

Generierung und phänotypische Analyse von Proteinkinase C δ/ϵ - doppelsefizienten Mäusen

Dem Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Frank Sacher
geboren am 20. November 1974 in Hannover

2004

Diese Arbeit wurde in der Zeit von April 2001 bis November 2004 am Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie unter der Betreuung von Dr. Michael Leitges und Prof. Dr. Gregor Eichele angefertigt.

Referent:

Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer
Universität Hannover

Korreferent:

Prof. Dr. Gregor Eichele
Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie, Hannover

Tag der Promotion: 20.12.2004

DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Dr. Michael Leitges für die Gelegenheit, meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Vor allem sein persönliches Interesse am Fortgang der Arbeit, zahlreiche fruchtbare Diskussionen und seine Anleitung zur selbstständigen wissenschaftlichen Arbeit haben entscheidend zur erfolgreichen Durchführung meines Projektes beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Gregor Eichele bedanke ich mich neben einer zur Verfügung gestellten exzellenten Ausstattung für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer möchte ich mich ganz herzlich für die freundliche Übernahme der Begutachtung und Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich Biologie bedanken.

Frau Dr. Gudrun Brandes danke ich für die überaus produktive Zusammenarbeit und Durchführung der elektronenmikroskopischen Analysen.

Weiterhin danke ich Nadine Naujokat, Alexandra Menneking, Hans-Otto Bader und Anja Schönfeld für die ausgezeichnete Pflege meiner Mäuse sowie für ihre Zusammenarbeit, ohne die die Etablierung und Haltung der PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Mauslinie sicherlich nicht möglich gewesen wäre.

Gesa Walsemann, Dr. Axel Visel und Dr. Henrik Oster sei außerdem herzlich gedankt für ihr konstruktives Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Dank gilt auch allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Instituts vor allem Judit Kovac, Miki Tsukada, Pablo Szendro, Stephan Busche, Diya Abraham, Ina Klebba, Uschi Braun, Sabine Bergmann, Alexander Prokscha, Carsten Möller, Marei Warnecke, Friederike Kruse, Susanne Krause, und Markus Uhr. Sie alle haben durch ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft zu dem angenehmen Arbeitsklima beigetragen, das ich an unserem Institut genießen durfte.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und Freunden danken für ihre Unterstützung während der letzten vier Jahre.

INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Zusammenfassung	7
Summary	8
1 Einleitung	9
1.1 Die Protein Kinase C-Familie	9
1.1.1 Regulierung	11
1.1.2 Adapter- und Gerüstproteine in der Regulierung von PKCs	12
1.1.3 Allgemeine Funktion der PKC in der Maus	13
1.1.3.1 Die Protein Kinasen PKC δ und PKC ϵ	14
1.2 Generelle embryonale vaskuläre Entwicklung	15
1.2.1 Embryonaler Prozess der vaskulären Entwicklung	15
1.2.1.1 Vaskulogenese	15
1.2.1.2 Angiogenese	17
1.3 Klassische Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren in der vaskulären Entwicklung	18
1.3.1 VEGF/VEGFR	19
1.3.2 Tie/Ang	21
1.3.3 EphB/EphrinB	23
1.3.4 Delta/Notch	24
1.3.5 FGF/FGFR	25
1.3.6 Weitere Rezeptoren	27
1.4 Adhäsions-Moleküle in der vaskulären Entwicklung	28
1.4.1 Cadherine	28
1.5 Transkriptionelle Kontrolle der vaskulären Entwicklung	29
1.5.1 Ets-Familie	29
1.5.2 PAS-bHLH, bHLH und MADS-Box	30
1.6 Zielsetzung	32
2 Ergebnisse	33
2.1 Expressionsanalyse von PKC δ/ϵ während der Embryogenese der Maus	33
2.1.1 Expression von PKC δ während der Embryogenese	33
2.1.1.1 Kardiovaskuläre Expression	33
2.1.1.2 Neuronale Expression	35
2.1.1.3 Weitere Expressionsdomänen	36
2.1.2 Expression von PKC ϵ während der Embryogenese	37
2.1.2.1 Kardiovaskuläre Expression	38
2.1.2.2 Neuronale Expression	39
2.1.2.3 Weitere Expressionsdomänen	42
2.2 Generierung und phänotypische <i>Charakterisierung der PKCδ/ϵ- doppelfizienten Mauslinie</i>	42
2.2.1 Genotyp-Häufigkeiten unter den Jungtieren und Embryonen	42
2.2.2 Phänotypische Beschreibung der letalen Genotypen	43
2.2.3 Immunhistochemische Darstellung des embryonalen vaskulären Systems	45
2.2.4 Histologische Darstellung von Plazenta und Dottersack	45
2.3 Allantois-Kultur	47
2.4 Immunhistochemische Darstellung von vaskulären glatten Muskelzellen des embryonalen vaskulären Systems	49

2.5	Elektronenmikroskopische Analyse von embryonalen Gewebeschnitten	51
2.6	Molekulare Analyse der PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Mauslinie	52
2.6.1	Quantitative Expressionsanalyse von Angiogenese-relevanten Genen.....	53
2.6.1.1	cDNA-Array.....	53
2.6.2	Quantitative Analyse der cDNA-Array-Kandidaten mittels <i>real-time</i> -PCR.....	54
2.6.2.1	<i>Real-time</i> -PCR-Quantifizierung der Expression von N-Cadherin, T-Cadherin, Fli-1, Erg-1 und PDGF-bb.....	55
2.7	Untersuchungen zur Funktion von PKC δ / ϵ in embryonalen murinen Endothelzellen	57
2.7.1	Charakterisierung der embryonalen Endothelzellen.....	58
2.7.2	Untersuchungen zur VEGF ₁₆₅ -abhängigen Aktivierung von PKC δ / ϵ	58
2.7.3	Untersuchungen zur VEGF ₁₆₅ -abhängigen Aktivierung von Erk1/2 und p38... ..	59
2.7.4	Induktion der Expression von Ets-1	60
2.8	Interaktionen von RTKs und PKCs.....	61
2.8.1	Koexpression von VEGFR-2, Tie-2 mit PKC δ / ϵ in COS7-Zellen	61
2.8.2	GST-RTK/PKC δ / ϵ - <i>pulldown</i> in MEECs	63
3	Diskussion.....	64
3.1	Die Expression von PKC δ und PKC ϵ in der Embryogenese der Maus.....	64
3.2	Untersuchungen zur Funktion von PKC δ und PKC ϵ in der Maus	65
3.2.1	Der Einfluss von PKC δ und PKC ϵ auf die embryonale Gefäßentwicklung.....	67
3.2.2	Die PKC δ ^{-/-} /PKC ϵ ^{+/-} /PKC δ ^{-/-} /PKC ϵ ^{+/-} -Genotypen im Vergleich.....	70
3.2.3	PKC δ / ϵ -abhängige Differenzierung von vaskulären glatten Muskelzellen	71
3.3	Der Einfluss von PKC δ / ϵ auf die Expression von Genen der Gefäßentwicklung	73
3.4	Untersuchungen zur VEGF-abhängigen Signalkaskade in MEECs.....	75
3.5	Die Interaktion von PKC δ und PKC ϵ mit Rezeptoren der Gefäßentwicklung..	76
3.6	PKC δ / ϵ -Signaltransduktion in der murinen vaskulären Entwicklung – Das Gesamtbild.....	76
3.7	PKC δ und PKC ϵ : Die Bedeutung funktioneller Redundanz in der Embryogenese.....	79
4	Material und Methoden.....	81
4.1	Behandlung und Haltung der Versuchstiere	81
4.2	Generierung der PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Mauslinie	81
4.3	<i>Whole mount in situ</i> -Hybridisierung (wm-ISH).....	81
4.4	ISH auf Paraffinschnitten	83
4.5	Immunhistochemie mit PFA-fixierten und Paraffin- eingebetteten Gewebeschnitten	84
4.6	<i>Whole mount</i> -Immunhistochemie (wm-IHC) mit Mausembryonen.....	84
4.7	β -Galactosidasefärbung von transgenen Mausembryonen	85
4.8	Immunfluoreszenz auf Zellen	85
4.9	Quantitative RT-PCR (Q-PCR)	85
4.10	cDNA-Array	86
4.11	Allantois-Kultur.....	87
4.12	Generierung und Kultivierung von embryonalen Endothelzellen aus der Maus (MEECs)	87
4.13	Wachstumsfaktor-Stimulierung von MEECs.....	88
4.14	Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	88
4.15	GST- <i>pulldown</i>	89
4.16	Transfektion von COS7-Zellen.....	89
4.17	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	89
4.18	Präparation der Dottersack-DNA zur Genotypisierung von Mausembryonen ..	90

4.18.1	PCR-basiertes Genotypisieren	90
4.19	Oligonukleotide	91
4.20	Plasmide und Vektoren	93
4.21	Antikörper	93
	Abkürzungen	95
	Referenzen	97
	Lebenslauf	109
	Publikationsliste	110
	Erklärung	111

ZUSAMMENFASSUNG

Die Protein Kinase C-Familie (PKC) ist eine der meistuntersuchten Gruppen von Serin/Threonin-Kinasen der intrazellulären Signaltransduktion. Es konnte gezeigt werden, dass Isoenzyme der PKC-Familie an vielen zellulären Prozessen beteiligt sind. Daher ist es erstaunlich, dass die Generierung von PKC-defizienten Mäusen in den meisten Fällen zu milden Phänotypen führt, die im Fall einer ursprünglich embryonalen Expression der PKC keine offensichtlichen entwicklungsbiologischen Schäden aufweisen. Dieses Phänomen könnte auf eine physiologisch-funktionelle Redundanz der Isoenzyme zurückzuführen sein.

Zur Untersuchung einer möglichen funktionellen Redundanz innerhalb der Familie der PKCs während der Embryogenese wurde nach überlappenden Expressionsdomänen verschiedener PKC-Isoenzyme gesucht. In dieser Arbeit konnte für PKC δ und PKC ϵ während der Embryogenese der Maus überlappende Expressionsdomänen in neuronalen und kardiovaskulären Bereichen bestimmt werden. Die darauf folgende Generierung von PKC δ/ϵ -doppeldefizienten Mäusen aus ursprünglich vitalen Einzelmutanten bestätigte die Hypothese, dass PKC δ und PKC ϵ funktionell redundant sind: PKC $\delta^{-/-}/PKC\epsilon^{-/-}$ - und PKC $\delta^{-/-}/PKC\epsilon^{+/-}$ -Mäuse sterben am Embryonaltag 10.5 aufgrund von drastischen Defekten des kardiovaskulären Gefäßsystems. Die detaillierte Charakterisierung des vaskulären Phänotyps zeigte, dass die PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz zur funktionellen Beeinträchtigung der embryonalen Vaskulo- und Angiogenese führt. Die Gefäßlumen der in der Vaskulogenese entwickelten dorsalen Aorten und Kardinalvenen sind drastisch verkleinert, die der während der Angiogenese ausgebildeten Kranielgefäße vergrößert. Überdies kommt es während der Angiogenese zu keiner Differenzierung von periendothelialen Zellen zu vaskulären glatten Muskelzellen.

Die elektronenmikroskopische Analyse von PKC δ/ϵ -doppeldefizienten Gefäßen konnte außerdem zeigen, dass es zu grundlegenden Veränderungen der molekularen Struktur des Endothels kommt: interzelluläre Kontakte zwischen den Endothelzellen weisen eine verminderte Proteindichte auf, Fokalkontakte sind stark reduziert und interzelluläre Kontakte zu periendothelialen Zellen sind nicht vorhanden. Untersuchungen zur molekularen Grundlage der vaskulären Defekte gaben Aufschluss über die durch die PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz beeinträchtigten Signaltransduktionswege. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PKC δ und PKC ϵ durch den vaskulären Endothelwachstumsfaktor VEGF reguliert werden. Außerdem wurde nachgewiesen, dass in der PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz der durch VEGF regulierte Transkriptionsfaktor Ets-1 und die durch Ets-1 regulierten Faktoren Fli-1, Ang2, VE-Cadherin und N-Cadherin vermindert exprimiert werden. Insbesondere die stark verminderte Expression der Adhäsionsproteine VE-Cadherin und N-Cadherin, die essentielle Funktionen in der Ausbildung von interzellulären Kontakten besitzen, trägt entscheidend zur Veränderung der molekularen Struktur des PKC δ/ϵ -doppeldefizienten Endothels bei.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse erstmalig für die Familie der PKCs einen Zusammenhang zwischen überlappender Genexpression und funktionellem Zusammenwirken einzelner Isoenzyme in der murinen Embryogenese. Es konnte gezeigt werden, dass die genetische Deletion von PKC δ und PKC ϵ zu einer Beeinträchtigung des VEGF-Signalweges führt. Dies resultiert letztendlich in einem generellen Defekt der embryonalen Gefäßentwicklung und führt zum Tod des Tiers am Embryonaltag 10.5

Schlagwörter: PKC, Angiogenese, Vaskulogenese, Embryogenese, Ets-1, Fli-1, N-Cadherin, VE-Cadherin, funktionelle Redundanz, VEGF, vaskulärer Defekt

SUMMARY

The protein kinase C family (PKC) is one of the most extensively studied groups of serine/threonine kinases in intracellular signal transduction. It has been shown that PKCs are involved in many different cellular processes. Therefore, it is surprising that the generation of PKC deficient mice results in almost all cases in mild phenotypes and in case of a native embryonic expression of the PKC with no obvious defects in embryonic development. This phenomenon can be attributed to the functional redundancy present within this family.

To study a putative functional redundancy within the PKC family during the embryonic development we looked for overlaps in the expression of different PKC isoforms during embryonic development. This work shows for PKC δ and PKC ϵ an overlapping expression pattern in neuronal and vascular domains. The generation of PKC δ/ϵ double deficient mice from originally viable single mutants confirmed the hypothesis that PKC δ and PKC ϵ are functionally redundant; PKC $\delta^{-/-}/$ PKC $\epsilon^{-/-}$ and PKC $\delta^{-/-}/$ PKC $\epsilon^{+/-}$ mice are lethal at embryonic day 10.5 due to defects in the cardiovascular development. The detailed analysis of the cardiovascular phenotype revealed that both vasculogenesis and angiogenesis are affected. The lumens of blood vessels originating from the vasculogenesis process such as the dorsal aorta and cardinal veins are reduced and the ones of angiogenesis origin such as the cranial vessels are dilated. In addition, no differentiation of periendothelial cells to vascular smooth muscle cells takes place during angiogenesis.

Electron microscopy analysis of the PKC δ/ϵ deficient vessels showed a severe malformation of the molecular structure of the endothelium; adherence junctions between endothelial cells have a reduced protein density, focal contacts are almost missing and the intercellular contacts to periendothelial cells are absent. Defining the molecular basis of the cardiovascular defect provided a deeper insight into the affected signal transduction pathway of the PKC δ/ϵ mutant. It is now proved that vascular endothelial growth factor VEGF regulates the PKC δ and the PKC ϵ activity. Consequently, the PKC δ/ϵ deficiency leads to a diminished expression of the VEGF downstream genes. The transcription- factor Ets-1 and some of its downstream genes such as the Fli-1, Ang2, VE-cadherin and the N-cadherin are down regulated. In particular, the diminished expression of the primary cell-cell adherence junction proteins VE-cadherin and N-cadherin in the endothelial cells are responsible for the defect in the molecular structure of the endothelium

In summary, this is the first time that an overlap in the expression could be connected with a functional interaction during embryonic development for members of the PKC family. It has been shown that the deficiency of PKC δ and PKC ϵ results in an impairment of the VEGF signalling. This leads to an overall defect in the embryonic vascular development and finally to embryonic mortality at E10.5.

Keywords: PKC, angiogenesis, vasculogenesis, embryogenesis, Ets-1, Fli-1, N-cadherin, VE-cadherin, functional redundancy, VEGF, vascular defect

1 Einleitung

1.1 Die Protein Kinase C-Familie

Die Entwicklung und Aufrechterhaltung von multizellulärem Leben erfordert eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z.B. Migration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Hierzu muss die Einzelzelle in der Lage sein, auf extrazelluläre Signale mit der Regulation ihrer Genexpression zu reagieren. Zu diesem Zweck existieren zwischen Signal- und Transkriptionsmaschinerie Netzwerke, die eine spezifische und erfolgreiche Signalübertragung garantieren.

Liganden binden an die extrazellulären Anteile von membranständigen Rezeptoren. Diese können, selbst oder über Signaltüberträger, Effektoren aktivieren, entweder direkt oder über Änderung der Verteilung der intrazellulären Konzentration von *second messengers*. Diese Effektoren regulieren selbst oder über weitere Zielproteine die Genexpression auf der Transkriptions- wie auf der Translationsebene.

Ein klassischer Signaltransduktionsweg wird durch die membranständigen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) vermittelt. Aktivierung der RTKs erfolgt durch Bindung des jeweiligen Liganden, was zur Dimerisierung und nachfolgender Autophosphorylierung führt und somit die Anlagerung von Signalüberträgern wie u.a. der Phospholipase C ermöglicht. Phospholipase C spaltet Phosphoinositid-4,5-bisphosphat in die als *second messenger* wirkenden Spaltprodukte sn-1,2-Diacylglycerin (DAG) und 1,4,5-myoinositoltriphosphat (IP3) (Schlessinger, 2000). IP3 stimuliert die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus endogenen Speichern der Zelle, während DAG direkt von Proteinen gebunden wird. Ein Zielprotein dieser *Second Messenger* ist die zu den Serin-/Threonin-Kinasen zählende Protein Kinase C-Familie (PKC). Die meisten Isoenzyme dieser Familie sind für ihre Aktivierung abhängig von Phosphatidylserin (PS), Diacylglycerin, Ca^{2+} und anderen Lipid *second messengern* (Newton, 2003).

Die PKCs bestehen aus einer N-terminalen regulatorischen und einer C-terminalen katalytischen Region. In Abhängigkeit von ihrer Homologie und ihren Aktivatoren kann man die aus zehn Isoenzymen bestehende Familie in drei Subfamilien einteilen. In die

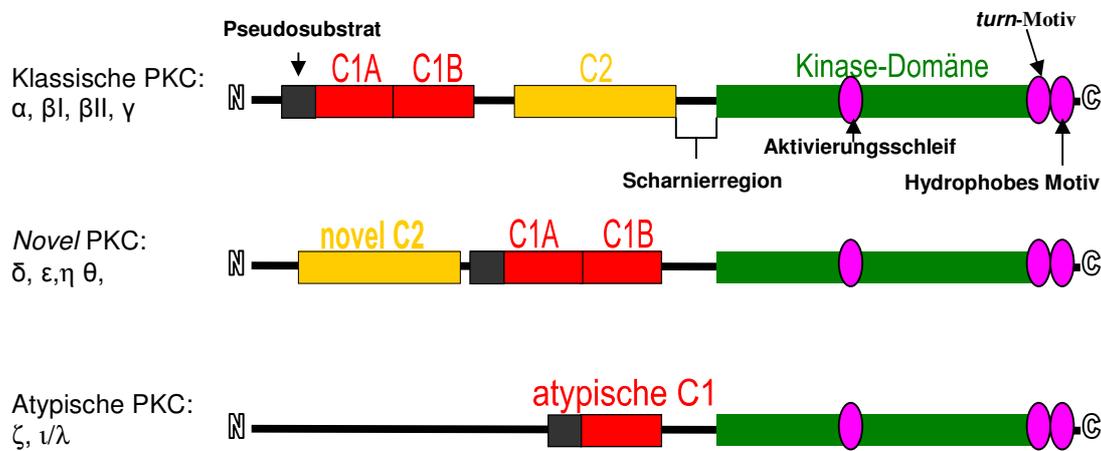


Abb.1.1. Die Protein Kinase C-Familie. In Abhängigkeit von ihrer Homologie und ihren Aktivatoren kann man die aus zehn Isoenzymen bestehende Familie in drei Subfamilien einteilen: die klassischen PKCs (cPKCs), die *novel* PKCs (nPKCs) und die atypischen PKCs (aPKCs).

zuerst entdeckten klassischen PKCs (cPKCs), die *novel* PKCs (nPKCs) und die atypischen PKCs (aPKCs). Zur Subfamilie der cPKCs, die Ca^{2+} , PS und DAG oder Phorbolster zur Aktivierung benötigen, gehören die Isozyten α , β I, β II und γ . Sie enthalten eine C1(C1A/C1B)-, C2- und Kinase-Domäne. Die nPKCs bestehen aus den Isoenzymen δ , ϵ , η und θ und haben mit den von cPKCs vergleichbare C1- und Kinase-Domänen. Es fehlt ihnen jedoch die C2-homologe Domäne, wodurch sie in ihrer Aktivierung unabhängig von Ca^{2+} sind. Eine C2-ähnliche Domäne in den nPKCs vermittelt die Bindung von PS und besitzt außerdem eine primäre Funktion in der Protein-Protein-Interaktion (Csukai, Chen et al., 1997). Zur Subfamilie der aPKCs zählen die Isoenzyme ι/λ und ζ , denen neben der C2-Domäne auch die Hälfte der C1-Domäne fehlt. Sie benötigen weder DAG und Phorbolster noch Ca^{2+} sondern nur PS zur Aktivierung (Dekker and Parker, 1994; Blobe, Stribling et al., 1996).

Die meisten der *PKC*-Gene resultieren in der Expression von nur einem Transkript. Für einige Isoenzyme gibt es jedoch zusätzliche Spleißvarianten beziehungsweise verschiedenartige Transkripte aufgrund von alternativen internen Promotoren. Spleißvarianten sind für die Isoenzyme PKC β I/PKC β II, für PKC θ /PKC θ II, und für PKC δ /PKC δ II/PKC δ III beschrieben worden (Ono, Kurokawa et al., 1986; Ono, Kikkawa et al., 1987; Ueyama, Ren et al., 2000; Niino, Irie et al., 2001; Sakurai, Onishi et al.,

2001). PKC ξ wird hingegen aufgrund eines zweiten internen Promotors in zwei verschiedenen Transkripten exprimiert, wobei eines davon spezifisch im Gehirn vorkommt (Ueyama, Ren et al., 2000).

1.1.1 Regulierung

Die Regulierung der PKCs erfolgt durch verschiedene sequentielle Prozesse wie u.a. Phosphorylierung, Pseudosubstrat-Freisetzung und intrazelluläre Translokation (Newton, 2003). Die Phosphorylierung der PKC ist essentiell für eine vollständige Entfaltung ihrer enzymatischen Aktivität. Während dieses Prozesses werden drei verschiedene Serin- oder Tyrosin-Aminosäurereste durch verschiedene Mechanismen phosphoryliert. Die initiale Phosphorylierung der Aktivierungsschleife erfolgt durch die PKC-regulierende Kinase PDK-1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) (Dutil, Toker et al., 1998), mit dem Resultat, dass es zu einer Autophosphorylierung des *turn*-Motivs kommt. Die Notwendigkeit der *turn*-Motiv-Phosphorylierung besteht primär in der Entfaltung der vollen enzymatischen Aktivität des Enzymes, aber zusätzlich wird angenommen, dass eine weitere Funktion in der Generierung einer Bindungsstelle für Proteine mit einer 14-3-3-Domäne besteht (Yaffe, Rittinger et al., 1997). Nach der Phosphorylierung des *turn*-Motivs erfolgt die letzte der drei für die Aktivität notwendigen Phosphorylierungen, die Autophosphorylierung des hydrophoben Motivs.

Anfänglich wurde angenommen, dass Kofaktoren ausschließlich für die Enzymaktivität wichtig sind. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die Kofaktoren auch für die Membranbindung der PKC im aktivierten Zustand verantwortlich sind. Ferner konnte die Funktion der C1- und C2-Domäne in der intrazellulären Lokalisation der PKCs näher bestimmt werden. Die Anwesenheit von DAG resultiert in einer starken Erhöhung der Affinität der PKCs zu der Membran. Dabei führt die Bindung von DAG mit der C1-Domäne zur Interaktion der PKCs mit Oberflächen, die Phosphatidylserin enthalten (Newton, 2003). Außerdem resultiert die Bindung von Ca²⁺ an die cPKC-C2-Domäne zur erhöhten Affinität der C2-Domäne nach PS (Newton, 2003). Letztendlich führt die Bindung von PKC an die Membran zur Freisetzung der Pseudosubstrat-Region und zu einer nun vollständig aktivierten PKC.

Phorbolster sind potente Aktivatoren der PKC. Da sie wie DAG an die cysteinreichen Regionen der Regulationsdomäne C1 binden, können sie die PKC-Aktivierung und die Wirkung von DAG nachahmen (Gschwendt, Leibersperger et al., 1991; Gschwendt, Leibersperger et al., 1992) (Castagna, Takai et al., 1982). Sie werden jedoch sehr viel

langsamer von der Zelle abgebaut und benötigen kein Ca^{2+} zur Aktivierung (Ryves, Evans et al., 1991)

1.1.2 Adapter- und Gerüstproteine in der Regulierung von PKCs

Die biologische Funktion der PKCs hängt maßgeblich von ihrer korrekten Lokalisierung innerhalb der Zelle ab. Dabei regulieren eine Vielzahl an Bindungspartnern diesen Prozess durch ihre Funktion als Adapter- oder Gerüstprotein (Mochly-Rosen, 1995; Jaken and Parker, 2000). Die Interaktion der PKCs mit diesen Bindungspartnern führt dazu, dass die PKCs in der Zelle neu positioniert werden, so dass sie in räumlicher Nähe mit ihren Substraten gebracht werden, und/oder dass sie zu spezifischen intrazellulären Kompartimenten transportiert werden.

Für die PKCs wurden verschiedenartige Bindungspartnern beschrieben, die in Abhängigkeit von diversen Faktoren mit ihnen interagieren können. Somit gibt es z.B. Bindungspartner für multiple oder spezifische PKCs. Außerdem gibt es solche für nicht-phosphorylierte und für aktive oder inaktive phosphorylierte PKCs (Newton, 2001).

Beispielsweise konnte für das Anker-Protein CG-NAB gezeigt werden, dass es neu synthetisiertes nicht-phosphoryliertes PKC ϵ zum Golgi/Zentrosom-Komplex transportiert (Takahashi, Mukai et al., 2000). Für Proteine der AKAP-Familie von Gerüst-Proteinen (*a kinase anchoring protein*) konnte nachgewiesen werden, dass sie phosphorylierte aber nicht-aktive PKCs in die räumliche Nähe von PKC-Substraten positionieren (Klauck, Faux et al., 1996).

Racks (*receptors for activated c kinase*) binden die aktive phosphorylierte Konformation von PKCs und lokalisieren sie an spezifische zelluläre Kompartimente (Schechtman and Mochly-Rosen, 2001). Dabei weisen die verschiedenen Racks eine unterschiedliche Bindungsspezifität zu PKC-Isoformen auf. Rack1 wurde z.B. ursprünglich als Bindungspartner von PKC β II identifiziert (Ron and Mochly-Rosen, 1995). Inzwischen konnte außerdem die Bindung von PKC δ und PKC ϵ mit Rack-1 nachgewiesen werden (Besson, Wilson et al., 2002; Rosdahl, Mourton et al., 2002).

STICKs (*substrates that interact with c kinase*) binden inaktive, phosphorylierte PKCs. Nachdem die Kinase durch weitere Faktoren aktiviert wurde, erfolgt die Phosphorylierung und die damit verbundene Freisetzung der STICKs (Jaken, 1996).

Die PKC-Anker-Proteine üben verschiedene zelluläre Funktionen aus, die eine positive wie negative Regulierung von Signalwegen umfasst. Zum Beispiel führt die Bindung von PKC ξ mit PAR-3 (*partitioning defective protein 3*) zur Aktivierung von Signalwegen, die

in der embryonalen Polaritätsentwicklung entscheidend sind (Tabuse, Izumi et al., 1998). Hingegen resultiert die Bindung von PKC ξ an PAR-4 (*partitioning defective protein 4*) in einer Inaktivierung der PKC, was letztendlich zur Apoptose führt (Diaz-Meco, Municio et al., 1996).

Wie bereits erwähnt, besteht die hauptsächliche Funktion der Adapter- und Gerüstproteine in der Translokation/Lokalisierung der PKCs zu spezifischen subzellulären Kompartimenten. Die Wichtigkeit dieser spezifischen Translokation/Lokalisierung zeigt sich bei der Interaktion des Gerüstproteines Pericentrin mit PKC β II (Chen, Purohit et al., 2004). Durch die Interaktion mit Pericentrin wird PKC β II an Zentrosomen verankert. Dabei bindet Pericentrin mit den Aminosäureresten 454-593 die C1A-Domäne von PKC β II. Die Unterbrechung dieser Interaktion führt zur Freisetzung von PKC β II von den Zentrosomen und resultiert letztendlich in der Desorganisation der Mikrotubuli, in einer funktionellen Beeinträchtigung des Spindelapparates und in einer Bildung einer Aneuploidie (Chen, Purohit et al., 2004).

1.1.3 Allgemeine Funktion der PKC in der Maus

Genetische Studien in der Maus belegen, dass bestimmte PKC-Isoformen essentiell für viele zelluläre Funktionen sind. So konnten z.B. für die folgenden murinen PKC-Mutanten verschiedenartige *in vivo*-Funktionen nachgewiesen werden: PKC γ besitzt eine wichtige Rolle in der synaptischen Plastizität (Abeliovich, Chen et al., 1993; Abeliovich, Paylor et al., 1993); PKC β I und PKC β II sind wichtige Mediatoren der humoralen Immunantwort (Leitges, Schmedt et al., 1996); PKC ϵ ist in der Schmerzempfindung involviert (Khasar, Lin et al., 1999); PKC ζ reguliert die B-Zell-Antwort (Martin, Duran et al., 2002); PKC δ hat Einfluss auf die B-Zell-Toleranz (Mecklenbrauker, Saijo et al., 2002; Miyamoto, Nakayama et al., 2002) und PKC α ist im Insulinsignalweg beteiligt (Leitges, Plomann et al., 2002). Basierend auf der Beobachtung, dass die meisten Isoformen ein sehr ausgedehntes Expressionsmuster besitzen, wird vermutet, dass die untersuchten PKC-Knockout Phänotypen jeweils nur einen Teil der Isoform-spezifischen PKC-Funktionen beschreiben. Deshalb kann vermutet werden, dass die Isoenzyme eine funktionelle Redundanz in Bereichen der überlappenden Expression ausüben (Parker and Murray-Rust, 2004).

1.1.3.1 Die Protein Kinasen PKC δ und PKC ϵ

PKC δ und PKC ϵ gehören zu den *novel* PKCs, sind demnach Kalzium-unabhängige aber Phorbol-ester/Diacylglycerol-sensitive Serin-/Threonin-Kinasen. Beide Isoenzyme sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt (Akita, 2002; Kikkawa, Matsuzaki et al., 2002), wie u.a. in immunologischen (Castrillo, Pennington et al., 2001; Leitges, Gimborn et al., 2002; Mecklenbrauker, Saijo et al., 2002), und in Bereichen, die Interaktionen mit Zytoskelett-Komponenten voraussetzen (Keenan and Kelleher, 1998; Ivaska, Whelan et al., 2002).

Die Generierung von PKC δ - (Leitges, Elis et al., 2001; Miyamoto, Nakayama et al., 2002) und PKC ϵ -defizienten Mäusen (Castrillo, Pennington et al., 2001) konnte ihre essentielle Funktion im Immunsystem bestätigen. PKC δ -defiziente Mäuse sind lebensfähig und bedingt fertil und zeigen mindesten zwei verschiedene immunologische Defekte. Erstens verringert die PKC δ -Defizienz die Entwicklung von der B-Zell-Toleranz, was letztendlich zur Differenzierung von selbst-reaktiven B-Zellen führt (Mecklenbrauker, Saijo et al., 2002). Zweitens konnte mittels PKC δ ^{-/-}-Mäusen gezeigt werden, dass PKC δ ein negativer Regulator in der Antigen-induzierten Mastzell-Degranulation ist (Leitges, Gimborn et al., 2002). PKC ϵ ^{-/-}-Mäuse sind ebenfalls lebensfähig und bedingt fertil, soweit die Fertilität nicht durch die überdurchschnittlich hohe Rate an Gebärmutterinfektionen beeinträchtigt wird (Castrillo, Pennington et al., 2001). Die Makrophagenaktivierung und die Abwehr gegen bakterielle Infektionen sind in der PKC ϵ -Defizienz beeinträchtigt, was auf eine drastische Reduktion der Generierung von NO (*nitric oxide*), TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) und Interleukin (IL)-1 β sowie auf eine Defizienz in der Induktion von NOS-2 (*nitric oxide synthase 2*) zurückgeführt werden konnte (Castrillo, Pennington et al., 2001).

Studien zur kardiovaskulären Funktion von PKC δ/ϵ zeigten, dass beide Isoformen spezielle Aufgaben in Kardiomyozyten ausüben (Chen, Hahn et al., 2001; Rybin, Sabri et al., 2003), die teilweise über eine Kreuzregulierung der PKCs stattfinden (Rybin, Sabri et al., 2003). Dabei wird davon ausgegangen, dass sich PKC δ und PKC ϵ reziprok innerhalb des hydrophoben sowie des *turn*-Motives phosphorylieren.

1.2 Generelle embryonale vaskuläre Entwicklung

1.2.1 Embryonaler Prozess der vaskulären Entwicklung

Das kardiovaskuläre System ist das erste funktionelle Organsystem des Wirbeltier-Embryos. Seine Entstehung erfolgt über zwei unterschiedliche Mechanismen (Flamme, Frolich et al., 1997). Der erste ist unabhängig von physiologischen Bedürfnissen der Gewebe, genetisch determiniert und damit in gewisser Weise autonom. So wird noch vor Beginn der embryonalen Blutzirkulation ein Gefäßsystem angelegt, indem sich Blutgefäße aus Endothelzellen bilden, die sich von mesodermalen Vorläuferzellen, den Angioblasten, ableiten. Dieser Vorgang wird als Vaskulogenese bezeichnet (Risau and Flamme, 1995). Beim zweiten Mechanismus, der Angiogenese, entstehen neue Blutgefäße u.a. durch Aussprossung aus bereits existierenden Gefäßen. Dabei reagieren die differenzierten Endothelzellen über spezifisch aktivierte Gene und Oberflächenrezeptoren auf Umwelteinflüsse oder parakrine Stimuli, indem sie proliferieren, migrieren, reifen oder absterben. Auf diese Weise ist es dem mit Sauerstoff oder Nährstoffen unterversorgten oder proliferierenden Gewebe möglich, den Endothelzellen seine Bedürfnisse zu signalisieren, damit diese neue Gefäße ausbilden können (Risau, 1997). Die grundlegende Struktur des fertig ausgebildeten Gefäßes besteht aus: (1) einer inneren Schicht aus flachen Endothelzellen verbunden mit einer Basalmembran, die *Tunica intima*; (2) einer intermediären Muskelschicht, die *Tunica media*, bestehend aus vaskulären glatten Muskelzellen (vSMC); (3) einer äußeren Schicht aus Bindegewebe, die *Tunica adventitia*. Die *Tunica media* ist in kleineren Gefäßen in ihrer Stärke reduziert und fehlt in Kapillaren völlig. In dem vaskulären Kapillarsystem übernehmen sog. Perizyten die Funktion der vSMCs, im lymphatischen System sind sie jedoch ebenfalls nicht vorhanden (Wilting, Christ et al., 2003).

1.2.1.1 Vaskulogenese

Der embryonale Prozess der Vaskulogenese (Risau, Sariola et al., 1988; Poole and Coffin, 1989; Risau and Flamme, 1995) beginnt im Dottersack, also im extraembryonalen Gewebe, um E6.5 (Embryonaltag 6.5). Dort entstehen aus den gemeinsamen Vorläuferzellen der Endothel- und hämatopoetischen-Abstammungslinie, den Hämangioblasten (D'Amore, 2000), die sog. Blutinseln. Diese setzen sich aus zwei

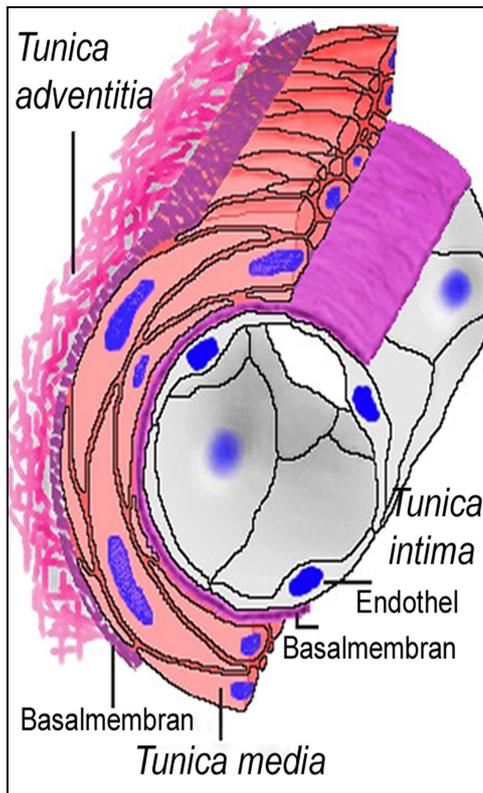


Abb.1.2. Die allgemeine Struktur eines Blutgefäßes. Sie besteht hauptsächlich aus 3 Schichten: (1) einer inneren Schicht aus flachen Endothelzellen verbunden mit einer Basalmembran, die *Tunica intima*; (2) einer intermediären Muskelschicht, die *Tunica media*, bestehend aus vaskulären glatten Muskelzellen (vSMC); (3) einer äußeren Schicht aus Bindegewebe, die *Tunica adventitia*. Die Abbildung ist adaptiert von Blue Histology (School of Anatomy and Human Biology - The University-of-Western-Australia).

verschiedenen Zelltypen zusammen: in der Peripherie gelegene, abgeflachte Angioblasten umschließen in ihrem Inneren abgerundete hämatopoetische Vorläuferzellen. Angioblasten wandern aus den endothelialen Hüllen benachbarter Blutinseln aus und nehmen Kontakt miteinander auf. So entsteht ein Netz aus Angioblastensträngen, deren Lumen in die Lichtungen der Blutinseln münden, und damit einen primären Gefäßplexus ausbilden.

Im Embryo selbst sind die Angioblasten in verschiedenen mesodermalen Strukturen präsent. Kurz nach dem Auftreten von Angioblasten im Dottersack befinden sich intraembryonale Angioblasten in enger Verbindung zum Endoderm an den lateralen Kanten der anterioren Intestinalöffnung und ventral zu den Somiten (Wilting, Christ et al., 2003). Diese Angioblasten bilden dann das Primordium der paarigen Dorsalaorten entlang der lateralen Kanten der Somiten um E7.2 (Drake and Fleming, 2000). Die Entstehung anderer Primärgefäße, wie der Kardinalvenen, läuft in vergleichbaren Schemata ab. Ferner ist festzustellen, dass die Gefäße des primären vaskulären Systems ausschließlich aus Endothelzellen bestehen und zu diesem Zeitpunkt noch nicht mechanischen Kräften ausgesetzt sind. Dies beginnt erst mit der Fertigstellung des

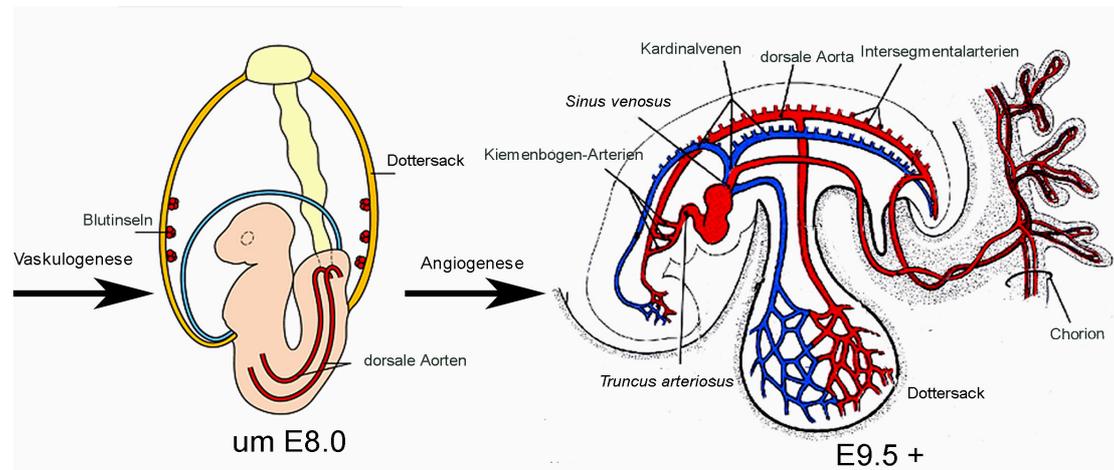


Abb.1.3. Schematische Darstellung der embryonalen Gefäßentwicklung. Während der Vaskulogenese werden die Primärgefäße gebildet. Um E.8.0-E8.5 ist der primäre vaskuläre Plexus fertig ausgebildet. Der Prozess der Angiogenese umfasst die Neu- und Umgestaltung des primären Gefäßsystems. Dabei wird ein hoch-differenziertes und heterogenes Gefäßsystem ausgebildet. Die Abbildungen ist adaptiert von (Dzierzak, Medvinsky et al., 1998).

sich entwickelnden Herzens (Wilting, Christ et al., 2003). Letztendlich ist der primäre vaskuläre Plexus um E8.0-E8.5 vollständig entwickelt (Drake and Fleming, 2000).

1.2.1.2 Angiogenese

Nach der Ausbildung des primären vaskulären Plexus um E8.5, erfolgt die weitere Entwicklung des Gefäßsystems durch einen Prozess der kollektiv als Angiogenese bezeichnet wird. Ursprünglich wurde dieser Begriff verwendet, um das Aussprossen von neuen Blutgefäßen aus bereits bestehenden zu beschreiben. Heute umschreibt er im weiteren Sinne das Wachstum und die Neugestaltung des primären Gefäßsystems und schließt Mechanismen wie u.a. Sprossung und Aufspaltung von bestehenden Gefäßen, sowie die Verschmelzung und die Vergrößerung von Gefäßen ein (Risau, 1997). Das angiogene Sprossen kann in sequentielle Schritte unterteilt werden (Wilting, Christ et al., 2003): Die Endothelzellen an der Spitze eines Sprosses bilden eine Vielzahl an langen Filamenten. Diese kommen in Kontakt mit benachbarten Endothelzellen, dabei werden einige dieser Kontakte zu Kapillarbögen umgestaltet. Sprießende Angiogenese findet sowohl im Dottersack als auch im Embryo selber besonders während der Vaskularisierung der Neuralröhre statt (Risau, 1997). Wachstum durch Intussuszeption (Ausstülpung/Invagination) wurde in verschiedenen Bereichen des vaskulären Systems

beobachtet und kann in drei Mechanismen unterteilt werden: intussuszeptives Mikrovaskulatur-Wachstum (IMG), intussuszeptive Verzweigungs-Umgestaltung (IBR) und die intussuszeptive Verzweigung (IAR). Grundsätzlich werden bei der Intussuszeption bereits existierende Gefäße gespalten, indem sich Einstülpungen extrazellulärer Matrix bilden, die das Gefäßlumen unterteilen (Djonov, Schmid et al., 2000; Djonov, Galli et al., 2000; Wilting, Christ et al., 2003). Angiogene Neugestaltung durch Verschmelzung und Vergrößerung resultiert in Gefäßen mit vergrößertem Lumen und Länge. Bei diesen Prozess können z.B. zwei Gefäße fusionieren, um ein größeres zu bilden, so wie es bei der Fusion der paarigen dorsalen Aorten zu beobachten ist (Wilting, Christ et al., 2003). Zusätzlich zu den hier bereits beschriebenen Mechanismen der Angiogenese, sind weitere zelluläre Prozesse in der Neugestaltung des primären vaskulären Plexus beteiligt, wie z.B. die Apoptose, auf die hier nicht weiter eingegangen wird (Wilting, Christ et al., 2003).

1.3 Klassische Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren in der vaskulären Entwicklung

Die Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems erfordert das koordinierte Zusammenwirken von Signalkaskaden, die an diversen zellulären Prozessen beteiligt sind, wie u.a. an der Proliferation, Migration, Differenzierung oder Apoptose. Aufgrund dieser Vielzahl an involvierten zellulären Funktionen konnte für etliche Proteine eine direkte oder auch indirekte Beteiligung an der Gefäßentwicklung beschrieben werden (Rossant and Howard, 2002). Für bestimmte Rezeptorfamilien, die hauptsächlich zur Klasse der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehören, konnte eine zentrale koordinierende Funktion in dem Prozess der Vaskulo- und Angiogenese zugeschrieben werden. Dazu gehören Mitglieder der VEGF/VEGFR, FGF/FGFR-, Notch/Delta- und Ephrin/Eph-Rezeptor/Liganden-Paare. In den folgenden Abschnitten soll die spezielle Funktion dieser Paare in der Vaskulo- und Angiogenese aufgezeigt werden.

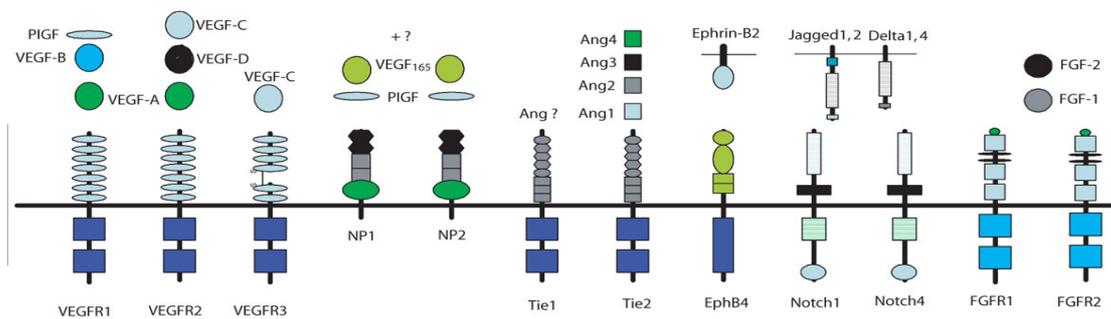


Abb.1.4. Die wesentlichen Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren der Vaskulo- und Angiogenese. Die VEGF/VEGFR-, FGF/FGFR-, Notch/Delta-, VEGF/NP-, Ang/Tie- und Ephrin/Eph-Rezeptor/Liganden-Paare sind die zentralen Wachstumsfaktoren und Rezeptoren die den Prozess der Gefäßentwicklung regulieren. Für eine detailliertere Beschreibung siehe Text.

1.3.1 VEGF/VEGFR

Die *vascular endothelial growth factors* (VEGFs) sind eine Gruppe von homodimeren Glykoproteinen mit essentiellen Funktionen in verschiedenen Aspekten der Vaskulo- und Angiogenese. Vier VEGF-Gene (A-D) und der VEGF verwandte *placenta growth factor* (PIGF) wurden bisher im Menschen und in der Maus identifiziert (Petrova, Makinen et al., 1999). Des Weiteren führt alternatives Spleißen zu einer weit höheren Anzahl an exprimierten Isoformen. Das murine VEGF-A-Gen produziert z.B. vier verschiedene Isoformen mit einer Länge von jeweils 121, 165, 188 und 206 Aminosäuren (Cross, Dixelius et al., 2003). Von denen sind die VEGF₁₂₁- und VEGF₁₆₅-Isoformen die vorherrschend exprimierten, wobei VEGF₁₆₅ das stärkere Mitogen ist. Ferner unterscheiden sich die VEGF-Isoformen in ihrer Fähigkeit mit Heparan-Sulfat-Proteoglykanen zu interagieren: die größten VEGF-Isoformen können Heparin binden und assoziieren mit der extrazellulären Matrix, wohingegen die kleinste Isoform VEGF₁₂₀ frei diffundieren kann (Robinson and Stringer, 2001) Es wurde gezeigt, dass VEGF-Liganden hauptsächlich an drei Rezeptoren binden: VEGFR-1/Flt1, VEGFR-2/Flk1 und VEGFR-3/Flt4 (Neufeld, Cohen et al., 1999). Hinzukommen die erst kürzlich identifizierten VEGF-Rezeptoren Neuropilin1 und Neuropilin2 (NP1 und NP2). Dabei entstehen folgende Ligand/Rezeptor-Konstellationen; VEGFR-1 bindet VEGF-A, -B und PIGF, VEGFR-2 bindet VEGF-A, -C und -D und VEGFR-3 bindet nur VEGF-C. Np1 und NP2 binden VEGF-A₁₆₅ und PIGF, die Interaktion mit den anderen VEGFs ist noch nicht bekannt (Neufeld, Kessler et al., 2002). Bindung von VEGF an VEGFR1-3 induziert

deren Homodimerisierung und somit die darauf folgende Autophosphorylierung, was letztendlich zur Initiierung von VEGF-abhängigen Signalkaskaden führt.

Knockout-Analysen haben einen tieferen Einblick in die Funktion des VEGF/VEGFR ermöglicht. Zum Beispiel sterben Embryonen, die defizient für den VEGFR-2 sind, um E9.0 ohne jegliche Entwicklung von vaskulären- oder hämatopoetischen Zellen (Shalaby, Rossant et al., 1995). Der Verlust dieser beiden Zelllinien würde auf eine Funktion von VEGFR-2 in der gemeinsamen Vorläuferzelle, den Hämangioblasten, hindeuten. Chimäranalysen und Studien an VEGFR-2-defizienten ES-Zellen konnten jedoch überzeugend darlegen, dass trotz VEGFR-2-Defizienz Hämatopoese stattfinden kann. Somit ist die endgültige Funktion in der Hämangioblast-Differenzierung weiterhin unklar (Shalaby, Ho et al., 1997; Hidaka, Stanford et al., 1999). Für die erst kürzlich charakterisierten neuen VEGF-Rezeptoren Np1 und Np2 wurde ebenfalls eine essentielle Funktion in der Vaskulogenese attestiert. Np1/Np2-doppeldefiziente Embryonen sterben um E8.5 aufgrund des völligen Fehlens eines Gefäßsystems (Takashima, Kitakaze et al., 2002).

Die Null-Mutation des Liganden VEGF-A führt ebenso zur frühen Sterblichkeit. Interessanterweise ist VEGF-A haploinsuffizient, das heißt, dass auch die heterozygoten Embryonen mit Reduktion in Gefäßgröße und Durchmesser um E10.5-E11.5 sterben (Carmeliet, Ferreira et al., 1996). Homozygote Embryonen wurden durch die Aggregation von homozygoten mutanten ES-Zellen mit tetraploiden Wildtypzellen produziert. Diese Embryonen zeigten einen noch schwereren Phänotyp, vergleichbar aber nicht so ausgeprägt wie der vom VEGFR-2-Knockout (Carmeliet, Ferreira et al., 1996). Im Gegensatz zur VEGFR-2- und Np1/Np2-Defizienz, bilden VEGFR-1-defiziente Embryonen ein Gefäßsystem aus, welches jedoch desorganisiert ist und eine veränderte Gefäßstruktur aufweist (Fong, Rossant et al., 1995). Diese Veränderung führt dennoch zur embryonalen Sterblichkeit in der frühen Entwicklung. Der VEGFR-2- und N1/Np2-Knockout bilden keine Endothelzellen aus, wohingegen der VEGFR-1-Knockout eine vermehrte Anzahl an Endothelzellen besitzt. Dieses Phänomen führte zu der Schlussfolgerung, dass VEGFR-2 als Negativregulator im VEGF-A-System agiert (Fong, Zhang et al., 1999; Rossant und Howard, 2002). VEGFR-3 wurde ursprünglich als lymphatisch-spezifischer Rezeptor betrachtet, und obwohl VEGF-C auch mit geringerer Affinität VEGFR-2 binden kann, wurde VEGF-C als lymphatischer Wachstumsfaktor angesehen ((Dumont, Jussila et al., 1998). Gezielte Mutation von VEGFR-3 führte jedoch zur embryonalen Sterblichkeit um E9.5, Vaskulo- und Angiogenese fanden statt,

aber größere Gefäße waren abnormal organisiert und hatten einen generellen Defekt des Gefäßlumens (Dumont, Jussila et al., 1998). Zusammenfassend hat VEGFR-3 eine bedeutungsvolle Funktion in der Entwicklung des embryonalen kardiovaskulären Systems, bevor lymphatische Gefäße im Embryo auftreten.

Die Signaltransduktion von VEGFRs verläuft im Allgemeinen über die klassischen Signalmoleküle, die auch von anderen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen genutzt werden (Cross, Dixelius et al., 2003). Für eine Anzahl von Proteinen konnte gezeigt werden, dass sie mit ihrer Src-Homologiedomäne-2 (SH2) an spezifische autophosphorylierte Tyrosinreste von VEGFR-2 binden: Tyr951 bildet z.B. eine Bindungsstelle für das VEGF-assoziierte Protein (VRAP) (Wu, Mayo et al., 2000) und Tyr1175 kreiert eine Bindungsstelle für Sck (Warner, Lopez-Dee et al., 2000) und PLC- γ (Phospholipase C- γ) (Takahashi, Yamaguchi et al., 2001). Für VEGFR-2 konnte u.a. gezeigt werden, dass die extrazellulär-regulierten Kinasen 1/2 (Erk1/2) in der VEGF-A-induzierten Proliferation und die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase p38 (p38) in der VEGF-A-abhängigen Zellmigration involviert sind (Cross, Dixelius et al., 2003). Ferner wird Raf im VEGF-Raf-MEK-MAPK-DNA-Synthese-Signalweg durch ein PKC-abhängigen Mechanismus aktiviert (Takahashi, Ueno et al., 1999). PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase), Protein-Kinase B (Akt/PKB) und das kleine GTP-bindende Protein Rac wurden ebenfalls als Komponenten des VEGFR-2-Signalweges nachgewiesen (Cross, Dixelius et al., 2003).

Die Signaltransduktions-Kapazität von VEGFR-2 ist stark beeinflusst durch den Adhäsionsstatus der Endothelzelle. Vaskuläres endotheliales Cadherin (VE-Cadherin/Cadherin-5) ist ein endothelspezifisches *adherence junctions*-Molekül, welches mit VEGFR-2 einen teilweise identischen Signalweg hat (Cross, Dixelius et al., 2003). Der VE-Cadherin/VEGFR-2-Signalweg beinhaltet β -Catenin, welches VEGF-A-abhängig phosphoryliert und zum Kern transloziert wird. Nukleäres β -Catenin bindet an den T-Zell-Faktor oder an den nahe verwandten lymphoid-verstärkenden Faktor (TCF/Lef), und wirkt dadurch regulierend auf die Expression von in der Angiogenese implizierten Genen (Henderson and Fagotto, 2002).

1.3.2 Tie/Ang

Trotz der dominierenden Stellung von VEGF in der vaskulären Entwicklung werden zusätzliche Faktoren benötigt, damit der Embryo ein funktionelles kardiovaskuläres System entwickeln kann. Die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Tie1/Tie2 und ihre Liganden

Angiopoietin1-4 (Ang1-4) bilden ein weiteres Rezeptor/Liganden-System, das wesentlich in der Angiogenese involviert ist (Yancopoulos, Davis et al., 2000).

Die Angiopoietine1-4 binden exklusiv an Tie2, eine Interaktion mit Tie1 konnte bisher unter den getesteten Bedingungen und mit den verwendeten Modellsystemen nicht nachgewiesen werden (Thurston, 2003). Es wurde gezeigt, dass Ang3 ein Antagonist und Ang4 ein Agonist von Tie2 ist. Detaillierte Studien über die tatsächliche *in vivo*-Funktion dieser beiden Angiopoietine sind jedoch noch nicht publiziert (Yancopoulos, Davis et al., 2000).

Für Ang1 sowie für Ang2 konnte gezeigt werden, dass sie die Phosphorylierung von Tie2 induzieren können (Thurston, 2003). Es gibt jedoch Indizien, die zeigen, dass Ang2 *in vivo* antagonistisch auf Tie2 wirken kann, und potent in der Lage ist, die Ang1-induzierte Tie2-Phosphorylierung zu inhibieren (Maisonpierre, Suri et al., 1997).

Ang1-defiziente Mäuse haben einen mit Tie2-defizienten Mäusen vergleichbaren Phänotyp. Der Knockout von Ang1 resultiert in einer embryonalen Sterblichkeit um E12.5 aufgrund von Defekten in der Herz- und Gefäßentwicklung (Suri, Jones et al., 1996). Der vaskuläre Defekt äußert sich in einer geringeren hierarchischen Organisation des Gefäßsystems. Ferner konnte mittels Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass die Endothelzellen der Ang1-defizienten Mäuse nur rudimentär mit der Basalmembran und den perivaskulären Zellen assoziiert sind (Suri, Jones et al., 1996).

Ang2-Defizienz führt zu einem weniger stark ausgeprägten kardiovaskulären Phänotyp. Die Ang2-Knockouts werden relativ normal geboren, sterben aber am postnatalen Tag 14 (P14) an kardiovaskulären und lymphatischen Defekten (Gale, Thurston et al., 2002). Somit kann Ang2 eine eher postnatale Funktion in der Angiogenese zugewiesen werden. Um näheren Aufschluss über die unterschiedlichen Funktionen von Ang1 und Ang2 zu erlangen, wurden Mäuse generiert, bei denen Ang2 durch Ang1 substituiert ist (Gale, Thurston et al., 2002). Die Analyse zeigte, dass Ang2 im lymphatischen System als Tie2-Agonist agiert (*Ang1-rescue*), aber in der Retina-Vaskulatur als Antagonist fungiert (kein *Ang1-rescue* vorhanden). Zusammenfassend bedarf es noch weiterer Studien, um den Ang1/Ang2-Signalweg vollkommen verstehen zu können (Thurston, 2003).

Tie1- und Tie2-Knockouts sind embryonal letal, dabei führt die Tie2-Defizienz zu einem embryonalen Tod um E10.5, welcher mit Herzfehlern, Hämorrhagie und diversen vaskulären Defekten assoziiert ist (Dumont, Gradwohl et al., 1994; Sato, Tozawa et al., 1995). Bis E13.0 zeigt der Tie1-Knockout keine Anzeichen eines vaskulären Defekts, kurz darauf entwickelt der Embryo jedoch Ödeme, lokale Hämorrhagie und geplatzte

Mikrogefäße. Dieses führt schließlich zum embryonalen Tod zwischen E13.5 und E18.5 (Puri, Rossant et al., 1995; Sato, Tozawa et al., 1995). Zu bemerken ist, dass in beiden Tie-defizienten Mäusen die großen Primärgefäße gebildet werden, so dass die primären Funktionen der Tie-Rezeptoren in der Angiogenese und der Herzentwicklung liegen (Thurston, 2003).

Die Signaltransduktionswege, die nach Tie2-Aktivierung ausgelöst werden, basieren auf Proteinen mit klassischen SH2 oder phosphotyrosinbindenden Domänen (PTP). Für zwei Proteine mit SH2-Domänen konnte *in vitro* eine Bindung an aktiviertes Tie2 gezeigt werden: für das wachstumsfaktorbindende Protein 2 (GRB2) und für die SH2-Tyrosin-Phosphatase 2 (SH-PTP2) (Huang, Turck et al., 1995). Vorherige Experimente legten dar, dass GRB2 und SH-PTP2 in Signalkaskaden involviert sind, die Zellwachstum und Zelldifferenzierung regulieren (Neel, 1993; Feng und Pawson, 1994).

Das Adaptermolekül Dok-R bindet mit einer PTB-Domäne an phosphoryliertes Tie2 (Jones und Dumont, 1998). Nach der Bindung wird Dok-R durch Tie2 phosphoryliert, was die Bindung an das Ras-GTPase-aktivierende Protein (rasGAP) und das Adapterprotein NCK ermöglicht (Rockow, Tang et al., 1996). NCK wird mit Zellmigration und Proliferation in Verbindung gebracht (Rockow, Tang et al., 1996), wohingegen für rasGAP eine wichtige Funktion in der kardiovaskulären Entwicklung nachgewiesen werden konnte (Henkemeyer, Rossi et al., 1995).

1.3.3 EphB/EphrinB

Die Eph-Rezeptoren umfassen die größte Familie von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und sind zusammen mit ihren Transmembranliganden, den Ephrinen, in zwei Untergruppen unterteilt (Xu und Wilkinson, 1997; Flanagan und Vanderhaeghen, 1998): Ephrin-As sind mit einem Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) in der Membran verankert; Ephrin-Bs haben eine konservierte intrazelluläre Domäne (Davis, Gale et al., 1994). EphA-Rezeptoren binden mit wenigen Ausnahmen an Ephrin-As und EphB-Rezeptoren an Ephrin-Bs. Die Ephrin-Bs können im Gegensatz zu den Ephrin-As über ihre intrazellulären Domänen Signale weiterleiten (Gale, Holland et al., 1996; Henkemeyer, Orioli et al., 1996), was eine bidirektionale Signaltransduktion ermöglicht (Holland, Gale et al., 1996).

Ursprünglich wurden die Ephrine ausschließlich mit der *axon guidance* und der *boundary maintenance* im zentralen Nervensystem (ZNS) in Zusammenhang gebracht

(Rossant and Howard, 2002), ihre Funktion in der vaskulären Entwicklung wurde erst in den letzten Jahren durch verschiedene Arbeiten gewürdigt (Augustin and Reiss, 2003). Auffallend sind die spezifischen Expressionen von Ephrin-B2 und EphB4. Ephrin-B2 ist nur in arteriellen und EphB4 nur in venösen Gefäßen ab sehr frühen embryonalen Stadien spezifisch exprimiert (Wang, Chen et al., 1998). Zusätzlich zu diesen konträr-exprimierten Ephrin/Eph-Paar werden noch weitere Mitglieder der Ephrin/Eph-Familie, EphB2 und EphB3, im embryonalen Gefäßsystem exprimiert (Cheng, Brantley et al., 2002), wobei Single- und Doppelknockout-Studien EphB2 und EphB3 nur untergeordnete Funktionen in der Gefäßentwicklung zusprechen (Adams, Wilkinson et al., 1999).

Embryonen die entweder EphrinB2- oder EphB4-defizient sind, sterben um E10.5 an den Folgen diverser vaskulärer Defekte, die über eine reine Veränderung der Venen/Arterien-Identität hinausgehen (Wang, Chen et al., 1998; Gerety, Wang et al., 1999). Zusammen mit weiteren Maus-Mutanten, die u.a. Ephrin-B2 und EphB4 reziprok exprimieren, konnte gezeigt werden, dass die bidirektionale Signaltransduktion essentiell für den Prozess der Angiogenese ist (Adams, Diella et al., 2001; Rossant and Howard, 2002)

1.3.4 Delta/Notch

Die Notch-Signaltransduktion ist in verschiedensten zellulären Prozessen involviert, u.a. in der Initiierung der Zelldifferenzierung, in der Zellzyklus-Progression und in der Apoptose (Shawber und Kitajewski, 2004). In Säugetieren wurden bisher vier Notch-Rezeptoren und fünf Notch-Liganden identifiziert: Notch1-4 und die Liganden Jagged1-2 und Delta1, 3-4 (Dll1, 3-4).

Die Aktivierung von Notch durch Ligandenbindung führt zur proteolytischen Abspaltung der intrazellulären Domäne (NICD) von der Membran. Die NICD transloziert nun in den Nukleus, um dort mit Proteinen der CSL-Familie von DNA-bindenden-Proteinen (CBF-1, Su(H), Lag-2) einen transkriptionsaktivierenden Komplex zu bilden (Mumm und Kopan, 2000). Nun erfolgt die Aktivierung der Notch/CSL-abhängigen Zielgene. Dazu gehören z.B. die *Hairy/Enhance of Split* (HES) und die HES-verwandten (Hey, CHF, HRT, HESR) Gene (Nakagawa, McFadden et al., 2000; Davis and Turner, 2001).

In den letzten Jahren wurden viele Studien durchgeführt, die die wesentliche Funktion von Notch/Delta-Signaltransduktion in der vaskulären Entwicklung hervorheben (Torres-Vazquez, Kamei et al., 2003). So wurde u.a. die humane degenerative vaskuläre

Krankheit CADASIL (*cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*) mit einer Mutation von Notch3 assoziiert (Joutel, Corpechot et al., 1996). In Vertebraten sind Notch1, Notch4, Jagged1, Jagged 2, Dll1 und Dll4 im arteriellen Endothel exprimiert (Shawber und Kitajewski, 2004). Gezielte Mutationen von Notch1, Notch1/Notch4, Jagged1 oder Dll1 resultierten ausnahmslos in vaskulären Defekten (Hrabe de Angelis, McIntyre et al., 1997; Xue, Gao et al., 1999; Huppert, Le et al., 2000; Krebs, Xue et al., 2000). Leider bleibt die präzise Aufgabe der Notch-Signaltransduktion bezüglich der Einflussnahme auf das Endothelzellverhalten trotz Knockoutstudien weitgehend unklar. Notch1^{-/-}, Notch1^{-/-}/Notch4^{-/-} und Jagged1^{-/-}-Embryonen entwickeln ein nahezu normalen primären vaskulären Plexus, sind jedoch nicht in der Lage, die Neugestaltung des Plexus durchzuführen. Dies würde auf eine essentielle Funktion von Notch in der angiogenen vaskulären Morphogenese und Neugestaltung hindeuten (Xue, Gao et al., 1999; Huppert, Le et al., 2000; Krebs, Xue et al., 2000).

Die vorherrschend arteriell-spezifische Expression würde auf eine Funktion von Notch in der Differenzierung von Endothelzellen zur arteriellen Identität hinweisen. Mutation des von Notch *downstream* liegenden Genes *gridlock* (*grl*) im Zebrafisch (Ortholog zum HRT2-Gen in den Vertebraten), resultierte in dem Fehlen der Rumpfzirkulation aufgrund von Defekten in der dorsalen Aorta (Weinstein, Stemple et al., 1995). Ferner führte die Doppeldefizienz der Notch-Zielgene *hey1* und *hey2* in der Maus ebenfalls zu schweren Defekten im arteriellen Gefäßen (Fischer, Schumacher et al., 2004).

Aufgrund der Tatsache, dass Notch-Liganden und -Rezeptoren während der Entwicklung ausschließlich in arteriellen Endothelzellen exprimiert werden, besteht die einzige Möglichkeit der Einflussnahme auf die arterielle Differenzierung darin, dass Notch in einer autokrinen Weise die arterielle Differenzierung von einzelnen Endothelzell-Populationen beeinflusst (Torres-Vazquez, Kamei et al., 2003). Dies würde die Vermutung unterstützen, dass die venöse Identität den Ausgangspunkt darstellt und es folglich nur zu einer aktiven Differenzierung zur arteriellen Identität kommt (Torres-Vazquez, Kamei et al., 2003).

1.3.5 FGF/FGFR

FGFs (*fibroblast growth factors*) gehören zu den ersten Molekülen, für die ein stimulierender Einfluss auf die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* beschrieben wurde (Bikfalvi, Klein et al., 1997). Bis

heute umfasst das FGF/FGF-Rezeptor (FGFR)-System 23 FGFs und vier Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Außerdem wird dieses Repertoire durch zahlreiche Isoformen und prozessierte Derivate innerhalb der FGF-Familie und durch verschiedene Spleißvarianten der FGFR ergänzt (Ornitz and Itoh, 2001).

Die Aktivierung der FGFRs erfordert zusätzlich zu der Ligandenbindung Heparan-Sulfat-Proteoglykane (HSPGs) als Korezeptoren. Dabei wird angenommen, dass die HSPGs die Ligandendimerisierung induzieren, mit dem Effekt, dass die FGFRs ebenfalls dimerisieren und somit aktiviert werden (Kwan, Venkataraman et al., 2001).

Zusätzlich zu den klassischen parakrinen Effekten der FGFs exprimieren vaskuläre Zellen eine Reihe von FGF-Isoformen, die in autokriner und intrazellulärer Weise agieren (Auguste, Javerzat et al., 2003). Zum Beispiel kommen in vaskulären Zellen FGF2-Isoformen als zytoplasmatische 18-kDa-, sowie als vier unterschiedliche nukleäre *high molecular weight* (HMW)-FGF2-Isoformen vor (Arese, Chen et al., 1999).

Im Gegensatz zu den gut charakterisierten Ligand/Rezeptor-Paaren VEGF/VEGFR, Eph/EphR und Ang/Tie ist die vaskuläre Funktion von FGF/FGFR eher unvollständig beschrieben. *In vitro*-Experimente konnten zeigen, dass FGFs an der Flk-1+-Hämangioblast-Differenzierung (Poole, Finkelstein et al., 2001), sprießender Angiogenese (Seghezzi, Patel et al., 1998; Feraud, Cao et al., 2001) oder in der Endothelbildung während der Vaskulogenese (Flamme and Risau, 1992) beteiligt sind. Die Inaktivierung von FGF/FGFR-Genen hatte jedoch einen geringeren Informationswert bezüglich Ihrer Rolle in der Gefäßbildung. FGF1^{-/-}- und FGF2^{-/-}-Mäuse (Einzel- oder Doppelknockout) präsentierten keinen vaskulären Phänotyp (Miller, Ortega et al., 2000), was entweder auf eine funktionell-redundante oder nicht-essentielle Funktion der FGFs in der Vaskulo- und Angiogenese hinweist.

FGFR1 und FGFR2 sind als einzige FGFRs in vaskulären Zellen exprimiert, wobei FGFR1 stark und FGFR2 gering exprimiert wird (Javerzat, Auguste et al., 2002). Die Knockouts dieser beiden Rezeptoren resultierten in Wachstumsstillstand der Embryonen, bevor die embryonale Vaskulogenese einsetzen konnte (Deng, Wynshaw-Boris et al., 1994; Arman, Haffner-Krausz et al., 1998). Damit konnte die Frage, ob FGFRs eine essentielle Rolle in der Gefäßentwicklung besitzen, noch nicht beantwortet werden. Untersuchungen an transgenen Mäusen, die eine dominant-negative FGFR1-Variante mit fehlenden zytoplasmatischen Domänen spezifisch im Auge exprimieren, deuten jedoch darauf hin, dass FGFR1 essentiell für die Verzweigung des Gefäßsystemes ist (Rousseau, Larrieu-Lahargue et al., 2003). Bezüglich der FGF/FGFR-abhängigen

Signaltransduktionewege in vaskulären Zellen wurde die Beteiligung von einigen verschiedenen Proteinen beschrieben. So konnten z.B. die Tyrosinkinase Fyn, Src und Fes und die Adapterproteine Shb und Grb2 mit der FGF-induzierten Angiogenese in Verbindung gebracht werden (Auguste, Javerzat et al., 2003). Des Weiteren wurde die *mitogen activated protein kinase* (MAPK) p38 als essentieller Mediator der FGF-abhängigen Signalwege in Endothelzellen identifiziert (Matsumoto, Turesson et al., 2002).

1.3.6 Weitere Rezeptoren

Neben den bereits beschriebenen Liganden/Rezeptor-Paaren wurden zwei weitere Ligand/RTK-Paarungen als essentiell für den Prozess der embryonalen Gefäßentwicklung beschrieben, TGF- β /T β RII (*tumor necrosis factor β*) und PDGF/PDGFR (*platelet derived growth factor*).

Die PDGF-Signaltransduktion ist in der Proliferation von vSMC und der Migration von vSMC und Perizyten zum sich entwickelnden Endothel involviert (Lindahl, Hellstrom et al., 1998), ein Prozess, der reziproke Interaktion zwischen dem Endothel und den umgebenden Zellen erfordert. Arterielle und kapillare Endothelzellen sezernieren PDGF-B, wohingegen sich entwickelnde vSMC und Perizyten den PDGF-B-Rezeptor PDGFR- β , exprimieren (Betsholtz, Karlsson et al., 2001).

TGF- β -Signaltransduktion in Endothelzellen basiert auf ein Zusammenwirken von TGF- β , T β RI, Alk1, Alk5 (Alk, *activin receptor-like kinase*) verschiedenen Smad-Transduktionsfaktoren (*sma- and mad-related protein*). Im Prinzip bindet TGF- β an den TyplI-Rezeptor T β RI, welcher darauf folgend einen der TyplI-Rezeptoren, Alk1 oder Alk2, rekrutiert und phosphoryliert (Wrana, 1998). Diese interagieren mit und phosphorylieren verschiedene Smad-Transduktionsfaktoren (u.a. Smad-2, Smad-3 oder Smad-5), welche mit Smad-4 komplexieren und nach ihrer Translokation in den Nukleus die Transkription von bestimmten Zielgenen aktivieren (Rossant und Howard, 2002). Endothelzellen exprimieren außerdem den TyplII-Transmembran-Korezeptor Endoglin, der die Aktivierung des TGF-Signals reduzieren kann (Barbara, Wrana et al., 1999).

Basierend auf Knockout- und Zellkultur-Studien wurde postuliert, dass TGF- β zusammen mit Alk5 und weiteren Wachstumsfaktoren die Proliferation und Migration von Endothelzellen unterstützt, aber zusammen mit Alk1 in einer späteren Phase der Angiogenese durch Rekrutierung von Helfer-Zellen zur Stabilisierung der Gefäße beiträgt (Rossant und Howard, 2002). Ferner wurde dargelegt, dass der TGF- β -

Signalweg eine entscheidende Funktion in der arteriovenösen Entwicklung der Gefäßsysteme besitzt (Urness, Sorensen et al., 2000).

1.4 Adhäsions-Moleküle in der vaskulären Entwicklung

1.4.1 Cadherine

Cadherine bilden eine Familie aus Transmembran-Glykoproteinen, die Kalzium-abhängige Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Im Allgemeinen sind sie in *adherence junctions* organisiert, wo sie gebündelt vorliegen und über ihre zytoplasmatische Domäne mit einer Vielzahl an Zytoskelett-Proteinen ein komplexes Netzwerk bilden (Wheelock and Johnson, 2003). Basierend auf ihrer homophilen Interaktion sind sie an verschiedensten zellulären Prozessen beteiligt, u.a. an der Embryogenese, Etablierung der Zellpolarität, Aufrechterhaltung der Gewebemorphologie und Zelldifferenzierung (Wheelock and Johnson, 2003).

Endothelzellen exprimieren nur drei verschiedene Cadherine: neuronales Cadherin (N-Cadherin), vaskulär-endotheliales Cadherin (VE-Cadherin) und das erst kürzlich näher charakterisierte T-Cadherin (Cadherin 13) (Ivanov, Philippova et al., 2004). T-Cadherin zeichnet sich durch seinen für Cadherine ungewöhnlichen Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker aus und wird hauptsächlich mit Zelladhäsion in Verbindung gebracht (Ivanov, Philippova et al., 2004). Detaillierte Untersuchungen zu der Funktion von T-Cadherin *in vivo* sind leider noch nicht vorhanden.

VE-Cadherin und N-Cadherin sind die hauptsächlich exprimierten Cadherine in Endothelzellen, und obwohl ihre Proteinexpression vergleichbar ist, ist nur VE-Cadherin in den *adherence junctions* lokalisiert. N-Cadherin ist hingegen gleichmäßig über die Zellmembran verteilt (Navarro, Ruco et al., 1998).

Interessanterweise führt die N-Cadherin-Defizienz zu einem embryonal-letalen Phänotyp um E9.5, der teilweise auf einen vaskulären Defekt des Dottersackes zurückzuführen ist (Radice, Rayburn et al., 1997). Außerdem wird N-Cadherin eine essentielle Funktion in der SMC-EC-Interaktion attestiert (Gerhardt, Wolburg et al., 2000; Moiseeva, 2001)

VE-Cadherin wird exklusiv in Endothelzellen exprimiert (Lampugnani, Resnati et al., 1992). Die Analyse von VE-Cadherin-defizienten Mäusen zeigt, dass VE-Cadherin primär in der Angiogenese aktiv ist (Gory-Faure, Prandini et al., 1999). VE-Cadherin-Knockouts bilden zwar ein primären vaskulären Plexus aus, doch es kommt zu keiner

angiogenen Neugestaltung (Carmeliet, Lampugnani et al., 1999). Erstaunlich ist, dass die VE-Cadherin-Defizienz zu keinem offensichtlichen Defekt der interzellulären Kontakte führt (Gory-Faure, Prandini et al., 1999), was möglicherweise mit einer funktionellen Redundanz der beiden Cadherine erklärt werden kann (Navarro, Ruco et al., 1998).

Ein weiterer Mechanismus, wie VE-Cadherin in der Angiogenese involviert ist, wurde durch die detaillierte Analyse des Knockouts dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass VE-Cadherin-defiziente Embryonen im Endothel eine erhöhte Apoptoserate aufzeigen (Carmeliet, Lampugnani et al., 1999). Ferner konnte gezeigt werden, dass VE-Cadherin-defiziente Zellen kein durch VEGF-A-induziertes anti-apoptotisches Signal weiterleiten können. Die Unterbrechung dieses Signalweges beruhte letztendlich auf dem Unvermögen der mit VEGFR-2 gebundenen Phosphatidylinositol-(PI3)-Kinase mit dem VE-Cadherin assoziierten β -Catenin zu komplexieren (Carmeliet, Lampugnani et al., 1999).

1.5 Transkriptionelle Kontrolle der vaskulären Entwicklung

Die vaskuläre Entwicklung ist ein komplexer Vorgang, der eine zeitlich und räumlich regulierte Expression von spezifischen Genen erfordert und die transkriptionelle Regulierung dieses Vorganges ist entscheidend für die koordinierte Expression dieser notwendigen Gene. Promotor-, Transaktivierungs- und Knockoutstudien identifizierten eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die eine essentielle Funktion in der Vaskulose sowie in der Angiogenese besitzen. In der Gefäßentwicklung sind hauptsächlich Transkriptionsfaktoren der Ets-, bHLH-, PAS-bHLH- und der MADS-Box-Gruppe involviert.

1.5.1 Ets-Familie

Die Ets-Familie umfasst Aktivatoren und Inhibitoren der Transkription, deren Aktivität durch Phosphorylierung und durch Protein-Protein-Interaktion reguliert ist. Aus dieser Familie sind während der Angiogenese Ets-1 (*E26 avian leukemia oncogene 1*), Erg-1 (*v-ets erythroblastosis virus E26*) und Fli-1 (*friend leukemia virus integration 1*) in Endothelzellen exprimiert (Lelievre, Lionneton et al., 2001). Ihre Expression wird durch angiogene Faktoren in kultivierten Endothelzellen sowie durch verschiedene

Stressfaktoren, die während der Angiogenese auftreten, induziert (Lelievre, Lionneton et al., 2001).

Funktionelle Ets-Bindungssequenzen konnten in mehreren Promotoren von Genen, die in der Angiogenese involviert sind, identifiziert werden. Für *tie1* (Ijtin, Dube et al., 1999), *tie2* (Dube, Akbarali et al., 1999), *vegfr1/flt-1* (Wakiya, Begue et al., 1996) und *vegfr2/flk-1* (Kappel, Schlaeger et al., 2000) konnte sogar eine direkte Regulierung durch Ets-1 gezeigt werden. Ferner erniedrigt Ets-1 die Endothelzellendichte im konfluenten Zustand und reguliert die Expression von VE-Cadherin (Lelievre, Mattot et al., 2000).

In vivo-Studien wiesen ebenfalls auf eine notwendige Funktion von Ets-1 in der Gefäßbildung hin. Die verminderte Expression von Ets-1 führte beispielsweise im *chorio-allantoic-membrane* (CAM)-Hühnchen-Modellsystem zur signifikanten Inhibierung der Angiogenese denn Gefäßdurchmesser sowie die Anzahl der Gefäße waren reduziert (Wernert, Stanjek et al., 1999). Der Ets-1-Knockout zeigte hingegen keine kardiovaskulären Defekte, was einerseits auf eine nicht essentielle Funktion von Ets-1 in der Angiogenese hinweist oder darauf hindeuten könnte, dass Fli-1 oder Erg-1, die ein überlappendes Expressionsmuster mit Ets-1 haben, die Ets-1-Defizienz kompensieren können (Barton, Muthusamy et al., 1998; Lelievre, Lionneton et al., 2001).

Fli-1 und Erg-1 regulieren ebenfalls die Expression verschiedener Gene, die direkt oder indirekt in der Angiogenese involviert sind. So konnte u.a. gezeigt werden, dass die Expression von VEGFR1 und der Kollagenase1 durch Erg-1 und GATA-1, Tenaskin-1 und EndoA durch Fli-1 reguliert wird (Lelievre, Lionneton et al., 2001).

Im Gegensatz zu den Ets-1-defizienten Mäusen sterben Fli-1^{-/-}-Mäuse allerdings um E12.0 an einen generellen kardiovaskulären Defekt (Spyropoulos, Pharr et al., 2000), was die unentbehrliche Funktion des Transkriptionsfaktors in der embryonalen Angiogenese demonstriert.

1.5.2 PAS-bHLH, bHLH und MADS-Box

Zusätzlich zu der Ets-Familie sind mindestens drei weitere Gruppen von Transkriptionsfaktoren in dem Prozess der Angiogenese beteiligt: die *PAS-basic-helix-loop-helix* (PAS-bHLH)-, die bHLH- und die MADS-Box-Transkriptionsfaktoren (Oettgen, 2001).

Beispielsweise sind Mäuse, die defizient für die MADS-Box-Transkriptionsfaktoren MEF2C und SMAD5 sind, aufgrund von massiven Defekten in der kardiovaskulären Entwicklung embryonal letal (Bi, Drake et al., 1999; Yang, Castilla et al., 1999). *Hairy*

and *enhancer of split related basic helix loop helix*-Transkriptionsfaktoren wie Hey und Hes sind Hauptzielgene der Notch/Delta-Signaltransduktion. Wie bereits beschrieben wurde, ist dieser Signalweg essentiell für die embryonale Gefäßentwicklung (Abschnitt 1.3.4). Dies wurde durch die Generierung des Hey1/Hey2-Doppelknockouts bestätigt, denn doppeldefiziente Embryonen sterben um E9.5 am generellen Fehlen der Angiogenese (Fischer, Schumacher et al., 2004).

Auch für Transkriptionsfaktoren der PAS-bHLH-Gruppe konnte durch die Generierung von Knockouts gezeigt werden, dass sie notwendige Funktionen in der embryonalen Gefäßentwicklung besitzen. Hif-1 α -defiziente Embryonen zeigen z.B. diverse Defekte in der Bildung des primären Gefäßplexus sowie in der Angiogenese. Detaillierte Analysen des Knockouts konnten die Ursache des Defektes auf eine VEGF-unabhängige Erhöhung des mesenchymalen Zelltodes zurückführen (Kotch, Iyer et al., 1999). Dies ist ein gutes Beispiele dafür, dass der Prozess der Gefäßentwicklung hochkomplex ist und die Interaktion eine Vielzahl verschiedener Zelltypen voraussetzt.

1.6 Zielsetzung

Die Protein Kinase C-Familie ist eine der meist untersuchten Gruppen von Proteinen, die in der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind. Fundierte Kenntnisse über funktionelle Redundanz oder Interaktionen innerhalb dieser Familie sind jedoch nur spärlich vorhanden.

Obwohl gezeigt wurde, dass PKCs u.a. bei Zellmigration, zellulärer Kommunikation und Apoptose wichtige Funktionen übernehmen, sind nahezu alle PKC-defizienten Mäuse lebensfähig und zeigen keine offensichtlichen entwicklungsbiologischen Schäden.

Die vorliegende Arbeit sollte einen Einblick in die funktionelle Interaktion von PKC-Isozymen während der embryonalen Entwicklung geben. Hierzu sollte nach überlappenden Expressionsdomänen innerhalb der PKC-Familie gesucht werden. Anschließend sollten die erzielten Erkenntnisse als Basis für die Generierung einer PKC-doppelfizienten Mauslinie dienen. Der Fokus des Projektes würde nun die phänotypische Analyse einer PKC-doppelfizienten Mauslinie sein. Hierbei sollten neben den anatomischen und histologischen Analysen zur Untersuchung morphologischer Defekte die in den PKC-doppelfizienten Mäusen veränderten Signalkaskaden im Mittelpunkt der Analyse stehen.

2 Ergebnisse

2.1 Expressionsanalyse von PKC δ/ϵ während der Embryogenese der Maus

Die Expression von PKCs in verschiedenen adulten Geweben ist von diversen Arbeitsgruppen untersucht worden (Schreiber, Paquet et al., 2001), (Redling, Pfaff et al., 2004). Eine genauere embryonale Analyse der Expressionsdomänen wurde jedoch bis auf einige wenige Expressionsanalysen wie z.B. der von PKC Φ (Wilda, Ghaffari-Tabrizi et al., 2001) nicht durchgeführt. Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, funktionelle Interaktionen von PKC-Isozymen während der embryonalen Entwicklung zu analysieren. Hierzu sollte nach überlappenden Expressionsdomänen innerhalb der PKC-Familie gesucht werden. Anschließend sollten die erzielten Kenntnisse als Basis für die Generierung einer PKC-doppeldefizienten Mauslinie dienen. Um Aufschluss über eine mögliche funktionelle Interaktion von PKC δ und PKC ϵ während der Embryonalentwicklung zu erhalten, wurde die Expression dieser beiden nPKCs zwischen E8.0 und E14.5 untersucht. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe von Immunhistochemie, der *whole mount in situ*-Hybridisierung (wmISH), *in situ*-Hybridisierung von Schnitten und der LacZ/X-Gal-Färbung homozygoter PKC $\delta^{\text{LacZ/LacZ}}$ - und PKC $\epsilon^{\text{LacZ/LacZ}}$ -Mäuse die genaue Lokalisierung der beiden PKC-Isoformen bestimmt.

2.1.1 Expression von PKC δ während der Embryogenese

Die PKC δ -Expression zwischen E8.0 und E13.5 wurde hauptsächlich im kardiovaskulären und neuronalen System beobachtet. Des Weiteren konnte die Lokalisierung von PKC δ in einigen anderen Organsystemen nachgewiesen werden.

2.1.1.1 Kardiovaskuläre Expression

Die kardiovaskuläre Expression von PKC δ wurde zwischen E8.0 und E13.5 untersucht, dabei konnte PKC δ in verschiedenen Herzregionen und in arteriellen sowie venösen Gefäßen nachgewiesen werden. Die früheste in den hier untersuchten embryonalen Stadien detektierbare Expression von PKC δ konnte um E8.0 innerhalb des Herz-Halbmondes (Abb. 2.1 A) und innerhalb der Blutinseln (Daten nicht gezeigt)

dokumentiert werden. Der Herz-Halbmond ist eine embryonale Anlage, die später an der Formation des Herzens beteiligt ist (Zaffran und Frasch, 2002). Die Blutinseln sind im Gegensatz dazu u.a. an der Formation des primären vaskulären Plexus beteiligt.

Bei E9.5 ist die kardiovaskuläre Expression auf die meisten Bereiche des sich entwickelnden Herzens und des Gefäßsystems ausgeweitet (Abb. 2.1 B). Hierbei konnte PKC δ im allen Herzregionen, d.h. im *Bulbus cordis*, in den primitiven Herzkammern und im *Sinus venosus* sowie innerhalb des ganzen arteriellen sowie venösen Gefäßsystems nachgewiesen werden. Im speziellen konnte PKC ϵ -Expression innerhalb der Intersegmentalgefäße (Abb. 2.1 C) sowie in den durch Vaskulogenese geformten primären Gefäßsystem wie z.B. innerhalb der dorsalen Aorten und der Kardinalvenen (Abb. 2 D) detektiert werden.

Grundsätzlich bleibt das kardiovaskuläre Expressionsmuster von PKC δ einen Tag später bei E10.5 (Abb. 2.1 E, F, G, I-K) unverändert. Weiterhin ist PKC δ innerhalb der Primärgefäße (Abb. 2.1 E, J, K) und kleinerer Gefäße (Abb. 2.1 G) lokalisiert. Allerdings beschränkt sich nun die Expression im Herzen auf das Perikardium, auf das Endokardium und auf das Epikardium, wobei diese Expression wiederum in allen Herzregionen vorhanden ist, darunter auch in den primitiven Herzkammern und innerhalb des *Bulbus cordis* (Abb. 2.1 I, K). Während der embryonalen Tage E11.5-E13.5 konnte PKC δ weiterhin in den verschiedenen Bereichen des kardiovaskulären Systems nachgewiesen werden wie z.B. innerhalb des Perikardiums (Abb. 2.2 A, B) der Intersegmentalgefäße (Abb. 2.2 G) und des Epikardiums (Abb. 2.2 H).

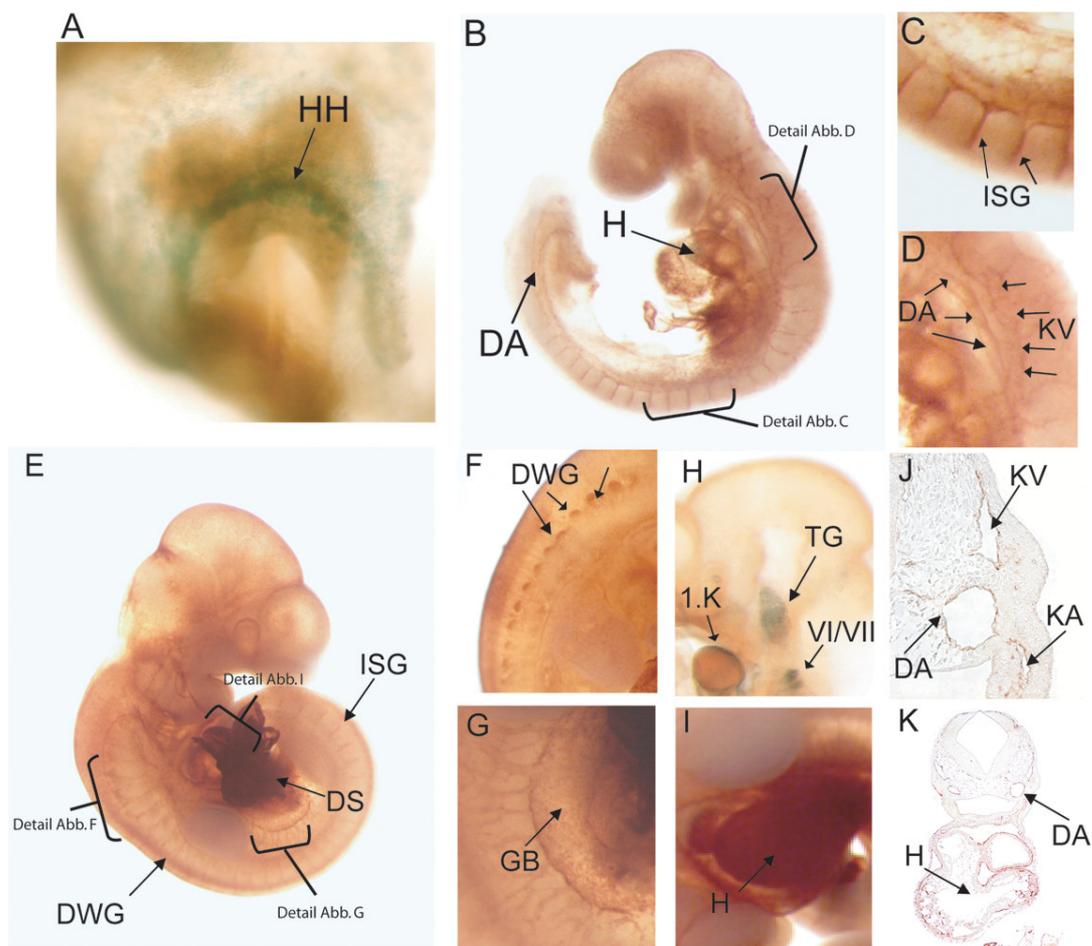


Abb. 2.1. Die Expression von PKC δ um E8.0 (A), E9.5 (B-C) und E10.5 (E-K) wurde mit *whole mount*- Immunhistochemie (A-G, I), LacZ/X-Gal Färbung (H) und Immunhistochemie auf Paraffin-Schnitten untersucht (J, K). DA, dorsale Aorta; DS, Dottersack; DWG, dorsale Wurzel-ganglien; GB, Gefäße des Bauchbereiches; H, Herz; HH, Herz-Halbmond; ISG, Intersegmentalgefäße; KA, Kiemenbogen-Aorta; KV, Kardinalvene; TG, Trigeminal-Ganglion; VI/VII, kraniale Ganglien VI/VII; 1.K, erster Kiemenbogen.

2.1.1.2 Neuronale Expression

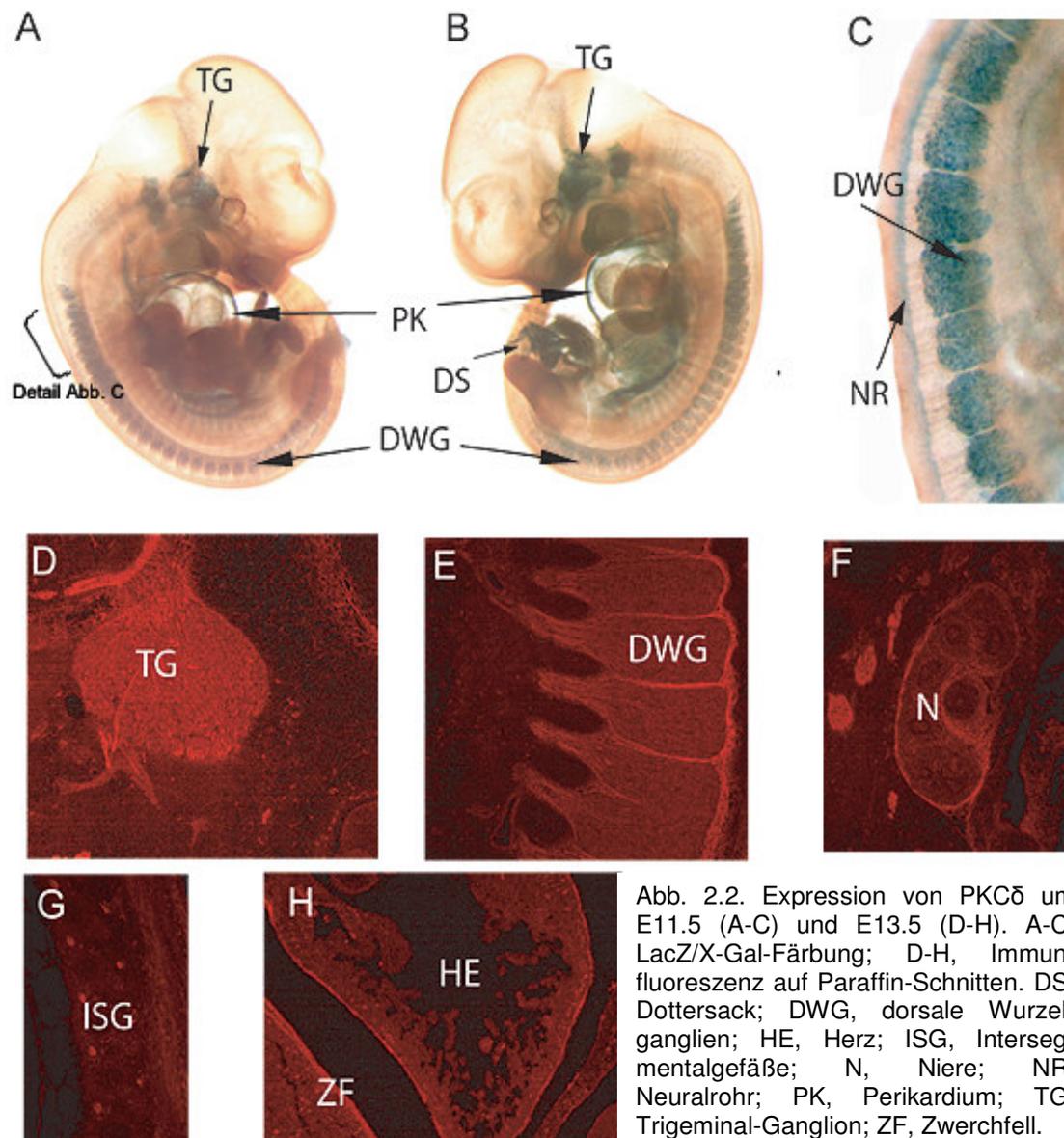
Die Expression von PKC δ im Zentralnervensystem (ZNS) wurde zwischen E10.5 und E13.5 hauptsächlich in drei verschiedenen Strukturen nachgewiesen; innerhalb der kranialen Ganglien, der dorsalen Wurzelganglien (DWG) und innerhalb des Neuralrohres. Die früheste Expression von PKC δ innerhalb des ZNS wurde um E10.5 in den dorsalen Wurzelganglien nachgewiesen (Abb.2.1 E, F), dabei ist anzumerken, dass diese Expressionsdomäne in den in dieser Arbeit untersuchten späteren embryonalen Stadien konstant vorhanden bleibt. Etwa zeitgleich mit dem Auftreten der Expression in den DWG konnte PKC δ mittels LacZ/X-Gal-Färbung innerhalb verschiedener kranialer

Ganglien nachgewiesen werden. Abbildung 2.1 H zeigt die Expression innerhalb des Trigeminal-Ganglions (Kranialganglion V) und der VI/VII-kranialen Ganglien. Wie bereits zuvor für die PKC δ -Expression in den DWG beschrieben wurde, bleibt auch die Expressionsdomäne der kranialen Ganglien in den späteren embryonalen Stadien E11.5 und E13.5 erhalten (Abb. 2.2 A-C, E). Ab E11.0 wurde mit dem Neuralrohr eine zusätzliche PKC δ -Expressionsdomäne beobachtet (Abb. 2.2 C) Dabei beschränkt sich die Expression auf den somatisch-efferenten Teil der Grundplatte des Neuralrohres (Abb. 2.2 C und nicht gezeigte Daten).

Bei E13.5, dem ältesten in dieser Arbeit untersuchten embryonalen Stadium, konnte die Expression in den bereits für jüngere Stadien beschriebenen Expressionsdomänen weiterhin nachgewiesen werden. Die PKC δ -Expression im Trigeminal-Ganglion ist weiter stark ausgeprägt, wobei nun zusätzlich eine Expression in der Verbindung zur Brückenregion (Pons) zu erkennen ist (Abb. 2.2 A, B, D).

2.1.1.3 Weitere Expressionsdomänen

Abgesehen von der vorherrschenden Expression von PKC δ im kardiovaskulären und im neuronalen System konnte PKC δ auch in anderen embryonalen Geweben lokalisiert werden. So wurde z.B. eine ubiquitäre Expression im Dottersack von E9.5-E11.5-Embryonen detektiert (Abb. 2.1 E und 2.2 B, Stadium E13.5 wurde nicht auf PKC δ -Expression im Dottersack geprüft). Ferner zeigten LacZ/X-Gal *whole mount*-Färbungen von E10.5 PKC $\delta^{\text{LacZ/LacZ}}$ -Embryonen die Expression von PKC δ im ersten Kiemenbogen (Abb. 2.2 H). Außerdem konnte PKC δ im Zwerchfell und in der Niere mittels Immunhistochmie nachgewiesen werden (Abb. 2.2 F, H).



2.1.2 Expression von PKC ϵ während der Embryogenese

Die Expressionsanalyse von PKC ϵ um E8.5-E14.5 zeigte, dass PKC ϵ ein mit PKC δ überlappendes Expressionsmuster aufweist. Wie bereits für PKC δ beschrieben, beschränkt sich die Expression von PKC ϵ innerhalb der in dieser Arbeit untersuchten embryonalen Stadien hauptsächlich auf zwei Expressionsdomänen, nämlich kardiovaskuläre Strukturen und neuronale Strukturen des ZNS.

2.1.2.1 Kardiovaskuläre Expression

Das früheste untersuchte embryonale Stadium mit Bezug auf die Expression von PKC ϵ im kardiovaskulären System war E8.5. In diesem Zusammenhang konnte die Expression von PKC ϵ im primitiven Herzen detektiert werden (Abb. 2.3 A). Dabei ist PKC ϵ im Myokardium der allgemeinen Herzkammer und innerhalb des *Sinus venosus* exprimiert (Abb. 2.3 E). Die Entwicklung des primären vaskulären Plexus ist um E8.5 abgeschlossen und der embryonale Prozess der Angiogenese führt nun zu einer Umgestaltung des primitiven Gefäßsystems in ein Netzwerk, bestehend aus Gefäßen mit heterogenem Lumen. Beginnend um E9.25-E9.75 konnte PKC ϵ in dem sich während der Angiogenese entwickelten mikrovaskulären Gefäßsystem nachgewiesen werden (Abb. 2.3 D, F, H). Die Expression von PKC ϵ beschränkte sich um E9.5 jedoch nicht ausschließlich auf Gefäße, die sich während der Angiogenese entwickelt haben, sondern PKC ϵ konnte auch im primären Gefäßsystem detektiert werden. Abbildung 2.3 C zeigt im Ausschnitt die PKC ϵ -Expression innerhalb der dorsalen Aorta. Hierbei ist anzumerken, dass die Expression innerhalb der Primärgefäße nur mittels *whole mount*-ISH nachgewiesen werden konnte und somit die Expressionsanalyse bezüglich der Primärgefäße für die älteren Stadien aufgrund der technischen Einschränkungen der *whole mount*-ISH nicht durchgeführt werden konnte.

Zusätzlich zu der Expression innerhalb der Mikrovaskulatur und der dorsalen Aorta wurde PKC ϵ , wie schon bereits für E8.5-Embryonen beschrieben wurde, im Herzen detektiert (Abb. 2.3 B, D, F, G). Auch bei diesem embryonalen Stadium beschränkte sich die Expression auf das Myokardium der primitiven Herzkammern und ferner auf den *Bulbus cordis* und den *Sinus venosus*. Während des embryonalen Tages 10.5 bleibt die Expression im kardiovaskulären Bereich bestehen, wobei die kardiale Expression nun auch das Epikardium umfasst (Abb. 2.4 E). Das embryonale Herz um E10.5 besteht grundsätzlich aus den primitiven Herzkammern, dem *Truncus arteriosus*, dem *Bulbus cordis* und dem *Sinus venosus*. In all diesen Herzregionen konnte um E10.5 die Expression von PKC ϵ nachgewiesen werden (Abbildung 2.4 D, E und nicht gezeigte Daten).

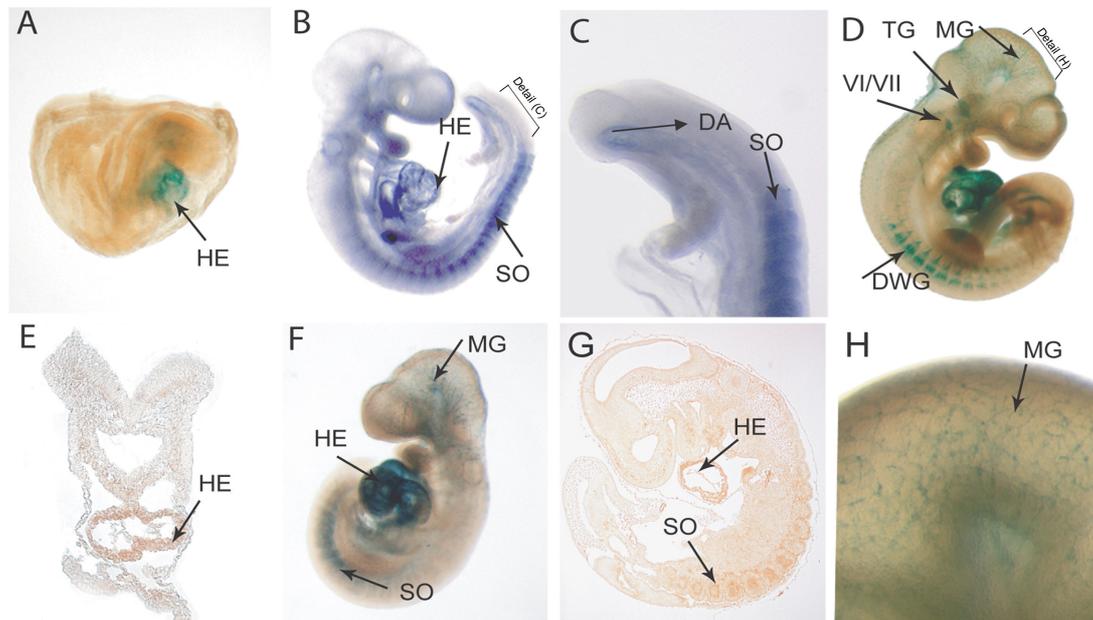


Abb.2.3. Die PKC ϵ -Expression von E8.5-E9.75 (E8.5, A, E; E9.0, B, C, F; E9.5, G; E9.75, D, H) wurde detektiert durch LacZ/X-Gal-Färbung (A, D, F und H), *whole mount* ISH (B, C) und Immunhistochemie auf Paraffin-Schnitten (E, G). DA, dorsale Aorta; DWG, dorsale Wurzelganglien; HE, Herz; MG, Mikrogefäße; SO, Somiten; TG, Trigeminal-Ganglion; VI/VII, kraniale Ganglien VI/VII.

Letztendlich bleibt die Expression von PKC ϵ im kardiovaskulären System um E11.5 und E14.5 bestehen und umfasst grundsätzlich die bereits für frühere Stadien erwähnten Strukturen (Abb. 2.4. D, E und hier nicht gezeigte Daten).

2.1.2.2 Neuronale Expression

Die neuronale Expression von PKC ϵ ähnelt der von PKC δ und beginnt um E9.75 in den dorsalen Wurzelganglien, dem Trigeminal-Ganglion, den VI/VII-Kranialganglien und den XI/X-Kranialganglien (Abb. 2.3 D). Einen knappen Tag später, um E10.5, ist die Expression von PKC ϵ im ZNS stärker ausdifferenziert. Es konnte eine Expression in allen bis zu diesem Stadium entwickelten sensorischen Ganglien nachgewiesen werden (Abb. 2.4 A-D, F). Um E11.75-E12.5 wird PKC ϵ zusätzlich zu den bereits erwähnten Ganglien im XI. kranialen Ganglion exprimiert und ist nun verstärkt innerhalb der Neuralröhre lokalisiert (Abb. 2.5 A-C, E, F). Im Neuralrohr beschränkt sich die LacZ/X-Gal-Färbung um E10.5 und E11.5 auf den somatisch-efferenten Teil der Grundplatte (Abb. 2.4 F, 2.5 B). Im Gegensatz dazu, wird PKC ϵ durch Immunhistochemie um E10.5 und E12.5 ubiquitär im Neuralrohr detektiert (Abb. 2.4 B, 2.5 C).

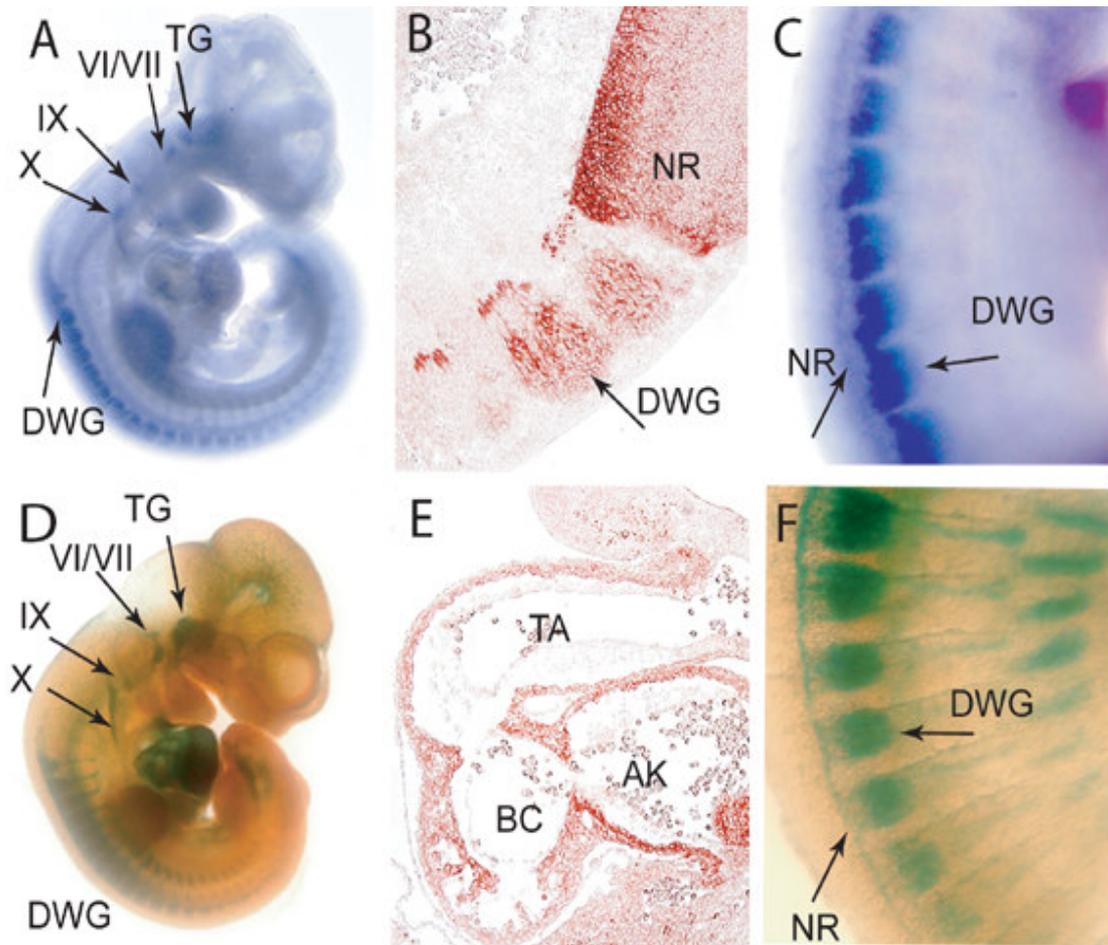


Abb. 2.4. Expression von PKC ϵ um E10.5. Die Lokalisierung von PKC ϵ wurde detektiert durch (A, C) *whole mount* ISH, (B, E) Immunhistochemie auf Paraffin-Schnitten, (D, F) LacZ/X-Gal- Färbung. AK, gemeinsame arterielle Kammer; BC, *Bulbus cordis*; DWG, dorsale Wurzelganglien; NR, Neuralrohr; TG, Trigeminale-Ganglion; VI/VII- IX-X, kraniale Ganglien.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Expressionsdomänen um E12.5 konnte bei diesem embryonalen Stadium eine ausgeprägte Expression von PKC ϵ in der Brückenregion nachgewiesen werden (Abb. 2.5 D).

Im weiter entwickelten Gehirn des E14.5-Embryos konnte PKC ϵ -Expression außerdem in der Kortikalplatte des Kortex, im Cerebellum und im Neuroepithel des Auges detektiert werden (Abb. 2.5 F, H, I).

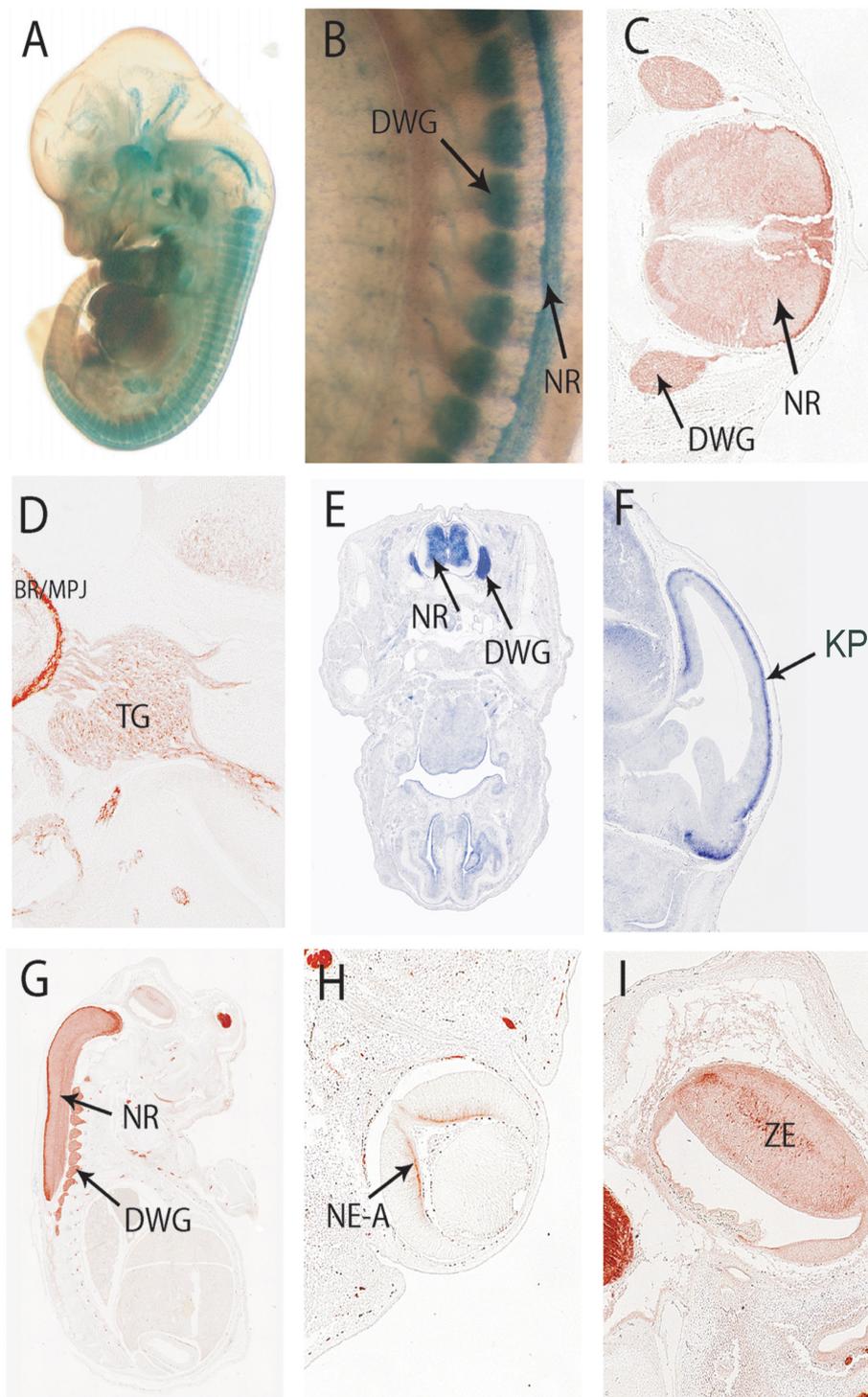


Abb. 2.5. Die PKC ϵ -Expression von E11.5- (A, B), E12.5- (C, D) und E14.5-Embryonen (E-I) wurde durch LacZ/X-Gal-Färbung (A, B), Immunhistochemie (C, D, G-I) und durch ISH (E, F) nachgewiesen. BR/MPJ, Brückenregion (*Midbrain/Pons junction*); DWG, dorsale Wurzelganglien; KP, Kortikalplatte; NE-A, Neuroepithel des Auges; NR, Neuralrohr; TG, Trigeminal-Ganglion; ZE, Cerebellum.

2.1.2.3 Weitere Expressionsdomänen

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Expressionsdomänen von PKC ϵ innerhalb des kardiovaskulären Systems und des ZNS konnte um E9.5 eine Expression in den Somiten nachgewiesen werden (Abb.2.4 B, C, F, G). In diesem Zusammenhang wurde PKC ϵ ubiquitär innerhalb der Somiten exprimiert (G).

2.2 Generierung und phänotypische Charakterisierung der PKC δ/ϵ -doppeldefizienten Mauslinie

Die PKC $\delta^{-/-}$ - und PKC $\epsilon^{-/-}$ -Mäuse wurden in der Arbeitsgruppe Leitges generiert (Leitges, ; Klock, 2000) und zeigen keinen auffälligen Phänotyp bezüglich der embryonalen kardiovaskulären oder neuronalen Entwicklung. Beide einzeldefizienten Mauselinien sind lebensfähig, wenn auch nur bedingt fertil.

Die Expressionsanalyse von PKC δ und PKC ϵ zeigte überlappende Expressionsdomänen dieser beiden PKC-Isoformen innerhalb des kardiovaskulären und des neuronalen Systems auf. Diese Überlappung könnte auf eine funktionelle Redundanz dieser beiden Isoformen innerhalb dieser Bereiche hindeuten, und somit erklären, warum es keinen embryonalen Phänotyp in den einzeldefizienten Mäusen gibt.

Um Aufschluss über eine mögliche funktionelle Redundanz von PKC δ und PKC ϵ zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit durch gezielte Verpaarung der Einzeldefizienzen die Folgen der PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz untersucht.

2.2.1 Genotyp-Häufigkeiten unter den Jungtieren und Embryonen

Die Verpaarung von PKC $\delta^{+/-}$ /PKC $\epsilon^{+/-}$ Mäusen mit nachfolgender Genotypisierung von ca. 150 Neugeborenen (Daten nicht gezeigt) ergab, dass zwei der zu erwartenden Genotypen, PKC $\delta^{-/-}$ /PKC $\epsilon^{+/-}$ und PKC $\delta^{-/-}$ /PKC $\epsilon^{-/-}$, nicht in der Neugeborenenpopulation vorhanden waren. Dagegen wiesen alle anderen Genotypen keine signifikanten Abweichungen von der zu erwartenden Häufigkeit innerhalb der genotypisierten Population auf. Dieser Befund lässt die Schlussfolgerung zu, dass die PKC $\delta^{-/-}$ /PKC $\epsilon^{+/-}$ - und die PKC $\delta^{-/-}$ /PKC $\epsilon^{-/-}$ -Genotypen einen embryonalen letalen Phänotyp besitzen.

2.2.2 Phänotypische Beschreibung der letalen Genotypen

Mit einer systematischen genotypischen Analyse von Embryonen im Alter zwischen E9.5 und E16.5 konnte gezeigt werden, dass die beiden letalen Genotypen zwar in E9.5-E10.5, aber nicht mehr in E11.5-E16.5-Populationen präsent sind (Daten nicht gezeigt), wodurch der Zeitpunkt des Sterbens letaler Genotypen auf Embryonaltag 10 eingegrenzt wurde.

Die detaillierte phänotypische Charakterisierung der verschiedenen Genotypen im Alter von E9.5 und E10.5 zeigte, dass $PKC\delta^{-}/PKC\epsilon^{+/-}$ - und $PKC\delta^{-}/PKC\epsilon^{-/-}$ -Embryonen diverse embryonale Fehlentwicklungen aufweisen (Abb. 2.6 A-D). Bei E9.5 ist der $PKC\delta^{-}/PKC\epsilon^{+/-}$ -Genotyp äußerlich nicht vom Wildtyp zu unterscheiden, wohingegen der doppeldefiziente Embryo eine generelle Wachstumsretardierung aufweist, die in Kopf- und Schwanzregion am ausgeprägtesten zu beobachten ist.

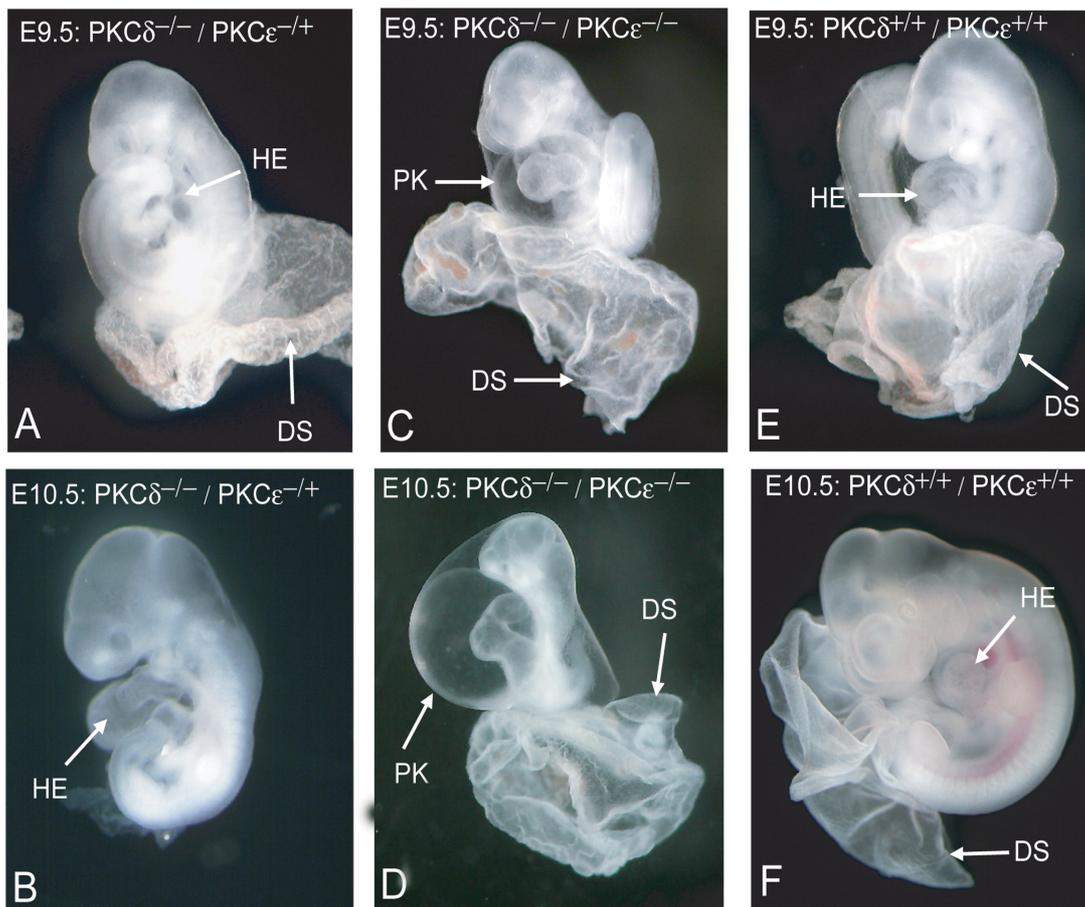


Abb. 2.6. Phänotypisches Erscheinungsbild von $PKC\delta^{-}/PKC\epsilon^{-/-}$ (C, D), $PKC\delta^{-}/PKC\epsilon^{+/-}$ (A, B) und Wildtyp-Embryonen (E, F) bei E9.5 und E10.5. Die $PKC\delta^{-}/PKC\epsilon^{+/-}$ -Embryonen zeigen im Vergleich zu den $PKC\delta^{-}/PKC\epsilon^{-/-}$ -Embryonen einen weniger stark ausgeprägten Phänotyp, dennoch weisen beide Genotypen eine generelle Wachstumsretardierung auf. Charakteristisch sind die vergrößerten Perikardialhöhlen und die veränderten Strukturen der Dottersäcke. DS, Dottersack; HE, Herz; PK, Perikardium.

Ein vergrößertes Perikardium, ein charakteristisches Merkmal für Gefäßsystemdefekte, konnte ebenfalls in der PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz beobachtet werden (Abb. 2.6 C, D). In Teilen des extraembryonalen Gewebes, insbesondere im Dottersack, weisen beide letalen Genotypen bei E9.5 und bei E10.5 eine veränderte Struktur auf (Abb. 2.6 A-D). Im Alter von E10.5 ist die Wachstumsretardierung des doppeldefizienten Embryos weiter ausgebildet (Abb. 2.6 B), und die bereits bei E9.5 sichtbaren Fehlbildungen sind nun stärker ausgeprägt. PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{+/-}-Embryonen zeigen bei E10.5 ähnliche, jedoch mildere Fehlentwicklungen im Vergleich zu den doppeldefizienten Embryonen. Jedoch sind auch hier eine generelle Wachstumsretardierung mit dem Schwerpunkt auf Kopf- und Schwanzregion und ein vergrößertes Perikardium zu beobachten.

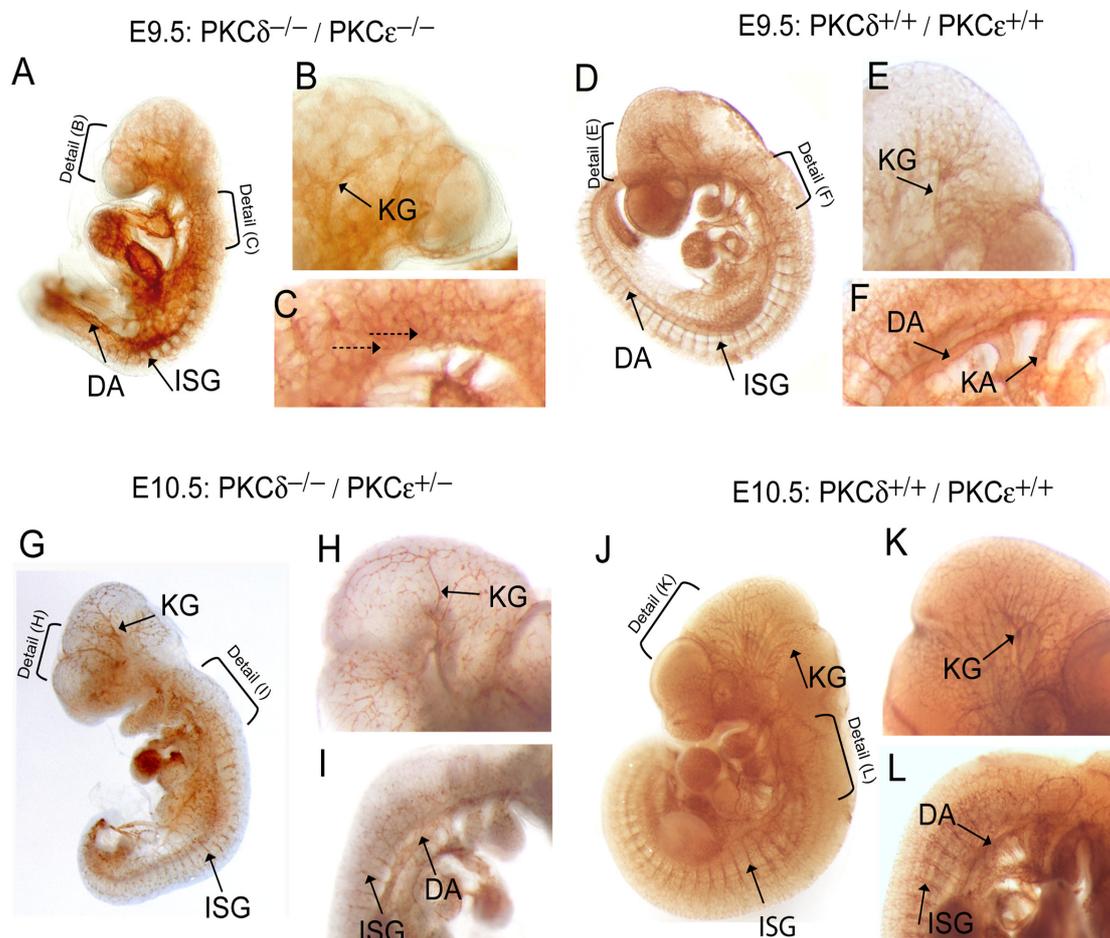


Abb. 2.7. Immunhistochemische (Pecam-1) Darstellung des embryonalen vaskulären Systems um E9.5 (A-F) und um E10.5 (G-L). Die PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{-/-}-Embryonen (A-C) haben diverse vaskuläre Defekte; die kranialen Gefäße sind vergrößert und die Primärgefäße der Rumpfregeion sind stark verkleinert oder fehlen völlig. Die PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{+/-}-Embryonen zeigen einen weniger stark ausgeprägten vaskulären Phänotyp. Die Primärgefäße sind entwickelt und die Gefäßlumen sind normal, scheinen jedoch weniger vaskularisiert zu sein. DA, dorsale Aorta; ISG, Intersegmentalgefäße; KA, Kiemenbogen-Arterien; KG, Kranialgefäße.

2.2.3 Immunhistochemische Darstellung des embryonalen vaskulären Systems

PKC δ und PKC ϵ haben eine überlappende Expression innerhalb des kardiovaskulären Knockouts, mit kardiovaskulären Defekten, beschrieben (siehe Abschnitt 3.2). Auch die PKC $\delta^{-/-}$ /PKC $\epsilon^{+/-}$ - und PKC $\delta^{-/-}$ /PKC $\epsilon^{-/-}$ -Mäuse weisen dieses Merkmal auf. Überlappende Expression, letaler Phänotyp und vergrößertes Perikardium führten zur Hypothese, dass die PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz möglicherweise zu einem Defekt in der embryonalen kardiovaskulären Entwicklung führt. Um dies zu prüfen, wurde das vaskuläre System von E9.5- und E10.5-Embryonen der verschiedenen Genotypen mit dem endothelspezifischen Marker Pecam-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule1*) immunhistochemisch dargestellt. Das vaskuläre System des doppeldefizienten Embryos bei E9.5 zeigt drastische Defekte in Bereichen, die während der Vaskulogenese sowie während der Angiogenese gebildet wurden (Abb. 2.7 A-B). Das Gefäßsystem des Kopfbereiches, welches sich während der Angiogenese entwickelt, weist deformierte, vergrößerte Gefäße auf (B). Eine Verzweigung der Gefäße, die auf der Neugestaltung des primären vaskulären Plexus beruht, scheint zu fehlen. Am Rumpfbereich sind die während der Vaskulogenese entstandenen Primärgefäße (dorsale Aorta und Kardinalvenen) stark retardiert oder fehlen völlig (C).

Um E10.5 sind die PKC $\delta^{-/-}$ /PKC $\epsilon^{+/-}$ -Embryonen im Vergleich zum Wildtyp weniger vaskularisiert (Abb. 2.7 G-L). Die Gefäße des Kopfbereiches sind im Gegensatz zu denen der doppeldefizienten Embryonen nicht vergrößert, eine klare verzweigte Struktur fehlt hier allerdings ebenfalls (H). Im Gegensatz zur PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz sind die primären Gefäße des Rumpfbereiches vollständig entwickelt (I).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass beide letalen Genotypen einen vaskulären Defekt aufweisen, der auf eine fehlerhafte Angiogenese und im Falle der Doppeldefizienz auch auf eine fehlerhafte Vaskulogenese schließen lässt.

2.2.4 Histologische Darstellung von Plazenta und Dottersack

Die Prozesse der embryonalen Vaskulogenese und Angiogenese finden nicht nur im Embryo, sondern auch in extraembryonalen Bereichen statt. Dazu zählen der Dottersack und die embryonalen Bereiche der Plazenta wie das Chorion. Die einwandfreie Entwicklung des extraembryonalen Gefäßsystems ist essentiell für die ausreichende Versorgung des Embryos mit Nährstoffen. Zur Analyse des extraembryonalen Bereichs wurden histologische Präparate der jeweiligen Bereiche angefertigt. Die histologische Analyse des Gefäßsystems von E9.5-Dottersäcken zeigte, dass die Organisation der

Dottersackgefäße in $PKC\delta^{-}/PKC\epsilon^{-}$ -Embryonen diskontinuierlich ist. Außerdem konnte keine erkennbare Unterteilung in kleinere Kapillaren und größere Sammelgefäße (Abb. 2.8 B, E) beobachtet werden. Ein Querschnitt durch den Dottersack ergab weiterhin, dass die Gefäße in den $PKC\delta/\epsilon$ -doppeldefizienten Dottersäcken extrem vergrößert sind (C, F). Die histologische Untersuchung der Plazenta von E10.5 $PKC\delta^{-}/PKC\epsilon^{-}$ -Embryonen zeigte, dass alle wichtigen Strukturen gebildet werden: Chorion, Labyrinth und die Spongiotrophoblast-Grenzschicht sind vorhanden (Abb 2.9 A-D). Eine Betrachtung des vaskulären Systems zeigte jedoch, dass in den Plazenten der $PKC\delta^{-}/PKC\epsilon^{-}$ -Embryonen die Gefäße extrem vergrößert sind (D). Mit der Analyse der extraembryonalen Bereiche konnte klar gezeigt werden, dass nicht nur die $PKC\delta^{-}/PKC\epsilon^{-}$ -Embryonen, sondern auch die extraembryonalen Strukturen einen vaskulären Defekt aufweisen.

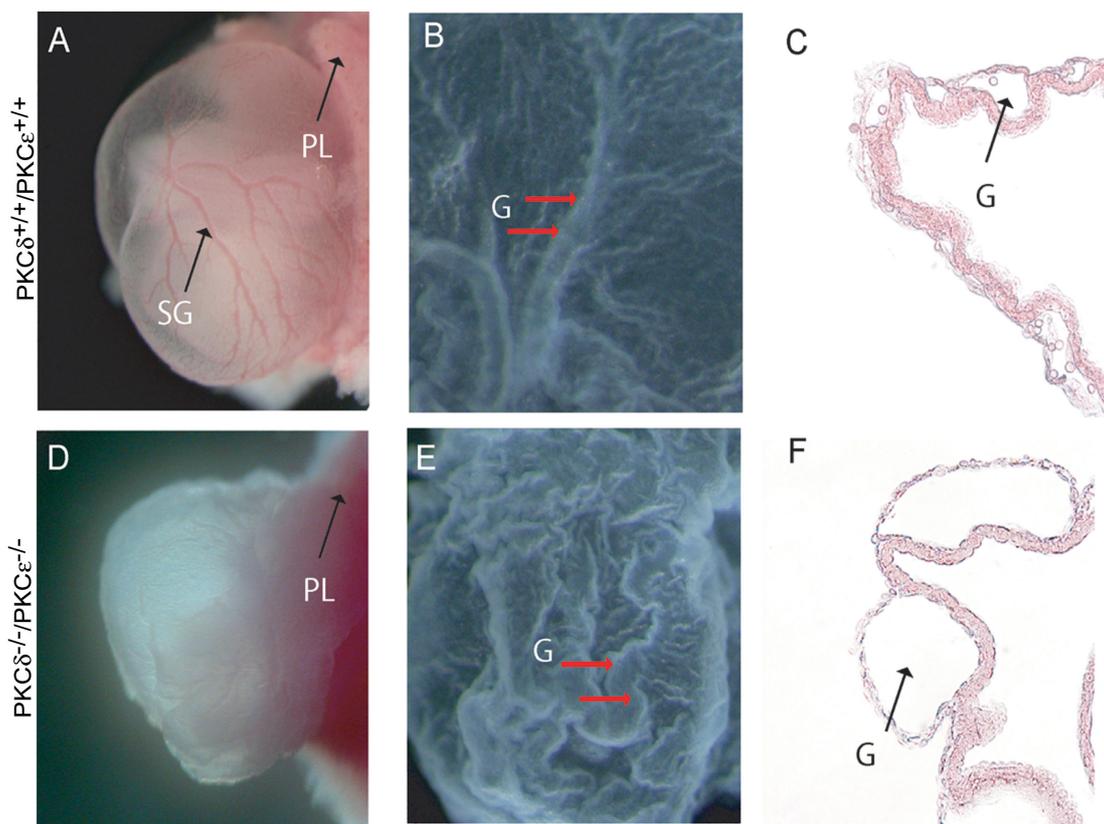


Abb. 2.8. Phänotypisches Erscheinungsbild des Dottersacks um E9.5. A-C, Wildtyp-Embryonen. D-F, $PKC\delta^{-}/PKC\epsilon^{-}$ -Embryonen. A und D, *whole-mount* Übersicht. B und E, lichtmikroskopische-Aufnahmen. C und F, histologische Darstellung. Die Dottersackgefäße der $PKC\delta^{-}/PKC\epsilon^{-}$ -Embryonen haben eine abnormale Morphologie (E) und vergrößerte Lumen (F). G, Gefäß; PL, Plazenta; SG, Sammelgefäß des Dottersacks

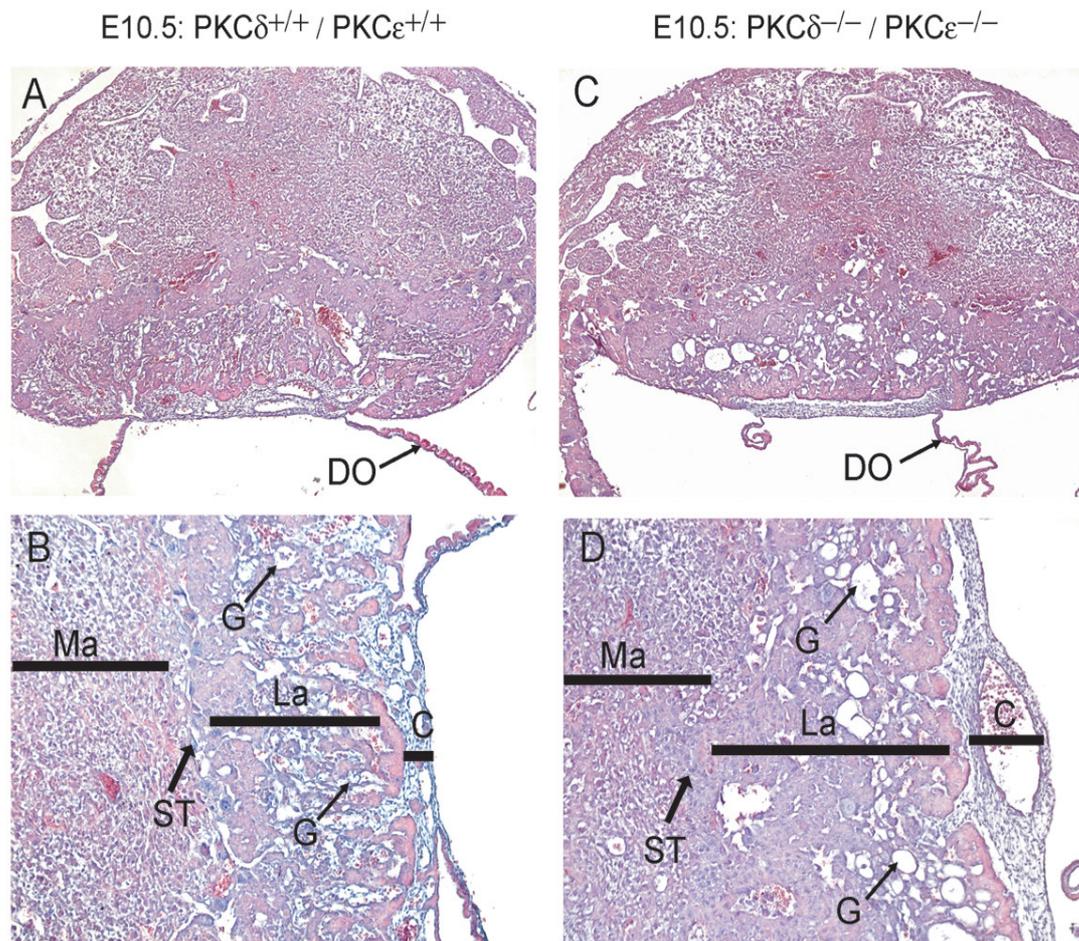


Abb. 2.9. Histologische H&E-Färbung der Plazenta um E10.5. A und B, Wildtyp. C und D, PKC δ ^{-/-} / PKC ϵ ^{-/-}. Die Detailansicht (B und D) zeigt, dass alle Bereiche der Plazenta in der PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz entwickelt sind. Auffallend sind jedoch die im Lumen vergrößerten Gefäße der PKC δ ^{-/-} / PKC ϵ ^{-/-}-Plazenta. C, Chorion (embryonaler Bereich); DO, Dottersack; G, Gefäß; La, Labyrinth; Ma, maternaler Bereich (*desidua basalis*); ST, Spongio-Trophoblast-Bereich.

2.3 Allantois-Kultur

Die extraembryonalen Gewebe, Plazenta und Dottersack, sind essentiell für die normale Entwicklung des Embryos (Conway, Kruzynska-Freitag et al., 2003). Entwicklungsbiologische Fehlentwicklungen in diesen Strukturen führen in einigen Fällen zur embryonalen Sterblichkeit und haben direkten Einfluss auf die fehlerfreie Entwicklung der embryonalen Vaskulatur.

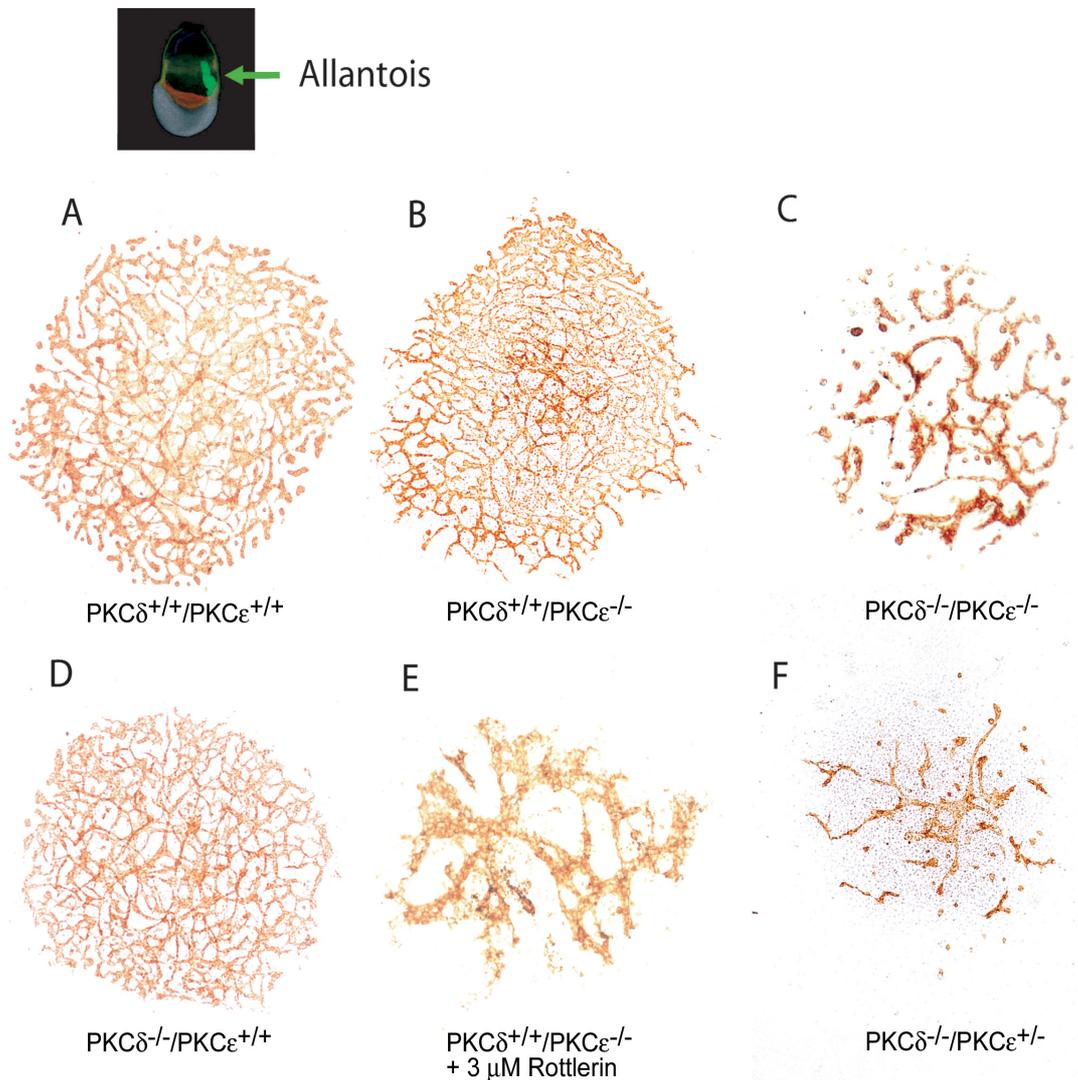


Abb. 2.10. Allantois-Kultur. Die Allantois von E7.5-Embryonen wurde für 24 Std. kultiviert. Die Neovaskularisierung wurde mittels immunhistochemischer Färbung mit dem Endothelmarker Pecam-1 analysiert. In den einzeldefizienten Allantois (B und D) ist keine erkennbare Beeinträchtigung der Neovaskulogenese zu beobachten. Die Allantois-Kulturen der beiden letalen Genotypen (C und D) sowie die der durch Rottlerin nachgeahmten Doppeldefizienz (E) weisen eine signifikante Reduktion der Neovaskularisierung auf. Die Abbildung der Allantois eines E7.5-Embryos (s.o.) ist verändert von (Edinburgh, 2004).

Um die Frage zu beantworten, ob der vaskuläre Defekt der PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Embryonen auf vaskulären Fehlentwicklungen der Plazenta und des Dottersacks basiert, wurde eine Kultur von E7.5-Allantois durchgeführt. Diese Allantois-Kultur dient zum Nachweis von maternaler und plazentaler unabhängiger Vaskulogenese und frühen Angiogenese (Downs, Gifford et al., 1998; Drake and Fleming, 2000).

Abb. 2.10 zeigt die neovaskularisierten Allantois von verschiedenen Genotypen; Wildtyp (A), PKC $\delta^{+/+}$ / PKC $\epsilon^{-/-}$ (B), PKC $\delta^{-/-}$ /PKC $\epsilon^{-/-}$ (C), PKC $\delta^{-/-}$ / PKC $\epsilon^{+/+}$ (D), PKC $\delta^{+/+}$ / PKC $\epsilon^{-/-}$ + 3 μ M Rottlerin (PKC δ -Inhibitor) (E) und PKC $\delta^{-/-}$ / PKC $\epsilon^{-/+}$ (F). In den einzeldefizienten Allantois war keine erkennbare Beeinträchtigung der Neo-vaskulogenese zu beobachten. Die Allantois-Kulturen der beiden letalen Genotypen sowie die der durch Rottlerin nachgeahmten PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz wiesen eine signifikante Reduktion der Neovaskularisierung auf.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine maternale und plazentale unabhängige Störung der Vaskulogenese und frühen Angiogenese in PKC $\delta^{-/-}$ / PKC $\epsilon^{-/+}$ - und PKC $\delta^{-/-}$ / PKC $\epsilon^{-/-}$ -Allantois besteht.

2.4 Immunhistochemische Darstellung von vaskulären glatten Muskelzellen des embryonalen vaskulären Systems

Während der embryonalen Gefäßentwicklung differenzieren mesenchymale Zellen zu vaskulären glatten Muskelzellen (Abschnitt 1.2.1), welche zusammen die *Tunica media* bilden und den Gefäßen Stabilität verleihen. Für eine Vielzahl an Knockouts wurde zusätzlich zu einem Defekt in der Vaskulo- und/oder Angiogenese ein Fehlen von vSMC nachgewiesen. Beispielweise kommt es zu keiner Differenzierung zu vSMC in den Tie2-, Endoglin-, Alk-1-, SMAD5-, LKLF- und VEGF-A-Knockouts (Suri, Jones et al., 1996; Kuo, Veselits et al., 1997; Carmeliet, Lampugnani et al., 1999; Li, Sorensen et al., 1999; Yang, Castilla et al., 1999; Oh, Seki et al., 2000; Thurston, 2003). Interessanterweise wird für die meisten dieser Knockouts davon ausgegangen, dass der Primärdefekt in den Endothelzellen vorliegt, und dass die Effekte auf die Entwicklung der *Tunica media* sekundär sind (Gerhardt and Betsholtz, 2003).

Um die Frage zu klären, ob die PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz zur Beeinträchtigung der Differenzierung von periendothelialen Zellen zu vSMC führt, wurden doppeldefiziente Embryonen auf das Vorhandensein von vaskulären glatten Muskelzellen untersucht.

Wildtyp-E9.5-Embryonen zeigen α -smooth muscle actin-positive Zellen (Marker für vSMC und für glatte Muskelzellen des Herzens) im Bereich der ventral gelegenen Seite der dorsalen Aorta (Abb. 2.11 A) und innerhalb des Herzens (B). Hingegen weisen die PKC δ/ϵ -doppeldefizienten Embryonen ausschließlich α -smooth muscle actin-positive Zellen im Herzbereich auf (Abb. 2.11 C, D), was auf ein generelles Fehlen von vaskulären glatten Muskelzellen schließen lässt. Auch bei E10.5 konnten keine α -smooth muscle actin-positive Zellen außerhalb des Herzens in PKC $\delta^{-/-}$ /PKC $\epsilon^{-/-}$ -Embryonen detektiert werden. Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass es in der PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz zu keiner Differenzierung von periendothelialen Zellen zu vaskulären glatten Muskelzellen kommt.

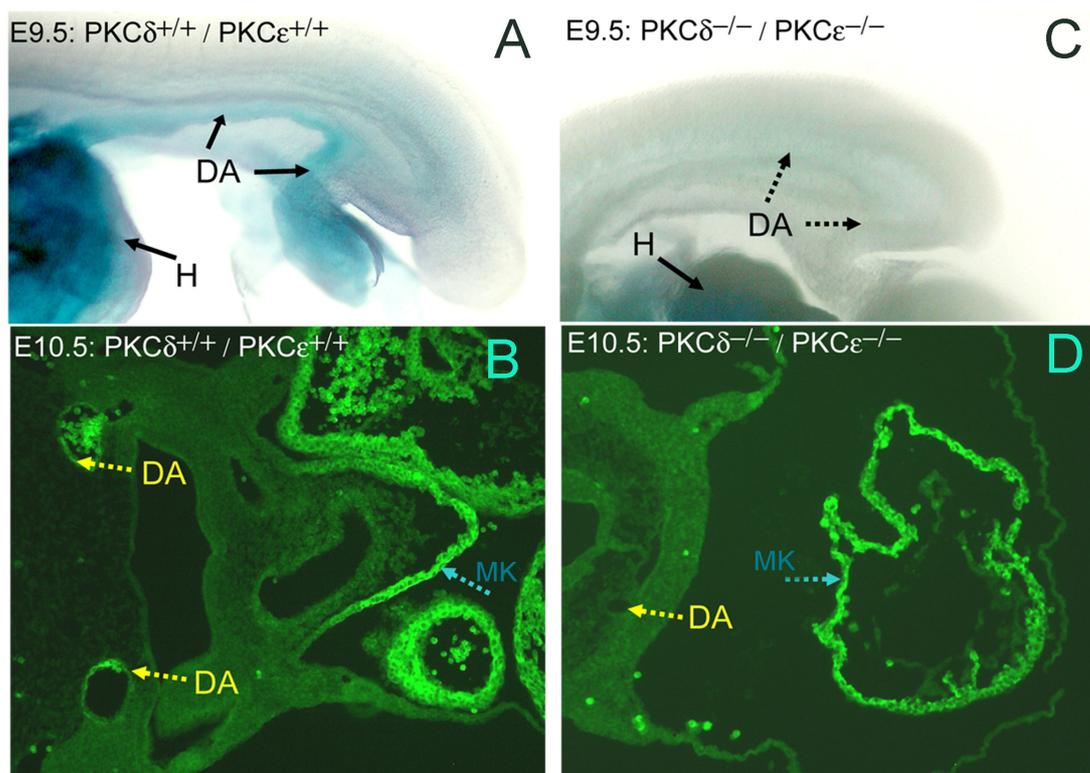


Abb. 2.11. Immunhistochemische Darstellung von vSMC in E9.5 (A und C, *whole mount*-Ansicht) und E10.5 Embryonen (B, D, transversale Schnitte). Die E9.5 und E10.5 PKC $\delta^{-/-}$ /PKC $\epsilon^{-/-}$ -Embryonen weisen keine α -smooth muscle actin-positive Zellen außerhalb des Herzens auf. DA; dorsale Aorta; MK, Myokardium; H, Herz.

2.5 Elektronenmikroskopische Analyse von embryonalen Gewebeschnitten

Die Integrität der embryonalen Gefäße wird maßgeblich durch die Interaktion der Endothelzellen untereinander sowie durch den Kontakt mit der Extrazellulärmatrix und den Mesenchymzellen (sowie im reifen Gefäß zu den vaskulären glatten Muskelzellen) gewährleistet. Das vergrößerte Perikardium der $PKC\delta/\epsilon$ -doppeldefizienten Embryonen, welches auf ein erhöhtes Flüssigkeitsvolumen innerhalb dieses Areals basiert, lässt auf

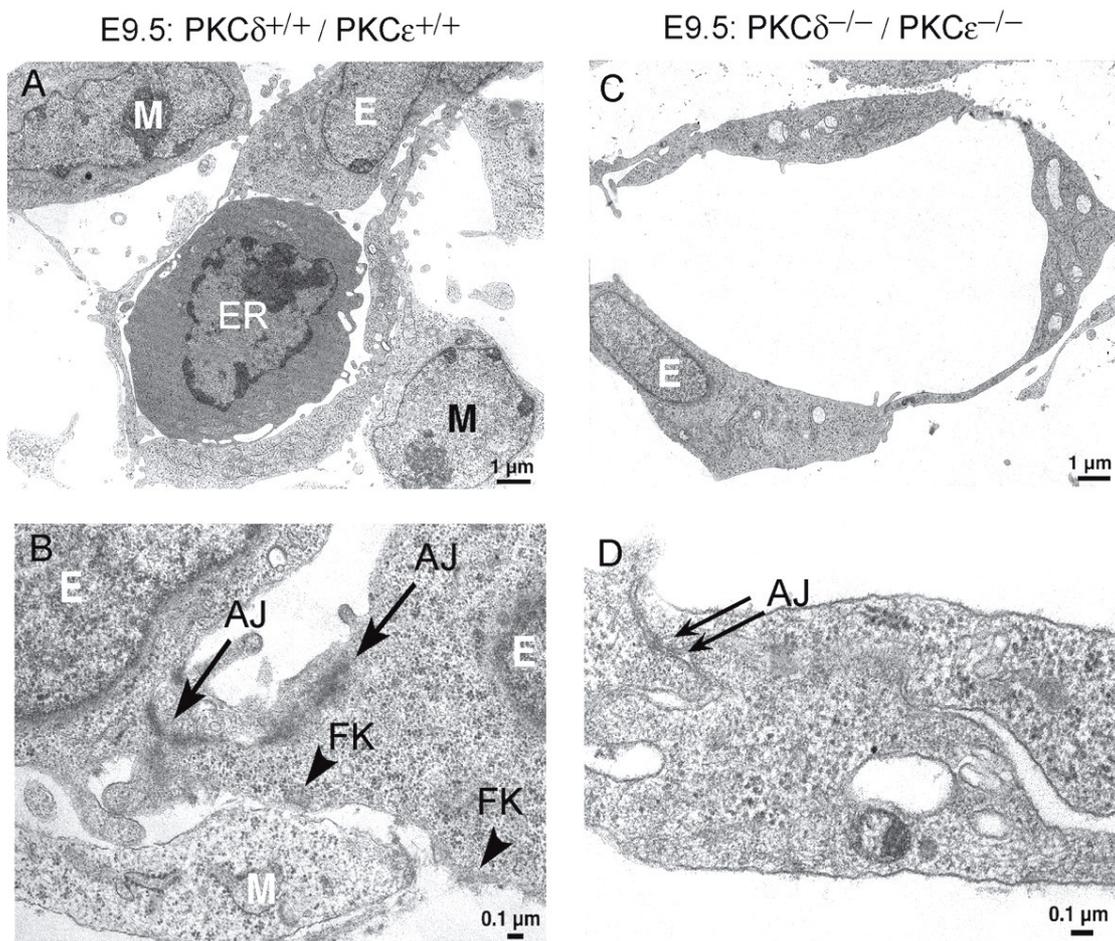


Abb. 2.12. Elektronenmikroskopische Analyse von embryonalen Gewebeschnitten um E9.5 (A-D). Die analysierten Kranialgefäße der $PKC\delta^{-/-}/PKC\epsilon^{-/-}$ -Embryonen (C und D) zeigen eine Erweiterung des Gefäßlumens. Die Proteindichte an den *adherence junctions* ist vermindert, und Fokalkontakte sind nahezu nicht ausgebildet (D). AJ, *adherence junctions*; E, Endothelzelle; ER, Erythrozyte; FK, Fokalkontakte; M, vSMC-Vorläuferzelle. Die EM-Bilder wurden von Frau Dr. Gudrun Brandes (MHH, Abteilung Zellbiologie, Zentrum Anatomie) in Zusammenarbeit angefertigt.

ein durchlässiges Gefäßsystems schließen. Ferner kommt es zu keiner Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu vaskulären glatten Muskelzelle in den PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Embryonen. Um die Frage zu beantworten, ob die mutmaßlich durchlässigen Gefäße sowie das Fehlen der vSMC durch unzureichende interzelluläre Kontakte verursacht werden, wurde die Endothelstruktur von E9.5-Embryonen in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Gudrun Brandes (MHH, Abteilung Zellbiologie, Zentrum Anatomie) elektronenmikroskopisch analysiert. Die Gefäße des Wildtyps bestehen aus einem durchgängigen Endothel (Abb. 2.12 A), welches von vaskulären glatten Muskelzellvorläuferzellen umgeben ist. Kontakte zu diesen Vorläuferzellen sind klar zu erkennen (B). Die Gefäße der PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{-/-}-Embryonen sind hingegen stark vergrößert (Abb. 2.12 C), und das gesamte Endothel hat eine dünne und glatte Erscheinung, zelluläre Ausläufer sind nicht zu erkennen.

Die Wildtyp-Endothelzellen sind über stark ausgeprägte *adherence junctions* miteinander verbunden (B) und Kontakte der Aktinfilamente mit der Zellmembran sind vorhanden (B). Im Gegensatz dazu sind die Endothelzellen der PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{-/-}-Gefäße über *adherence junctions* miteinander verbunden, die über eine geringere Dichte an Proteinen verfügen (D). Kontakte von Aktinfilamenten zur Zellmembran (Fokalkontakte) sind stark vermindert vorhanden oder fehlen völlig (D).

Zusammenfassend fehlt dem Endothel der PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{-/-}-Embryonen im Vergleich zum Wildtyp-Endothel ein genereller Kontakt zu den umliegenden Mesenchymzellen und außerdem sind die Fokalkontakte nur sehr vermindert ausgebildet oder fehlen völlig.

2.6 Molekulare Analyse der PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Mauslinie

Die PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz führt während der embryonalen Entwicklung zu einem Defekt in der Vaskulogenese und der Angiogenese. Eine genaue Einordnung von PKC δ sowie von PKC ϵ in klassische Signaltransduktionswege der Vaskulogenese und der Angiogenese konnte bisher jedoch nicht überzeugend dargelegt werden. Um Aufschluss über PKC δ / ϵ -abhängige *downstream*-Gene zu erlangen, wurden quantitative Expressionsanalysen zwischen PKC δ / ϵ -doppeldefizienten und Wildtyp-Embryonen durchgeführt.

2.6.1 Quantitative Expressionsanalyse von Angiogenese-relevanten Genen

Für den quantitativen Vergleich der cDNA-Populationen von E9.5 PKC δ / ϵ -doppeldefizienten- und E9.5 Wildtyp-Embryonen wurden zwei unabhängige Methoden verwendet: ein cDNA-Array für die primäre Suche nach verschiedenartig exprimierten Genen und die *real-time*-PCR zu ihrer Validierung.

2.6.1.1 cDNA-Array

Die semiquantitative Analyse der unterschiedlichen Expressionslevel konnte aus technischen Gründen (Blot-Qualität/Analysesoftware) nur über manuellen Vergleich der Arrays erfolgen. Trotz dieses technischen Nachteils, konnte die auf der cDNA-Array

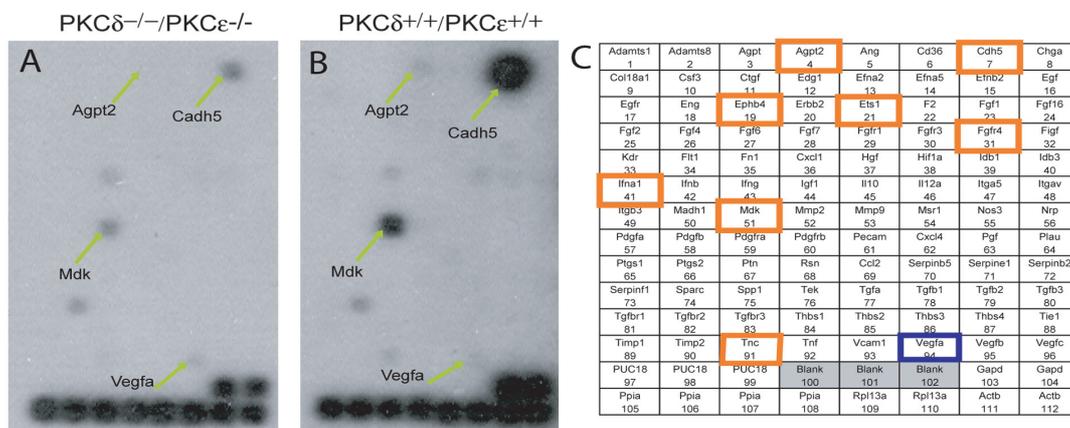


Abb. 2.13. cDNA-Array-Analyse der Genexpression von Angiogenese-relevanten Genen um E9.5 (A und B). Rot markierte Gene wurden vermindert, blau markierte erhöht in der PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz exprimiert (C). Für die detaillierte Analyse der Arrays wurden Filme mit verschiedenen Exponierungszeiten verwendet (hier nur 12 Std.). Agpt2, Angiotensin-2; Cadh5, VE-Cadherin; Ephb4, EphB4; Fgfr4, FGFR4; Ifna1, Interferon- α , Mdk, Midkine; Tnc, Tenaskin.

Erhöht exp.	Vermindert exp.
VEGF (++)	VE-Cadherin (++++)
	Angiotensin-2 (++)
	Ephb4 (++)
	Ets1 (+)
	Fgfr4 (+++)
	Midkine (+++)
	Tenaskin (+)
	Ifna1 (+++)

Tab.2.1. Geschätzte Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp- und PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Embryonen, basierend auf den cDNA-Arrays. Die Werte beziehen sich auf die in den PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Embryonen veränderten exprimierten Gene. (+)Särke des Expressionsunterschieds.

basierende Expressionsanalyse neun Gene identifizieren, die um E9.5 im direkten Vergleich zum Wildtyp-Embryo im PKC δ / ϵ -doppeldefizienten-Embryo quantitativ unterschiedlich exprimiert werden (Abb. 2.13). Von den neun Genen wurden acht vermindert und ein Gen erhöht in den PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Embryonen exprimiert. Davon wurde VEGF-A, ein zentraler Wachstumsfaktor der Vaskulo- und Angiogenese, als einziges Gen erhöht in den PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Embryonen exprimiert. Im Gegensatz dazu wurden VE-Cadherin, Fgfr4, Angiopoietin-2, EphB4, Ets1, Midkine, TNC (*tenascin*) und Ifna1 (*interferon alpha 1*) mit unterschiedlicher Intensität vermindert in der PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz exprimiert (Tab. 2.1).

Zur weiteren Validierung der cDNA-Array-Kandidaten wurden die Gene, für die bereits Funktionen in der embryonalen Gefäßentwicklung bekannt sind, mittels *real-time*-PCR zusätzlich quantifiziert.

2.6.2 Quantitative Analyse der cDNA-Array-Kandidaten mittels *real-time*-PCR

Eine Expressionsanalyse basierend auf einem cDNA-Array zeigte, dass die Expressionsstärken von VE-Cadherin, Angiopoietin-2, FGFR-4, Midkine, Ets-1, EphB4

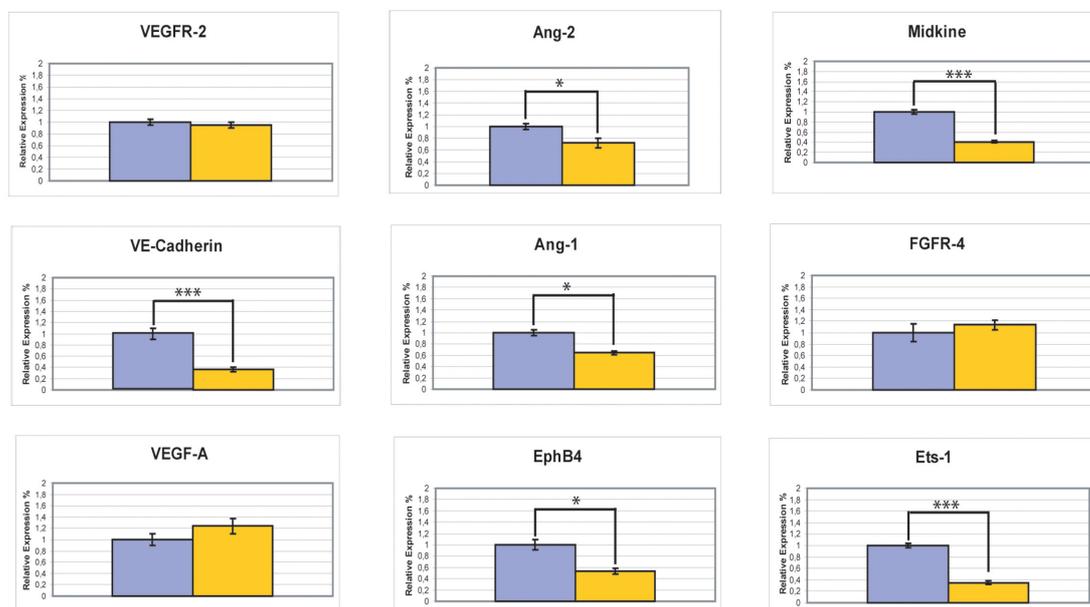


Abb. 2.14. Quantitative Analyse der cDNA-Array-Kandidaten mittels *real-time*-PCR (basierend auf E9.5-Embryonen). Die *real-time*-PCR bestätigte signifikante Expressionsunterschiede für sechs von neun Kandidaten, nämlich VE-Cadherin, Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Midkine, Ets-1, EphB4. Für von VEGF-A und FGFR-4 wurden die *Array*-Ergebnisse nicht signifikant bestätigt. In blau dargestellt, Wildtyp; in gelb dargestellt, PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz. * = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$

eine Expressionsanalyse für die Kandidatengene basierend auf der *real-time*-PCR durchgeführt. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Genen wurden außerdem weitere und VEGF-A in der PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz um E9.5 verändert sind. Zur Validierung und genauen Quantifizierung dieser Expressionsunterschiede, wurde Gene auf eine mögliche PKC δ/ϵ -abhängige Expressionsveränderung untersucht. In diesem Zusammenhang wurden Gene ausgewählt, die aufgrund eines zu niedrigen Expressionsniveaus nicht durch den cDNA-Array erfasst wurden, sowie mehrere, die ursprünglich nicht auf dem cDNA-Blot vertreten waren.

Mögliche Expressionsunterschiede von Genen, die spezifisch für Endothelzellen sind, könnten aufgrund einer veränderten Anzahl an Endothelzellen auftreten. Um diese Möglichkeit ausschließen zu können, wurden außerdem zwei unabhängige Endothel-Marker-Gene, VEGFR2 und Pecam-1, in die Analyse mit einbezogen.

Die *real-time*-PCR-Analyse (Abb. 2.14) bestätigte die meisten der Expressionsunterschiede, die mittels des cDNA-Arrays zuvor identifiziert wurden. In diesem Zusammenhang konnte die signifikant-verminderte Expression von VE-Cadherin, Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Midkine, Ets-1, EphB4 bestätigt werden. Die veränderten Expressionslevel von VEGF-A und FGFR-4 konnten jedoch nicht reproduziert werden (Abb. 2.14). Überdies konnte durch die Expressionsanalyse der Endothelmarker Pecam-1 (Abb. 2.15) und VEGFR-2 (Abb. 2.14) gezeigt werden, dass die Anzahl an Endothelzellen im Mutanten sowie im Wildtyp vergleichbar sind. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Expressionsunterschiede der hier untersuchten Gene nicht auf einer veränderten Quantität der Endothelzellen zurück zu führen ist.

2.6.2.1 *Real time*-PCR-Quantifizierung der Expression von N-Cadherin, T-Cadherin, Fli-1, Erg-1 und PDGF-bb

Die Expressionsanalysen konnten nachweisen, dass der Transkriptionsfaktor Ets-1 um E9.5 in der PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz vermindert exprimiert wird. Der Ets-1-Knockout besitzt jedoch keinen kardiovaskulären Defekt, was die zentrale Bedeutung dieser verminderten Expression in Frage stellt. Fli-1 und Erg-1 bilden zusammen mit Ets-1 eine Subfamilie der Ets-Transkriptionsfaktoren. Dabei wird davon ausgegangen, dass diese Ets-Transkriptionsfaktoren jedenfalls teilweise funktionell redundant sind (Lelievre, Lionneton et al., 2001). Daher sollte die Expression von Fli-1 und Erg-1 in der PKC δ/ϵ -Doppledefizienz genauer untersucht werden.

Die verminderte Expression von Ets-1 in der PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz könnte zur verminderten Expression von Ets-1-abhängig regulierten Genen führen, was letzten Endes die funktionelle Beeinträchtigung der Vaskulo- und Angiogenese bewirken könnte. Ets-1 reguliert u.a. die Expression von VE-Cadherin (siehe Einleitung, Abschnitt 1.5.1); ob nun das erniedrigte Expressionsniveau von Ets-1 in der PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz auch direkt oder indirekt Einfluss auf die Expression der zwei weiteren in Endothelzellen exprimierten Cadherine, N-Cadherin und T-Cadherin, hat, sollte außerdem mittels der *real-time*-PCR ermittelt werden.

Im Abschnitt 2.6 wurde bereits beschrieben, dass es in der PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz zu keiner Differenzierung von Mesenchymzellen zu vSMC kommt. Im Allgemeinen ist die Rekrutierung von Mesenchymzellen zum Endothel ein wichtiger Schritt in dieser Differenzierung. In diesem Zusammenhang besitzt der von den Endothelzellen sezernierte Wachstumsfaktor PDGF-bb eine zentrale Aufgabe (siehe Abschnitt 1.5.1). Inwiefern eine mögliche veränderte PDGF-bb-Expression zur vSMC-Defizienz der PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Embryonen beiträgt, wurde ebenfalls mittels der *real-time*-PCR untersucht

Die Auswertung der *real-time*-PCR-Expressionsanalyse zeigte, dass N-Cadherin und Fli-1 im Mutanten signifikant geringer exprimiert werden. T-Cadherin- sowie Erg-1-Level sind vergleichbar, wohingegen PDGF-bb wesentlich erhöht exprimiert wird.

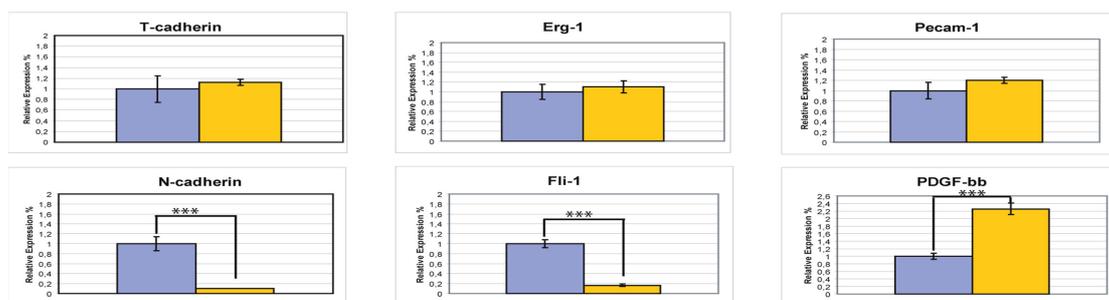


Abb. 2.15. *Real-time*-PCR-Quantifizierung der Expression von N-Cadherin, T-Cadherin, Fli-1, Erg-1 und PDGF-bb. Die Expressionsanalyse konnte nachweisen, dass N-Cadherin und der Transkriptionsfaktor Fli-1 vermindert in der PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz um E9.5 exprimiert sind. Im Gegensatz dazu, wurde gezeigt, dass PDGF-bb mehr als doppelt so stark in den Mutanten exprimiert wird. T-Cadherin-, Erg-1- und Pecam-1-Expressionslevel weisen keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp- und Mutantenembryo auf. In gelb dargestellt, PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz und in blau dargestellt, Wildtyp. *** = $p \leq 0,001$

2.7 Untersuchungen zur Funktion von PKC δ/ϵ in embryonalen murinen Endothelzellen

Die quantitative Expressionsanalyse von in die Angiogenese involvierten Genen (Abschnitt 2.6.1) identifizierte eine Reihe von verschiedenen Faktoren, die in der PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz entweder erhöht oder vermindert exprimiert werden. Somit konnten verschiedene direkt oder indirekt PKC δ/ϵ -abhängig regulierte Gene identifiziert werden.

Für die Identifizierung von potentiellen PKC δ/ϵ -regulierenden Faktoren müssen jedoch zusätzliche Methoden angewendet werden. Das heißt, eine detaillierte Untersuchung des Signaltransduktionsweges kann nur bedingt im Embryo durchgeführt werden, im generellen ist es jedoch notwendig für diesen Zweck ein zelluläres Modellsystem zu verwenden. Dabei sollte ein adäquates zelluläres Modellsystem verwendet werden, dass heißt Zelllinien, die möglichst nahe verwandt sind mit dem Mausmodell, welches für die Generierung der Primärdaten verwendet wurde. Für diesen Zweck wurden verschiedene embryonale Maus-Endothelzelllinien (*mouse embryonic endothelial cells*, MEECs) aus E9.5-Embryonen etabliert (siehe Material/Methoden, Abschnitt 4.12) und ihre korrekte Expression von bekannten Endothelmarkern mittels RT-PCR und Immunhistochemie bestätigt.

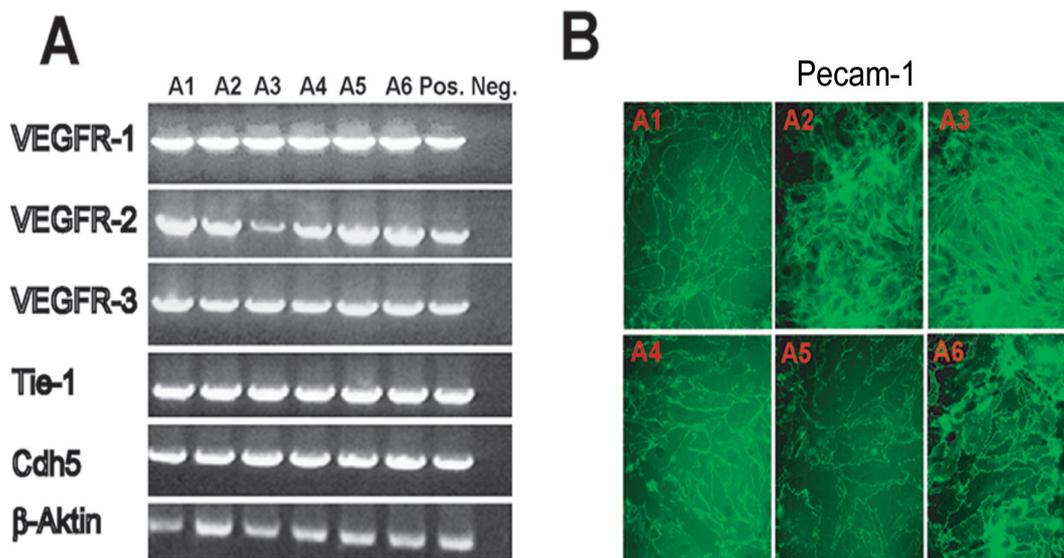


Abb. 2.16. Charakterisierung von MEEC-Zelllinien (A und B). Die Charakterisierung der etablierten MEEC-Zelllinien aus E9.5 Wildtypembryonen (A1-A6) erfolgte durch den Nachweis der Expression von verschiedenen Endothelmarkern mittels RT-PCR (A) und Immunfluoreszenz (B). RT-PCR, VEGFR1-3/Tie-1/VE-Cadherin (Cdh5) (A); Immunfluoreszenz, Pecam-1 (B). A1-A6, Wildtyp-MEECs; Pos., End2-Zelllinie; Neg., Wasserkontrolle.

2.7.1 Charakterisierung der embryonalen Endothelzellen

Die Charakterisierung der etablierten MEEC-Zelllinien erfolgte durch den Nachweis der Expression von verschiedenen Endothelmarkern; VEGFR1-3, Tie-1, VE-Cadherin und Pecam-1. In allen getesteten MEEC-Zelllinien (Wildtyp-Zellen), wurden die für Endothelzellen charakteristischen Gene, VEGFR1-3, Tie-1 und VE-Cadherin auf vergleichbarem Niveau exprimiert (Abb. 2.16 A). Ferner konnte die membranständige Lokalisierung von Pecam-1 durch Immunhistochemie in allen MEEC-Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 2.16 B).

2.7.2 Untersuchungen zur VEGF₁₆₅-abhängigen Aktivierung von PKC δ/ϵ

Die PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz führt zu einem Defekt in der Vaskulo- sowie in der Angiogenese, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die PKCs in einen Signalweg involviert sind, der eine Funktion in beiden dieser Prozesse ausübt. VEGF₁₆₅ ist der zentrale Wachstumsfaktor der Vaskulo- sowie Angiogenese. Um zu untersuchen ob PKC δ/ϵ in einem VEGF₁₆₅-abhängigen Signalweg involviert sind, wurden MEECs mit VEGF₁₆₅ stimuliert, und eine potentielle Translokation der PKCs zu der Membran analysiert.

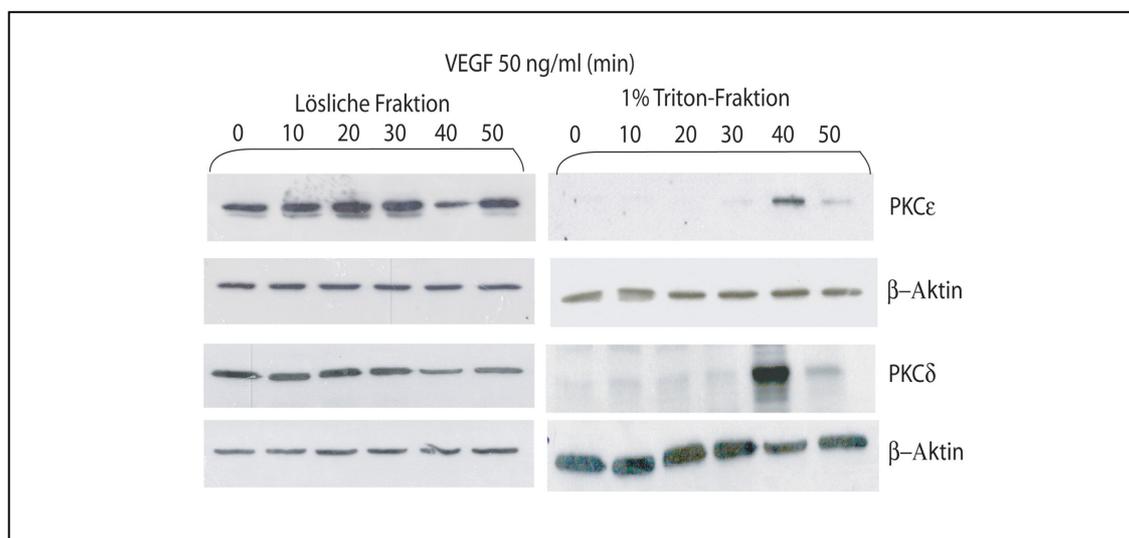


Abb. 2.17. Untersuchungen zur VEGF₁₆₅-abhängigen Aktivierung von PKC δ/ϵ . MEECs wurden mit VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) für verschiedene Zeiträume stimuliert. Nachfolgend wurde die Aktivierung der PKCs durch Fraktionierung des Zelllysates (1% TritonX-100 entspricht der Membranfraktion), SDS-Page und Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Beide Isoenzyme translozieren nach VEGF-Stimulierung mit vergleichbarer Kinetik zur Membranfraktion des Zelllysates (1% Triton).

Es konnte gezeigt werden, dass beide Isoenzyme zur Membranfraktion des Zellysates (1% Triton) nach VEGF₁₆₅-Stimulierung translozieren, und dass dies mit einer vergleichbaren Kinetik verläuft. Dabei erreicht die Translokation von PKC δ und PKC ϵ nach 40 min das Maximum.

2.7.3 Untersuchungen zur VEGF₁₆₅-abhängigen Aktivierung von Erk1/2 und p38

In humanen Endothelzelllinien (HUVEC) kommt es zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und p38 nach Stimulierung mit VEGF₁₆₅. Ob VEGF₁₆₅ auch in embryonalen Mausendothelzellen ein potenter Aktivator von Erk1/2 und p38 ist, sollte durch die Verwendung von MEECs in Stimulierungsexperimenten geklärt werden.

Die Stimulierung von MEECs mit VEGF₁₆₅ führte zu einer zeitabhängigen Aktivierung/Phosphorylierung von Erk1/2 und p38. Dabei resultierte die VEGF₁₆₅-Stimulierung in der stärksten Phosphorylierung von Erk1/2 nach 40 min und die VEGF₁₆₅-abhängige p38-Phosphorylierung führte nach 30 min – 50 min zu einer Aktivierung der Kinase.

Zusammenfassend konnten die für HUVEC postulierten VEGF₁₆₅-abhängigen MAPK-Signalwege auch in embryonalen Maus-Endothelzellen bestätigt werden.

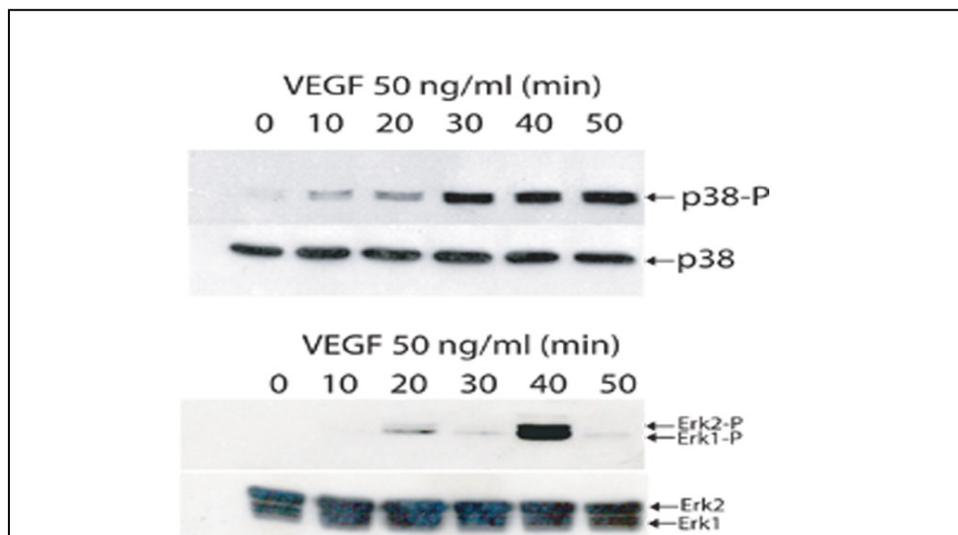


Abb. 2.18. VEGF₁₆₅-abhängige Aktivierung von Erk1/2 und p38 in MEECs. Die Stimulierung von MEECs mit VEGF₁₆₅ führte zu einer zeitabhängigen Aktivierung/Phosphorylierung von Erk1/2 und p38. Die VEGF₁₆₅-Stimulierung führte zur stärksten Phosphorylierung von Erk1/2 nach 40 min und die VEGF₁₆₅-abhängige p38-Phosphorylierung führte nach 30 min – 50 min zu einer Aktivierung der Kinase.

2.7.4 Induktion der Expression von Ets-1

Ets-1 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Vielzahl von Genen reguliert, die an Vaskulo- und Angiogenese beteiligt sind (siehe Einleitung, Abschnitt 1.5.1). In den PKC δ/ϵ -defizienten Embryonen sind Ets-1 und einige Ets-1-regulierte Gene signifikant vermindert exprimiert. Überdies konnte gezeigt werden, dass VEGF₁₆₅-Stimulierung in der Lage ist PKC δ/ϵ zu aktivieren. In humanen (HUVECs) und in Rinder-Endothelzellen (*bovine aortic endothelial cells*, BAEC) konnte eine PKC-abhängige Induktion der Expression von Ets-1 experimentell gezeigt werden (siehe Abschnitt 1.5.1), was eine Involvierung von PKC δ/ϵ in der VEGF-abhängigen Ets-1 Expression theoretisch ermöglichen würde. Um die Frage zu klären, ob die in den HUVECs und BAECs postulierten Signalwege ebenfalls in der Maus existieren, wurden MEECs mit VEGF₁₆₅ stimuliert und die relative Expression von Ets-1 mittels *real time*-PCR quantifiziert.

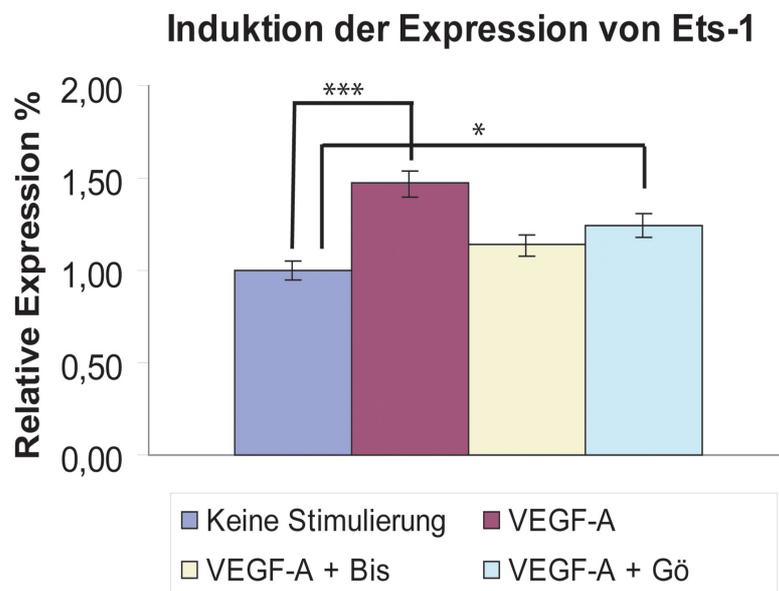


Abb. 2.19. Induktion der endogenen Expression von Ets-1 in MEECs. Die Stimulierung von konfluent wachsenden MEECs mit VEGF-A resultierte in einer signifikanten Erhöhung der relativen Ets-1-Expression im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen. Die Stimulierung mit VEGF-A zusammen mit PKC-Inhibitoren, verminderte die Expression von Ets-1. Dabei führte die Zugabe des generellen PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimide 1 zu einer stärkeren Hemmung der Expression, als die von dem cPKC-Inhibitor Gö 6976. * = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$

Die Stimulierung von konfluent wachsenden MEECs mit VEGF-A resultierte in einer signifikanten Erhöhung der relativen Ets-1-Expression im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen (Abb. 2.19). Die Stimulierung mit VEGF-A zusammen mit PKC-Inhibitoren, verminderte die Expression von Ets-1. Dabei führte die Zugabe des generellen PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimide 1 zu einer stärkeren Hemmung der Expression, als die von cPKC-Inhibitor Gö 6976.

2.8 Interaktionen von RTKs und PKCs

Es konnte gezeigt werden, dass PKC δ/ϵ in den VEGF-A-abhängigen Signalweg involviert sind, es bleibt jedoch unklar, ob die PKC-Aktivierung zu einer direkten Interaktion mit den VEGF-A-aktivierten Rezeptoren führt. Rekrutierung von PKCs zu einem RTK-ständigen Signalkomplex würde sie in unmittelbare räumliche Nähe zu potentiellen Substraten bringen, was deren Phosphorylierung und somit die Signalweiterleitung ermöglichen würde.

Um die Frage zu klären, ob PKC δ/ϵ durch die Komplexierung mit VEGF-A-Rezeptoren oder mit anderen RTKs Einfluss auf Angiogenese-relevante Signalkaskaden ausüben, sollte die Kolo-kalisierung mit VEGFR-2 und Tie-2 überprüft und eine mögliche Komplexierung mit weiteren RTKs ermittelt werden.

2.8.1 Koexpression von VEGFR-2, Tie-2 mit PKC δ/ϵ in COS7-Zellen

VEGFR-2/Flk-1 und Tie-2 sind zentrale Signalmoleküle der embryonalen Gefäßbildung. Eine Kolo-kalisierung von PKC δ und/oder PKC ϵ mit ihnen, würde auf ein funktionelles Zusammenwirken im Prozess der Gefäßbildung hindeuten.

Endothelzellen können nicht durch konventionelle Techniken transfiziert werden, daher wurden Standard-Zelllinien wie COS7-Zellen für diesen experimentellen Ansatz verwendet.

In diesem Zusammenhang wurden COS7-Zellen mit PKC δ oder PKC ϵ zusammen mit entweder VEGFR-2/Flk-1 oder Tie-2 kotransfiziert. Dabei war eine zusätzliche Stimulierung der Rezeptoren nicht notwendig, weil RTKs in einem Status der Überexpression nachweislich im aktivierten Zustand vorliegen (persönliche Korrespondenz mit Prof. Dr. Urban Deutsch, MPI Münster). Die Lokalisierung der RTKs

und PKCs konnte mit Hilfe von spezifischen Antikörpern durch Immunfluoreszenz visualisiert werden.

Die gemeinsame Expression von PKCs und RTKs führte zu einer durch die Überexpression bedingten Kolo­kalisierung im perinukleären Bereich, eine überlappende räumliche Anordnung im Zellmembran-Bereich konnte aufgrund der nur sehr bedingten membranständigen Lokalisierung der RTKs nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend führte die gemeinsame Expression von VEGFR-1 oder Tie-2 mit PKC δ/ϵ nur zu einer Kolo­kalisierung im perinukleären Bereich, die eher durch die Überexpression als durch eine funktionelle Lokalisierung bedingt ist. Eine Aussage über die wirkliche Kolo­kalisierung im Membranbereich lässt sich aufgrund der nur gering membranständig exprimierten RTKs nicht treffen.

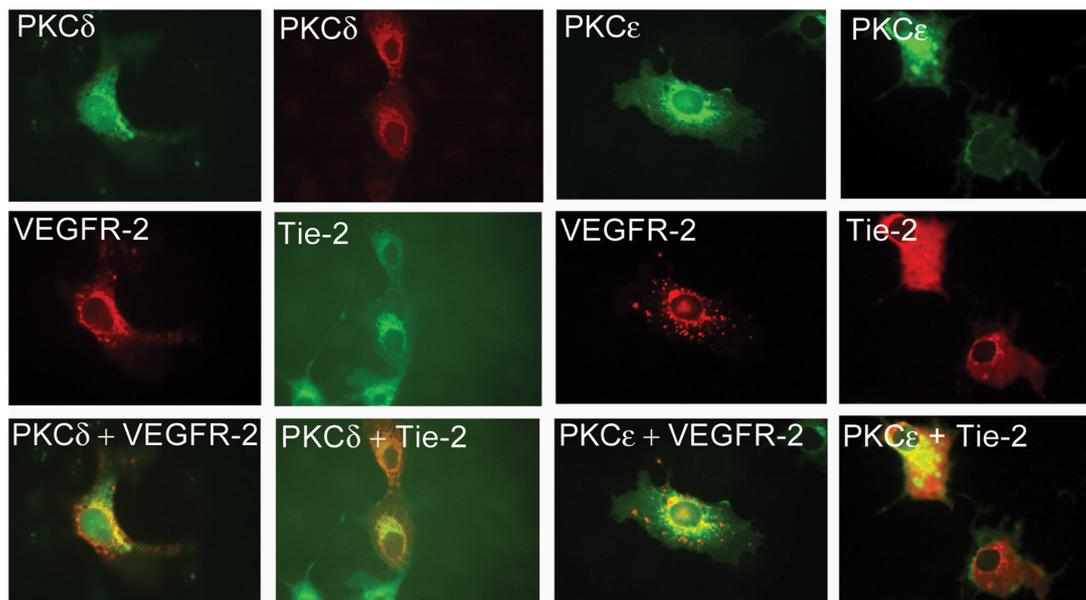


Abb. 2.20. Lokalisierung von VEGFR-2/Flk-1, Tie-2 und PKC δ/ϵ in COS7-Zellen. Die Koexpression von PKCs und RTKs führte zu einer durch die Überexpression bedingten Kolo­kalisierung im perinukleären Bereich, eine überlappende räumliche Anordnung im Zellmembran-Bereich konnte aufgrund der nur sehr bedingten membranständigen Lokalisierung der RTKs nicht festgestellt werden.

2.8.2 GST-RTK/PKC δ / ϵ -pulldown in MEECs

Basierend auf der Erkenntnis, dass RTKs in Standard-Zelllinien keine beziehungsweise nur geringe membranständige Lokalisierung aufweisen, und weil die Verwendung von Endothelzellen aufgrund ihrer nicht-Transfizierbarkeit nicht möglich ist, sollte eine potentielle Interaktion von RTKs mit den PKC mittels eines GST-RTK/PKC δ / ϵ -pulldowns mit MEECs (Zelllysat) untersucht werden. Hierfür wurden die C-terminalen zytoplasmatischen Bereiche von VEGFR-1, VEGFR-2, Tie-1, Tie-2, und EphB4 an GST fusioniert und in *E. coli* exprimiert. Anschließend wurden die Fusionsproteine mittels GST aufgereinigt (Abb. 2.21 A). Als Positivkontrolle wurde ein GST-Rack1 Fusionsprotein verwendet, für welches eine direkte Interaktion mit PKC ϵ bereits beschrieben wurde (Csukai, Chen et al., 1997). MEECs-Zelllysat und GST-RTKs wurden zusammen inkubiert, und nach der GST-Präzipitation und einer SDS-PAGE wurde eine mögliche Kopräzipitation der PKCs mittels spezifischer Antikörper im Western-Blot untersucht.

Der GST-pulldown zeigte, dass sowohl PKC δ als auch PKC ϵ mit allen GST-RTK-Fusionsproteinen kopräzipitieren (Abb. 2.21 B), nicht jedoch mit GST alleine. Demzufolge konnte mit der Verwendung von GST-RTK-Konstrukten gezeigt werden, dass sowohl PKC δ als auch PKC ϵ im GST-pulldown mit den zytoplasmatischen Bereichen von in der Angiogenese relevanten Rezeptoren interagieren können. Es bleibt jedoch unklar, ob diese Interaktion *in vivo* ebenfalls stattfindet und in welcher Art und Weise die PKCs mit den RTKs interagieren.

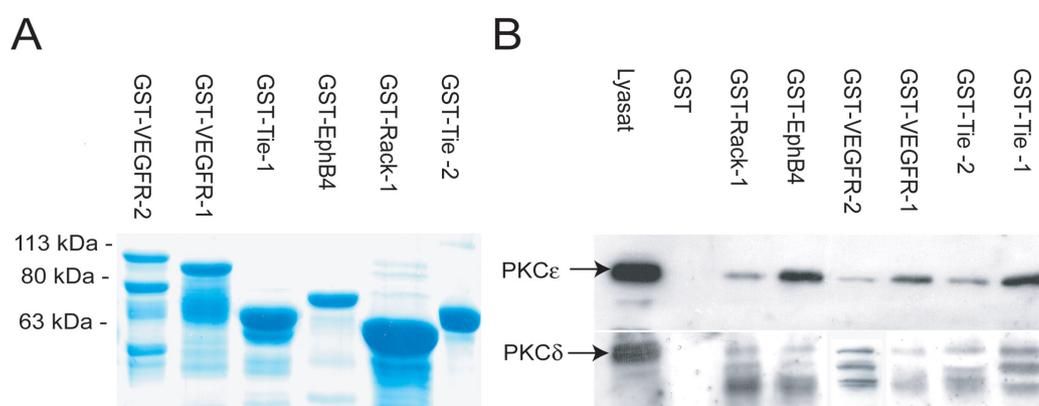


Abb. 2.21. GST-pulldown. GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt (A). Jeweils 5 μ g GST-Fusionprotein wurde in einen GST-pulldown mit Endothelzelllysat mit nachfolgender SDS-PAGE und Western-Blot eingesetzt. PKC δ und PKC ϵ interagieren mit allen GST-Fusionproteinen (B).

3 Diskussion

Obwohl die Isoenzyme der PKC-Familie an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt sind, führte die Generierung von PKC-defizienten Mäusen in den meisten Fällen zu erstaunlich milden Phänotypen (Parker and Murray-Rust, 2004). Dieses Phänomen könnte auf eine physiologisch-funktionelle Redundanz der Isoenzyme zurückzuführen sein, das heißt, einzelne Isoenzyme können im Fall der Defizienz eines anderen Isoenzymes dieses funktionell substituieren und somit die Aufrechterhaltung der biologischen Prozesse bewirken. Als Voraussetzung für eine solche Substitution müssen die potentiell funktionell-redundanten Isoenzyme jedoch in den gleichen Zellen, das heißt, in denselben Geweben exprimiert werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene PKC-Isoenzyme auf ihr mögliches Zusammenwirken zu untersuchen, um dadurch näheren Aufschluss über ihre tatsächliche Funktion *in vivo* zu erhalten. In dieser Arbeit konnte für zwei der zu den *novel* PKCs zählenden Isoenzyme, PKC δ und PKC ϵ , überlappende Expressionsdomänen während der Embryogenese bestimmt werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Generierung von PKC δ/ϵ -doppeldefizienten Mäusen, aus ursprünglich vitalen Einzelknockouts, zur embryonalen Sterblichkeit führt, die auf schwere Defekte in den Bereichen der überlappenden Expressionsdomänen zurückzuführen ist. Somit konnte erstmalig für die Familie der PKCs ein Zusammenhang zwischen überlappender Genexpression und funktionellem Zusammenwirken einzelner Isoenzyme in der Maus dargestellt werden.

3.1 Die Expression von PKC δ und PKC ϵ in der Embryogenese der Maus

Die Analyse der Expression von PKC δ und PKC ϵ hat gezeigt, dass beide Isoenzyme während der Embryonalentwicklung ein erstaunlich ähnliches Expressionsmuster aufweisen, welches hauptsächlich das neuronale und kardiovaskuläre System umfasst. Dabei ist festzustellen, dass neben dem hohen Anteil an überlappenden Expressionen, auch Isoenzym-spezifische Expressionsdomänen vorhanden sind.

Für PKC δ und im Besonderen für PKC ϵ wurde eine essentielle Funktion im sensorischen Nervensystem aufgezeigt (Dekker, 2004), die in Übereinstimmung mit der embryonalen Expression von PKC δ und PKC ϵ steht. Beide Isoenzyme sind in nahezu allen Bereichen des sich entwickelnden sensorischen Nervensystems exprimiert, wobei die überlappende Expression in den dorsalen Wurzelganglien, dem Neuralrohr, dem Trigeminal-Ganglion und den VI/VII-Kranial- Ganglien am stärksten ausgeprägt ist.

Die Funktion der beiden nPKCs im Herzen wurde bisher ausschließlich in adulten Mäusen untersucht (Chen, Hahn et al., 2001; Roman, Geenen et al., 2001), die embryonale beziehungsweise Expression von PKC δ/ϵ in der Herzentwicklung war bisher nicht bekannt.

PKC δ sowie PKC ϵ sind in allen embryonalen Herzkammern und Regionen exprimiert, wobei PKC δ vornehmlich im Epi- und Endokardium, PKC ϵ hingegen im Myokardium lokalisiert ist. Diese komplementäre Expression der beiden nPKCs im embryonalen Herzen lässt auf eine eher unterschiedliche als synergistische Funktion in der Herzentwicklung und/oder der embryonalen Herzfunktion schließen. Innerhalb des vaskulären Systems wird PKC δ in allen Gefäßtypen relativ stark exprimiert, PKC ϵ konnte hingegen nur in geringeren Maße detektiert werden. So konnte u.a. die Expression von PKC ϵ in dem mikrovaskulären System mittels Lac-Z-Färbung nur in PKC^{LacZ/LacZ}- aber nicht in PKC^{+LacZ}-Embryonen nachgewiesen werden, was ein gutes Indiz für eine geringe Expression von PKC ϵ im vaskulären System ist. Basierend auf der Beobachtung, dass wohl beide nPKCs im vaskulären System exprimiert sind, die Expressionsintensität von PKC δ jedoch weit stärker ist als die von PKC ϵ , kann von einer dominanten Funktion von PKC δ ausgegangen werden.

Die identischen Expressionsmuster der beiden nPKCs führten letztendlich zu der Hypothese, dass sie redundante Funktionen in den betroffenen Zelltypen haben könnten und/oder in dem Fall der Defizienz der anderen Isoform diese funktionell substituieren können.

3.2 Untersuchungen zur Funktion von PKC δ und PKC ϵ in der Maus

Die PKC δ - und PKC ϵ -einzelfizienten Mäuse weisen keinen embryonalen Phänotyp auf, sind lebensfähig, bedingt fertil und zeigen keine Fehlentwicklungen bezüglich des neuronalen oder kardiovaskulären Systems. Das Fehlen eines gravierenden Phänotyps

könnte dadurch erklärt werden, dass andere PKC-Isoformen die Defizienz substituieren. Dass erst das Fehlen von mindestens zwei Isoformen einer Kinasefamilie zu der Entwicklung eines signifikanten Phänotypes führt, wurde anhand der Src-Familie von Tyrosin-Kinasen mehrfach gezeigt, und verdeutlicht die physiologische Bedeutung von Redundanzen innerhalb einzelner Protein-Familien (Lowell, Niwa et al., 1996; De Franceschi, Fumagalli et al., 1997; Yasue, Nishizumi et al., 1997; Quek, Pasquet et al., 2000).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PKC δ und PKC ϵ auffällige identische embryonale Expressionsmuster aufweisen, was zu der Hypothese führte, dass die beiden nPKCs möglicherweise sich gegenseitig substituieren können. Eine solche

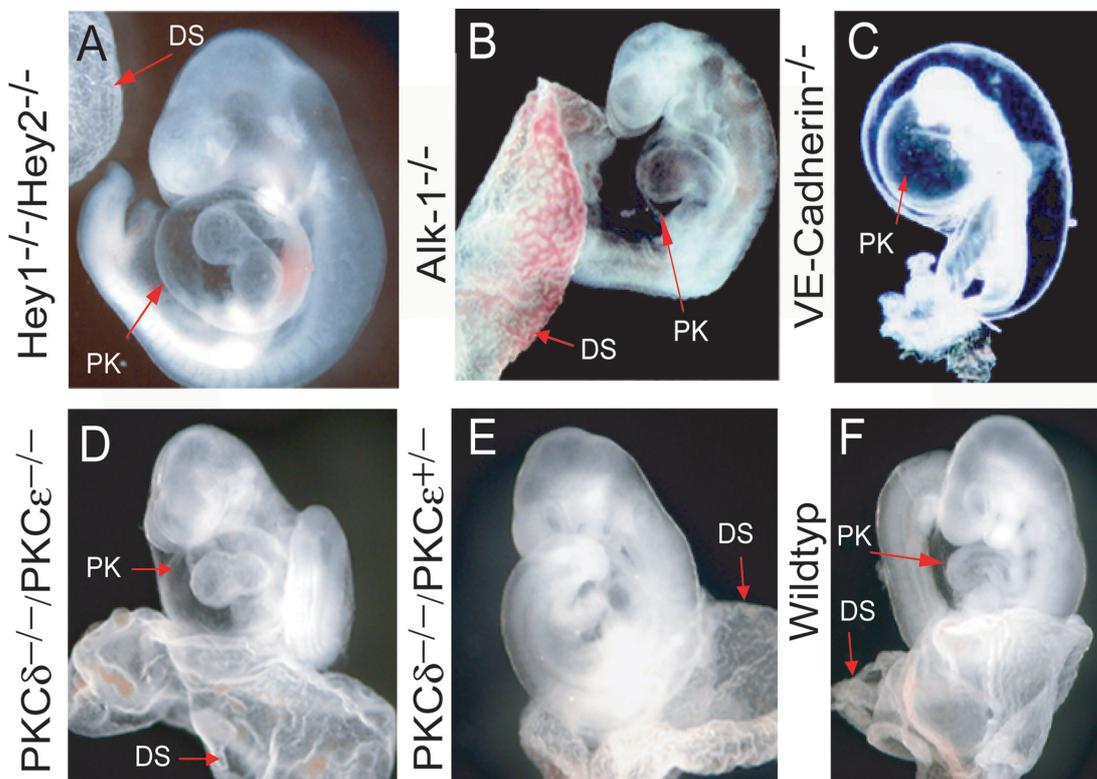


Abb. 3.1. Vergleich der PKC δ/ϵ -Mutanten (D, E) mit verschiedenen Knockouts (A-C) die einen embryonalen vaskulären Defekt aufweisen um E9.5. Eine generelle Wachstumsretardierung und eine vergrößerte Perikardialhöhle um E9.5 sind charakteristisch für vaskuläre Phänotypen. A, Hey1/Hey2-Doppelknockout (Fischer, Schumacher et al., 2004), B, Alk1-Knockout (Khasar, Lin et al., 1999; Oh, Seki et al., 2000) und C, VE-Cadherin-Knockout (Carmeliet, Lampugnani et al., 1999). DS, Dottersack; PK, Perikardium

funktionelle Redundanz könnte somit das Fehlen eines gravierenden Phänotyps in den Einzeldefizienzen bezüglich der neuronalen und kardiovaskulären Expressiondomänen erklären. Die Verpaarung von $PKC\delta^{-/-}$ mit $PKC\epsilon^{-/-}$ -Mauslinien zeigte, dass zwei der möglichen Genotypen einer doppelt-heterozygoten Verpaarung embryonal letal sind. Die $PKC\delta^{-/-}/PKC\epsilon^{-/-}$ - und die $PKC\delta^{-/-}/PKC\epsilon^{+/-}$ -Embryonen sterben um E10.5, wobei die $PKC\delta^{-/-}/PKC\epsilon^{+/-}$ -Embryonen einen vergleichbaren, aber durchgängig mildereren Phänotyp ausbilden. Ein direkter Vergleich mit verschiedenen anderen Knockouts, die ebenfalls einen letalen Phänotyp um E9.5-E10.5 aufweisen, lässt einige phänotypische Parallelen erkennen. Die $Alk^{-/-}$, $Hey1^{-/-}/Hey2^{-/-}$ und $VE-Cadherin^{-/-}$ -Mäuse und die PKC -Mutanten sind ausnahmslos wachstumsretardiert. Die Dottersäcke sind morphologisch verändert, und das Perikardium ist stark vergrößert (Oh, Seki et al., 2000), (Fischer, Schumacher et al., 2004), (Gory-Faure, Prandini et al., 1999), (Abb. 3.1). Im Besonderen die Vergrößerung des Perikardiums in den verschiedenen Mauslinien wird einem kardiovaskulären Defekt zugeschrieben. Dabei wird davon ausgegangen, dass durchlässige Gefäße für die Akkumulation von Flüssigkeit in der Perikardialhöhle verantwortlich sind (Conway, Kruzynska-Freitag et al., 2003).

Die anfänglich observierte Expression von $PKC\delta/\epsilon$ im kardiovaskulären System während der Embryogenese, die embryonale Sterblichkeit und die eindeutigen phänotypischen Parallelen zu anderen Knockouts mit definierten kardiovaskulären Defekt führte zu einer ausführlichen Untersuchung des embryonalen Gefäßsystems der $PKC\delta/\epsilon$ -defizienten Embryonen.

3.2.1 Der Einfluss von $PKC\delta$ und $PKC\epsilon$ auf die embryonale Gefäßentwicklung

Die embryonale Entwicklung des Gefäßsystems ist grundsätzlich in zwei sequentielle Prozesse unterteilt, die Vaskulo- und die Angiogenese (siehe Einleitung, Abschnitt 1.2). Während der Vaskulogenese entwickeln sich aus Angioblasten Gefäße in bisher noch nicht vaskularisiertem Gewebe. Während der embryonalen Angiogenese wird der während der Vaskulogenese entstandene primäre vaskuläre Plexus durch verschiedene Mechanismen umgestaltet und entwickelt sich letztendlich zu einem mit vSMCs/Perizyten stabilisierten Gefäßsystem (Risau, 1997). Defekte in der embryonalen Gefäßentwicklung sind mannigfaltig und führen häufig zu einer pränatalen Sterblichkeit. So bewirkt z.B. die Defizienz von VEGFR-2 einen kompletten Verlust an Endothelzellen, was zum Tod zwischen E8.5-E9.5 führt (Shalaby, Rossant et al., 1995). An diesem Beispiel kann man den zeitlichen Rahmen erkennen, in dem das embryonale

Gefäßsystem lebensnotwendig für den Embryo wird. So wird zwischen E8.5-E9.5 die Umstellung von reiner Versorgung durch Diffusion zu einer Nährstoffversorgung über die Dottersackgefäße und über die direkte Gefäßverbindung zur Plazenta zum wichtigsten Schritt während dieses Entwicklungsabschnittes (Drake and Fleming, 2000). Eine unvollständige Ausbildung des primären vaskulären Plexus führt somit unweigerlich zur Wachstumsretardierung und letztendlich zum pränatalen Tod. PKC δ/ϵ -defizienten Embryonen sterben um E10.5, was ebenfalls auf einen Defekt in der Gefäßentwicklung hindeutet, und somit eine detaillierte Untersuchung des Gefäßsystems im intra- sowie im extraembryonalen Bereichen als notwendig erscheinen läßt.

Die immunhistochemische Darstellung des embryonalen Gefäßsystems der Mutanten zeigte, dass es zu einer generellen Differenzierung von Endothelzellen kommt (Abschnitt 2.2.3). Damit unterscheiden sich die PKC δ/ϵ -Mutanten mit dem Knockout für VEGFR-2. Eine Funktion von PKC δ/ϵ in der Angioblasten-Differenzierung scheint eher unwahrscheinlich zu sein. Die PKC δ/ϵ -Mutanten haben jedoch eindeutige Defekte in Gefäßen, die während der Vaskulogenese sowie während der Angiogenese gebildet werden. Ein Vergleich der beiden letalen Genotypen zeigt, dass der PKC $\delta^{-/-}$ / PKC $\epsilon^{+/-}$ -Genotyp anscheinend einen milderen vaskulären Phänotyp aufweist (siehe Abschnitt 2.2.3). Folglich gibt es gewisse Übereinstimmungen bezüglich der vaskulären Defekte aber auch grundlegende Unterschiede. Eine ausführliche Diskussion der Übereinstimmungen sowie Unterschiede zwischen den beiden Genotypen wird im Abschnitt 3.3 geführt. Demnach fokussiert sich die nachfolgende Diskussion auf den vaskulären Phänotyp der PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz. Die extreme Verkleinerung und/oder der Verlust der dorsalen Aorta und der Kardinalvenen in der Rumpfregeion der PKC δ/ϵ -doppeldefizienten Embryonen basiert auf einer mangelhaften Vaskulogenese, und ist vergleichbar mit dem Defekt, der bereits für die Hey1/Hey2-Doppelmutante beschrieben wurde (Fischer, Schumacher et al., 2004). Die Vaskularisierung der Kopfregeion findet hauptsächlich während der Angiogenese statt, wobei es dabei zu einer Verzweigung der primären kranialen Aorten und Venen (*Arteria carotis*, Kardinalvene) kommt (Risau, 1997). Die PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz führt zu einem desorganisierten kranialen Gefäßsystem, mit auffälligen Defekten in der Verzweigungsstruktur und Lumen (Abb. 2.7). Die veränderte kraniale Gefäßstruktur ähnelt der von Mef2C-defizienten Embryonen (Bi, Drake et al., 1999). Bei den Mef2C-Mutanten wird davon ausgegangen, dass erhöhte VEGF-Werte aufgrund der auf der fehlenden Blutzirkulation beruhenden Hypoxie im Kopfbereich für die Erweiterung der Gefäßlumen verantwortlich sind. Ob

partiell erhöhte VEGF-Werte im Kopfbereich auch für die PKC δ / ϵ -abhängige Gefäßlumenerweiterung verantwortlich sind, kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, jedoch weisen die auf den ganzen Embryo ermittelten durchschnittlichen VEGF-Werte (Abb. 2.14) auf ein eher VEGF-unabhängigen Mechanismus hin.

Die embryonale Vaskulogenese und Angiogenese findet nicht nur im Embryo, sondern auch in den extraembryonalen Bereichen statt. Dazu zählen der Dottersack und die embryonalen Teile der Plazenta. Die einwandfreie Entwicklung des extraembryonalen Gefäßsystems ist essentiell für eine ausreichende Versorgung des Embryos mit Nährstoffen. Es konnte mittels verschiedener Mutanten gezeigt werden, dass embryonale Fehlentwicklungen in diesen Gefäßbereichen zur pränatalen Sterblichkeit führen können. Mäuse, die defizient für den Plazenta- α 2-Adrenozeptors sind, sterben z.B. zwischen E10.5-E11.5 an schweren Missbildungen des Gefäßsystems im Bereich des Dottersacks und der embryonalen Bereiche der Plazenta (Philipp, Brede et al., 2002). Die bereits beschriebenen Hey1/Hey2- und Mef2C-defizienten Tiere entwickeln neben dem generellen Angiogenesedefekt ebenfalls vaskuläre Defekte im extraembryonalen Gewebe (Bi, Drake et al., 1999; Fischer, Schumacher et al., 2004).

Die PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz führt im Labyrinth der Plazenta und innerhalb des Dottersacks ebenfalls zu einer signifikanten Vergrößerung der Blutgefäße (Abb. 2.8, 2.9), mit verringerter Verzweigungsstruktur und homogener Größe. Mäuse mit Defizienz für den TGF- β -Typ1 Rezeptor (T β R1) weisen ein nahezu identisches Dottersack-Phänotyp auf (Larsson, Goumans et al., 2001), und es konnte gezeigt werden, dass dieser vaskuläre Defekt hauptsächlich auf einer erhöhten Proliferationsrate und auf einem veränderten Migrationverhalten der Endothelzellen basiert (Larsson, Goumans et al., 2001). Ob eine veränderte Proliferation oder Migration zu dem vaskulären Phänotyp der PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Embryonen beiträgt, wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht näher untersucht.

Aufgrund der schweren extraembryonalen vaskulären Defekte konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der kardiovaskuläre Phänotyp des PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Embryonen ein sekundärer Effekt ist. Die Allantois-Kultur dient als Nachweis für eine maternal und extraembryonal unabhängige Neovaskularisierung und frühe Angiogenese (Downs, Gifford et al., 1998; Drake and Fleming, 2000). Die Allantois-Kultur der PKC-Mutanten zeigte eine stark reduzierte Neovaskularisierung im Vergleich zu den getesteten Kontrollgruppen (Abb. 2.10). Was eindeutig zeigt, dass sich

die vaskulären Defekte der PKC-Mutanten unabhängig von den extraembryonalen Defekten entwickeln.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von Gefäßen des Kopfbereiches bestätigte die Annahme, dass die Gefäßlumen der PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Embryonen speziell im Kopfbereich stark erweitert sind (Abb. 2.11). Außerdem konnte eine verringerte Proteindichte in den *adherence junctions* festgestellt werden, die vermutlich zu einer durchlässigen Endothelstruktur führt und somit die Flüssigkeits-Akkumulation in der Perikardialhöhle erklären kann. Expressionsanalysen konnten eine stark verminderte Expression von VE-Cadherin in der PKC-Mutante nachweisen (Abschnitt 2.6.1). VE-Cadherin ist ein zentrales Zell-Zell-Adhäsionsprotein welches in den *adherence junctions* organisiert ist (Abschnitt 1.4.1). Die verminderte VE-Cadherin-Expression könnte ausschlaggebend sein für die geringere Proteindichte an den Zell-Zell-Kontakten und infolgedessen auch verantwortlich für die Durchlässigkeit des Endothels.

Zusammenfassend führt die PKC δ / ϵ -Doppeldefizienz zu schwerwiegenden Defekten des embryonalen Gefäßsystems. Dabei sind Gefäße betroffen, die während der Vaskulogenese sowie während der Angiogenese entstanden sind. Eine präferenzielle Schädigung des arteriellen oder des venösen embryonalen Gefäßsystems konnte nicht festgestellt werden. Ferner betreffen die Defekte zusätzlich die extraembryonalen Bereiche Dottersack und die embryonalen Regionen der Plazenta.

3.2.2 Die PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{+/-}-/PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{+/-}-Genotypen im Vergleich

Die beiden letalen PKC δ / ϵ -Genotypen, PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{+/-} und PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{-/-}, sterben um E10.5, wobei PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{+/-}-Embryonen teilweise auch in späteren Embryonalstadien vorzufinden sind. Das phänotypische Erscheinungsbild der PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{+/-}-Embryonen unterscheidet sich zur Doppeldefizienz in verschiedener Hinsicht. Um E9.5 weisen beide Genotypen ein abnormales Erscheinungsbild des Dottersacks auf (Abb. 2.6). Der Körper des PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{+/-}-Embryos ist jedoch zu diesem Zeitpunkt morphologisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Im Vergleich dazu, weist der doppeldefiziente Embryo bereits schwere Beeinträchtigungen in der Entwicklung auf. Erst um E10.5 zeigt der PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{+/-}-Genotyp charakteristische Anzeichen einer Wachstumsretardierung. Die Darstellung des vaskulären Systems der beiden Genotypen zeigt, dass es sich um zwei unterschiedliche vaskuläre Defekte handelt. Im Gegensatz zu den offensichtlichen Vaskulo- und Angiogenese-Defekten des doppeldefizienten Embryos (Abb. 2.7) weist der PKC δ ^{-/-}/PKC ϵ ^{+/-}-Genotyp keine Beeinträchtigung der Vaskulogenese auf. Obwohl die

Kopfgefäße nicht im Lumen vergrößert scheinen, kann aufgrund der reduzierten generellen Verzweigung davon ausgegangen werden, dass der PKC $\delta^{-/-}$ /PKC $\epsilon^{+/-}$ -Genotyp einen Defekt in der Angiogenese besitzt. Es wäre jedoch ebenfalls denkbar, dass die Wachstumsretardierung speziell des PKC $\delta^{-/-}$ /PKC $\epsilon^{+/-}$ -Genotyps zu einem gewissen Anteil auf den Defekt des Dottersacks zurückzuführen ist (Conway, Kruzynska-Freitag et al., 2003).

Dass es signifikante Unterschiede in der phänotypischen Ausprägung zwischen doppeldefizienten und Embryonen mit einem einseitig heterozygoten Genotyp gibt, wurde bereits für die NP1/NP2- und Hey1/Hey2-Doppelknockouts im Detail beschrieben. NP1 $^{-/-}$ /NP2 $^{-/-}$ -Embryonen sterben um E8.5 im Uterus, und weisen keine Gefäßstrukturen im Dottersack auf (Takashima, Kitakaze et al., 2002). Der NP1 $^{+/-}$ /NP2 $^{-/-}$ - als auch der NP1 $^{-/-}$ /NP2 $^{+/-}$ -Genotyp sind ebenfalls embryonal letal, jedoch erst um E10.5. Im Gegensatz zu den nicht vaskularisierten Dottersäcken der Doppeldefizienz bilden die „Semi-Heteromutanten“ ein Gefäßsystem im Dottersack aus, es fehlen allerdings größere Sammelgefäße und eine ausgeprägte Verzweigung des Gefäßnetzes (Takashima, Kitakaze et al., 2002). Hey1 $^{-/-}$ /Hey2 $^{-/-}$ -Embryonen sterben um E9.5 an einem ausgeprägten vaskulären Phänotyp, der auf einem kompletten Fehlen funktioneller Angiogenese beruht (Fischer, Schumacher et al., 2004). Auch in diesem Fall, entwickeln die einfach heterozygoten Mäuse, Hey1 $^{-/+}$ /Hey $^{-/-}$ und Hey1 $^{-/-}$ /Hey $^{-/+}$, einen individuell charakteristischen Phänotyp im Vergleich zu den Einzelknockouts beziehungsweise zum Doppelknockout aus. Diese Diskrepanzen führen wie u.a. bei Hey1/Hey2-doppeldefizienten Mäusen dazu, dass die phänotypische Charakterisierung solcher Doppeldefizienzen hauptsächlich auf den kompletten Doppelknockout fokussiert ist (Fischer, Schumacher et al., 2004).

3.2.3 PKC δ/ϵ -abhängige Differenzierung von vaskulären glatten Muskelzellen

In ausdifferenzierten Blutgefäßen bilden vSMC/Perizyten die *Tunica media*, die Schicht, die dem Gefäß Stabilität und Flexibilität verleiht. Eine Defizienz von vSMC/Perizyten führt jedoch nicht nur zu einem generellen Stabilitätsverlust der Gefäße, sondern auch zu einem generellen Angiogenesedefekt (Gerhardt and Betsholtz, 2003) (Hellstrom, Gerhardt et al., 2001).

Eine Anzahl an verschiedenen Knockouts entwickeln eine vSMC/Perizyten-Defizienz, wobei nur in PDGF-B/PDGFR- β -Knockouts dafür ein funktioneller Mechanismus

beschrieben werden konnte (Hellstrom, Gerhardt et al., 2001). Bezüglich der Mausmutanten für Ang1 und seinem Rezeptor Tie-2, Endoglin, Alk-1, SMAD5, LKLF sowie für VEGF-A (Suri, Jones et al., 1996; Li, Sorensen et al., 1999; Thurston, 2003) (Yang, Castilla et al., 1999; Oh, Seki et al., 2000) (Kuo, Veselits et al., 1997) (Carmeliet, Lampugnani et al., 1999) ist der funktionelle Mechanismus eher unklar. Für die meisten dieser Mutanten ist es jedoch wahrscheinlich, dass der Primärdefekt in den Endothelzellen stattfindet, und dass die Effekte auf die Entwicklung der *Tunica media* sekundär sind (Gerhardt and Betsholtz, 2003)

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in den PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Embryonen zu keiner Differenzierung von periendothelialen Zellen zu vSMC/Perizyten kommt (Abschnitt 2.4). Dabei ist anzunehmen, dass dieser Defekt auf der PKC δ / ϵ -abhängigen Deaktivierung von für die Differenzierung essentiellen Genen basiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass u.a. Ang-1 und N-Cadherin in den PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Mäusen vermindert exprimiert werden (Abb. 2.15).

Ang-1-defiziente Mäuse sterben um E11.5 an Defekten des embryonalen Gefäßsystems, dabei bilden die Ang-1-defizienten Endothelzellen keinerlei Kontakte zu periendothelialen Zellen aus (Suri, Jones et al., 1996). Die verminderte Ang-1-Expression könnte somit einen ähnlichen Effekt in der PKC- Mutante bewirken.

Die Interaktion von Endothelzellen mit vSMC-Vorläuferzellen ist essentiell für die Differenzierung von Mesenchymzellen zu vSMCs (Gerhardt and Betsholtz, 2003). N-Cadherin ist im Gegensatz zu VE-Cadherin nicht an der Bildung von intraendothelialen *adherence junctions* beteiligt (Navarro, Ruco et al., 1998), sondern hat eine Funktion in der Kontaktbildung zu den periendothelialen Zellen (Gerhardt, Liebner et al., 1999; Gerhardt and Betsholtz, 2003). Ferner konnte gezeigt werden, dass N-Cadherin die β -Catenin-Signaltransduktion in *adherence junctions* zwischen Endothelzellen und Perizyten unterstützt (Gerhardt, Wolburg et al., 2000). Zusammen mit der reduzierten Ang-1-Expression kann die stark reduzierte N-Cadherin- Expression somit ein wichtiger Faktor sein, der die fehlende Differenzierung von periendothelialen Zellen zu vSMC in der PKC δ / ϵ -Defizienz beeinflusst.

Unterstützt wird diese Vermutung außerdem durch die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Gefäßen der PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Embryonen (Abschnitt 2.5). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Endothelzellen der PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Embryonen im Gegensatz zu den

Wildtypkontrollen keine Verbindungen zu vSMC/Perizyten Vorläuferzellen und/oder zu der extrazellulären Matrix ausbilden (Abb. 2.12).

Zusammenfassend kann das Fehlen von vSMC/Perizyten in der PKC-Mutanten Ursachen haben, die entweder primär auf der verminderten Expression von Ang-1 und N-Cadherin, oder sekundär aufgrund des allgemeinen Gefäßdefekts basieren.

3.3 Der Einfluss von PKC δ/ϵ auf die Expression von Genen der Gefäßentwicklung

Am Ende einer Signalkaskade kann die Regulierung der Expression von spezifischen Genen stehen, die die zelluläre Antwort auf ein ursprüngliches initiiertes Signal darstellen. Die Defizienz von Signaltransduktions-Proteinen kann somit zu einer Veränderung der Expression von den jeweiligen *downstream*-Genen führen. Diese veränderte Expression trägt nun entscheidend zur Bildung und zum Charakter eines Knockout-Phänotypes bei. Das Erscheinungsbild eines Phänotypes stellt die Summe der aufgrund der Defizienz entstandenen Expressions-Veränderungen dar.

Die Expressionsanalyse von Genen der Gefäßentwicklung identifizierte eine Anzahl an Genen, die in der PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz entweder vermindert oder erhöht exprimiert werden (Abschnitt 2.6.1). So konnte gezeigt werden, dass PDGF-BB signifikant erhöht, VE-Cadherin, N-Cadherin, Ang-1, Ang-2, Midkine, Ets-1, Fli-1 und EphB4 hingegen vermindert in der PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz exprimiert werden.

PDGF-BB bildet zusammen mit seinem Rezeptor PDGFR- β eine wichtige Ligand/Rezeptor-Einheit, welche entscheidenden Einfluss auf die Interaktion von Endothelzellen und vSMC-Vorläuferzellen hat. Die erhöhte Expression von PDGF-BB könnte indirekt durch das Fehlen einer negativen Rückkopplung aufgrund der vSMC-Defizienz gefördert werden. Alternativ könnte die verminderte Expression von Ang-1, einem Wachstumsfaktor, für den eine Funktion in der negativen Regulierung von PDGF-BB nachgewiesen wurde (Taylor and Khachigian, 2000), zu der Erhöhung des Expressionsniveaus führen.

Der Heparin-bindende-Wachstumsfaktor Midkine übernimmt vielfältige Funktionen in verschiedenen Bereichen der Angiogenese (Zhang and Deuel, 1999; Sumi, Muramatsu et al., 2002), so dass die Reduzierung des Expressionsniveaus einen signifikanten Einfluss auf den Angiogenesedefekt des PKC-Mutanten haben könnte. Interessanterweise ist Midkine ein Ligand des Heparan-Sulfat-Proteoglykan-Transmembranrezeptors

Syndecan-4 (Deepa, Yamada et al., 2004). Syndecan-4-defiziente Mäuse zeigen eine verminderte Wundheilung, die auf einem Angiogenesedefekt beruht. Für die Aktivierung des Rezeptors wurde außerdem gezeigt, dass hierfür eine durch PKC δ vermittelte Serin-Phosphorylierung notwendig ist (Murakami, Horowitz et al., 2002).

Die PKC δ/ϵ -abhängige verminderte Expression des Transkriptionsfaktors Ets-1 besitzt womöglich eine Schlüsselfunktion bezüglich der veränderten Expression von weiteren Genen in der PKC-Mutante. So konnte gezeigt werden, dass Ets-1 die Expression von Ang-2, Fli-1 und VE-Cadherin regulieren kann und somit *upstream* von diesen in der PKC-Mutanten vermindert exprimierten Genen liegt (Lelievre, Mattot et al., 2000; Lelievre, Lionneton et al., 2001; Lelievre, Lionneton et al., 2002; Hasegawa, Abe et al., 2004). Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die durch VEGF stimulierte Induktion der Expression von Ets-1 von der PKC vermittelten Signaltransduktion abhängig ist (Abschnitt 2.7.4 und 3.4).

Eine Datenbank-Analyse identifiziert eine Vielzahl an bekannten Ets-1/Fli-1 Bindungsstellen in der Promotorsequenz von N-Cadherin (<http://www.biochem.missouri.edu/~martin/etsalign.htm>). Dieses eröffnet die Möglichkeit, dass auch die verminderte Expression von N-Cadherin in der PKC-Mutante auf dem reduzierten Ets-Niveau basiert.

Eine Ets-1-abhängige verminderte Expression von Ang-2, Fli-1 und VE-Cadherin und N-Cadherin würde bedeuten, dass PKC δ und PKC ϵ *upstream* von Ets-1 wirken, und damit ein Fehlen der PKCs direkt zu einer verminderten Expression des Transkriptionsfaktors führt. Ferner sollte ein Ets-1-Knockout einen ähnlichen Phänotyp aufweisen wie der PKC δ/ϵ -Knockout. Allerdings zeigen Ets-1-defiziente Mäuse keinen Angiogenesedefekt, was die essentielle Funktion von Ets-1 in Frage stellt (Barton, Muthusamy et al., 1998). Es wird angenommen, dass in Ets-1-defizienten Mäusen Fli-1 und Erg Ets-1 funktionell substituieren (Lelievre, Lionneton et al., 2001). In der PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz werden Ets-1 und Fli-1 signifikant vermindert exprimiert, so dass es zu keiner Substitution von Ets-1 durch Fli-1 kommen kann. Interessanterweise, führt die Fli-1-Defizienz zu einem Defekt in der embryonalen Angiogenese, was in einem embryonalen Tod um E12.5 resultiert (Spyropoulos, Pharr et al., 2000). Somit ist der Phänotyp der PKC δ/ϵ -doppeldefizienten Embryonen im Gegensatz zu den Ets-1-, Fli-1-Einzelmutanten das Resultat einer verminderten Expression von zwei Ets-Transkriptionsfaktoren, was die Unterschiede in der phänotypischen Ausprägung der vaskulären Defekte erklären könnte.

In Endothelzellen wird die Ets-1-Expression u.a. durch VEGF induziert (Valter, Hugel et al., 1999). Ob PKC δ und PKC ϵ ebenfalls durch VEGF aktiviert werden, und somit potentiell *upstream* von Ets-1 in einer VEGF-induzierten Signalkaskade liegen, wurde anhand von VEGF-Stimulations-Experimenten in MEECs untersucht (Abschnitt 3.4).

3.4 Untersuchungen zur VEGF-abhängigen Signalkaskade in MEECs

VEGF₁₆₅ ist der vorherrschende vaskuläre Wachstumsfaktor, der die Expression von Ets-1 in Endothelzellen induzieren kann. Jedoch konnte bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden, welcher der VEGF₁₆₅-Rezeptoren für diese Induktion verantwortlich ist. Der Wachstumsfaktor VEGF₁₆₅ bindet mit verschiedener Affinität VEGFR-1, VEGFR-2, NP-1 und NP-2. Somit kann die Expression von Ets-1 durch eine Reihe von verschiedenen Signalkaskaden in der Zelle initialisiert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass VEGF₁₆₅ nicht nur in humanen und Rinder-Endothelzellen, sondern auch in Mauszellen Ets-1-Expression induzieren kann (Abschnitt 2.7.4). Ferner konnten die in HUVEC untersuchten VEGF-abhängigen p38- und Erk1/2-Stimulierungen in MEECs qualitativ reproduziert werden (Abschnitt 2.7.3). Dies lässt den Schluss zu, dass die beschriebenen VEGF-Signalkaskaden mit denen der embryonalen Maus-Endothelzellen identisch sind.

In HUVECs wurde bereits eine VEGF-abhängige PKC ϵ -Aktivierung beschrieben (Wu, Mayo et al., 2000), eine Aktivierung von PKC δ durch VEGF wurde jedoch bisher in keiner Zelllinie nachgewiesen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PKC δ und PKC ϵ durch die Stimulierung von MEECs mit VEGF₁₆₅ aktiviert werden (Abb. 2.17). Ferner konnte mit Hilfe von verschiedenen PKC-Inhibitoren nachgewiesen werden, dass die VEGF₁₆₅-abhängige Ets-1-Induzierung jedenfalls teilweise über nPKCs erfolgt.

Der zeitliche Verlauf der p38-, Erk1/2- und PKC δ/ϵ -Aktivierungen lässt vermuten, dass p38 PKC δ/ϵ -unabhängig, Erk1/2 jedoch möglicherweise PKC δ/ϵ -abhängig durch VEGF₁₆₅ aktiviert werden könnte. Für definitive Aussagen bezüglich der PKC-abhängigen MAPKs Aktivierungen müssten jedoch entweder VEGF₁₆₅-Stimulierungen mit PKC δ/ϵ -einzel- oder -doppeltdefizienten Zellen oder Stimulierungen mit entsprechenden Inhibitoren durchgeführt werden.

3.5 Die Interaktion von PKC δ und PKC ϵ mit Rezeptoren der Gefäßentwicklung

Wie zuvor beschrieben, führt die VEGF₁₆₅-Stimulierung von MEECs zur Translokation von PKC δ sowie der von PKC ϵ zur Membranfraktion des Zelllysates. Ferner konnte dargestellt werden, dass die PKCs direkt oder indirekt an die VEGF₁₆₅-Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 sowie an Tie-1, Tie-2 und EphB4 binden. Außerdem konnten erste Untersuchungen zur PKC-abhängigen Phosphorylierung der RTKs zeigen, dass diese nicht durch die PKCs phosphoryliert werden (Daten nicht gezeigt), was darauf schließen lässt, dass die Funktion der Bindung darin besteht, die PKCs in räumlicher Nähe zu ihrem Substrat zu lokalisieren. Die Möglichkeit einer indirekten Bindung der PKC an die RTKs wird durch die Tatsache unterstützt, dass der Rezeptor für aktivierte C-Kinasen 1 (Rack-1) ebenfalls an die GST-RTK Fusionsproteine binden kann (Busche, 2004).

Das Adapterprotein Rack-1 wurde ursprünglich als Bindungspartner von PKC β II identifiziert (Ron und Mochly-Rosen, 1995). Inzwischen konnte jedoch außerdem die Bindung von PKC δ und PKC ϵ an Rack-1 nachgewiesen werden (Besson, Wilson et al., 2002; Rosdahl, Mourton et al., 2002). Neben der Bindung von PKC interagiert Rack-1 u.a. mit den zytoplasmatischen Tyrosin-Kinasen Src und Fyn (Chang, Chiang et al., 2001; Yaka, Phamluong et al., 2003; Miller, Lee et al., 2004), welche wiederum an bestimmte VEGF-Rezeptoren binden können. So konnte nachgewiesen werden, dass Src präferenziell mit VEGFR-2 und Fyn mit VEGFR-1 interagiert (Chou, Wang et al., 2002). Basierend auf diesen Interaktionen ist es denkbar, dass PKC δ und PKC ϵ über Rack-1/Src oder Rack-1/Fyn an VEGFR-1 beziehungsweise VEGFR-2 binden. Aufgrund der Tatsache, dass Rack-1 ebenfalls an Tie-1, Tie-2 und EphB4 binden kann (Abschnitt 2.8.2), ist für diese Rezeptoren ein ähnlicher Mechanismus denkbar. Die Vermutung, dass es sich um eine indirekte Interaktion handelt, wird außerdem dadurch bekräftigt, dass PKC δ sowie PKC ϵ in einem *yeast two hybrid* Ansatz nicht mit den RTKs interagieren (Busche, 2004).

3.6 PKC δ/ϵ -Signaltransduktion in der murinen vaskulären Entwicklung – Das Gesamtbild

Bisher wurden in dieser Arbeit viele verschiedene Aspekte diskutiert, die sich mit den Folgen einer PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz in der murinen Embryogenese befassen. Wie

sieht jedoch das Gesamtbild der Signaltransduktions-Ereignisse aus, das durch PKC δ und PKC ϵ vermittelt wird?

Ausgangspunkt der Konstruktion eines Gesamtüberblickes ist die embryonale Sterblichkeit der PKC δ/ϵ -doppeldefizienten Embryonen um E10.5, die auf einen umfangreichen Defekt in der Vaskulo- und Angiogenese beruht. Somit ist festzustellen, dass beide PKC Isoformen eine essentielle Aufgabe in den Signaltransduktions-Ereignissen besitzen, die den Prozess der Gefäßbildung und Gefäßneugestaltung kontrollieren. Basierend auf der Vermutung, dass es sich hierbei um einen Signalweg handeln muss, der bekanntlich in der Vaskulo- sowie in der Angiogenese involviert ist, kann es sich primär nur um ein durch VEGF-A-vermittelten Signaltransduktionweg handeln. Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass VEGF-A der einzige vaskuläre Wachstumsfaktor ist, der nachweislich essentielle Funktionen in beiden embryonalen Prozessen der Gefäßentwicklung besitzt und dabei keine Präferenz für verschiedenartige Gefäße aufweist (Rossant and Howard, 2002). Als VEGF-Rezeptoren, die Einfluss auf die Vaskulogenese haben, kommen vornehmlich VEGFR-2, NP1 und NP2 in Frage. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die VEGF-A-Isoform VEGF₁₆₅ *upstream* von PKC δ und PKC ϵ wirkt (Abschnitt 2.7.2). VEGF₁₆₅ ist an einer Vielzahl an funktionellen Prozessen der Gefäßentwicklung beteiligt, wobei die Induktion der Expression des vaskulären Transkriptionsfaktors Ets-1 eine zentrale Bedeutung in der VEGF-stimulierten zellulären Antwort darstellt (Lelievre, Lionneton et al., 2001).

Es konnte nachgewiesen werden, dass Ets-1 und der Ets-Transkriptionsfaktor Fli-1 in der PKC δ/ϵ -Doppelmutanten vermindert exprimiert werden. Dieses lässt vermuten, dass diese verminderte Expression durch eine Störung des VEGF-Signalweges hervorgerufen wurde. Bestärkt wurde diese Annahme außerdem durch die VEGF-abhängigen Ets-1 Expressionsinduktions-Studien in MEECs. Dabei konnte durch Verwendung von PKC Inhibitoren die VEGF abhängige Ets-1 Induktion signifikant gehemmt werden (Abschnitt 2.7.4). Ets-1 und Fli-1 sind Transkriptionsfaktoren, die die Expression von vielen vaskulären Proteinen regulieren. Somit würde das Fehlen dieser wichtigen Regulatoren erst indirekt durch die unterbleibende Expression von *downstream*-Genen einen physiologischen Effekt auf die Vaskulogenese haben. Die Expressionsanalyse von bekannten Ets-1/Fli-1-*downstream*-Genen, sowie die von Genen mit Ets-Bindungsstellen, konnte die verminderte Expression von VE-Cadherin, Ang-2 und N- Cadherin in der PKC δ/ϵ -Doppeldefizienz nachweisen (Abschnitt 2.6.1)

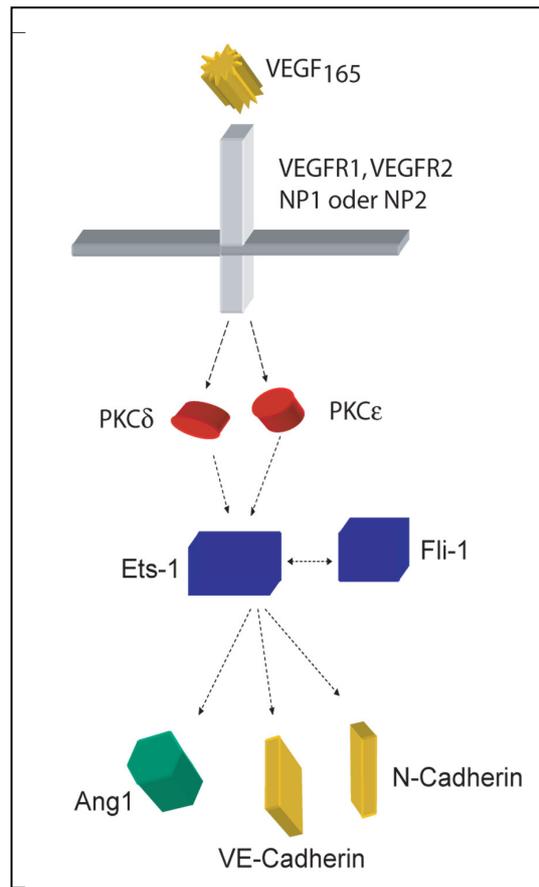


Abb. 3.2. Schematische Darstellung der PKC δ/ϵ -abhängigen VEGF₁₆₅-induzierten Expression von Ang1, VE-Cadherin und N-Cadherin. Stimulierung der VEGF-Rezeptoren VEGFR1-2 oder NP1-2 führt zur PKC-abhängigen Induzierung der Expression von Ets-1 und Fli-1. Dies führt zur verstärkten Expression vom Wachstumsfaktor Ang1 und den Adhäsionsproteinen VE-Cadherin und N-Cadherin.

Für VE-Cadherin und N-Cadherin ist bekannt, dass sie wichtige Funktionen in der Vaskulogenese sowie Angiogenese ausüben. Die Defizienz von vSMC und die veränderte Struktur der *adherence junctions* in den PKC δ/ϵ -doppeldefizienten Embryonen könnte somit das Resultat der verminderten Expression von VE-Cadherin und N-Cadherin sein.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die unterbundene VEGF-A induzierte Ets-1/Fli-1-Induktion in den PKC δ/ϵ -doppeldefizienten Embryonen zu einer verminderten Expression von VE-Cadherin, Ang1 und N-Cadherin führt, und dass dieses letztendlich entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung des vaskulären Phänotypes hat.

3.7 PKC δ und PKC ϵ : Die Bedeutung funktioneller Redundanz in der Embryogenese

Funktionelle Redundanz bedeutet, dass zwei oder mehr Gene/Proteine die gleiche Funktion ausüben können, so dass die Inaktivierung von einem dieser Gene/Proteine einen geringen oder keinen Effekt auf den biologischen Phänotyp hat (Nowak, Boerlijst et al., 1997). Dabei scheint Redundanz in vielen verschiedenen biologischen Prozessen weit verbreitet zu sein, u.a. in der Embryogenese (Wang, Schnegelsberg et al., 1996), (Solloway and Robertson, 1999), in der Immunologie (De Franceschi, Fumagalli et al., 1997) und der Neurobiologie (Grifman, Galyam et al., 1998).

Über die biologische Bedeutung der Redundanz beziehungsweise über ihre Evolution wurde in den letzten Jahren viel spekuliert (Nowak, Boerlijst et al., 1997; Krakauer and Nowak, 1999).

Eines der schwerwiegendsten Argumente gegen eine vollständige Redundanz zweier Gene ist der evolutionäre Selektionsdruck. Dabei würde mindestens eines der redundanten Gene den „Schutz“ gegen die Akkumulation von Mutationen verlieren (Nowak, Boerlijst et al., 1997). Aufgrund der Tatsache, dass dennoch funktionell redundant wirkende Gene aktiv sind, wird davon ausgegangen, dass die Konservierung der redundant wirkenden Gene in einem biologischen Bereich stattfindet, der nicht redundant zwischen den beiden Genen ist. Das heißt, neben der überlappenden Funktion zweier redundant wirkender Gene, gibt es im Organismus außerdem genspezifische Funktionen (Nowak, Boerlijst et al., 1997). Allgemein wird dieser Mechanismus auch als Pleiotropie bezeichnet.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei dem Versuch, die biologische Bedeutung der funktionellen Redundanz zu erklären, ist die „Rückversicherung“ gegen somatische Mutationen während der Embryogenese, die bei Genen, die in lebensnotwendigen Prozessen involviert sind verstärkt vorzufinden ist. Folgendermaßen führt das Vorhandensein von redundant agierenden Genen zu einer höheren Wahrscheinlichkeit zu überleben, denn im Fall einer durch Mutation bedingten funktionellen Beeinträchtigung des einen Genes kann die Funktion von einem anderen Gen ausgeübt werden (Nowak, Boerlijst et al., 1997).

Die Untersuchung der PKC δ/ϵ -doppeldefizienten Mauslinie konnte die oben aufgeführten Charakteristika einer funktionellen Redundanz bestätigen. Beide PKC-Isoformen haben sowohl überlappende sowie unterschiedliche Expressionsdomänen,

und die Einzelmutanten zeigen unterschiedliche Phänotypen. Das bedeutet, die evolutionäre Konservierung der beiden PKC Gene erfolgt aufgrund der unterschiedlichen biologischen Funktionen. Dass PKC δ und PKC ϵ funktionell redundant in den überlappenden Expressionsdomänen sind, konnte in dieser Arbeit anhand der Analyse des kardiovaskulären Defekts des PKC δ/ϵ -Doppelknockouts gezeigt werden. Der PKC $\delta^{-/-}/PKC\epsilon^{+/-}$ - aber nicht der PKC $\delta^{+/-}/PKC\epsilon^{-/-}$ -Genotyp ist zusätzlich zu der Doppeldefizienz embryonal letal, was zu der Frage führt, in welcher Art und Weise die funktionelle Redundanz dieser beiden Isoenzyme in der Zelle organisiert ist.

Die Expressionsanalysen zeigen eine stärker ausgeprägte Expression von PKC δ in allen Bereichen des embryonalen vaskulären Systems im Vergleich zu PKC ϵ , für das nur eine moderate Expressionstärke nachgewiesen wurde. Dieses könnte ein Indiz für eine dominante Funktion von PKC δ sein.

Die unterschiedlichen Expressionsniveaus in Verbindung mit dem letalen PKC $\delta^{-/-}/PKC\epsilon^{+/-}$ -Genotyp könnten jedoch auch zu einer anderen Hypothese führen: Angenommen, dass PKC ϵ und PKC δ im Endothel vornehmlich zwei unterschiedlich Funktionen ausüben, jedoch im Fall der Defizienz des anderen Isoenzym sich reziprok substituieren können, müssten die Isoenzyme folglich mit der gleichen Quantität zwei unabhängige Funktionen ausüben können. Für die stark exprimierte PKC δ könnte dies demnach eher möglich sein, als für die nur im Vergleich schwach exprimierte PKC ϵ . Somit könnte die in dem PKC δ -Knockout-Hintergrund beobachtete PKC ϵ -Haploinsuffizienz als Resultat der unterschiedlichen Expressionsstärken bewertet werden.

Obwohl die in dieser Arbeit gezeigten Daten wie z.B. die Aktivierung von PKC δ sowie die von PKC ϵ nach VEGF₁₆₅, auf das Zusammenwirken der beiden Isoenzyme in der gleichen Signalkaskade hindeuten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass beide Isoenzyme in verschiedenen Kaskaden aktiv sind. Somit könnte der vaskuläre Defekt der PKC δ/ϵ -Mutanten nicht ausschließlich auf eine klassische funktionelle Redundanz zurückzuführen sein, sondern könnte sich vielmehr aufgrund einer synergistischen Amplifikation aus zwei ursprünglich auf den Einzeldefizienzen beruhenden geringfügigeren vaskulären Defekten entwickelt haben.

4 Material und Methoden

4.1 Behandlung und Haltung der Versuchstiere

Sämtliche Arbeiten mit Tieren wurden entsprechend den Vorschriften des Bundes-Tierschutzgesetzes durchgeführt (BGB1 S.1105, ber. S. 181, Abschnitt 2 (§2+3), 5 (§7-9) und 8 (§119)). Zur Analyse von Expressionsmustern wurde der Mausstamm NMRI verwendet.

4.2 Generierung der PKC δ / ϵ -doppeldefizienten Mauslinie

Die PKC δ - und PKC ϵ -einzeldefizienten Mauslinien wurden zuvor in der AG Leigtes generiert (Klock, 2000) und nicht publizierte Daten (Leitges). Die Generierung der PKC δ / ϵ -doppeldefiziente Mauslinie erfolgte durch Kreuzung der einzeldefizienten Mauslinien. Durch Rückkreuzungen bis zur F7-Generation wurde ein homogener genetischer Hintergrund generiert.

4.3 *Whole mount in situ*-Hybridisierung (wm-ISH)

Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, auf einem Schüttler bei Raumtemperatur (RT). Inkubationsschritte bei höheren Temperaturen wurden in einem Schüttelwasserbad durchgeführt. Die Embryonen wurden in Glasgefäßen mit Teflon-beschichteten Deckeln behandelt.

Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Embryonen wurden nach einer Methanol/PBT-Reihe in reines PBT (0,1% Tween-20 in PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM NaH₂PO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,4)) überführt: 75%, 50%, 25% Methanol/PBT für je 10 min, danach zweimal 10 min in PBT. Dann wurden die Embryonen in 6% H₂O₂ in PBT für eine Stunde gebleicht, dreimal für jeweils 5 min in PBT gewaschen und mit 10 µg/ml Proteinase K (Roche, Schweiz) in PBT für eine Dauer entsprechend ihres Entwicklungsstadiums behandelt (E8.5 für 1 min, E9.5 für 4 min, E10.5 für 7 min, E11.5 für 10 min). Danach wurden die Embryonen zweimal in 2 mg/ml Glycin in PBT für jeweils 10 min und dreimal mit PBT für 5 min gespült. Anschließend erfolgte eine Fixierung mit 4% Paraformaldehyd/0.2% Glutaraldehyd in PBT für 20 min. Daraufhin wurden die Embryonen in 1 ml Prähybridisierungspuffer (50% Formamid, 5 x SSC (20 x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat; pH 4,5), 50 µg/ml Hefe-tRNA; 1% SDS; 50 µg/ml Heparin) für 5 min geschüttelt. Der Prähybridisierungspuffer wurde durch 2 ml frischen Prähybridisierungspuffer ersetzt und die

Embryonen zwei Stunden im Wasserbad bei 70°C inkubiert. Schliesslich wurden die Embryonen in 1-2 ml Prähybridisierungspuffer, der 1 µg/ml der RNA-Sonde enthielt, über Nacht bei 70°C inkubiert.

Post-Hybridisierung und Antikörper-Inkubation

Nach Entfernung der Hybridisierungsmischung wurden die Embryonen dreimal für 30 min in einer vorgewärmten Lösung I (50% Formamid; 5 x SSC pH 4,5; 1% SDS; in nicht DEPC-behandeltem Wasser) bei 70°C gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen. Nach drei Inkubationen in TNT (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,5 M NaCl; 0,1% Tween-20) für 5 min bei RT wurden die Embryonen zweimal 30 min mit 100 µg/ml RNase in TNT bei 37°C behandelt. Anschließend wurden die Embryonen nach einem kurzen Waschschrift für 5 min in TNT-Lösung I (1:1) bei RT dreimal für 30 min in Lösung II (50% Formamid; 2 x SSC, pH 4,5; 0,2% SDS, in nicht DEPC-behandeltem Wasser) bei 65°C inkubiert. Parallel wurde die Antikörperlösung hergestellt. Hierzu wurde 1 mg Embryopuder (Trockensubstanz aus E10.5-E12.5-alten Mausembryonen) in ein 50 ml-Gefäß eingewogen und 0,5 ml MAB/Block (s.u.) zugesetzt. Die Suspension wurde durch kurzes Vortexen gemischt und für 30 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 5 µl Schafserum und 0,4 µl Anti-Dig-Peroxidase-Konjugat (Roche, Schweiz) wurde die Antikörperlösung für eine Stunde bei 4°C geschwenkt. Durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm wurde der unlösliche Teil der Lösung sedimentiert. Der Überstand wurde durch die Zugabe von 1% Schafserum in MAB/Block (2% Roche Blockingreagenz in 100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 2 mM Levamisol; pH 7,5) auf 2 ml verdünnt. Der beschriebene Ansatz wurde für ein einzelnes Probengefäß eingesetzt. Nach der Inkubation in Lösung II wurden die Embryonen dreimal 5 min in MAB (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 2 mM Levamisol (Sigma, Deutschland); pH 7,5; frisch hergestellt) bei RT inkubiert. Nachdem die Embryonen für 2-3h in MAB/Block bei RT präinkubiert wurden, wurden sie über Nacht bei 4°C in der Antikörperlösung unter leichtem Schwenken inkubiert.

Waschschritte nach der Antikörper-Inkubation

Die Embryonen wurden dreimal für 10 min bei RT in MAB gewaschen, dann wurde die MAB-Lösung über den ganzen Tag stündlich erneuert. Die Embryonen wurden dann über Nacht bei 4°C in MAB geschwenkt.

Färbereaktion und Lagerung

Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen dreimal 10 min bei RT mit NTMT (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl) gespült. Die Färbereaktion erfolgte anschließend in BM-Purple (Roche, Schweiz), 2 mM Levamisol in Gefässen, die durch Aluminiumfolie vor Sonneneinstrahlung geschützt waren. Die Reaktion wurde solange vollzogen, bis das Signal erkennbar war, maximal über Nacht. Gestoppt wurde die Färbung durch dreimaliges Waschen in PBT, pH 4,5 für 5 min bei RT. Die Embryonen wurden entweder in dieser Lösung bei 4°C

gelagert, in 80% Glycerin/PBT überführt und bei -80°C gelagert oder zur Anfertigung von Schnitten in 90% Methanol transferiert.

4.4 ISH auf Paraffinschnitten

Soweit nicht anders erwähnt wurden die Inkubations- und Waschschriffe bei RT durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden durch zweimaliges Eintauchen in Xylol für jeweils 10 min entwachst und durch eine absteigende Reihe von Ethanol/PBS in reines PBS überführt. Darauf folgte eine Nachfixierung in 4% PFA für 20 min gefolgt von zweimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 min. Nachdem die Schnitte für 10 min einer Proteinase K-Behandlung unterzogen wurden (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K in 100 mM Tris-HCl, pH 7,5), wurden sie zur Inhibierung der Reaktion für 10 min in 0,2 % Glycerin/PBS eingetaucht.

Nach zweimaligem Waschen in PBS für 5 min, wurde zum zweiten Mal für 10 min in 4% PFA fixiert. Dann wurden die Schnitte für 5 min mit PBS gewaschen, für 15 min in eine 0,2 N HCl-Lösung eingetaucht, erneut zweimal 5 min mit PBS gewaschen und 10 min in der TEA-Lösung (0,1 M Triethanolamin, pH 8,0; 0,25% Essigsäure) inkubiert, um Aminogruppen abzusättigen. Nun wurden die Schnitte für jeweils 5 min in PBS und DEPC-H₂O gewaschen, um sie anschließend für 2h bei 70°C zu prähybridisieren (in 50% Formamid; 5 x SSC (20 x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hefe-tRNA; 1% SDS; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Heparin; 1 x Denhards; 0,1% Tween). Die Hybridisierung erfolgte bei 70°C über Nacht mit 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dig-markierter Probe in der Prähybridisierungs-Lösung. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte dreimal für 30 min in Lösung 1 (50% Formamid; 5 x SSC pH 4,5 und 1% SDS in ddH₂O) bei 67°C gewaschen. Nach drei Inkubationen in TNT (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,5 M NaCl; 0,1% Tween-20) für 5 min bei RT wurden die Schnitte zweimal 30 min mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase in TNT bei 37°C behandelt. Anschließend wurden die Schnitte nach einem kurzen Waschschriffe für 5 min in TNT: Lösung II (1:1) bei RT dreimal für 30 min in Lösung II (50% Formamid; 2 x SSC pH 4,5; 0,2% SDS, in nicht DEPC-behandeltem Wasser) bei 63°C inkubiert. Nachdem die Schnitte dreimal für jeweils 5 min in MAP-Lösung (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 2 mM Levamisol, pH 7,5) gewaschen wurden, folgte das Blockieren der freien Bindungsstellen in MAP/Block/Schafserum (2% Roche Blockingreagenz in 100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 2 mM Levamisol, pH 7,5; 10% Schafserum) für 3 Stunden bei RT unter konstanter Bewegung auf dem Schüttler. Schliesslich wurden jeweils 200 μL Antikörper-Lösung (Herstellung siehe wm-ISH mit Mäuseembryonen) pro Objektträger aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am dritten Tag der ISH wurden die Schnitte dreimal für 10 min und viermal für 1 Stunde in MAP-Lösung gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte dreimal 10 min mit NTMT (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl) gespült. Die Färbereaktion erfolgte anschließend in BM-Purple (Roche, Schweiz), 2 mM Levamisol, so lange, bis das Signal erkennbar war, maximal über Nacht. Gestoppt wurde die

Färbung durch dreimaliges Waschen in PBT, pH 4,5, jeweils für 5 min bei RT. Die histologischen Präparate wurden zur Aufbewahrung in MOVIOL® eingedeckelt.

4.5 Immunhistochemie mit PFA-fixierten und Paraffin- eingebetteten Gewebeschnitten

Die Gewebeschnitte wurden durch zweimaliges Eintauchen in Xylol für jeweils 10 min entparaffinisiert und durch eine Ethanol-Reihe in reines PBS überführt. Es folgte eine zweiminütige Inkubation der Schnitte im kochenden Zitratpuffer (10mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 150 mM NaCl). Nach 5 min in PBS wurden die Schnitte mit 10% FCS/PBS für 1 Stunde blockiert und danach über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden Antikörper (verdünnt in 10% FCS/PBS) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Gewebeschnitte dreimal 5 min in PBT (PBS + 0,002% Tween) gewaschen und danach für 2 Stunden mit dem jeweiligen sekundären Antikörper (verdünnt in 10% FCS/PBS) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBT wurde die Farbreaktion durch Zugabe von DAB (Diaminobenzidine) durchgeführt.

4.6 *Whole mount*-Immunhistochemie (wm-IHC) mit Mausembryonen

Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, auf einem Schüttler bei Raumtemperatur (RT). Die Embryonen wurden in Glasgefäßen mit Teflon-beschichteten Deckeln behandelt.

Fixieren, Bleichen und Verdau

Die Embryonen wurden abhängig vom verwendeten Antikörper entweder in 4% PFA oder in Methanol:DMSO (4:1) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen in 6% H₂O₂ für 2 Stunden gebleicht, um endogene Peroxydasen zu neutralisieren. Die Embryonen wurden in 100% Methanol überführt und in einer Reihe von Methanol/PBT in reines PBT überführt. Abhängig vom eingesetzten Antikörper wurden die Embryonen mit 20 µg/ml Proteinase K für 3-5 min verdaut. Dabei wurden Proteinase K-verdaute Embryonen zusätzlich mit 0,1% GDA Lösung (Glutardialdehyd) für 15 min fixiert und zweimal in 2 mg/ml Glycin gewaschen.

Antikörper-Inkubation

Die Embryonen wurden zweimal für 1 Stunde in PMTM (PBS; 0,1% Triton-100; 2% Magermilchpulver) blockiert und mit der entsprechenden Antikörperverdünnung in PMTM über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde sie zweimal bei 4°C und dreimal bei RT in PMTM gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde mit der entsprechenden Verdünnung in

PMTM über Nacht mit den Embryonen inkubiert. Am nächsten Tag folgte ein zweimaliger Waschvorgang bei 4°C gefolgt von einem dreimaligen Waschschrift bei RT in PMTM.

Nach 20 min Waschen in PBBT (0,2% BSA; 0,1% TritonX-100; PBS) wurden die Embryonen für 20 min in DAB vorinkubiert, bevor die DAB-Farbreaktion durch Zugabe von H₂O₂ initialisiert wurde. Nach erfolgter Färbung wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen in PBT gestoppt. Wenn erwünscht, wurden die Embryonen mit 0,1% GDA/PBT nachfixiert und durch eine Reihe von Glycerin/PBT zur Lagerung bei -20°C in 80% Glycerin/PBT überführt.

4.7 β-Galactosidasefärbung von transgenen Mausembryonen

Die zu färbenden Embryonen wurden direkt nach der Präparation aus der Gebärmutter in PBS gewaschen und entsprechend des Alters für 10-30 min fixiert (100 mM Phosphatpuffer (168 mM Na₂HPO₄; 32 mM NaH₂PO₄), 0,2 % GDA; 2 mM MgCl₂ und 5 mM EGTA). Nach dreimaligem Waschen in NP-Waschlösung (0,01% Natrium Desoxycholat; 0,002 Nonident-P40; 2 mM MgCl₂; 100 mM Phosphatpuffer) folgte die Färbungsreaktion (50 mg/ml X-Gal; 10 mM K₃[Fe(CN)₆]; 10 mM K₄ [Fe(CN)₆] in NP-Waschlösung) über Nacht bei 37°C auf einer Wippe. Am nächsten Morgen wurden die Embryonen mit PFA nachfixiert und bei Bedarf durch eine Glycerin/PBS-Reihe in 80% Glycerin/PBS überführt.

4.8 Immunfluoreszenz auf Zellen

24 Stunden vor der Immunfluoreszenz-Behandlung wurden die Zellen auf Gelatine-beschichtete Glasscheiben in 12-Loch-Platten ausgesät. Dann wurden die Zellen entweder mit 4% Paraformaldehyd für 10 min bei RT oder mit 100% Methanol für 20 min bei -20°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 30 min mit 0,1% Borax/PBS gebleicht. Wahlweise wurden die Zellen für 5-15 min mit 0,1% TritonX-100/PBS inkubiert. Es folgte das Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen mit dem entsprechenden Serum für 1-3 Stunden bei RT. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mindestens dreimal mit 0,0002% Tween-20/PBS gewaschen, mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 20 min bis 2 Stunden bei RT inkubiert und erneut dreimal mit 0,0002% Tween-20/PBS gewaschen.

4.9 Quantitative RT-PCR (Q-PCR)

Um die unterschiedlichen Expressionsniveaus der in den verschiedenen experimentellen Versuchsanordnungen zu detektierenden Gene zu ermitteln, wurden die Transkripte mittels PCR

wie zuvor beschrieben quantifiziert (iCycler real-time-PCR System, BIO-RAD) (Fruman, Ferl et al., 2002). Das Haushaltsgen *elongation factor 1 alpha (EF1a)* wurde verwendet, um die cDNA-Mengen zu normalisieren. Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung des iQ-SYBR Green Supermix (BIO-RAD) entsprechend eines Standardprotokolls angesetzt.

PCR-Reaktionsansatz

5 µl cDNA (1:10 Verdünnung der cDNA-Stammlösung, s.o.)

5 µl Primer-Mix (1,4 µM von *forward*- und *reverse*-Primer)

10 µl Sybr-Mix

$\Sigma = 20 \mu\text{l}$

Um Abweichungen durch Pipettierfehler zu verringern, wurden die Reaktionsansätze durch Verwendung eines Mastermixes, der die Primer und den SYBR Green-Mix enthält, vereinigt. Dieser wurde dann auf die vorgelegte cDNA gegeben.

PCR-Programm

Denaturierung: 95°C 3 min

Amplifikation (50 Zyklen): 94°C 30 sek

Primerbindung: 58-64°C 25 sec (Temperatur war abhängig von den verwendeten Primern)

72°C 25 sek

Denaturierung: 95°C 1 min

Temperatur-Rampe (90 mal): 50-95°C 10 sek, nach jedem Zyklus + 0.5°C

Final: 4°C

Die anfängliche Denaturierung reichte aus, um die hot-start-Taq-Polymerase des SYBR Green-Mixes zu aktivieren. Die DNA-Konzentration wurde während der Amplifikation und des Temperatur-Gradienten detektiert. Die Schmelzkurve der PCR-Produkte (Resultat des Temperatur-Gradienten) diente dazu, Reaktionen mit mehr als einem PCR-Produkt auszuschließen (in den beschriebenen Experimenten nicht der Fall). Um Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Embryonen zu vermindern, wurden immer mehrere Embryonen zu einem Gesamtpool vereinigt. Um Pipettier- und PCR-Durchführungsfehler zu reduzieren, wurden alle PCR-Reaktionen mindestens in Triplikaten angesetzt. Für die spätere Quantifizierung wurde der Mittelwert unter Berücksichtigung der Standardabweichung verwendet.

4.10 cDNA-Array

Die Quantifizierung von Expressionsunterschieden zwischen E9.5-PKC δ / ϵ -doppeldefizienten und E9.5-Wildtyp-Embryonen wurde grundsätzlich gemäss der Arbeitsvorschrift des GE-Arrays-Kits (Super-Array, Katalognummer: MM-009-2) durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde aus E9.5-Embryonen und des Dottersacks isoliert und nachfolgend quantifiziert. Jeweils 5 µg Gesamt-RNA

wurde radioaktiv mit ^{32}P -dCTP markiert und als Sonde in der Blot-Hybridisierung eingesetzt. Nach semi-quantitativer Auswertung der Blots und Entfernung der vorherigen Sonde wurde die Hybridisierung mit der jeweils anderen Sonde erneut hybridisiert, um eventuelle Unterschiede in den verwendeten cDNA-Blots zu kompensieren.

4.11 Allantois-Kultur

Die Allantois-Kultur wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Drake and Fleming, 2000). Allantois von E7.5-Embryonen wurden seziiert und über Nacht in AK-Medium (D-MEM (Gibco Kat.-Nr. 61965-026); 10% FCS; 1% Pen/Strep; 2% L-Glutamin; 1% Natriumpyruvat; 1% nicht-essentielle Aminosäuren; 5 μM β -Mercaptoethanol) bei 37°C und 10% CO_2 inkubiert. Wahlweise wurden die Allantois auf Gelatine-beschichteten Glasplatten kultiviert. Danach wurden die Allantois für 10 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit 0,02% TritonX-100 für 30 min permeabilisiert. Darauf folgte die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation mit 3% BSA/PBS für 12-18 Stunden und die Inkubation mit dem primären Antikörper für 1,5 Stunden bei 26°C. Nun wurden die Explantate dreimal mit PBS gewaschen und für 1,5 Stunden mit dem sekundären Antikörper bei 26°C inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS bevor die Gefäße durch das jeweilige Detektionsystems (DAB, oder IF) visualisiert wurden.

4.12 Generierung und Kultivierung von embryonalen Endothelzellen aus der Maus (MEECs)

E9.5-Embryonen wurden aus der Gebärmutter entnommen und von maternalem und extraembryonalem Gewebe gesäubert. Die Embryonen wurden mit jeweils 100 μl einer Kollagenase/Dispase-Lösung (10 mg/ml Stock, Roche) für 15-20 min bei 37°C verdaut. Danach folgte die Homogenisierung des Zellgemisches durch wiederholtes Pipetieren mit einer 200 μl -Spitze. Das Homogenisat wurde für 10 min bei 1300 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag in einer 0,125% Trypsinlösung (Invitrogen) aufgenommen und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml MBE-Medium (DMEM; 10% FCS; 1% Pen/Strep; 2% L-Glutamin; 1% ECGs; 1% Natriumpyruvat; 1% nicht-essentielle Aminosäuren; 5 μM β -Mercaptoethanol) abgestoppt und wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Der Niederschlag wurde danach in 2 ml MBE-Medium aufgenommen und in 12-Loch-Platten über Nacht bei 37°C kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Primärzellen für 2 Stunden mit einem *Polyoma-middle-T-Retrovirus*-Überstand (von frisch wachsenden zu 2/3 konfluenten virusproduzierenden Zellen (GP+E86 pNTK mT)) und 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene (Sigma) inkubiert. Der Überstand wurde nun

mit normalen MBE-Medium ausgetauscht. Nach ca. 6-12 Wochen konnten reine Endothelzelllinien charakterisiert werden

4.13 Wachstumsfaktor-Stimulierung von MEECs

Konfluent-gewachsene MEECs wurden für 24-48 Stunden gehungert (0,1% FCS), um die basale Phosphorylierung der zu untersuchenden Kinasen zu vermindern. Durch Zugabe von 50-100 ng/ml VEGF₁₆₅ (PeproTech EC) oder 50-100 ng/ml FGF-2 (PeproTech EC) wurden die MEECs unterschiedlich lange stimuliert. Nach der Stimulierung folgte die Lysis der Zellen durch Zugabe des Lysispuffers für ca. 15 min auf Eis (50 mM Tris/HCl, pH 7,5-8,0; 2 mM EDTA, pH 7,0; 10 mM EGTA, pH 7,0; 1 x Protease-Inhibitoren-Mix (Sigma); 1 x Phosphatase-Inhibitoren-Mix (Sigma); 0,1% TritonX-100). Die Lysate wurden dann für 20 min bei 12,000 rpm zentrifugiert und die Überstände entfernt. Für die Untersuchung der Translokation von PKCs zu der Membran wurde der Niederschlag in 1%-TritonX-100-Lysispuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Schliesslich wurden die Lysate mit 1 x SDS-Puffer vermischt (250 mM Tris/HCl, pH 6,5; 8 x SDS; 20% Glycerin; 100 mM DTT und 0,0001% Bromphenolblau) und für 5 min bei 99°C aufgekocht.

4.14 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Die Expression der GST-Fusionsproteine basiert auf der Arbeitsvorschrift der Firma Amersham Biosciences, es wurden jedoch einige Veränderungen vorgenommen. Mit pGEX (Expressionsvektor, Amersham Biosciences) transformierte *E. coli* (BL21 oder Rosetta) wurden in LB-Medium über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde dann 1:10 mit neuem LB-Medium verdünnt und erneut bis zu einer Wachstumsdichte zwischen OD₆₀₀ 0,5 und OD₆₀₀ 1,0 bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von IPTG (Endkonzentration zwischen 0,1 und 2 mM) gefolgt von einer zeitlich variablen Inkubation (2,5 Std. bis über Nacht) zur Proteinexpression. Die Bakteriensuspension wurde dann für 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag in kaltem PBS resuspendiert und erneut bei 3000 rpm für 2 min zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in einer PBS-Lysozym-Lösung (100 µg/ml, Roche) aufgenommen und für 15-30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 5 mM DTT und 0,1-1 mM PMSF. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch die Zugabe von Sarkosyl zu einer Endkonzentration von 1,5%. Das Lysisgemisch wurde nun für ca. 5 min durch Vortexen gemischt und durch Zugabe von TritonX-100 zu einer Endkonzentration von 1,5% wurde das Sarkosyl durch die Bildung von gemischten Mizellen neutralisiert. Dann wurden die Lysate für 5 min im Wasserbad sonifiziert und bei 12 000 rpm für 1 Stunde bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände

wurden danach zusammen mit den *Glutathion-Sepharose 4B-beads* für mindestens 2 Stunden bei 4 °C rotiert.

Anschließend wurden die *beads* bei 1000 rpm sedimentiert, der Überstand verworfen und mit 1 x PBS gewaschen. Dieser Schritt wurde dann für 6-8-mal wiederholt. Aufgereinigte Fusionsproteine wurden bei -80 °C bis zu der Verwendung gelagert.

4.15 GST-pulldown

5 µg der an *beads* gebundenen aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden mit der entsprechenden Menge an MEEC-Lysat (ca. 1000 µl/5 x 10⁶ Zellen, MEEC-Lysat-Puffer: 1% TritonX-100; 1% Natriumdeoxycholat; 0,1% SDS; 0,15 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 7,2; 1 mM EDTA; 1 x Protease-Inhibitoren-Mix; 1 mM PMSF) für mindestens 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die *beads* bei 1000 rpm sedimentiert, der Überstand verworfen und die *beads* zweimal mit MEEC-Lysat-Puffer und 6-8 x mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 x SDS-Puffer und Aufkochen für 5 min bei 99 °C wurden die Proteine mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt und mögliche Koimmunpräzipitationen von Proteinen durch einen Western-Blot nachgewiesen.

4.16 Transfektion von COS7-Zellen

Zu 80% konfluent-gewachsene COS7-Zellen wurden für 30 min mit einem Kalzium-Phosphat-DNA-Kopräzipitat bei 37 °C inkubiert (250 µl 40 µg/ml DNA in 0,1 x TE-Puffer, pH 8,0; 31 µl CaCl₂ und 220 µl 2 x HBS-Puffer (280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,5 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 12 mM Dextrose; 50 mM HEPES). Nach 48-60 Stunden wurden die Transfektionseffizienz mittels Immunfluoreszenz bestimmt.

4.17 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Die Genotypisierung von Mäusen erfolgte in der Regel durch PCR-Analyse. Dazu wurden 0,5-1 cm lange Schwanzbiopsien entnommen und in 400 µl Extraktions-Puffer (200 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS; 1 mg/ml Proteinase K) über Nacht bei 55 °C inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurden unlösliche Partikel durch Zentrifugation sedimentiert (20 min, 13000 rpm, RT). Die DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol gefällt (30 min, 13000 rpm, RT), mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und in 200 µl TE-Puffer gelöst (2-10 Std. bei 55 °C). Für die PCR wurden 0,6 µl DNA in einer 1:10-Verdünnung eingesetzt (in einem 25 µl Ansatz).

4.18 Präparation der Dottersack-DNA zur Genotypisierung von Mausembryonen

Die Genotypisierung von E7.5-E18.5-Embryonen erfolgte durch PCR-Analyse. Dafür wurden ca. 0,5 cm² des Dottersackes in 50 µl PCR-Lysispuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 0,45% NP-40; 0,45% Tween-20; 60 µg/ml Proteinase K) über Nacht bei 55 °C verdaut. Am nächsten Tag wurde das PCR-Lysispuffer-Gemisch für 10 min bei 99 °C aufgeköcht und 0,6 µl in die PCR-Analyse eingesetzt.

4.18.1 PCR-basiertes Genotypisieren

Die Genotypisierung der Knockout-Mäuse erfolgte mittels Multiplex-PCR. Dabei wurden in einer Reaktion Knockout- und Wildtyp-Allele detektiert.

PCR-Programm für PKC ϵ	PCR-Programm für PKC δ
1. 95 °C – 15 min 2. 95 °C – 30 sek 3. 64,1 °C – 45 sek 4. 72 °C – 45 sek zurück nach 2. (40 x) 5. 72 °C – 10 min 6. 4 °C – Endlosschleife	1. 95 °C – 15 min 2. 95 °C – 30 sek 3. 65,1 °C – 30 sek 4. 72 °C – 45 sek zurück nach 2. (44 x) 5. 72 °C – 10 min 6. 4 °C – Endlosschleife
Wildtypfragment: 800 bp Neo-Fragment: 1100 bp	Wildtypfragment: 1020 bp Neo-Fragment: 800 bp
0,6 µl genomische DNA (s.o.) 12,5 µl HotStartTaq Mastermix Kit (Qiagen, Deutschland) 0,5µl PKC ϵ -/- (10 µM) 0,5 µl <i>forward</i> (10 µM) 1,0 µl <i>reverse</i> (10 µM) 10 µl H ₂ O Σ= 25 µl	0,6 µl genomische DNA (s.o.) 12,5 µl HotStartTaq Mastermix Kit (Qiagen, Deutschland) 0,5µl PKC δ -/- (10 µM) 0,5 µl <i>forward</i> (10 µM) 1,0 µl <i>reverse</i> (10 µM) 6,5 µl H ₂ O Σ= 25 µl

4.19 Oligonukleotide

Name	GenBank oder Ensembl-ID	<i>forward-Primer (5'-3')</i>	<i>reverse-Primer (5'-3')</i>	Länge (bp)
Oligonuk. für <i>real time</i>-PCR				
VE- Cadherin	ENSMUSG0000003 1871	TGTGCAAGTGCAACG AGCAG	CGTGAATCTCCAGC GCACTC	194
T- Cadherin	ENSMUSG0000003 1841	TGGATGTCAACGAGG GACC	CCGTTCCATTGATG GGGTTG	192
N- Cadherin	ENSMUST0000002 5166	CCCCACACCCTGGGG ATATT	CCGCTGCCCTCGTA GTCAAA	114
PDGF-BB	BC064056	GGGCGCTCTTCCTTC CTCTC	TCCAGCTCAGCCCC ATCTTC	168
EphB4	XM_124676.1	TCGGCTCCTTTGAGG TGGTC	TGCTGCACACTGGC CAAGAT	103
Pecam-1	ENSMUSG0000002 0717	GCGGTGTTTCAGCGAG ATCC	GGCTCGTCCCCTCT TTCACA	1 0 8
VEGFR-2	NM_010612.1	AAAGAGAGGAACGTC GGCAGAG	ACCCTCAGACCTGC CACCAG	120
Ang1	XM_122933.1	GTGCAAATGCGCTCT CATGC	TCCATGATTTTGTCC CGCAGT	100
Ang2	NM_007426.1	CCGCGGCCAAAATAA GTAGC	CGTCAAACCACCAG CCTCCT	120
Ets-1	ENSMUST0000003 4534	CCGATCCAGCTGTGG CAGTT	GGCCACGGCTCAGT TTCTCA	178
Fli-1	ENSMUST0000001 6231	GGATCACAGACCATG GGCAAG	TGGTCCCCTCCCAG GTGATA	180
Erg-1	ENSMUST0000003 5525	CAGCCACCTCACCCC TCAGT	TCGAGCAGGAACTG CCACAG	167
β -Aktin	NM_007393.1	ACCCAGGCATTGCTG ACAGG	GGACAGTGAGGCCA GGATGG	136
EF1- α	BC083069	AATTCACCAACACCA GCAGCAA	TGCCCCAGGACACA GAGACTTCA	96

Midkine	ENSMUSG0000002 7239	ATGGGAGCACTGGCA CCAAA	GGAGGCTCTCTGGC CTCCTG	171
FGFR4	ENSMUSG0000000 5320	GCAGCTGGTGGGAAGC TCTGG	GCAAAGGGTCGTGG CTGAAA	152
VEGF-A	NM_009505.1	CAAGGCGAGGCAGCT TGAGT	GGTTCCCGAAACCC TGAGGA	103
Oligonucleotide für GST-RTK-Konstrukte				
VEGFR-2	NM_010612.1	TATCCGCAGGGTGAG GAAGG	GCTACTTCCGGGTG GTGGAA	1980
VEGFR-1	NM_010228.1	ACCTCACCGTGCAAG GAACC	TGTCGGGGCTGGTG AGAAG	1787
Rack-1	AF295529	TGCTTGGCTCTCTGA GCTATC	AATTGGTGATGAAA TGACATCTG	1197
EphB4	XM_124676.1	GGCCAGGAGCATCAC AGTCA	GGGAGGGGCTCAT CTTGTGA	1491
Tie1	NM_011587	TGGCTGCCCTTTTAG CCTTG	TGGGAACAGCTGGC AAGAAA	1278
Tie2	NM_013690	TCGGCTGGAATGACT TGCAT	TGGGTGGCTTGCTT GGTACA	1197
Oligon. für Genotypisierungen				
PKC δ	ENSMUSG0000002 1948	ACAGGCCAGCCTCAC ACACCTAC	GTCAGCGCAGGGG CGCCCGG	1020
PKC $\delta^{-/-}$		GCAGGGAGCCCAGCT CATAGG		800
PKC ϵ	ENSMUSG0000005 5637	CTCCCCCTCCGGGAG TCGAAATTG	CTGCAGCAGCTCCT CGAACTGGT	800
PKC $\epsilon^{-/-}$		CTTGGGTGGAGAGGC TATTC		1100

4.20 Plasmide und Vektoren

Name	Plasmid	Fragment	Verwendung	GenBank-/ Ensembl-ID
PKC ϵ	pBluescript II SK+	12-1700	ISH/wm-ISH	ENSMUSG00000 055637
PKC ϵ	pmT2	121-2100	COS7-Transfektion	ENSRNOG00000 015603
PKC δ	pCRII-TOPO	240-2200	ISH/wm-ISH	ENSMUSG00000 021948
PKC δ	pmT2	5-2020	COS7-Transfektion	ENSRNOT000000 22279
Tie1	pJFE14	mRNA	COS7-Transfektion	NM_011587
Tie2	pJFE14	mRNA	COS7-Transfektion	NM_013690
VEGFR-2	pJFE14	mRNA	COS7-Transfektion	NM_010612.1
VEGFR-1	pGEX-6P-3	2261-4047 über Sal1	GST- <i>pulldown</i>	NM_010228.1
VEGFR-2	pGEX-6P-1	2370-4349 über EcoR1	GST- <i>pulldown</i>	NM_010612.1
EphB4	pGEX-6P-3	1648-3138 über Sal1	GST- <i>pulldown</i>	XM_124676.1
Rack-1	pGEX-6P-1	322-1518 über EcoR1	GST- <i>pulldown</i>	AF295529
Tie1	pGEX-6P-1	2678-3955 über EcoR1	GST- <i>pulldown</i>	NM_011587
Tie2	pGEX-6P-1	2598-3794 über EcoR1	GST- <i>pulldown</i>	NM_013690

4.21 Antikörper

Name (Anti-)	Verwendung/ Verdünnung	Firma	Kat.-Nr.	Gekoppelt mit
Actin (I-19)	WB: 1:1000	Santa Cruz	sc-1316	
p38 (N-20)	WB: 1:1000	Santa Cruz	sc-728	
P-p38	WB: 1:1000	Cell Signaling	#9211	
PKC δ	WB: 1:2000	R&D Antibodies	AS-2443S	

<i>α-Smooth muscle actin</i>	IHC: 1:250	Sigma	A 5691	AP, Fitz
Erk1/2	WB: 1:2000	StressGen	KAP-MA001	
P-Erk1/2	WB: 1:2000	Biomol	SA-275	
P-PKCε	WB: 1:1000	Upstate	06-821	
P-PKCδ	WB: 1:1000	StressGen	KAP-PK010	
PECAM-1 (CD31)	wmlHC: 1:100	Pharmingen	553372	
GST	WB: 1:4000	Amersham Bio.	RPN1236	HRP
PKCε (C-15)	WB: 1:1000 wmlHC: 1:500	Santa Cruz	Sc-214	
PKCδ (C-17)	WB: 1:1000 wmlHC: 1:100	Santa Cruz	sc-213	
PKCδ (C-20)	WB: 1:1000	Santa Cruz	sc-937	
Tie1 (H-180)	IF: 1:1000	Santa Cruz	sc-9025	
Tie2	IF: 1:1000	Upstate	05-584	
VEGFR2 (C-20)	IF: 1:1000	Santa Cruz	sc-315	
Sekundäntikörper				
<i>Goat Anti-Rabbit</i>	WB: 1:5000	Dianova	111-035-144	HRP
<i>Donkey Anti-Goat</i>	WB: 1:5000	Dianova	705-035-147	HRP
<i>Goat Anti-Rat</i>	wmlHC: 1:250	Dianova	112-035-003	HRP
<i>Donkey Anti-Goat</i>	IF: 1:200-1:2000	Dianova	705-025-147	Tritz
<i>Donkey Anti-Rabbit</i>	IF: 1:200-1:2000	Dianova	711-095-152	Fitz
<i>Anti-Rabbit</i>	ICH: 1:200	Dianova	711-065-152	Biotin- SP
Streptavidin	ICH: 1:500	Dianova	016-020-084	Tritz

ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol pro Liter
AP	alkalische Phosphatase
Ang	Angiopoitin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cm	Centimeter
DA	dorsale Aorta
DAB	Diaminobenzamidin
DAG	sn-1,2-Diacylglycerin
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dig	Digoxygenin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E	embryonaler Tag
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF1α	Elongationsfaktor 1α
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-Aminoethylether)-N,N',N',-Tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
Fitz	Fluoreszeinisothiozyan at
GDA	Glutaraldehyd
GST	Glutathion-S-Transferase
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IF	Immunfluoreszenz
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
IHC	Immunhistochemie
IP3	1,4,5-myo-Inositoltriphosphat
k.o.	<i>knock-out</i>
kb	Kilobasenpaare
M	Mol pro Liter
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MeOH	Methanol
MEEC	embryonale Endothelzellen aus der Maus

min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
n	Anzahl
NaOAc	Natrium-Acetat
NaF	Natriumfluorid
NBT	4-Nitro-Blue-Tetrazolium-Chlorid
N-Cadherin	neuronaies Cadherin
NP	Neuropelin
P	postnataler Tag
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatpuffer, salzhaltig
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenium = pH-Wert
PKC	Protein Kinase C
PKD	Protein Kinase D
PMA	Phorbol 12-myristat 13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
Rack	Rezeptor für aktivierte C Kinasen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Sek	Sekunden
SH2	Src-homologe Domäne 2
SSC	Natrium-Citratpuffer, salzhaltig
Std.	Stunden
TBS	Tris-Puffer, salzhaltig
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEA	Triethanolamin
TGF	<i>tumor growth factor</i>
TRIS	Tris[hydroxymethyl]aminoethan
Tritz	Tetramethylrhodaminisothiozyanat
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
VE-Cadherin	vaskuläres Endothel-Cadherin
VEGF	<i>vaskular endothelial growth factor</i>
vSMV	vaskuläre glatte Muskelzelle
wmISH	<i>whole mount in situ</i> -Hybridisierung
wmIHC	<i>whole mount</i> Immunhistochemie
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

REFERENZEN

- Abeliovich, A., C. Chen, et al. (1993). "Modified hippocampal long-term potentiation in PKC gamma-mutant mice." Cell **75**(7): 1253-62.
- Abeliovich, A., R. Paylor, et al. (1993). "PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning." Cell **75**(7): 1263-71.
- Adams, R. H., F. Diella, et al. (2001). "The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration." Cell **104**(1): 57-69.
- Adams, R. H., G. A. Wilkinson, et al. (1999). "Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis." Genes Dev **13**(3): 295-306.
- Akita, Y. (2002). "Protein kinase C-epsilon (PKC-epsilon): its unique structure and function." J Biochem (Tokyo) **132**(6): 847-52.
- Arese, M., Y. Chen, et al. (1999). "Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals." Mol Biol Cell **10**(5): 1429-44.
- Arman, E., R. Haffner-Krausz, et al. (1998). "Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5082-7.
- Auguste, P., S. Javerzat, et al. (2003). "Regulation of vascular development by fibroblast growth factors." Cell Tissue Res **314**(1): 157-66.
- Augustin, H. G. and Y. Reiss (2003). "EphB receptors and ephrinB ligands: regulators of vascular assembly and homeostasis." Cell Tissue Res **314**(1): 25-31.
- Barbara, N. P., J. L. Wrana, et al. (1999). "Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily." J Biol Chem **274**(2): 584-94.
- Barton, K., N. Muthusamy, et al. (1998). "The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice." Immunity **9**(4): 555-63.
- Besson, A., T. L. Wilson, et al. (2002). "The anchoring protein RACK1 links protein kinase Cepsilon to integrin beta chains. Requirements for adhesion and motility." J Biol Chem **277**(24): 22073-84.
- Betsholtz, C., L. Karlsson, et al. (2001). "Developmental roles of platelet-derived growth factors." Bioessays **23**(6): 494-507.
- Bi, W., C. J. Drake, et al. (1999). "The transcription factor MEF2C-null mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac expression of angiopoietin 1 and VEGF." Dev Biol **211**(2): 255-67.

- Bikfalvi, A., S. Klein, et al. (1997). "Biological roles of fibroblast growth factor-2." Endocr Rev **18**(1): 26-45.
- Blobe, G. C., S. Stribling, et al. (1996). "Protein kinase C isoenzymes: regulation and function." Cancer Surv **27**: 213-48.
- Busche, S. (2004). Interaktionsstudien von *novel PKC* mit vaskulären Rezeptor-Tyrosinkinasen. Fachbereich Chemie. Hannover, Universität Hannover.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, et al. (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." Nature **380**(6573): 435-9.
- Carmeliet, P., M. G. Lampugnani, et al. (1999). "Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis." Cell **98**(2): 147-57.
- Castagna, M., Y. Takai, et al. (1982). "Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters." J Biol Chem **257**(13): 7847-51.
- Castrillo, A., D. J. Pennington, et al. (2001). "Protein kinase C epsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection." J Exp Med **194**(9): 1231-42.
- Castrillo, A., D. J. Pennington, et al. (2001). "Protein kinase C epsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection." J Exp Med **194**(9): 1231-42.
- Chang, B. Y., M. Chiang, et al. (2001). "The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1." J Biol Chem **276**(23): 20346-56.
- Chen, D., A. Purohit, et al. (2004). "Centrosomal Anchoring of Protein Kinase C {beta}II by Pericentrin Controls Microtubule Organization, Spindle Function, and Cytokinesis." J. Biol. Chem. **279**(6): 4829-4839.
- Chen, L., H. Hahn, et al. (2001). "Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11114-9.
- Cheng, N., D. M. Brantley, et al. (2002). "The ephrins and Eph receptors in angiogenesis." Cytokine Growth Factor Rev **13**(1): 75-85.
- Chou, M. T., J. Wang, et al. (2002). "Src kinase becomes preferentially associated with the VEGFR, KDR/Fik-1, following VEGF stimulation of vascular endothelial cells." BMC Biochem **3**(1): 32.
- Conway, S. J., A. Kruzynska-Freitag, et al. (2003). "What cardiovascular defect does my prenatal mouse mutant have, and why?" Genesis **35**(1): 1-21.
- Cross, M. J., J. Dixelius, et al. (2003). "VEGF-receptor signal transduction." Trends Biochem Sci **28**(9): 488-94.
- Csukai, M., C. H. Chen, et al. (1997). "The coatmer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase C epsilon." J Biol Chem **272**(46): 29200-6.
- D'Amore, P. A. (2000). "Kissing cousins-evidence for a common vascular cell precursor." Nat Med **6**(12): 1323-4.

- Davis, R. L. and D. L. Turner (2001). "Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning." Oncogene **20**(58): 8342-57.
- Davis, S., N. W. Gale, et al. (1994). "Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity." Science **266**(5186): 816-9.
- De Franceschi, L., L. Fumagalli, et al. (1997). "Deficiency of Src family kinases Fgr and Hck results in activation of erythrocyte K/Cl cotransport." J Clin Invest **99**(2): 220-7.
- Deepa, S. S., S. Yamada, et al. (2004). "Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparan sulfate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor." J Biol Chem **279**(36): 37368-76.
- Dekker, L. V. (2004). Protein Kinase C.
- Dekker, L. V. and P. J. Parker (1994). "Protein kinase C--a question of specificity." Trends Biochem Sci **19**(2): 73-7.
- Deng, C. X., A. Wynshaw-Boris, et al. (1994). "Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization." Genes Dev **8**(24): 3045-57.
- Diaz-Meco, M. T., M. M. Municio, et al. (1996). "The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C." Cell **86**(5): 777-86.
- Djonov, V., M. Schmid, et al. (2000). "Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation." Circ Res **86**(3): 286-92.
- Djonov, V. G., A. B. Galli, et al. (2000). "Intussusceptive arborization contributes to vascular tree formation in the chick chorio-allantoic membrane." Anat Embryol (Berl) **202**(5): 347-57.
- Downs, K. M., S. Gifford, et al. (1998). "Vascularization in the murine allantois occurs by vasculogenesis without accompanying erythropoiesis." Development **125**(22): 4507-20.
- Drake, C. J. and P. A. Fleming (2000). "Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo." Blood **95**(5): 1671-9.
- Dube, A., Y. Akbarali, et al. (1999). "Role of the Ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific Tie2 gene." Circ Res **84**(10): 1177-85.
- Dumont, D. J., G. Gradwohl, et al. (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**(16): 1897-909.
- Dumont, D. J., L. Jussila, et al. (1998). "Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3." Science **282**(5390): 946-9.
- Dutil, E. M., A. Toker, et al. (1998). "Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1)." Curr Biol **8**(25): 1366-75.

- Dzierzak, E., A. Medvinsky, et al. (1998). "Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo." Immunol Today **19**(5): 228-36.
- Edinburgh, U. o. (2004). Edinburgh mouse atlas, University of Edinburgh.
- Feng, G. S. and T. Pawson (1994). "Phosphotyrosine phosphatases with SH2 domains: regulators of signal transduction." Trends Genet **10**(2): 54-8.
- Feraud, O., Y. Cao, et al. (2001). "Embryonic stem cell-derived embryoid bodies development in collagen gels recapitulates sprouting angiogenesis." Lab Invest **81**(12): 1669-81.
- Fischer, A., N. Schumacher, et al. (2004). "The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development." Genes Dev **18**(8): 901-11.
- Flamme, I., T. Frolich, et al. (1997). "Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis." J Cell Physiol **173**(2): 206-10.
- Flamme, I. and W. Risau (1992). "Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro." Development **116**(2): 435-9.
- Flanagan, J. G. and P. Vanderhaeghen (1998). "The ephrins and Eph receptors in neural development." Annu Rev Neurosci **21**: 309-45.
- Fong, G. H., J. Rossant, et al. (1995). "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium." Nature **376**(6535): 66-70.
- Fong, G. H., L. Zhang, et al. (1999). "Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice." Development **126**(13): 3015-25.
- Fruman, D. A., G. Z. Ferl, et al. (2002). "Phosphoinositide 3-kinase and Bruton's tyrosine kinase regulate overlapping sets of genes in B lymphocytes." PNAS **99**(1): 359-364.
- Gale, N. W., S. J. Holland, et al. (1996). "Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis." Neuron **17**(1): 9-19.
- Gale, N. W., G. Thurston, et al. (2002). "Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1." Dev Cell **3**(3): 411-23.
- Gerety, S. S., H. U. Wang, et al. (1999). "Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development." Mol Cell **4**(3): 403-14.
- Gerhardt, H. and C. Betsholtz (2003). "Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis." Cell Tissue Res **314**(1): 15-23.
- Gerhardt, H., S. Liebner, et al. (1999). "N-cadherin expression in endothelial cells during early angiogenesis in the eye and brain of the chicken: relation to blood-retina and blood-brain barrier development." Eur J Neurosci **11**(4): 1191-201.
- Gerhardt, H., H. Wolburg, et al. (2000). "N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken." Dev Dyn **218**(3): 472-9.

- Gory-Faure, S., M. H. Prandini, et al. (1999). "Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis." Development **126**(10): 2093-102.
- Grifman, M., N. Galyam, et al. (1998). "Functional redundancy of acetylcholinesterase and neuroligin in mammalian neuritogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13935-40.
- Gschwendt, M., H. Leibersperger, et al. (1992). "Protein kinase C zeta and eta in murine epidermis. TPA induces down-regulation of PKC eta but not PKC zeta." FEBS Lett **307**(2): 151-5.
- Gschwendt, M., H. Leibersperger, et al. (1991). "Immunological demonstration of epsilon PKC. Murine tissue distribution, ontogeny, cellular localization and translocation." FEBS Lett **290**(1-2): 115-8.
- Hasegawa, Y., M. Abe, et al. (2004). "Transcriptional regulation of human angiopoietin-2 by transcription factor Ets-1." Biochem Biophys Res Commun **316**(1): 52-8.
- Hellstrom, M., H. Gerhardt, et al. (2001). "Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis." J Cell Biol **153**(3): 543-53.
- Henderson, B. R. and F. Fagotto (2002). "The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport." EMBO Rep **3**(9): 834-9.
- Henkemeyer, M., D. Orioli, et al. (1996). "Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system." Cell **86**(1): 35-46.
- Henkemeyer, M., D. J. Rossi, et al. (1995). "Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein." Nature **377**(6551): 695-701.
- Hidaka, M., W. L. Stanford, et al. (1999). "Conditional requirement for the Flk-1 receptor in the in vitro generation of early hematopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7370-5.
- Holland, S. J., N. W. Gale, et al. (1996). "Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands." Nature **383**(6602): 722-5.
- Hrabe de Angelis, M., J. McIntyre, 2nd, et al. (1997). "Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1." Nature **386**(6626): 717-21.
- Huang, L., C. W. Turck, et al. (1995). "GRB2 and SH-PTP2: potentially important endothelial signaling molecules downstream of the TEK/TIE2 receptor tyrosine kinase." Oncogene **11**(10): 2097-103.
- Huppert, S. S., A. Le, et al. (2000). "Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1." Nature **405**(6789): 966-70.
- Ilijin, K., A. Dube, et al. (1999). "Role of ets factors in the activity and endothelial cell specificity of the mouse Tie gene promoter." Faseb J **13**(2): 377-86.
- Ivanov, D., M. Philippova, et al. (2004). "Cell adhesion molecule T-cadherin regulates vascular cell adhesion, phenotype and motility." Exp Cell Res **293**(2): 207-18.
- Ivaska, J., R. D. Whelan, et al. (2002). "PKC epsilon controls the traffic of beta1 integrins in motile cells." Embo J **21**(14): 3608-19.

- Jaken, S. (1996). "Protein kinase C isozymes and substrates." Curr Opin Cell Biol **8**(2): 168-73.
- Jaken, S. and P. J. Parker (2000). "Protein kinase C binding partners." Bioessays **22**(3): 245-54.
- Javerzat, S., P. Auguste, et al. (2002). "The role of fibroblast growth factors in vascular development." Trends Mol Med **8**(10): 483-9.
- Jones, N. and D. J. Dumont (1998). "The Tek/Tie2 receptor signals through a novel Dok-related docking protein, Dok-R." Oncogene **17**(9): 1097-108.
- Joutel, A., C. Corpechot, et al. (1996). "Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia." Nature **383**(6602): 707-10.
- Kappel, A., T. M. Schlaeger, et al. (2000). "Role of SCL/Tal-1, GATA, and ets transcription factor binding sites for the regulation of flk-1 expression during murine vascular development." Blood **96**(9): 3078-85.
- Keenan, C. and D. Kelleher (1998). "Protein kinase C and the cytoskeleton." Cell Signal **10**(4): 225-32.
- Khasar, S. G., Y. H. Lin, et al. (1999). "A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice." Neuron **24**(1): 253-60.
- Kikkawa, U., H. Matsuzaki, et al. (2002). "Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions." J Biochem (Tokyo) **132**(6): 831-9.
- Klauck, T. M., M. C. Faux, et al. (1996). "Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein." Science **271**(5255): 1589-92.
- Klock, J. (2000). Funktionelle Charakterisierung von Protein Kinase C-Delta durch *gene targeting* in der Maus. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Köln, Universität Köln.
- Kotch, L. E., N. V. Iyer, et al. (1999). "Defective vascularization of HIF-1 alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death." Dev Biol **209**(2): 254-67.
- Krakauer, D. C. and M. A. Nowak (1999). "Evolutionary preservation of redundant duplicated genes." Semin Cell Dev Biol **10**(5): 555-9.
- Krebs, L. T., Y. Xue, et al. (2000). "Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice." Genes Dev **14**(11): 1343-52.
- Kuo, C. T., M. L. Veselits, et al. (1997). "The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis." Genes Dev **11**(22): 2996-3006.
- Kwan, C. P., G. Venkataraman, et al. (2001). "Probing fibroblast growth factor dimerization and role of heparin-like glycosaminoglycans in modulating dimerization and signaling." J Biol Chem **276**(26): 23421-9.
- Lampugnani, M. G., M. Resnati, et al. (1992). "A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts." J Cell Biol **118**(6): 1511-22.
- Larsson, J., M. J. Goumans, et al. (2001). "Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice." Embo J **20**(7): 1663-73.
- Leitges, M. Generierung einer PKC-Epsilon-defizienten Mauslinie.

- Leitges, M., W. Elis, et al. (2001). "Rottlerin-independent attenuation of pervanadate-induced tyrosine phosphorylation events by protein kinase C-delta in hemopoietic cells." Lab Invest **81**(8): 1087-95.
- Leitges, M., K. Gimborn, et al. (2002). "Protein kinase C-delta is a negative regulator of antigen-induced mast cell degranulation." Mol Cell Biol **22**(12): 3970-80.
- Leitges, M., M. Plomann, et al. (2002). "Knockout of PKC alpha enhances insulin signaling through PI3K." Mol Endocrinol **16**(4): 847-58.
- Leitges, M., C. Schmedt, et al. (1996). "Immunodeficiency in protein kinase cbeta-deficient mice." Science **273**(5276): 788-91.
- Lelievre, E., F. Lionneton, et al. (2002). "Ets-1 regulates fli-1 expression in endothelial cells. Identification of ETS binding sites in the fli-1 gene promoter." J Biol Chem **277**(28): 25143-51.
- Lelievre, E., F. Lionneton, et al. (2001). "The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis." Int J Biochem Cell Biol **33**(4): 391-407.
- Lelievre, E., V. Mattot, et al. (2000). "ETS1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin." Oncogene **19**(20): 2438-46.
- Li, D. Y., L. K. Sorensen, et al. (1999). "Defective angiogenesis in mice lacking endoglin." Science **284**(5419): 1534-7.
- Lindahl, P., M. Hellstrom, et al. (1998). "Endothelial-perivascular cell signaling in vascular development: lessons from knockout mice." Curr Opin Lipidol **9**(5): 407-11.
- Lowell, C. A., M. Niwa, et al. (1996). "Deficiency of the Hck and Src tyrosine kinases results in extreme levels of extramedullary hematopoiesis." Blood **87**(5): 1780-92.
- Maisonpierre, P. C., C. Suri, et al. (1997). "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis." Science **277**(5322): 55-60.
- Martin, P., A. Duran, et al. (2002). "Role of zeta PKC in B-cell signaling and function." Embo J **21**(15): 4049-57.
- Matsumoto, T., I. Turesson, et al. (2002). "p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis." J Cell Biol **156**(1): 149-60.
- Mecklenbrauker, I., K. Saijo, et al. (2002). "Protein kinase Cdelta controls self-antigen-induced B-cell tolerance." Nature **416**(6883): 860-5.
- Miller, D. L., S. Ortega, et al. (2000). "Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice." Mol Cell Biol **20**(6): 2260-8.
- Miller, L. D., K. C. Lee, et al. (2004). "RACK1 regulates Src-mediated Sam68 and p190RhoGAP signaling." Oncogene **23**(33): 5682-6.
- Miyamoto, A., K. Nakayama, et al. (2002). "Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cdelta." Nature **416**(6883): 865-9.
- Mochly-Rosen, D. (1995). "Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction." Science **268**(5208): 247-51.

- Moiseeva, E. P. (2001). "Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions." Cardiovasc Res **52**(3): 372-86.
- Mumm, J. S. and R. Kopan (2000). "Notch signaling: from the outside in." Dev Biol **228**(2): 151-65.
- Murakami, M., A. Horowitz, et al. (2002). "Protein kinase C (PKC) delta regulates PKCalpha activity in a Syndecan-4-dependent manner." J Biol Chem **277**(23): 20367-71.
- Nakagawa, O., D. G. McFadden, et al. (2000). "Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13655-60.
- Navarro, P., L. Ruco, et al. (1998). "Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization." J Cell Biol **140**(6): 1475-84.
- Neel, B. G. (1993). "Structure and function of SH2-domain containing tyrosine phosphatases." Semin Cell Biol **4**(6): 419-32.
- Neufeld, G., T. Cohen, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." Faseb J **13**(1): 9-22.
- Neufeld, G., O. Kessler, et al. (2002). "The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF." Adv Exp Med Biol **515**: 81-90.
- Newton, A. C. (2001). "Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions." Chem Rev **101**(8): 2353-64.
- Newton, A. C. (2003). "Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm." Biochem J **370**(Pt 2): 361-71.
- Niino, Y. S., T. Irie, et al. (2001). "PKCtheta II, a New Isoform of Protein Kinase C Specifically Expressed in the Seminiferous Tubules of Mouse Testis." J. Biol. Chem. **276**(39): 36711-36717.
- Nowak, M. A., M. C. Boerlijst, et al. (1997). "Evolution of genetic redundancy." Nature **388**(6638): 167-71.
- Oettgen, P. (2001). "Transcriptional regulation of vascular development." Circ Res **89**(5): 380-8.
- Oh, S. P., T. Seki, et al. (2000). "Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2626-31.
- Ono, Y., U. Kikkawa, et al. (1987). "Expression and properties of two types of protein kinase C: alternative splicing from a single gene." Science **236**(4805): 1116-20.
- Ono, Y., T. Kurokawa, et al. (1986). "Two types of complementary DNAs of rat brain protein kinase C. Heterogeneity determined by alternative splicing." FEBS Lett **206**(2): 347-52.
- Ornitz, D. M. and N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." Genome Biol **2**(3): REVIEWS3005.
- Parker, P. J. and J. Murray-Rust (2004). "PKC at a glance." J Cell Sci **117**(Pt 2): 131-2.

- Petrova, T. V., T. Makinen, et al. (1999). "Signaling via vascular endothelial growth factor receptors." Exp Cell Res **253**(1): 117-30.
- Philipp, M., M. E. Brede, et al. (2002). "Placental alpha(2)-adrenoceptors control vascular development at the interface between mother and embryo." Nat Genet **31**(3): 311-5.
- Poole, T. J. and J. D. Coffin (1989). "Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern." J Exp Zool **251**(2): 224-31.
- Poole, T. J., E. B. Finkelstein, et al. (2001). "The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development." Dev Dyn **220**(1): 1-17.
- Puri, M. C., J. Rossant, et al. (1995). "The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells." Embo J **14**(23): 5884-91.
- Quek, L. S., J. M. Pasquet, et al. (2000). "Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway." Blood **96**(13): 4246-53.
- Radice, G. L., H. Rayburn, et al. (1997). "Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin." Dev Biol **181**(1): 64-78.
- Redling, S., I. L. Pfaff, et al. (2004). "Immunolocalization of Protein Kinase C Isoenzymes alpha, beta I, beta II, delta and epsilon in Mouse Kidney." Am J Physiol Renal Physiol.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-4.
- Risau, W. and I. Flamme (1995). "Vasculogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 73-91.
- Risau, W., H. Sariola, et al. (1988). "Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies." Development **102**(3): 471-8.
- Robinson, C. J. and S. E. Stringer (2001). "The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors." J Cell Sci **114**(Pt 5): 853-65.
- Rockow, S., J. Tang, et al. (1996). "Nck inhibits NGF and basic FGF induced PC12 cell differentiation via mitogen-activated protein kinase-independent pathway." Oncogene **12**(11): 2351-9.
- Roman, B. B., D. L. Geenen, et al. (2001). "PKC-beta is not necessary for cardiac hypertrophy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(5): H2264-70.
- Ron, D. and D. Mochly-Rosen (1995). "An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudoanchoring site." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(2): 492-6.
- Rosdahl, J. A., T. L. Mourton, et al. (2002). "Protein kinase C delta (PKCdelta) is required for protein tyrosine phosphatase mu (PTPmu)-dependent neurite outgrowth." Mol Cell Neurosci **19**(2): 292-306.
- Rossant, J. and L. Howard (2002). "Signaling pathways in vascular development." Annu Rev Cell Dev Biol **18**: 541-73.
- Rousseau, B., F. Larrieu-Lahargue, et al. (2003). "Involvement of fibroblast growth factors in choroidal angiogenesis and retinal vascularization." Exp Eye Res **77**(2): 147-56.

- Rybin, V. O., A. Sabri, et al. (2003). "Cross-regulation of novel protein kinase C (PKC) isoform function in cardiomyocytes. Role of PKC epsilon in activation loop phosphorylations and PKC delta in hydrophobic motif phosphorylations." *J Biol Chem* **278**(16): 14555-64.
- Ryves, W. J., A. T. Evans, et al. (1991). "Activation of the PKC-isotypes alpha, beta 1, gamma, delta and epsilon by phorbol esters of different biological activities." *FEBS Lett* **288**(1-2): 5-9.
- Sakurai, Y., Y. Onishi, et al. (2001). "Novel protein kinase C delta isoform insensitive to caspase-3." *Biol Pharm Bull* **24**(9): 973-7.
- Sato, T. N., Y. Tozawa, et al. (1995). "Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation." *Nature* **376**(6535): 70-4.
- Schechtman, D. and D. Mochly-Rosen (2001). "Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction." *Oncogene* **20**(44): 6339-47.
- Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." *Cell* **103**(2): 211-25.
- School of Anatomy and Human Biology - The University-of-Western-Australia, U. Blue Histology. **2004**.
- Schreiber, K. L., L. Paquet, et al. (2001). "Protein kinase C isoform expression and activity in the mouse heart." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(5): H2062-2071.
- Seghezzi, G., S. Patel, et al. (1998). "Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis." *J Cell Biol* **141**(7): 1659-73.
- Shalaby, F., J. Ho, et al. (1997). "A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis." *Cell* **89**(6): 981-90.
- Shalaby, F., J. Rossant, et al. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." *Nature* **376**(6535): 62-6.
- Shawber, C. J. and J. Kitajewski (2004). "Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man." *Bioessays* **26**(3): 225-34.
- Solloway, M. J. and E. J. Robertson (1999). "Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup." *Development* **126**(8): 1753-68.
- Spyropoulos, D. D., P. N. Pharr, et al. (2000). "Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor." *Mol Cell Biol* **20**(15): 5643-52.
- Sumi, Y., H. Muramatsu, et al. (2002). "Midkine, a heparin-binding growth factor, promotes growth and glycosaminoglycan synthesis of endothelial cells through its action on smooth muscle cells in an artificial blood vessel model." *J Cell Sci* **115**(Pt 13): 2659-67.
- Suri, C., P. F. Jones, et al. (1996). "Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis." *Cell* **87**(7): 1171-80.
- Tabuse, Y., Y. Izumi, et al. (1998). "Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*." *Development* **125**(18): 3607-14.

- Takahashi, M., H. Mukai, et al. (2000). "Association of immature hypophosphorylated protein kinase cepsilon with an anchoring protein CG-NAP." *J Biol Chem* **275**(44): 34592-6.
- Takahashi, T., H. Ueno, et al. (1999). "VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells." *Oncogene* **18**(13): 2221-30.
- Takahashi, T., S. Yamaguchi, et al. (2001). "A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells." *Embo J* **20**(11): 2768-78.
- Takashima, S., M. Kitakaze, et al. (2002). "Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3657-62.
- Taylor, L. M. and L. M. Khachigian (2000). "Induction of platelet-derived growth factor B-chain expression by transforming growth factor-beta involves transactivation by Smads." *J Biol Chem* **275**(22): 16709-16.
- Thurston, G. (2003). "Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis." *Cell Tissue Res* **314**(1): 61-8.
- Torres-Vazquez, J., M. Kamei, et al. (2003). "Molecular distinction between arteries and veins." *Cell Tissue Res* **314**(1): 43-59.
- Ueyama, T., Y. Ren, et al. (2000). "cDNA cloning of an alternative splicing variant of protein kinase C delta (PKC deltaIII), a new truncated form of PKCdelta, in rats." *Biochem Biophys Res Commun* **269**(2): 557-63.
- Urness, L. D., L. K. Sorensen, et al. (2000). "Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1." *Nat Genet* **26**(3): 328-31.
- Valter, M. M., A. Hugel, et al. (1999). "Expression of the Ets-1 Transcription Factor in Human Astrocytomas Is Associated with Fms-like Tyrosine Kinase-1 (Flt-1)/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Synthesis and Neoangiogenesis." *Cancer Res* **59**(21): 5608-5614.
- Wakiya, K., A. Begue, et al. (1996). "A cAMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene." *J Biol Chem* **271**(48): 30823-8.
- Wang, H. U., Z. F. Chen, et al. (1998). "Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4." *Cell* **93**(5): 741-53.
- Wang, Y., P. N. Schnegelsberg, et al. (1996). "Functional redundancy of the muscle-specific transcription factors Myf5 and myogenin." *Nature* **379**(6568): 823-5.
- Warner, A. J., J. Lopez-Dee, et al. (2000). "The Shc-related adaptor protein, Sck, forms a complex with the vascular-endothelial-growth-factor receptor KDR in transfected cells." *Biochem J* **347**(Pt 2): 501-9.
- Weinstein, B. M., D. L. Stemple, et al. (1995). "Gridlock, a localized heritable vascular patterning defect in the zebrafish." *Nat Med* **1**(11): 1143-7.
- Wernert, N., A. Stanjek, et al. (1999). "Inhibition of Angiogenesis In Vivo by ets-1 Antisense Oligonucleotides-Inhibition of Ets-1 Transcription Factor

- Expression by the Antibiotic Fumagillin." Angew Chem Int Ed Engl **38**(21): 3228-3231.
- Wheelock, M. J. and K. R. Johnson (2003). "Cadherins as modulators of cellular phenotype." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 207-35.
- Wilda, M., N. Ghaffari-Tabrizi, et al. (2001). "Protein kinase C isoenzyme: selective expression pattern of protein kinase C-[theta] during mouse development." Mechanisms of Development **103**(1-2): 197-200.
- Wilting, J., B. Christ, et al. (2003). "Cellular and molecular mechanisms of embryonic haemangiogenesis and lymphangiogenesis." Naturwissenschaften **90**(10): 433-48.
- Wrana, J. L. (1998). "TGF-beta receptors and signalling mechanisms." Miner Electrolyte Metab **24**(2-3): 120-30.
- Wu, L. W., L. D. Mayo, et al. (2000). "Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation." J Biol Chem **275**(7): 5096-103.
- Wu, L. W., L. D. Mayo, et al. (2000). "VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor." J Biol Chem **275**(9): 6059-62.
- Xu, Q. and D. G. Wilkinson (1997). "Eph-related receptors and their ligands: mediators of contact dependent cell interactions." J Mol Med **75**(8): 576-86.
- Xue, Y., X. Gao, et al. (1999). "Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1." Hum Mol Genet **8**(5): 723-30.
- Yaffe, M. B., K. Rittinger, et al. (1997). "The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity." Cell **91**(7): 961-71.
- Yaka, R., K. Phamluong, et al. (2003). "Scaffolding of Fyn kinase to the NMDA receptor determines brain region sensitivity to ethanol." J Neurosci **23**(9): 3623-32.
- Yancopoulos, G. D., S. Davis, et al. (2000). "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." Nature **407**(6801): 242-8.
- Yang, X., L. H. Castilla, et al. (1999). "Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5." Development **126**(8): 1571-80.
- Yasue, T., H. Nishizumi, et al. (1997). "A critical role of Lyn and Fyn for B cell responses to CD38 ligation and interleukin 5." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10307-12.
- Zaffran, S. and M. Frasch (2002). "Early signals in cardiac development." Circ Res **91**(6): 457-69.
- Zhang, N. and T. F. Deuel (1999). "Pleiotrophin and midkine, a family of mitogenic and angiogenic heparin-binding growth and differentiation factors." Curr Opin Hematol **6**(1): 44-50.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben:

- Name: Frank Sacher
- Geburtstag: 20.11.1974
- Geburtsort: Hannover
- Adresse: Quirre Straße 1, 30451 Hannover
- Kontakt: Email, frank.sacher@mpihan.mpg.de; Tel, 0511/5334979

Ausbildung:

Juni 1994	Erhalt der allgemeinen Hochschulreife Albert-Einstein-Schule, Laatzen
Juli 1994- Oktober 1995	Zivildienst Agnes Karl Krankenhaus, Laatzen
Oktober 1995- Juni 2001	Studium im Fachbereich Biologie Universität Hannover
September 1998- Juni 1999	Auslandsstudium (DAAD) Northeastern University, Boston, MA, USA
Juli 2000- März 2001	Diplomarbeit Massachusetts Institute of Technology Boston, MA, USA
3.Juli 2001	Erhalt des Hochschulgrades “ Diplom-Biologe“ Universität Hannover
Juli 2001- bis dato	Promotionsstudiengang im Fachbereich Biologie Universität Hannover
April 2001- November 2004	Anfertigung der Promotionsarbeit Max Planck Institut Hannover, AG Leitges, Abteilung Prof. Dr. Gregor Eichele

PUBLIKATIONSLISTE

Veröffentlichungen

Newmark JA, **Sacher F**, Jones GS, Warner CM.

Ped gene deletion polymorphism frequency in wild mice

J Exp Zool. 2002 Jul 1;293(2):179-85

Danilova N, Hohman VS, **Sacher F**, Ota T, Willett CE, Steiner LA.

T cells and the thymus in developing zebrafish

Dev Comp Immunol. 2004 Jun;28(7-8):755-67

Sacher F and Leitges M

Expression of PKC ϵ during mid-gestation

In Vorbereitung

Sacher F, Brandes G, Leitges M

Developmental defects in mouse embryos lacking protein kinase C (δ/ϵ)

In Vorbereitung

Konferenzbeiträge

Sacher F and Leitges M

Characterization of the PKC ϵ/δ Double-Knockout

Presentation and Abstract, GfE school 2002, Ulm

Sacher F, Brandes G, Leitges M

The protein kinase c (δ/ϵ) double knockout and its implication in mouse embryonic developemnt

Mouse Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, 2004 Sep 1-5, Poster and Abstract (Page 151)

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe. Ich habe die Dissertation nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Arbeit verwendet und, abgesehen von den angegebenen Teilveröffentlichungen, nicht zuvor publiziert.

Hannover, 5.11.2004

(Frank Sacher)