta$  führt. Reporterstudien zeigen, dass die Expression von CBF $\beta$  schon durch JunB alleine und durch JunB in Kombination mit c-Fos verstärkt induziert werden kann. Die Transaktivierung erfolgt wahrscheinlich über eine oder mehrere der vier in dieser Arbeit identifizierten TREs bzw. über die CRE-Konsensus Sequenz im proximalen Bereich des CBF $\beta$ -Promoters.

#### 4.5.1 CBF $\beta$ und JunB in myeloiden Leukämien

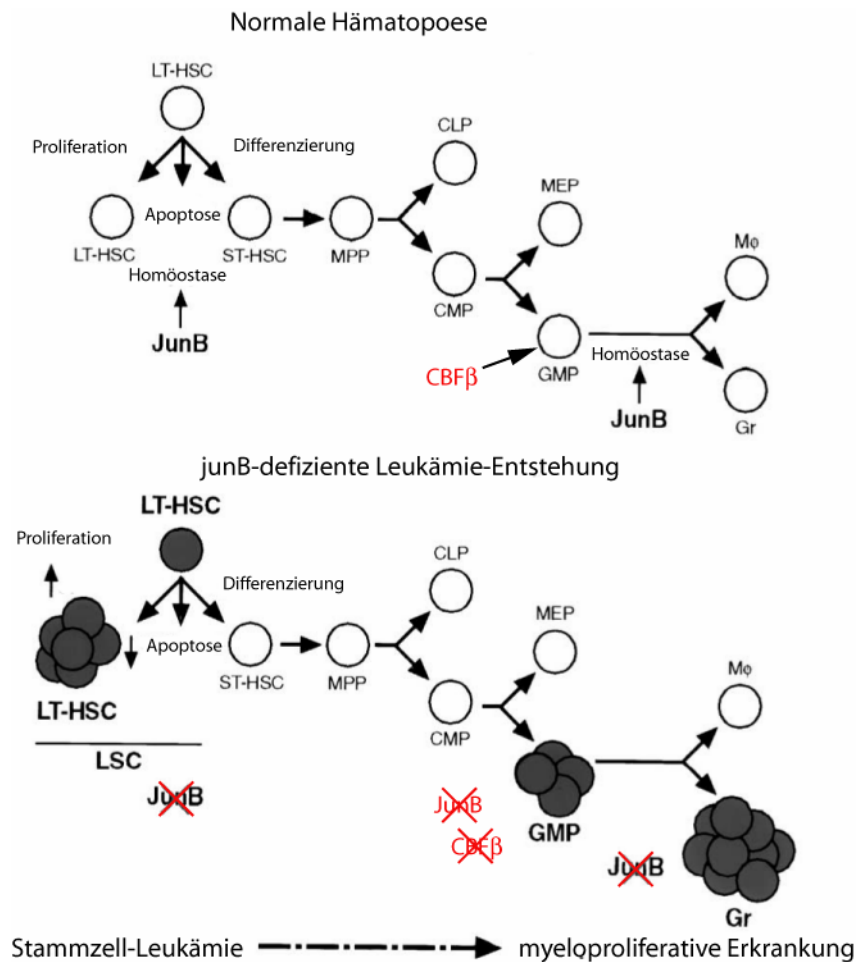
In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass JunB *in vivo* die Expression von CBF $\beta$  in den hämatopoetischen Geweben des Knochenmarks und der Milz reguliert. Die Expression von CBF $\beta$  im Knochenmark von Mäusen, bei denen JunB mittels konditionaler Geninaktivierung deletiert wurde, war im Vergleich zu Kontrolltieren stark vermindert. Die gleichen Mäuse zeigten in immunhistochemischen Untersuchungen auf Gewebeschnitten der Milz stark verminderte Mengen an CBF $\beta$ -Protein. Die Expression von CBF $\beta$  in der Milz von Mäusen mit stark verminderter *junB*-Transgen-Expression war ebenfalls stark abgeschwächt. Somit besteht die Möglichkeit, dass die Regulation von CBF $\beta$  über JunB eine Bedeutung bei der Hämatopoese bzw. beim Entstehen myeloider Leukämien besitzt. Diese Vermutung wird durch verschiedene Arbeiten verstärkt, in denen sowohl CBF $\beta$  als auch JunB in Zusammenhang mit myeloiden Leukämien gebracht werden.

So führt das Fehlen von JunB in der myeloiden Linie in Mäusen zu einer transplantierbaren myeloproliferativen Erkrankung (MPD), die sich durch eine erhöhte Anzahl an Granulozytenvorläufern auszeichnet (Passegue et al., 2001). Detailliertere Untersuchungen zeigen, dass JunB entscheidend für die Homöostase früher hämatopoetischer Stammzellen (LT-HSC) ist. Die Überexpression von JunB reduziert die Anzahl von LT-HSCs, wohingegen die Inaktivierung von JunB zu einer Expansion der LT-HSC-Population und der Population von Granulozytenvorläuferzellen führt (Passegue et al., 2004). Ferner wurde gezeigt, dass nur JunB-defiziente LT-HSCs das Potenzial besitzen, durch Transplantation eine myeloproliferative Erkrankung in Empfänger-mäusen auszulösen (Passegue et al., 2004). Weiterhin wurde beobachtet, dass die Expression von *junB* in einigen Patienten mit Chronischer Myeloider Leukämie (CML) durch Hypermethylierung des *junB*-Promotors inaktiviert ist (Yang et al., 2003) und dass die *junB*-Expression auch in einem Subtyp der Akuten Myeloiden Leukämie (AML) vermindert ist (Dorsam et al., 2004). CBF $\beta$ -defiziente Mausembryonen leiden an einer gestörten Hämatopoese und sterben zwischen Tag 11,5 und 13,5 der Embryonalentwicklung (Wang et al., 1996a). Die Deletion des *RUNX1*-Gens führt in Mäusen zu einem identischen Phänotyp wie die Deletion von CBF $\beta$  (Okuda et al., 1996; Wang et al., 1996b). Chromosomale Translokationen, die sowohl CBF $\beta$  als auch *RUNX1* betreffen, tragen im Menschen zur Pathogenese myeloider Leukämien bei. Die unterschiedlichen im Menschen vorkommenden Translokationen der CBF-Untereinheiten resultieren in Fusionsproteinen, die eine dominant inhibierende Wirkung auf die normale CBF-Aktivität ausüben, wodurch die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen

---

blockiert wird und myeloide Leukämien entstehen (Speck und Gilliland, 2002). Die Expression von CBF $\beta$ -SMMHC unter der Kontrolle des endogenen Promotors von CBF $\beta$  führt ebenfalls zu dem identischen Phänotyp wie er bei RUNX1- und CBF $\beta$ -defizienten Embryonen beobachtet werden kann (Castilla et al., 1996). Chimäre Mäuse, die durch Injektion von embryonalen Stammzellen, welche das CBF $\beta$ -SMMHC Fusionsprotein exprimieren, in Wildtyp-Blastozysten generiert wurden, entwickeln myeloide Leukämien, allerdings nicht spontan sondern erst nach Behandlung eines DNA-alkylierenden Mutagens (Castilla et al., 1999). Daraus wurde geschlossen, dass chromosomale Aberrationen, welche das CBF $\beta$ -Gen betreffen, nicht ausreichen, um eine Leukämie auszulösen, sondern dass dazu noch weitere Mutationen notwendig sind (Castilla et al., 1999; Kundu et al., 2002a).

Die Identifikation von CBF $\beta$  als JunB-Zielgen und die vielfältigen Übereinstimmungen der Funktionen der beiden Faktoren eröffnen die Möglichkeit, dass eine JunB-abhängige Regulation von CBF $\beta$  bei der Entstehung von myeloiden Leukämien eine entscheidende Rolle spielt. So könnte eine verminderte CBF $\beta$ -Expression in JunB-defizienten Granulozytenvorläufern zu einer Blockierung der Differenzierung führen (Abb. 25). Da die Inaktivierung von CBF $\beta$  alleine nicht ausreicht, um eine Leukämie auszulösen, scheint es möglich, dass der Verlust von JunB neben einer verminderten Expression von CBF $\beta$  zur Deregulierung weiterer in der Hämatopoese beteiligter Faktoren führt, was dann letztlich in myeloiden Leukämien resultiert.



**Abb. 25: Mögliches Modell für die Rolle von JunB und CBF $\beta$  in der normalen und leukämischen Hämatopoese (nach Passegué et al., 2004).** Während der normalen Hämatopoese reguliert JunB die Homöostase des Stammzell-Kompartiments durch die Kontrolle des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose. In JunB-defizienten Mäusen führt der Verlust von JunB zu einer erhöhten Anzahl an LT-HSCs, wohingegen die Anzahl der "short-term" Hämatopoetischen Stammzellen (ST-HSC), Multipotenten Vorläufern (MPP), allgemeinen Lymphoiden (CLP) und allgemeinen Myeloiden Vorläufern (CMP) gleich bleibt. Weiterhin kontrolliert JunB die Homöostase der Granulozyten-Linie. Die Abwesenheit von JunB in den hämatopoetischen Stammzellen führt zu einer übermäßigen Vermehrung von Granulozytenvorläufern (GMP). Da inaktives oder nicht vorhandenes CBF $\beta$  in einer Blockierung der Differenzierung von GMPs in reife Granulozyten resultiert, könnte verminderte CBF $\beta$ -Expression in JunB-defizienten GMPs für die Vermehrung unreifer GMPs verantwortlich sein.

#### 4.5.2 CBF $\beta$ und JunB in der Knochenentwicklung

Phänotypische Übereinstimmungen von verschiedenen JunB- und CBF $\beta$ -Mausmodellen liefern weiterhin Hinweise, dass eine Regulation von CBF $\beta$  durch JunB bei der

Knochenentwicklung beteiligt sein könnte. Wie vorläufige Immunfluoreszenz-Untersuchungen auf Gewebeschnitten von Knochen aus *junB*<sup>-/-</sup> Ubi-*junB* Mäusen belegen, ist die Expression von CBF $\beta$  in Chondrozyten abhängig von JunB (Daten nicht gezeigt). Diese vorläufigen Untersuchungen und die funktionellen Übereinstimmungen von JunB und CBF $\beta$  bei der Regulation der Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten lassen vermuten, dass die in dieser Arbeit beobachtete JunB-abhängige Regulation von CBF $\beta$  auch in der Entwicklung des Skelettsystems eine Rolle spielen könnte.

Die Letalität JunB-defizienter Mäuse kann durch die transgene Expression von JunB aufgehoben werden. Diese Mäuse zeigen eine gestörte endochondrale Ossifikation, wobei der Osteoporose- und Hypochondrodysplasie-ähnliche Phänotyp mit der verminderten Proliferation von Osteoblasten und Chondrozyten der Wachstumsplatte einhergeht (Hess et al., 2003). In einem weiteren Mausmodell, bei dem der letale Phänotyp von JunB durch eine Epiblasten-spezifische Deletion von JunB umgangen wurde, entwickeln die Nachkommen ebenfalls eine Osteoporose-ähnliche Erkrankung, die aufgrund von Defekten in der Proliferation und der Differenzierung der Osteoblasten- und Osteoklasten-Zelllinie hervorgerufen wird (Kenner et al., 2004). CBF $\beta$  hat neben der Regulation der Hämatopoese eine weitere Funktion in der Knochenentwicklung. Diese Gewebespezifität wird durch die Dimerisierung mit RUNX2 vermittelt (Speck und Gilliland, 2002). Die frühe Letalität von CBF $\beta$ -defizienten Embryonen kann ebenfalls durch die transgene Expression von CBF $\beta$  aufgehoben werden und zeichnen sich auch durch Defekte in der Knochenentwicklung aus (Miller et al., 2002; Yoshida et al., 2002; Kundu et al., 2002b). Die Mäuse weisen eine verspätete endochondrale und desmale Ossifikation sowie eine gestörte Chondrozytendifferenzierung auf.

### 4.5.3 CBF $\beta$ und JunB in der Angiogenese

Neben der Regulation der Hämatopoese und der Knochenentwicklung wurde CBF $\beta$  eine Rolle in der Angiogenese zugeschrieben. Die Expression des inhibierenden CBF $\beta$ -SMMHC-Fusionsproteins hemmt die Aktivität von murinen Endothelzellen in einem *in vitro*-Angiogenese Modell (Namba et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls ein *in vitro* Angiogenese-Modell benutzt, um einen Zusammenhang zwischen dem vaskulären Phänotyp von JunB-defizienten Mäusen, der Beteiligung von CBF $\beta$  an Vorgängen der Blutgefäßbildung sowie der JunB-abhängigen Expression von CBF $\beta$  in Endothelzellen zu untersuchen.

Durch die transgene Expression von JunB kann der angiogene Defekt von *junB*<sup>-/-</sup>-Endothelioma-Zellen zum überwiegenden Teil (ca. 75%) wieder hergestellt werden. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die verminderte angiogene Aktivität durch eine eventuelle Sekundärmutation bei der Etablierung der Endothelioma-Zellen zustande kommt.

JunB-defiziente Endothelioma-Zellen, die mit dem CBF $\beta$ -Virus infiziert (END<sup>-/-</sup>tg-C) und im Matrigel ausgesät wurden, erreichen fast 60% des Organisationsgrades der Kontroll-Zellen. Vergleicht man die vaskuläre Organisation der CBF $\beta$ -infizierten Zellen (END<sup>-/-</sup>tg-C) mit der der Positivkontrolle aus dem Infektionsansatz, nämlich den Zellen, die das JunB-Transgen exprimieren, so erreichten die Zellen, die das CBF $\beta$ -Transgen exprimieren, sogar 80% (59,7% von 75,5%) der vaskulären Organisation. Diese Ergebnisse beweisen, dass der Großteil der von JunB vermittelten Aktivität von Endothelioma-Zellen über CBF $\beta$  verläuft.

Endothelzellen, die das leukämische CBF $\beta$ -SMMHC-Fusionsprotein exprimieren, weisen ebenfalls migratorische Angiogenesedefekte auf, die auf einer verminderten Transkription von Angiopoietin-1 beruhen soll und nicht auf einer deregulierten Expression von Matrixproteinasen wie MMP-3, MMP-9 oder uPA (Namba et al., 2000). Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass RUNX1/CBF $\beta$  die Expression der Prolyl-insensitiven Leucyl-spezifischen Aminopeptidase (PILSAP) induziert (Niizeki et al., 2004). PILSAP ist bei der Proliferation und Migration sowie bei der Röhrenbildung von Endothelzellen *in vitro* involviert und spielt auch *in vivo* eine Rolle bei der Angiogenese (Miyashita et al., 2002). Möglicherweise agiert JunB als übergeordneter Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression von CBF $\beta$ , das dann durch die Steuerung einer Gruppe in der Angiogenese involvierten Gene den angiogenen Effekt von JunB vermittelt. Da die transgene Expression von CBF $\beta$  nicht zu einer vollständigen Aufhebung des angiogenen Defekts führt, ist es möglich, dass JunB neben CBF $\beta$  noch weitere Faktoren reguliert, die an den Prozessen der Gefäßentwicklung beteiligt sind.

Die vorliegende Arbeit erbringt den experimentellen Beweis dafür, dass *junB* unter hypoxischen Bedingungen transkriptionell aktiviert wird und dass diese Hypoxie-induzierte Aktivierung von *junB* über den NF $\kappa$ B-Signalweg erfolgt. Zudem beweist sie, dass JunB zum einen die basale VEGF Transkription und darüber hinaus im Zusammenspiel mit HIF-1 $\alpha$  die VEGF-Induktion nach Hypoxie reguliert. Die Microarray-Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass JunB eine kleine Gruppe Hypoxie-abhängiger Gene reguliert – einige davon durch Koregulation mit HIF (z.B. Nix), andere unabhängig von HIF.



Die Identifikation neuer JunB-Zielgene eröffnet einen neuen Blickwinkel mit Hinsicht auf den Vergleich ähnlicher "Knock-out"-Phänotypen. So weist das in dieser Arbeit als JunB-abhängig identifizierte Gen CBF $\beta$  funktionelle Übereinstimmungen mit JunB in der Hämatopoese und der Entstehung von Leukämien sowie bei der Knochenentwicklung und der Angiogenese auf. Mit dem CBF $\beta$ -kodierenden viralen Vektor wurde ein Werkzeug hergestellt, mit dem der experimentelle Beweis für eine physiologische Verbindung dieser zwei Transkriptionsfaktoren erbracht werden kann. Durch die Verwendung dieses Vektors konnte eine direkte Beziehung zwischen JunB und CBF $\beta$ -Expression in der Angiogenese hergestellt und der funktionelle Beweis erbracht werden, dass CBF $\beta$  ein entscheidendes Zielgen von JunB bei der Regulation der angiogenen Aktivität von Endothelzellen ist.

Die Identifikation von CBF $\beta$  als JunB-Zielgen als Endergebnis dieser Arbeit eröffnet im Zusammenhang mit den phänotypischen Übereinstimmungen von JunB und CBF $\beta$  die interessante Hypothese, dass CBF $\beta$  das entscheidende JunB-Zielgen in den physiologischen Prozessen der Knochenentwicklung und der Hämatopoese sowie bei der Pathologie von myeloiden Leukämien darstellt. Funktionelle Studien dazu sollten in Zukunft die notwendigen Beweise zur Untermauerung dieser Hypothese erbringen.

#### **4.6 Ausblick**

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Kenntnisse über JunB als transkriptioneller Regulator von CBF $\beta$  könnten von Nutzen sein, um die Frage zu beantworten, ob diese Regulation von CBF $\beta$  auch in den physiologischen Prozessen der Skelettbildung und der Hämatopoese bzw. in den pathophysiologischen Prozessen von myeloiden Leukämien beteiligt ist.

So kann die Infektion von primären JunB-defizienten Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten mit dem in dieser Arbeit angefertigten viralen CBF $\beta$ -Vektor Aufschluss darüber geben, ob eine verminderte CBF $\beta$ -Expression für die Störungen in der Proliferation und der Differenzierung dieser Zelltypen verantwortlich ist.

Untersuchungen zur CBF $\beta$ -Expression in Leukämie-Patienten mit reduzierter JunB-Expression (Yang et al., 2003; Dorsam et al., 2004) sollen Hinweise darüber liefern, ob eine Inaktivierung von JunB im Menschen zu einer reduzierten CBF $\beta$ -Expression führt und ob eine solche, durch die Abwesenheit von JunB vermittelte, abgeschwächte CBF $\beta$ -Expression eventuell Auslöser der Leukämie sein könnte. Um den funktionellen Beweis für eine

Beteiligung der JunB-abhängigen CBF $\beta$ -Expression bei der Entstehung von Leukämien zu erbringen, könnte man Knochenmark-Transplantationsexperimente durchführen. Die Transplantation von JunB-defizienten Knochenmarkzellen in gesunde Empfänger löst in Mäusen eine myeloproliferative Krankheit aus (Passegue et al., 2001; Passegue et al., 2004). Durch die Transplantation von Knochenmarkzellen, die mit dem CBF $\beta$ -Retrovirus infiziert werden, kann geklärt werden, ob die transgene Expression von CBF $\beta$  in JunB-defizienten Knochenmarkzellen ausreicht, um das Entstehen von Leukämien in diesen Empfängermäusen zu verhindern.

Künftige Untersuchungen zur JunB-abhängigen Regulation von CBF $\beta$  sollen somit zum weiteren Verständnis physiologischer Vorgänge wie der Angiogenese, der Knochenentwicklung und der Hämatopoese beitragen und könnten außerdem bei der Aufklärung pathologischer Mechanismen von Knochenerkrankungen oder Leukämien sowie bei Krankheiten mit deregulierter Angiogenese von großem Nutzen sein.

---

## 5 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* 219:526-38.
- Adams RH (2003): Molecular control of arterial-venous blood vessel identity. *J Anat* 202:105-12.
- 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* 14:3191-203.
- Alfranca A, Gutierrez MD, Vara A, Aragonés J, Vidal F, Landazuri MO (2002): c-Jun and hypoxia-inducible factor 1 functionally cooperate in hypoxia-induced gene transcription. *Mol Cell Biol* 22:12-22.
- Andrecht S, Kolbus A, Hartenstein B, Angel P, Schorpp-Kistner M (2002): Cell cycle promoting activity of JunB through cyclin A activation. *J Biol Chem* 277:35961-8.
- Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P (1987a): 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol Cell Biol* 7:2256-66.
- Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M (1988): The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55:875-85.
- Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M (1987b): Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49:729-39.
- Angel P, Karin M (1991): The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072:129-57.
- Angel P, Karin M (1992): Specific members of the Jun protein family regulate collagenase expression in response to various extracellular stimuli. *Matrix Suppl* 1:156-64.
- 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* 85:221-8.
- Bakiri L, Lallemand D, Bossy-Wetzel E, Yaniv M (2000): Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *Embo J* 19:2056-68.
- Bandyopadhyay RS, Phelan M, Faller DV (1995): Hypoxia induces AP-1-regulated genes and AP-1 transcription factor binding in human endothelial and other cell types. *Biochim Biophys Acta* 1264:72-8.
- Bergman MR, Cheng S, Honbo N, Piacentini L, Karliner JS, Lovett DH (2003): A functional activating protein 1 (AP-1) site regulates matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) transcription by cardiac cells through interactions with JunB-Fra1 and JunB-FosB heterodimers. *Biochem J* 369:485-96.
- Berstine EG, Hooper ML, Grandchamp S, Ephrussi B (1973): Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:3899-903.
- Bonizzi G, Karin M (2004): The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25:280-8.
- Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, Angel P, Woodgett JR, Karin M, Hunter T (1991): Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 64:573-84.
- Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J (2005): Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* 17:1-9.
- Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W (1992): Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 114:521-32.
- 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* 204:228-39.
- Brown JR, Ye H, Bronson RT, Dikkes P, Greenberg ME (1996): A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fosB. *Cell* 86:297-309.

- Bruick RK (2000): Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9082-7.
- Carmeliet P (2003): Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9:653-60.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein 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* 380:435-9.
- Carmeliet P, Jain RK (2000): Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-57.
- Castilla LH, Garrett L, Adya N, Orlic D, Dutra A, Anderson S, Owens J, Eckhaus M, Bodine D, Liu PP (1999): The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia. *Nat Genet* 23:144-6.
- Castilla LH, Wijmenga C, Wang Q, Stacy T, Speck NA, Eckhaus M, Marin-Padilla M, Collins FS, Wynshaw-Boris A, Liu PP (1996): Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knocked-in leukemia gene CBFB-MYH11. *Cell* 87:687-96.
- Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, Lanier LL (2000): Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12:721-7.
- Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA (2003): Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 17:1263-93.
- Chang L, Karin M (2001): Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40.
- Chen L, Glover JN, Hogan PG, Rao A, Harrison SC (1998): Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* 392:42-8.
- Chen YF, Shin SJ, Lin SR (2005): Ets1 was significantly activated by ERK1/2 in mutant K-ras stably transfected human adrenocortical cells. *DNA Cell Biol* 24:126-32.

- Chinenov Y, Kerppola TK (2001): Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 20:2438-52.
- Chiu R, Angel P, Karin M (1989): Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell* 59:979-86.
- Cleaver O, Krieg PA (1999): Molecular mechanisms of vascular development. in: Harvey RP, Rosenthal N. (Eds) 1999. *Heart Development*. 221-252. San Diego: Academic Press.
- Cleaver O, Melton DA (2003): Endothelial signaling during development. *Nat Med* 9:661-8.
- Coffer P, de Jonge M, Mettouchi A, Binetruy B, Ghysdael J, Kruijer W (1994): junB promoter regulation: Ras mediated transactivation by c-Ets-1 and c-Ets-2. *Oncogene* 9:911-21.
- 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* 8:702-10.
- Conrad PW, Freeman TL, Beitner-Johnson D, Millhorn DE (1999a): EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J Biol Chem* 274:33709-13.
- Conrad PW, Rust RT, Han J, Millhorn DE, Beitner-Johnson D (1999b): Selective activation of p38alpha and p38gamma by hypoxia. Role in regulation of cyclin D1 by hypoxia in PC12 cells. *J Biol Chem* 274:23570-6.
- Damert A, Ikeda E, Risau W (1997): Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-induciblefactor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem J* 327 (Pt 2):419-23.
- Davis RJ (2000): Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103:239-52.
- Dorsam ST, Ferrell CM, Dorsam GP, Derynck MK, Vijapurkar U, Khodabakhsh D, Pau B, Bernstein H, Haqq CM, Largman C, Lawrence HJ (2004): The transcriptome of the leukemogenic homeoprotein HOXA9 in human hematopoietic cells. *Blood* 103:1676-84.

- Dorsey MJ, Tae HJ, Sollenberger KG, Mascarenhas NT, Johansen LM, Taparowsky EJ (1995): B-ATF: a novel human bZIP protein that associates with members of the AP-1 transcription factor family. *Oncogene* 11:2255-65.
- Dougherty CJ, Kubasiak LA, Prentice H, Andreka P, Bishopric NH, Webster KA (2002): Activation of c-Jun N-terminal kinase promotes survival of cardiac myocytes after oxidative stress. *Biochem J* 362:561-71.
- Drake CJ (2003): Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69:73-82.
- 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* 8:1897-909.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM (1995): Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146:1029-39.
- Eferl R, Sibilica M, Hilberg F, Fuchsbichler A, Kufferath I, Guertl B, Zenz R, Wagner EF, Zatloukal K (1999): Functions of c-Jun in liver and heart development. *J Cell Biol* 145:1049-61.
- Faller DV (1999): Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:74-84.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13.
- Ferrara N (1999): Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 237:1-30.
- 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* 380:439-42.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669-76.

- Figueroa YG, Chan AK, Ibrahim R, Tang Y, Burow ME, Alam J, Scandurro AB, Beckman BS (2002): NF-kappaB plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression. *Exp Hematol* 30:1419-27.
- Findlay JK (1986): Angiogenesis in reproductive tissues. *J Endocrinol* 111:357-66.
- Florin L, Hummerich L, Dittrich BT, Kokocinski F, Wrobel G, Gack S, Schorpp-Kistner M, Werner S, Hahn M, Lichter P, Szabowski A, Angel P (2004): Identification of novel AP-1 target genes in fibroblasts regulated during cutaneous wound healing. *Oncogene* 23:7005-17.
- Florin L, Schorpp-Kistner M, Szabowski A, Angel P (2005): Delayed wound healing and epidermal hyperproliferation in mice lacking JunB in the skin. Zur Veröffentlichung eingereicht bei *J Invest Derm*.
- Folkman J (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-6.
- 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* 126:3015-25.
- 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. *Mol Cell Biol* 16:4604-13.
- Frazier-Jessen MR, Thompson CD, Brown R, Rawat R, Nordan RP, Feldman GM (2002): NF-kappaB elements contribute to junB inducibility by lipopolysaccharide in the murine macrophage cell line RAW264.7. *FEBS Lett* 513:203-7.
- Garay M, Gaarde W, Monia BP, Nero P, Cioffi CL (2000): Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by an antisense oligonucleotide targeted to JNK1 in human kidney cells. *Biochem Pharmacol* 59:1033-43.
- Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R (2004): The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev* 18:2183-94.



- Grignani F, Kinsella T, Mencarelli A, Valtieri M, Riganelli D, Grignani F, Lanfrancone L, Peschle C, Nolan GP, Pelicci PG (1998): High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res* 58:14-9.
- Gruda MC, van Amsterdam J, Rizzo CA, Durham SK, Lira S, Bravo R (1996): Expression of FosB during mouse development: normal development of FosB knockout mice. *Oncogene* 12:2177-85.
- Haddad JJ (2004): Hypoxia and the regulation of mitogen-activated protein kinases: gene transcription and the assessment of potential pharmacologic therapeutic interventions. *Int Immunopharmacol* 4:1249-85.
- Hai T, Curran T (1991): Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3720-4.
- Harris AL (2002): Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2:38-47.
- Hartenstein B, Teurich S, Hess J, Schenkel J, Schorpp-Kistner M, Angel P (2002): Th2 cell-specific cytokine expression and allergen-induced airway inflammation depend on JunB. *Embo J* 21:6321-9.
- Hayden MS, Ghosh S (2004): Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18:2195-224.
- Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C (2001): Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 153:543-53.
- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004): AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117:5965-73.
- Hess J, Hartenstein B, Teurich S, Schmidt D, Schorpp-Kistner M, Angel P (2003): Defective endochondral ossification in mice with strongly compromised expression of JunB. *J Cell Sci* 116:4587-96.
- Hess J, Porte D, Munz C, Angel P (2001): AP-1 and Cbfa/runt physically interact and regulate parathyroid hormone-dependent MMP13 expression in osteoblasts through a new osteoblast-specific element 2/AP-1 composite element. *J Biol Chem* 276:20029-38.

- Hilberg F, Aguzzi A, Howells N, Wagner EF (1993): c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* 365:179-81.
- 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* 95:9349-54.
- Hirschi KK, Rohovsky SA, Beck LH, Smith SR, D'Amore PA (1999): Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ Res* 84:298-305.
- 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 O<sub>2</sub> sensing. *Science* 292:464-8.
- 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 O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12:149-62.
- 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 O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468-72.
- Jain RK (2003): Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9:685-93.
- 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. *J Biol Chem* 272:19253-60.
- Jochum W, Passegue E, Wagner EF (2001): AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 20:2401-12.
- Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V (1992): Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* 71:577-86.
- Johnson RS, van Lingen B, Papaioannou VE, Spiegelman BM (1993): A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev* 7:1309-17.

- Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P (1990): Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62:1189-204.
- Karin M, Liu Z, Zandi E (1997): AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:240-6.
- Kearney JB, Kappas NC, Ellerstrom C, DiPaola FW, Bautch VL (2004): The VEGF receptor flt-1 (VEGFR-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis. *Blood* 103:4527-35.
- Kenner L, Hoebertz A, Beil T, Keon N, Karreth F, Eferl R, Scheuch H, Szremska A, Amling M, Schorpp-Kistner M, Angel P, Wagner EF (2004): Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *J Cell Biol* 164:613-23.
- Kiefer F, Courtneidge SA, Wagner EF (1994): Oncogenic properties of the middle T antigens of polyomaviruses. *Adv Cancer Res* 64:125-57.
- Kitabayashi I, Kawakami Z, Matsuoka T, Chiu R, Gachelin G, Yokoyama K (1993): Two cis-regulatory elements that mediate different signaling pathways for serum-dependent activation of the junB gene. *J Biol Chem* 268:14482-9.
- Kitamura T, Onishi M, Kinoshita S, Shibuya A, Miyajima A, Nolan GP (1995): Efficient screening of retroviral cDNA expression libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9146-50.
- Ko MS, Threat TA, Wang X, Horton JH, Cui Y, Wang X, Pryor E, Paris J, Wells-Smith J, Kitchen JR, Rowe LB, Eppig J, Satoh T, Brant L, Fujiwara H, Yotsumoto S, Nakashima H (1998): Genome-wide mapping of unselected transcripts from extraembryonic tissue of 7.5-day mouse embryos reveals enrichment in the t-complex and under-representation on the X chromosome. *Hum Mol Genet* 7:1967-78.
- König H, Ponta H, Rahmsdorf U, Buscher M, Schönthal A, Rahmsdorf HJ, Herrlich P (1989): Autoregulation of fos: the dyad symmetry element as the major target of repression. *Embo J* 8:2559-66.
- Koong AC, Chen EY, Giaccia AJ (1994a): Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res* 54:1425-30.

- Koong AC, Chen EY, Mivechi NF, Denko NC, Stambrook P, Giaccia AJ (1994b): Hypoxic activation of nuclear factor-kappa B is mediated by a Ras and Raf signaling pathway and does not involve MAP kinase (ERK1 or ERK2). *Cancer Res* 54:5273-9.
- 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* 209:254-67.
- Kozak KR, Abbott B, Hankinson O (1997): ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev Biol* 191:297-305.
- Krappmann D, Wegener E, Sunami Y, Esen M, Thiel A, Mordmuller B, Scheidereit C (2004): The IkappaB kinase complex and NF-kappaB act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1. *Mol Cell Biol* 24:6488-500.
- Kundu M, Chen A, Anderson S, Kirby M, Xu L, Castilla LH, Bodine D, Liu PP (2002): Role of Cbfb in hematopoiesis and perturbations resulting from expression of the leukemogenic fusion gene Cbfb-MYH11. *Blood* 100:2449-56.
- Kundu M, Chen A, Anderson S, Kirby M, Xu L, Castilla LH, Bodine D, Liu PP (2002a): Role of Cbfb in hematopoiesis and perturbations resulting from expression of the leukemogenic fusion gene Cbfb-MYH11. *Blood* 100:2449-56.
- Kundu M, Javed A, Jeon JP, Horner A, Shum L, Eckhaus M, Muenke M, Lian JB, Yang Y, Nuckolls GH, Stein GS, Liu PP (2002b): Cbfbeta interacts with Runx2 and has a critical role in bone development. *Nat Genet* 32:639-44.
- Kyriakis JM, Avruch J (2001): Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81:807-69.
- Laderoute KR, Calaoagan JM, Gustafson-Brown C, Knapp AM, Li GC, Mendonca HL, Ryan HE, Wang Z, Johnson RS (2002): The response of c-jun/AP-1 to chronic hypoxia is hypoxia-inducible factor 1 alpha dependent. *Mol Cell Biol* 22:2515-23.
- Laderoute KR, Calaoagan JM, Knapp M, Johnson RS (2004): Glucose utilization is essential for hypoxia-inducible factor 1 alpha-dependent phosphorylation of c-Jun. *Mol Cell Biol* 24:4128-37.

- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Land SC (2003): Oxygen-sensing pathways and the development of mammalian gas exchange. *Redox Rep* 8:325-40.
- 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* 16:1466-71.
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML (2002): Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295:858-61.
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML (2002b): Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295:858-61.
- Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988): The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759-64.
- Le YJ, Corry PM (1999): Hypoxia-induced bFGF gene expression is mediated through the JNK signal transduction pathway. *Mol Cell Biochem* 202:1-8.
- 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* 273:6417-23.
- Li B, Tournier C, Davis RJ, Flavell RA (1999): Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *Embo J* 18:420-32.
- Lin A, Frost J, Deng T, Smeal T, al-Alawi N, Kikkawa U, Hunter T, Brenner D, Karin M (1992): Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell* 70:777-89.
- 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. *Circ Res* 77:638-43.

- Lopez-Rovira T, Chalaux E, Rosa JL, Bartrons R, Ventura F (2000): Interaction and functional cooperation of NF-kappa B with Smads. Transcriptional regulation of the junB promoter. *J Biol Chem* 275:28937-46.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75.
- Lukiw WJ, Otlecz A, Lambrou G, Grueninger M, Finley J, Thompson HW, Bazan NG (2003): Coordinate activation of HIF-1 and NF-kappaB DNA binding and COX-2 and VEGF expression in retinal cells by hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4163-70.
- Mahon PC, Hirota K, Semenza GL (2001): FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 15:2675-86.
- 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.
- 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* 386:403-7.
- Martin ME, Piette J, Yaniv M, Tang WJ, Folk WR (1988): Activation of the polyomavirus enhancer by a murine activator protein 1 (AP1) homolog and two contiguous proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5839-43.
- Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, Krappmann D, Lietz A, Jundt F, Bommert K, Mechtal-Grigoriou F, Stein H, Dorken B, Scheiderei C (2002): Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *Embo J* 21:4104-13.
- May D, Itin A, Gal O, Kalinski H, Feinstein E, Keshet E (2005): Ero1-L alpha plays a key role in a HIF-1-mediated pathway to improve disulfide bond formation and VEGF secretion under hypoxia: implication for cancer. *Oncogene* 24:1011-20.

- Michiels C, De Leener F, Arnould T, Dieu M, Remacle J (1994): Hypoxia stimulates human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens: role of prostaglandins and bFGF. *Exp Cell Res* 213:43-54.
- Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnurch 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* 72:835-46.
- Miller J, Horner A, Stacy T, Lowrey C, Lian JB, Stein G, Nuckolls GH, Speck NA (2002): The core-binding factor beta subunit is required for bone formation and hematopoietic maturation. *Nat Genet* 32:645-9.
- Miner JN, Yamamoto KR (1992): The basic region of AP-1 specifies glucocorticoid receptor activity at a composite response element. *Genes Dev* 6:2491-501.
- Minet E, Arnould T, Michel G, Roland I, Mottet D, Raes M, Remacle J, Michiels C (2000): ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* 468:53-8.
- Minet E, Michel G, Mottet D, Piret JP, Barbieux A, Raes M, Michiels C (2001): c-JUN gene induction and AP-1 activity is regulated by a JNK-dependent pathway in hypoxic HepG2 cells. *Exp Cell Res* 265:114-24.
- Minet E, Michel G, Mottet D, Raes M, Michiels C (2001): Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med* 31:847-55.
- Miyashita H, Yamazaki T, Akada T, Niizeki O, Ogawa M, Nishikawa S, Sato Y (2002): A mouse orthologue of puromycin-insensitive leucyl-specific aminopeptidase is expressed in endothelial cells and plays an important role in angiogenesis. *Blood* 99:3241-9.
- Morgenstern JP, Land H (1990): Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* 18:3587-96.
- Muller JM, Krauss B, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Rupec RA (1997): Hypoxia induces c-fos transcription via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 272:23435-9.

- Nagy A (2000): Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109.
- Nakajima K, Kusafuka T, Takeda T, Fujitani Y, Nakae K, Hirano T (1993): Identification of a novel interleukin-6 response element containing an Ets-binding site and a CRE-like site in the junB promoter. *Mol Cell Biol* 13:3027-41.
- Namba K, Abe M, Saito S, Satake M, Ohmoto T, Watanabe T, Sato Y (2000): Indispensable role of the transcription factor PEBP2/CBF in angiogenic activity of a murine endothelial cell MSS31. *Oncogene* 19:106-14.
- Niizeki O, Miyashita H, Yamazaki T, Akada T, Abe M, Yoshida N, Watanabe T, Yoshimatsu H, Sato Y (2004): Transcriptional regulation of angiogenesis-related puromycin-insensitive leucyl-specific aminopeptidase in endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 424:63-71.
- Norris ML, Millhorn DE (1995): Hypoxia-induced protein binding to O<sub>2</sub>-responsive sequences on the tyrosine hydroxylase gene. *J Biol Chem* 270:23774-9.
- O'Rourke JF, Dachs GU, Gleadle JM, Maxwell PH, Pugh CW, Stratford IJ, Wood SM, Ratcliffe PJ (1997): Hypoxia response elements. *Oncol Res* 9:327-32.
- O'Shea EK, Rutkowski R, Stafford WF, 3rd, Kim PS (1989): Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. *Science* 245:646-8.
- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR (1996): AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84:321-30.
- Onishi M, Kinoshita S, Morikawa Y, Shibuya A, Phillips J, Lanier LL, Gorman DM, Nolan GP, Miyajima A, Kitamura T (1996): Applications of retrovirus-mediated expression cloning. *Exp Hematol* 24:324-9.
- Passegue E, Jochum W, Schorpp-Kistner M, Mohle-Steinlein U, Wagner EF (2001): Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage. *Cell* 104:21-32.
- Passegue E, Wagner EF (2000): JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *Embo J* 19:2969-79.



- Passegue E, Wagner EF, Weissman IL (2004): JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell* 119:431-43.
- Patan S (2000): Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol* 50:1-15.
- Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH (2000): The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8386-91.
- Perez-Albuerne ED, Schatteman G, Sanders LK, Nathans D (1993): Transcriptional regulatory elements downstream of the JunB gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11960-4.
- Peterson BR, Sun LJ, Verdine GL (1996): A critical arginine residue mediates cooperativity in the contact interface between transcription factors NFAT and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13671-6.
- Plendl J (2000): Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anat Histol Embryol* 29:257-66.
- 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.
- Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F (1996): Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98:600-3.
- Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schutz G (1998): DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93:531-41.
- 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* 274:32631-7.
- Risau W, Flamme I (1995): Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73-91.
- Ryan HE, Lo J, Johnson RS (1998): HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 17:3005-15.

- Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS (2000): Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 60:4010-5.
- Saha MS, Cox EA, Sipe CW (2004): Mechanisms regulating the origins of the vertebrate vascular system. *J Cell Biochem* 93:46-56.
- Salnikow K, Kluz T, Costa M, Piquemal D, Demidenko ZN, Xie K, Blagosklonny MV (2002): The regulation of hypoxic genes by calcium involves c-Jun/AP-1, which cooperates with hypoxia-inducible factor 1 in response to hypoxia. *Mol Cell Biol* 22:1734-41.
- Sassone-Corsi P, Sisson JC, Verma IM (1988): Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature* 334:314-9.
- 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* 376:70-4.
- Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS (2001): Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 15:2865-76.
- Schmedtje JF, Jr., Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS (1997): Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 272:601-8.
- Schmidt-Ullrich R, Aebischer T, Hulsken J, Birchmeier W, Klemm U, Scheidereit C (2001): Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices. *Development* 128:3843-53.
- Schmidt D (2001): Role of JunBin Hypoxia-mediated Cell Response and Tumour Angiogenesis. Inauguraldissertation an der Universität Freiburg.
- Schönthal A, Buscher M, Angel P, Rahmsdorf HJ, Ponta H, Hattori K, Chiu R, Karin M, Herrlich P (1989): The Fos and Jun/AP-1 proteins are involved in the downregulation of Fos transcription. *Oncogene* 4:629-36.

- Schorpp-Kistner M, Wang ZQ, Angel P, Wagner EF (1999): JunB is essential for mammalian placentation. *Embo J* 18:934-48.
- Schorpp M, Jager R, Schellander K, Schenkel J, Wagner EF, Weiher H, Angel P (1996): The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice. *Nucleic Acids Res* 24:1787-8.
- Schreiber M, Wang ZQ, Jochum W, Fetka I, Elliott C, Wagner EF (2000): Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1. *Development* 127:4937-48.
- Schutte J, Viallet J, Nau M, Segal S, Fedorko J, Minna J (1989): jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell* 59:987-97.
- Segura I, Serrano A, De Buitrago GG, Gonzalez MA, Abad JL, Claveria C, Gomez L, Bernad A, Martinez AC, Riese HH (2002): Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis. *Faseb J* 16:833-41.
- Semenza GL (2003): Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3:721-32.
- Seta KA, Millhorn DE (2004): Functional genomics approach to hypoxia signaling. *J Appl Physiol* 96:765-73.
- 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* 376:62-6.
- Shaulian E, Karin M (2001): AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20:2390-400.
- Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, Ng YS, Adamis AP, D'Amore PA (1996): The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem* 271:3877-83.
- Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E (1995): Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:768-72.
- Smeal T, Angel P, Meek J, Karin M (1989): Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes. *Genes Dev* 3:2091-100.

- Smeal T, Binetruy B, Mercola D, Grover-Bardwick A, Heidecker G, Rapp UR, Karin M (1992): Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Mol Cell Biol* 12:3507-13.
- Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, Gutkind JS (2000): The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res* 60:4873-80.
- Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL (2001): HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 61:6669-73.
- Speck NA, Gilliland DG (2002): Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2:502-13.
- 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* 18:3112-9.
- 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. *Cell* 87:1171-80.
- Taipale J, Makinen T, Arighi E, Kukk E, Karkkainen M, Alitalo K (1999): Vascular endothelial growth factor receptor-3. *Curr Top Microbiol Immunol* 237:85-96.
- Tallquist MD, Soriano P (2000): Epiblast-restricted Cre expression in MORE mice: a tool to distinguish embryonic vs. extra-embryonic gene function. *Genesis* 26:113-5.
- Tanaka TS, Jaradat SA, Lim MK, Kargul GJ, Wang X, Grahovac MJ, Pantano S, Sano Y, Piao Y, Nagaraja R, Doi H, Wood WH, 3rd, Becker KG, Ko MS (2000): Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9127-32.
- Teurich S, Angel P (1995): The glucocorticoid receptor synergizes with Jun homodimers to activate AP-1-regulated promoters lacking GR binding sites. *Chem Senses* 20:251-5.

- Thepot D, Weitzman JB, Barra J, Segretain D, Stinnakre MG, Babinet C, Yaniv M (2000): Targeted disruption of the murine junD gene results in multiple defects in male reproductive function. *Development* 127:143-53.
- Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD (2000): Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 6:460-3.
- 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* 12:3320-4.
- Todaró GJ, Green H (1963): Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17:299-313.
- Treier M, Staszewski LM, Bohmann D (1994): Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* 78:787-98.
- Tuckermann JP, Reichardt HM, Arribas R, Richter KH, Schutz G, Angel P (1999): The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. *J Cell Biol* 147:1365-70.
- Vailhe B, Vittet D, Feige JJ (2001): In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 81:439-52.
- van Dam H, Castellazzi M (2001): Distinct roles of Jun: Fos and Jun: ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 20:2453-64.
- van Dam H, Huguier S, Kooistra K, Baguet J, Vial E, van der Eb AJ, Herrlich P, Angel P, Castellazzi M (1998): Autocrine growth and anchorage independence: two complementing Jun-controlled genetic programs of cellular transformation. *Genes Dev* 12:1227-39.
- van der Weyden L, Adams DJ, Bradley A (2002): Tools for targeted manipulation of the mouse genome. *Physiol Genomics* 11:133-64.
- Vokes SA, Krieg PA (2002): Endoderm is required for vascular endothelial tube formation, but not for angioblast specification. *Development* 129:775-85.

- Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA (1996b): Disruption of the *Cbfa2* gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3444-9.
- Wang Q, Stacy T, Miller JD, Lewis AF, Gu TL, Huang X, Bushweller JH, Bories JC, Alt FW, Ryan G, Liu PP, Wynshaw-Boris A, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA (1996a): The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. *Cell* 87:697-708.
- Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Mohle-Steinlein U, Ruther U, Wagner EF (1992): Bone and haematopoietic defects in mice lacking *c-fos*. *Nature* 360:741-5.
- Webster NJ, Green KN, Settle VJ, Peers C, Vaughan PF (2004): Altered processing of the amyloid precursor protein and decreased expression of ADAM 10 by chronic hypoxia in SH-SY5Y: no role for the stress-activated JNK and p38 signalling pathways. *Brain Res Mol Brain Res* 130:161-9.
- Welsh DJ, Peacock AJ, MacLean M, Harnett M (2001): Chronic hypoxia induces constitutive p38 mitogen-activated protein kinase activity that correlates with enhanced cellular proliferation in fibroblasts from rat pulmonary but not systemic arteries. *Am J Respir Crit Care Med* 164:282-9.
- Weston CR, Davis RJ (2002): The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* 12:14-21.
- Whitmarsh AJ, Davis RJ (1996): Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 74:589-607.
- Wisdom R (1999): AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res* 253:180-5.
- Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J (1993): *flk-1*, an *flt*-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118:489-98.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000): Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407:242-8.

- Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, Karin M (1990): Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62:1205-15.
- Yang MY, Liu TC, Chang JG, Lin PM, Lin SF (2003): JunB gene expression is inactivated by methylation in chronic myeloid leukemia. *Blood* 101:3205-11.
- Yoshida CA, Furuichi T, Fujita T, Fukuyama R, Kanatani N, Kobayashi S, Satake M, Takada K, Komori T (2002): Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nat Genet* 32:633-8.
- Zampetaki A, Mitsialis SA, Pfeilschifter J, Kourembanas S (2004): Hypoxia induces macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) gene expression in murine macrophages via NF-kappaB: the prominent role of p42/ p44 and PI3 kinase pathways. *Faseb J* 18:1090-2.
- Zhang Y, Feng XH, Derynck R (1998): Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* 394:909-13.
- Zhu Y, Sun Y, Xie L, Jin K, Sheibani N, Greenberg DA (2003): Hypoxic induction of endoglin via mitogen-activated protein kinases in mouse brain microvascular endothelial cells. *Stroke* 34:2483-8.

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe, und dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Mannheim, den 12. Juli 2005

---

Oliver Pein