

Angiogenese-Modellsysteme zur Funktionsanalyse des humanen CCM3-Proteins

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von

Elisa Schleider

aus Nürnberg

Würzburg 2010

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender:

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. med. Ute Felbor

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. med. Ricardo Benavente

Drittgutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brand

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am

Für meine Schwester

Inhaltsverzeichnis:

SUMMARY	2
ZUSAMMENFASSUNG	3
1. EINLEITUNG	4
1.1 Eigenschaften Zerebraler Kavernöser Gefäßmalformationen (CCMs)	4
1.2 Mausmodelle	6
1.3 Zebrafischmodelle	7
1.4 Angiogenese <i>in vitro</i> Zellkultursysteme	8
1.4.1 Migration	9
1.4.2 Proliferation	10
1.4.3 Tube Formation (Morphogenese).....	11
1.5 PamChip Kinase Profiling.....	11
1.6 Apoptose Assays	13
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	15
2. ERGEBNISSE	16
2.1 CCM3 bildet zusammen mit CCM1 und CCM2 einen ternären Komplex (Stahl et al., 2008)..	16
2.2 Der <i>Knock-down</i> von CCM3 führt zu einem kardiovaskulären Phänotyp im Zebrafisch (Voss et al., 2009)	16
2.3 CCM3 reguliert die Migration, Proliferation und Tube Formation von Endothelzellen <i>in vitro</i> und moduliert den PDPK-1/Akt1 Signalweg (Schleider et al., 2010)	17
3. DISKUSSION	21
4. LITERATUR	30
Curriculum Vitae	37
Erklärung	40
Danksagung.....	41
Publikationen (Anlagen 1-3)	

Summary

Cerebral cavernous malformations are slow-flow vascular lesions, mainly located in the brain. They consist of blood-filled dilated capillary-like vessels without brain parenchyma or mural cells. Clinical symptoms include intense headaches, epilepsy and stroke. However, about 40% of lesion carriers live without any symptoms throughout their lives due to incomplete penetrance. The disease prevalence is 0.5% in the population. Sporadic as well as autosomal-dominantly inherited familial forms exist. In recent years, 3 disease-related genes have been identified. Mutations within *CCM1*, *CCM2* or *CCM3* lead to indistinguishable clinical phenotypes. All three proteins form a ternary complex *in vitro*, confirming their participation in one main signaling pathway. While *CCM1* and *CCM2* have been explored to a great extent over the past years, little is known about *CCM3* and its function so far. In this study, we show that *CCM3* plays an important role in angiogenesis. Upon overexpression it has strong negative effects in endothelial cells. The ability to migrate, proliferate and to form capillary-like structures in matrix gels is significantly impaired. *Knock-down* experiments with siRNA against *CCM3* did not reveal such distinct effects. Only the ability to form capillary-like structures was elevated. To identify signaling pathways modulated by *CCM3*, tyrosine kinase arrays were conducted. Lysates from HUVECs overexpressing *CCM3* were compared with control lysates. Five substrates revealed significantly increased phosphorylation: the discoidin domain receptor 1 (DDR1), the dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A), the proto-oncogene tyrosine-protein kinase FER (FER), the fyn-related kinase (FRK) and the Phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). The candidate 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 is an important upstream activator of the serine-threonine kinase Akt/PKB. Subsequent experiments confirmed and demonstrated that p-PDK-1 and p-Akt are activated in lysates overexpressing *CCM3*. In agreement with the fact that Akt is important for cell survival, we could finally show that *CCM3* is both antiangiogenic and antiapoptotic. Our data suggest that *CCM3* plays a role in maintaining quiescence of adult vascular endothelial cells.

Zusammenfassung

Zerebrovaskuläre kavernöse Malformationen (CCM) sind Blutgefäßfehlbildungen, welche hauptsächlich im Gehirn vorkommen. Sie sind gekennzeichnet durch stark dilatierte kapillarähnliche Gefäße mit niedriger Flussrate („*slow-flow lesions*“). Intervenierendes Gehirnparenchym fehlt ebenso wie Perizyten oder glatte Gefäßmuskelzellen. Die klinischen Symptome reichen von starken Kopfschmerzen über Epilepsie bis hin zum Schlaganfall. Dennoch bleiben viele Kavernomträger aufgrund unvollständiger Penetranz ihr Leben lang asymptomatisch. Die Prävalenz beträgt ca. 0,5% in der Gesamtbevölkerung. Es gibt sowohl sporadische als auch dominant vererbte Krankheitsformen. In den letzten Jahren konnten 3 Gene ursächlich mit der Krankheit in Verbindung gebracht werden. Mutationen in *CCM1*, *CCM2* oder *CCM3* führen zu einem nicht unterscheidbaren klinischen Phänotyp. Alle drei Proteine bilden einen ternären Komplex *in vitro*, was eine Beteiligung an einem gemeinsamen molekularen Signalweg bekräftigt. Während die Proteine *CCM1* und *CCM2* in den letzten Jahren umfangreich erforscht wurden, ist über das *CCM3*-Protein bis heute wenig bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *CCM3* eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielt und diese bei Überexpression in humanen Endothelzellen stark negativ reguliert: die Migration, die Proliferation und die Fähigkeit, kapillarähnliche Strukturen in Matrix-Gelen zu bilden kommt nahezu zum Erliegen. Ein gegenläufiger Effekt nach siRNA induziertem *Knock-down* von *CCM3* war weniger stark ausgeprägt. Einzig die Fähigkeit, gefäßähnliche Strukturen in Matrigelen zu bilden, war erhöht. Um weiterhin Klarheit über die intrazellulären, von *CCM3* beeinflussten Signalwege zu schaffen, wurden Tyrosin Kinase Arrays durchgeführt, bei welchen *CCM3*-überexprimierende HUVEC Lysate mit Kontrolllysaten verglichen wurden. Dabei stellte sich heraus, dass 5 Substrate signifikant erhöht phosphoryliert wurden: der Discoidin Domänen Rezeptor 1 (discoidin domain receptor; DDR1), die duale spezifitätstyrosinphosphorylierungsregulierte Kinase 1A (dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A; DYR1A), die Protoonkogen Tyrosin-Protein Kinase FER (proto-oncogene tyrosine-protein kinase FER; FER), die fynbezogene Kinase (Fyn-related kinase; FRK) und die phosphoinositolabhängige Kinase 1 (Phosphoinositide-dependent kinase 1, PDPK-1). Im Folgenden bestätigten Western Blot, dass die Überexpression von *CCM3* in Endothelzellen die phosphoinositolabhängige Kinase 1 und die nachgeschaltete Serin-Threonin Kinase Akt/PBK aktiviert, welche ein bedeutsames Überlebenssignal der Zelle darstellt. Schließlich konnte gezeigt werden, dass *CCM3* nicht nur antiangiogen, sondern auch antiapoptotisch wirkt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass *CCM3* für die Integrität des ruhenden, adulten Endothelbettes wichtig ist.

1. Einleitung

1.1 Eigenschaften Zerebraler Kavernöser Gefäßmalformationen (CCMs)

Zerebrale kavernöse Gefäßmalformationen (kavernöse Angiome oder Kavernome, CCMs; cerebral cavernous malformations, OMIM 11680, 603284, 603285) gehören neben den arteriovenösen Malformationen zu den häufigsten vaskulären Fehlbildungen des Gehirns (Leblanc et al., 2009). Sie sind auf Fehlern in der normalen Reifung der Gefäße in der Embryonalphase zurückzuführen und damit angeboren und keine Neoplasien. Seit ihrer Erstbeschreibung durch Luschka im Jahre 1854 veränderte sich ihre pathologische Definition mehrmals (Luschka, 1854). Histologisch sind sie heute durch abnorm erweiterte kapillarähnliche Strukturen definiert, denen sowohl normale Blut-Hirn-Schranke Komponenten und intervenierendes Gehirnparenchym als auch murale Zellen fehlen. Die *tight junctions* zwischen den Endothelzellen sind abnorm oder fehlen gänzlich (Bertalanffy et al., 2002; Clatterbuck et al., 2001; Revencu et al., 2006).

Die Prävalenz der CCMs wird zwischen 0,1 und 0,5% vermutet (Labauge et al., 2007). Neben einer sporadischen gibt es auch eine familiäre, autosomal-dominant vererbte Form, deren Häufigkeit zwischen 1:2000 und 1:10000 liegt (Bergametti et al., 2005). Sie wurde erstmals 1928 durch Hugo Friedrich Kufs als „heredofamiliäre Angiomatose des Gehirns“ beschrieben (Kufs, 1928). Die klinische Prävalenz ist jedoch wesentlich geringer, da die Krankheit eine klinische Penetranz von 60% und variable inter- und intrafamiliäre Expressivität aufweist (Denier et al., 2006). Symptomatische Personen leiden unter fokalen neurologischen Defiziten, Krampfanfällen und rezidivierenden Kopfschmerzen (Labauge et al., 2007). Kavernome werden durch Magnetresonanztomographie (MRT) diagnostiziert, da sie aufgrund des langsamen Blutflusses angiographisch nicht nachweisbar sind (Ahlhelm et al., 2007). Nach wiederholten Einblutungen in das Gehirn oder dem Auftreten einer therapierefraktären Epilepsie ist eine Resektion abhängig von der Lage der Läsion häufig das Mittel der Wahl. Obwohl auch Strahlentherapien als Behandlungsform beschrieben sind, werden sie aufgrund verschiedener unerwünschter Nebenwirkungen und ungenügender Wirksamkeit nicht empfohlen. Zusätzlich wurden auch Kavernome beschrieben, welche erst durch Strahlentherapien anderer Indikationen neu aufgetreten sind (Bertalanffy et al., 2002). Die Läsionen, welche bei familiären Formen vorwiegend multipel und bei sporadischen Formen singulär in Erscheinung treten (Labauge et al., 2007), werden meist zwischen der 2. und 4. Lebensdekade symptomatisch. Dennoch sind auch teils schwere Verlaufsformen im Kleinkindalter bekannt (Surucu et al., 2006).

Innerhalb der letzten 10 Jahre konnten drei CCM-assoziierte Gene identifiziert werden: *CCM1/KRIT1* auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q21-q22) (Laberge-le Couteux et al., 1999; Sahoo et al., 1999), *CCM2/MGC4607* auf dem kurzen Arm von Chromosom 7 (7p15-

p13) (Denier et al., 2004) und *CCM3/PDCD10* auf dem langen Arm von Chromosom 3 (3q25.2-q27) (Bergametti et al., 2005). In allen drei Genen konnten zahlreiche Nonsense-, Frameshift- und Splicemutationen neben den seltener vorkommenden Missensemutationen gefunden werden (Labauge et al., 2007). Ferner wurden auch komplette Gendelektionen für alle drei *CCM*-Gene beschrieben (Bergametti et al., 2005; Denier et al., 2004; Gaetzner et al., 2007; Liquori et al., 2007; Liquori et al., 2008). Bei den Mutationen in den *CCM*-Genen handelt es sich demnach um *loss-of-function* Mutationen.

Es konnte gezeigt werden, dass somatische *second-hit* Mutationen in allen drei Genen mit den Läsionen assoziiert sind (Akers et al., 2009; Gault et al., 2009) und dass kavernöse Endothelzellen immunnegativ für das jeweilige in der Keimbahn schon betroffene Gen und sein Produkt sind (Pagenstecher et al., 2009). Die Zweischrinaktivierung nach Knudson (Knudson, 1971), welche vor allem bei Tumorsuppressorgenen bekannt ist, spielt bei der Pathogenese von CCMs folglich ebenfalls eine Rolle. Schließlich konnte mittlerweile mehrfach bewiesen werden, dass Endothelzellen, und nicht wie lange Zeit vermutet neurales Gewebe, autonom für die Entwicklung der Krankheit verantwortlich sind (Boulday et al., 2009; Hogan et al., 2008; Pagenstecher et al., 2009; Whitehead et al., 2009).

CCM1 kodiert für ein zytoplasmatisches Protein mit 84 kDa, welches für die Formierung und die Integrität von Zell-Zell Kontakten wichtig ist. Als Interaktionspartner von ICAP1- α (Integrin-cytoplasmic-associated-protein 1- α) scheint es auch die Zellproliferation, -adhäsion, -migration und -morphologie zu modulieren (Zawistowski et al., 2002). Das Genprodukt von *CCM2* ist ca. 50 kDa groß und wie alle anderen *CCM*-Proteine ubiquitär exprimiert. In Fibroblasten wurde beobachtet, dass das murine Ortholog von *CCM2* OSM (osmosensing scaffold for MEKK3) eine Rolle bei der Antwort auf osmotischen Schock spielt. Dabei fungiert es als Gerüstprotein für die Aktivierung des p38 MAPK Signalweges, welcher bei der Modulierung von extrazellulärem Stress wichtig ist (Uhlik et al., 2003). Bei humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass der durch siRNA vermittelte *Knock-down* von *CCM2* zu einem Verlust von kortikalem Aktin, einer Erhöhung von Stressfasern und einer verminderten Endothelzellbarriere führt. Bei humanen Nabelschnur-Venenendothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) führte derselbe *Knock-down* zwar zu einer verbesserten Sprossung und Migration der Zellen, dennoch war die Lumenbildung beeinträchtigt (Whitehead et al., 2009). Andererseits wurde in humanen Gehirnendothelzellen gezeigt, dass ein Verlust von *CCM2* zu einer verminderten Fähigkeit zu migrieren und gefäßähnliche Röhren in einer zweidimensionalen Matrix zu bilden führt (Croese et al., 2009).

Über *CCM3* ist bislang am wenigsten bekannt. Obwohl es mittlerweile ein oft zitiertes Molekül in Publikationen und Datenbanken ist, fehlt eine genaue Funktionsbeschreibung des hoch konservierten Proteins bis heute. Das ca. 25 kDa große *CCM3*-Protein besitzt keine

bisher bekannten Domänen. Ursprünglich wurde es hochreguliert in einer humanen apoptotischen prämyeloischen Zelllinie entdeckt (Wang et al., 1999). Auch eine weitere Studie vermutete eine mögliche Apoptose-induzierende Rolle (Chen et al., 2009). Andererseits wurde beobachtet, dass CCM3 die Proliferation und Transformation einer humanen Prostatakrebszelllinie fördert, indem es den ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase) Signalweg moduliert (Ma et al., 2007). CCM3 wird *in vitro* von der Serin/Threonin Kinase 25 (STK25) phosphoryliert und von der Phosphatase FAP1 (Fas-associated phosphatase-1) dephosphoryliert. Beide wurden in einem *Yeast-Two-Hybrid* Screen als Interaktionspartner von CCM3 gefunden und später durch Immunpräzipitationen und *Pull-Down* Assays bestätigt (Voss et al., 2007). Auch MST4 (serine/threonine protein kinase MST4) konnte als CCM3 Bindungspartner gefunden werden (Ma et al., 2007). Sowohl STK25 als auch MST4 sind bei der Modulation von Apoptose und Migration beteiligt, könnten aber gegenteilige Effekte haben (Preisinger et al., 2004). Ob diese Interaktionen eine Relevanz *in vivo* haben, konnte bisher nicht bestätigt werden.

1.2 Mausmodelle

In den letzten Jahren wurden mehrere CCM1 und CCM2 Mausmodelle beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass homozygote *Ccm1 Knock-out* Mäuse bereits vor dem 11. embryonalen Entwicklungstag aufgrund von multiplen Entwicklungsarresten vor allem bei der Gefäßentwicklung versterben. Bereits ab dem 8. embryonalen Entwicklungstag sind dilatierte Gefäße erkennbar. Die neurale Entwicklung war nicht betroffen und verlief bis zum Absterben der Embryonen unauffällig. Weiterhin wurde vermutet, dass der Notch-Signalweg, welcher für die arterielle Identität verantwortlich ist, bei *CCM1* Mutationsträgern betroffen sein könnte. Der arterielle Marker Notch4 war in humanen Kavernomgeweben signifikant herunterreguliert. (Whitehead et al., 2004).

Eine andere Studie ergab, dass Mäuse, welche heterozygot für *Ccm1* sind und gleichzeitig einen *Knock-out* Hintergrund für das Tumorsuppressor Gen *Trp53* (*transformation related protein 53*) besitzen, zu über 50% Läsionen im Gehirn entwickeln. Dieser Studie lag die Annahme zugrunde, dass durch den *p53 Knock-out* Hintergrund die Rate an somatischen Mutationen wächst. Der Verlust der Heterozygotie konnte in den *Ccm1^{+/-}/p53^{-/-}*-Mäusen methodisch allerdings nicht bewiesen werden. Auch eine Beteiligung bei der Pathogenese von kavernösen Malformationen von *p53* selbst konnte nicht ausgeschlossen werden (Plummer et al., 2004).

Auch *Ccm2 Knock-out* Mäuse sind letal und versterben bereits zwischen dem embryonalen Entwicklungstag 9 und 10,5 aufgrund von Wachstumsarrest und defekter vaskulärer Entwicklung (Boulday et al., 2009; Kleaveland et al., 2009; Whitehead et al., 2009). Der Zeitpunkt des Todes stimmt mit dem Beginn der Angiogenese überein und verdeutlicht, dass

CCM2 für die vaskuläre Entwicklung essentiell ist. *In vivo* Ultraschallstudien konnten außerdem belegen, dass *CCM2*^{-/-} Embryonen nicht in der Lage sind, eine Blutzirkulation zu etablieren, obwohl die Herzentwicklung und -kontraktion nahezu normal abläuft (Whitehead et al., 2009). Bei genauerer Betrachtung fiel allerdings auf, dass die Herzen vergrößert waren und bluteten, obwohl die Proliferation der Endothelzellen nicht verändert war (Boulday et al., 2009).

Konditionale *CCM2* Mausmutanten wurden etabliert, um die gewebespezifische Funktion von *CCM2* endgültig zu belegen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *CCM2* einzig im Endothel und nicht, wie zuvor oftmals vermutet, im neuralen Gewebe oder in den glatten Gefäßmuskelzellen zu massiven Defekten in der Angiogenese und Embryonalentwicklung führt (Boulday et al., 2009; Whitehead et al., 2009). Ferner konnte dargestellt werden, dass die Expression des arteriellen Markers Ephrin B2 (*Efnb2*) bei Mutanten und Kontrollen keine Unterschiede aufwies. Außerdem war auffällig, dass die Rekrutierung von muralen Zellen in der dorsalen Aorta gestört war und diese dort kaum vorgefunden werden konnten (Boulday et al., 2009).

Zu Beginn dieser Arbeit gab es kein publiziertes *CCM3* Mausmodell. Dieses wurde jüngst von He et al. im April 2010 publiziert. Auf die Ergebnisse dieser Studie wird in der Diskussion näher eingegangen.

1.3 Zebrafischmodelle

Schon vor über 10 Jahren wurden bei genetischen Mutationsscreens Zebrafische entdeckt, welchen ein vergrößertes Herz und damit ein kardialer Phänotyp gemeinsam war (Chen et al., 1996; Stainier et al., 1996). Die Mutationen betrafen die Gene *santa*, *valentine* und *heart of glass* (*heg*). Später konnte gezeigt werden, dass *santa* das Zebrafisch Ortholog von *CCM1* und *valentine* das Ortholog von *CCM2* ist (Mably et al., 2006). Sowohl *santa* und *valentine* als auch *heg* Mutanten gelingt es nicht, eine Blutzirkulation zu etablieren, obwohl die Herzen kontrahieren können. Das Myokard ist nur einschichtig und es werden keine Endokardkissen gebildet. Außerdem ist die Zellmorphologie der Myokardzellen verändert, nicht aber deren Anzahl. Untersuchungen zeigten, dass das konzentrische Wachstum der Myokardzellen gestört war und diese nicht mehrschichtig, sondern ausgedehnt in einer einzigen Zellschicht innerhalb der Umrandung des ansonsten bis dahin normal entwickelten Herzens wuchsen (Mably et al., 2006). Es stellte sich heraus, dass *heg*, welches im Endokard exprimiert wird, als Signal für das konzentrische Wachstum des Myokards benötigt wird (Mably et al., 2003). Es wird angenommen, dass die reziproke Signalweitergebung zwischen Myokard und Endokard gestört ist und es dadurch zu einem vergrößerten Herzen kommt, dessen Ursache jenseits einer veränderten Zellzahl liegt. Obwohl der Phänotyp des Zebrafisch Mutanten *heg* identisch zu den *santa* und *valentine* Phänotypen ist (Mably et al.,

2006), konnte bislang kein Patient mit Mutationen im menschlichen Ortholog gefunden werden. *Heg-Knock-out* Mäuse sind embryonal letal, spiegeln aber nicht den *Ccm1*^{-/-} bzw. *Ccm2*^{-/-} Phänotyp wieder. Auf der anderen Seite ist eine heterozygote *Ccm2* Mutation neben einem *Heg Knock-out* ausreichend, um die *Ccm1* bzw. *Ccm2 Knock-out* Phänotypen zu etablieren (Kleaveland et al., 2009).

In späteren Studien konnte letzten Endes bewiesen werden, dass sowohl *santa/ccm1* als auch *valentine/ccm2* Mutanten neben einem vergrößerten Herzen stark erweiterte Gefäße besitzen (Hogan et al., 2008; Jin et al., 2007). Diese Gefäße zeichnen sich, ähnlich wie das vergrößerte Herz, durch eine veränderte Zellform aus. Dies ist nicht auf einen gestörten Zell-Zell Kontakt zurückzuführen und deutet eher auf eine der Endothelzelle selbst innewohnende Eigenschaft hin. Die Vermutung, dass die durch die *ccm1* Mutation hervorgerufenen Defekte Endothelzellautonom sind, konnte durch einen Transplantations-Assay bestätigt werden. Dabei waren transplantierte Wildtyp-Endothelzellen fähig zu elongieren, während die Endothelzellen der *ccm1* Empfängermutanten einen auffällig großen und runden Phänotyp aufwiesen (Hogan et al., 2008). Durch die Kreuzung von *santa* (*sar*²³⁴) Mutanten mit einer zweiten transgenen Zebrafischlinie, welche ein GFP (green fluorescent protein)-Reporter gen mit der endothelspezifischen Rezeptortyrosinkinase Tie2 (Tg(tie2:GFP)^{s849}) fusioniert hat, konnte gezeigt werden, dass deren Expressionsniveau deutlich erhöht ist. Dies deutet darauf hin, dass *santa* an der negativen Regulation von Endothel-spezifischen Markern oder Genen beteiligt ist (Jin et al., 2007).

Da die Morpholino-Koinjektion geringer Mengen an *santa* mit *valentine* ebenso wie auch die Koinjektion von *santa* bzw. *valentine* mit *heg* zur Ausprägung des kardialen CCM Phänotyps führen, wird von einem synergistischen Effekt und einem gemeinsamen molekularen Signalweg ausgegangen (Mably et al., 2006).

1.4 Angiogenese *in vitro* Zellkultursysteme

In den letzten 40 Jahren hat die Angiogeneseforschung enorm an Wichtigkeit gewonnen und ist auch in ihrem Umfang exponentiell gewachsen. Insgesamt sind über 50 verschiedene Erkrankungen, insbesondere Krebs, rheumatische Arthritis und Schuppenflechte durch eine pathologische Angiogenese gekennzeichnet. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Assays wurden entwickelt, um das Wissen über die Entstehung, Reifung und Aufrechterhaltung der Gefäße zu vertiefen und um geeignete Methoden zur Behandlung der damit assoziierten Krankheiten zu entwickeln (Staton et al., 2009).

Obwohl *in vivo* Assays den pathologischen Prozess der Angiogenese besser nachahmen können, haben *in vitro* Assays einige entscheidende Vorteile. Einzelne Schritte der Angiogenese können unabhängig voneinander betrachtet werden und auch einzelne Komponenten, wie beispielsweise Matrixbestandteile, können separat untersucht werden

(Goodwin, 2007). Außerdem sind *in vivo* Assays durch Faktoren wie Spezies und einzelne Organeigenschaften zusätzlich eingeschränkt (Staton et al., 2009). Schließlich erlauben *in vitro* Assays einfache genetische Manipulationen durch adenovirale Transduktion (Staton et al., 2009).

Für *in vitro* Assays werden vor allem Endothelzellen verwendet, welche den Hauptbestandteil neu gebildeter Gefäße ausmachen (Goodwin, 2007). Immortalisierte sekundäre humane Hautendothelzellen (human dermal microvascular endothelial cells, HMEC-1) zeigten nach mehreren Jahren teilweise Verluste ihrer funktionalen Eigenschaften und ihrer Responsivität auf angiogene Stimuli (Nisato et al., 2004) und sind deshalb nicht die erste Wahl. Primäre Endothelzellen werden bevorzugt, da sie einige Male passagiert werden können, ehe sie ihre physiologischen Eigenschaften und Fähigkeiten verlieren (Staton et al., 2009). Eine der am besten charakterisierten primären Endothelzellkulturen für Angiogenese *in vitro* Assays sind die humanen Nabelschnur-Venenendothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC). Diese Zellen sind einfach zu isolieren und seit 1973 erfolgreich in Gebrauch. Sie gehören damit zu den meistgenutzten Endothelzellen in der Gefäßforschung (Nakatsu et al., 2007). Der Prozess der Angiogenese umfasst hauptsächlich Migration, Proliferation und Morphogenese (Tube Formation) (Goodwin, 2007). Diese Schritte sollen im Folgenden gemeinsam mit deren jeweils zur Verfügung stehenden Assays vorgestellt werden.

1.4.1 Migration

Als ein einleitender Prozess der Angiogenese migrieren Endothelzellen als Antwort auf angiogene Stimuli in das umliegende Gewebe. Dabei kann die Chemokinese (ungerichtete Zellbewegung) von der Chemotaxis (gerichtete Zellbewegung) unterschieden werden (Goodwin, 2007).

In vitro sind neben „Wound Scrape“ und „under-agarose“ Assays die Transwell Assays die meistbenutzten Migrationsassays. Sie sind eine Weiterentwicklung der bereits 1962 beschriebenen „Boyden Chambers“, später auch „modified Boyden Chambers“ (Boyden, 1962). Bei diesen Assays werden die Zellen auf eine poröse Membran plattiert und eine den Wachstumsfaktor enthaltende Lösung wird auf die gegenüberliegende Seite in die entsprechende Well-Vertiefung gegeben. Um die Adhärenz der Zellen zu unterstützen, wird die Membran vorher mit einem Extrazellulärmatrixbestandteil wie beispielsweise Kollagen oder Fibronectin beschichtet. Die Porengröße variiert je nach verwendeter Zelllinie zwischen ca. 3 und 8 μm . Im Anschluss an die Migration werden alle nicht migrierten Zellen von der Membran abgewischt und die migrierten Zellen fixiert sowie angefärbt. Unter einem Lichtmikroskop können diese danach ausgezählt werden (Goodwin, 2007). Der Nachteil der Methode liegt in der Tatsache, dass sich der Gradient zwischen den Kammern mit der Zeit

normalisiert und der beobachtete Migrationseffekt eher einer Chemokinese als einer Chemotaxis zugeschrieben werden könnte (Goodwin, 2007; Staton et al., 2009).

1.4.2 Proliferation

Während des Prozesses der Migration sind die Endothelzellen auch stark proliferativ und die Überlebensrate wächst (Goodwin, 2007). Zur Untersuchung der Proliferation stehen einige *in vitro* Assays zur Verfügung, welche durch das Messen unterschiedlicher Parameter Rückschlüsse auf den Proliferationsstatus der Zelle liefern. Die einfachste Methode zur Beurteilung der Zellzahl ist das direkte Auszählen. Durch Anfärben mit Trypanblau kann außerdem die Vitalität der Zellen beurteilt werden. Da die Verdopplungsrate der Endothelzellen bei etwa 18-24 Stunden liegt, wird meist ein Vielfaches von 24 Stundenintervallen zur Auszählung benutzt (Staton et al., 2009). Durch die Messung von markierten Substanzen, welche während der DNA Synthese in den neu synthetisierten Strang interkalieren, kann die mitotische Zellteilung berechnet werden (Goodwin, 2007). Die [³H] Thymidininkorporation, welche durch einen Szintillator gemessen werden kann, ist direkt proportional zur vorangegangenen Zellteilung (Yu et al., 2004). Eine elegantere Methode, welche ohne Radioaktivität funktioniert, ist die Inkorporation von Bromdesoxyuridin (BrdU). Dieses Pyrimidin Analog kann nach der Inkubation der Zellen beispielsweise immunologisch mit einem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Assay gemessen werden. Die Ergebnisse sind mit denen der Thymidin Assays vergleichbar (Messele et al., 2000). Auch die metabolische Aktivität der Zellen kann zur Beurteilung ihres proliferativen und vitalen Status herangezogen werden. Der Stoffwechselumsatz von Tetrazoliumsätzen wie beispielsweise MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) oder WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) kann direkt proportional durch kolorimetrische Messungen erfasst und berechnet werden (Berridge et al., 2005). Eine weitere Methode untersucht die Expression des *PCNA*-Gens (*proliferating cell nuclear antigen*). Dessen Expression nimmt während der G₁-Phase zu, erreicht seinen Höhepunkt während der S-Phase und flacht während der G₂/M-Phase wieder ab (Staton et al., 2009). Schließlich ist es auch möglich, durch direkte Zellzyklus-Analysen Rückschlüsse auf die Proliferation zu ziehen. Nach einer BrdU Markierung werden die Zellen mit Propidiumiodid abgesättigt. Die Korrelation zwischen BrdU Gehalt und FACS-basierter Propidiumiodid Messung der Zellen führt zu einer allgemeinen Zellzyklusinformation (Gomez et al., 2003). Um das größtmögliche zuverlässige Ergebnis zu erzielen, bietet es sich an, mehrere Methoden parallel anzuwenden (Staton et al., 2009).

1.4.3 Tube Formation (Morphogenese)

Assays, welche die Entwicklung Kapillar-ähnlicher Strukturen untersuchen, werden repräsentativ für die späten Phasen der Angiogenese gesehen (Staton et al., 2009). Der grundlegende Tube Formation Assay, welcher nun seit über 20 Jahren erfolgreich als Standardmethode in der Angiogeneseforschung angewandt wird (Arnaoutova et al., 2009), beinhaltet das Ausplattieren von Endothelzellen auf oder in eine Gel-Matrix, welche aus verschiedenen Extrazellulärmatrixbestandteilen wie beispielsweise Kollagen oder Fibronectin besteht. Die am häufigsten verwendete Substanz ist das Matrigel, welches aus dem Engelbreth-Holm-Swarm Tumor von Mäusen gewonnen wird. Es besteht aus Extrazellulär- und Basalmembranproteinen. Auf Matrigel beginnen die Tubes innerhalb der ersten Stunde zu wachsen und erreichen ihren ausgereiften Zustand bereits nach 12 Stunden (Lawley et al., 1989). Da Matrigel einen hohen Anteil pro-angiogener Stimuli besitzt, besteht das Problem der Basal-Stimulation, welche mit zusätzlichen Wachstumsfaktoren meist nicht mehr übertroffen werden kann. Dafür wurde in den letzten Jahren „*Growth-factor-reduced* Matrigel“ entwickelt, welches zwar nicht völlig frei von Wachstumsfaktoren ist, eine Stimulierung durch angiogene Substanzen aber erlaubt (Donovan et al., 2001). Es muss allerdings beachtet werden, dass auch andere Zelllinien wie primäre Fibroblasten, die humane Prostata Krebszelllinie PC3 und die Glioblastom Zelllinie U87-MG Tube-ähnliche Strukturen auf Matrigel bilden können (Donovan et al., 2001). Um das Ausmaß der Tube Formation zu messen, können verschiedene Auswertungen zur Anwendung kommen. Die häufigsten umfassen das Messen der Tubelänge, der Anzahl der Tubes oder der geschlossenen Kreise, der Tubefläche oder das Auszählen der Knotenpunkte. Dabei können manuelle und computerbasierte Auswertungen zum Einsatz kommen. Eine weitere Methode zur Quantifizierung der späten Angiogenesedifferenzierung ist die Sandwichmethode, bei welcher Endothelzellen auf einer Kollagen Matrix ausgesät werden, darauf adhären dürfen und erst anschließend von einer zweiten Kollagenschicht bedeckt werden (Goodwin, 2007). Auch viele Kombinationen und Erweiterungen, beispielsweise in die 3D-Ebene, können zur Anwendung kommen (Staton et al., 2009).

1.5 PamChip Kinase Profiling

Über 20% des menschlichen Genoms kodiert für Proteine, welche bei der Signaltransduktion beteiligt sind. Darunter befinden sich mehr als 520 Kinasen und 130 Phosphatasen. Die Gruppe der Tyrosin-Kinasen umfasst etwa 90 bekannte Mitglieder, welche, wenn mutiert, vor allem als dominante Onkogene in Erscheinung treten. Sie werden eingeteilt in Rezeptortyrosin-Kinasen und zytoplasmatische Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinasen. Tyrosin Kinasen spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von Metazoen. Sie sind für die Zell-Zell-Signalweitergebung und die Transmembran-

Signaltransduktion von großer Bedeutung, einschließlich der Integrin vermittelten Zelladhäsion und der Zellzykluskontrolle (Blume-Jensen et al., 2001; Hunter, 2009). Aus diesem Grund ist es wichtig, die Mechanismen zu verstehen, die zur biologischen Funktion von Proteinen wie in diesem Fall Kinasen und einem bestimmten Phänotyp beitragen. Zunächst war das Feld der DNA-Microarrays populär und weit verbreitet. Es diente dazu die Expressionsmuster verschiedener Zellen oder Gewebe zu vergleichen. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass die Korrelation zwischen mRNA Level und tatsächlich translatiertem Protein nicht 1:1 entspricht und dass Proteinmodifikationen wie Phosphorylierungen nicht erfasst werden. Es wird angenommen, dass immerhin 30% aller zellulären Proteine gebundenes Phosphat besitzen (Graves et al., 2003). Deshalb hat sich ein breites Feld an „*Functional Proteomics*“ entwickelt, um Proteininteraktionen, -integrationen und -funktionen zu entschlüsseln. Diese Strategien verknüpfen Informationen des Proteoms mit biochemischen und physiologischen Analysen, um das Wissen über die Funktion von Proteinen in gesunden und kranken Organen aufzuklären (Ping, 2003). Zusätzlich stellen gerade Kinasen im Besonderen einen der Hauptziele der pharmakologischen Arzneimittelindustrie dar (Johnson, 2009) und sind deshalb auch für die alternative Behandlung von Kavernomen attraktiv.

In dieser Arbeit wurde der Ansatz verfolgt, das Profil CCM3 überexprimierender Endothelzellen mit dem von GFP-exprimierenden Kontrollzellen mittels des PamChip Tyrosin Kinase Arrays der Firma PamGene, Hertogenbosch, Niederlande zu vergleichen (Prinzip siehe Abbildung 1). Dieser Array besteht aus 144, auf einer porösen Aluminiumoxidmembran immobilisierten, 15 Aminosäuren langen Tyrosin-Kinase-Substraten. Die Lysate der zu untersuchenden Zellen werden in N₂ schockgefroren, um anschließend auf den PamChip Tyrosin Kinase Array aufgetragen zu werden. Dort wird die Probe unter Zugabe von ATP, welches als Phosphat-Donor dient, drei Mal durch die Membran auf- und abgepumpt, um diffusionsabhängige Phosphorylierungskinetiken zu vermeiden. Anschließend wird das gebundene Phosphat mittels eines Tyrosin-spezifischen Phospho-Antikörpers markiert, welcher wiederum fluoreszenzgekoppelt ist. Die Detektion erfolgt über eine CCD-Kamera auf einer PamStation[®]96 Plattform. Auf der gleichen Microarray Membran werden A431 Zelllysate als Standardkontrollen von der Firma mitgeführt. Jede Versuchsprobe wird in dreifacher, separater Ausführung hergestellt und getestet, außerdem werden aus jeder Probe jeweils vier technische Replikate erzeugt, um den Fehler zu verkleinern und die Aussagekraft des Arrays zu erhöhen. Um die hohe Aussagekraft des Arrays zu gewährleisten, wurde die studentsche T-Verteilung als statistisches Werkzeug angewandt. Der p-Wert ist bei allen positiven Kandidaten stets <0,05. Der Array erkennt folglich phosphorylierte Peptide als fluoreszierende Signalstärken, welche in einem linearen Bereich von 2,5 Größenordnungen liegen. Der Hintergrund wird von der erhaltenen Signalstärke

abgezogen. Als Hintergrund werden diejenigen Werte verwendet, welche bei einer regulären Messung, allerdings ohne Zugabe von ATP, gewonnen werden.

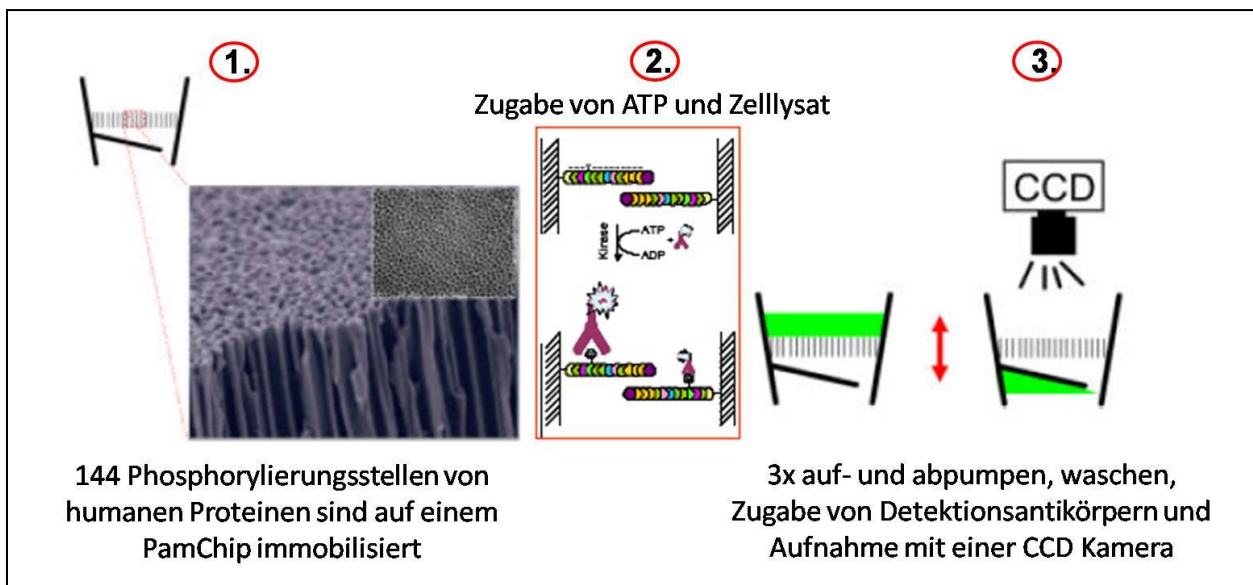


Abb. 1: Prinzip eines Kinase Profilings mittels des PamChips von PamGene, Hertogenbosch, Niederlande.

1.6 Apoptose Assays

Der Begriff Apoptose beschreibt den Prozess, bei welchem Zellen als Antwort auf intra- oder extrazelluläre Stimuli in einer energieabhängigen, geordneten Weise ihren eigenen Tod begehen. Im Gegensatz dazu steht die Nekrose, welche einen ungeordneten, pathologischen Untergang der jeweiligen Zelle darstellt (Kerr et al., 1972).

Grob lässt sich die Apoptose in vier Hauptmerkmalsschritte unterteilen. Nach der Induktion durch verschiedene intra- und extrazelluläre Stimuli sinkt zunächst das mitochondriale Potential. Dieser Schritt kann bereits als „*Point-of-no-return*“ bezeichnet werden. Anschließend wird eine Kaskade verschiedener Caspasen (Cystein Aspartat-spezifische Proteasen) aktiviert. Diese sorgen in der Zelle für die Spaltung wichtiger Zellproteine. Die Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran ist die erste morphologische Veränderung, welche im Folgenden durch Zellschrumpfung und das Abschnüren von Zellvesikeln sichtbar wird. Die DNA-Fragmentierung ist der letzte Schritt vor dem Auflösen der Zelle und der Phagozytose der Überreste.

Zur Überprüfung dieser Schritte im Labor haben sich vier zu untersuchende Hauptparameter etabliert; die Zellmorphologie, die DNA-Fragmentierung, die Caspase Aktivität und die Zellmembranveränderungen.

In dieser Arbeit wurde der Caspase-Glo 3/7 Assay der Firma Promega verwendet. Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wird basierend auf der Spaltung von DEVD-((Asp-Glu-Val-Asp), Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure) Sequenz-Peptid-Aminoluziferin-

Substraten gemessen. Nach Zugabe des Caspase-Glo 3/7 Reagenzes findet die Zelllyse statt und die Caspasen werden freigesetzt, welche die DEVD-Sequenz erkennen und spalten. Diese Spaltung setzt Aminoluziferin frei. Dieses wiederum kann von der Luziferase als Substrat bei der Generierung von Licht verwendet werden, welches schließlich mittels eines Luminometers erfasst werden kann. Der Caspase-Glo Assay gehört zu den sensitivsten seiner Art, seine Nachweisgrenze liegt bei etwa 20 apoptotischen Zellen (www.promega.com). Die Caspasen 3 und 7 gehören zu den Effektor-Caspasen. Vorläufer von Effektor-Caspasen werden von den autolytischen Initiator Caspasen (2, 8, 9, 10) gespalten und damit aktiviert (Kuribayashi et al., 2006).

Für die Induktion der Apoptose wurde der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin verwendet. Dieses Alkaloid wurde ursprünglich aus Streptomyces Kulturen isoliert (Omura et al., 1977) und besitzt ein breites Wirkspektrum. Seine Fähigkeit, Apoptose in einer Vielzahl von verschiedenen Zellarten unabhängig von deren Differenzierungsgrad oder deren Zellzyklus zu induzieren (Bertrand et al., 1994), macht es zu einem universell einsetzbaren Stimulanz für den programmierten Zelltod, beispielsweise auch als Chemotherapeutikum bei der Krebsbehandlung (Sanz et al., 2009).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Bisher ist es nicht gelungen molekulare Mechanismen, welche zur Entstehung von kavernösen Malformationen beitragen, hinreichend zu entschlüsseln. Es konnten 3 Gene ursächlich mit der Krankheit assoziiert werden. Mutationen in *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* führen zu einem nicht unterscheidbaren klinischen Erscheinungsbild. Die Symptome reichen von Kopfschmerzen bis hin zu Gehirnblutungen und Schlaganfällen, welche bisweilen auch tödlich verlaufen. Nachdem wir zu Beginn dieser Arbeit nachweisen konnten, dass alle drei an der Krankheit beteiligten Genprodukte einen ternären Komplex *in vitro* bilden, kann von einem gemeinsamen Signalweg ausgegangen werden. Hauptziel dieser Promotion war es, die Funktion des CCM3-Proteins näher aufzuklären. Bisher war über dieses Protein nicht viel bekannt, was zur Aufklärung seiner zellulären Aufgaben beigetragen hätte. Da es sich bei den CCMs um Blutgefäßfehlbildungen handelt, liegt eine Funktion im Bereich der Angiogenese nahe. *In vivo* konnte im Laufe dieser Arbeit beim Zebrafisch gezeigt werden, dass der Verlust von CCM3 zu einem kardiovaskulären Phänotyp führt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf verschiedene *in vitro* Zellkultursysteme gelegt, die Proliferations-, Migrations- und Tube Formation-Assays. Weiterhin sollte untersucht werden, in welchen molekularen Signalwegen CCM3 eine entscheidende funktionale Rolle spielt. Hierzu wurde der Ansatz des Kinase-Profilings mit Hilfe eines Mikrochips von PamGene gewählt. Auf diesem Chip befinden sich 144 verschiedene Tyrosin-Kinase-Substrate, welche mit CCM3 überexprimierenden Zelllysaten inkubiert werden. Kandidaten, welche eine signifikant erhöhte Phosphorylierung aufweisen, könnten Hinweise auf Signalwege geben, welche maßgeblich von CCM3 moduliert werden. Da Tyrosin-Kinasen zu einer der vielversprechendsten Molekülgruppen für eine pharmakologische Behandlung von Krankheiten zählen, wäre ein klinischer Nutzen für die Zukunft denkbar.

2. Ergebnisse

2.1 CCM3 bildet zusammen mit CCM1 und CCM2 einen ternären Komplex (Stahl et al., 2008)

Nachdem gezeigt worden war, dass CCM1 mit CCM2 interagiert (Zawistowski et al., 2005) und dass CCM3 an CCM2 bindet (Voss et al., 2007), stellte sich die Frage, ob alle drei Proteine gemeinsam in einem Komplex vorliegen. Durch Immunpräzipitationen (Fig. 5b, Stahl et al., 2008) und *Pull-Down* Assays (Fig. 5a, Stahl et al., 2008) in HEK293 Zellen wurde die Vermutung bestätigt, dass CCM1, CCM2 und CCM3 in einem ternären Komplex vorliegen. Die bisher einzig bekannte humane genomische *in frame* Deletion des Exons 2 von CCM2 (CCM2:p.P11_K68del), welche auch als Transkriptvariante durch ein Exon-Skipping vorkommt, interagiert nicht mit CCM1 (Fig. 4a, Stahl et al., 2008). Mit CCM2:p.P11_K68del war es nicht möglich, den ternären CCM1/CCM2/CCM3-Komplex zu bilden. Allerdings blieb die Interaktionsfähigkeit mit CCM3 erhalten (Fig. 4b und Fig. 5a, Stahl et al., 2008).

2.2 Der *Knock-down* von CCM3 führt zu einem kardiovaskulären Phänotyp im Zebrafisch (Voss et al., 2009)

In allen CCM Genen wurden verschiedene Nonsense-, Frameshift-, Splice- und Missensemutationen gefunden, welche zu einem frühzeitigen Stopkodon und damit zu einem verkürzten Protein führen. Alle bisherigen Analysen lassen darauf schließen, dass es sich bei den CCM-Mutationen um *loss-of-function* Mutationen handelt. Die einzig bislang bekannte humane *in frame* Deletion von CCM3 betrifft Exon 5. Um den Krankheitswert dieser *in frame* Deletion zu beleuchten, wurden biochemische Analysen und *Knock-down*-Experimente im Zebrafisch durchgeführt.

Ein stabiles Protein, welchem 18 Aminosäuren fehlen (CCM3:p.L33_K50del), konnte *in vitro* in HEK293 Zellen gebildet werden (Anlage 2, Voss et al., 2009). Die Interaktion mit CCM2 blieb erhalten, während die Interaktion mit den Bindungspartnern STK25 und MST4 verloren ging bzw. stark beeinträchtigt war (Fig. 2a, Voss et al., 2009). Der ternäre Komplex konnte weiterhin gebildet werden (Fig. 2b, Voss et al., 2009), allerdings war STK25 nicht mehr in der Lage, CCM3:p.L33_K50del *in vitro* zu phosphorylieren. Um die Phosphorylierungsstellen von CCM3 zu charakterisieren, wurde phosphoryliertes His-CCM3 angereichert und mit einem nano-LC-MS/MS Massenspektrometer analysiert. Es zeigte sich, dass CCM3 an den Positionen Serin 39 und Threonin 43 Phosphorylierungsstellen besitzt (Fig. 3b, 3c, Voss et al., 2009). Das Zebrafisch-Ortholog der Exon 5 Deletion von humanem CCM3 (ccm3:p.L31_K48del) konnte ebenso in HEK293 Zellen exprimiert werden wie das Wildtyp-Zebrafisch Protein ccm3a und sein Duplikat ccm3b. Alle drei Proteine konnten durch CCM2

koimmunpräzipitiert werden. Ebenso interagierten *ccm3a* und *ccm3b* mit STK25 und MST4. Die Deletionsmutante *ccm3:p.L31_K48del* war ebenso wie humanes CCM3 nicht fähig, STK25 zu binden. Mit MST4 zeigte sich eine stark eingeschränkte Interaktion (Fig. 4, Voss et al., 2009).

Der kombinierte Morpholino-induzierte *Knock-down* von *ccm3a* und *ccm3b* führte zu einem ausgeprägten kardiovaskulären Phänotyp, welcher identisch mit *ccm1* (*santa*) und *ccm2* (*valentine*) Zebrafisch Mutanten ist (Fig. 5, Voss et al., 2009). Zwei Tage nach der Behandlung mit 1 ng dieses Morpholinos zeigten 86% der Zebrafischembryonen ein vergrößertes, langsam schlagendes Herz mit fehlender Blutzirkulation. Ein *Knock-down* von *ccm3a* oder *ccm3b* alleine führte in nur 18% der damit behandelten Embryonen zu diesem kardialen Phänotyp. Bei einem simultanen *Knock-down* von *ccm3a* und *ccm3b* in einer für das Beobachten der Gefäßentwicklung geeigneten transgenen Zebrafischlinie, bei welcher der VEGF Rezeptor 4 (*flk-1*) mit GFP fusioniert ist, konnte festgestellt werden, dass die Gehirngefäße nach 32 hpf erweitert und später aufgrund der nicht vorhandenen Blutzirkulation fehlentwickelt aussahen. Die subintestinalen Gefäße waren ebenso stark erweitert wie die Schwanz- und die hintere Hauptvene. Auch ein gleichzeitiger *Knock-down* von *ccm3a*^{E313} und *ccm3b*^{E414}, welcher die Deletion von Exon 3 beim Zebrafisch nachahmt, führte zu einem kardiovaskulären Phänotyp mit schweren Gefäßerweiterungen und perikardialen Ödemen.

2.3 CCM3 reguliert die Migration, Proliferation und Tube Formation von Endothelzellen *in vitro* und moduliert den PDPK-1/Akt1 Signalweg (Schleider et al., 2010)

Um den Einfluss von CCM3 auf die Angiogenese zu untersuchen, wurden primäre humane Nabelschnur-Venenendothelzellen (human umbilical vein endothelial cells; HUVECs) verwendet. Durch adenovirale Transduktion wurde CCM3 überexprimiert, der *Knock-down* erfolgte mittels validierter siRNA. CCM3 wurde simultan mit dem Green Fluorescent Protein GFP exprimiert, welches durch eine IRES Site getrennt auf demselben Vektor lag und als Transduktionseffizienz-Monitor fungierte. Als Kontrollen wurden Viren mit GFP alleine bzw. eine nicht spezifische siRNA (siNonTargeting) verwendet (Fig. 1a, Schleider et al., 2010). In den darauffolgenden Migrations-, Proliferations- und Tube-Formationassays konnte gezeigt werden, dass CCM3 überexprimierende HUVECs eine stark verminderte Fähigkeit zur Migration zeigen (Fig. 1c, Schleider et al., 2010), dass die Proliferation beinahe zum Erliegen kommt (Fig. 1b, Schleider et al., 2010), und dass auch die Fähigkeit, kapillarähnliche Strukturen in Matrigelen zu bilden, stark beeinträchtigt ist (Fig. 1d, Schleider et al., 2010). Ein gegenläufiger Effekt war bei der Migration und Proliferation nach Herunterregulieren von endogenem CCM3 mittels siRNA nicht nachweisbar (Fig. 1c, 1b, Schleider et al., 2010). Allerdings konnte eine signifikant erhöhte Fähigkeit zur Tube-Formation nachgewiesen

werden (Fig. 1d, Schleider et al., 2010). Um weitere Hinweise auf Signalwege zu erhalten, welche maßgeblich von CCM3 moduliert werden, wurde ein Tyrosin-Kinase-Array gemacht, bei welchem CCM3 überexprimierende HUVEC Lysate mit 144 verschiedenen Tyrosin-Kinase-Substraten inkubiert wurden. Die Zellen wurden zuvor jeweils 5 Minuten (Tab.1) bzw. 15 Minuten (Tab 2.) mit VEGF stimuliert. Es konnten fünf Kandidaten (siehe Tab. 1 und 2) mit einer signifikant erhöhten Phosphorylierung detektiert werden. Es handelt sich dabei um den Discoidin Domänen Rezeptor 1 (discoidin domain receptor; DDR1), die duale spezifitätstyrosinphosphorylierungsregulierte Kinase 1A (dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A; DYR1A), die Protoonkogen Tyrosin-Protein Kinase FER (proto-oncogene tyrosine-protein kinase FER; FER), die fynbezogene Kinase (Fyn-related kinase; FRK) und die phosphoinositolabhängige Kinase 1 (phosphoinositol-dependent kinase 1; PDPK-1). Für die ersten vier Kandidaten stehen keine kommerziell erhältlichen, phosphospezifischen Antikörper zur Verfügung. Aus diesem Grund ist ihre Bestätigung zum jetzigen Zeitpunkt schwierig. Für die PDPK-1 stehen solche Antikörper zur Verfügung. Außerdem zeigte sie auch thematisch die größtmöglichen Übereinstimmungen für eine putative Beteiligung bei der CCM-Pathogenese.

Bei dem von uns durchgeführten Array wurde speziell das Tyrosin 9 der PDPK-1 als signifikant phosphoryliertes Substrat entdeckt. Da die PDPK-1 maßgeblich an der Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase Akt/PKB (ν -akt murine thymoma viral oncogene homolog 1/protein kinase B) beteiligt ist, wurde weiterhin untersucht, ob CCM3 überexprimierende HUVECs einen veränderten Akt Phosphorylierungsgrad aufweisen. Die Akt/PKB kann an mehreren Stellen phosphoryliert und aktiviert werden. Dabei geschieht die Aktivierung durch die PDPK-1 an der Stelle Threonin 308. Eine weitere sehr wichtige Phosphorylierungsstelle ist das Serin 473, welche durch den mTOR-Komplex (mechanistic target of rapamycin) beispielsweise stressabhängig phosphoryliert wird (Matheny et al., 2009).

In unstimulierten, mit CCM3-Virus transduzierten HUVECs ist die PDPK-1 tatsächlich am Tyrosin 9 und Akt/PKB sowohl am Threonin 308 als auch am Serin 473 signifikant erhöht phosphoryliert (Fig. 1F, Schleider et al., 2010).

Bei einem Apoptose Assay, welcher die Aktivität der Caspasen 3 und 7 misst (Caspase-Glo 3/7 Assay, Promega), konnten wir außerdem zeigen, dass CCM3 überexprimierende Zellen nach einer zweistündigen Staurosporin Inkubation deutlich weniger apoptotisch sind als Kontrollzellen (Fig. 1E, Schleider et al., 2010).

Tabelle 1: Tyrosin-Kinase-Array (Zeitpunkt 5 Minuten). Zusammenfassung der signifikanten Peptide nach VEGF Stimulation (5 Minuten). Durchschnittswerte sind nach Abzug des Hintergrundes (no ATP) aufgelistet. Die Peptide wurden in eine positive und eine negative Gruppe eingeteilt und nach ihrem p-Wert sortiert. Die positive Gruppe, deren Signal erhöht ist im Vergleich zur Kontrollgruppe (GFP), ist mit einem Pfeil markiert.

Time Point 5 min				
Average signals				
Peptide ID	No ATP	GFP	CCM3	P-value
DYR1A_312_324	3479	5446	6555	0,0042
DYR1A_212_224	-425	-271	-51	0,0168
DDR1_506_518	-255	794	1230	0,0229
PDPK1_2_14	995	6483	5297	0,0001
EPHA2_765_777	868	7165	5658	0,0004
PGFRB_572_584	1769	7867	6149	0,0011
K2C8_425_437	1599	1886	1097	0,0016
EGFR_1118_1130	1327	1659	927	0,0031
VGFR1_1326_1338	572	3210	2587	0,0032
FER_707_719	340	6159	4973	0,0042
EPOR_361_373	697	3605	2566	0,0062
PGFRB_768_780	1852	4326	3502	0,0064
KSYK_518_530	2218	2837	2338	0,0081
JAK1_1015_1027	1962	3038	2364	0,0105
EPHB1_771_783	3370	5318	4136	0,0106
PGFRB_709_721	580	3017	2506	0,0129
PAXI_111_123	2002	8338	6921	0,0134
41_654_666	1545	3001	2587	0,0151
MK12_178_190	3364	3352	3011	0,0154
PLCG1_776_788	1101	1475	648	0,0157
PP2AB_297_309	7387	8069	7046	0,0165
VGFR1_1206_1218	576	599	418	0,0171
EPHA4_589_601	2299	2890	2271	0,0174
PAXI_24_36	3461	7794	6766	0,0174
INSR_992_1004	3221	3486	2585	0,0179
EGFR_1190_1202	11	427	-26	0,0183
CALM_95_107	728	1234	958	0,0200
CTNB1_79_91	814	2132	1464	0,0204
NTRK1_489_501	6672	5702	4551	0,0210
PRRX2_202_214	3493	7498	6618	0,0257
P85A_600_612	1910	5547	4354	0,0304
ERBB4_1277_1289	7438	7772	6376	0,0317
NCF1_313_325	15316	17760	16489	0,0329
VGFR1_1049_1061	2006	2995	1927	0,0333
FES_706_718	258	7481	6497	0,0352
MK07_211_223	9734	10507	9028	0,0368
MET_1227_1239	9673	12148	10878	0,0394
EPHA7_607_619	4239	7477	5971	0,0418
RON_1346_1358	-154	1773	685	0,0424
MK01_180_192	3488	3516	2945	0,0429
PLCG1_764_776	6233	15286	14237	0,0437
VGFR2_1046_1058	3827	4003	3368	0,0438
EGFR_1103_1115	-156	1710	979	0,0441
JAK2_563_577	2412	4741	3982	0,0478
EPOR_419_431	4383	5679	4396	0,0479

Tabelle 2: Tyrosin-Kinase-Array (Zeitpunkt 15 Minuten). Zusammenfassung der signifikanten Peptide nach VEGF Stimulation (15 Minuten). Durchschnittswerte sind nach Abzug des Hintergrundes (no ATP) aufgelistet. Die Peptide wurden in eine positive und eine negative Gruppe eingeteilt und nach ihrem p-Wert sortiert. Die positive Gruppe, deren Signal erhöht ist im Vergleich zur Kontrollgruppe (GFP), ist mit einem Pfeil markiert

Time Point 15 min				
Average signals				
Peptide ID	No ATP	GFP	CCM3	P-value
DDR1_506_518	-255	762	1446 ↑	0,0002
PDPK1_2_14	995	5914	6836 ↑	0,0019
FER_707_719	340	5997	7060 ↑	0,0149
FRK_380_392	6672	14150	16381 ↑	0,0342
NPT2A_501_513	12150	14877	11996	0,0005
VGFR1_1206_1218	576	688	414	0,0009
INSR_992_1004	3221	4253	3013	0,0094
RAF1_332_344	9104	12475	11088	0,0100
ERBB4_1277_1289	7438	9366	7157	0,0110
NCF1_313_325	15316	17873	16231	0,0113
INSR_1348_1360	5707	6069	5412	0,0161
TYRO3_679_691	7002	9762	8848	0,0259
VGFR2_944_956	3827	8651	7677	0,0274
NTRK1_489_501	6465	6579	5304	0,0280
VGFR2_1046_1058	3324	4594	3825	0,0356
TEC_512_524	4752	6432	5532	0,0446
PTN11_539_551	3955	5400	4852	0,0472

3. Diskussion

Zerebrovaskuläre kavernöse Malformationen sind Blutgefäßfehlbildungen im Gehirn, welche sich durch stark dilatierte, kapillarähnliche Strukturen mit niedriger Blutflussrate und fehlendem Gehirnparenchym auszeichnen (Labauge et al., 2007). Mutationen in *CCM1*, *CCM2* oder *CCM3* führen zu dieser sporadisch auftretenden oder auch familiär autosomal-dominant vererbten Krankheit. Es konnte gezeigt werden, dass eine somatische Mutation einer bereits heterozygot vorliegenden Keimbahnmutation folgt und demnach ein *two-hit* Mechanismus der Entstehung von Kavernomen zugrunde liegt (Akers et al., 2009; Gault et al., 2009; Pagenstecher et al., 2009). Unabhängig vom betroffenen Gen können Patienten klinisch nicht unterschieden werden. Aus diesem Grund wurde schon vor einiger Zeit ein gemeinsamer Signalweg für alle drei CCM Proteine vorgeschlagen (Revencu et al., 2006). Bereits 2005 konnte gezeigt werden, dass *CCM1* mit *CCM2* interagiert (Zawistowski et al., 2005; Zhang et al., 2007). 2007 gelang es in unserer Arbeitsgruppe, die Interaktion zwischen *CCM2* und *CCM3* zu beweisen (Voss et al., 2007). Außerdem konnten wir zeigen, dass *CCM3* nicht in der Lage war, mit *CCM1* zu koimmunpräzipitieren. Da sowohl *CCM1* als auch *CCM3* an *CCM2* binden können, wurde untersucht, ob diese Bindung möglicherweise kompetitiv ist. Schließlich stellte sich heraus, dass die Bindung kooperativ ist, und dass mehr *CCM3* an *CCM2* bindet, wenn zusätzlich auch *CCM1* überexprimiert vorliegt (Voss et al., 2007).

Mit der vorliegenden Arbeit ist es schließlich gelungen, den ternären Komplex aus *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* nachzuweisen. Bei *Pull-Down* Assays und Koimmunpräzipitationen konnte *CCM1* nur detektiert werden, wenn zusätzlich zu *CCM3* auch *CCM2* vorhanden war (Fig. 5a und b, Stahl et al., 2008). Diese Daten konnten zur selben Zeit durch eine Proteomics Studie gestützt werden, welche eine Interaktion von rekombinant gereinigtem *CCM3* mit *CCM1* und *CCM2* *in vitro* nachweisen konnte (Hilder et al., 2007). Die in einem Patienten beschriebene Mutation *CCM2*:pP11_K68del (Liquori et al., 2008; Stahl et al., 2008), welcher auf DNA-Ebene das Exon 2 *in frame* fehlt, ist nicht mehr fähig, an *CCM1* zu binden und den ternären *CCM1/CCM2/CCM3*-Komplex zu bilden. Die Interaktion mit *CCM3* bleibt allerdings unberührt, so dass *CCM2* eine Linker-Funktion zwischen *CCM1* und *CCM3* zukommt. Das Exon 2 von *CCM2* umfasst die Aminosäuren 11-68 und liegt damit knapp N-terminal, überlappend zur PTB Domäne, welche sich an Stelle 66-227 befindet. Das Fehlen des Exons 2 kommt auch bei gesunden Personen als Transkriptvariante vor (Denier et al., 2004). Der Anteil von *CCM2* mit zu *CCM2* ohne Exon 2 scheint bei gesunden Personen auf Seite der *full-length* Variante zu liegen. Auch die Punktmutationen *CCM2*:p.L198R und *CCM2*:p.F217A (Zawistowski et al., 2005), welche sich innerhalb der PTB Domäne befinden, lassen die Interaktion mit *CCM3* unberührt (Fig. 4b, Stahl et al., 2008). Die Interaktion mit

CCM1 kann wiederum von beiden Punktmutanten nicht aufrecht erhalten werden (Fig. 4a, Stahl et al., 2008). Somit scheint neben der PTB Domäne das Exon 2 essentiell für die Interaktion mit CCM1 zu sein.

Über das CCM3-Protein ist nach wie vor wenig bekannt. Anders als CCM1 und CCM2 besitzt es keine bekannten Proteindomänen, welche eventuelle Rückschlüsse auf seine Funktion zulassen. Mausmodelle gestalten sich schwierig, da sowohl CCM1 als auch CCM2 *Knock-out*-Mutanten aufgrund multipler Wachstumsarreste und Fehlern bei der Angiogenese embryonal letal sind (Boulday et al., 2009; Kleaveland et al., 2009; Whitehead et al., 2009; Whitehead et al., 2004). Bis kurz vor Abschluss dieser Arbeit wurde keine CCM3 Mauslinie publiziert. Die erst anschließend publizierte Studie offenbart aber einen identischen Phänotyp (siehe weiter unten) (He et al., 2010).

Ein anderer in der Erforschung von Organentwicklungen sehr häufig erfolgreich verwendeter Modellorganismus ist der Zebrafisch (*Danio rerio*). Dieser Fisch hat etliche experimentelle Vorteile gegenüber der Maus, wie eine nur 3-monatige Generationszeit sowie den kurzen Brutzyklus von nur 1-2 Wochen. Die große Anzahl an Nachkommen ermöglicht genetische Analysen im großen Maßstab. Die Entwicklung findet außerhalb des Mutterleibes statt und der Embryo bleibt lange Zeit transparent, wodurch er für die Beobachtung unter einem Lichtmikroskop gut zugänglich ist. Speziell bei der Beobachtung der Blutgefäßentwicklung ist es von entscheidendem Vorteil, dass der Zebrafisch aufgrund seiner geringen Größe genügend Sauerstoff über passive Diffusion aufnehmen kann, auch wenn kein Blutkreislauf etabliert werden kann. Damit ist es möglich, die Embryonen zu frühen Zeitpunkten in der Entwicklung zu beobachten. Außerdem ist das Spektrum experimenteller Möglichkeiten, wie beispielsweise konkrete Zellschicksals- und Abstammungsanalysen, Einzel-Zell-Transplantationen, Mikroinjektion funktionaler Moleküle und *Knock-down* spezifischer Gene durch Injektion von Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden, sehr umfangreich. Durch die Expression von gewebespezifischen Markern wie dem green fluorescent protein (GFP) sind genaue Visualisierungen bis hin zu einzelnen Endothelzellen möglich (Weinstein, 2002).

Orthologe von CCM1 und CCM2 wurden schon vor über 10 Jahren im Zebrafisch entdeckt, ohne dass man damals von deren humanen Pendanten wusste. Beide Mutanten zeigen einen ausgeprägten kardiovaskulären Phänotyp (Chen et al., 1996; Stainier et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit (siehe Anlage 2, Voss et al., 2009) konnte gezeigt werden, dass CCM3 Zebrafisch Mutanten einen identischen Phänotyp aufweisen. Beim Zebrafisch liegt das *CCM3*-Gen dupliziert vor. Beide Genvarianten zeigen eine hohe Aminosäuresequenzhomologie zu humanem CCM3 von 94% für *ccm3a* bzw. 92% für das Duplikat *ccm3b*. Aus diesem Grund wurde ein Morpholino-Antisense-Oligonukleotid entwickelt, welches gleichzeitig auf das Startkodon von *ccm3a* und *ccm3b* abzielt. Nur dieser

kombinierte *Knock-down* führte zu einem ausgeprägten kardiovaskulären Phänotyp, welcher identisch mit *ccm1 (santa)* und *ccm2 (valentine)* Zebrafisch Mutanten ist. Damit kann dem Duplikat *ccm3b* eine redundante Rolle bei der Zebrafischentwicklung *in vivo* zugeschrieben werden. Mit demselben Morpholino konnte in einer GFP-transgenen Zebrafischlinie gezeigt werden, dass der Phänotyp auch auf Gefäßebene mit dem der *santa (ccm1)* und *valentine (ccm2)* Mutanten identisch ist (Hogan et al., 2008; Jin et al., 2007). Die Gefäße zeichnen sich durch eine veränderte, auffällig große und runde Zellform aus. Dabei konnten in der damaligen Studie allerdings keine gestörten Zell-Zell Kontakte erkannt werden. Beim Zebrafisch konnte durch Transplantationsassays bewiesen werden, dass der CCM3-Phänotyp endothelzellautonom ist (Hogan et al., 2008). *In vitro* konnte zuvor gezeigt werden, dass CCM1 in arteriellen und venösen Endothelzellen an den Zell-Zell Kontakten zusammen mit dem Ras-proximate-1 (Rap1) Protein nachgewiesen werden konnte. Rap-1 reguliert sowohl in Endothel- als auch in Epithelzellen die Zell-Zell-Kontakte (Cullere et al., 2005; Knox et al., 2002; Price et al., 2004). Bei einem siRNA induzierten Fehlen von CCM1 ist die Integrität der *tight junctions* gestört (Glading et al., 2007). Auch immunozytochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Patientenmaterial wiesen darauf hin, dass die Endothelzellen der Läsionen keine *tight junctions* besaßen (Clatterbuck et al., 2001).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der humanen *in frame* Deletion von CCM3 im Exon 5. Sekundärstrukturvoraussagen ließen vermuten, dass die Deletion von Exon 5 zu einem instabilen Protein führen müsste, da 60% einer für das Protein markanten N-terminalen α -Helix betroffen sind. Dennoch war es möglich, das mutierte Protein, welchem die Aminosäuren 33 bis 50 fehlen (CCM3:pL33_L50del, (Bergametti et al., 2005)), in HEK293 Zellen stabil zu exprimieren (siehe Anlage 2, Abb. 2). Sequenzhomologien der Aminosäuren 16 bis 69 mit den Aminosäuren 355 bis 411 des CCM3-Bindungspartners STK25 (Voss et al., 2007) (siehe Anlage 2, Abb. 1b) ließen darauf schließen, dass die untersuchte Deletion Einfluss auf die Interaktion dieser beiden Proteine nehmen könnte. Nachdem wir zeigen konnten, dass die Deletion keinen Einfluss auf die Bildung des ternären Komplexes aus CCM1/CCM2/CCM3 hat, stellte sich heraus, dass CCM3:pL33_L50del tatsächlich nicht mehr in der Lage war, endogene STK25 zu koimmunpräzipitieren. Auch die weiteren Interaktionspartner STK24 und MST4 zeigten übereinstimmende Sequenzhomologien zu CCM3. Auch MST4 konnte nicht mehr mit CCM3:p.L33_L50del interagieren. Ein Beweis, dass auch STK24 diese Interaktion nicht mehr eingeht, konnte aufgrund eines fehlenden spezifischen Antikörpers nicht erbracht werden.

Auch *ccm3a* und sein Duplikat *ccm3b* wurden auf ihre Bindungsfähigkeit zu endogenem STK25 und MST4 in HEK293 Zellen untersucht. Sie ließen sich stabil exprimieren und zeigten analog zu humanem CCM3 Interaktionen mit STK25 und MST4. Darüber hinaus war

es möglich, CCM2 zu koimmunpräzipitieren. Auch der ternäre Komplex konnte mit CCM1 und CCM2 gebildet werden. Das mutierte Zebrafischprotein *ccm3:p.L31_K48del*, welchem 18 Aminosäuren und damit das Exon 3 *in frame* fehlen, konnte auch stabil in HEK293 Zellen exprimiert werden. Der ternäre Komplex konnte gebildet werden und das mutierte Protein war genauso wenig in der Lage, mit endogener STK25 und nur noch schwach mit MST4 zu interagieren wie ihr humanes Pendant CCM3:pL33_L50del. Im Zebrafisch konnten wir durch ein Morpholino-Experiment, bei welchem das Exon 3 von *ccm3a* durch ein *in frame* skipping beim Spleißen deletiert ist (*ccm3a^{E3/3}*), zeigen, dass bei gleichzeitigem *Knock-down* von *ccm3b* in 86% der Embryonen ein kardiovaskulärer Phänotyp auftritt. Durch den Einsatz eines weiteren Morpholinos war es möglich, das Exon Skipping auch bei *ccm3b* zu erreichen (*ccm3b^{E4/4}*). Ein simultaner *Knock-down* von *ccm3a^{E3/3}* zusammen mit *ccm3b^{E4/4}* führte ebenso zu diesem Phänotyp. Damit ist bewiesen, dass allein das Fehlen dieser Domäne ausreicht, den dramatischen kardiovaskulären CCM-Phänotyp im Zebrafisch nachzustellen. Nachdem CCM3 eine signifikante Rolle im Tiermodell gezeigt hatte stellte sich die Frage, welche Funktion es auf rein zellulärer Ebene besitzt. Mehrmals bewiesen ist, dass die Endothelzelle das Hauptkompartiment des Krankheitsursprungs darstellt (Boulday et al., 2009; Hogan et al., 2008; Pagenstecher et al., 2009; Whitehead et al., 2009).

Da es sich bei den Kavernomen um eine Gefäßentwicklungsstörung handelt, schien es sinnvoll, die Endothelzellen während der Angiogenese zu betrachten. Eine der am besten untersuchten primären Endothelzellkulturen sind die humanen Nabelschnur-Venenendothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs). Diese sind leicht zu gewinnende, makrovaskuläre Endothelzellen. Von Nachteil ist, dass Endothelzellen nur schwer mit herkömmlichen Transfektionsreagenzien transfizierbar sind. Die adenovirale Transduktion bot die Möglichkeit, eine hohe Transfektionseffizienz mit transientem Charakter zu vereinen. Um diese Effizienz besser beobachten zu können, wurden Viren hergestellt, welche auf dem von ihnen verpackten Vektor neben CCM3 GFP trugen, welches durch eine IRES (internal ribosome binding site) Sequenz von CCM3 getrennt war. Für das Herunterregulieren der CCM3 Expression wurde zuvor validierte siRNA verwendet, welche eine stark verminderte Expression von CCM3 auf Proteinebene bewirkte. Als Negativkontrolle fungierte ein Oligonukleotid mit einer nicht natürlich vorkommenden Sequenz (siControl) (siehe Anlage 3, Schleider et al., 2010).

Bei den durchgeführten Proliferations-, Migrations- und Tube-Formationassays zeigte sich, dass CCM3 überexprimierende Zellen eine stark verminderte Performance aufweisen. Im Gegensatz dazu waren die Effekte bei den siRNA behandelten Zellen weniger stark ausgeprägt und einzig die Anzahl gebildeter kapillarähnlicher Strukturen auf Matrigelen war signifikant erhöht. Somit konnte gezeigt werden, dass CCM3 antiangiogene Eigenschaften besitzt.

Da die Überexpressionsstudien vielversprechendere Ergebnisse lieferten, beschränkte sich die Kinase-Profling-Analyse auf den Vergleich CCM3-IRES-GFP überexprimierender HUVEC-Lysate mit den Kontrollzelllysaten, welche GFP alleine überexprimieren. Nach erfolgreicher Datenauswertung des Tyrosin Kinase Arrays PamChip durch die Firma PamGene konnten insgesamt 5 Substratkandidaten ermittelt werden, welche nach CCM3 Überexpression signifikant höher phosphoryliert waren als in den GFP transduzierten Kontrolllysaten.

Die Bestätigung des Kandidaten phosphoinositolabhängige Kinase 1 (PDPK-1) wurde fokussiert, da CCM3 zuvor mit Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphaten in Verbindung gebracht worden war (Hilder et al., 2007). Diese sind auch für die Rekrutierung der PDPK-1 an die Zellmembran und damit zur Aktivierung ihrer *downstream* gelegenen und ebenfalls über Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate zur Zellmembran rekrutierten Zielkinase Akt/PKB vonnöten (Fayard et al., 2005).

Die phosphoinositolabhängige Kinase 1 ist eine Serin/Threonin Kinase, welche diverse Mitglieder der AGC Superfamilie phosphoryliert und damit zu deren Aktivität maßgeblich beiträgt (Mora et al., 2004). Einer der bekanntesten und wichtigsten Vertreter dieser Familie ist die Proteinkinase B (PKB, Akt, Rac). Sie spielt eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Metabolismus, Migration, Genexpression und bei der Kontrolle des Gleichgewichts von Überleben und Apoptose (Matheny et al., 2009).

Die phosphoinositolabhängige Kinase 1 besitzt insgesamt 4 funktionale Phosphorylierungsstellen. Die Phosphorylierung am Serin 241 ist essentiell für die Aktivität der PDPK-1 und wird von dieser selbst autophosphoryliert. Weiterhin kann die PDPK-1 an verschiedenen Tyrosin-Resten (Tyrosin 9, Tyrosin 373/376) durch die Tyrosin-Kinase v-Src (v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)), welche dabei gleichzeitig mit der Tyrosinkinase Pyk2 (Kalzium-abhängige Tyrosinkinase Pyk2) assoziiert ist (Taniyama et al., 2003), phosphoryliert werden (Yang et al., 2008). Dabei scheint die Phosphorylierung an den Resten Tyrosin 373/376 nur sequentiell nach erfolgreicher Phosphorylierung an Tyrosin 9 möglich (Taniyama et al., 2003). Jüngst wurde die Struktur von CCM3 aufgeklärt. Interessanterweise konnte in der durch Li und Mitarbeiter publizierte Studie gezeigt werden, dass der C-Terminus von CCM3 eine hohe Strukturähnlichkeit zur FAT (focal adhesion targeting)-Domäne von Pyk2 besitzt. Auch experimentell konnte CCM3 räumlich in die Nähe von fokalen Adhäsionen und damit zur Zellmembran gebracht werden (Li et al., 2010).

Bei dem durch uns durchgeführten Assay wurde das Tyrosin 9 als signifikant erhöht phosphoryliertes Substrat nach CCM3 Überexpression detektiert. Dabei war dieser signifikante Unterschied erst beim Zeitpunkt 15 Minuten evident. Auf Proteinebene konnten

wir diese Daten durch Western Blot Analysen stützen. Dabei fiel auf, dass die PDPK-1 auch ohne vorherige Stimulation mit VEGF signifikant erhöht phosphoryliert war.

Die Phosphorylierung am Tyrosin 9 und deren Bedeutung für die Funktion der PDPK-1 sind noch nicht vollständig erforscht und teilweise widersprüchlich. Durch Kinase *in vitro* Assays wurde ursprünglich gezeigt, dass die Phosphorylierung durch Src am Tyrosin 9 der PDPK-1 keinen Einfluss auf deren Kinaseaktivität hat (Park et al., 2001). Später wurde wiederum gezeigt, dass die PDPK-1 auch Src unabhängig von der Tyrosinkinase RET/PTC am Tyrosin 9 phosphoryliert und aktiviert werden kann. Diese Aktivierung führt in Folge auch zu einer Aktivierung von Akt/PKB durch deren Phosphorylierung am Threonin 308 (Kim et al., 2003). Eine weitere Funktion wurde der PDPK-1 bei der Regulierung von fokalen Adhäsionen beigemessen. Durch eine Angiotensin-II induzierte Stimulation konnte eine Tyrosin 9 Phosphorylierung der PDPK-1 in vaskulären glatten Muskelzellen nachgewiesen werden, welche eine Formierung von fokalen Adhäsionen zur Folge hatte. Auch die Akt/PKB selbst könnte durch ihre Umorganisation des Aktin Zytoskeletts (Morales-Ruiz et al., 2000) an dieser Formierung beteiligt sein (Taniyama et al., 2003).

PDPK-1 *knock-out* Mäuse sind embryonal letal und versterben am Entwicklungstag 9,5 aufgrund eines nicht etablierten Zirkulationssystems (Lawlor et al., 2002). Hingegen sind PDPK-1 defiziente embryonale Stammzellen lebensfähig und proliferieren mit derselben Rate wie PDPK-1 Wildtyp-Zellen (Williams et al., 2000). Die aus den PDPK-1 defizienten Zellen hergestellten „*embryoid bodies*“ (embryonale Körperchen, EBs) unterscheiden sich in einer reduzierten Größe und verminderten Zellausbreitung („*cell spreading*“) von Wildtyp EBs. Diese Beobachtung wurde auf eine verminderte Adhäsion oder Motilität zurückgeführt. Bei Überexpression von PDPK-1 in Endothelzellen, welche zuvor aus den EBs gewonnen worden waren, konnte eine verstärkte Zellmigration beobachtet werden, PDPK-1 *knock-out* Zellen waren dagegen in ihrer Migrationsfähigkeit eingeschränkt (Primo et al., 2007).

Der Akt/PKB Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse. Die bei der Angiogenese entscheidende Isoform Akt1 ist für die Vitalität und die Regulation endothelialer Funktionen wie Migration, Proliferation oder Adhäsion bedeutend. Ebenso ist sie eine wichtige Komponente bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität. Dabei spielt die Menge der aktiven Kinase eine ebenso große Rolle wie Lang- und Kurzzeitaktivierungen. Deren Muster haben einen entscheidenden Einfluss auf Signalwege, welche die Balance zwischen anti- und proangiogenen Faktoren beeinflussen. Zahlreiche *in vitro* Versuche konnten zeigen, dass ein Verlust von Akt negativen Einfluss auf Proliferation, Migration und Zellsprossung hat. Umgekehrt lässt sich damit sagen, dass Akt für physiologische Angiogeneseprozesse gebraucht wird (Übersicht in Ackah et al., 2005; Manning et al., 2007; Shiojima et al., 2002).

Auf der einen Seite konnten wir zeigen, dass CCM3 bei einer Überexpression in Endothelzellen antiangiogen wirkt (Fig. 1B-D, Schleider et al., 2010). Auf der anderen Seite konnten wir aber auch zeigen, dass die PDPK-1 und deren *downstream* gelegener Zielpartner Akt/PKB unter CCM3-Einfluß in einem daueraktivierten Zustand vorliegen (Fig. 1F, Schleider et al., 2010). Die herunterregulierte Apoptoseneigung CCM3-überexprimierender Zellen konnte dies auch auf funktionaler Ebene noch einmal verdeutlichen (Fig. 1E, Schleider et al., 2010).

Aufgrund neuerer Studien ist vor kurzem gezeigt worden, dass Akt neben seiner proangiogenen Eigenschaft auch antiangiogene Eigenschaften besitzt. Bei einer *in vitro* Studie wurde Akt in Zusammenhang mit dem ruhenden Gefäßbett gebracht. Dabei ist eine Akt-Aktivierung bei der Angiopoetin I induzierten Krüppel-like factor 2 Expression wichtig. Der Krüppel-like factor 2 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Angiogenese sowie Entzündungsreaktionen negativ beeinflusst und damit für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase wichtig ist (Sako et al., 2009).

Die andere Studie konnte durch *in vivo* Versuche eindeutig zeigen, dass ein Fehlen von Akt eine erhöhte Responsivität auf angiogene Stimuli zur Folge hatte. Diese verstärkten Wirkungen wurden mit einer Beeinträchtigung der Gefäßreifung und einer erhöhten vaskulären Permeabilität, wie sie für angiogenes Gewebe typisch ist, offenbar (Chen et al., 2005).

Übertragen auf CCM3 könnte dies bedeuten, dass bei einer Mutation und dem daraus resultierenden Verlust des Proteins eine verminderte Phosphorylierung von PDPK-1 sowie eine ungenügende Aktivierung von Akt/PKB erfolgen. Fehlt diese Aktivierung, so ist die Etablierung von Gefäßen generell wohl weniger betroffen als deren abschließende Reifung und Integrität im ruhenden adulten Gefäßbett, wie man es bei den Kavernomen der Patienten beobachten kann. Auch die Blutungsneigung könnte damit erklärt sein.

Kürzlich, nach Abschluss der für diese Arbeit etablierten Daten, wurde das erste CCM3 Mausmodell veröffentlicht. Ebenso wie *Ccm1* und *Ccm2 Knock-out* Mäuse sind die *Ccm3 Knock-out* Mäuse embryonal letal und versterben im Gegensatz zu diesen bereits am Entwicklungstag 8,5. Die Embryonen fielen durch ihre geringere Größe und ein anämisches, blasses Erscheinungsbild auf. Dieser Phänotyp lässt auf Fehler bei der Vaskulogenese sowie der Hämatopoese schließen. Außerdem hatten die Embryonen Defekte im kardiovaskulären System. Neben den *Ccm3 Knock-out* Mäusen wurden auch zellspezifische Gendelektionsmutanten (vaskuläre *Ccm3 Knock-out* Mäuse) generiert. Dabei zeigte sich abermals, dass einzig endothelzellspezifische *Ccm3* Mausmutanten einen Phänotyp aufwiesen und embryonal letal sind. Allerdings versterben sie im Gegensatz zu *Ccm3 Knock-out* Mäusen erst am Entwicklungstag 10,5 und zeigen bis zu diesem Zeitpunkt keine verminderte Körpergröße, haben aber ein anämisches Erscheinungsbild. Histologische

Untersuchungen konnten außerdem zeigen, dass die vaskulären *Knock-out* Mäuse Defekte bei der Angiogenese und dem ersten „*vascular remodeling*“ (Gefäßwandumbau) haben. Der VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) zeigte eine verminderte Expression in vaskulären *Ccm3 Knock-out* Tieren. Die Köpfe der vaskulären *Ccm3 Knock-out* Tiere waren verkleinert, während der Herzbeutel vergrößert erschien. Die dorsale Aorta und die Hauptvene waren sowohl vergrößert als auch in ihrer Integrität gestört. Auch die zuvor in den *Ccm1* und *Ccm2* Mutanten beschriebenen Defekte der Zell-Zell Kontakte konnten in den vaskulären *Ccm3 Knock-out* Tieren gefunden werden. Insgesamt ähnelt der Phänotyp von vaskulären *Ccm3 Knock-out* Mäusen dem von *VEGF* und *VEGFR2 Knock-out* Tieren (He et al., 2010). Für das erstmals publizierte CCM3 Angiogenese *in vitro* Modell wurden sowohl Gehirndothelzellen der *Knock-out* Mäuse verwendet als auch CCM3 *Knock-down* HUVECs. Zunächst fiel auf, dass die Mauszellen eine verminderte Abundanz des VEGFR2 auf Proteinebene, nicht aber auf mRNA Ebene besitzen. Durch eine VEGF-Stimulation konnte gezeigt werden, dass CCM3-defiziente Zellen eine reduzierte Aktivierung und damit Phosphorylierung des VEGFR2, der PLC- γ (Phospholipase C- γ), der Kinase Akt und der ERK1/2 aufwiesen, was durch eine Stimulation mit dem bFGF (basic fibroblast growth factor) nicht erkennbar war. Die verringerte Akt Phosphorylierung nach dem Verlust des CCM3 Proteins ist im Einklang mit den von uns erhobenen Daten nach CCM3 Überexpression, bei welcher die Phosphorylierung von Akt erhöht ist. Die durch He und Mitarbeiter durchgeführten Migrations- und Tube Formation Assays ergaben, dass CCM3 defiziente Zellen ohne Zugabe von Stimulanzen keine zu den Kontrollzellen veränderte Fähigkeiten besitzen. Auch dieses Ergebnis deckt sich mit den von uns etablierten Ergebnissen. Im Gegensatz dazu waren die Zellen bei den in dieser Studie durchgeführten Proliferationsassays nach CCM3 Verlust stark in ihrem Wachstum eingeschränkt, was wir so nicht bestätigen können. Weiterhin belegt die Studie, dass die Fähigkeit von CCM3 defizienten Zellen zu migrieren und Tubes zu bilden unter VEGF Zugabe stark eingeschränkt ist, nicht aber durch die Stimulation durch bFGF (He et al., 2010). Von uns durchgeführte ähnliche Versuche konnten diesen Unterschied nicht erkennen lassen (Daten nicht gezeigt). Letztlich konnten He und Mitarbeiter durch *Pull-down* Assays und Kollisionsstudien zeigen, dass CCM3 mit dem VEGFR2 interagiert. Der VEGFR2 selbst aktiviert die Lipidkinase PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) (He et al., 2010). Diese phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphaten (PIP₃), welche, wie bereits oben erwähnt, für die Rekrutierung der PDK-1, von Akt und auch von CCM3 selbst notwendig sind (Hilder et al., 2007; Matheny et al., 2009). Aus diesem Grund passen auch diese Daten gut zu den von uns etablierten, welche durch die CCM3 Überexpression ein umgekehrtes Szenario darstellen.

Insgesamt bleibt die Aufklärung der genauen Pathomechanismen, welche zur Entwicklung von zerebrovaskulären kavernösen Malformationen führen, ein langfristiges und herausforderndes Ziel. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass CCM3 dabei eine wichtige und distinkte Rolle spielt. *In vitro* konnten wir in Endothelzellen zeigen, dass es eine antiangiogene und gleichzeitig antiapoptotische Funktion besitzt, indem es unter anderem den PDPK-1/Akt-Signalweg positiv moduliert. Für die Zukunft wäre eine genauere Untersuchung dieser Daten *in vivo* ebenso wichtig wie die eingehende Untersuchung der restlichen, durch unseren Kinase Array identifizierten Kandidatenproteine und deren Signalwege.

4. Literatur

Ackah, E., Yu, J., Zoellner, S., Iwakiri, Y., Skurk, C., Shibata, R., Ouchi, N., Easton, R.M., Galasso, G., Birnbaum, M.J., *et al.* (2005). Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *The Journal of clinical investigation* 115, 2119-2127.

Ahlhelm, F., Hagen, T., Schulte-Altendorneburg, G., Grunwald, I., Reith, W., and Roth, C. (2007). [Cavernous malformations]. *Der Radiologe* 47, 863-867.

Akers, A.L., Johnson, E., Steinberg, G.K., Zabramski, J.M., and Marchuk, D.A. (2009). Biallelic somatic and germline mutations in cerebral cavernous malformations (CCMs): evidence for a two-hit mechanism of CCM pathogenesis. *Human molecular genetics* 18, 919-930.

Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H.K., and Benton, G. (2009). The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* 12, 267-274.

Bergametti, F., Denier, C., Labauge, P., Arnoult, M., Boetto, S., Clanet, M., Coubes, P., Echenne, B., Ibrahim, R., Irthum, B., *et al.* (2005). Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *American journal of human genetics* 76, 42-51.

Berridge, M.V., Herst, P.M., and Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review* 11, 127-152.

Bertalanffy, H., Benes, L., Miyazawa, T., Alberti, O., Siegel, A.M., and Sure, U. (2002). Cerebral cavernomas in the adult. Review of the literature and analysis of 72 surgically treated patients. *Neurosurgical review* 25, 1-53; discussion 54-55.

Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1994). Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Experimental cell research* 211, 314-321.

Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-365.

Boulday, G., Blecon, A., Petit, N., Chareyre, F., Garcia, L.A., Niwa-Kawakita, M., Giovannini, M., and Tournier-Lasserre, E. (2009). Tissue-specific conditional CCM2 knockout mice establish the essential role of endothelial CCM2 in angiogenesis: implications for human cerebral cavernous malformations. *Disease models & mechanisms* 2, 168-177.

Boyden, S. (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *The Journal of experimental medicine* 115, 453-466.

Chen, J., Somanath, P.R., Razorenova, O., Chen, W.S., Hay, N., Bornstein, P., and Byzova, T.V. (2005). Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nature medicine* 11, 1188-1196.

Chen, J.N., Haffter, P., Odenthal, J., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F.J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., *et al.* (1996). Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish. *Development (Cambridge, England)* 123, 293-302.

Chen, L., Tanriover, G., Yano, H., Friedlander, R., Louvi, A., and Gunel, M. (2009). Apoptotic functions of PDCD10/CCM3, the gene mutated in cerebral cavernous malformation 3. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40, 1474-1481.

- Clatterbuck, R.E., Eberhart, C.G., Crain, B.J., and Rigamonti, D. (2001). Ultrastructural and immunocytochemical evidence that an incompetent blood-brain barrier is related to the pathophysiology of cavernous malformations. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 71, 188-192.
- Cröse, L.E., Hilder, T.L., Sciaky, N., and Johnson, G.L. (2009). Cerebral cavernous malformation 2 protein promotes smad ubiquitin regulatory factor 1-mediated RhoA degradation in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 284, 13301-13305.
- Cullere, X., Shaw, S.K., Andersson, L., Hirahashi, J., Lusinskas, F.W., and Mayadas, T.N. (2005). Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood* 105, 1950-1955.
- Denier, C., Goutagny, S., Labauge, P., Krivosic, V., Arnoult, M., Cousin, A., Benabid, A.L., Comoy, J., Frerebeau, P., Gilbert, B., *et al.* (2004). Mutations within the MGC4607 gene cause cerebral cavernous malformations. *American journal of human genetics* 74, 326-337.
- Denier, C., Labauge, P., Bergametti, F., Marchelli, F., Riant, F., Arnoult, M., Maciazek, J., Vicaut, E., Brunereau, L., and Tournier-Lasserre, E. (2006). Genotype-phenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients. *Ann Neurol* 60, 550-556.
- Donovan, D., Brown, N.J., Bishop, E.T., and Lewis, C.E. (2001). Comparison of three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis* 4, 113-121.
- Fayard, E., Tintignac, L.A., Baudry, A., and Hemmings, B.A. (2005). Protein kinase B/Akt at a glance. *Journal of cell science* 118, 5675-5678.
- Gaetzner, S., Stahl, S., Surucu, O., Schaafhausen, A., Halliger-Keller, B., Bertalanffy, H., Sure, U., and Felbor, U. (2007). CCM1 gene deletion identified by MLPA in cerebral cavernous malformation. *Neurosurgical review* 30, 155-159; discussion 159-160.
- Gault, J., Awad, I.A., Recksiek, P., Shenkar, R., Breeze, R., Handler, M., and Kleinschmidt-Demasters, B.K. (2009). Cerebral Cavernous Malformations: Somatic Mutations in Vascular Endothelial Cells. *Neurosurgery* 65, 138-145.
- Glading, A., Han, J., Stockton, R.A., and Ginsberg, M.H. (2007). KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. *The Journal of cell biology* 179, 247-254.
- Gomez, D., and Reich, N.C. (2003). Stimulation of primary human endothelial cell proliferation by IFN. *J Immunol* 170, 5373-5381.
- Goodwin, A.M. (2007). In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvascular research* 74, 172-183.
- Graves, P.R., and Haystead, T.A. (2003). A functional proteomics approach to signal transduction. *Recent progress in hormone research* 58, 1-24.
- He, Y., Zhang, H., Yu, L., Gunel, M., Boggon, T.J., Chen, H., and Min, W. (2010). Stabilization of VEGFR2 signaling by cerebral cavernous malformation 3 is critical for vascular development. *Sci Signal*, doi: 10.1126/scisignal.2000722.
- Hilder, T.L., Malone, M.H., Bencharit, S., Colicelli, J., Haystead, T.A., Johnson, G.L., and Wu, C.C. (2007). Proteomic identification of the cerebral cavernous malformation signaling complex. *Journal of proteome research* 6, 4343-4355.

Hogan, B.M., Bussmann, J., Wolburg, H., and Schulte-Merker, S. (2008). *ccm1* cell autonomously regulates endothelial cellular morphogenesis and vascular tubulogenesis in zebrafish. *Human molecular genetics* 17, 2424-2432.

Hunter, T. (2009). Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Current opinion in cell biology* 21, 140-146.

Jin, S.W., Herzog, W., Santoro, M.M., Mitchell, T.S., Frantsve, J., Jungblut, B., Beis, D., Scott, I.C., D'Amico, L.A., Ober, E.A., *et al.* (2007). A transgene-assisted genetic screen identifies essential regulators of vascular development in vertebrate embryos. *Developmental biology* 307, 29-42.

Johnson, L.N. (2009). Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds. *Quarterly reviews of biophysics* 42, 1-40.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.

Kim, D.W., Hwang, J.H., Suh, J.M., Kim, H., Song, J.H., Hwang, E.S., Hwang, I.Y., Park, K.C., Chung, H.K., Kim, J.M., *et al.* (2003). RET/PTC (rearranged in transformation/papillary thyroid carcinomas) tyrosine kinase phosphorylates and activates phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1): an alternative phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway to activate PDK1. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 17, 1382-1394.

Kleaveland, B., Zheng, X., Liu, J.J., Blum, Y., Tung, J.J., Zou, Z., Chen, M., Guo, L., Lu, M.M., Zhou, D., *et al.* (2009). Regulation of cardiovascular development and integrity by the heart of glass-cerebral cavernous malformation protein pathway. *Nature medicine* 15, 169-176.

Knox, A.L., and Brown, N.H. (2002). Rap1 GTPase regulation of adherens junction positioning and cell adhesion. *Science (New York, NY)* 295, 1285-1288.

Knudson, A.G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68, 820-823.

Kufs, H. (1928). Über die heredofamiläre Angiomatose des Gehirns und der Retina, ihre Beziehungen zueinander und zur Angiomatose der Haut. *Z Neurol Psychiatrie* 113, 651-686

Kuribayashi, K., Mayes, P.A., and El-Deiry, W.S. (2006). What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? *Cancer biology & therapy* 5, 763-765.

Labauge, P., Denier, C., Bergametti, F., and Tournier-Lasserre, E. (2007). Genetics of cavernous angiomas. *Lancet neurology* 6, 237-244.

Laberge-le Couteulx, S., Jung, H.H., Labauge, P., Houtteville, J.P., Lescoat, C., Cecillon, M., Marechal, E., Joutel, A., Bach, J.F., and Tournier-Lasserre, E. (1999). Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat Genet* 23, 189-193.

Lawley, T.J., and Kubota, Y. (1989). Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *The Journal of investigative dermatology* 93, 59S-61S.

Lawlor, M.A., Mora, A., Ashby, P.R., Williams, M.R., Murray-Tait, V., Malone, L., Prescott, A.R., Lucocq, J.M., and Alessi, D.R. (2002). Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *The EMBO journal* 21, 3728-3738.

- Leblanc, G.G., Golanov, E., Awad, I.A., and Young, W.L. (2009). Biology of Vascular Malformations of the Brain. *Stroke; a journal of cerebral circulation*.
- Li, X., Zhang, R., Zhang, H., He, Y., Ji, W., Min, W., and Boggon, T.J. (2010). Crystal structure of CCM3, a cerebral cavernous malformation protein critical for vascular integrity. *The Journal of biological chemistry*.
- Liquori, C.L., Berg, M.J., Squitieri, F., Leedom, T.P., Ptacek, L., Johnson, E.W., and Marchuk, D.A. (2007). Deletions in CCM2 are a common cause of cerebral cavernous malformations. *American journal of human genetics* 80, 69-75.
- Liquori, C.L., Penco, S., Gault, J., Leedom, T.P., Tassi, L., Esposito, T., Awad, I.A., Frati, L., Johnson, E.W., Squitieri, F., *et al.* (2008). Different spectra of genomic deletions within the CCM genes between Italian and American CCM patient cohorts. *Neurogenetics* 9, 25-31.
- Luschka, H. (1854). Cavernöse Blutgeschwulst des Gehirnes. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie* 6, 458–470.
- Ma, X., Zhao, H., Shan, J., Long, F., Chen, Y., Chen, Y., Zhang, Y., Han, X., and Ma, D. (2007). PDCD10 interacts with Ste20-related kinase MST4 to promote cell growth and transformation via modulation of the ERK pathway. *Molecular biology of the cell* 18, 1965-1978.
- Mably, J.D., Chuang, L.P., Serluca, F.C., Mohideen, M.A., Chen, J.N., and Fishman, M.C. (2006). *santa* and *valentine* pattern concentric growth of cardiac myocardium in the zebrafish. *Development (Cambridge, England)* 133, 3139-3146.
- Mably, J.D., Mohideen, M.A., Burns, C.G., Chen, J.N., and Fishman, M.C. (2003). *heart of glass* regulates the concentric growth of the heart in zebrafish. *Curr Biol* 13, 2138-2147.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Matheny, R.W., Jr., and Adamo, M.L. (2009). Current perspectives on Akt activation and Akt-ions. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* 234, 1264-1270.
- Messele, T., Roos, M.T., Hamann, D., Koot, M., Fontanet, A.L., Miedema, F., Schellekens, P.T., and Rinke de Wit, T.F. (2000). Nonradioactive techniques for measurement of in vitro T-cell proliferation: alternatives to the [³H]thymidine incorporation assay. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 7, 687-692.
- Mora, A., Komander, D., van Aalten, D.M., and Alessi, D.R. (2004). PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Seminars in cell & developmental biology* 15, 161-170.
- Morales-Ruiz, M., Fulton, D., Sowa, G., Languino, L.R., Fujio, Y., Walsh, K., and Sessa, W.C. (2000). Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circulation research* 86, 892-896.
- Nakatsu, M.N., Davis, J., and Hughes, C.C. (2007). Optimized fibrin gel bead assay for the study of angiogenesis. *J Vis Exp*, 186.
- Nisato, R.E., Harrison, J.A., Buser, R., Orci, L., Rinsch, C., Montesano, R., Dupraz, P., and Pepper, M.S. (2004). Generation and characterization of telomerase-transfected human lymphatic endothelial cells with an extended life span. *The American journal of pathology* 165, 11-24.

- Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchya, H., Takahashi, Y., and Masuma, R. (1977). A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *The Journal of antibiotics* 30, 275-282.
- Pagenstecher, A., Stahl, S., Sure, U., and Felbor, U. (2009). A two-hit mechanism causes cerebral cavernous malformations: complete inactivation of CCM1, CCM2 or CCM3 in affected endothelial cells. *Human molecular genetics* 18, 911-918.
- Park, J., Hill, M.M., Hess, D., Brazil, D.P., Hofsteenge, J., and Hemmings, B.A. (2001). Identification of tyrosine phosphorylation sites on 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and their role in regulating kinase activity. *The Journal of biological chemistry* 276, 37459-37471.
- Ping, P. (2003). Identification of novel signaling complexes by functional proteomics. *Circulation research* 93, 595-603.
- Plummer, N.W., Gallione, C.J., Srinivasan, S., Zawistowski, J.S., Louis, D.N., and Marchuk, D.A. (2004). Loss of p53 sensitizes mice with a mutation in *Ccm1* (*KRIT1*) to development of cerebral vascular malformations. *The American journal of pathology* 165, 1509-1518.
- Preisinger, C., Short, B., De Corte, V., Bruyneel, E., Haas, A., Kopajtich, R., Gettemans, J., and Barr, F.A. (2004). YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3zeta. *The Journal of cell biology* 164, 1009-1020.
- Price, L.S., Hajdo-Milasinovic, A., Zhao, J., Zwartkruis, F.J., Collard, J.G., and Bos, J.L. (2004). Rap1 regulates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *The Journal of biological chemistry* 279, 35127-35132.
- Primo, L., di Blasio, L., Roca, C., Droetto, S., Piva, R., Schaffhausen, B., and Bussolino, F. (2007). Essential role of PDK1 in regulating endothelial cell migration. *The Journal of cell biology* 176, 1035-1047.
- Revenu, N., and Vikkula, M. (2006). Cerebral cavernous malformation: new molecular and clinical insights. *J Med Genet* 43, 716-721.
- Sahoo, T., Johnson, E.W., Thomas, J.W., Kuehl, P.M., Jones, T.L., Dokken, C.G., Touchman, J.W., Gallione, C.J., Lee-Lin, S.Q., Kosofsky, B., *et al.* (1999). Mutations in the gene encoding *KRIT1*, a *Krev-1/rap1a* binding protein, cause cerebral cavernous malformations (*CCM1*). *Human molecular genetics* 8, 2325-2333.
- Sako, K., Fukuhara, S., Minami, T., Hamakubo, T., Song, H., Kodama, T., Fukamizu, A., Gutkind, J.S., Koh, G.Y., and Mochizuki, N. (2009). Angiopoietin-1 induces Kruppel-like factor 2 expression through a phosphoinositide 3-kinase/AKT-dependent activation of myocyte enhancer factor 2. *The Journal of biological chemistry* 284, 5592-5601.
- Sanz, M., Burnett, A., Lo-Coco, F., and Lowenberg, B. (2009). FLT3 inhibition as a targeted therapy for acute myeloid leukemia. *Current opinion in oncology* 21, 594-600.
- Shiojima, I., and Walsh, K. (2002). Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circulation research* 90, 1243-1250.
- Stahl, S., Gaetzner, S., Voss, K., Brackertz, B., Schleider, E., Surucu, O., Kunze, E., Netzer, C., Korenke, C., Finckh, U., *et al.* (2008). Novel CCM1, CCM2, and CCM3 mutations in patients with cerebral cavernous malformations: in-frame deletion in CCM2 prevents formation of a CCM1/CCM2/CCM3 protein complex. *Human mutation* 29, 709-717.

- Stainier, D.Y., Fouquet, B., Chen, J.N., Warren, K.S., Weinstein, B.M., Meiler, S.E., Mohideen, M.A., Neuhauss, S.C., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., *et al.* (1996). Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development (Cambridge, England)* 123, 285-292.
- Staton, C.A., Reed, M.W., and Brown, N.J. (2009). A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International journal of experimental pathology* 90, 195-221.
- Surucu, O., Sure, U., Gaetzner, S., Stahl, S., Benes, L., Bertalanffy, H., and Felbor, U. (2006). Clinical impact of CCM mutation detection in familial cavernous angioma. *Childs Nerv Syst* 22, 1461-1464.
- Taniyama, Y., Weber, D.S., Rocic, P., Hilenski, L., Akers, M.L., Park, J., Hemmings, B.A., Alexander, R.W., and Griendling, K.K. (2003). Pyk2- and Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK1 regulates focal adhesions. *Molecular and cellular biology* 23, 8019-8029.
- Uhlik, M.T., Abell, A.N., Johnson, N.L., Sun, W., Cuevas, B.D., Lobel-Rice, K.E., Horne, E.A., Dell'Acqua, M.L., and Johnson, G.L. (2003). Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nature cell biology* 5, 1104-1110.
- Voss, K., Stahl, S., Hogan, B.M., Reinders, J., Schleider, E., Schulte-Merker, S., and Felbor, U. (2009). Functional analyses of human and zebrafish 18-amino acid in-frame deletion pave the way for domain mapping of the cerebral cavernous malformation 3 protein. *Human mutation* 30, 1003-1011.
- Voss, K., Stahl, S., Schleider, E., Ullrich, S., Nickel, J., Mueller, T.D., and Felbor, U. (2007). CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. *Neurogenetics* 8, 249-256.
- Wang, Y., Liu, H., Zhang, Y., and Ma, D. (1999). cDNA cloning and expression of an apoptosis-related gene, human *TFAR15* gene. *Science in China (Series C)* 42, 323-329.
- Weinstein, B.M. (2002). Plumbing the mysteries of vascular development using the zebrafish. *Seminars in cell & developmental biology* 13, 515-522.
- Whitehead, K.J., Chan, A.C., Navankasattusas, S., Koh, W., London, N.R., Ling, J., Mayo, A.H., Drakos, S.G., Jones, C.A., Zhu, W., *et al.* (2009). The cerebral cavernous malformation signaling pathway promotes vascular integrity via Rho GTPases. *Nature medicine* 15, 177-184.
- Whitehead, K.J., Plummer, N.W., Adams, J.A., Marchuk, D.A., and Li, D.Y. (2004). *Ccm1* is required for arterial morphogenesis: implications for the etiology of human cavernous malformations. *Development (Cambridge, England)* 131, 1437-1448.
- Williams, M.R., Arthur, J.S., Balendran, A., van der Kaay, J., Poli, V., Cohen, P., and Alessi, D.R. (2000). The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr Biol* 10, 439-448.
- Yang, K.J., Shin, S., Piao, L., Shin, E., Li, Y., Park, K.A., Byun, H.S., Won, M., Hong, J., Kweon, G.R., *et al.* (2008). Regulation of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) by Src involves tyrosine phosphorylation of PDK1 and Src homology 2 domain binding. *The Journal of biological chemistry* 283, 1480-1491.
- Yu, C.H., Wu, J., Su, Y.F., Ho, P.Y., Liang, Y.C., Sheu, M.T., and Lee, W.S. (2004). Anti-proliferation effect of 3-amino-2-imino-3,4-dihydro-2H-1,3-benzothiazin-4-one (BJ-601) on

human vascular endothelial cells: G0/G1 p21-associated cell cycle arrest. *Biochemical pharmacology* *67*, 1907-1916.

Zawistowski, J.S., Serebriiskii, I.G., Lee, M.F., Golemis, E.A., and Marchuk, D.A. (2002). KRIT1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: a new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (CCM1) pathogenesis. *Human molecular genetics* *11*, 389-396.

Zawistowski, J.S., Stalheim, L., Uhlik, M.T., Abell, A.N., Ancrile, B.B., Johnson, G.L., and Marchuk, D.A. (2005). CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Human molecular genetics* *14*, 2521-2531.

Zhang, J., Rigamonti, D., Dietz, H.C., and Clatterbuck, R.E. (2007). Interaction between krit1 and malcavernin: implications for the pathogenesis of cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery* *60*, 353-359; discussion 359.

Curriculum Vitae

Zur Person: Elisa Schleider
Diplom-Biologin
geboren am 07.01.1982 in Nürnberg,
deutsch
ledig

Privatanschrift: Kapuzinerstrasse 21, 97070 Würzburg
Tel.: 0931-26080199

Ausbildung

2001 Allgemeine Hochschulreife

2001-2007 Diplomstudium Biologie an der Universität Bayreuth und an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Hauptfach: Mikrobiologie, Nebenfächer: Biochemie und Humangenetik

05/2006-04/2007 Diplomarbeit am Institut für Humangenetik zum Thema „Interaktionsstudien von CCM1, CCM2 und CCM3“

Seit 05/2007 Promotion am Institut für Humangenetik zum Thema „Angiogenese-Modellsysteme zur Funktionsanalyse des humanen CCM3-Proteins“

Seit 04/2008 Mitglied des Graduiertenkollegs 1048 „Molecular basis of organ development in vertebrates“

Forschungsaufenthalt

2008/2009 6-wöchiger/1-wöchiger Forschungsaufenthalt bei Dr. med. Andreas Fischer, Joint Research Division Vascular Biology, University of Mannheim and German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany
Erlernen von Proliferations-, Migrations-, Matrigel-, Sprouting- und Apoptose-Assays mit humanen, primären Nabelschnur-Venenendothelzellen (HUVEC) unter Verwendung von siRNA-Transfektionen und adenoviralen Protein-Überexpressionen

Wissenschaftliche Kooperationen:

Dr. rer. nat. Stefan Schulte-Merker, Netherland's Institute of Developmental Biology, Hubrecht Laboratory, Utrecht, NL
Dr. med. Andreas Fischer, Joint Research Division Vascular Biology, University of Mannheim and German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany

Studienbegleitende und außeruniversitäre Nebentätigkeiten

05/2005-06/2005	Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Botanik 2 für das SFB 567-Teilprojekt A-5: Mechanismen der interspezifischen Interaktion von Organismen
10/2005	Studentische Hilfskraft am Zentrum für Infektionsforschung für das SFB 479 Teilprojekt A-7: Erregervariabilität und Wirtsreaktion bei infektiösen Krankheitsprozessen
08/2005-09/2005	Werkstudentin bei der Siemens AG, Abteilung Automotion and Drives, Erlangen; Disposition, SAP-Benutzung
04/2008-04/2009	Sprecherin des Graduiertenkollegs 1048 „Molecular basis of organ development in vertebrates“
2008-2009	Mitglied des Organisationskomitees des „4th international students' symposium organized by the students of the graduate school of life sciences“, 26.-27. März 2009

Originalarbeiten in Zeitschriften mit Gutachtersystem:

1. **Schleider, E.**, Stahl, S., Wüsthube, J., Walter, U., Fischer, A., Felbor, U. (2010) Evidence for anti-angiogenic and pro-survival functions of the cerebral cavernous malformation protein 3. **Neurogenetics**, submitted 2008IF: 3.000
2. Voss, K., Stahl, S., Reinders, J., Hogan, B.M., **Schleider, E.**, Schulte-Merker, S., Felbor, U. (2009) Functional analysis of human and zebrafish 18 amino acid in-frame deletion pave the way for domain mapping of the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. **Hum Mutat**, 30, 1003-1011. 2008IF: 7.033
3. Stahl, S., Gaetzner, S., Voss, K., Brackertz, B., **Schleider, E.**, Sürücü, O., Kunze, E., Netzer, C., Korenke, C., Finckh, U., Habek, M., Poljakovic, Z., Elbracht, M., Rudnik-Schöneborn, S., Bertalanffy, H., Sure, U., Felbor, U. (2007) Novel *CCM1*, *CCM2*, and *CCM3* mutations in patients with cerebral cavernous malformations: in-frame deletion in *CCM2* prevents formation of a *CCM1/CCM2/CCM3* protein complex. **Hum Mutat**, 29, 709-717. 2008IF: 7.033
4. Voss K, Stahl S, **Schleider E**, Ullrich S, Nickel J, Mueller TD, Felbor U. (2007) *CCM3* interacts with *CCM2* indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformation. **Neurogenetics** 8, 249-256. 2008IF: 3.000

Poster und Vorträge:

1. **Schleider E**, Angiogenesis *in vitro* modeling of *CCM3* function, Vortrag, 8. Mitarbeiterkolloquium des Bayerischen Genomforschungsnetzwerkes BayGene, Regensburg, April 2010.
2. **Schleider E**, Stahl S, Wüsthube J, Walter U, Fischer A, Felbor U. *CCM3* regulates endothelial cell proliferation, migration and tube formation and contributes to the PDK1/Akt pathway. Poster, 21. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Hamburg, März 2010.
3. **Schleider E**, Stahl S, Wüsthube J, Fischer A, Felbor U. *In vitro* modeling of *CCM3* function. Poster, 2nd International Symposium Molecular Basis of Organ Development in Vertebrates 2009, Würzburg, Oktober 2009.

4. Voss K, Stahl S, Hogan BM, Reinders J, **Schleider E**, Schulte-Merker S, Felbor U. Functional analyses of human and zebrafish 18 amino acid in-frame deletion pave the way for domain mapping of the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. Poster, *20. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik*, Aachen, April 2009.
5. **Schleider E**, Stahl S, Gaetzner S, Fischer A, Felbor U. *In vitro* modeling of CCM3 function. Poster, *4th International Symposium organized by the Students of the Graduate School of Life Sciences 2009*, Würzburg, März 2009.
6. **Schleider E**, *In vivo* and *in vitro* modeling of CCM3 function, Vortrag, *Retreat des Graduiertenkollegs 1048, Kleinwalsertal/Österreich*, Dezember 2008.
7. **Schleider E**, Stahl S, Gaetzner S, Voss K, Felbor U. CCM2 is the core molecule of the cerebral cavernous malformation protein complex. Poster, *European Life Scientist Organization Meeting 2008*, Nizza/Frankreich, September 2008.
8. Stahl S, Gätzner S, Voss K, **Schleider E**, Müller TD, Felbor U. CCM2 is the core molecule of the cerebral cavernous malformation protein complex. Poster, *19. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik*, Hannover, April 2008.
9. Voss K, Stahl S, **Schleider E**, Ullrich S, Nickel J, Müller TD, Felbor U. CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. Poster, *European Life Scientist Organization Meeting 2007*, Dresden, September 2007.
10. Voss K, **Schleider E**, Ullrich S, Stahl S, Felbor U. Functional characterization of *CCM1* missense mutations. Poster, *18. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik*, Bonn, März 2007.

Würzburg, den 23.06.2010

Erklärung

Erklärung gemäß §4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. März 1999:

1. Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.
2. Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.
3. Weiterhin erkläre ich, dass ich außer den mit Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben, oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den

Elisa Schleider

Mein herzlicher Dank geht an...

...Prof. Dr. med. Ute Felbor. Ihr gebührt der größte Dank! Für die Überlassung dieses spannendes Themas, für die gesamte Betreuung dieser Dissertation, für das mir entgegengebrachte Engagement und für ihr großes Vertrauen.

...Prof. Dr. med. Ricardo Benavente und Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brand für die freundliche Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens und für die netten, hilfreichen Gespräche während unserer gemeinsamen Zeit im Graduiertenkolleg 1048.

...Prof. Dr. med. Holger Höhn sowie Prof. Dr. med. Ulrich Walter. Ihnen danke ich jeweils für die freundliche Aufnahme in ihre Labor- und Büroräume in der Humangenetik beziehungsweise der klinischen Biochemie.

...meine Arbeitsgruppe, bestehend aus Dr. rer. nat. Sonja Stahl und Sabine Gätzner, sowie den Ehemaligen Dr. rer. nat. Katrin Voss, Bettina Brackertz, Juliane Kläs und Sybille Ullrich für alle großen und kleinen Hilfen im Laboralltag. Liebe Sonja, liebe Sabine, DANKE im Besonderen euch beiden für diese intensiven Jahre und eure uneingeschränkte Hilfe bei allem!!

...das gesamte Graduiertenkolleg 1048 für die Förderung dieser Arbeit und dafür, dass mir die Möglichkeit gegeben wurde an diverse Seminaren und Kongressen teilzuhaben. Bei all meinen Mitkollegiaten möchte ich mich außerdem für unsere gemeinsame Zeit im „Vertebrate Club“ bedanken. Ein ganz besonderer Dank geht hier auch an Gabriele Heilmann für ihre gute Zusammenarbeit und ihre oft erfrischend unbürokratischen, schnellen Hilfen.

...meine „zweite“ Arbeitsgruppe um Dr. med. Andreas Fischer von der Abteilung für vaskuläre Biologie und Tumorangio-genese des „Center for Biomedicine and Medical Technology Mannheim“ CBTM und des deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg. Sie haben maßgeblich am Erfolg dieser Arbeit teil gehabt und mich vor Ort in die Welt der Angiogenese *in vitro* Assays und der viralen Transduktion eingeführt. Ein ganz besonderer Dank geht hierbei an Joycelyn Wüstehube, die mir zurück in Würzburg oft gefehlt hat.

...die Mitglieder des Lehrstuhls für Humangenetik und alle Mitglieder unseres neuen Schaffensortes am Institut für klinische Biochemie/Haus Auvera. Die letzten Monate haben einen neuen Maßstab in Sachen Kollegialität gesetzt. Vielen Dank, dass ich daran teilhaben durfte!

...alle meine Freunde und meine gesamte Familie. Ihr macht mich stolz und unglaublich glücklich!

...Torsten, für ALLES.

Anlage 1

RESEARCH ARTICLE

Novel CCM1, CCM2, and CCM3 Mutations in Patients With Cerebral Cavernous Malformations: In-Frame Deletion in CCM2 Prevents Formation of a CCM1/CCM2/CCM3 Protein Complex

Sonja Stahl,¹ Sabine Gaetzner,¹ Katrin Voss,¹ Bettina Brackertz,¹ Elisa Schleider,¹ Oguzkan Sürücü,² Ekkehard Kunze,³ Christian Netzer,⁴ Christoph Korenke,⁵ Ulrich Finckh,⁶ Mario Habek,⁷ Zdravka Poljakovic,⁷ Miriam Elbracht,⁸ Sabine Rudnik-Schöneborn,⁸ Helmut Bertalanffy,² Ulrich Sure,⁹ and Ute Felbor^{1*}

¹Department of Human Genetics, University of Würzburg, Würzburg, Germany; ²Department of Neurosurgery, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland; ³Department of Neurosurgery, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany; ⁴Institute of Human Genetics, Institute for Genetics, University of Cologne, Cologne, Germany; ⁵Department of Pediatrics, Klinikum Oldenburg, Oldenburg, Germany; ⁶Laboratoriumsmedizin Dortmund, Dortmund, Germany; ⁷Department of Neurology, Zagreb School of Medicine, Zagreb, Croatia; ⁸Institute of Human Genetics, University Hospital, RWTH Aachen University, Aachen, Germany; ⁹Department of Neurosurgery, University of Marburg, Marburg, Germany

Communicated by Peter Oefner

Cerebral cavernous malformations (CCM) are prevalent cerebrovascular lesions predisposing to chronic headaches, epilepsy, and hemorrhagic stroke. Using a combination of direct sequencing and MLPA analyses, we identified 15 novel and eight previously published CCM1 (*KRIT1*), CCM2, and CCM3 (*PDCD10*) mutations. The mutation detection rate was >90% for familial cases and >60% for isolated cases with multiple malformations. Splice site mutations constituted almost 20% of all CCM mutations identified. One of these proved to be a de novo mutation of the most 3' acceptor splice site of the CCM1 gene resulting in retention of intron 19. A further mutation affected the 3' splice site of CCM2 intron 2 leading to cryptic splice site utilization in both CCM2 and its transcript variant lacking exon 2. With the exception of one in-frame deletion of CCM2 exon 2, which corresponds to the naturally occurring splice variant of CCM2 on the RNA level and is predicted to result in the omission of 58 amino acids (CCM2:p.P11_K68del), all mutations lead to the introduction of premature stop codons. To gain insight into the likely mechanisms underlying the only known CCM2 in-frame deletion, we analyzed the functional consequences of loss of CCM2 exon 2. The CCM2:p.P11_K68del protein could be expressed in cell culture and complexed with CCM3. However, its ability to interact with CCM1 and to form a CCM1/CCM2/CCM3 complex was lost. These data are in agreement with a loss-of-function mechanism for CCM mutations, uncover an N-terminal CCM2 domain required for CCM1 binding, and demonstrate full-length CCM2 as the essential core protein in the CCM1/CCM2/CCM3 complex. *Hum Mutat* 29(5), 709–717, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: cerebral cavernous malformation; CCM1; CCM2; CCM3

INTRODUCTION

Cerebral cavernous malformations (CCM; MIM#s 116860, 603284, and 603285) are vascular lesions composed of densely packed, dilated vascular channels that lack components of organized mature vessel walls such as smooth muscle cells and intact endothelial cell–cell junctions. Growth of these slow-flow lesions and repeated hemorrhages clinically manifest as chronic headaches, epilepsy, and hemorrhagic stroke, mostly during the second to fourth decade of life [Labauge et al., 2007; Revencu and Vikkula, 2006]. Autosomal dominantly inherited familial CCM has been estimated to occur with a frequency of 1:2,000–1:10,000 and is generally associated with the occurrence of multiple CCMs. In addition to a heterozygous germline mutation in 1 out of 3 genes, CCM1 [Laberge-le Couteulx et al., 1999], CCM2 [Liquori

et al., 2003], or CCM3 [Bergametti et al., 2005], a second somatic mutation appears to be required for lesion genesis [Gault et al., 2005; Kehrer-Sawatzki et al., 2002]. Apart from very few

Received 29 August 2007; accepted revised manuscript 29 November 2007.

*Correspondence to: Ute Felbor, Department of Human Genetics, University of Würzburg, Biozentrum, Am Hubland, D-97074 Würzburg, Germany. E-mail: felbor@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Grant sponsors: Bavarian Genome Network; Deutsche Forschungsgemeinschaft: Emmy Noether grant number Fe 432/6-5 and Graduiertenkolleg 1048.

DOI 10.1002/humu.20712

Published online 25 February 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

exceptions, mutations in CCM genes are truncating or the result of large genomic rearrangements. While this facilitates medical genetic counseling, this does not provide a basis for structural and functional analyses of the CCM proteins.

The 84-kDa CCM1 gene product CCM1 (KRIT1) was originally identified and later confirmed as a RAP1A interactor [Béraud-Dufour et al., 2007; Serebriiskii et al., 1997; Wohlgenuth et al., 2005] (our unpublished results). RAP1A is a member of the Ras superfamily and requires CCM1 for maintaining the integrity of endothelial junctions [Glading et al., 2007]. CCM1 also binds to integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 α (ICAP-1 α) through its most N-terminal NPXY motif [Zawistowski et al., 2002; Zhang et al., 2001]. Furthermore, CCM1 is a yeast two-hybrid interactor of CCM2 [Zhang et al., 2007]. The murine ortholog of 50-kDa CCM2 (OSM) is a scaffold protein for MEKK3 within the stress-activated p38 MAPK signaling cascade [Uhlík et al., 2003], and the phosphotyrosine binding domain (PTB) of CCM2 has been reported to be important for the CCM1/CCM2 association [Zawistowski et al., 2005]. Recently, we have shown that CCM2 interacts with 25-kDa CCM3 (PDCD10) and that this interaction is increased in the presence of CCM1 [Voss et al., 2007].

We present here a total of 23 CCM mutations comprising nine stop, eight frameshift, and four splice site mutations as well as two genomic deletions. With the help of the only known human in-frame deletion within the CCM2 gene which leads to lack of the 58 amino acids encoded by exon 2 (CCM2:p.P11_K68del), we show that this domain located N-terminally to the PTB domain is critical for CCM1 binding and for linking CCM1 with CCM3: While deletion of amino acids 11–68 does not impair formation of a CCM2/CCM3 complex, it prevents formation of a CCM1/CCM2 and of a ternary CCM1/CCM2/CCM3 complex.

MATERIALS AND METHODS

Mutation and Transcript Analyses

Genetic testing was approved by local ethics committees (University of Würzburg, Study 21/05) and performed with informed consent. Direct sequencing of all coding CCM1, CCM2, and CCM3 exons including adjacent splice sites and subsequent screening for large CCM alterations using the SALSA MLPA Kits P130 & P131 CCM (MRC Holland, Amsterdam, Netherlands) were performed as described [Gaetner et al., 2007]. For paternity testing, the PowerPlex[®] 16 system (Promega, Mannheim, Germany) was used.

Total RNA was extracted with TRIZOL[®] reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) from cultured lymphocytes immortalized with the Epstein-Barr virus for the patient carrying the de novo c.2143–2A>G CCM1 mutation and the affected individual harboring a heterozygous deletion of CCM2 exon 2. For the CCM2:c.205–1₂delinsT mutation carrier, RNA was extracted from untreated peripheral blood lymphocytes using the PAXgene Blood RNA kit (PreAnalytiX, Qiagen, Hilden, Germany). cDNA was synthesized using SuperScript[™] III Reverse Transcriptase (Invitrogen). CCM1 intron 19 was amplified using a cDNA-specific forward primer complementary to the exon 18/exon 19 junction (5'-ATGGAACTAAGGCTTTACTC-3') and allele-specific reverse primers (wild-type: 5'-TTACCACGAGAC-CAGCCT-3'; mutant: 5'-TTACCACGAGACCAGCCC-3') and directly sequenced. Exons 1–4 of the CCM2 gene were amplified using primers 5'-GCGGCGATATGGAAGAGG-3' [Denier et al., 2004] and 5'-GCACCCTGAGGATGATATC-3'. PCR-products were size-separated by agarose gel electrophoresis prior to TA-cloning (Invitrogen) and sequencing.

GenBank accession numbers are as follows: CCM1, NM_194456.1; CCM2, NM_031443.3; and CCM3, NM_007217.3. DNA mutation numbering is based on cDNA sequence with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon.

Protein Expression, Coimmunoprecipitation, and Glutathione S Transferase (GST) Pull-Down Experiments

For expression in HEK293 cells, PCR-amplified full-length human CCM1, CCM2, and CCM3 were cloned into the *NheI* and *NotI* sites of the pIRESneo-derived vector VP5, which allows expression of N-terminal FLAG/HA tagged fusion proteins (FLAG-CCM1, FLAG-CCM2, and FLAG-CCM3) as described previously [Voss et al., 2007]. Similarly, CCM1, the C-terminally altered CCM1 coding sequence of Patient 14 (using the allele-specific reverse primer 5'-CGC CTC GAG GCA CAC AAT AGT TTA TGA AGT CCA A-3'), CCM2, and CCM2 lacking exon 2 (derived from control cDNA) were PCR-cloned into the *EcoRI* and *XhoI* sites of pcDNA3.1myc/His-B (Invitrogen), which allows expression of myc/His tagged CCM1, CCM1:p.A715VfsX14, CCM2, and CCM2:p.P11_K68del (myc-CCM1, myc-CCM1:p.A715VfsX14, myc-CCM2, myc-CCM2:p.P11_K68del). After QuickChange[™] site-directed mutagenesis (Stratagene, Amsterdam, Netherlands), the PTB domain mutants CCM2:p.L198R and CCM2:p.F217A were also cloned into pcDNA3.1 myc/His-B (Invitrogen). Furthermore, pcDNA3.1 constructs for expression of HA-CCM2, HA-CCM2:p.P11_K68del, and FLAG-CCM3 were generated by PCR-cloning using a 5' primer containing the coding sequences for the HA or FLAG tag, respectively.

HEK293 cells were transiently transfected with the indicated constructs using FuGene6[™] (Roche, Mannheim, Germany) and harvested 48 hr after transfection. Coimmunoprecipitation experiments were performed as described [Voss et al., 2007]. In brief, precleared lysates were incubated with either anti-FLAG M2 agarose (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) or α -c-myc antibody (Sigma-Aldrich) coupled to protein A sepharose beads (Sigma-Aldrich) for 2 hr overhead at 4°C. After extensive washing, 2 \times Laemmli buffer was added and samples were boiled for 10 min at 100°C. For Western blot analyses, cell lysates and immunoprecipitation (IP) eluates were subjected to 5–20% gradient SDS-PAGE, immobilized on a nitrocellulose membrane, and probed with rabbit polyclonal anti-c-myc (1:1,000; Sigma-Aldrich) or primary mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibodies (1:1,000; Sigma-Aldrich). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase were obtained from Dianova (Hamburg, Germany). Glutathione S transferase (GST) pull-down experiments were performed exactly as described in Voss et al. [2007].

RESULTS

Over 90% of Familial Cases Harbor a Mutation in CCM1, CCM2, or CCM3

Based on family history and clinical examination, our cohort initially consisted of 16 familial and 12 isolated cases. Mutations were identified in 15 out of 16 (94%) familial and 8 out of 12 (67%) isolated subjects (Table 1). Genetic analyses revealed that the mutations of two of the isolated cases (Patients 5 and 8; Table 1) had in fact been inherited from a silent carrier parent while one isolated case proved to be truly sporadic (Patient 13; Table 1). Thus, the proportion of mutations for CCM families was 56% (10/18) for CCM1, 33% (6/18) for CCM2, and 6% (1/18) for CCM3. A total of nine stop, eight frameshift, and four splice-site

TABLE 1. *CCM1*, *CCM2*, and *CCM3* Gene Mutations Identified in This Study*

Patient	Presentation	Gene	Exon	Nucleotide change	Amino acid change	Type of mutation	Reference
1	Familial	<i>CCM1</i>	Deletion of entire <i>CCM1</i> gene				Gaetzner et al. [2007]
2	Isolated	<i>CCM1</i>	12	c.1066_1070dupATTTC	p.P358VfsX15	Frameshift	Novel
3	Isolated	<i>CCM1</i>	13	c.1201_1204delCAAA	p.Q401TfsX10	Frameshift	Novel
4	Familial	<i>CCM1</i>	13	c.1246_1249del	p.K416HfsX19	Frameshift	Novel
5	Familial	<i>CCM1</i>	13	c.1253del	p.P417HfsX19	Frameshift	Novel
6	Familial	<i>CCM1</i>	Intron 13	c.1255-4_1255-2del	p.?	Splice	Verlaan et al. [2002]
7	Familial	<i>CCM1</i>	14	c.1258G>T	p.E420X	Stop	Novel
8	Familial	<i>CCM1</i>	16	c.1678C>T	p.Q560X	Stop	Novel
9	Familial	<i>CCM1</i>	16	c.1683_1684insA	p.V562SfsX6	Frameshift	Sürücü et al. [2006]
10	Isolated	<i>CCM1</i>	16	c.1710_1711insA	p.H571TfsX8	Frameshift	Novel
11	Familial	<i>CCM1</i>	17	c.1780_1783delinsTACCTGTACCAAA	p.A594YfsX14	Frameshift	Sürücü et al. [2007]
12	Familial	<i>CCM1</i>	17	c.1815C>G	p.Y605X	Stop	Novel
13	Familial	<i>CCM1</i>	18	c.1877T>A	p.L626X	Stop	Novel
14	Sporadic	<i>CCM1</i>	Intron 19	c.2143-2A>G	p.A715VfsX14	Splice	Novel
15	Familial	<i>CCM2</i>	Intron 1	c.30+1G>A	p.?	Splice	Verlaan et al. [2004]
16	Familial	<i>CCM2</i>	2	c.55C>T ^a	p.R19X	Stop	Verlaan et al. [2004]
17	Isolated	<i>CCM2</i>	2	c.55C>T ^a	p.R19X	Stop	Verlaan et al. [2004]
18	Isolated	<i>CCM2</i>	2	c.31-?_204+?del	p.P11_K68del	Deletion in-frame	Liquori et al. [2007]
19	Familial	<i>CCM2</i>	Intron 2	c.205-1_2delinsT	p.Y69VfsX3; p.Y11VfsX3	Splice	Novel
20	Familial	<i>CCM2</i>	4	c.353_354insA	p.Y118X	Stop	Novel
21	Familial	<i>CCM2</i>	5	c.475C>T	p.Q159X	Stop	Novel
22	Familial	<i>CCM2</i>	6	c.622G>T	p.E208X	Stop	Novel
23	Familial	<i>CCM3</i>	7	c.350_351insT	p.D118RfsX2	Frameshift	Novel

*GenBank accession numbers: *CCM1*: NM_194456.1, *CCM2*: NM_031443.3, and *CCM3*: NM_007217.3. DNA mutation numbering is based on cDNA sequence with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon.

^aEthnic origin different: German vs. Asian. Since this mutation occurred at a CpG dinucleotide, this base may be highly mutable.

mutations were identified by direct sequencing while two genomic deletions were only detected with the MLPA method (Patients 1 and 18; Table 1). Consistent with the literature [Felbor et al., 2006], close to one-fifth of CCM mutations affected invariant splice consensus sequences. Of the four splicing errors identified in the present study, two had previously been reported to be associated with CCM pathology. The two novel splice site mutations as well as the only in-frame deletion discovered in this study were characterized in more detail.

Retention of *CCM1* Intron 19 Due to a De Novo c.2143-2A>G Splice Site Mutation: Reduced Expression of *CCM1*:p.A715VfsX14 In Vitro

The first proband (Patient 14; Table 1) is a 15-year-old girl who presented with a 4-month history of progressive proximal paresis of the left arm preceded by an intermittent right-sided dysesthesia for 4 years. Correspondingly, magnetic resonance imaging revealed a large cavernous malformation within the right central sulcus (Fig. 1A) and multiple clinically asymptomatic lesions in both cerebral hemispheres (data not shown). The symptomatic lesion was completely excised by microsurgery without morbidity for the patient who is the only affected individual in her family (Fig. 1B). Direct sequencing and MLPA analyses of the entire *CCM1*, *CCM2*, and *CCM3* coding regions revealed an A to G transition disrupting the conserved AG dinucleotide in the acceptor splice site of *CCM1* intron 19 (Fig. 1C and D). This mutation is not present in the parents and sisters (data not shown). Since paternity was confirmed (data not shown), this patient carries a de novo mutation. Transcript analyses demonstrated the presence of intron 19 in the affected individual's cDNA (Fig. 1E and F). The predicted altered C-terminus lacks 22 amino acids. Instead, 13 different amino acids are introduced prior to the occurrence of a

new stop codon (Fig. 1D). This alteration of the C-terminus of the *CCM1* protein, *CCM1*:p.A715VfsX14, did result in reduced protein expression, decreased binding to *CCM2*, and reduced *CCM1*/*CCM2*/*CCM3* complex formation in vitro (see Fig. 5B).

CCM2:c.205-1_2delinsT Leads to Use of an Alternative Splice Acceptor in Both *CCM2* and the *CCM2* Transcript Variant Lacking Exon 2

The second individual is a 32-year-old male manifesting with ataxia, left-sided dysmetria, dysidiadochokinesis, and sudden severe nausea at the age of 28 years (Patient 19; Table 1). Subsequently, a large cerebellar cavernoma was resected. Two years later, two further lesions were excised microsurgically because of repeated hemorrhages and growth of the lesions. The patient's mother had been diagnosed to carry multiple CCMs at the age of 56 years when she had experienced reversible loss of vision.

Direct sequencing detected a mutation that affects the invariant splice consensus sequence at the 3' end of intron 2 of the *CCM2* gene (c.205-1_2delinsT; Fig. 2A and B). In accordance with the predicted effect of this mutation by www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html, experimental analyses of the full-length *CCM2* transcript confirmed that an illegitimate splice site within exon 3 is selected (Fig. 2B). Since this splice acceptor is located seven nucleotides downstream of the original acceptor, the splicing defect leads to a frameshift resulting in premature termination of the coding sequence after the introduction of two altered amino acids (p.Y69VfsX3; Fig. 2B).

Interestingly, the 3' splice site mutation of *CCM2* intron 2 also affects correct splicing of the widely expressed *CCM2* transcript variant lacking exon 2. The transcript variant is predicted to produce a 386-amino acid *CCM2* isoform lacking 58 amino acids. Subcloning and sequencing of the proband's smaller transcript

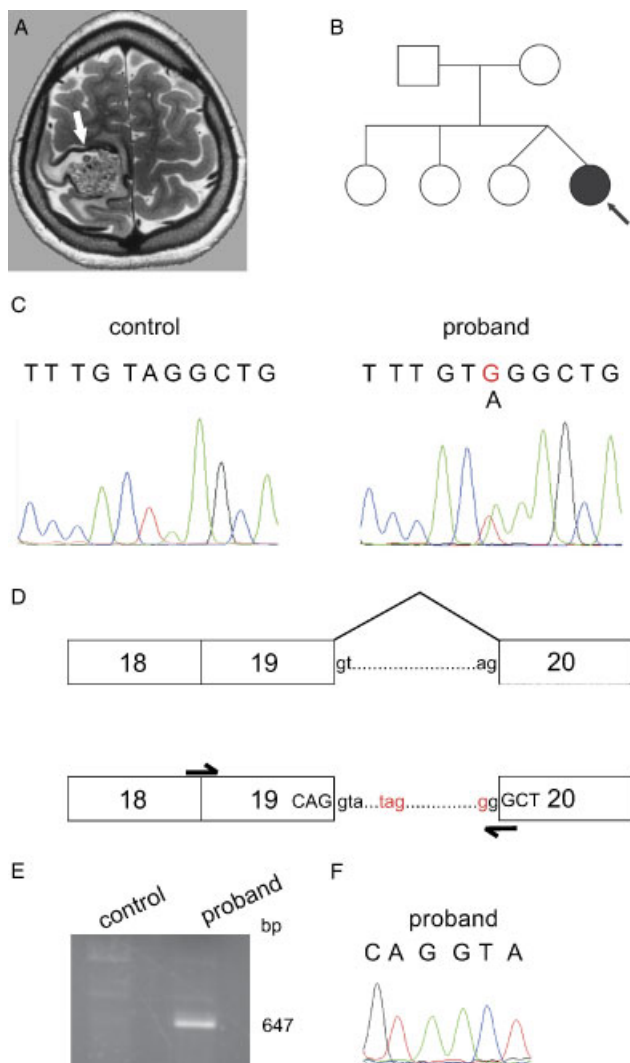


FIGURE 1. De novo c.2143–2A>G splice site mutation resulting in retention of CCM1 intron 19. **A:** T2-weighted magnetic resonance imaging of the 15-year-old proband showed a large cavernous malformation (arrow) within the right central sulcus displaying the typical black hemosiderin rim caused by repeated hemorrhages. **B:** Pedigree demonstrating that the proband is an isolated case. **C,D:** Sequencing revealed a novel c.2143–2A>G splice site mutation. **E:** Allele-specific PCR from lymphocyte cDNA yields a specific 647-bp product only in the proband suggesting the inclusion of intron 19. **F:** Electropherogram illustrating the junction between exon 19 and intron 19 in the pathogenic transcript. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://www.interscience.wiley.com>.]

variant (Fig. 2C) revealed that 52% of the clones were incorrectly spliced again resulting in a frameshift and a premature stop (p.Y11VfsX3; Fig. 2D).

Genomic Deletion of CCM2 Exon 2 Confirmed by Transcript Analysis

In a further isolated case with multiple lesions but negative sequencing results (Patient 18; Table 1), a heterozygous deletion of CCM2 exon 2 was reproducibly found with two adjacent MLPA probes designed for CCM2 exon 2 (Fig. 3A) while all other CCM1, CCM2, and CCM3 peaks and ratios did not differ between patient and controls (Fig. 3B). This 35-year-old female patient had experienced generalized seizures at the age of 30 years

and successfully underwent neurosurgical therapy of the epileptogenic lesion. Three remaining asymptomatic cavernous lesions in the pons, the basal ganglia, and the frontoorbital gyrus are monitored by MRT annually (Fig. 3C). Her father had died of cancer. MLPA analyses of her clinically unaffected mother did not show the proband's deletion. Thus, concurrent appearance of the CCM phenotype with a de novo mutation could not be demonstrated for this patient.

Both the proband and her mother are heterozygous for SNP rs11552377 in exon 4 of the CCM2 gene (c.358G>A), which allowed independent confirmation of the deletion detected by MLPA. PCR-amplification of the proband's CCM2 cDNA resulted in two products corresponding to the size of CCM2 and its transcript variant lacking exon 2 [Denier et al., 2004]. The intensity of the proband's full-length CCM2 transcript was decreased when compared to controls carrying two full-length CCM2 genes (Fig. 3D). Instead, the band corresponding to the shorter transcript variant lacking exon 2 was stronger in the proband carrying the genomic deletion of exon 2 when compared to controls with an alternatively spliced CCM2 transcript only. Subcloning and sequencing of both transcripts revealed that the proband's wild-type allele carried an A at SNP rs11552377 in exon 4 of the CCM2 gene (c.358G>A) while the in-frame deletion of exon 2 was located on the G allele. Thus, the transcript variant generated by alternative splicing is characterized by the c.358G>A substitution and can be distinguished from the transcript derived from the deleted G allele in this patient (Fig. 3E). Otherwise, both transcripts showed exactly the same in-frame omission of the entire exon 2 sequence, which consists of 174 nucleotides. 90% of the clones representing the smaller transcript were in fact derived from the proband's deleted allele. Alternative splicing was only identified in 10% of clones.

Interaction of CCM2:p.P11_K68del With CCM1 Is Impaired, Resulting in the Inability to Form a CCM1/CCM2/CCM3 Complex

The genomic deletion of exon 2 of the CCM2 gene (seen in Patient 18, in Table 1, and illustrated in Fig. 3) as well as skipping of exon 2 in the ubiquitously occurring transcript variant [Denier et al., 2004] are predicted to result in the omission of 58 amino acids (CCM2:p.P11_K68del). Compared with 50-kDa CCM2, CCM2:p.P11_K68del migrated at about 44 kDa in overexpression experiments (Fig. 4). To assess whether CCM2:p.P11_K68del coimmunoprecipitates with CCM1 and CCM3, we coexpressed myc-CCM2:p.P11_K68del with either FLAG-CCM1 (Fig. 4A) or FLAG-CCM3 (Fig. 4B) and performed coimmunoprecipitation studies. The interaction of myc-CCM2 with FLAG-CCM1 or FLAG-CCM3 was used as positive control (Fig. 4A and B; lane 2). FLAG-CCM3 coimmunoprecipitated with myc-CCM2:p.P11_K68del (Fig. 4B; lane 3) whereas FLAG-CCM1 did not (Fig. 4A; lane 3). Only upon long exposure, a faint myc-CCM2:p.P11_K68del band became visible (Fig. 4A; lane 3) comparable to those obtained with the PTB domain mutants CCM2:p.L198R and CCM2:p.F217A (Fig. 4A; lanes 4 and 5). While these point mutations had previously been described to abrogate CCM1/CCM2 complex formation [Zawistowski et al. 2005], we show here that the respective mutants retain their ability to interact with CCM3 (Fig. 4B; lanes 4 and 5).

Since these data imply that CCM2 is capable to simultaneously interact with CCM1 and CCM3, we next demonstrated that CCM1, CCM2, and CCM3 in fact form a ternary complex (Fig. 5). For GST pull-down experiments (Fig. 5A), HEK293 cells were

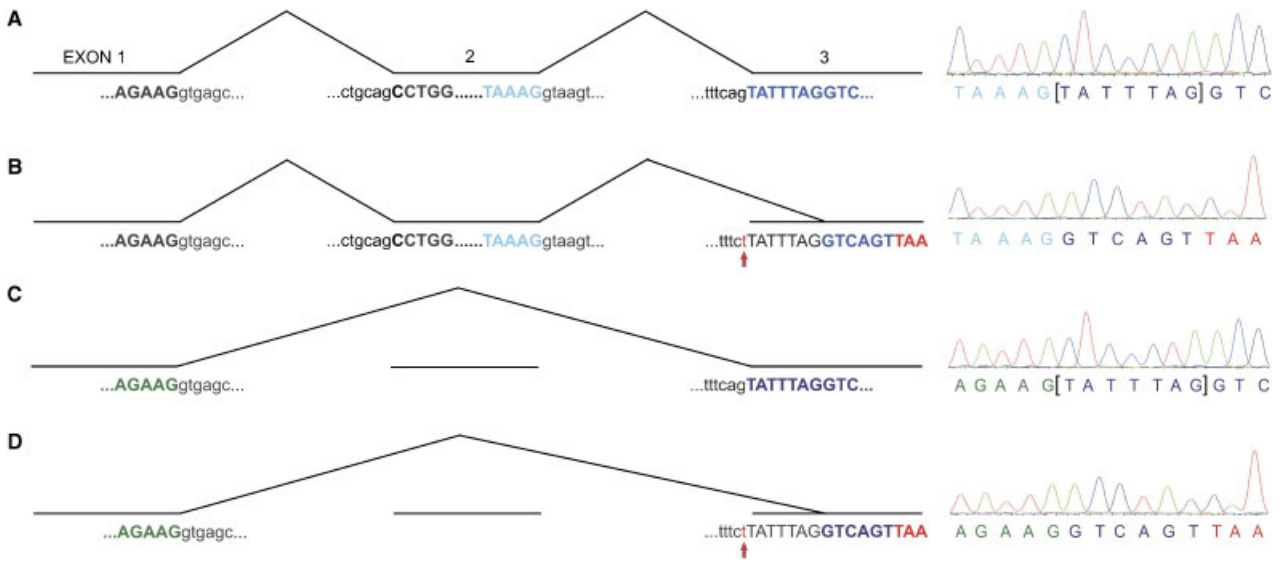


FIGURE 2. Schematic presentation of splicing errors introduced on account of *CCM2:c.205-1_2delinsT*. **A:** Regular splicing and electropherogram of the full-length wild-type *CCM2* transcript (omitted sequence in **(B,D)** is marked by brackets). **B:** Aberrant splicing of the mutant allele (red T at 3' splice acceptor) results in a premature TAA stop codon (red) in the pathogenic transcript. **C:** Alternative splicing leads to complete skipping of exon 2. **D:** Aberrant alternative splicing of the mutant allele.

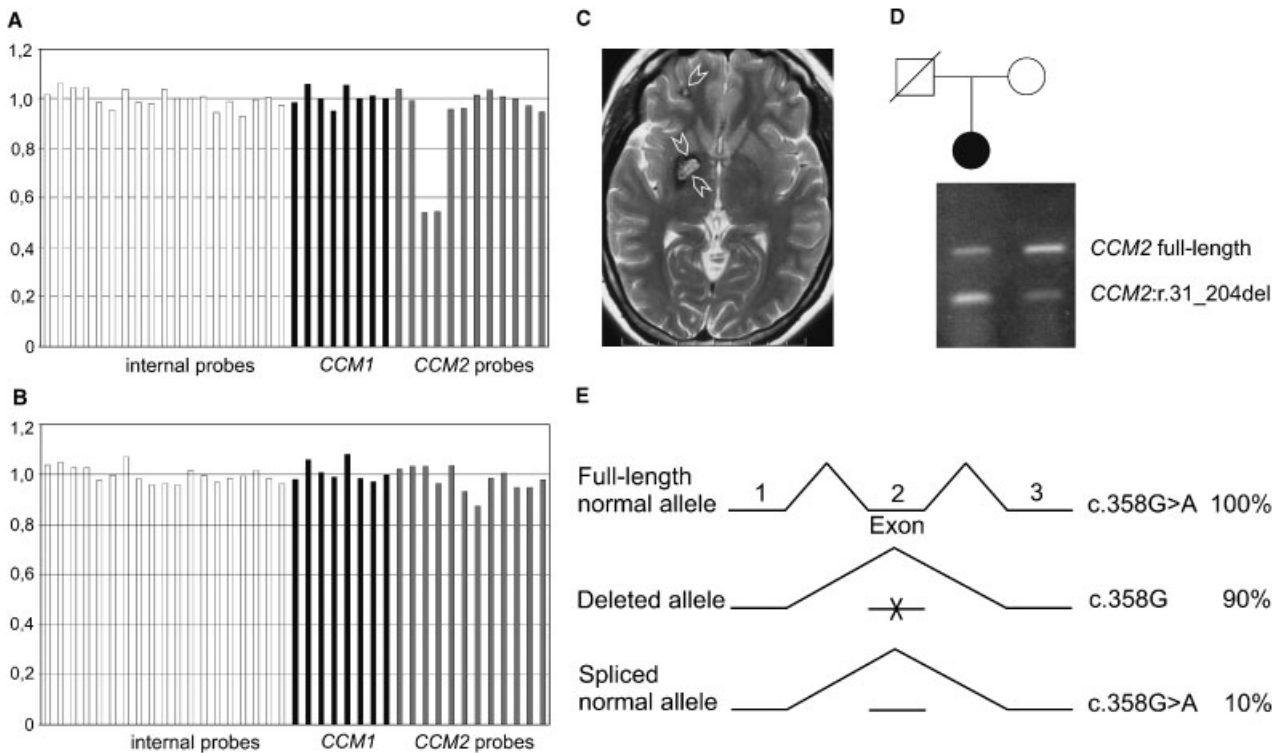


FIGURE 3. MLPA analysis demonstrating reduced peaks for two adjacent *CCM2* exon 2 probes in the proband (**A**) when compared to a control (**B**). **C:** The T2-weighted MR image shows 2 of the remaining 3 cavernomas in the right basal ganglia and the right fronto-orbital cortex (white arrowheads). **D:** The intensity of the band corresponding to the proband's full-length *CCM2* transcript was decreased while the signal corresponding to the shorter transcript lacking exon 2 was increased when compared to the proband's mother who carries two full-length *CCM2* genes. **E:** Schematic presentation of the full-length (all clones containing the proband's full-length *CCM2* allele (see **D**) have the c.358G>A SNP), deleted (90% of clones harboring *CCM2*:r.31_204del), and alternatively spliced (10% of *CCM2*:r.31_204del clones) *CCM2* transcripts observed in the proband.

transiently cotransfected with FLAG-CCM1 and myc-CCM2 or mutant myc-CCM2:p.P11_K68del, respectively, and lysates were exposed to GST-CCM3 as well as to the controls GST and

sepharose beads. GST-CCM3, but not the controls, was able to pull down FLAG-CCM1 only in the presence of intact myc-CCM2. Coexpression of mutant myc-CCM2:p.P11_K68del with

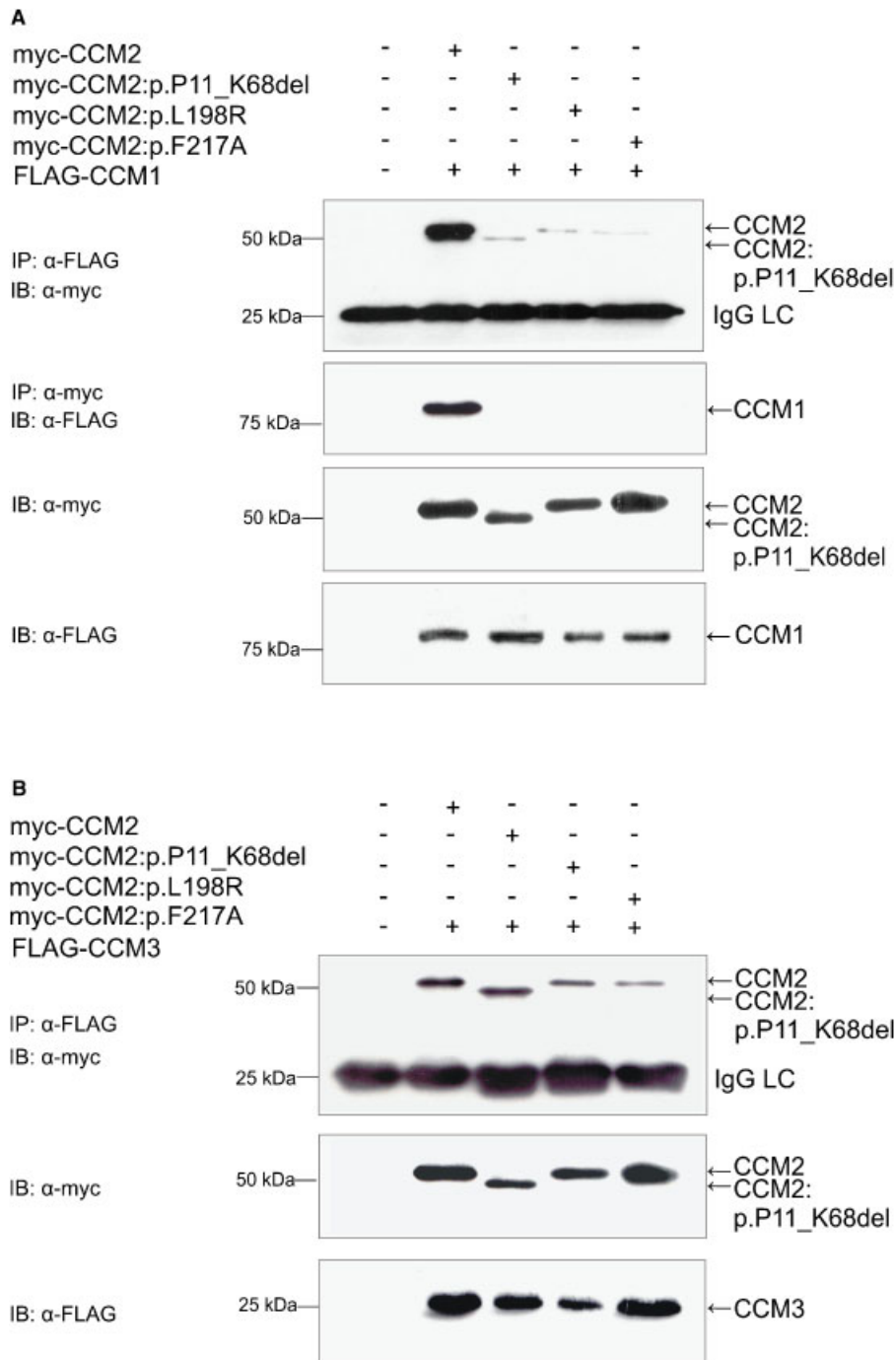


FIGURE 4. Impaired interaction of CCM1 with CCM2:p.P11_K68del. A,B: Coimmunoprecipitation experiments (IP) of HEK293 cells transiently coexpressing the indicated plasmids were performed and analyzed by Western blotting (IB). Cotransfection of empty myc- and FLAG-vectors (A,B; lanes 1) or transfection of FLAG-CCM1 with the PTB domain point mutations myc-CCM2:p.L198R and myc-CCM2:p.F217A (A; lanes 4 and 5) were used as negative controls. Coimmunoprecipitation of myc-CCM2 with FLAG-CCM1 (A; lane 2) or FLAG-CCM3 (B; lane 2) served as positive controls. Myc-CCM2:p.P11_K68del did not (A; lane 3) coprecipitate with FLAG-CCM1 whereas coprecipitation of FLAG-CCM3 with myc-CCM2:p.P11_K68del was not altered (B; lane 3). Western blot analyses of IgG bands at 25 kDa (A,B; upper panels) and of cell lysates (A,B; the two lower panels) served as loading and expression controls.

FLAG-CCM1 resulted in the absence of the ternary complex. Consistent with our coimmunoprecipitation experiments, GST-CCM3 complexed with myc-CCM2 and mutant myc-CCM2:p.P11_K68del but not with FLAG-CCM1 in the absence of myc-CCM2. In order to further prove the existence of a ternary complex, HA-tagged CCM2 and CCM2:p.P11_K68del were generated. Again, coimmunoprecipitation experiments demon-

strated that CCM3 was only able to form a complex with CCM2 and CCM1 or CCM2 and CCM1:p.A715Vfsx14 (seen in Patient 14, in Table 1, and illustrated in Fig. 1) if intact HA-tagged CCM2 was cotransfected with myc-CCM1 or myc-CCM1:p.A715Vfsx14 and FLAG-CCM3 (Fig. 5B). Taken together, the interaction between CCM1 and CCM3 proteins depends on the presence of intact CCM2.

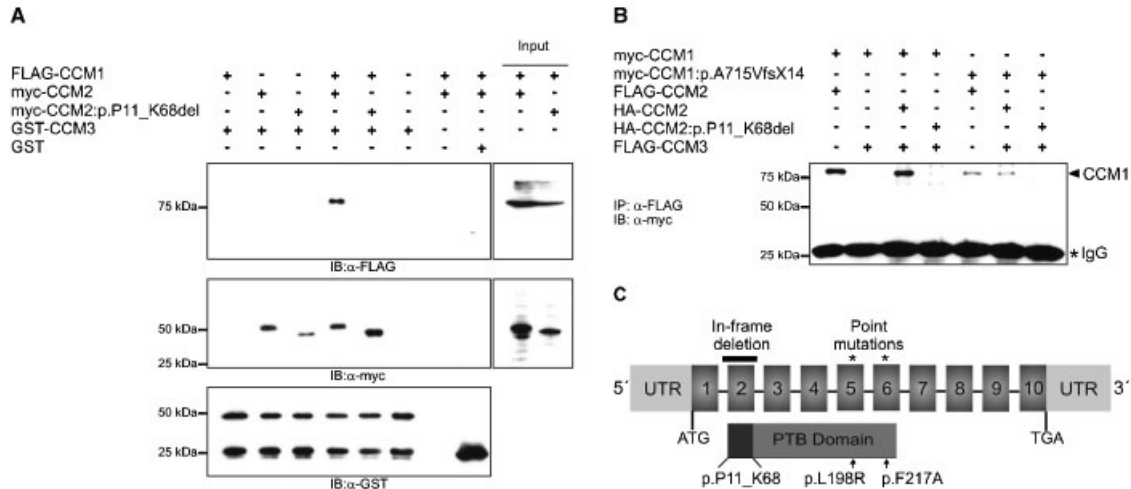


FIGURE 5. The formation of a ternary CCM1/CCM2/CCM3 complex is impaired if mutant CCM2:p.P11_K68del is overexpressed instead of CCM2. **A:** GST-CCM3 (lanes 1–6), sepharose alone (lane 7), and immobilized GST alone (lane 8) were incubated with HEK293 cell lysates (input) expressing the indicated proteins and subjected to SDS-PAGE. Western blot analyses with an anti-FLAG (α -FLAG) antibody demonstrated that FLAG-CCM1 was only pulled down by GST-CCM3 if intact myc-CCM2 was coexpressed (upper panel, lane 4). An anti-myc antibody confirmed that GST-CCM3 did complex with myc-CCM2 and mutant myc-CCM2:p.P11_K68del (middle panel). Western blot analysis using an anti-GST antibody proved the presence of GST-CCM3, which is partially cleaved (lower panel). **B:** Coimmunoprecipitation using anti-FLAG agarose revealed that CCM3 complexes with CCM1 or CCM1:p.A715VfsX14 only in the presence of intact HA-CCM2 (lanes 3 and 6) and not in the presence of HA-CCM2:p.P11_K68del (lanes 4 and 7). FLAG-tagged CCM2 was used in lanes 1 and 5 only demonstrating that CCM1:p.A715VfsX14 binds to CCM2 albeit with reduced efficiency due to decreased expression of the mutant CCM1 protein. IgG bands at 25 kDa served as loading controls. **C:** Schematic localization of the N-terminal CCM2 domain encoded by exon 2 of the CCM2 gene. This CCM1 interacting domain is adjacent to the PTB domain previously studied with help of the two point mutations indicated.

DISCUSSION

Mutation Detection Rates Differ for Familial and Isolated CCM

The sporadic case harboring a c.2143–2A>G splice site mutation in the *CCM1* gene (Patient 14; Table 1) is the sixth patient with a proven de novo mutation among the almost 200 CCM mutations reported thus far. One of the previously described truly sporadic cases also carried a *CCM1* mutation [Lucas et al., 2001], the four others a *CCM3* mutation [Bergametti et al., 2005; Liquori et al., 2006]. In an attempt to elucidate whether the isolated cases presented in this study were inherited or are de novo, an aspect of CCM genetics important in the context of genetic counseling of the respective individuals and their families, we have made some effort to get back to the patients and their families. However, most are currently unavailable or noninformative either due to the fact that at least one parent had died (e.g., Patient 18; Table 1) or did not consent to predictive genetic or neuroradiological testing. In addition, several patients did not wish to involve their parents or did not maintain contact with them. However, the known incomplete penetrance, the high inter- and intrafamilial variability of the disease, and the rare occurrence of nonreproductivity are reasonable explanations for the limited description of de novo mutations. Furthermore, a systematic analysis of a French cohort of 22 isolated probands with multiple CCMs demonstrated that 75% of cases were in fact inherited through an asymptomatic parent as determined by neuroimaging [Labauge et al., 1998]. Thus, most seemingly isolated cases are in fact familial.

Consistent with a previous study [Denier et al., 2006], the mutation detection rate for familial CCM was 94% in our cohort. The only index case without a thus far identified mutation may carry a mutation within regulatory elements of *CCM1-3*, within

deep intronic *CCM1-3* regions relevant for correct splicing or within a fourth CCM gene. While the majority of our cases were familial, a significant proportion of patients with multiple CCMs initially presented without a family history (12/28). As opposed to familial cases, a clearly reduced mutation detection rate of 57–71% for isolated cases with multiple CCMs has been noticed [Denier et al., 2006; Felbor et al., 2007]. The difference ranges from 26% (this study) to 37% [Denier et al., 2006]. One explanation for this observation might be the occurrence of phenocopies given a prevalence of 0.5% for CCMs in the general population. Another explanation might be somatic mosaicism, which has been described for other autosomal dominantly inherited hamartomatous diseases such as tuberous sclerosis [Verhoef et al., 1999]. Even severe tuberous sclerosis manifesting with seizures, mental retardation, and facial angiofibromas was shown to be associated with a *TSC1* mutation in only a minority of lymphocytes [Kwiatkowska et al., 1999]. Given the variability of somatic mosaicism in different cells and tissues as well as the limitations of the mutation scanning techniques applied, it is likewise conceivable that mosaic mutations in peripheral blood cells of isolated CCM individuals remained undetected. However, depending on the level of mosaicism in germ cells, the risk of transmission to children may be up to 50% for an apparent noncarrier with multiple CCMs.

CCM2 Isoform Does Not Assemble Into a CCM1/CCM2/CCM3 Protein Complex

Even large genomic rearrangements can pose a difficult question for risk assessment if only a single exon is deleted in-frame in an isolated case such as in our Patient 18 (Table 1) who carries a deletion of exon 2 of the *CCM2* gene. For instance, deletion of exon 16 of the dystrophin gene has recently been reported not to

be associated with disease at all [Schwartz et al., 2007]. A deletion of exon 2 of the *CCM2* gene has thus far been found in one CCM family and one isolated CCM case using MLPA without further confirmatory data or experimental proof of pathogenicity [Liquori et al., 2007]. In zebrafish embryos, injection of an antisense morpholino oligonucleotide directed against the donor splice site of intron 2 resulted in both partial and complete loss of zebrafish *ccm2* exon 2. The phenotype was comparable with a *ccm2* mutant harboring a nonsense mutation in *ccm2* exon4: enlarged heart chambers, absent blood circulation, and a myocardial wall consisting of only a single cell layer [Mably et al., 2006]. Transcript analyses of our Patient 18 validated the deletion of *CCM2* exon 2 and demonstrated that this deletion in fact results in an in-frame mRNA corresponding to the alternatively spliced shorter *CCM2* transcript lacking exon 2. This has inspired us to focus on the functional analyses of a *CCM2* protein lacking the 58 amino acids encoded by exon 2.

We show here that this *CCM2* isoform can be expressed and pulled-down by GST-*CCM3* in vitro. In addition, this isoform coprecipitates with *CCM3*. Consequently, partial *CCM2* function is retained in its normal form. However, coimmunoprecipitation experiments demonstrated that the *CCM2* isoform lacking amino acids 11 to 68 is unable to interact with *CCM1*. Thus, the shorter *CCM2* isoform cannot completely compensate for full-length *CCM2*.

Previously, it had been shown that mutagenesis of the PTB pocket critical for binding to NPXY peptides (*CCM2*:p.F217A) resulted in the abrogation of *CCM1/CCM2* complex formation. Similar results were obtained with a familial *CCM2* missense mutation, *CCM2*:p.L198R, which resides in the C-terminal region of the PTB domain of *CCM2* [Zawistowski et al., 2005]. According to the PFAM database (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam), the PTB domain comprises amino acids 66 to 227. Therefore, our data on a mutant protein lacking amino acids 11 to 68 suggest that an intact *CCM2* domain located N-terminally of the PTB domain is essential for binding of *CCM1* to *CCM2* (Fig. 5C).

In agreement with our previous observation that interaction of *CCM1*, *CCM2*, and *CCM3* is cooperative [Voss et al., 2007], our present results on intact interaction of *CCM2*:p.P11_K68del with *CCM3* implied that *CCM1* and *CCM3* can simultaneously interact with *CCM2* and that *CCM2* has linker properties within the *CCM1/CCM2/CCM3* protein complex. In this study, we confirm the existence of a *CCM1/CCM2/CCM3* complex in cells. These results are corroborated by most recently published data demonstrating that purified recombinant *CCM3* does complex with *CCM2* and *CCM1* in vitro [Hilder et al., 2007]. Consistent with a loss-of-function mechanism for CCM mutations, we have also shown that the human in-frame deletion of exon 2 of the *CCM2* gene resulted in the inability of the gene product to form this complex. Therefore, we demonstrate for the first time that the N-terminal *CCM2* domain encoded by exon 2 is an essential *CCM1* binding domain (Fig. 5C). In conclusion, our data show cooperative assembly of the *CCM1/CCM2/CCM3* protein complex in which full-length *CCM2* is the central scaffold molecule strictly required for complex formation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the affected individuals and their families for participating in this study and Dr. Robert G. Roeder (Rockefeller University, New York, New York) for plasmids pIRESVP5 and pIRESneoVP5-eGFP. This work was supported by the Bavarian

Genome Network. U.F. was the recipient of an Emmy Noether grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Fe 432/6-5). S.S. received a stipend from the Graduiertenkolleg 1048.

REFERENCES

- Béraud-Dufour S, Gautier R, Albiges-Rizo C, Chardin P, Faurobert E. 2007. Krit 1 interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. *FEBS J* 274:5518–5532.
- Bergametti F, Denier C, Labauge P, Arnoult M, Boetto S, Clanet M, Coubes P, Echenne B, Ibrahim R, Irthum B, Jacquet G, Lonjon M, Moreau JJ, Neau JP, Parker F, Tremoulet M, Tournier-Lasserre E. 2005. Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 76:42–51.
- Denier C, Goutagny S, Labauge P, Krivosic V, Arnoult M, Cousin A, Benabid AL, Comoy J, Frerebeau P, Gilbert B, Houtteville JP, Jan M, Lapiere F, Loiseau H, Menei P, Mercier P, Moreau JJ, Nivelon-Chevallier A, Parker F, Redondo AM, Scarabin JM, Tremoulet M, Zerah M, Maciazek J, Tournier-Lasserre E. 2004. Mutations within the *MGC4607* gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 74:326–337.
- Denier C, Labauge P, Bergametti F, Marchelli F, Riant F, Arnoult M, Maciazek J, Vicaut E, Brunereau L, Tournier-Lasserre E. 2006. Genotype-phenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients. *Ann Neurol* 60:550–556.
- Felbor U, Sure U, Grimm T, Bertalanffy H. 2006. Genetics of cerebral cavernous angioma. *Zentralbl Neurochir* 67:110–116.
- Felbor U, Gaetzner S, Verlaan DJ, Vijzelaar R, Rouleau GA, Siegel AM. 2007. Large germline deletions and duplication in isolated cerebral cavernous malformation patients. *Neurogenetics* 8:149–153.
- Gaetzner S, Stahl S, Sürücü O, Schaafhausen A, Halliger-Keller B, Bertalanffy H, Sure U, Felbor U. 2007. *CCM1* gene deletion identified by MLPA in cerebral cavernous malformation. *Neurosurg Rev* 30:155–159.
- Gault J, Shenkar R, Recksiek P, Awad IA. 2005. Biallelic somatic and germ line *CCM1* truncating mutations in a cerebral cavernous malformation lesion. *Stroke* 36:872–874.
- Glading A, Han J, Stockton RA, Ginsberg MH. 2007. KRIT-1/*CCM1* is a Rap1 effector that regulates endothelial cell-cell junctions. *J Cell Biol* 179:247–254.
- Hilder TL, Malone MH, Bencharit S, Colicelli J, Haystead TA, Johnson GL, Wu CC. 2007. Proteomic identification of the cerebral cavernous malformation signaling complex. *J Proteome Res* 6:4343–4355.
- Kehrer-Sawatzki H, Wilda M, Braun VM, Richter HP, Hameister H. 2002. Mutation and expression analysis of the *KRIT1* gene associated with cerebral cavernous malformations (*CCM1*). *Acta Neuropathol* 104:231–240.
- Kwiatkowska J, Wigowska-Sowinska J, Napierala D, Slomski R, Kwiatkowski DJ. 1999. Mosaicism in tuberous sclerosis as a potential cause of the failure of molecular diagnosis. *N Engl J Med* 340:703–707.
- Labauge P, Laberge S, Brunereau L, Levy C, Tournier-Lasserre E. 1998. Hereditary cerebral cavernous angiomas: clinical and genetic features in 57 French families. *Lancet* 352:1892–1897.
- Labauge P, Denier C, Bergametti F, Tournier-Lasserre E. 2007. Genetics of cavernous angiomas. *Lancet Neurol* 6:237–244.
- Laberge-le Couteux S, Jung HH, Labauge P, Houtteville JP, Lescoat C, Cecillon M, Marechal E, Joutel A, Bach JF, Tournier-Lasserre E. 1999. Truncating mutations in *CCM1*, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat Genet* 23:189–193.
- Liquori CL, Berg MJ, Siegel AM, Huang E, Zawistowski JS, Stoffer T, Verlaan D, Balogun F, Hughes L, Leedom TP, Plummer NW, Cannella M, Maglione V, Squitieri F, Johnson EW, Rouleau GA, Ptacek L, Marchuk DA. 2003. Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 73:1459–1464.
- Liquori CL, Berg MJ, Squitieri F, Ottenbacher M, Sorlie M, Leedom TP, Cannella M, Maglione V, Ptacek L, Johnson EW, Marchuk DA. 2006.

- Low frequency of *PDCD10* mutations in a panel of CCM3 probands: potential for a fourth CCM locus. *Hum Mutat* 27:118.
- Liquori CL, Berg MJ, Squitieri F, Leedom TP, Ptacek L, Johnson EW, Marchuk DA. 2007. Deletions in *CCM2* are a common cause of cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 80:69–75.
- Lucas M, Costa AF, Montori M, Solano F, Zayas MD, Izquierdo G. 2001. Germline mutations in the *CCM1* gene, encoding Krit1, cause cerebral cavernous malformations. *Ann Neurol* 49:529–532.
- Mably JD, Chuang LP, Serluca FC, Mohideen MA, Chen JN, Fishman MC. 2006. *santa* and *valentine* pattern concentric growth of cardiac myocardium in the zebrafish. *Development* 133:3139–3146.
- Revenu N, Vikkula M. 2006. Cerebral cavernous malformation: new molecular and clinical insights. *J Med Genet* 43:716–721.
- Schwartz M, Duno M, Palle AL, Krag T, Vissing J. 2007. Deletion of exon 16 of the dystrophin gene is not associated with disease. *Hum Mutat* 28:205.
- Serebriiskii I, Estojak J, Sonoda G, Testa JR, Golemis EA. 1997. Association of *Krev-1/rap1a* with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene* 15:1043–1049.
- Sürücü O, Sure U, Gaetzner S, Stahl S, Benes L, Bertalanffy H, Felbor U. 2006. Clinical impact of CCM mutation detection in familial cavernous angioma. *Childs Nerv Syst* 22:1461–1464.
- Sürücü O, Sure U, Stahl S, Gaetzner S, Miller D, Bertalanffy H, Felbor U. 2007. A novel *CCM1* mutation in a 2-year old child. Cerebral and cutaneous manifestations of familial cavernoma. *Monatsschr Kinderheilkd* 155:1161–1165.
- Uhlík MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, Horne EA, Dell'Acqua ML, Johnson GL. 2003. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol* 5:1104–1110.
- Verhoef S, Bakker L, Tempelaars AM, Hesseling-Janssen AL, Mazurczak T, Jozwiak S, Fois A, Bartalini G, Zonnenberg BA, van Essen AJ, Lindhout D, Halley DJ, van den Ouweland AM. 1999. High rate of mosaicism in tuberous sclerosis complex. *Am J Hum Genet* 64:1632–1637.
- Verlaan DJ, Davenport WJ, Stefan H, Sure U, Siegel AM, Rouleau GA. 2002. Cerebral cavernous malformations: mutations in *KRIT1*. *Neurology* 58:853–857.
- Verlaan DJ, Laurent SB, Rochefort DL, Liquori CL, Marchuk DA, Siegel AM, Rouleau GA. 2004. *CCM2* mutations account for 13% of cases in a large collection of kindreds with hereditary cavernous malformations. *Ann Neurol* 55:757–758.
- Voss K, Stahl S, Schleider E, Ullrich S, Nickel J, Mueller TD, Felbor U. 2007. *CCM3* interacts with *CCM2* indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. *Neurogenetics* 8:249–256.
- Wohlgemuth S, Kiel C, Kramer A, Serrano L, Wittinghofer F, Herrmann C. 2005. Recognizing and defining true Ras binding domains I: biochemical analysis. *J Mol Biol* 348:741–758.
- Zawistowski JS, Serebriiskii IG, Lee MF, Golemis EA, Marchuk DA. 2002. *KRIT1* association with the integrin-binding protein *ICAP-1*: a new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (*CCM1*) pathogenesis. *Hum Mol Genet* 11:389–396.
- Zawistowski JS, Stalheim L, Uhlík MT, Abell AN, Ancrile BB, Johnson GL, Marchuk DA. 2005. *CCM1* and *CCM2* protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Hum Mol Genet* 14:2521–2531.
- Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, Chang DD, Dietz HC. 2001. Interaction between *krit1* and *icap1 α* infers perturbation of integrin β 1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet* 10:2953–2960.
- Zhang J, Rigamonti D, Dietz HC, Clatterbuck RE. 2007. Interaction between *krit1* and *malcavernin*: implications for the pathogenesis of cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery* 60:353–359.

Anlage 1, Stahl et al., 2008:

Eigenanteil/own contribution:

UF and SS initiated the study and coordinated the experimental work. OS, EK, CN, CK, UFi, MH, ZP, ME, SRS, HB and US provided us with DNA and clinical data from their CCM patients. UF and SS prepared the manuscript with feedback from all other authors. KV, SS, BB and **ES** conducted most of the DNA cloning and protein experiments. SG, BB and SS performed genetic analyses of the patient's DNA. UF oversaw the entire project.

Unterschriften der Autoren/signatures of the authors:

Stahl, S.,

Gaetzner, S.,

Voss, K.,

Brackertz, B.,

Schleider, E.,

Sürücü, O.,

Kunze, E.,

Netzer, C.,

Korenke, C.

Finckh, U.

Habek, M.

Poljakovic, Z.

Elbracht, M.

Rudnik-Schöneborn, S.

Bertalanffy, H.

Sure, U.

Felbor, U.



Anlage 2

Functional Analyses of Human and Zebrafish 18–Amino Acid In-Frame Deletion Pave the Way for Domain Mapping of the Cerebral Cavernous Malformation 3 Protein

Katrin Voss,¹ Sonja Stahl,¹ Benjamin M. Hogan,² Joerg Reinders,^{3,4} Elisa Schleider,¹ Stefan Schulte-Merker,² and Ute Felbor^{1*}

¹Department of Human Genetics, University of Würzburg, Würzburg, Germany; ²Hubrecht Institute-KNAW and University Medical Centre, Utrecht, The Netherlands; ³Institute of Functional Genomics, University of Regensburg, Regensburg, Germany; ⁴Pharmaceutical Biology, University of Würzburg, Würzburg, Germany

Communicated by Peter Oefner

Received 31 October 2008; accepted revised manuscript 29 January 2009.

Published online 20 February 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/humu.20996

ABSTRACT: Cerebral cavernous malformations (CCMs) may cause recurrent headaches, seizures, and hemorrhagic stroke and have been associated with loss-of-function mutations in *CCM1/KRIT1*, *CCM2*, and *CCM3/programmed cell death 10 (PDCD10)*. The *CCM3/PDCD10* amino acid sequence does not reveal significant homologies to protein domains with known structure. With the help of the only published human in-frame deletion of the *CCM3* gene (c.97-?_150+?del), *CCM3:p.L33_K50del*, we have identified the interaction domain of *CCM3* with the oxidant stress response serine/threonine kinase 25 (*STK25*, *YSK1*, *SOK1*) and with the mammalian Ste20-like kinase 4 (*MST4*, *MASK*). Consistently, nano-liquid chromatography–tandem mass spectrometry (nano-LC-MS/MS) analyses revealed two *STK25* phosphorylation sites at serine 39 and threonine 43. The corresponding in-frame deletion of zebrafish *ccm3a*, *dcm3:p.L31_K48del*, also resulted in impaired interaction with *STK25* and *MST4*. In agreement with the observed redundant biochemical functionality of zebrafish *ccm3a* and its duplicate *ccm3b*, simultaneous inactivation of both genes resulted in a progressive cardiovascular phenotype in zebrafish indistinguishable from *ccm1* and *ccm2* mutants. The pronounced cardiovascular dilatations could be recapitulated by morpholino-induced in-frame skipping of the exon encoding the *STK25* and *MST4* binding site of zebrafish *Ccm3a* if *Ccm3b* was repressed in parallel. Using a novel zebrafish model of CCM, we could thus demonstrate that the newly mapped *STK25* and *MST4* interaction domain

within the *CCM3* protein plays a crucial role for vascular development in zebrafish.

Hum Mutat 30, 1003–1011, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: cerebral cavernous malformation; *CCM3*; *PDCD10*; *CCM2*; *STK25*; *MST4*

Introduction

Heterozygous autosomal-dominantly inherited mutations in either human *CCM1/KRIT1*, *CCM2*, or *CCM3/Programmed cell death 10 (PDCD10)* are associated with cerebral cavernous malformations (CCMs; MIM#s 116860, 603284, and 603285). These hamartomatous malformations can be caused by a Knudsonian two-hit mechanism [Gault et al., 2005; Akers et al., 2008; Pagenstecher et al., 2008] and consist of blood-filled dilated blood vessels lined with a single layer of endothelial cells lacking electron-dense markers characteristic of tight junctions. The surrounding collagenous stroma is devoid of elastin and smooth muscle cells resulting in fragile, immature vessel walls. Recurrent hemorrhages lead to chronic headaches, seizures, and neurological deficits with an age-dependent penetrance of about 60% [Revencu and Vakkula, 2006; Labauge et al., 2007].

Several studies have most recently provided convincing evidence that the mechanisms of CCM pathogenesis are likely endothelial cell-autonomous [Hogan et al., 2008; Pagenstecher et al., 2009; Kleaveland et al., 2009; Whitehead et al., 2009]. However, the function of the three gene products *CCM1/KRIT1*, *CCM2/Malacavernin*, and *CCM3/PDCD10* remains to be fully elucidated. The 84-kDa protein *CCM1* was originally identified and later confirmed as a RAPIA interactor and microtubuli associated protein [Serebriiskii et al., 1997; Wohlgenuth et al., 2005; Beraud-Dufour et al., 2007]. The small GTPase RAPIA is a member of the Ras superfamily and requires *CCM1* for maintaining the integrity of endothelial junctions [Glading et al., 2007]. It has been shown that *CCM1* exists in a closed and in an open conformation. RAPIA binds both forms through the FERM domain of *CCM1*. Integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 α (ICAP-1 α), another *CCM1* interactor,

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article. K. Voss and S. Stahl contributed equally to this work.

Current affiliation for K. Voss: Department of Haematology, University of Cambridge, UK.

Current affiliation for S. Stahl: Institute of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, University of Würzburg, Germany.

*Correspondence to: Prof. Dr. U. Felbor, Department of Human Genetics, University of Würzburg, Biozentrum, Am Hubland, D-97074 Würzburg, Germany.

E-mail: felbor@biozentrum.uni-wuerzburg.de

only binds to the open conformation of CCM1 through its most N-terminal NPXY motif [Zhang et al., 2001; Zawistowski et al., 2002]. ICAP-1 α and RAP1A form a ternary protein complex with CCM1 at cellular membranes [Beraud-Dufour et al., 2007]. Therefore, it was proposed that CCM1 is participating in β 1-integrin-mediated pathways. Furthermore, CCM1 interacts with the phosphotyrosine binding domain (PTB) of CCM2 [Zawistowski et al., 2005] through its second and third NPXY motif [Zhang et al., 2007] and with the heart of glass (HEG1) receptor [Kleaveland et al., 2009]. The murine ortholog of 50-kDa CCM2 (OSM) was originally reported to be a scaffold protein for MEKK3 and MKK3; thereby affecting the p38 MAPK stress-responsive signaling cascade in fibroblasts [Uhlik et al., 2003; Zawistowski et al., 2005]. In human endothelial cell cultures, CCM2 was found to bind RHOA and RAC1 and to regulate migration, lumen formation, and vascular permeability [Whitehead et al., 2009].

CCM3 is a protein without any known conserved functional domains. Recently, we have shown that 25-kDa CCM3, also known as PDCD10, interacts with CCM2 [Voss et al., 2007]. Consistent with the observation that human CCM1, CCM2, and CCM3 mutation carriers cannot be clinically distinguished, the CCM proteins were shown to form a ternary protein complex in vitro with CCM2 as the core protein [Hilder et al., 2007; Stahl et al., 2008]. Furthermore, we revealed that CCM3 binds to 48-kDa mammalian serine/threonine protein kinase STK25 as well as to STK24 but is phosphorylated by STK25 only [Voss et al., 2007]. Another study showed that the 47-kDa protein kinase MST4 also interacts with CCM3 [Ma et al., 2007]. STK25, also known as YSK-1 or SOK-1, STK24/MST3, and MST4/MASK belong to the germinal center kinases III (GCKIII) subfamily of mammalian Ste20-like (MST) kinases, which are homologs of the yeast protein kinase Sterile 20 (Ste20). STK25, STK24, and MST4 are involved in cell migration [Lu et al., 2006; Preisinger et al., 2004] and apoptosis [Dan et al., 2002; Huang et al., 2002; Nogueira et al., 2008] but do not activate JNK or p38 MAPK pathways [Pombo et al., 1996; Schinkmann and Blenis, 1997; Dan et al., 2002]. Experimental data suggest that STK25 and MST4 have opposite effects regarding migration and are required for reorientation of the Golgi apparatus toward the direction of forward movement [Preisinger et al., 2004], which marks an initial step of cell polarization in migrating cells [Mellor, 2004].

We here show that the only known human CCM3 in-frame deletion that leads to a transcript lacking the entire exon 5 coding sequence (c.97-?_150+?del) [Bergametti et al., 2005] results in a truncated protein lacking the STK25 and MST4 binding sites. Although secondary structure predictions suggested that the deleted protein might be structurally unstable, the corresponding protein CCM3:p.L33_K50del could be expressed in cell culture, binds to CCM2, and forms a ternary protein complex with CCM2 and CCM1. However, STK25 and MST4 fail to bind CCM3:p.L33_K50del, and STK25 is unable to phosphorylate this mutant in vitro. Moreover, the human disease could be modeled in vitro and in vivo in zebrafish. The corresponding zebrafish mutant protein is also unable to interact with STK25 and shows impaired binding to MST4 while binding to CCM2 is intact. Knockdown studies of zebrafish *ccm3a* and its duplicate *ccm3b* revealed a dramatic cardiovascular phenotype that could be recapitulated upon skipping of exon 3, which encodes the STK25 and MST4 binding sites in zebrafish. Our data prove the functional relevance of CCM3 interaction with STK25 and MST4 and provide an in vivo angiogenesis model system to study the pathobiology of CCM.

Materials and Methods

Generation of Plasmids

Human full-length myc/his-tagged CCM1 and CCM2, hemagglutinin (HA)-tagged CCM2, and FLAG/HA-tagged CCM3 constructs used for expression in human embryonic kidney 293 (HEK293) cells have been described previously [Voss et al., 2007; Stahl et al., 2008]. Similarly, the CCM3 coding sequence lacking human exon 5 was PCR-cloned into the *NheI* and *NotI* sites of the pIRESneo-derived vector VP5 (pIRESVP5; a kind gift from Dr. Robert G. Roeder, Rockefeller University, New York, NY) after QuickChangeTM site-directed mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA). Full-length zebrafish *ccm3a* (derived from clone IR-BOp991E057D; RZPD, Berlin, Germany) and *ccm3b* (derived from 24 hours post fertilization [hpf] zebrafish cDNA synthesized with the SV Total RNA Isolation System (Promega, Mannheim, Germany) and Superscript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)) coding sequences were also PCR-cloned into pIRESVP5, which allows expression of an N-terminal FLAG/HA tag. The zebrafish *ccm3a* coding sequence lacking zebrafish exon 3 was amplified from cDNA derived from 24-hpf zebrafish embryos after knockdown using the *ccm3aE3I3* morpholino (see Supporting Figure S1C; lower 579-bp product) and PCR-cloned into pcDNA3.1 using a 5' primer containing the coding sequence for a FLAG tag. To assess the quality of the start morpholinos used, the target-binding sequences of *ccm3a/b*-morpholino antisense oligomers (MO) and *ccm3a*-MO were cloned into the *HindIII* and *BamHI* sites in front of the green fluorescent protein (GFP) open reading frame of the RNA expression vector pCS2-GFP to generate *ccm3a/b*-GFP and *ccm3a*-GFP RNA. For prokaryotic expression, full-length human CCM3 as well as CCM3 lacking human exon 5 were cloned into the *NdeI* and *XhoI* sites of pET28b (Novagen, Darmstadt, Germany), thus using the coding sequence for an N-terminal His tag. GenBank accession numbers are NM_007217.3 (CCM3), NM_200555.1 (*dccm3a*), and NM_212933.1 (*dccm3b*). Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence. The initiation codon is codon 1.

Coimmunoprecipitation Experiments

HEK293 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with GlutaMaxTM I (Gibco, Karlsruhe, Germany) containing 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin-streptomycin (P/S). One day prior to transfection, cells were seeded in 10-cm culture dishes and grown overnight in culture medium. At 50% confluency cells were transiently transfected with the indicated constructs using FuGene6TM (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer instructions. FLAG-GFP (MOCK) was used as positive control for transfection efficiency and as negative control for immunoprecipitation (IP) studies. Cells were harvested 48 hr post transfection and coimmunoprecipitation experiments were performed as described [Stahl et al., 2008; Voss et al., 2007]. In brief, precleared lysates were incubated with anti-FLAG M2 agarose (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) for 2 hr overhead at 4°C. After extensive washing, 2 \times Laemmli buffer was added and samples were boiled for 10 min at 99°C. For Western blot analyses, cell lysates and IP eluates were subjected to 10 to 20% gradient SDS-PAGE, immobilized on a nitrocellulose membrane, and probed with rabbit polyclonal anti-c-Myc (1:1,000; Sigma-Aldrich) or

mouse monoclonal anti-FLAG M2 (1:1,000; Sigma-Aldrich) or goat polyclonal anti-YSK1 (anti-STK25, 1:200, N-19; Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) or mouse monoclonal anti-HA (1:10,000, clone HA-7; Sigma-Aldrich) or rabbit monoclonal anti-MST4 (1:1,000, EP1864Y; Abcam, Cambridge, UK) antibodies. Secondary antibodies (1:5,000) conjugated to horseradish peroxidase were obtained from Dianova (Hamburg, Germany).

Purification of Recombinant Proteins and Phosphorylation Assays

His-CCM3 and His-CCM3:p.L33_K50del were expressed in *E. coli* strain BL21 (DE3) and purified with Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Germany) agarose following the manufacturer's instructions. In vitro kinase assays were carried out with 0.02 μ g recombinant GST-STK25 (Invitrogen) and 1 μ g His-CCM3, His-CCM3:p.L33_K50del, or myelin basic protein (MBP) (Biomol, Lörach, Germany), respectively. Kinases and substrates were diluted in assay buffer and reactions were performed with 100 μ M (γ -³²P)ATP (50,000–90,000 cpm/pmol) as described [Pombo et al., 1996; Voss et al., 2007]. Samples were subjected to 12.5% SDS-PAGE and autoradiography.

Identification of CCM3 Phosphorylation Sites Via MS Analyses

Recombinant His-CCM3 was in vitro phosphorylated as described above and separated on a 12.5% SDS-PAGE. After colloidal Coomassie staining, protein bands were subjected to in-gel digestion and phosphopeptides were enriched by Fe³⁺-based metal ion affinity chromatography (IMAC) as in Reinders et al. [2007]. Eluted phosphopeptides were acidified with formic acid and analyzed by nano-liquid chromatography–tandem mass spectrometry (nano-LC-MS/MS) using a LCQ Deca XPplusTM (Thermo Electron, Dreieich, Germany) coupled to an UltimateTM 3,000 nano-HPLC system (Dionex, Idstein, Germany) as described [Schönleben et al., 2007]. Tandem-MS spectra were searched against the SwissProt database using the MascotTM algorithm (version 2.1) and the MascotTM Daemon (version 2.1.6) (Matrix Science Ltd., London, UK). The mass spectra and localizations of phosphorylation sites were verified manually using MS-Product (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/4.0.7/html/msprod.htm>).

Zebrafish

Zebrafish strains were maintained in the Hubrecht Institute or the Biocenter of the University of Würzburg (Würzburg, Germany) using standard husbandry conditions. Animal experiments were approved by the Animal Experimentation Committee of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (DEC) and performed in compliance with the regulations on animal experiments of the University of Würzburg. The *kdrl:GFP* transgenic line was used to visualize the embryonic vasculature [Jin et al., 2005; Bussmann et al., 2008]. Embryos were mounted in 0.5% agarose in a six-well culture plate with a coverslip replacing the bottom of each well. Imaging was performed with a Leica TCS SP (Leica, Wetzlar, Germany) confocal microscope or a Leica SP2 confocal microscope.

Morpholino Oligomers

The *ccm3a/b* start codon targeting MO (*ccm3a/b*-MO: 5'-CTTCATCTCTTCCATTGTCCATCCTC-3'), the *ccm3a* morpholino

targeting the third ATG of the *ccm3a* gene (*ccm3a*-MO: 5'-CGTCCGCTTCATTCTTCATCTCTTC-3'), and the splice morpholinos designed to target exon/intron boundaries in *ccm3a* (*ccm3a*^{E313}-MO: 5'-CAGAACAACATCATGTTTGCTCACC-3') and *ccm3b* (*ccm3b*^{E414}-MO: 5'-ACATTATGTTCTCGCCTTACCCTCC-3') were purchased from Gene Tools, LLC (Pilomath, OR). To test the functionality of the start codon targeting MOs, 20 μ g capped mRNA of *ccm3a/b:GFP* and *ccm3a:GFP* were injected into one-cell-stage embryos, which resulted in strong GFP expression. Coinjection of 1 ng/embryo *ccm3a/b*-MO or 1 ng/embryo *ccm3a*-MO efficiently blocked translation of the target mRNA (data not shown).

Results

Human In-Frame Deletion of CCM3 Exon 5 Results in Loss of CCM3:p.L33_K50del Binding to STK25 and MST4

Apart from one exception, human *CCM3* mutations are either truncating or large genomic deletions of the entire *CCM3* gene [Bergametti et al., 2005; Guclu et al., 2005; Verlaan et al., 2005; Liquori et al., 2006, 2007; Stahl et al., 2008]. The only known in-frame deletion of exon 5 of the *CCM3* gene [Bergametti et al., 2005] is predicted to result in the omission of 18 amino acids: CCM3:p.L33_K50del (Fig. 1A and B). Sequence similarities between amino acids 19 to 69 of CCM3 and amino acids 355 to 411 of STK25, the latter being located C-terminally of the kinase domain of STK 25, suggested that the human in-frame deletion might affect dimerization of CCM3 with STK25 and other kinases (Fig. 1C). Alternatively, secondary structure predictions indicated that the 18-amino acid deletion abolishes 60% of a prominent N-terminal α -helix [Voss et al., 2007] and, therefore, might have a destabilizing effect on CCM3 protein structure. Contrary to the expected destabilizing effect, expression experiments in HEK293 demonstrated that a stable CCM3:p.L33_K50del protein is built (Fig. 2A and B). Furthermore, coexpression of CCM3:p.L33_K50del with CCM2 and CCM1 in HEK293 cells revealed that CCM3:p.L33_K50del retains the ability to coimmunoprecipitate with the known CCM3 interactor CCM2 (Fig. 2A) and to form a ternary CCM1/CCM2/CCM3:p.L33_K50del complex (Fig. 2B). In contrast, binding of CCM3:p.L33_K50del to endogenous human STK25 was abrogated (Fig. 2A) while intact CCM3 was able to trap STK25, as published recently [Voss et al. 2007]. Similarly, CCM3:p.L33_K50del showed significantly impaired interaction with MST4 (Fig. 2A). Only upon long-term exposure, a slight band became visible (data not shown). Binding of CCM3:p.L33_K50del to endogenous STK24 could not be assessed because the commercially available antibodies against STK24 also recognize STK25 while anti-MST4 does not (data not shown). Thus, our experimental data demonstrate that the N-terminal part of CCM3 harbors an interaction domain for STK25 and MST4.

STK25 Phosphorylates CCM3 at Serine 39 and Threonine 43

STK25 is a yeast two-hybrid interactor of CCM3 that was shown to phosphorylate CCM3 in vitro [Voss et al., 2007]. In agreement with our immunoprecipitation results, we next demonstrated that GST-STK25 was unable to phosphorylate purified recombinant His-CCM3:p.L33_K50del (Fig. 3A). Phosphorylation of the STK25 substrates His-CCM3 and MBP were used as positive controls (Fig. 3A). In order to determine the phosphorylation sites within CCM3, phosphorylated His-CCM3 was enriched at the peptide level using IMAC and

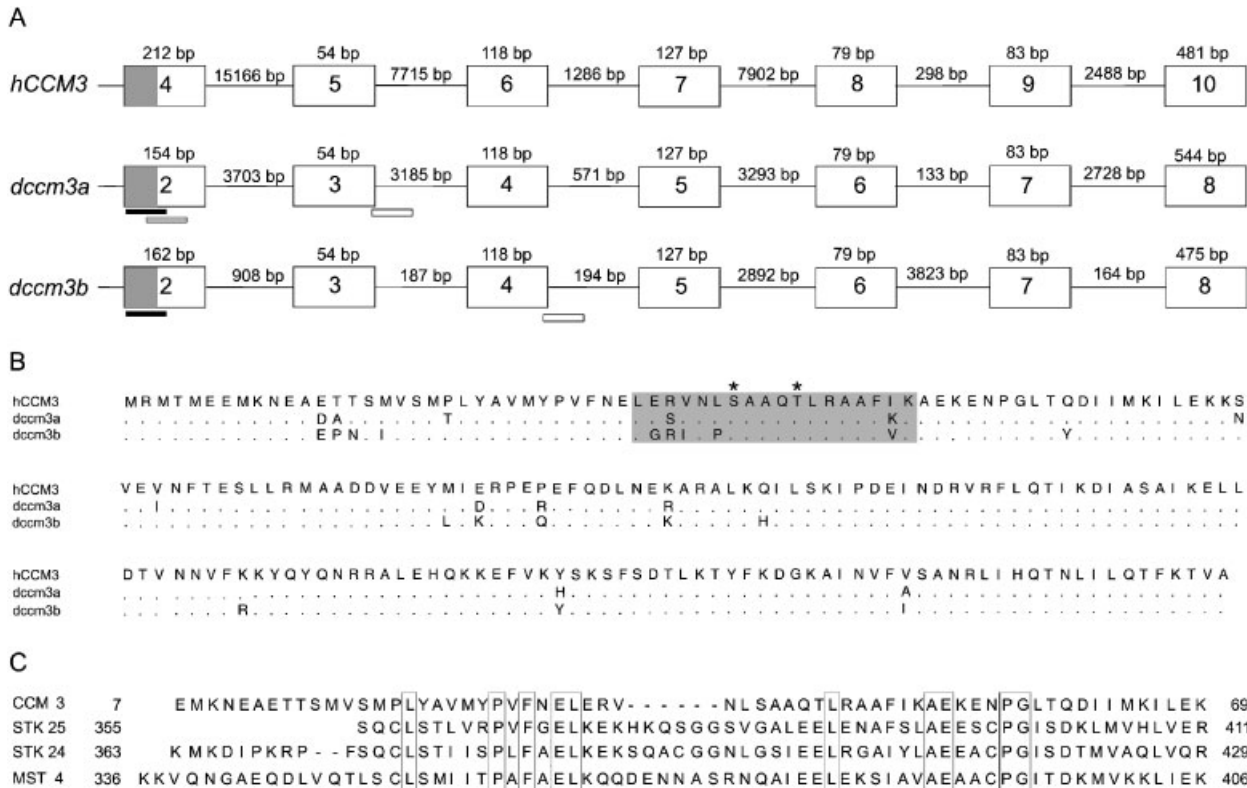


Figure 1. **A:** Comparison of the exon/intron organization of human *CCM3* (*hCCM3*) with zebrafish *ccm3* genes (*dccm3a*, *dccm3b*, *d*, *Danio rerio*, h, human). Exons are shown as boxes and introns as thin lines (bp, base pairs). GenBank accession numbers are NM_007217.3 (*hCCM3*), NM_200555.1 (*dccm3a*), and NM_212933.1 (*dccm3b*). Morpholinos used for injections in one- to two-cell stage embryos are indicated by bars. The start morpholino against the first ATG (black bars, *ccm3a/b*-MO) downregulates both *ccm3a* and *ccm3b*. A morpholino directed against a region surrounding the third ATG of *ccm3a* downregulates only *ccm3a* (gray bar, *ccm3a*-MO). The splice morpholino *ccm3a*^{E313}-MO (open bar) mirrors the human splice site mutation resulting in an in-frame deletion of 18 amino acids (*dccm3*:p.L31_K48del). *ccm3b*^{E414}-MO (open bar) downregulates only *ccm3b*. **B:** Sequence alignment of human and zebrafish CCM3 proteins. Identical amino acids are indicated by dots. The shaded amino acid residues are encoded by human exon 5 and zebrafish exons 3, respectively. This area contains two phosphorylation sites for STK25 (asterisks). **C:** Amino acid sequence similarities between CCM3 and the kinases STK25, STK24, and MST4 are highlighted by boxes (GenBank accession numbers are NM_006374.3, NM_003576.3, and NM_016542.3, respectively. Amino acid numbering starts with +1 corresponding to the start methionine).

analyzed by nano-LC-MS/MS. CCM3 was found to contain two phosphorylation sites at serine 39 and threonine 43 as shown in the spectra of peptide VNLSAAQTLR (Fig. 3B and C). Consistent with our binding data, both phosphorylated residues are located within the region encoded by *CCM3* exon 5, which was found to be deleted in individuals affected with CCM and to mediate binding to STK25 (shaded in Fig. 1B).

Zebrafish Ccm3:p.L31_K48del Protein Biochemically Recapitulates Loss of CCM3 Interaction With STK25 and Impaired Interaction With MST4

In order to assess the *in vivo* relevance of CCM3 interaction with STK25, we chose zebrafish as model system. The genomic organization of the human *CCM3* gene is highly comparable to zebrafish *ccm3a* and its gene duplicate *ccm3b* (Fig. 1A). Furthermore, human CCM3 shares 94% amino acid identity with zebrafish Ccm3a and 92% amino acid identity with Ccm3b (Fig. 1B). Accordingly, Ccm3a, Ccm3b, and the mutant zebrafish protein Ccm3:p.L31_K48del, which lacks the 18 amino acids encoded by zebrafish *ccm3* exon 3 could be expressed in human HEK293 cells and complexed with human CCM2 (Fig. 4). Ccm3a and Ccm3b were also capable to immunoprecipitate endogenous human STK25 and MST4 whereas Ccm3:p.L31_K48del was not

able to bind to human STK25 (Fig. 4) and showed a significantly reduced binding capacity to human MST4. On the one hand, these data demonstrate that Ccm3:p.L31_K48del had lost the ability to interact with STK25 and is equivalent to the human mutation CCM3:p.L33_K50del. On the other hand, these results indicate that the zebrafish *ccm3b* duplicate retains redundant functionality *in vitro*.

Pronounced Cardiovascular Phenotype Identical to *ccm1* and *ccm2* Mutants After Combined Knockdown of *ccm3a* and *ccm3b*

Our biochemical analyses demonstrated that the Ccm3a as well as the Ccm3b protein each interact with human CCM2, STK25, and MST4 in cell culture. In accordance with the observed biochemical redundancy of Ccm3a and Ccm3b, only combined downregulation of zebrafish *ccm3a* and its gene duplicate *ccm3b* consistently resulted in a pronounced heart phenotype identical to *ccm1* (*santa*) and *ccm2* (*valentine*) mutant zebrafish [Chen et al., 1996; Stainier et al., 1996; Mably et al., 2006; Hogan et al., 2008]. Injection of 1 ng/embryo of an MO designed to simultaneously target the start codon of *ccm3a* and *ccm3b* (*ccm3a/b*-MO; Fig. 1A) led to enlarged, slowly contracting heart chambers and disturbed blood circulation after 2 days of development in 86% of embryos

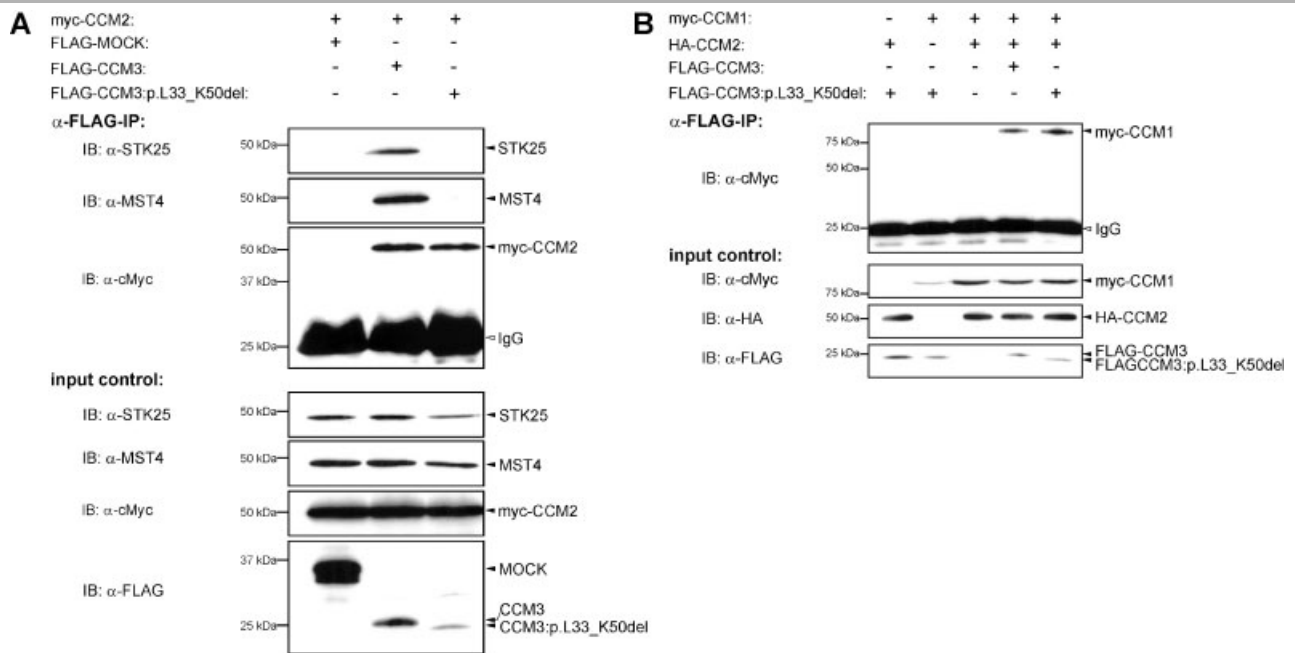


Figure 2. Human CCM3 protein lacking 18 amino acids (CCM3:p.L33_K50del) retains partial functionality in vitro but has lost the ability to bind to human STK25 and MST4. **A:** Western blot analyses (IBs) of coimmunoprecipitations (IPs) and cell lysates (input control) using the indicated antibodies anti-STK25 (α -STK25), anti-MST4 (α -MST4), anti-c-Myc (α -cMyc), and anti-FLAG (α -FLAG). The truncated CCM3:p.L33_K50del protein can be expressed in HEK293 cells in vitro (input control, lane 3, bottom panel) and interacts with CCM2 (α -FLAG-IP, lane 3, bottom panel). In contrast, binding to endogenous STK25 and MST4 is abrogated (α -FLAG-IP, lane 3, top and middle panels). Cotransfection of FLAG-GFP (MOCK) with myc-CCM2 was used as transfection control and as negative control for IP studies. Cotransfection of FLAG-CCM3 with myc-CCM2 was used as positive control for IP. Immunoglobulin G (IgG) bands at about 25 kDa (α -FLAG-IP, lanes 1–3, bottom panel) served as loading control and IBs of cell lysate served as expression controls of endogenous (input control, lanes 1–3, both upper panels) and overexpressed proteins (input control, lanes 1–3, both bottom panels). **B:** CCM3:p.L33_K50del is capable to form a CCM1/CCM2/CCM3:p.L33_K50del protein complex. At 48 hr post transfection with the indicated constructs, protein extracts were coimmunoprecipitated using anti-FLAG agarose (α -FLAG-IP). Western blots probed with α -cMyc showed that both CCM3 and CCM3:p.L33_K50del form the ternary complex (lanes 4 and 5, top panel). The three lower panels represent IB analyses of cell lysates used for IP studies and prove expression of all cotransfected plasmids (lanes 1–5, input controls).

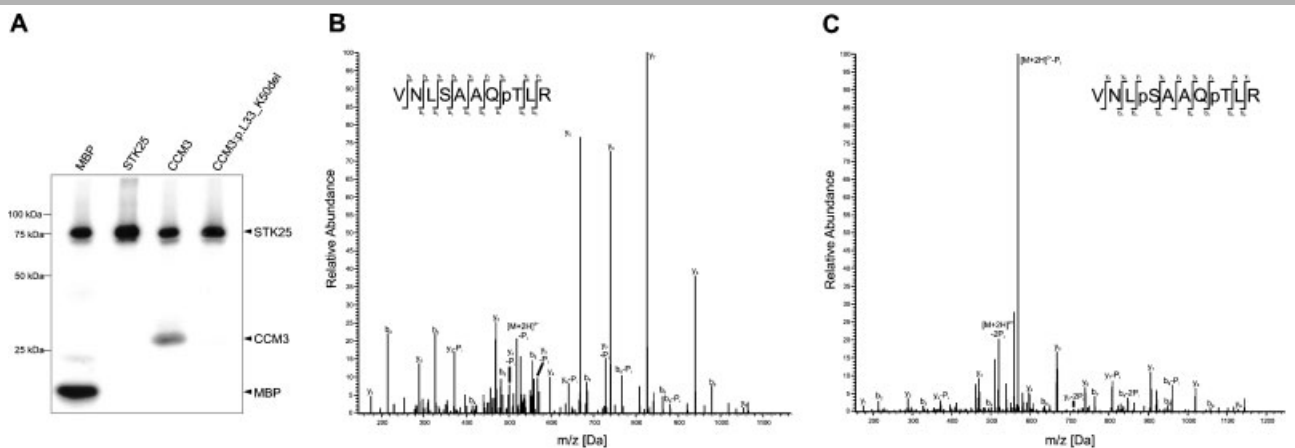


Figure 3. **A:** Absent phosphorylation of CCM3:p.L33_K50 lacking serine 39 and threonine 43. Recombinant GST-tagged STK25 was incubated with the substrates myelin basic protein (MBP), His-CCM3 (CCM3) or His-CCM3:p.L33_K50del (CCM3:p.L33_K50del), and (γ - 32 P)ATP. MBP as well as CCM3 were phosphorylated by STK25 whereas CCM3:p.L33_K50del was not. **B,C:** Fragment ion spectra of the peptides VNLpSAAQpTLR (B) and VNLpSAQpTLR (C) derived from in vitro phosphorylated His-CCM3 with one and two phosphorylation sites, respectively. CCM3 contains one phosphoserine residue (pS) at position 39 (C) and one phosphothreonine residue (pT) at position 43 (B,C). All prominent signals can be assigned to b- and y-ions.

(N = 110/128). A pronounced pericardial edema is found after 4 days in 78% (N = 285/367) (Table 1; Fig. 5A–D). Inactivation of either *ccm3a* with 1.5 ng/embryo of *ccm3a*-MO directed against the third ATG of the *ccm3a* gene (Fig. 1A) or *ccm3b* with 8 ng/embryo of *ccm3b*^{E414}-MO (Fig. 1A) produced a cardiac

phenotype in only 18% of embryos (N = 54/302 and N = 26/143, respectively) (Table 1). The splice morpholino *ccm3b*^{E414}-MO was designed to block the donor splice site of intron 4 of the *ccm3b* gene (Fig. 1A) and resulted in both severely reduced transcript level and utilization of a cryptic splice site within intron 4. The

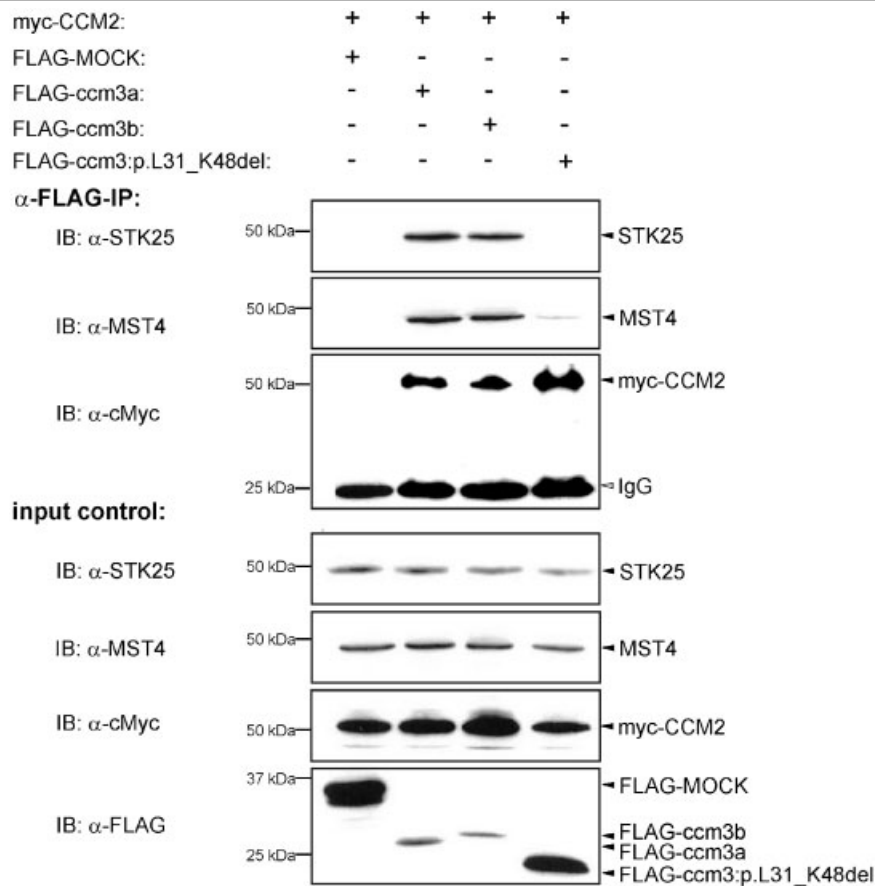


Figure 4. The zebrafish *ccm3b* duplicate retains redundant functionality in vitro and the binding capacity of zebrafish Ccm3:p.L31_K48del is equivalent to human CCM3:p.L33_K50del. Cotransfection of HEK293 cells, immunoprecipitations (IPs) and Western blot analyses (IBs) were performed as in Fig. 2 using the indicated constructs and antibodies. Cotransfection of human myc-CCM2 with FLAG-GFP (FLAG-MOCK) served as transfection control and negative control for IP studies (α -FLAG-IP, lane 1). Both the zebrafish protein FLAG-Ccm3a as well as its duplicate FLAG-Ccm3b coprecipitated with human myc-CCM2, endogenous STK25 and MST4 (α -FLAG-IP, lanes 2 and 3). Analogous to the human mutation CCM3:p.L33_K50, zebrafish mutant Ccm3:p.L31_K48del interacted with myc-CCM2 (α -FLAG-IP, lane 4, bottom panel) but not with endogenous STK25 (α -FLAG-IP, lane 4, top panel) and only weakly with MST4 (α -FLAG-IP, lane 4, middle panel). IB analysis of cell lysates using the indicated antibodies monitors expression of the endogenous proteins (input control, two upper panels) and the cotransfected plasmids (input control, two lower panels). IgG bands at about 25 kDa served as loading controls (α -FLAG-IP, lanes 1–4, bottom panel).

Table 1. Phenotype Frequencies of Embryos Injected With the Indicated Morpholinos*

Morpholino	% Phenotype	N
<i>ccm3a/b</i>	78	285/367
<i>ccm3a</i>	18	54/302
<i>ccm3b</i> ^{E414}	18	26/143
<i>ccm3a</i> ^{E313}	2	5/251
<i>ccm3a</i> ^{E313} / <i>ccm3b</i> ^{E414}	86	131/153

*Downregulation of both *ccm3a* and *ccm3b* (*ccm3a/b*-MO) leads to cardiac dilatation, pericardial edema, and disturbed blood circulation in 78% of the injected embryos after 4 days. This phenotype was observed in only 18% of embryos after injection of either *ccm3a*-MO or *ccm3b*^{E414}-MO. Injection of *ccm3a*^{E313}-MO yields a truncated *ccm3a* protein that retains partial functionality. However, additional knockdown of *ccm3b* (*ccm3a*^{E313}/*ccm3b*^{E414}-MO) reveals that the amino acids encoded by exon 3 of *ccm3a* are essential for cardiovascular development in zebrafish.

addition of 27 intronic bp included a stop codon after 15 bp thus predicting a truncated protein (Supp. Fig. S1A and B). The observation that downregulation of either *ccm3a* or *ccm3b* leads to a less severe phenotype in only a small percentage of embryos indicates that the *ccm3b* duplicate retains redundant functionality in zebrafish development in vivo.

Simultaneous inactivation of both *ccm3a* and *ccm3b* genes with 1 ng *ccm3a/b*-MO in *kdr-l:GFP* transgenic embryos also resulted in dilatation of brain vessels at 32 hpf that look dysmorphic at later stages due to lack of circulation (Fig. 5C and D), in disorganization of overgrown subintestinal vessels (Fig. 5E and F), and in dilatation of the caudal and posterior cardinal veins (Fig. 5G and H) as published most recently for *ccm1* (*santa*) and *ccm2* (*valentine*) mutant zebrafish [Jin et al., 2007; Hogan et al., 2008].

The specificity and efficacy of the morpholinos used to knockdown *ccm3a* and *ccm3b* was confirmed by a number of different criteria. First, the capability of each start codon targeting MO to knockdown the desired target was confirmed by inhibition of GFP translation when the target site of the MO was fused to the 5' of the GFP coding sequence (data not shown). For splice-site targeting MOs, the capability of the MOs to inhibit splicing of the targeted mRNA was confirmed by RT-PCR on RNA extracted from MO-injected embryos, followed by subsequent sequencing of the targeted cDNA product (Supp. Fig. S1). Second, the specificity of the described phenotype to the simultaneous knockdown of *ccm3a* and *ccm3b* is demonstrated by the fact that multiple MOs targeted to the same transcripts reproduce this highly specific cardiovascular phenotype (Table 1). Further indicative of the

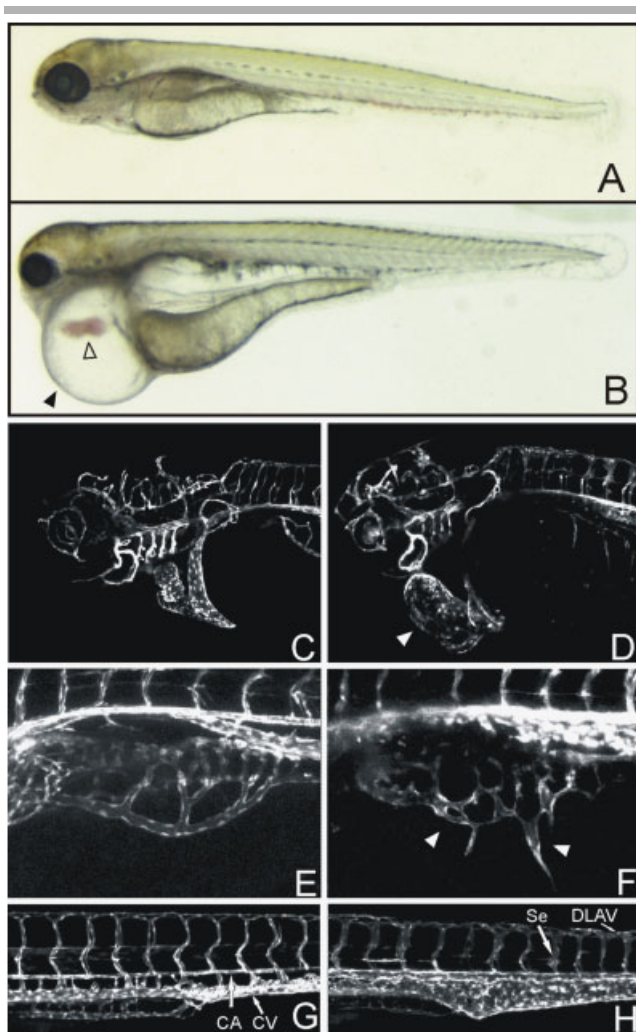


Figure 5. Cardiovascular phenotype after simultaneous inactivation of *ccm3a* and *ccm3b* is identical to *ccm1* and *ccm2* mutants [Hogan et al., 2008]. **A,B:** Lateral view of (A) wild-type larva and (B) 1 ng *ccm3a/b*-MO injected morphant at 4 days postfertilization (dpf) (PTU-treated) demonstrating a dilated heart with an accumulation of erythrocytes (open arrowhead) and a severe pericardial edema (black arrowhead). **C,D:** Confocal microscopy of 72-hpf *kdr-l:GFP* transgenic zebrafish embryos, viewed laterally, after the injection of 1 ng of *ccm3a/b*-MO (D) and for uninjected control embryos (C). The severely dilated heart is clearly observable in *ccm3* morphant embryos (D, arrowhead). Dismorphic brain vessels were observed in all examined morphants. **E,G:** The 4-dpf siblings transgenic for *kdr-l:GFP* and (**F,H**) morphants after injection of 1 ng *ccm3a/b*-MO (PTU-treated). **F:** Disorganized subintestinal vessels with expanded branching (arrowheads). **H:** Extremely enlarged caudal vein (CV), almost spatially indistinguishable from the caudal artery (CA), broadened dorsal longitudinal anastomotic (DLAV) and intersegmental (Se) vessels. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://www.interscience.wiley.com>.]

specificity of the phenotype to the simultaneous knockdown of *ccm3a* and *ccm3b* is the fact that we observe redundancy in function of these duplicated genes, a scenario highly unlikely to occur due to off-target effects. Finally, loss of any of the three CCM genes disrupts the function of the CCM complex [Stahl et al., 2008], and we have shown that knockdown of *ccm3* duplicates produces the identical phenotype to that observed in *ccm1* or *ccm2* mutant zebrafish [Hogan et al., 2008]. Taken together, these data demonstrate that the phenotypes described

here are specific to *ccm3a* and *ccm3b* knockdown and not due to off-target or MO-mediated nonspecific defects.

The STK25 and MST4 Interaction Domain of Ccm3 is Required for Cardiovascular Development in Zebrafish

The only known human *CCM3* in-frame deletion results in a transcript lacking the exon 5 coding sequence and in a truncated protein lacking the STK25 binding and phosphorylation sites (Figs. 1B, 2, and 3) and shows reduced binding to MST4. The corresponding zebrafish mutant protein is also unable to interact with STK25 while coprecipitation with CCM2 is intact (Fig. 4A). Since the STK25 binding and phosphorylation sites are encoded by zebrafish exon 3, we intended to model the human mutation in zebrafish. Knockdown experiments using an antisense morpholino oligomer designed against the donor splice site of intron 3 of the *ccm3a* gene (*ccm3a*^{E313}-MO; Fig. 1A) in fact caused in-frame skipping of exon 3 as confirmed by subcloning and sequencing on the transcript level (Supp. Fig. S1C and D). This could not be shown on the protein level due to the lack of a specific anti-CCM3 antibody that recognizes the respective zebrafish epitope [Pagenstecher et al., 2009]. A total of 6 ng *ccm3a*^{E313}-MO retained about 50% of normally-spliced full-length *ccm3a* transcript and yielded only 50% of *ccm3a* transcript lacking exon 3 thus explaining the need for higher doses of *ccm3a*^{E313}-MO. Given the redundancy of *ccm3a* and *ccm3b*, it is therefore not surprising that the heart phenotype was only observed in 2% of embryos after injection of 1.5 to 6 ng *ccm3a*^{E313}-MO (N = 5/251) (Table 1). Additional downregulation of *ccm3b* using 6 ng *ccm3a*^{E313}-MO and 6 ng *ccm3b*^{E414}-MO produced the severe cardiac dilatation and pericardial edema observed after simultaneous inactivation of *ccm3a* and *ccm3b* in 86% of embryos (N = 131/153) (Table 1). Moreover, coinjection of 6 ng *ccm3a*^{E313}-MO and 6 ng *ccm3b*^{E414}-MO into *kdr-l:GFP* transgenic embryos also resulted in dramatically dilated cranial vasculature (data not shown). Taken together our biochemical data and our knockdown experiments in zebrafish have allowed the identification of the serine/threonine kinase binding and phosphorylation domain in both human and zebrafish CCM3 proteins and demonstrated that this domain is required for normal cardiovascular development in vivo.

Discussion

Given that the CCM3 protein has no homology with any other protein with known structure, our data present a first step toward domain mapping of the CCM3 molecule. Focusing on the functional analysis of a human CCM3 in-frame deletion encompassing amino acids L33 to K50, we identified and characterized the STK25 and MST4 binding sites biochemically and show that the STK25 and MST4 interaction domain of CCM3 is essential for normal cardiovascular development in zebrafish. This demonstrates the functional relevance of CCM3-associated serine/threonine kinases that had been identified in yeast two-hybrid [Rual et al., 2005; Voss et al., 2007] and proteomic screens [Ewing et al., 2007; Goudreaux et al., 2009]. STK25 and MST4 belong to the GCKIII subfamily of Ste20-like kinases that mediate the ordered localization of the Golgi matrix in the perinuclear region [Preisinger et al., 2004], a fundamental step for cell polarity and motility [Mellor, 2004]. Intriguingly, downregulation of *ccm1* in zebrafish also affected endothelial cell morphology rather than endothelial cell proliferation or fate: progressive endothelial cell spreading and thinning appeared to underlie altered vascular morphogenesis [Hogan et al., 2008]. Notably, this was observed

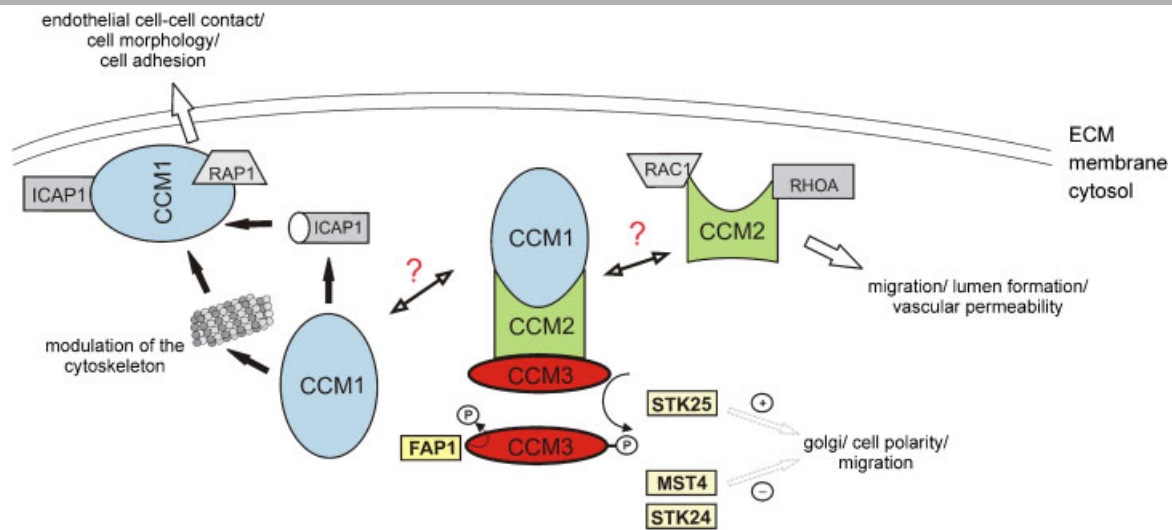


Figure 6. Hypothetical model of the CCM complex and its components in signal transduction. Phosphorylation of CCM3 by STK25 is not necessary for complex formation *in vitro* but could regulate either localization of the entire complex or of CCM3 alone, thereby allowing further interactions. Since CCM3 has been thought to function as a regulatory adaptor protein for MST4 these might include modulation of cell morphology and migration. CCM1 has been shown to stabilize endothelial cell–cell junctions. CCM2 plays similar roles in vessel formation and maintenance of the integrity of the vascular endothelium. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://www.interscience.wiley.com>.]

at an embryonic stage prior to the appearance of vascular pericytes and smooth muscle cells. Consistently, transplantation assays demonstrated that *ccm1* functions autonomously within endothelial cells [Hogan et al., 2009]. Furthermore, loss of CCM1, CCM2, or CCM3 protein expression corresponds to the respective germline mutation and occurs within cavernous endothelial cells of individuals affected with autosomal dominantly-inherited CCM [Pagenstecher et al., 2009]. Finally, conditional knockout mice lacking *Ccm2* in the endothelium as well as siRNA experiments in human endothelial cell cultures have revealed essential roles for CCM2 in endothelial cells *in vivo* and *in vitro* [Whitehead et al., 2009]. Therefore, it seems likely that CCM3 function is also intrinsic to endothelial cells. While STK25 promotes cell migration, MST4 and STK24 kinase activities abolish invasion into collagen via different pathways [Preisinger et al., 2004]. CCM3 overexpression increased MST4 kinase activity, suggesting that CCM3 functions as positive regulator of MST4 [Ma et al., 2007]. Through its different interactions, CCM3 may thus modulate the balance between STK25-induced promigratory events and MST4-mediated antimigratory processes (Fig. 6).

Loss of either *ccm1*, *ccm2* [Hogan et al., 2008], or *ccm3* (Fig. 5) results in identical phenotypes further supporting nonredundant, essential roles for each of the three gene products within the same pathway. We have recently shown that STK25 is part of a CCM2/CCM3 complex [Voss et al., 2007]. In the present study, we show that mutant CCM3:p.L33_K50del is able to bind to CCM2 and to form the ternary CCM protein complex (Fig. 2). This suggests that phosphorylation of CCM3 is not necessary for complex formation and that the interaction domain with CCM2 may be located C-terminally to the STK25 interaction domain of CCM3. It is conceivable that phosphorylation of CCM3 by STK25 and dephosphorylation by FAP-1 [Voss et al., 2007] could control CCM3 localization and interactions (Fig. 6). One possibility is that phosphorylation could mediate CCM3 translocation from the CCM protein complex to other cellular components such as the large multiprotein striatin-interacting phosphatase and kinase (STRIPAK) complex that contains CCM3 but not CCM1 and

CCM2 [Goudreaux et al., 2009]. However, the function of the CCM1/CCM2/CCM3 complex remains to be elucidated.

In summary, the only known human in-frame deletion of CCM3 [Bergametti et al., 2005] fails to bind to STK25 and MST4 (Fig. 2), suggesting a significant role of these interactions in normal vascular development and in the pathogenesis of CCM. While STK25 has been reported to promote cell migration, the CCM3 binding partners STK24 and MST4 inhibit cell migration. These data link CCM3 to pro- and antimigratory processes. Hence, loss of CCM3 could result in imbalanced cell migration contributing to the formation of vascular lesions in the brain.

Acknowledgments

This work was supported by the Bavarian Genome Network. Special thanks go to S. Ullrich for contributing to Figure 5; Drs. C. Winkler (University of Singapore) and I. Moarefi (CRELUX GmbH) for comments; and S. Gätzner and J. Peterson-Maduro for excellent technical assistance. E.S. receives a stipend from the Graduiertenkolleg 1048.

References

- Akers AL, Johnson E, Steinberg GK, Zabramski JM, Marchuk DA. 2008. Biallelic somatic and germline mutations in cerebral cavernous malformations (CCM): evidence for a two-hit mechanism of CCM pathogenesis. *Hum Mol Genet* 18:919–930.
- Beraud-Dufour S, Gautier R, Albiges-Rizo C, Chardin P, Faurobert E. 2007. Krit1 interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. *FEBS J* 274:5518–5532.
- Bergametti E, Denier C, Labauge P, Arnoult M, Boetto S, Clanet M, Coubes P, Echenne B, Ibrahim R, Irthum B, Jacquet G, Lonjon M, Moreau JJ, Neau JP, Parker F, Tremoulet M, Tournier-Lasserre E. 2005. Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 76:42–51.
- Bussmann J, Lawson N, Zon L, Schulte-Merker S. 2008. Zebrafish VEGF receptors: a guideline to nomenclature. *PLoS Genet* 4:e1000064.
- Chen JN, Haffter P, Odenthal J, Vogelsang E, Brand M, van Eeden FJ, Furutani-Seiki M, Granato M, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Nusslein-Volhard C. 1996. Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish. *Development* 123:293–302.

- Dan I, Ong SE, Watanabe NM, Blagoev B, Nielsen MM, Kajikawa E, Kristiansen TZ, Mann M, Pandey A. 2002. Cloning of MASK, a novel member of the mammalian germinal center kinase III subfamily, with apoptosis-inducing properties. *J Biol Chem* 277:5929–5939.
- Ewing RM, Chu P, Elisma F, Li H, Taylor P, Climie S, McBroom-Cerajewski L, Robinson MD, O'Connor L, Li M, Taylor R, Dharsee M, Ho Y, Heilbut A, Moore L, Zhang S, Ornatsky O, Bukhman YV, Ethier M, Sheng Y, Vasilescu J, Abu-Farha M, Lambert JP, Duewel HS, Stewart II, Kuehl B, Hogue K, Colwill K, Gladwish K, Muskat B, Kinach R, Adams SL, Moran MF, Morin GB, Topaloglou T, Figeys D. 2007. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* 3:89.
- Gault J, Shenkar R, Recksiek P, Awad IA. 2005. Biallelic somatic and germ line *CCM1* truncating mutations in a cerebral cavernous malformation lesion. *Stroke* 36:872–874.
- Glading A, Han J, Stockton RA, Ginsberg MH. 2007. KRIT-1/*CCM1* is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. *J Cell Biol* 179:247–254.
- Goudreaux M, D'Ambrosio LM, Kean MJ, Mullin M, Larsen BG, Sanchez A, Chaudhry S, Chen GI, Sicheri F, Nesvizhskii AI, Aebersold R, Raught B, Gingras AC. 2009. A PP2A phosphatase high-density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (*CCM3*) protein. *Mol Cell Proteomics* 8:157–171.
- Guclu B, Ozturk AK, Pricola KL, Bilguvar K, Shin D, O'Roak BJ, Gunel M. 2005. Mutations in apoptosis-related gene, *PDCD10*, cause cerebral cavernous malformation 3. *Neurosurgery* 57:1008–1013.
- Hilder TL, Malone MH, Bencharit S, Colicelli J, Haystead TA, Johnson GL, Wu CC. 2007. Proteomic identification of the cerebral cavernous malformation signaling complex. *J Proteome Res* 6:4343–4355.
- Hogan BM, Bussmann J, Wolburg H, Schulte-Merker S. 2008. *ccm1* cell autonomously regulates endothelial cellular morphogenesis and vascular tubulogenesis in zebrafish. *Hum Mol Genet* 18:1965–1978.
- Huang CY, Wu YM, Hsu CY, Lee WS, Lai MD, Lu TJ, Huang CL, Leu TH, Shih HM, Fang HI, Robinson DR, Kung HJ, Yuan CJ. 2002. Caspase activation of mammalian sterile 20-like kinase 3 (*Mst3*). Nuclear translocation and induction of apoptosis. *J Biol Chem* 277:34367–34374.
- Jin SW, Beis D, Mitchell T, Chen JN, Stainier DY. 2005. Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish. *Development* 132:5199–5209.
- Jin SW, Herzog W, Santoro MM, Mitchell TS, Frantsve J, Jungblut B, Beis D, Scott IC, D'Amico LA, Ober EA, Verkade H, Field HA, Chi NC, Wehman AM, Baier H, Stainier DY. 2007. A transgene-assisted genetic screen identifies essential regulators of vascular development in vertebrate embryos. *Dev Biol* 307:29–42.
- Kleaveland B, Zheng X, Liu JJ, Blum Y, Tung JJ, Zou Z, Chen M, Guo L, Lu MM, Zhou D, Kitajewski J, Affolter M, Ginsberg MH, Kahn ML. 2009. Regulation of cardiovascular development and integrity by the heart of glass-cerebral cavernous malformation protein pathway. *Nat Med* 15:169–176.
- Labauge P, Denier C, Bergametti F, Tournier-Lasserre E. 2007. Genetics of cavernous angiomas. *Lancet Neurol* 6:237–244.
- Liquori CL, Berg MJ, Squitieri F, Ottenbacher M, Sorlie M, Leedom TP, Cannella M, Maglione V, Ptacek L, Johnson EW, Marchuk DA. 2006. Low frequency of *PDCD10* mutations in a panel of *CCM3* probands: potential for a fourth *CCM* locus. *Hum Mutat* 27:118.
- Liquori CL, Berg MJ, Squitieri F, Leedom TP, Ptacek L, Johnson EW, Marchuk DA. 2007. Deletions in *CCM2* are a common cause of cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 80:69–75.
- Lu TJ, Lai WY, Huang CY, Hsieh WJ, Yu JS, Hsieh YJ, Chang WT, Leu TH, Chang WC, Chuang WJ, Tang MJ, Chen TY, Lu TL, Lai MD. 2006. Inhibition of cell migration by autophosphorylated mammalian sterile 20-like kinase 3 (*MST3*) involves paxillin and protein-tyrosine phosphatase-PEST. *J Biol Chem* 281:38405–38417.
- Ma X, Zhao H, Shan J, Long F, Chen Y, Zhang Y, Han X, Ma D. 2007. *PDCD10* interacts with Ste20-related kinase *MST4* to promote cell growth and transformation via modulation of ERK pathway. *Mol Biol Cell* 18:1965–1978.
- Mably JD, Chuang LP, Serluca FC, Mohideen MA, Chen JN, Fishman MC. 2006. *santa* and *valentine* pattern concentric growth of cardiac myocardium in the zebrafish. *Development* 133:3139–3146.
- Mellor H. 2004. Cell motility: Golgi signalling shapes up to ship out. *Curr Biol* 14:R434–R435.
- Nogueira E, Fidalgo M, Molnar A, Kyriakis J, Force T, Zalvide J, Pombo CM. 2008. SOK1 translocates from the Golgi to the nucleus upon chemical anoxia and induces apoptotic cell death. *J Biol Chem* 283:16248–16258.
- Pagenstecher A, Stahl S, Sure U, Felbor U. 2009. A two-hit mechanism causes cerebral cavernous malformations: complete inactivation of *CCM1*, *CCM2* or *CCM3* in affected endothelial cells. *Hum Mol Genet* 18:911–918.
- Pombo CM, Bonventre JV, Molnar A, Kyriakis J, Force T. 1996. Activation of a human Ste20-like kinase by oxidant stress defines a novel stress response pathway. *EMBO J* 15:4537–4546.
- Preisinger C, Short B, De Corte V, Bruyneel E, Haas A, Kopajtic R, Gettemans J, Barr FA. 2004. YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3zeta. *J Cell Biol* 164:1009–1020.
- Reinders J, Wagner K, Zahedi RP, Stojanovski D, Eyrieh B, van der Laan M, Rehling P, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C. 2007. Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase. *Mol Cell Proteomics* 6:1896–1906.
- Revenu N, Vikkula M. 2006. Cerebral cavernous malformation: new molecular and clinical insights. *J Med Genet* 43:716–721.
- Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg DS, Zhang LV, Wong SL, Franklin G, Li S, Albala JS, Lim J, Fraughton C, Llamosas E, Cevik S, Bex C, Lamesch P, Sikorski RS, Vandenhaute J, Zoghbi HY, Smolyar A, Bosak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Cusick ME, Hill DE, Roth FP, Vidal M. 2005. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437:1173–1178.
- Schinkmann K, Blenis J. 1997. Cloning and characterization of a human STE20-like protein kinase with unusual cofactor requirements. *J Biol Chem* 272:28695–28703.
- Schönleben S, Sickmann A, Mueller MJ, Reinders J. 2007. Proteome analysis of *Apis mellifera* royal jelly. *Anal Bioanal Chem* 389:1087–1093.
- Serebriiskii I, Estojak J, Sonoda G, Testa JR, Golem EA. 1997. Association of Krev-1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene* 15:1043–1049.
- Stahl S, Gaetner S, Voss K, Brackertz B, Schleider E, Sürücü O, Kunze E, Netzer C, Korenke C, Finckh U, Habek M, Poljakovic Z, Elbracht M, Rudnick-Schöneborn S, Bertalanffy H, Sure U, Felbor U. 2008. Novel *CCM1*, *CCM2*, and *CCM3* mutations in patients with cerebral cavernous malformations: in-frame deletion in *CCM2* prevents formation of a *CCM1/CCM2/CCM3* protein complex. *Hum Mutat* 29:709–717.
- Stainier DY, Fouquet B, Chen JN, Warren KS, Weinstein BM, Meiler SE, Mohideen MA, Neuhaus SC, Solnica-Krezel L, Schier AF, Zwartkruis F, Stemple DL, Malicki J, Driever W, Fishman MC. 1996. Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development* 123:285–292.
- Uhlik MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, Horne EA, Dell'Acqua ML, Johnson GL. 2003. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol* 5:1104–1110.
- Verlaan DJ, Roussel J, Laurent SB, Elger CE, Siegel AM, Rouleau GA. 2005. *CCM3* mutations are uncommon in cerebral cavernous malformations. *Neurology* 65:1982–1983.
- Voss K, Stahl S, Schleider E, Ullrich S, Nickel J, Mueller TD, Felbor U. 2007. *CCM3* interacts with *CCM2* indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. *Neurogenetics* 8:249–256.
- Whitehead KJ, Chan AC, Navankasattusas S, Koh W, London NR, Ling J, Mayo AH, Drakos SG, Marchuk DA, Davis GE, Li DY. 2009. The cerebral cavernous malformation signaling pathway promotes vascular integrity via Rho GTPases. *Nat Med* 15:177–184.
- Wohlgemuth S, Kiel C, Kramer A, Serrano L, Wittinghofer F, Herrmann C. 2005. Recognizing and defining true Ras binding domains I: biochemical analysis. *J Mol Biol* 348:741–758.
- Zawistowski JS, Serebriiskii IG, Lee MF, Golem EA, Marchuk DA. 2002. KRIT1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: a new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (*CCM1*) pathogenesis. *Hum Mol Genet* 11:389–396.
- Zawistowski JS, Stalheim L, Uhlik MT, Abell AN, Ancrile BB, Johnson GL, Marchuk DA. 2005. *CCM1* and *CCM2* protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Hum Mol Genet* 14:2521–2531.
- Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, Chang DD, Dietz HC. 2001. Interaction between krit1 and icap1 α infers perturbation of integrin β 1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet* 10:2953–2960.
- Zhang J, Rigamonti D, Dietz HC, Clatterbuck RE. 2007. Interaction between krit1 and malcavernin: implications for the pathogenesis of cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery* 60:353–359.

Anlage 2, Voss et al., 2009:

Eigenanteil/own contribution:

UF and SS initiated the study and coordinated the experimental work. SSM and BMH contributed to the design of the study and supported the zebrafish analyses. UF, KV, SS, and **ES** prepared the manuscript with feedback from the other authors. SS and BMH performed the zebrafish experiments. KV, SS, and **ES** conducted most of the protein experiments. JR performed the mass spectrometry analyses. UF oversaw the entire project.

Unterschriften der Autoren/signatures of the authors:

Voss, K.

Stahl, S.

Reinders, J.

Hogan, B.M.

Schleider, E

Schulte-Merk

Felbor, U.

Anlage 3

Evidence for anti-angiogenic and pro-survival functions of the cerebral cavernous malformation protein 3

Elisa Schleider^{1,2}, Sonja Stahl^{1,2}, Joycelyn Wüstehube³, Ulrich Walter², Andreas Fischer³, Ute Felbor⁴

¹Department of Human Genetics and ²Institute of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, University of Würzburg, Germany

³Joint Research Division Vascular Biology of the Medical Faculty Mannheim (CBTM), Heidelberg University, and the German Cancer Research Center (DKFZ-ZMBH Alliance), Germany

⁴Institute of Human Genetics, University Hospital Greifswald and Interfaculty Institute for Genetics and Functional Genomics, Ernst-Moritz-Arndt University Greifswald, Germany

Communicating author:

Ute Felbor, MD

Institute of Human Genetics, University Hospital Greifswald, Fleischmannstr. 42/44

D-17475 Greifswald, Germany

felbor@uni-greifswald.de

Tel.: (+)49-3834-86-5370, Fax: (+)49-3834-86-5393

Cerebral cavernous malformations (CCM) have a prevalence of about 1 in 200 individuals and can occur sporadically or in an autosomal dominantly inherited manner with 60% disease penetrance. Affected patients present with chronic headaches, epilepsy or hemorrhagic stroke. Second hit somatic loss-of-function mutations in *CCM1* (*KRIT1*), *CCM2* (*OSM*) or *CCM3* (*PDCD10/Programmed Cell death 10*) have been identified within cavernous lesions [1].

The gene products of *CCM1* and *CCM2* were shown to be important for endothelial cell-cell junction formation and maintenance of endothelial barrier function [2] [3]. In contrast, *CCM3* remains without precise endothelial cell function description. Originally, *CCM3* mRNA was found to be upregulated in an apoptotic human myeloid cell line [4]. An apoptosis-inducing role was suggested based on *CCM3* overexpression in HeLa cells and increased *CCM3* transcription levels in serum-deprived human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) [5]. In a human prostate cancer cell line, *CCM3* was reported to promote cell proliferation [6]. Most recently, endothelial cell-specific disruption of *ccm3* in mice demonstrated that *CCM3* is essential for early embryonic vascular development and acts through stabilization of VEGFR2 signaling [7].

The aim of this study was to characterize *CCM3* function in primary human endothelial cells. The isolation of highly pure endothelial cells from CCM lesions has been hampered by calcification of the resected lesions and the presence of diverse cell types within CCM specimen including not only cavernous but also normal neoangiogenic endothelial cells [1]. Therefore, an adenoviral approach with almost 100% transduction efficiency was used for overexpression of human *CCM3* in HUVECs (details are provided in Supplementary Information).

Overexpression of CCM3 led to twofold reduction of cell proliferation, an at least twofold reduced motility, and a decreased ability to form complete capillary-like structures on Matrigel. CCM3-depletion resulted in increased tube formation when compared to siRNA control and GFP-overexpressing cells (Fig. 1a-d, for details see Supplementary Information). This observation that downregulation of endogenous CCM3 results in increased formation of tube-like structures is in agreement with previous *ccm3* knockdown studies in zebrafish that revealed excessive disorganized sprouting of subintestinal vessels [8].

Induction of apoptosis with 250 nmol/l staurosporine for 2h resulted in more than 4-fold increased caspase 3/7 activities in GFP-overexpressing HUVECs. In contrast, CCM3-overexpressing HUVECs showed only a less than twofold increase in caspase 3/7 activities (Fig. 1e). These data are in line with the observation that endogenous CCM3 expression is increased in HUVECs 30 minutes after induction of apoptosis by serum deprivation prior to the increase of cleaved caspase 3 levels seen after 3 hours [5]. However, our data demonstrate that upregulation of CCM3 protects endothelial cells from cell death rather than inducing it.

Tyrosine kinase activity profiling represents an unbiased novel approach to dissect the mechanisms behind the observed negative effects of CCM3 overexpression on endothelial cell proliferation, migration, tube formation, and apoptosis. Details on tyrosine kinase activity profiling are provided in Supplementary Information. HUVECs transduced with CCM3 demonstrated significantly increased tyrosine 9-specific phosphorylation for 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDPK-1, data not shown). Elevated levels of PDPK-1 phosphorylated at its tyrosine 9 residue could be confirmed with phosphospecific antibodies against PDPK-1 in HUVECs overexpressing CCM3 (Fig. 1f). PDPK-1 had been shown to be important for endothelial cell migration [9] and formation of a circulatory system in embryonic mice [10] and plays a central role in Akt activation upon growth factor stimulation [11]. In accordance with the observation that embryonic CCM3 knockout tissues

showed decreased Akt phosphorylation [7], CCM3 overexpression led to increased phosphorylation of the potent inhibitor of apoptosis Akt at threonine 308 and serine 473 (Fig. 1f) [12]. Thus, CCM3 expression resulted in altered phosphorylation patterns in endothelial cells including activation of Akt and its upstream activator PDPK-1.

Taken together, we show that CCM3 inhibits endothelial cell migration, proliferation, and tube formation and supports PDPK-1/Akt-mediated endothelial cell survival. Our data suggest that CCM3 plays a crucial role in maintaining endothelial integrity and protection from cell death.

Acknowledgements

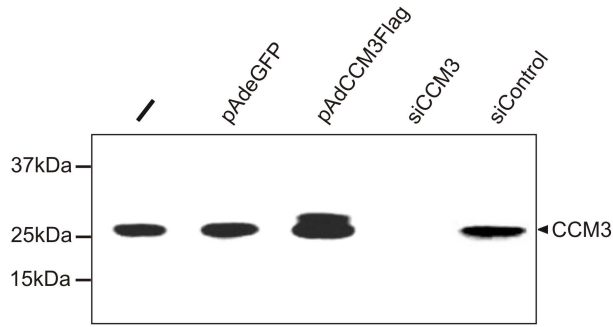
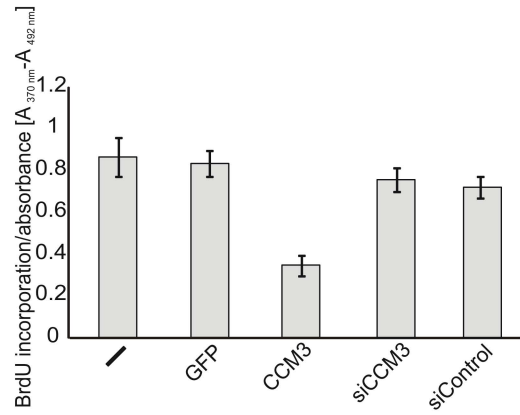
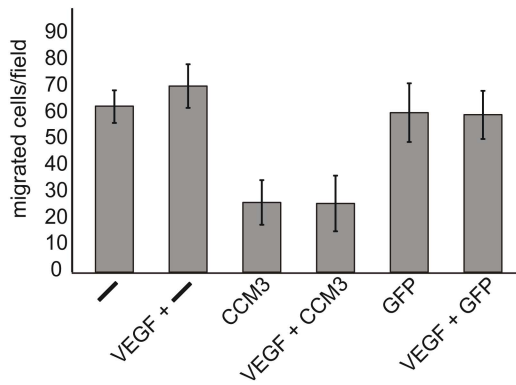
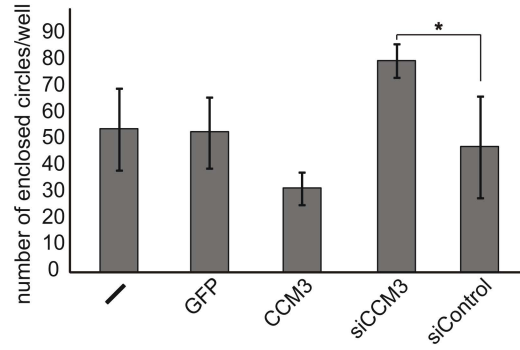
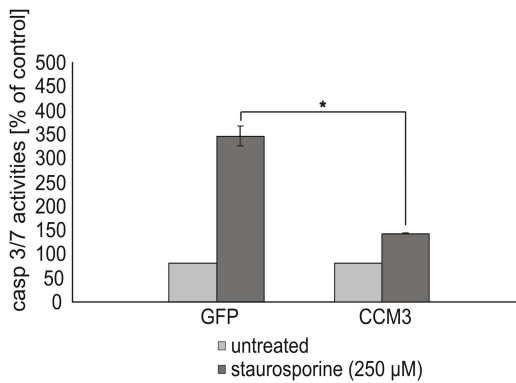
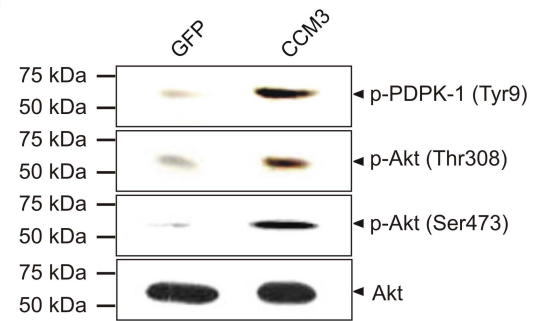
The authors thank D. Pijnenburg and A. Brilleman from PamGene International B.V. for performing PamChip kinase arrays and bioinformatics. This work was supported by the Bavarian Genome Network. E.S. receives a stipend from the Graduiertenkolleg 1048. A.F. receives funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG (SFB-Transregio 23 and Graduiertenkolleg 880).

Figure legend

Fig. 1 Overexpression of CCM3 in HUVECs strongly impaired endothelial cell proliferation, migration, tube formation and apoptosis and activated the PDPK-1/Akt survival pathway. **(a)** Western Blot analysis with anti-CCM3 antibody revealed prominent overexpression of CCM3 (lane 3) and successful downregulation of endogenous CCM3 (lane 4). **(b)** Cells overexpressing CCM3 (lane 3) proliferated half as much as control cells (lanes 1, 2 and 5) and siCCM3 transfected cells (lane 4). **(c)** The ability of endothelial cells to migrate was strikingly reduced in cells overexpressing CCM3 (lanes 3 and 4) when compared to untreated (lanes 1 and 2) and GFP-transduced cells (lanes 5 and 6). **(d)** CCM3-transduced (lane 3) cells showed decreased ability to form complete capillary-like structures. CCM3-depleted cells showed a slight but significant increase in tube formation (lane 4). **(e)** Overexpression of CCM3 had no effect on apoptosis under normal growth factor conditions but staurosporine-induced cell death was more than 2-fold less in CCM3-overexpressing cells when compared to GFP-overexpressing cells. **(f)** Western Blot analyses of HUVEC lysates overexpressing GFP (lane 1) or CCM3 (lane 2), respectively. Protein expression was detected using anti-phospho-PDPK-1 (Tyr 9), anti-phospho-Akt (Thr 308), and anti-phospho-Akt (Ser 473). Anti-Akt staining served as loading control. Phosphorylation of PDPK-1 and Akt was significantly elevated in CCM3-overexpressing cell lysates (lane 2). *, $p < 0.01$

Literature

1. Limaye N, Boon LM, Vikkula M (2009) From germline towards somatic mutations in the pathophysiology of vascular anomalies. *Hum Mol Genet* 18:R65-74.
2. Glading A, Han J, Stockton RA, Ginsberg MH (2007) KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. *J Cell Biol* 179:247-254.
3. Whitehead KJ, Chan AC, Navankasattusas S, Koh W, London NR, Ling J, Mayo AH, Drakos SG, Jones CA, Zhu W, Marchuk DA, Davis GE, Li DY (2009) The cerebral cavernous malformation signaling pathway promotes vascular integrity via Rho GTPases. *Nat Med* 15:177-184.
4. Wang Y, Liu H, Zhang Y, Ma D (1999) cDNA cloning and expression of an apoptosis-related gene, human *TFAR15* gene. *Science in China (Series C)* 42:323-329.
5. Chen L, Tanriover G, Yano H, Friedlander R, Louvi A, Gunel M (2009) Apoptotic functions of PDCD10/CCM3, the gene mutated in cerebral cavernous malformation 3. *Stroke* 40:1474-1481.
6. Ma X, Zhao H, Shan J, Long F, Chen Y, Chen Y, Zhang Y, Han X, Ma D (2007) PDCD10 interacts with Ste20-related kinase MST4 to promote cell growth and transformation via modulation of the ERK pathway. *Mol Biol Cell* 18:1965-1978.
7. He Y, Zhang H, Yu L, Gunel M, Boggon TJ, Chen H, Min W (2010) Stabilization of VEGFR2 signaling by cerebral cavernous malformation 3 is critical for vascular development. *Sci Signal*. doi: 10.1126/scisignal.2000722.
8. Voss K, Stahl S, Hogan BM, Reinders J, Schleider E, Schulte-Merker S, Felbor U (2009) Functional analyses of human and zebrafish 18-amino acid in-frame deletion pave the way for domain mapping of the cerebral cavernous malformation 3 protein. *Hum Mutat* 30:1003-1011.
9. Primo L, di Blasio L, Roca C, Droetto S, Piva R, Schaffhausen B, Bussolino F (2007) Essential role of PDK1 in regulating endothelial cell migration. *J Cell Biol* 176:1035-1047.
10. Lawlor MA, Mora A, Ashby PR, Williams MR, Murray-Tait V, Malone L, Prescott AR, Lucocq JM, Alessi DR (2002) Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *EMBO J* 21:3728-3738.
11. Bayascas JR (2008) Dissecting the role of the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) signalling pathways. *Cell Cycle* 7:2978-2982.
12. Hemmings BA (1997) Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. *Science* 275:628-630.

a**b****c****d****e****f**

Evidence for anti-angiogenic and pro-survival functions of the cerebral cavernous malformation protein 3

Neurogenetics

E. Schleider^{1,2}, S. Stahl^{1,2}, J. Wüsthube³, U. Walter², A. Fischer³, U. Felbor⁴

¹Department of Human Genetics and ²Institute of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, University of Würzburg, Germany

³Joint Research Division Vascular Biology of the Medical Faculty Mannheim (CBTM), Heidelberg University, and the German Cancer Research Center (DKFZ-ZMBH Alliance), Germany

⁴Institute of Human Genetics, University Hospital Greifswald and Interfaculty Institute for Genetics and Functional Genomics, Ernst-Moritz-Arndt University Greifswald, Germany

Communicating author:

Ute Felbor, MD

felbor@uni-greifswald.de

Supplementary methods

Adenoviral constructs, siRNAs, antibodies, and western blot analyses

pENTR3C-CCM3Flag-IRES-eGFP was generated by PCR-cloning full-length human *CCM3* cDNA into the *SmaI/SacI* site of pENTR3C-IRES-eGFP using a 3'-primer containing the coding sequences for the Flag tag. The adenoviral plasmid pAd-CCM3Flag-IRES-eGFP was generated by clonase-mediated recombination using pAd/CMV/V5-DEST (Invitrogen) as acceptor and pENTR3C-CCM3-IRES-eGFP as donor (Gateway[®] LR Clonase[®] enzyme mix, Invitrogen). HEK293A cells were transfected with the indicated constructs and lysates containing recombinant adenoviruses were produced by using the Virapower[™] Adenovirus Expression System (Invitrogen). The following validated human *CCM3* specific siRNA molecules were used: siGENOME siRNA PDCD10 (ID: D-004436-03; Dharmacon) (termed siCCM3) and validated nontargeting negative control siCONTROL Non-targeting Pool siRNA (ID: D-001206-13-05; Dharmacon) (termed siControl). For Western blot analyses membranes were probed with rabbit polyclonal anti-CCM3 (IG-626; immunoGlobe GmbH), phospho-PDPK-1 (Tyr9) (ab45375, Abcam), phospho-Akt (Thr308) (2965, Cell Signalling), phospho-Akt (Ser473) (9271, Cell Signalling), Akt (9272, Cell Signalling). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase were obtained from Dianova.

Transfection of HUVECs with siRNA molecules

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were purchased from PromoCell, cultured in endothelial cell growth medium (ECGM, PromoCell) completed with 10 % FCS and antibiotics, seeded in 6-well plates, and grown to 50 % confluency. Transfection was performed with siRNA (final concentration: 200 nmol/L) and 6 μ L of Oligofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The transfection medium was replaced

after 4 hours by ECGM containing 10 % FCS and antibiotics, and the cells were incubated for another 48 hours.

Transduction of HUVECs with adenoviral constructs

HUVECs were seeded in 6-well plates and grown to 80 % confluency. 1 h before transduction, medium was changed into serum-free endothelial cell basal medium (PromoCell). After addition of Polybrene (1:1000), 100 μ l of adenovirus-containing lysate was added to each well. The transduction medium was replaced after 4 hours by ECGM containing 10 % FCS and the cells were incubated for another 48 hours.

Proliferation assay with HUVECs using 5-Bromodeoxyuridine

siRNA transfected or adenovirus transduced HUVECs were seeded in 96-well plates (2000 cells/well). 24 h later, new medium with 5-bromodeoxyuridine (5-BrdU) was added. 5-BrdU incorporation was measured 1 day later according to the manufacturer's protocol (Cell Proliferation ELISA, BrdU; Roche Applied Science).

Migration Assay with HUVECs

HUVECs were transduced with the indicated adenoviral constructs or transfected with siRNA. 24 h later, cells were starved overnight in endothelial cell basal medium (PromoCell) with 2.5 % FCS without any supplements. Chemotaxis was assessed using a modified 48-well Micro Chemotaxis Boyden chamber (Neuroprobe) and a polycarbonate membrane (8 μ m pore diameters, Whatman) coated with collagen I. Cells were stimulated by placing 25 ng/ml VEGF (R&D Systems) diluted in starving medium in the lower wells of the chamber. Every sample was done in triplicate. In the upper wells of the chamber 3×10^5 cells/ ml were allowed to migrate for 3 h in a humidified chamber at 37 °C and 5 % CO₂. After migration, the membrane-bound cells were ethanol-fixed and stained with Giemsa. The membrane was

attached to a microscope slide and non-migrating cells were removed from the upper side of the filter by using a cotton bud. HUVEC migration was quantified by counting the number of cells in five random fields (x 40 total magnification) per well.

Matrigel Assay with HUVECs

HUVECs were transduced/transfected with the indicated adenoviral constructs or siRNA, respectively. 48 h later, 150 μ l of growth factor reduced BD MatrigelTM Matrix (BD Bioscience) was put into each well of a 48-well plate and incubated for 30 minutes at 37 °C and 5 % CO₂. siRNA transfected and adenovirus transduced HUVECs were trypsinized and 2.5 x 10⁴ cells were plated per well. Cells were incubated overnight at 37 °C and 5 % CO₂. The number of completely enclosed circles per well was counted for 5 randomly chosen fields using light microscopy. Paired or unpaired two-tailed *t*-tests were performed using GraphPad Software depending on effective matching of the analyzed data. Standard deviation is indicated by error bars. Significance was assumed for *P* values < 0.05.

Caspase 3/7 Assay

HUVECs were transduced with the indicated adenoviral constructs. 48 h later, apoptosis was quantified by measuring caspase 3 and 7 activities, using Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega). Induction of apoptosis was done with 250 nmol/l staurosporine (Sigma-Aldrich) for 2 h.

Tyrosine kinase activity profiling

HUVECs overexpressing either CCM3 or GFP were starved overnight in endothelial cell basal medium (PromoCell) supplemented with 0.5 % FCS. 24 h later, cells were stimulated with VEGF for 5 and 15 min, respectively. For biological replicates *n* = 3 for each time point and sample. Cell lysates were harvested in lysis buffer (M-PER Mammalian Extraction Buffer, Pierce 78503) supplemented with Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail (Pierce 78420)

and Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA free (Pierce 78415). Arrays containing 144 kinase substrates (Tyrosine Kinase PamChip[®]96 Peptide Microarray # 86311, PamGene International B.V.) were incubated with 5 µg total protein in 40 µl of kinase assay buffer in the presence and absence of ATP (n=4 for technical replicates; GFP at time point 5 min served as negative control) and a fluorescently labeled antibody (PY20) to phospho-tyrosine. The cell line A431 served as internal system control. Real-time detection of phospho-tyrosine residues with a PamStation 4 and data analyses using Bionavigator software were done by PamGene International B.V.

Anlage 3, Schleider et al., 2010:

Eigenanteil/own contribution:

UF, **ES** and SS initiated the study and coordinated the experimental work. AF and JW contributed to the design of the study and supported the angiogenesis *in vitro* assays. **ES**, UF and AF prepared the manuscript with feedback from the other authors. **ES** performed the production of the adenovirus constructs, the validation of the siRNA, the angiogenesis *in vitro* assays and the production of adenovirus lysates for the kinase array analysis. **ES** and SS evaluated the array results. **ES** conducted most of the array confirmation work with support from AF and JW. UF, AF and UW oversaw the entire project.

Unterschriften der Autoren/signatures of the authors:

Schleider, E.,

Stahl, S.,

Wüstehube, J.,

Walter, U.,

Fischer, A.,

Felbor, U.

Prof. Dr. med. Ute Felbor

Elisa Schleider