

# **Differentielle Genexpressionsanalyse aktivierter Endothelzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Tobias Schmidt

aus Stuttgart

Göttingen 2001

D7

Referent: Prof. Dr. R. Hardeland

Koreferent: Prof. Dr. H.-D. Söling

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2001

„Ein Drittel [meines Publikums] glaubt, ihr Genom sei im Gehirn, ein weiteres Drittel vermutet es in den Eierstöcken beziehungsweise den Hoden und ausschliesslich dort. Das letzte Drittel hat keine Ahnung, wovon ich eigentlich rede.“  
Craig Venter im ZEIT-Gespräch (Nr. 42/2000: 28)

denen,  
die mich begleitet haben

---

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Angiogenese	1
1.2	Untersuchung der Angiogenese	5
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>9</b>
2.1	Chemikalien und Geräte	9
2.2	Zellen, Plasmide und Oligonukleotide	11
2.2.1	Bakterienstämme	11
2.2.2	Zelllinien und Gewebe	12
2.2.3	Plasmide	13
2.2.4	Oligodesoxyribonukleotide	13
2.3	Kulturbedingungen von <i>E. coli</i>	18
2.4	Zellkultur	19
2.5	Molekularbiologische Methoden	20
2.5.1	Standardmethoden	20
2.5.2	Klonierung	21
2.5.3	Isolation und Aufreinigung von Nucleinsäuren	22
2.5.4	Northern Blot	24
2.5.5	Reverse Transkription von RNA	27
2.5.6	PCR	28
2.5.7	Sequenzierung	30
2.5.8	Differentielles RNA Display (DD)	31
2.5.9	5'-RACE	38
2.6	Proteinchemische Methoden	42
2.6.1	Standardmethoden	42
2.6.2	Western-blot	43
2.6.3	Expressions-Klonierung	45
2.6.4	Proteinextraktion aus <i>E. coli</i>	47
2.7	Bioinformatische Methoden	49
2.7.1	Software und Datenbanken	49
2.7.2	EST-Integration	51

---

<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>52</b>
3.1	Differential Display-Strategie	52
3.2	Differential Display	54
3.2.1	Isolierung und Verifikation	56
3.3	Identifikation differentiell exprimierter Gene	58
3.3.1	Bekannte Gene	59
3.3.2	Genfragmente / EST-Homologien	65
3.4	Steckbriefe neuer Gene	67
3.4.1	Gen 40-2-3	67
3.4.2	Gen 40-6-3	72
3.4.3	Gen 40-9-1	75
3.4.4	Gen 42-9-9	78
3.4.5	Gen 67-11-3	83
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>88</b>
4.1	Methodenkritik	88
4.2	Expressionsmuster bekannter Gene	98
4.3	Expressionsmuster neuer Gene	104
4.4	Ausblick	108
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>118</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>120</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>133</b>
7.1	EMBL-Genbank- <i>submission</i>	133
7.2	Abkürzungen	134
7.3	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	136
7.4	Lebenslauf	137

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 ANGIOGENESE

Das Gefässsystem findet seinen ontogenetischen Ursprung in der **Vaskulogenese**. In der Embryonalentwicklung differenzieren sich hämatopoietische Stammzellen mesodermaler Herkunft über Angioblasten zu Endothelzellen (EC), die als vaskuläre Lakunen bezeichnete Blutinseln umschliessen. Durch Fusionierung bildet sich schliesslich ein primitives Netzwerk aus, der sogenannte primäre vaskuläre Plexus (Risau & Flamme, 1995). Obwohl dieser Prozess ausschliesslich auf die Embryonalentwicklung beschränkt ist, gibt es neuerdings Hinweise auf Gefässneubildung durch vaskulogeneseartige Vorgänge im postnatalen Organismus, indem jüngst identifizierte, im Blut zirkulierende EC-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark unterstützend in die Gefässneubildung einbezogen werden (Asahara *et al.*, 1999). Abgelöst wird die Gefässinitiierung durch Vaskulogenese von der nun (teilweise parallel) einsetzenden Weiterentwicklung bestehender Gefässe, der **Angiogenese**. Man unterscheidet dabei zwischen sprossender und nicht-sprossender Variante (Risau, 1997; Carmeliet, 2000). Die längsseitige Teilung einer Kapillare durch Einschnürung (Intussusception) oder Kompartimentierung via intrakapillar einwachsende Endothelzellbrücken führt zur Gefässvermehrung nach nicht-sprossendem Muster, wobei umgekehrt auch eine Verschmelzung mehrerer kleiner Gefässe zu einem großen möglich ist.

Dem Vorkommen nach am wichtigsten ist die Neovaskularisation durch Sprossung und daraus resultierende Verzweigung bestehender Blutgefässe. Im adulten Organismus kommt dieser Prozess im physiologischen Kontext beinahe vollständig zum Erliegen, lediglich im weiblichen ovariellen Zyklus in Corpus luteum und Uterus findet noch regelhaft angiogene Gefässbildung statt. Ansonsten ist der onkofetale Mechanismus im adulten ausschliesslich mit pathologischen Vorgängen assoziiert, wie Wundheilung, Entzündung, Tumorvaskularisierung oder Retinopathien.

Die zentrale, diesen Angiogeneseprozess modulierende Zielzelle ist die **Endothelzelle**. Das vaskuläre Endothel kleidet als einschichtige Zelllage mesodermalen Ursprungs das gesamte Gefässsystem luminal aus, im gesunden, maturen Gefäss vollständig wachstumsarretiert durch Kontaktinhibition. In seiner Gesamtheit bildet es ein systemisch disseminiertes Organ von

beträchtlichem biologischen Potential. Entsprechend seinen spezifischen Funktionen als Biokompartimentierung ist das Endothel in erstaunlicher Masse phänotypisch heterogen (Augustin *et al.*, 1994; Risau, 1995). Je nachdem, ob es vorwiegend den Blutstrom begrenzt und als potente Barriere fungiert (z.B. Blut-Hirn-Schranke) ist es kontinuierlich ausgeprägt oder diskontinuierlich, wenn der Stoffaustausch im Vordergrund steht, wie etwa in der Niere, Lunge oder in endokrinen Drüsen (Carmeliet, 2000). Dabei ist das Endothel nicht nur eine mehr oder minder dichte Isolation des Blutstromes, sondern präsentiert einerseits organ- und situationsspezifisch Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren, die zirkulierenden Zellen z.B. des Immunsystems die Orientierung erlaubt, und so bei Inflammationsvorgängen (chronisch z.B. bei Atherosklerose, Review von Lusis, 2000) deren Rekrutierung und Ausschleusung aus der Zirkulation vermittelt. Das *homing* verläuft dabei nach einer Kaskade aus Annäherung, Rollen, Arrestierung und Integration, jeweils mediiert über verschiedene endothelial präsentierte Adressine wie Selektine und Integrine (Review von Springer, 1994). Damit stellt das Endothel einen Lageplan des Körpers dar, eindrucksvoll durch organspezifische Metastasierung von Tumoren illustriert (Pauli *et al.*, 1990). Andererseits reagiert das Endothel spezifisch auf physikalische oder chemische Stimuli, beispielsweise mit einer selektiven Permeabilitätszunahme nach Zytokinstimulation mit *vascular permeability factor* entsprechend *vascular endothelial growth factor* (VPF / VEGF, Dvorak *et al.*, 1999). Schliesslich beteiligt sich das Endothel aktiv an der Steuerung des Gefäßstatus wie etwa durch die Ausschüttung vasoaktiver Substanzen.

Die wichtigste endotheliale Effektorfunktion ist die **angiogene Kaskade**, ein komplexer Mehrschrittprozess, untergliedert in **Initiation**, Progression und Maturation, bei dem es auch zu Regressionsvorgängen kommt (umfassende Reviews von Carmeliet, 2000; Yancopoulos *et al.*, 2000).

Die angiogene Aktivierung des Endothels (meist von postkapillaren Venulen ausgehend) erfolgt durch primäre Angiogenesestimulatoren. Als solche wirken ebenso Mikroumfeldfaktoren (Hypoxie, Azidose; Semenza, 1998) wie spezifische Zytokinaktivierung, z.B. durch das VEGF-Rezeptor-Ligandensystem (Reviews von Eriksson & Alitalo, 1999; Neufeld *et al.*, 1999), einer exklusiv endothelialen Rezeptortyrosinkinasefamilie (RTK). Die aktivierten EC unterstützen die angiogene Kaskade sowohl über Mechanismen autokriner Wachstumskontrolle als auch durch Sensibilisierung für parakrine Stimulation durch RTK-Expression, im

weiteren Verlauf durch Freisetzung lokaler angiogener Stimulatoren wie a/bFGF (*fibroblast growth factor I/II*), TGF- $\alpha/\beta$  (*transforming growth factor*), PDGF (*platelet derived growth factor*) aktiviert. Weiter erfolgt eine endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen sowie auch deren Rezeptoren (Feil & Augustin, 1998). Dies führt bei inflammatorischer Angiogenese zur Rekrutierung von Monozyten (Goede *et al.*, 1999) und Leukozyten, die eine sekundäre Verstärkung der Aktivierung und weitere **Progression** bewirken. Ferner verlagert sich die proteolytische Balance durch hochregulierte Expression von Proteasen und Proteinasen in Richtung eines invasiven Phänotyps. Die aktivierten EC migrieren und proliferieren chemotaktisch in Richtung des angiogenen Reizes, dabei formieren und verlängern sie neue Kapillaren.

Im Rahmen der **Maturation** wird das neue Gefässbett mittels spezifischer Rezeptor-Liganden-Interaktionen durch apoptotische Regressions- und Umbauvorgänge auf den tatsächlichen Bedarf zugeschnitten (Remodeling) und nachfolgend durch Zellkontakt mit ummantelnden Perizyten bzw. glatten Muskelzellen unabhängig vom Überlebensfaktor VEGF (Carmeliet *et al.*, 1999). Vermittelt wird diese Stabilisierung über den endothelialen Tie-2-Rezeptor, der durch den Liganden Angiopoietin-1 (alle 4 bekannten Angiopoietine binden an Tie-2) von muralen Zellen aktiviert wird. Die **Regressionsvorgänge** werden unter Beteiligung des natürlichen Antagonisten Ang-2 vermittelt (indem dessen spezifische Tie-2-Bindung keine Rezeptoraktivierung durch Autophosphorylierung induziert, Maisonpierre *et al.*, 1997): Dieser bewirkt eine autokrine endotheliale Destabilisierung maturer Blutgefässe. Da an Orten angiogenen Remodelings eine erhöhte Ang-2 Expression zu beobachten ist, wird zudem angenommen, dass diese postnatal als Voraussetzung für die VEGF-induzierte Angiogenese erforderlich ist (Maisonpierre *et al.*, 1997; Holash *et al.*, 1999a & b). In der Maturationsphase degradieren Ang-2-destabilisierte Gefässe ohne VEGF apoptotisch (wie während der Luteolyse im Ovar, Goede *et al.*, 1998), so dass eine bedarfsabhängige Feinabstimmung ermöglicht wird (Yancopoulos *et al.*, 2000).

Die Ausreifung wird begleitet von der endothelialen Synthese extrazellulärer Matrix (ECM). Das reife **Blutgefäss** organisiert sich dann in Intima, bestehend aus EC, abluminal umgeben von einer feinen Basalmembran und ECM aus Kollagen und Proteoglykanen, die an einigen Stellen durchbrochen ist und einen Kontakt ermöglicht zu den muralen Zellen der Media (glatte Muskelzellen oder Perizyten). Die äussere Hülle eines maturen Blutgefässes (Adventitia) bilden schliesslich Fibroblasten. Zwischen den Zellen der verschiedenen



Schichten ereignen sich vielerlei Interaktionen, aber auch laterale interendotheliale Zellkontakte spielen eine wichtige funktionelle Rolle bei der Regulation von Zellform, Permeabilität und Zellverhalten (Review von Lampugnani & Dejana, 1997).

Vier Mitglieder der grossen Eph-Rezeptorenfamilie bilden neben den genannten RTK-Familien VEGF-R1-3 und Tie-1-2 die dritte wichtige endotheliale Gruppe mit angiogenese-assoziiertes Funktion (aktueller Review von Gale & Yancopoulos, 1999). Sie werden aktiviert durch sogenannte Ephrin-Liganden, die wie ihre Rezeptoren membranständig sind. Während der embryonalen Kapillarentwicklung zeigen sie eine exklusive reziproke Expression in EC, Ephrin-B2 im arteriellen Teil, sein EphB4-Rezeptor umgekehrt im venösen (Wang *et al.*, 1998). Entsprechend und in Analogie zum Nervensystem wird abgeleitet, dass das Rezeptor-Ligandensystem am kapillaren Übergang durch laterale Kontakte die arteriovenöse Differenzierung vermittelt und einer Vermischung vorbeugt (Yancopoulos *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 1999; Gale & Yancopoulos, 1999). Eine im adulten auf EC-angrenzende murale Zellen ausgeweitete Ephrin-B2- / EphB4-Expression, aber auch das Auftreten der anderen Typen deutet auf zusätzliche Funktionen bei der Gefässorganisation oder Maturation, die nicht nur auf die arteriovenöse Grenze beschränkt sind.

Solide Tumoren ab einer Grösse von etwa 4 mm werden nur insuffizient durch Diffusionsvorgänge versorgt. Im Rahmen der seit langem bekannten **Tumorangiogenese** induziert der Tumor massiv seine Vaskularisierung durch spezifische Aktivierung des physiologischen Wirtsmechanismus Angiogenese. Entsprechend lassen sich Tumoren auch als Wunden auffassen, die nicht abheilen (Dvorak, 1986). Folglich bedeutet **antiangiogene** Intervention eine **Antitumortherapie**, die „resistent gegen die Entwicklung von Resistenzen“ ist (Boehm *et al.*, 1997), da sie auf einen physiologischen Mechanismus abzielt, auch wenn sich die Anzeichen mehren, dass sich pathologische und physiologische Angiogenese und Gefässbetten unterscheiden (vgl. Carmeliet, 2000). Zudem muss einschränkend festgestellt werden, dass nicht alle Tumoren gleichermassen angiogenese-abhängig sind. Insbesondere Tumoren geringer Wachstumsdynamik sowie stark invasive, metastasierende Varianten werden deshalb eher als ungeeignete Antiangiogenese-Ziele angesehen (Augustin, 1998). Zudem gibt es neuere Hinweise, dass expandierende Tumoren bestehende Wirtsgefässe zunächst einbeziehen, die dann möglicherweise als Abwehrmechanismus degradieren, bevor erst sekundär massiv tumorinduzierte Angiogenese einsetzt (Holash *et al.*, 1999a). Voraussichtlich verläuft Tumorwachstum weder ausschliesslich nach diesem „Cooption“-Konzept

noch via Tumorangiogenese, so dass der grösste Nutzen angekündigter antiangiogener Tumorthérapien (z.B. von Entremed Inc., Rockville, Maryland, USA) in Kombination mit etablierten Ansätzen zu erwarten sein wird (siehe Review von Augustin, 1998).

Eine jüngst erschienene Studie von Eberhard *et al.* (2000) bestätigt eine mangelnde Gefäss-maturation in Tumoren mit erheblicher individueller Varianz. Somit besteht der wesentliche Unterschied zwischen Tumor und Wirtsgefässbett möglicherweise weniger in der Aktivierung des Endothels als vielmehr im Maturationsgrad. Damit eröffnen sich neue Ansatzmöglichkeiten für die Entwicklung vaskulärer Zieltechniken, bei denen tumorgefässbett-spezifisch ein Effektor mit breiter zytotoxischer Wirkung adressiert wird.

Zusammengenommen ist Angiogenese ein durch ein Netzwerk induzierender und inhibierender Faktoren streng kontrollierter, balancierter Prozess (Hanahan & Folkman, 1996; Iruela-Arispe & Dvorak, 1997). Zur Formierung funktioneller Gefässe muss die konzertierte Expression der vaskulär-spezifischen Zytokine dabei räumlich, zeitlich und konzentrations-bezogen exakt abgestimmt sein.

Konzentrierte sich die Forschung bislang vorwiegend auf die Identifizierung angiogener Wachstumsfaktoren, so gerät zunehmend als Ziel der angiogenen Aktivierung die Endothelzelle selbst ins Visier. Die Identifizierung spezifisch angiogeneseassoziiert exprimierter Rezeptortyrosinkinasen und Integrinheterodimere hat zu wesentlichen Impulsen in der Angiogeneseforschung geführt.

## 1.2 UNTERSUCHUNG DER ANGIOGENESE

Das biologische Phänomen Angiogenese ist ein komplexer Vorgang, den in seiner Gesamtheit zu verstehen eine Vielzahl von Ansätzen erfordert, die unterschiedliche Aspekte adressieren. Exemplarisch genannt sei Angiogenese in verschiedenen physiologischen und pathologischen Szenarien, die verschiedenen Phasen der angiogenen Kaskade, Zell-Zellkontakte, Homing, die Untersuchung von Stoffwechselleistungen des Endothels und den weiteren gefässkonstituierenden Zellen oder deren Manipulation. Entsprechend stehen inzwischen zahlreiche physiologische und pathologische Angiogenesemodelle diverser Spezies *in vivo* und *in vitro* zur Verfügung. Dazu gehören *in vivo*-Modelle wie die ursprünglich avaskuläre Kaninchen-Cornea, die embryonale Chorio-Allantois-Membran des Huhns (CAM), die physiologische

zyklische Ovarangiogenese im Corpus luteum (CL), Revaskularisierung in der ischämischen Hinterextremität der Maus sowie zahlreiche Tumormodelle nach Implantation. Eine Sonderstellung nehmen dabei *ex vivo*-Modelle wie etwa kultivierte Blutgefäßabschnitte ein. *In vitro* sind zahlreiche Zellkulturmodelle etabliert, über die allgemeinen zweidimensionalen EC-Kulturen über differenzierte dreidimensionale Sprossung simulierende Modelle von EC oder Cokulturen zusammen mit anderen muralen Zellen, die sich zu Sphäroiden in Gelmatrizes organisieren bis hin zu spezialisierten Assays zur Bestimmung spezifischer endothelialer Effektorfunktionen wie Migration nach Verletzung eines EC-Monolayers oder chemotaxisvermittelt (*Boyden-chamber*), oder Proliferation ( $^3\text{H}$ -Thymidininkorporation, BrdU).

Zum einen sind sie Voraussetzung für die Charakterisierung des zugrundeliegenden Zellverhaltens, zum anderen ermöglichen sie die funktionelle Identifikation und Überprüfung angiogenesestimulatorischer und inhibitorischer Effektoren. Als Beispiel für Proteinaufreinigungen stehen hier die endogenen Angiogeneseinhibitoren Angiostatin (O'Reilly *et al.*, 1994a & b) und Endostatin (O'Reilly *et al.*, 1997). Da es sich bei beiden um proteolytische Fragmente von ubiquitären Proteinen anderer Funktion handelt, wären sie auf genetischem Weg nicht zu erschliessen. Die Untersuchung angiogener EC hat zu einer beträchtlichen Anzahl weiterer stimulatorisch und inhibitorisch aktiver Substanzen geführt, die im einzelnen hier aufzuführen zu weit führt.

Zum vollständigen Verständnis ist aber die Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Vorgänge erforderlich. Dementsprechend ist die genotypische Charakterisierung des angiogenen Phänotyps von EC der initiale Schritt zur Identifikation neuer Effektoren der angiogenen Kaskade. Da das Verhalten einer Zelle von deren exprimierten Genen reflektiert und determiniert wird, gilt es, die spezifisch mit dem Phänomen verknüpften Gene zu identifizieren. Für diese Zielgruppe kann erwartet werden, dass sich ihre Expression signifikant vom Grundzustand unterscheidet. Zur validen Untersuchung differentieller Genexpression muss ein geeignetes, die Angiogenese repräsentierendes Modell gewählt werden, da nach Carulli *et al.* (1998) der Vergleich zweier Proben grundsätzlich expressionelle Unterschiede identifiziert, und weiter: Im Sinne einer guten Basis sollten die Experimente so einfach und reproduzierbar sein, wie möglich. Der tatsächliche Bezug isolierter Kandidaten zur Fragestellung bedeutet die Notwendigkeit, möglichst ähnliche

Zustände zu vergleichen, um so alle nicht relevanten Expressionsänderungen von vornherein zu eliminieren.

Zwar sind auf genetischem Wege neue Kandidaten vergleichsweise leicht zu isolieren, deren spezifische Funktion ist aber erst sekundär durch nachgeschaltete Experimente zu erschliessen, im Gegensatz zu den klassischen Proteinisolationsverfahren, wo man einen Kandidaten mit messbarer Funktion (unter allerdings hohem Aufwand) zu identifizieren und isolieren trachtet. Damit ist es bei isolierten Genkandidaten unumgänglich, die Hypothese der tatsächlichen Involvierung in den betreffenden Prozess im geeigneten Zell- oder Tiermodell zu überprüfen, so dass ein entsprechendes experimentelles System zur Verfügung stehen muss.

### **Ziel der Arbeit**

Entsprechend diesen Vorüberlegungen und da ganz allgemein der endotheliale angiogene Phänotyp auf molekularer Ebene charakterisiert werden sollte, wurde auf das einfache zweidimensionale Zellkulturmodell aktivierter, proliferierender EC zurückgegriffen, die mit wachstumsarretierten, konfluent kontaktinhibierten EC im Ruhezustand verglichen wurden. Nach Augustin Voss *et al.* (1993) und Kozian (1996) verhalten sich *in vitro* kultivierte EC in guter Näherung wie undifferenzierte, an der Spitze eines kapillaren Sprosses proliferierende, angiogene EC *in vivo*. Neben der einfachen Realisierbarkeit bot das Zellkulturmodell ferner die entscheidenden Vorteile hoher Reproduzierbarkeit, leichter Manipulierbarkeit und das Potential quantitativer Umsetzung zu ausgedehnten Kontrollexperimenten.

Die Wahl des basalen angiogenen Stimulators bFGF war motiviert in der Konstitution eines allgemein aktivierten Zellstatus von EC (vgl. Augustin Voss *et al.*, 1993), der eine entsprechend breit angelegte Charakterisierung ermöglicht. Folglich wurde der zum Vergleich ruhende Zellstatus konfluenter EC zusätzlich mit einem funktionsneutralisierenden Antikörper gegen bFGF verstärkt, um eine möglichst deutliche Differenz zwischen diesen Zuständen zu erzeugen sowie zur Kompensation der Beobachtung, dass kultivierte EC trotz Kontaktinhibition eine geringfügige artefaktuelle Basalaktivität aufrecht erhalten (Bavisotto *et al.*, 1990; Cines *et al.*, 1998).

Verschiedene Verfahren zur Identifikation unbekannter regulierter Gene stehen zur Verfügung von denen Differential Display der vorliegenden Arbeit zugrunde gelegt wurde.

Die Fragestellung war dabei die molekulare genetische Charakterisierung der angiogenen EC mit dem Ziel, nachfolgend aus dem ermittelten Kandidatenpool angiogeneserelevante Effektoren zu identifizieren und diese näher zu untersuchen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 CHEMIKALIEN UND GERÄTE

#### Chemikalien

Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in p.a.- oder reinst-Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva Feinbiochemika (Heidelberg) und Sigma Aldrich Chemie (Deisenhofen) bezogen. Zur Herstellung von Lösungen wurde doppelt Quarzglas-destilliertes (bidest. oder dd-) Wasser verwendet, optional zusätzlich DEPC-behandelt (1‰) und autoklaviert (DEPC-Wasser). Je nach Angabe kam ausserdem durch einen Ionenaustauscher demineralisiertes (demin-) Wasser zum Einsatz.

#### Geräte

Brutschrank CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus, Hanau
Fotokamera CRT Instant Camera TA 40 (Polaroid)	Krannich, Göttingen
Hybridisierungsöfen OV1	Biometra, Göttingen
Nassblotapparatur (für Western-blot)	HSI, San Francisco
PAGE-Apparatur IBI Base Runner 100 (für DD-Gele)	Kodak, Stuttgart
PAGE-Apparatur Mini Protean® II (für Westerngele)	BioRad, München
pH-Meter Schott CG 822	Krannich, Göttingen
Phosphoimager GS-250 Molecular Imager	BioRad, München
Photometer (für DNA)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Photometer (für Proteine) ELISA-Photometer (Behring)	PE Wallac, Freiburg
Sequencer Abi 310	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Sequencer Abi 377	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Spannungsquelle High Voltage Power Pack P30	Biometra, Göttingen
Sterilbank Lamin Air HLB244GS	Heraeus, Hanau
Szintillationsmessgerät Wallac 1409 Liquid Szintillation Counter	PE Wallac, Freiburg
Thermocycler Robocycler Gradient 96	Stratagene, Heidelberg
Thermocycler UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Thermocycler GeneAmp PCR System 2400	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
UV-Crosslinker UV Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
UV-Transilluminator (254 nm) Typ NM-90 KM	Intas, Göttingen
Vakuumtrocknungsapparatur für DD-PAGE-Gele Typ VSGE 300-400	Biometra, Göttingen
Videodokumentation mit Thermoprinter	Intas, Göttingen
Zentrifuge Sigma 201 M	Sigma, Osterode
Zentrifuge Sigma 3 K 30	Sigma, Osterode

#### Sonstige Materialien und Geräte

Röntgenfilm Kodak BioMax MR, einseitig beschichtet	Intas, Göttingen
Röntgenfilm Kodak X-OMAT Blue XB-1, beidseitig beschichtet	Intas, Göttingen

Röntgenfilm NEF-485, beidseitig beschichtet	NEN, Köln
Verstärkerscreen für Röntgenkassetten Reflection QL 400004	NEN, Köln
Film Sofortbild Typ 667 (Polaroid)	Krannich, Göttingen
Software	siehe Liste unter 2.7.1

**Enzyme und Proteine****Bezugsquelle**

BSA	Paesel + Lorei, Hanau
Trypsin für Zellkulturarbeiten	Sigma, Deisenhofen
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Proteinaseinhibitoren PMSF, Aprotinin, Leupeptin, Inhibitor-Cocktail	Sigma, Deisenhofen
Proteinlängenstandard, Protein Color Marker Wide Range	Sigma, Deisenhofen
RNasin	Promega (Mannheim), Life Technologies (Karlsruhe)
DNase I	Roche, Mannheim
Reverse Transkriptase SuperscriptII™	Life Technologies, Karlsruhe
Reverse Transkriptase Expand™	Roche, Mannheim
Reverse Transkriptase AMV	Roche, Mannheim
Reverse Transkriptase MMLV	Clontech, Heidelberg
DNA Polymerase <i>Taq</i>	Life Technologies, Karlsruhe
DNA Polymerase <i>Taq</i>	Promega, Mannheim
DNA Polymerase <i>Taq</i>	Roche, Mannheim
DNA Polymerase <i>Taq</i>	Qiagen, Hilden
DNA Polymerasen <i>Taq</i> , <i>Ex Taq</i>	TaKaRa, Japan
DNA Polymerase <i>AmpliTaq</i> Gold	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
DNA Polymerase <i>MoBiTaq</i> (K)	MoBiTec, Göttingen
DNA Polymerase Mix Synergy™, (mit Fehlerkorrektur)	GeneCraft, Münster
DNA Polymerase Mix Advantage™ <i>KlenTaq</i> , (mit Fehlerkorrektur)	Clontech, Heidelberg
DNA Polymerase <i>vent</i> ™, (mit Fehlerkorrektur)	New England Biolabs, Frankfurt/Main
DNA-Ligase (T4)	Roche, Mannheim
Terminale Transferase	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Roche (Mannheim), Pharmacia Biotech (Freiburg), Promega (Mannheim)
bFGF, Human, rekombinant (No G5071)	Promega, Mannheim

**Kits****Bezugsquelle**

Delta™ RNA Fingerprinting Kit	Clontech, Heidelberg
Advantage RT-for-PCR Kit	Clontech, Heidelberg
TA-cloning Kit	Invitrogen, Niederlande
TOPO™-TA cloning.Kit	Invitrogen, Niederlande
PCR-DIG Probe Synthesis Kit	Roche, Mannheim
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim
GENECLEAN II® Kit	Dianova, Hamburg
QIAquick™ Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Plasmidextraktions Kits (Mini, Midi und Maxi)	Qiagen, Hilden
RNA-Isolationskit RNeasy	Qiagen, Hilden
Random Prime DNA Labelling System	Life Technologies (Karlsruhe)
Ready-To-Go™ DNA Random-Prime-Labeling Kit (dCTP)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Ready-To-Go™ T4 Polynucleotide Kinase Kit	Pharmacia Biotech, Freiburg

dRDT und BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

PE Applied Biosystems, Weiterstadt

QIAexpress, 6x-HisTag-Proteinaufreinigungssystem (Ni-NTA- Agarose / Spin Columns)

Qiagen, Hilden

GelCode® E-Zinc™ Reversible Stain Kit (Pierce)

Perbio Science, Bonn

**Tab. 1: Antikörper**

Antikörper	aus	Bezugsquelle	No	Western-blot
$\alpha$ -caveolin-1 (IgG)	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg	sc-894	1:800
$\alpha$ -c-myc (IgG <sub>1</sub> , Klon 9E10)	Maus	Ade, München	13-2500	1:5000
$\alpha$ -GST	Ziege	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	27-4577	1:2000
$\alpha$ -penta-His	Maus	Qiagen, Hilden	34660	1:5000
$\alpha$ -tetra-His	Maus	Qiagen, Hilden	34670	1:5000
$\alpha$ -V5 (Ig 2a)	Maus	Invitrogen®, Niederlande	R960-25	1:5000
$\alpha$ -Kaninchen-HRP	Ziege	DAKO A/S, Dänemark	P0448	1:2000
$\alpha$ -Maus-HRP	Kaninchen	DAKO A/S, Dänemark	P0260	1:10 000
$\alpha$ -Ziege-HRP	Kaninchen	DAKO A/S, Dänemark	P0160	1:12 500
				<b>Zellkultur</b>
$\alpha$ -bovin-bFGF (IgG <sub>1K</sub> )	Maus	Biozol/Upstate Biotech Inc., Eching	05-117	1 $\mu$ g/ml

## 2.2 ZELLEN, PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE

### 2.2.1 Bakterienstämme

Folgende thermokompetente *E. coli* **Zellstämme** wurden verwendet:

BL21(DE3)pLysS one-shot™-competent cells

Bezugsquelle

Invitrogen, Niederlande

DH5 $\alpha$

Life Technologies, Karlsruhe

TOP 10 / TOP 10 F' one-shot™-competent cells

Invitrogen, Niederlande

XL1-blue ultracompetent / competent cells

Stratagene, Heidelberg



## 2.2.2 Zelllinien und Gewebe

### Zelllinien

BAEC	bovine Aortenendothelzellen, Primärkultur
HFibro	humane Vorhaut-Fibroblasten, ATCC-No CRL-1502
HSMC	humane glatte Muskelzellen, (Promocell, Heidelberg)
HMVEC	humane mikrovaskuläre Endothelzellen, (Clontech, Heidelberg)
HUVEC	humane Nabelvenen-Endothelzellen, Primärkultur
MCF7	humane Mammakarzinomzellen, (Clontech, Heidelberg)
PancTU	Pancreas Tumorzelllinie, Dr. Frauke Alves, Hämatologie Uniklinik Göttingen
U937	humane monozytäre Tumorzelllinie, ATCC-No CRL-2367

### Gewebe, bovin

Aorta, Dünndarm, Herz, Leber, Milz, Muskel, Niere, Uterus

Ovar-Corpus luteum

Sämtliche bovinen Gewebeproben wurden innerhalb von 20 min nach der Schlachtung der klinisch gesunden, adulten Rinder entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gelbkörperproben (CL) wurden in ca. 0,5 cm-Scheiben auf Trockeneis bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Klassifizierung des ovariellen Zyklusstandes (Stadium früh, mittel, spät; vgl. Augustin *et al.*, 1995) erfolgte durch zwei unabhängige Beobachter anhand der CL beider Ovarien. Proben von trächtigen Tieren oder solchen mit pathologischen Veränderungen der weiblichen Geschlechtsorgane wurden ausgeschlossen.

### Gewebe, human

Mammatumoren 1-5: A8/1, A4/3, A14, A17-1, A19

Blut

Bei den verwendeten humanen Mammagewebstumoren handelt es sich ausnahmslos um Archivmaterial (Probeextirpate, bzw. Gewebe aus Totalamputationen), die in Stücken (ca. 0,5cm x 0,3cm) innerhalb von 30 min nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurden. Die Klassifizierung (G1-G3) der Extirpate erfolgte durch Pathologen des Universitätsklinikums Göttingen. Die Blutproben wurden gesunden adulten Probanden durch Venenpunktion (Antikoagulant: Citrat) entnommen und auf Eis unmittelbar zur RNA-Aufreinigung überführt.

### 2.2.3 Plasmide

#### Standardvektoren

pCR-II	TOPO™-TA cloning Kit (Invitrogen, Niederlande)
pCR-2.1	TOPO™-TA cloning Kit (Invitrogen, Niederlande)

#### Expressionsvektoren

Zur carboxyterminalen 6x-Histidin-*c-myc*-Epitop-Fusionsproteinherstellung und prokaryontischen Proteinexpression unter dem Trc-Promoter in *E. coli*:

pTrcHis2	TOPO™-TA cloning Kit (Invitrogen, Niederlande)
----------	--

Zur carboxyterminalen 6x-Histidin-*c-myc*-Epitop-Fusionsproteinherstellung und prokaryontischen Proteinexpression unter dem T7-Promoter in *E. coli*:

pCR®T7/CT	TOPO™-TA cloning Kit (Invitrogen, Niederlande)
-----------	--

Zur aminoterminalen GST-Fusionsproteinherstellung und prokaryontischen Proteinexpression in *E. coli*:

pGEX-KG	Pharmacia Biotech, Freiburg
---------	-----------------------------

Zur carboxyterminalen 6x-Histidin-V5-Epitop-Fusionsproteinherstellung und eukaryontischen Proteinexpression durch Transfektion in Säugetierzellen:

pcDNA3.1/V5/His-TOPO	TOPO™-TA cloning Kit (Invitrogen, Niederlande)
----------------------	--

### 2.2.4 Oligodesoxyribonukleotide

Die Orientierung der Primer in Bezug auf ein Gen oder eine Vektorinsertionsstelle ist an den Kennbuchstaben F (*forward*) und R (*reverse*) zu erkennen, wobei alle Primer in 5'→3'-Leserichtung angegeben sind. Der Primernamenname gibt auch Auskunft über die Spezies, von der die Sequenz abgeleitet wurde: B=bovin, H=human, M=murin

Mutationsstellen oder gemischte Basen (*wobble*) sind durch Fettdruck hervorgehoben:

**N**=A+T+C+G, **R**=A+G, **Y**=C+T, **M**=A+C, **K**=T+G, **S**=C+G, **W**=A+T, **H**=A+T+C, **B**=T+C+G, **D**=A+T+G, **V**=A+C+G

**Tab. 2: Differential-Display-Primer**

Die P-Primer sind genbezogen *forward*-orientiert, die T-Primer entgegengesetzt.

DD-Primer	Sequenz	Länge
P1	ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA	25 bp
P2	ATTAACCCTCACTAAATCGGTCATAG	26 bp
P3	ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG	25 bp
P4	ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG	25 bp
P5	ATTAACCCTCACTAAAGATCTGACTG	26 bp
P6	ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG	25 bp
P7	ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG	25 bp
P8	ATTAACCCTCACTAAATGGAGCTGG	25 bp
P9	ATTAACCCTCACTAAATGTGGCAGG	25 bp
P10	ATTAACCCTCACTAAAGCACCGTCC	25 bp
T1	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAA	30 bp
T2	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAC	30 bp
T3	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAG	30 bp
T4	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCA	30 bp
T5	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCC	30 bp
T6	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCG	30 bp
T7	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGA	30 bp
T8	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGC	30 bp
T9	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGG	30 bp

**PCR-Primer**

Die angegebenen Annealingtemperaturen ( $T_m$ ) verstehen sich als die zur Amplifikation tatsächlich verwendeten Bedingungen. Bei Primerpaarungen mit unterschiedlichen Angaben wurde die niedrigere Temperatur verwendet.

Primer zur Expressionsklonierung sind in das Leseraster eingepasst, je nach Expressionsvektor ex- oder inklusive Start- (ATG) oder Stopcodon. Die Primer zur Histidin-Affinitätsaufreinigung (His-tag) sind durch ‚his‘ gekennzeichnet, die zur Synthese von GST-Fusionsproteinen tragen ‚pGEX‘ (Vektorbezeichnung) im Namen. Zur Klonierung genutzte Restriktionsschnittstellen sind durch Unterstreichung gekennzeichnet.

Tab. 3: PCR-Primer

PCR-Primer	Sequenz	T <sub>m</sub>	Länge
H β-Actin 1 (F)	GGCATGGGTCAGAAGGAT	54°C	18 bp
HM β-Actin 2 (R)	GTGGTGGTGAAGCTGTA	54°C	17 bp
HM β-Actin F2	ACCGAGGCCCCCCTGAACCC	60°C	20 bp
HM β-Actin R2	GCTGGGGTGTGTAAGGTCTC	60°C	20 bp
HM GAPDH F	ACCACAGTCCATGCCATCAC	56°C	20 bp
HM GAPDH R	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	56°C	20 bp
Myc F1	ACACCATGGGAGCTGGTAAT	55°C	20 bp
Myc F2	GTTCTTTGAAAAGTGAAT	55°C	18 bp
Myc R1	CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT	55°C	27 bp
Myc R2	GCATCCACCAWAWACTCT	55°C	18 bp
B Cav 1 F	CGTAGACTCAGAGGGACATC	60°C	20 bp
B Cav 2 R	CGTGTTGATGCGGATATTGC	60°C	20 bp
BH Cav 3 F	TCAGCAATATCCGCATCAAC	58°C	20 bp
B Cav 4 R	GAATTCTAACAGGTGTATGG	58°C	20 bp
H Cav 5 R	CTTATCCATGCCGTGTCTG	58°C	19 bp
HB 40-2-3 F1	GACGTCTCCAGCCATGAAC	60°C	19 bp
HM 40-2-3 F2his	CGGTTTGGYACCCGGTTGGT	60°C	20 bp
HM 40-2-3 F2hisATG	ATGCGGTTTGGYACCCGGTTGGT	60°C	23 bp
HM 40-2-3 F2pGEX	TATAT <u>CTAGAG</u> CGGTTTGGCACCCGGTTGGT	52°C	32 bp
HB 40-2-3 R1	CTGTCTGAGCCAACCATGAA	58°C	20 bp
H 40-2-3 R2	CTTTCATTTGGTGTATGCACG	?	20 bp
H 40-2-3 R3	CGCACTCTCATCCTGAATTG	60°C	20 bp
H 40-2-3 R4	ACTTTGCTGGAGGAGTCTTC	60°C	20 bp
H 40-2-3 R5	TTCATTGCTGCGGGCCTTCG	60°C	20 bp
M 40-2-3 R6his	TCCCACAGTCACAAAGCGGC	60°C	20 bp
M 40-2-3 R6pGEX	ACACT <u>CTCGAGT</u> TCCCACAGTCACAAAGCGGC	52°C	31 bp
H 40-2-3 R7his	TCCCACGGTGACAAAGCGGC	60°C	20 bp
H 40-6-3 F1	GAAGCTCAGAATGGCTCAGAA	57°C	21 bp
H 40-6-3 F2	GTGATAGTAGCAGCTCCGGC	58°C	20 bp
H 40-6-3 F3his	GCGGCGGCTGCAGCAGGAAC	58°C	20 bp
M 40-6-3 F4his	GCGGCAGCTGCAGCAGGACC	58°C	20 bp

PCR-Primer	Sequenz	T <sub>m</sub>	Länge
M 40-6-3 F4hisATG	ATGGCGGCAGCTGCAGCAGGACC	58°C	23 bp
M 40-6-3 F4pGEX	TATAT <u>TCTAGAT</u> GCGGCAGCTGCAGCAGGACC	52°C	32 bp
H 40-6-3 R1	AGATTTCTCCAGCCCCACAA	57°C	20 bp
H 40-6-3 R2	TGGTGAGAATTTCGCTCACAG	?	20 bp
H 40-6-3 R3his	GTACTTTTTCCATTCCATATCATCAGG	58°C	27 bp
M 40-6-3 R4his	GTACTGTTTCCATTCCATATCATCGGG	58°C	27 bp
M 40-6-3 R4pGEX	TCTGT <u>CTCGAGG</u> TACTGTTTCCATTCCATATCATCGGG	52°C	38 bp
H 40-9-1 F1	GTGGCCTTTCCTTGTGTGT	56°C	20 bp
H 40-9-1 F2	TTGAATCGAATTTGGGGAAG	56°C	20 bp
H 40-9-1 F3	CGCTTCTGTCTCCTACTCC	?	20 bp
H 40-9-1 F4	CGGCAATTTGTCTTTTCCTT	58°C	20 bp
H 40-9-1 F5his	CCCAGTGCTTAGCATGAAGA	58°C	20 bp
H 40-9-1 R1	GGTTCATTAGGCACATTCAA	56°C	21 bp
H 40-9-1 R2	CGGCAAGCAGATACATGAGA	56°C	20 bp
H 40-9-1 R3	CAGGACACGGAACCTGAAAT	61°C	20 bp
H 40-9-1 R4his	ATGGCCACCTCCAGGTGCAT	58°C	20 bp
H 42-9-9 F1	ACGTGCACTCCTCCAGTAGC	?	20 bp
H 42-9-9 F2	GTAGCGGCTGCACGTCGT	58°C	18 bp
H 42-9-9 F3his	GCCCCGCTATGAGGAGGTGAG	58°C	20 bp
M 42-9-9 F4his	GCCACA <u>ATT</u> CGAGGAGGTGAGCGTGCTG	52°C	27 bp
M 42-9-9 F4hisATG	ATGGCCACA <u>ATT</u> CGAGGAGGTGAG	52°C	23 bp
M 42-9-9 F4pGEX	AGAGAT <u>CTAGAGG</u> CCACATTCGAGGAGGTGAGCGTGCTG	52°C	39 bp
H 42-9-9 R1	CCTTCCAAGAATCACGTTCC	56°C	20 bp
M 42-9-9 R3his	<u>G</u> TCTTCAGAGAAGATCATC	52°C	19 bp
M 42-9-9 R3pGEX	AGAGAC <u>TCGAGG</u> TCTTCAGAGAAGATCATC	52°C	30 bp
M 42-9-9 R4his	ATCTTCAGAGAACAACATTTCCAC	58°C	24 bp
H 67-11-3 F1	GGAGTTACGCACGTCCTGAT	60°C	20 bp
HM 67-11-3 F2	<u>GMR</u> GATGCT <u>WG</u> AAGAAGATGG	56°C	20 bp
HM 67-11-3 F3his	GGGTGGTCTAAAGGAAAGGG	52°C	20 bp
HM 67-11-3 F3hisATG	ATGGGGTGGTCTAAAGGAAAGGG	52°C	23 bp
HM 67-11-3 F3pGEX	GAGG <u>CTCTAGAT</u> TGGGTGGTCTAAAGGAAAGGG	52°C	32 bp

PCR-Primer	Sequenz	T <sub>m</sub>	Länge
H 67-11-3 R1	TATTGAAGGGAACCGAGAGC	56°C	20 bp
H 67-11-3 R2	TGCTGAAGGGCTCAGAGTTT	60°C	20 bp
H 67-11-3 R3	TGGGAAGGATTCATTTGGAA	56°C	20 bp
H 67-11-3 R4	CCTCTCCTCTTTTTGGGCTT	56°C	20 bp
HM 67-11-3 R5	AGAGSCMTYGGAAACWCTGGT	56°C	20 bp
M 67-11-3 R6his	TCTGGAAACTTTCTTCTTCT	52°C	20 bp
M 67-11-3 R6pGEX	CTCGCCTCGAGTCTGGAAACTTTCTTCTTCT	52°C	31 bp
H 67-11-3 R7his	TTTGGAATCTTTCTTCTTCT	48°C	20 bp
H KIAA0002 F	GCGTGAAGCTGCTTCCTGC	57°C	18 bp
H KIAA0002 R	CATCCAGCCAAGAATACAAACA	57°C	22 bp

Tab. 4: Sequenzierprimer

Seq-Primer	Sequenz	T <sub>m</sub>	Länge
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	60°C	20 bp
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	?	18 bp
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT	58°C	17 bp
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	58°C	17 bp
TAP1	TCGGATCCACTAGTAACGG	58°C	19 bp
TAP2	CCAGTGTGATGGATATCTGC	58°C	20 bp
pTrcHisF	GAGGTATATATTAATGTATCG	?	21 bp
pTrcHisF2	AGGAGGAATAAACCATGGCC	52°C	20 bp
pTrcHisF3	TCTGTGTGGGCACTCGACCG	?	20 bp
pTrcHisR	GATTTAATCTGTATCAGG	?	18 bp
pTrcHisR2	CGACGGCGCTATTCAGATCC	52°C	20 bp
pTrcHisR3	AGACCGCTTCTGCGTTCTG	?	19 bp
pGEX F	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	56°C	23 bp
pGEX R	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	56°C	23 bp

**Tab. 5: 5'-RACE-Primer**

<b>RACE-Primer</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Länge</b>
Anchor	GTGTAGTCATGCAGTGATCGTACAG	25 bp
Anchor-dT16	GTGTAGTCATGCAGTGATCGTACAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT <sup>v</sup>	42 bp

## 2.3 KULTURBEDINGUNGEN VON E. COLI

### Nährmedien

Alle Nährmedien wurden, sofern nicht anders angegeben, nach den Angaben des Herstellers bereitet. Die Antibiotika sind erst bei Abkühlung unter 50°C den Medien zuzusetzen.

SOB/SOC-Medium (zur Regeneration nach Transformation)	Invitrogen, Niederlande
2YT-Medium zur Flüssigkultur von <i>E. coli</i> (inkl. Amp 100, optional Chloramphenicol 20)	Life Technologies, Karlsruhe
LB-Agarplatten (inkl. Amp 100), optional mit IPTG/X-Gal (b/w-Selektion)	Life Technologies, Karlsruhe

Reichhaltiges Medium (Amp 100) zur Proteinüberexpression (für 1 l):

12 g	Trypton
24 g	Hefeextrakt
4 ml	Glycerin (100%)
ad 850 ml	dd-Wasser
	15 min autoklavieren bei 121 °C

dazu	100 ml	Phosphatpuffer, sterilfiltriert
aus	2,31 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	16,43 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	ad 100 ml	dd-Wasser

dazu	1%	Glucoselösung (20%), sterilfiltriert
	100 µg/ml	Ampicillin, sterilfiltriert
	ad 1000 ml	demin-Wasser, autoklaviert

### Kultivierung

Sämtliche Glasgerätschaften und hitzestabilen Plastikmaterialien sowie Lösungen wurden bei 121°C für 20 min autoklaviert. Die sonstigen Plastikmaterialien wurden steril vom Hersteller bezogen. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden vor dem Einsatz durch 0,2 µm Porenweite-Filter (Millipore, Eschborn) sterilfiltriert. Die Kultivierungsarbeiten wurden an einer

Sterilbank im Arbeitsbereich mit S1-Genehmigung für gentechnische Experimente durchgeführt.

Die Anzucht von *E. coli*-Kolonien erfolgte auf LB-Agarplatten (Amp 100) bei 37°C im Brutschrank über Nacht. Flüssigkulturen in 2YT-Medium (Amp 100) wurden bis 8 ml in Reagenzgläsern im Schüttelschrank bei 37°C über Nacht kultiviert. Für größere Kulturvolumina bis zu 100 ml wurden 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane oder 500 ml-Einwegzellkulturflaschen verwendet. Für 500 ml-Kulturen kamen 2 l-Erlenmeyerkolben mit Schikane zum Einsatz. Für den BL21(DE3)pLysS-Stamm zur Proteinexpression unter dem T7-Promoter wurde 2YT-Medium (Amp 100, Chloramphenicol 20) verwendet, reichhaltiges Medium (Amp 100) zur Proteinüberexpression für alle anderen Zellstämme.

### Stammhaltung

Alle Klone wurden auf Agarplatten bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Langzeitkultivierung wurden die Zellen im entsprechenden Flüssigmedium mit 60% Glycerin bei -20°C gelagert.

## 2.4 ZELLKULTUR

### Medien

EBM-Medium für HMVEC	Clonetics, Belgien
ECG-Vollmedium für HUVEC (Endothelial Cell Growth Medium + 10% FCS)	Promocell, Heidelberg
HSMC-Vollmedium für HSMC (Human Smooth Muscle Cell Growth Medium + 5% FCS)	Promocell, Heidelberg
RPMI-Medium für U937	Life Technologies, Karlsruhe
DME-Vollmedium für alle sonstigen Zelllinien (Dulbecco's Modified Eagle Medium + 10% FCS)	Promocell, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS, hitzeinaktiviert)	Biochrom, Berlin
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)	Life Technologies, Karlsruhe

### Kultivierung

Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank unter Verwendung autoklavierter oder steril erworbener Einwegmaterialien vorgenommen. Die Kultivierung erfolgte auf handelsüblichen adhäsiven Kulturschalen (75 cm<sup>2</sup> = 10 cm Durchmesser, Falcon) oder in Flaschen in einem Heräus-Brutschrank unter CO<sub>2</sub>-Begasung (5%) und 100% Luftfeuchtigkeit bei 37°C. Die



verwendeten Medien und andere Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37°C im Wasserbad temperiert.

Zum Passagieren der Zellen wurde nach Mediumabnahme und zweimaligem HBSS-Waschen eine Ablösung der adhärennten Zellen durch Trypsinierung (2 ml Trypsinlösung für 2 min bei 37°) durchgeführt. Danach wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen, für 5 min bei 3000 g pelletiert und anschliessend in 2x bis 8x-Verdünnung in 10 ml Medium auf neue Kulturschalen ausgesät.

Sphäroide von HUVEC, HSMC oder Cokulturen beider wurden nach beschriebener Methode (Korff & Augustin, 1998; Korff & Augustin, 1999) kultiviert und zur RNA-Extraktion geerntet.

Die Verwendung mycoplasmenfreier Zellen wurde durch eine monatliche Routinekontrolle mittels PCR (siehe 2.5.6) sichergestellt.

### **Lagerung**

Röhrchen mit gefrorenen Zellen ( $1-4 \cdot 10^6$ ) wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Anzucht wurden die Zellen mit vorgewärmtem Medium aufgetaut und in 50 ml Kulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) angezogen.

Zum Einfrieren kultivierter Zellen wurde zunächst wie bei der Passagierung nach Abnahme von Medium und zweimaligem HBSS-Waschen trypsiniert, in 10 ml Medium aufgenommen und pelletiert. Das Zellpellet wurde aufgenommen in:

70%	Medium
20%	FCS (Fetales Kälberserum)
10%	DMSO (Dimethylsulfoxid)

Die Zelllösung wurden in 1 ml Aliquots in Schraubdeckelröhrchen (Nalgene Cryovials, Nalgene Company, USA) überführt, um ca. 10°C pro Stunde auf -70°C abgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert.

## **2.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN**

### **2.5.1 Standardmethoden**

Die elektrophoretische Analyse von DNA in Flachbettelektrophoreseapparaturen wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Üblicherweise wurden 1%ige Agarosegele unter 0,5x

TBE-Puffer verwendet. Als Längenstandard wurde immer die 100 bp Leiter von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet, wenn nicht anders angegeben. Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden das GENE CLEAN II<sup>®</sup> Kit (Dianova, Hamburg) und das QIAquick<sup>™</sup> Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach deren Angaben verwendet. Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäurelösungen erfolgten durch Bestimmung der OD<sub>260</sub> im Photometer. DNA-Lösungen wurden kurzfristig bei 4°C gelagert, langfristig jedoch bei -20°C oder -70°C, RNA-Lösungen, Zellpellets und Gewebeproben grundsätzlich nur bei -70°C. Die Manipulation rekombinanter DNA mit Restriktionsendonukleasen, DNA-Ligasen (T4-Ligasen) und DNA-Polymerase orientierte sich an den Angaben des Herstellers.

### 2.5.2 Klonierung

Zur Klonierung wurde nach Angaben des Herstellers das TA-cloning Kit verwendet, später, nach dessen Markteinführung, das TOPO<sup>™</sup>-TA-cloning Kit (beide Invitrogen, Niederlande). Beide Kits basieren auf linearisierten Vektoren mit einem 3'-terminalen T-Überhang, welcher als kohäsives Ende für PCR-Produkte mit einem von *Taq*-Polymerasen automatisch synthetisierten 3'-terminalen A-Überhang (Clark, 1988) fungiert. Da leere Vektoren kaum religieren können, wird eine hohe Klonierungseffizienz erzielt. Die enthaltenen Vektoren pCR II oder pCR 2.1 wurden zur standardmässigen Klonierung der DD-Reamplifikate und aller zu sequenzierenden PCR-Produkte verwendet. Sie erlaubten eine blau/weiss-Selektion auf Agarplatten mit IPTG/X-Gal (*E. coli* Stamm TOP 10F') respektive X-Gal (TOP 10). Voraussetzung waren frische PCR-Produkte bis zu 48 h, die im Sinne eines vollständigen Syntheseabschlusses einen terminalen Elongationsschritt von 72°C für 25 min durchlaufen haben. Ältere PCR-Produkte wurden nach erneuter Zugabe von Enzym durch Durchlaufen eines Amplifikationszyklusses entsprechend präpariert. Die unter Verwendung von *Taq*-Enzymgemischen mit einer Fehlerkorrekturkomponente (z.B. Klen-*Taq*, Synergy-*Taq*) amplifizierte DNA erwies sich ebenfalls als TA-klonierbar.

#### Ligation

1-2 µl	frisches PCR-Produkt
1 µl	TOPO <sup>™</sup> -TA-Vektor-Enzymgemisch mit Puffer
ad 5 µl	Wasser
	5 min bei RT Ligation
	auf Eis

## Transformation

2 µl	Ligationsansatz
2 µl	Mercaptoethanol
aliquot	TOP 10 oder TOP 10F' kompetente Zellen
	30 min auf Eis
	30 sec bei 42°C Hitzeschock (Wasserbad)
	2 min auf Eis
+250 µl	SOC-Medium (RT)
	30 min bei 37°C (Regeneration)
100 µl	ausplattiert auf Agarplatten
	über Nacht bei 37°C inkubieren

Nach Bedarf liessen sich positive Klone per Screening-PCR identifizieren, indem die ausgewählten Kolonien mittels einer Pipettenspitze zunächst auf Agarplatten und dann in den korrespondierenden PCR-Reaktionsansatz übertragen wurden. Für diese Standard-PCR (siehe 2.5.6) kam üblicherweise das die Vektorinsertionsstelle flankierende Primerpaar TAP 1/2 (siehe 2.2.4) zum Einsatz. Die Orientierung des Inserts konnte durch Kombination eines spezifischen Primers des Inserts mit einem flankierenden Primer des Vektors ermittelt werden.

## 2.5.3 Isolation und Aufreinigung von Nukleinsäuren

### Plasmidpräparation

Routinemässig eingesetzt wurden die Plasmidisolationskits der Firma Qiagen (Hilden) in den Masstäben ‚Mini‘, ‚Midi‘ und ‚Maxi‘ nach Herstellerprotokollen. Grundlage für die Aufreinigung waren Zellpellets aus über Nacht-*E. coli*-Kulturen von 2 ml, bis 100 ml respektive bis 500 ml für die entsprechenden Masstäbe. Um weitere enzymatische Modifikationen zu ermöglichen, wurde die DNA abweichend vom Protokoll in 100 µl DEPC-Wasser eluiert oder für die grösseren Kits nach dem Fällern und Waschen in einem geeigneten Volumen DEPC-Wassers aufgenommen.

### Gesamt-RNA

Um die RNase-Aktivitäten zu minimieren, wurden hitzsterilisierte (160°C für 6 h ‚backen‘) Glasgeräte verwendet, RNase-arme Einwegmaterialien und Reagenzien, DEPC-Wasser zum Ansetzen von Lösungen. Der DEPC-Zusatz (1%) inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikationen und wird nach Inkubation über Nacht durch Autoklavieren selbst vollständig inaktiviert. Es wurde zügig und gekühlt auf Eis gearbeitet und dabei EtOH-desinfizierte Einweghandschuhe getragen.

Zur RNA-Extraktion wurde das auf die kombinierte GTC/Phenol-Chloroform Methode (Chomczynski & Sacchi, 1987) basierende Reagenz peqGOLD RNA Pure™ der Firma Peqlab (Erlangen) nach deren Protokoll verwendet. Vereinfacht wurde nur ein Waschschrift mit 75%igem EtOH durchgeführt und die RNA in DEPC-Wasser aufgenommen. Zur RNA-Extraktion aus Blut kam das RNeasy-Isolationskit von Qiagen (Hilden) zum Einsatz. Zellgewebe wurde unter flüssigem Stickstoff im Keramikmörser mit dem Pistill zu Pulver gemahlen und dann direkt in das Peqlab-Reagenz überführt. Auf 200 mg Gewebe kamen 4 ml Reagenz. Für die PBS-gewaschenen und mittels Gummispatel geernteten und bei 300xg pelletierten adhärenen Gewebekulturzellen war das Verhältnis 2-3 konfluente 75 cm<sup>2</sup>-Kultur-schalen entsprechend 6-9\*10<sup>6</sup> Endothelzellen pro Milliliter Reagenz.

### Säulenreinigung

Zur Reinigung von DNA in wässriger Lösung bietet Pharmacia Biotech (Freiburg) das MircoSpin™ Sephacryl HR Column-System in drei verschiedenen Trenngrenzen an. Es basiert auf Zentrifugenröhrchen gepackt mit einem Sephacryl®-Gel, welches die Produkte passieren lässt, während kleinere Verunreinigungen zurückgehalten werden.

S-200 HR-Säulen wurden zum Umpuffern und Entfernen von nicht-inkorporierten Nukleotiden verwendet, S-300 HR und S-400 HR zur Abtrennung von überschüssigen Primern. Alternativ zu den S-200 HR-Säulen wurden Centriflex-Säulen der Firma MoBiTec (Göttingen) mit dem gleichen Protokoll verwendet:

	1 min bei 735xg vorzentrifugieren (Entfernen des TE-Puffers)
+25-100 µl	Probelösung
	2 min bei 735xg zentrifugieren

Alternative Reinigungssysteme wie z.B. das High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) binden die DNA ab 100 bp in einer Zentrifugensäule spezifisch an einer Silica-matrix in Anwesenheit eines chaotropen Salzes (zerstört die Organisation der Hydrathülle). Nach zwei Waschsritten, bei denen das Enzym, überschüssige Primer und der Puffer entfernt werden, wird die DNA wieder eluiert und ist für Folgereaktionen vorbereitet.

ca. 50µl	PCR-Produkt
+500 µl	Bindungspuffer
	13000 rpm für 30 sec
500 µl	Waschpuffer
	13000 rpm für 30 sec
200 µl	Waschpuffer
	13000 rpm für 30 sec
ca. 50µl	DEPC-Wasser
	13000 rpm für 30 sec, Elution

### **Fällung von Nukleinsäuren**

Zur Konzentration und Reinigung können Nukleinsäuren aus einer wässrigen Lösung mit Ethanol gefällt werden.

Fällung:

1x Vol	DNA-Lösung (effektiv ab 100 µl)
2x Vol	100% Ethanol
1/10 Vol	3M Na-Acetat
alternativ	7,5M NH <sub>4</sub> -Acetat
	mind. 1h -20°C oder -70°C fällen
	12000xg bei 4°C für 15 min zentrifugieren
	Pellet mit
	70% Ethanol (DNA)
oder	75% Ethanol (RNA) waschen
	12000xg bei 4°C für 10 min zentrifugieren
	Pellet trocknen und in adäquater Menge Wasser aufnehmen

### **2.5.4 Northern Blot**

#### **Denaturierende Gele**

Zur elektrophoretischen Auftrennung der RNA wurden 1%ige denaturierende Agarosegele in einer ausschliesslich dazu verwendeten Apparatur (Gel: 11,5 x 12,5 x 0,8 cm) von MWG-Biotech (Ebersberg), die zuvor in 1 M Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>) über Nacht gereinigt wurde, bei 100 V gefahren.

10x-MOPS Puffer:

0,2 M	MOPS
50 mM	NaAcetat
10 mM	EDTA
	mit DEPC-Wasser angesetzt
einstellen auf pH 7	mit NaOH
	autoklavieren

**Gel:**

1%	Agarose
1x	MOPS Puffer
7,4%	Formaldehyd mit DEPC-Wasser angesetzt

**Laufpuffer:**

1x	MOPS Puffer
7,4%	Formaldehyd mit DEPC-Wasser angesetzt

**Ladepuffer:**

10 µg	RNA
50%	Formamid
7,4%	Formaldehyd
1x	MOPS Puffer
5-10%	Schwerelösung 10 min bei 65°C denaturieren
alternativ	3 min bei 75°C 3 min Eis, abzentrifugieren, laden

In der verwendeten Gelapparatur liessen sich im 12-Taschen Masstab jeweils bis zu 30 µl Gesamtvolumen laden. War die RNA nicht ausreichend konzentriert, wurden alle Proben gefällt (ohne zu waschen), um einen gleichmässigen Lauf zu gewährleisten.

**Blotten**

Nach abgeschlossenem Lauf wurden die RNA-Gele vor dem Blotten 2 mal für 15 min in bidestilliertem Wasser auf dem Schütteltisch gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen. Der RNA-Transfer auf die ungeladene Nylonmembran Hybond N (Amersham, Braunschweig) erfolgte nach dem vertikalen Kapillarblotprinzip mittels Whatmanpapier 3MM (Biometra, Göttingen) und Zellstoffpapier über Nacht. Als mobile Phase wurde 10x SSC verwendet.

Die transferierte RNA wurde auf der in 0,5x SSC gewaschenen, feuchten Membran mit einem UV-Crosslinker (UV Stratalinker 2400, Stratgene, Heidelberg) fixiert. Eine Kontrolle gleichmässiger Beladung erfolgt durch Auflegen der feuchten Membranen auf den UV-Transilluminator (254 nm) mit der RNA-Seite zum UV-Licht gewandt, welches die RNA zum fluoreszieren anregt und per Polaroidfoto dokumentiert wurde (vgl. Buess *et al.*, 1997). Die anschliessend hybridisierungsfertigen Membranen wurden bei RT getrocknet und gelagert.

### Radioaktive Sondenmarkierung

Zur Herstellung von radioaktiv markierten Sonden für die spezifische Hybridisierung mit membrangebundener RNA wurde das Ready-To-Go™ Random-Prime-Labeling Kit (Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Protokoll verwendet. Es funktioniert auf der Basis der Bindung von Zufalls-Hexameren als Primer, an die sich in einem Elongationsschritt eine Gegenstrangsynthese durch eine T7-Polymerase anschliesst, in der die <sup>32</sup>P-markierten α-dCTP-Nukleotide (Amersham, Braunschweig) inkorporiert werden. Obwohl sich sowohl PCR-Produkte als auch Plasmid-DNA sich als Sonde eignen, wurde nach Möglichkeit immer die Verwendung von PCR-Produkten vorgezogen, da sie keine unspezifisch bindenden Vektorbereiche aufweist. Dennoch liess sich bei Plasmidsonden kein höherer Hintergrund feststellen.

Markierungsreaktion für PCR-Produkte und Plasmide:

+30 µl	Reaktionsgemisch Lyophilisat (T7-Polymerase und Puffer) DEPC-Wasser 15-30 min bei RT rekonstituieren
10-50 ng oder 200-500 ng ad 15 µl	PCR-Produkt (unaufgereinigt, aber ohne Nebenprodukte) Plasmid DEPC-Wasser 3 min 99°C denaturieren, 2 min Eis zusammengeben
+5 µl	α <sup>32</sup> P-dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Fr.) 15-30 min 37°C, abzentrifugieren 3 min bei 735xg über Centriflex-Säule (MoBiTec) aufreinigen 3 min bei 99°C denaturieren direkt zur Hybridisierungslösung (6-12 ml) zufügen

Für die Verwendung von Oligonukleotiden als Sonde (18 S-RNA Ladekontrolle) wurde eine 5'-Endmarkierung vorgenommen. Dabei wurde ein <sup>32</sup>P-markierter γ-ständiger ATP-Phosphatrest durch eine T4-Kinase an das Oligonukleotid transferiert. Die Phosphorylierung wurde mithilfe des Ready-To-Go™ T4 Polynucleotide Kinases (Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Markierungsreaktion für Oligonukleotide:

	Reaktionsgemisch Lyophilisat (T4-Kinase und Puffer)
+30 $\mu$ l	DEPC-Wasser
	2-5 min bei RT rekonstituieren
+5-10 pmol	Oligonukleotid
ad 49 $\mu$ l	DEPC-Wasser
+1 $\mu$ l	$\gamma^{32}$ P-ATP (3000 Ci/mmol, 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l, Amersham)
	30 min bei 37°C inkubieren
	3 min bei 750xg über S-200 HR-Säulen aufreinigen
	direkt zur Hybridisierungslösung (6-12 ml) zufügen
	über Nacht bei 63°C hybridisieren

### Hybridisierung und Detektion

Die RNA-Membranen wurden für mindestens 30 min bis über Nacht im Rotationsofen bei 56-63°C prähybridisiert. Im Sinne einer hohen Sondenkonzentration wurden je nach Zahl der Blots für kleine oder grosse Röhren mit 6 ml bzw 12 ml Hybridisierungslösung Roti-Hybri-Quick (Roth, Karlsruhe) das Volumen knapp bemessen. Zur Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung ausgetauscht und nach erfolgter Temperierung die Sonde zugesetzt und über Nacht inkubiert.

Nach dem Abschütten des Hybridisierungsgemisches wurden die Blots in der Röhre für je 15 min mit erst 2x SSC und dann 0,5x SSC gewaschen und in noch feuchtem Zustand in eine Plastiktüte eingeführt und in einer Röntgenkassette mit strahlungsempfindlichem Film zur Exposition 6 h bis 2 Wochen gelagert und anschliessend maschinell entwickelt. Wahlweise kam entweder einseitig beschichteter Röntgenfilm für hohe Auflösung bei RT zum Einsatz oder beidseitig beschichteter Röntgenfilm mit Verstärkerfolie bei -70°C für schwache Signale oder kurze Expositionszeiten.

### 2.5.5 Reverse Transkription von RNA

Zur cDNA Synthese aus Gesamt-RNA (siehe 2.5.3) mittels Reverser Transkriptase wurden alternativ die Enzyme und Puffer von Expand RT (Roche, Mannheim) und Superscript II™ (Life-Technologies) nach Standardprotokollen verwendet. Als alternative Primer kamen entweder Zufalls-Hexamere (Life Technologies, Karlsruhe; No 48190-011) oder Oligo dT<sub>15</sub>-Primer (Pharmacia Biotech, Freiburg) zum Einsatz. Während letztere am Poly-A-tail der RNA binden und nur diese Subpopulation vom 3'-Ende ausgehend bis zum Syntheseabbruch transkribiert wird, zeichnet sich dem Prinzip nach die statistische Gleichverteilung der Bindung von Zufalls-Hexameren vor allen Dingen durch eine effektivere Transkription



grosser RNA-Moleküle in deren 5'-Bereich aus, so dass diese standardmässig verwendet wurden. Da die kurzen Hexamere eine niedrigere Annealingtemperatur aufweisen, wurden die ersten 10 min der Synthese auf 30°C heruntersgesetzt.

200 ng	Primer (Zufalls-Hexamere)
1 µg	Gesamt-RNA
ad 11 µl	DEPC-Wasser
	65°C für 10 min denaturieren, dann auf Eis
alternativ	75°C für 3 min
	1x Puffer Expand™
3 µl	DTT
	1 mM dNTPs
	75 U Reverse Transkriptase Expand™
optional 40 U	RNasin
ad 19 µl	DEPC-Wasser
	zusammengeben
	30°C für 10 min, dann 42°C für 50 min inkubieren
	75°C für 10 min Enzym inaktivieren
alternativ	95°C für 2 min

### 2.5.6 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1986) ist ein schnelles und effektives Verfahren zur Amplifikation kleinster DNA-Mengen. Das Prinzip ist die mehrfache Wiederholung von Denaturierung der Template-DNA, Hybridisierung der für die zu untersuchende Sequenz spezifischen Primer an die Template-DNA und Gegenstrangsynthese durch das thermostabile Enzym *Taq*-DNA-Polymerase. RNA muss zur Amplifikation erst in cDNA umgeschrieben werden (siehe 2.5.5).

Da es sich bei der PCR um ein äußerst sensitives Nachweisverfahren handelt, wurden die allgemeinen Regeln zur Labororganisation und Reaktionsvorbereitung (Kwok & Higuchi, 1989) befolgt sowie eine effektive Überwachung durch Leerkontrollen und ggf. Positiv- und Negativkontrollen in allen sensiblen Versuchen einbezogen (Schmidt *et al.*, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR eingesetzt zur Identifikation (Screening) von positiven Klonen (siehe 2.5.2), zur Vervielfältigung von klonierter DNA aus Plasmiden, zur Differential Display- (DD) Amplifikation und Reamplifikation von exprimierten Genfragmenten (siehe 2.5.8), zur genspezifischen Amplifikation (Klonierung und Manipulation von Gesamtgenen 2.5.8, 2.6.3) (siehe auch RACE 2.5.9) und schliesslich zur Sondenherstellung für die *in situ*-Hybridisierung.

Standardprotokoll für 25 µl-Ansatz:

	1x	Puffer
	2 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,75 U	Taq-Polymerase
alternativ	1x	Synergy-Puffer inkl. MgCl <sub>2</sub>
alternativ	3 U	Synergy-Taq-Polymerase Mix (Fehlerkorrektur)
	je 5 pmol	Primer
	5 nmol	dNTPs
	ad 24,5 µl	DEPC-Wasser
	ca. 50 µl	ölüberschichten
		auf 94°C im Thermocycler erhitzen, Hot start (Chou <i>et al.</i> , 1992)
	+0,5 µl	cDNA (siehe 2.5.5)

Programm im Thermocycler:

	94°C für 3 min, initiale Denaturierung
35-50 Zyklen:	94°C für 30 sec, Denaturierung
	50-60°C für 30 sec, Primerannealing, je nach Primer
	72°C für 30 sec bis 2,5 min, Elongation, je nach Produktlänge
optional	72°C für 25 min, terminale Elongation (siehe 2.5.2)
	∞ 4°C, Lagerung

Die Annealingtemperatur ( $T_m$ ) wurde bis zu einer Primerlänge von 25 bp nach der Formel

$$T_m = 2 * (A + T) + 4 * (C + G) - 4$$

abgeschätzt, wobei A, C, G und T die Anzahl der jeweiligen Basen des Oligonukleotids darstellten. Für problematische Reaktionen wurde die Annealingtemperatur im Gradientencycler experimentell bestimmt. Die verwendeten  $T_m$  finden sich in der Primerliste in Abschnitt 2.2.4. Pro Kilobase Templatelänge wurde mindestens eine Minute Elongationszeit gesetzt. Enzyme mit Fehlerkorrektur erforderten eine ca. 10-20% längere Elongationszeit. Die Zyklenzahl richtete sich nach der jeweiligen Reaktionseffizienz und der Frequenz des zu amplifizierenden Templates. cDNA wurde typischerweise mit 45 Zyklen amplifiziert, Plasmid-DNA mit 35 Zyklen. Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden ca. 50 ng eingesetzt.

Neue, im DD-Projekt identifizierte Gene sowie zur Expressionsklonierung bestimmte Genfragmente wurden zur Vermeidung von Punktmutationen mithilfe von Polymerasen mit 3'→5' Exonukleaseaktivität amplifiziert. Im Sinne einer hohen Reaktivität erweisen sich dabei kommerziell vertriebene Gemische aus Enzym ohne diese Fehlerkorrektur mit einem

geringerem Zusatz von korrigierendem Enzym als am geeignetsten (SynergyTaq, KlenTaq). Standardmässig wurden 2,5 U Synergy-Taq pro 25 µl-Ansatz eingesetzt.

Mycoplasmenüberwachung:

Zur Mycoplasmenkontrolle kultivierter Zellen wurde eine zweiphasige PCR in der Art einer *nested* PCR etabliert. Die Primer sind spezifisch für eine Vielzahl von Mycoplasmenstämmen (Uemori *et al.*, 1992).

Probenaufbereitung:

ca. 200 µl	konditioniertes Zellmedium
	95°C für 5 min Zellaufschluss
	4000 rpm für 1 min
1 µl	Überstand in Standard-PCR (50µl) einsetzen

94°C-3 min//94°C-30 sec/55°C-2 min/72°C-1 min für 35 Zyklen//72°C-7 min//∞4°C

Aus der ersten Amplifikationsphase mit den Primern F1/R1 wurde nach 35 Zyklen 1 µl Produkt in die zweite Phase überführt und mit dem Primerpaar F2/R2 unter gleichen Bedingungen amplifiziert.

### 2.5.7 Sequenzierung

Die Sequenzanalyse doppelsträngiger DNA erfolgte mithilfe der Systeme Abi 310 (Kapillarelektrophorese) und Abi 377 (Gelelektrophorese) von PE Applied Biosystems. Sie basieren auf der Didesoxymethode nach Sanger *et al.* (1977), einer linearen PCR, bei der ausgehend von einem Sequenzierprimer Einzelstränge synthetisiert werden, die bei der statistisch gleichverteilten Inkorporation von ddNTPs zum Abbruch kommen. Da die ddNTPs je nach Basenart mit vier verschiedenen Farbstoffen markiert sind, können die Produkte, der Länge nach und entsprechend der Sequenz elektrophoretisch aufgetrennt, differentiell per Fluoreszenz detektiert werden.

Die Reaktion wurde durchgeführt mit dem dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (dRDT) oder BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (BD) von PE Applied Biosystems (Weiterstadt) nach dem Standardprotokoll des Herstellers unter Verwendung der halben Menge (4 µl) an Premix (Enzym-Puffer-Nukleotidgemisch) auf 20 µl Reaktionsmasstab. Dabei wurde auf die Ölüberschichtung verzichtet, um eine gute Benetzung beim späteren Beladen des Sequenziergeles sicherzustellen. Eingesetzt wurden

500 ng Plasmid-DNA, wobei die Reinheit der Mini-preps (siehe 2.5.3) ausreichte. Zur Sequenzierung von PCR-Produkten (Einsatz von 50 ng) wurde vorab eine Säulenaufreinigung (siehe 2.5.3) vorgenommen. Als Sequenzierprimer wurde einer der Amplifikationsprimer (Einsatz von 10 pmol) verwendet. Nach der Reaktion wurden die Syntheseprodukte durch Fällung gereinigt (siehe 2.5.3) und im Sequenzer analysiert. Abweichungen zwischen dem Elektropherogramm und der abgeleiteten Nukleotidsequenz wurden manuell korrigiert.

Programm im Thermocycler (Perkin Elmer 2400):

96°C-10 sec/50°C-5 sec/60°C-4 min für 25 Zyklen//∞4°C

## **2.5.8 Differentielles RNA Display (DD)**

### **Design**

Im differentiellen mRNA-Display (DD) wird die relative Genexpression von zwei oder mehreren Zellpopulationen oder Geweben miteinander verglichen, so dass sich RNAs identifizieren lassen, die unterschiedlich exprimiert werden. Im Prinzip wird aus den zu vergleichenden Zellproben RNA extrahiert, in cDNA revers transkribiert und nach der seriellen Amplifikation mit verschiedenen Kombinationen von je zwei Zufallsprimern elektrophoretisch analysiert. Die so resultierenden Bandenmuster reflektieren einen Teil der Genexpression des untersuchten Genpools. Eine Veränderung der Signalintensität einer Bande (eines Amplifikationsproduktes) im Vergleich der Proben untereinander spiegelt die Regulation des zugrundeliegenden Genes wider (Liang *et al.*, 1992; Liang & Pardee, 1992). Für die RT und die Amplifikation wurde das Delta™ RNA Fingerprinting Kit (Clontech, Heidelberg) verwendet.

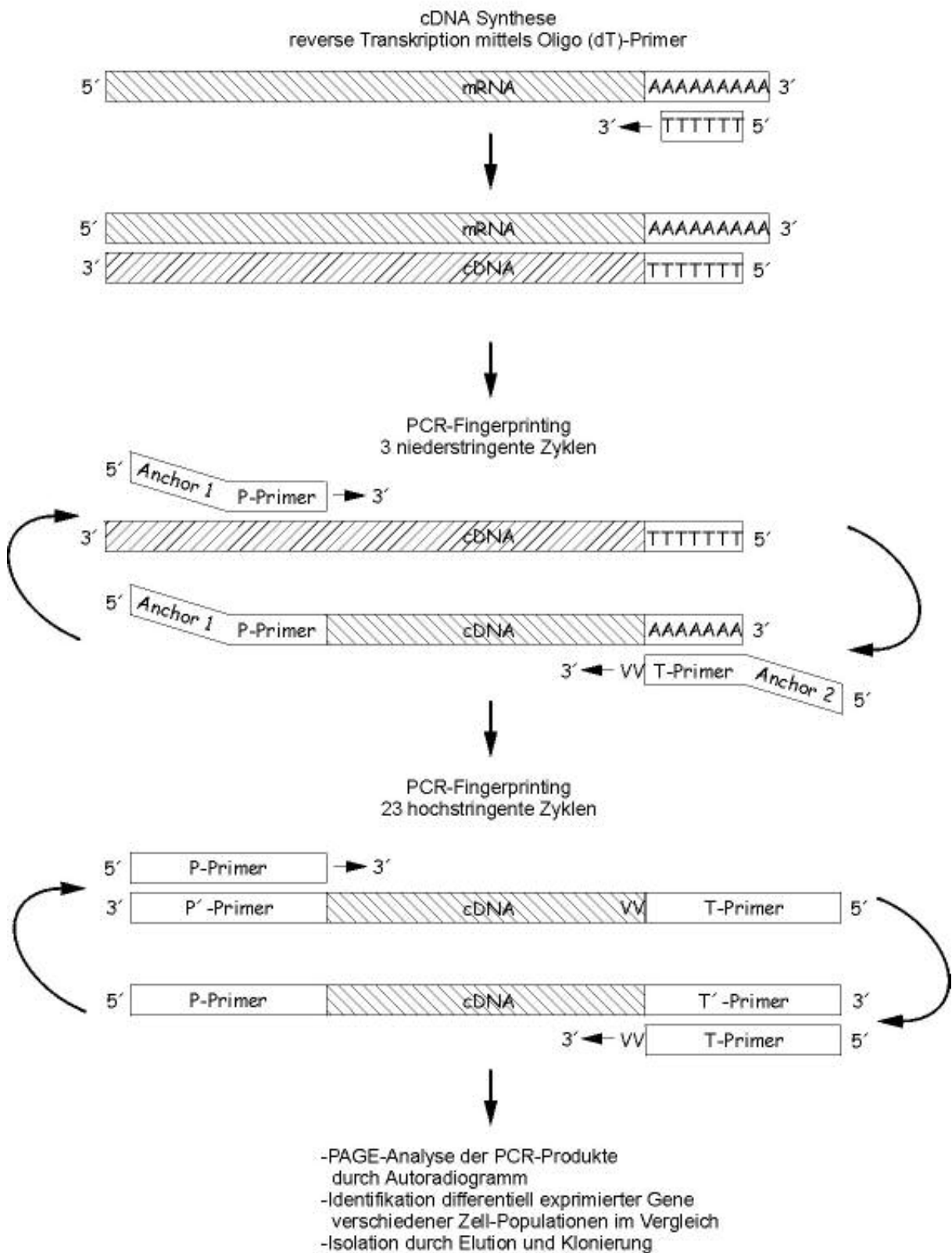


Abb. 1: DD-Schema

Es wurden bovine Aorten-Endothelzellen (BAEC) verwendet, um der Fragestellung entsprechend aktivierte Gene angiogener Endothelzellen zu identifizieren. Wie bei allen semiquantitativen, PCR-basierenden (exponentiell verstärkten) Verfahren beruht die Genauigkeit der Messung auf vergleichbaren Reaktionsbedingungen und Effizienzen. Im Sinne einer Reduktion der methodenimmanent gegebenen Falsch-positiv-Rate wurden je zwei ruhende Zellpopulationen mit zwei aktivierten in einem Ansatz simultan verglichen (Liang *et al.*, 1993). Eine der aktivierten, subkonfluenten Endothelzellpopulationen wurde zusätzlich mit einem basalen Angiogeneseinduktor (bFGF) stimuliert, umgekehrt wurde eine ruhende, konfluente Zellpopulation mit einem Angiogeneseantagonisten (Anti-bFGF-AK) inhibiert. Nur stetige Signalverläufe wurden berücksichtigt. Darüberhinaus wurde die Reaktion ein weiteres Mal mit unabhängig kultivierten Zellen (möglicher biologischer Varianz Rechnung tragend) reproduziert, bevor regulierte Genfragmente aus dem Gel isoliert wurden.

### Zellen

Zur Vermeidung von Populationsunterschieden wurden Zellen der jeweils gleichen Population und Passage in aktivierten und ruhendem Zustand miteinander verglichen. Es kamen nur junge bis mittelalte Zellen zum Einsatz (Passage 7-22), da deren Proliferation erheblich aktivierbarer ist. Um Konditionierungseffekte auszuschliessen, fand der letzte Mediumwechsel immer ein Tag vor der Ernte statt.

**Tab. 6: Zellpopulationen**

Zellen	Konditionierung
S+ subkonfluent+bFGF	BAEC 1:5 ausgesät, nach 1d Medienwechsel, nach 2d Stimulation mit 10 ng/ml bFGF für 4,5 h, dann ca. 60%-konfluent geerntet
S subkonfluent	BAEC 1:5 ausgesät, nach 1d Medienwechsel, nach 2d ca. 60%-konfluent geerntet
K konfluent	BAEC 1:5 ausgesät und konfluent wachsen lassen, Ernte 1d nach letztem Mediumwechsel
K+ konfluent+ $\alpha$ -bFGF	BAEC 1:5 ausgesät und konfluent wachsen lassen, Ernte 1d nach letztem Mediumwechsel, zuvor für 6h mit 1 $\mu$ g/ml $\alpha$ -bFGF (funktionsneutralisierend) behandelt

### RNA Extraktion

siehe 2.5.3 Die Reinigung wurde zweifach durchgeführt.

## RT-PCR

Zur cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA wurden Oligo dT-Primer verwendet (Delta™ RNA Fingerprinting Kit, Clontech, Heidelberg), da sie nur die Poly-A tail RNAs transkribieren und somit den zu amplifizierenden cDNA-Pool auf die Gene von Interesse reduzieren, also den Hintergrund nicht regulierter Banden minimieren.

2 µg	Gesamt-RNA
1 pmol	Oligo(dT) cDNA Primer (Clontech, Heidelberg)
ad 5 µl	DEPC-Wasser
	70°C für 3 min denaturieren, dann auf Eis

Reaktionsmastermix, je Probe:

1x	first-strand Puffer (Clontech, Heidelberg)
10 nmol	dNTPs (Clontech, Heidelberg)
200 U	MMLV Reverse Transkriptase (Clontech, Heidelberg)
ad 5 µl	DEPC-Wasser
	zusammengeben, mischen
	42°C für 1 h inkubieren
	75°C für 10 min inaktivieren
ad 100 µl	DEPC-Wasser, bei -20 °C lagern

## Amplifikation

(siehe Abb. 1: DD-Schema)

Die Amplifikationsprimer bestehen aus einem Satz von 10 (P1-P10) 5'-Primern und einem Satz von 9 (T1-T9) 3'-Oligo-dT Primern (Delta™ RNA Fingerprinting Kit, Clontech, Heidelberg, Sequenz siehe 2.2.4). Von den möglichen 90 Kombinationen aus je einem der 5'- und einem der 3'-Primer werden in jedem Einzelexperiment je ein Paar zur Amplifikation verwendet, bis genügend differentiell exprimierte Produkte identifiziert sind.

Aufgrund des Designs der T-Primer (identische 30-mere, deren letzte beiden 3'-Basen eine variable Kombination aus A, C oder G = V sind, vor denen ein 9 bp-T-Stretch liegt) binden diese an je einer anderen Subfraktion der cDNA (anfangsständig am poly-A-Schwanz). Die P-Primer (25- oder 26-mere mit einem variablen 9 bp bzw 10 bp 3'-Ende) liefern durch Zufallsbindung mit ihrer variablen Sequenz wiederum nur für einen Teil der möglichen cDNAs einen Gegenstrang. Im Ergebnis wird die Anzahl der amplifizierten Fragmente so reduziert, dass sich das resultierende Fragmentgemisch mit elektrophoretischen Verfahren noch auflösen lässt. Des weiteren erlaubt die Konzeption der Primer (Länge und 5'-Anchor-Sequenzbereiche) eine Amplifikation unter spezifischen Bedingungen mit hoher Reprodu-

zierbarkeit, nachdem zunächst in wenigen initialen unspezifischen Amplifikationszyklen exakte Bindungsstellen nach der Primervorlage synthetisiert wurden.

Reaktionsansatz im 20  $\mu$ l-Masstab:

1 $\mu$ l	cDNA vorlegen (1:10 Verdünnung, wie oben beschrieben)
Mastermix:	
1x	Klen <i>Taq</i> -Puffer
1 nmol	dNTPs
je 20 pmol	P-/T-Primer
0,4 $\mu$ l	Advantage Klen <i>Taq</i> Polymerase Mix
3 pmol	$\alpha^{35}\text{S}$ dATP (Amersham, Braunschweig; No AG1000)
ad 19 $\mu$ l	DEPC-Wasser
	auf die Proben verteilen, öüberschichten

Programm im Thermocycler:

1 Zyklus	94°C für 5 min 40°C für 5 min 72°C für 5 min
2 Zyklen	94°C für 2 min 40°C für 5 min 72°C für 5 min
23 Zyklen	94°C für 1 min 60°C für 1 min 72°C für 2 min

Kontrollen:

Zur Überwachung von DNA-Kontaminationen wurde von jedem verwendeten Gesamt-RNA Extrakt ein Aliquot (1  $\mu$ l einer 1:100 Verdünnung) direkt (ohne RT) in die Amplifikation eingesetzt. Die Banden durften sich nicht von denen in der korrespondierenden Leerkontrolle unterscheiden. Eine solche Leerkontrolle (Substitution des Templates mit Wasser) wurde für jedes verwendete Primerpaar durchgeführt. Die bei der Systemetablierung durchgeführten Positivkontrollen mit den beiden mitgelieferten RNAs, die parallel zu den sonstigen Proben in cDNAs umgeschrieben wurden, erbrachten mit den entsprechenden Primern das erwartete differentielle Muster.

## PAGE

Zur elektrophoretischen Auftrennung der DD-PCR-Produkte wurde eine Gelapparatur von Kodak (Stuttgart) unter mit 43x21,5 cm Platten mit 0,4 mm Spacern und 32 Taschenkamm verwendet. Die haftende Platte wurde auf der Gelseite ca. alle 4 Läufe mit Silicone solution



(Serva) behandelt, die nicht haftende Platte mit Acryl-Glide™ (Amresco, Bezug über Biometra, Göttingen). Überschüssiges Beschichtungsreagenz wurde mit Aceton entfernt. Zur Auftrennung wurden denaturierende 5% PAA-Gele eingesetzt:

1x	TBE-Puffer
6,9 M	Urea
5%	PAA [19:1] (Roth, Karlsruhe)
ad 60 ml	dd-Wasser
	lösen des Urea durch erwärmen vor Zugabe des PAA
+320 µl	10% APS
+50 µl	TEMED
	mischen und blasenfreies Gel giessen

Elektrophorese:

2,5 µl	denaturierender Ladepuffer (Amersham T7-Sequencing Kit)
2,5 µl	DD-PCR-Produkt
	94°C für 2 min denaturieren, dann Eis
3,5 µl	auf das Gel laden
	14 mA für ca 3 h 20 min

Nach der Elektrophorese wurden die Gelplatten getrennt und das Gel auf Whatmanpapier übertragen, dann nach Abdeckung der Gelseite mit Frischhaltefolie in einer Vakuum-trocknungsapparatur mit dem Trägerpapier verbacken und durchgetrocknet (ca. 2 h). Anschliessend wurde es über Nacht in einer Röntgenkassette mit  $\beta$ -strahlungssensiblen Film (Kodak MR) exponiert.

### **Fragment-Isolation**

Die Art der cDNA-Synthese und die Auflösung der PAA-Gele lieferte verwertbare Fragmente zwischen 200-2000 bp. Auf dem Film sichtbare differentielle (hochregulierte) Banden wurden auf dem getrockneten Gel auf Whatmanpapier mittels Einwegkanülen durch Einstiche markiert und mit Einwegskalpelln ausgeschnitten. Der Film wurde anhand von vor der Exposition angebrachten Markierungen auf dem Gel positioniert. Das korrekte Ausschneiden der Fragmente wurde durch erneute Filmexposition kontrolliert.

Die ausgeschnittenen Gelfragmente wurden unter 100 µl [10 mM] Tris pH 8 für 30 min bei 37°C eluiert und nach Entfernen des Gelstücks über Nacht bei -20°C gefällt unter Ethanol/NH<sub>4</sub>AC (siehe 2.5.3) und zusätzlich 50 µg Glycogen als Fällungshilfe, einmal unter 75% EtOH gewaschen, in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### Reamplifikation (PCR)

Zum Einsatz kam eine modifizierte Standard-PCR (siehe 2.5.6), bei der durch Reduzierung der Primerkonzentration sowie durch eine hohe Annealingtemperatur spezifische Amplifikationsbedingungen in den Vordergrund gestellt wurden. Es wurden jeweils dieselben P-/T-Primerkombinationen wie bei der DD-Amplifikation verwendet.

Standardprotokoll für 50 µl-Ansatz:

1x	Puffer (Life Technologies, Karlsruhe)
2 mM	MgCl <sub>2</sub>
je 2,5 pmol	P-/T-Primer
5 nmol	dNTPs
1,5 U	Taq-Polymerase (Life Technologies, Karlsruhe)
ad 49,5 µl	DEPC-Wasser
ca. 50 µl	Öüberschichten
	auf 94°C im Thermocycler erhitzen, Hot start (Chou <i>et al.</i> , 1992)
+0,5 µl	DD-Banden-Extrakt

94°C-3 min//94°C-1 min/61°C-1 min/72°C-2 min für 40 Zyklen//72°C-7 min//∞4°C

### Klonierung

Da sich hinter jeder ausgeschnittenen und reamplifizierten DD-PCR-Bande mehrere Genfragmente gleicher Grösse verbergen konnten, die über die gleichen Primerbindungsstellen verfügten, war zur Isolation eines einzelnen, regulierten Genfragmentes eine Klonierung erforderlich. Die frischen Reamplifikate wurden direkt unter Verwendung des TA-cloning Kits kloniert und mittels PCR identifiziert (siehe 2.5.2).

### Northern-blot

Die durch Klonierung vereinzelt DD-Genfragmente wurden im radioaktiven Northern-blot (siehe 2.5.4) auf differentielle Regulation (Aktivierung) überprüft.

### Sequenzierung, Datenbankrecherche

Im Northern-blot verifizierte Klone wurden angezogen und im ‚Mini‘-Masstab Plasmid aufgereinigt (siehe 2.5.3) und nach Standard-Protokoll sequenziert (siehe 2.5.7). Die Sequenzen wurden gegen die Gen-Datenbanken (siehe 2.7.1) abgeglichen.

Fanden sich Homologien nur zu EST-Sequenzen, handelte es sich also um ein Fragment eines neuen Gens, so wurde mittels DB am Computer versucht, die Gesamtsequenz (*full length*) durch Integration überlappender ESTs zu erschliessen (siehe 2.7.2).

### **Gesamtsequenz-Klonierung**

Die Gene der am Computer erstellten Gensequenzen wurden zur Überprüfung per PCR aus gesamt-cDNA (siehe 2.5.5) amplifiziert und zur Sequenzierung kloniert. Die dazu notwendigen Primer wurden aus den EST-Sequenzen abgeleitet (siehe Liste 2.2.4).

### **2.5.9 5'-RACE**

*Rapid amplification of cDNA ends* (RACE, siehe Abb. 2) ist eine experimentelle Methode zur Identifikation endständiger Gensequenzbereichen von unvollständig bekannter mRNA-Gensequenzen (Frohman *et al.*, 1989). Beim 5'-RACE wird der Genanfang identifiziert, der oftmals aufgrund unvollständigen Synthesedurchlaufs der Reversen Transkriptase fehlt.

Im ersten Schritt wird die mRNA des Gens revers transkribiert. Dazu wird ein genspezifischer Primer SP1 verwendet, welcher am bekannten 5'-Ende der Sequenz positioniert wird. Diese Transkription endet automatisch am tatsächlichen 5'-Ende der mRNA. An den resultierenden cDNA-Einzelstrang wird in einer Tailingreaktion durch eine Terminale Transferase eine 3'-poly-A-Sequenz ansynthetisiert. Diese fungiert als Bindungsstelle für einen forward-5'-dT<sub>16</sub>-Anchorprimer, der mithilfe seiner poly-dT Sequenz daran bindet und so eine Zweitstrang-synthese ermöglicht. Anschliessend erfolgt eine Amplifikation, die sich im gleichen Reaktionsansatz realisieren lässt. Als forward 5'-Primer wird der Anchorprimer (im Sinne spezifischer Reaktionsbedingungen ohne den poly-dT Bereich) verwendet, als reverse-3'-Primer ein SP2 Primer, so dass der eingeschlossene Genbereich mittels PCR amplifiziert werden kann. Der 3'-Gegenprimer SP2 bindet relativ zu SP1 etwas genaufwärts und setzt auf diese Weise das Prinzip der *nested*-PCR um. Durch eine weitere Amplifikation mit einem noch weiter innenliegenden SP3-Primer, der abermals mit dem Anchorprimer kombiniert wird, lässt sich der Verstärkungseffekt bei hoher Spezifität noch weiter erhöhen.

Auf der Grundlage des 5'-RACE Protokolls von Roche (Mannheim) wurden Modifikationen in Primerkonzentrationen, Primersequenzen (keine Schnittstellen in der Anchorsequenz), Temperaturprofil und Enzymauswahl eingeführt, die sich an Schaefer (1995) orientierten.

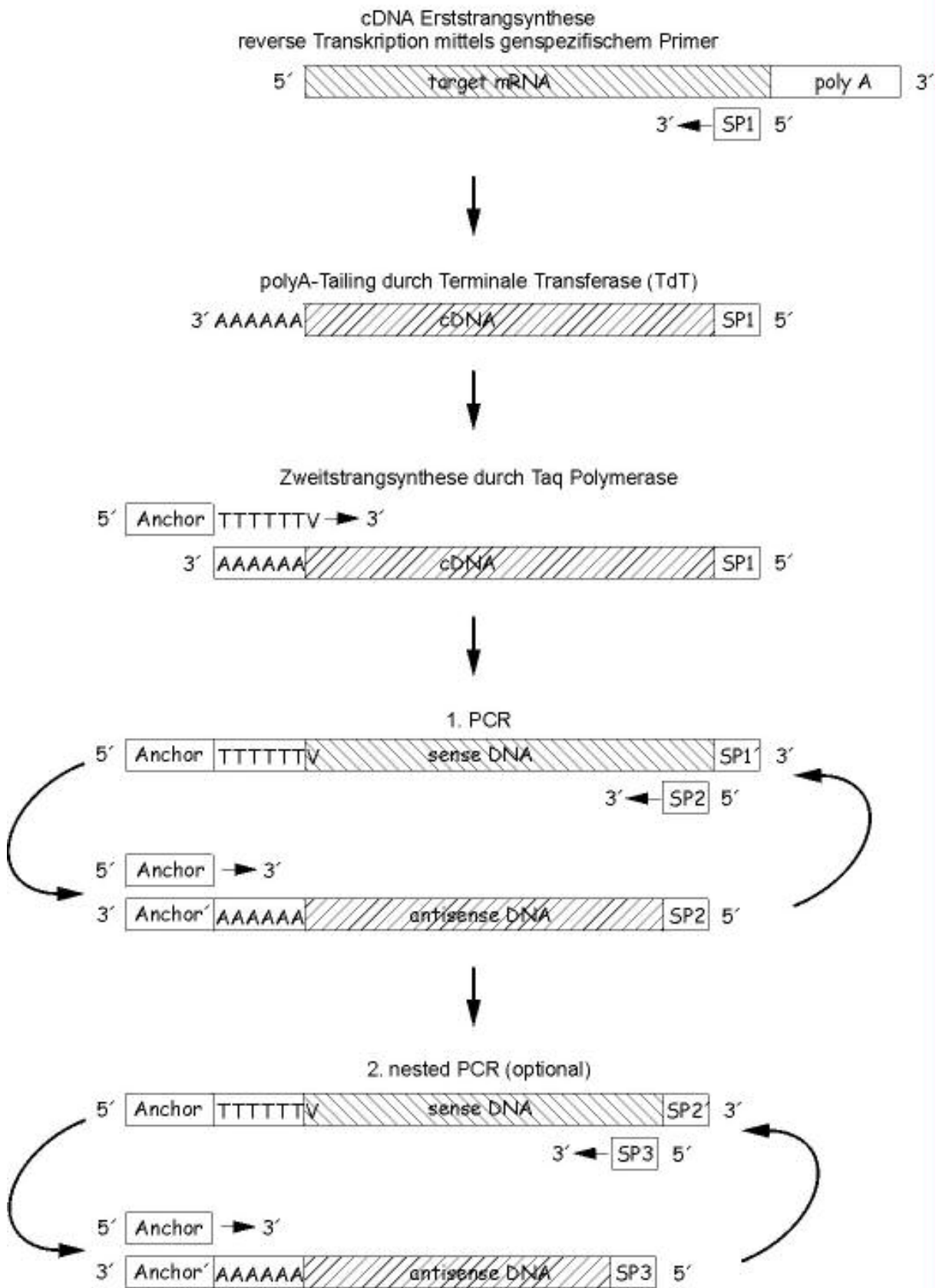


Abb. 2: Prinzip des 5'-RACE

**Reverse Transkription:**

5 pmol	Primer SP1
2 µg	Gesamt-RNA
ad 13 µl	DEPC-Wasser
	70°C für 3 min denaturieren, dann auf Eis
1x	Puffer
3 µl	DTT
10 nmol	dNTPs
20 U	AMV RT inkl. RNase H Aktivität
ad 7 µl	DEPC-Wasser
	55°C für 1 h
	65°C für 10 min

Die AMV-Reverse Transkriptase lässt eine hohe Synthesetemperatur zu, bei der möglichst wenig Sekundärstrukturen der RNA auftreten. Zudem besitzt sie eine RNase H Aktivität, die das mRNA-Template nach der cDNA-Synthese abbaut, so dass diese bei der Amplifikation (Bindung des dT<sub>16</sub>-Anchorprimers am poly-A tail) nicht stört. Eine anschließende cDNA-Säulenaufreinigung (siehe 2.5.3) mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben (Elution in 2 x 22,5 µl Tris-HCl [pH8], poolen) entfernt das Enzym, überschüssige Primer und den Puffer und bereitet so die Tailreaktion vor.

**Tailing:**

Um die anschließende Zweitstrangsynthese und die PCR effektiv und ohne Umpuffern durchführen zu können, wurde die Tailingreaktion direkt im PCR-Reaktionspuffer durchgeführt.

Reaktionsansatz im 25µl-Masstab:

1x	PCR Puffer (Life Technologies, Karlsruhe)
37,5 nmol	MgCl <sub>2</sub>
5 nmol	dATP
18,25 µl	cDNA
ad 24,6 µl	DEPC Wasser
	94°C für 3 min denaturieren, dann auf Eis
+10 U	TdT (Roche, Mannheim)
	37°C für 30 min inkubieren
	70°C für 10 min inaktivieren, einfrieren

**Zweitstrangsynthese und 1. PCR:**

Es wird eine kombinierte Zweitstrangsynthese und PCR in einer Reaktion durchgeführt. Für die Zweitstrangsynthese ist zunächst eine niedrige Annealingtemperatur von 45-50°C erforderlich, damit der poly-dT Bereich des dT<sub>16</sub>-Anchorprimer binden kann. Um das

Aufeinanderfolgen der einzelnen Reaktionen zu gewährleisten und damit der Synthese unspezifischer Nebenprodukte vorzubeugen, werden die Primer für die PCR erst nach erfolgter Zweitstrangsynthese zugegeben. Die PCR-Amplifikation nach Standardprotokoll läuft dann bei höherer Annealingtemperatur unter spezifischeren Bedingungen ab, so dass die im Ansatz verbleibenden, überschüssigen dT<sub>16</sub>-Anchorprimer mit ihrem oligo-dT Ende nicht mehr binden und die Reaktion nicht beeinträchtigen können.

Zweitstrangsynthese (50 µl):

1x	Puffer (Life Technologies, Karlsruhe)
2 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,5 pmol	dT <sub>16</sub> Anchorprimer
10 nmol	dNTPs
1,5 U	Taq-Polymerase (Life Technologies, Karlsruhe)
ad 45 µl	DEPC-Wasser
ca. 50 µl	Ölüberschichten
5 µl	cDNA aus der Tailingreaktion

94°C-2 min//

Zweitstrang 94°C-1 min/50°C-2 min/72°C-3 min für 3 Zyklen

PCR:

+je 5 pmol	Primer Anchor, SP2
PCR	94°C-30 sec/61°C-1 min//72°C-3 min für 30 Zyklen// 72°C-25 min//∞4°C

## 2. PCR:

Aus der 1. PCR wird ein ein Aliquot in einer *nested*-PCR mit einem weiter innenliegenden SP3-Primer unter Standardbedingungen (siehe 1. PCR) amplifiziert.

1x	Puffer (Life Technologies, Karlsruhe)
2 mM	MgCl <sub>2</sub>
je 5 pmol	Anchorprimer, SP3
10 nmol	dNTPs
1,5 U	Taq-Polymerase (Life Technologies, Karlsruhe)
ad 49 µl	DEPC-Wasser
ca. 50 µl	Ölüberschichten
1 µl	PCR-Produkt (1:20-Verdünnung) aus der 1. PCR

94°C-2 min//94°C-30 sec/61°C-1 min/72°C-3 min für 40 Zyklen//72°C-25 min//∞4°C

Aus erster und zweiter PCR werden je 5 µl auf einem Agarosegel kontrolliert und die PCR-Produkte kloniert (siehe 2.5.2) und sequenziert (siehe 2.5.7).

## 2.6 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

### 2.6.1 Standardmethoden

Die Proteinarbeiten orientierten sich an den Standardprotokollen aus Sambrook *et al.* (1989). Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen erfolgten chromogen mittels Bradford-Reagenz (Protein-Assay 1:5 in dd-Wasser, BioRad, München) durch Bestimmung der OD<sub>578</sub> im Photometer und anschliessender Interpretation anhand einer zuvor erstellten BSA-Eichkurve (Bradford, 1976). Proteinfällung zur Volumenreduktion erfolgte durch 1:1-Versetzen der Probe mit 10% Trichloressigsäure (TCA), einstündiges Einfrieren bei -20°C und anschliessendes Pelletieren (20 000 g für 15 min bei 4°C). Protein-Lösungen wurden auf Eis gehalten und bei -20°C gelagert.

#### Proteinnachweis

Zur Detektion bestimmter Proteine wurde unter denaturierenden Bedingungen (Mercaptoethanol) ein Zellysat oder Proteinextrakt elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE, siehe 2.6.2). Überexprimierte Proteine sollten dann direkt im Gel mittels Färbung zu detektieren sein, identifiziert nach Grösse anhand eines Längenstandards. Entweder wurde irreversibel gefärbt mit Coomassie-Blau-R250 (Serva, Heidelberg; nach Sambrook *et al.*, 1989) bzw. Silberfärbung (siehe unten) oder reversibel mit E-Zinc™ (Pierce, Bonn) zur weiteren Verwendung der Gele im Western-blot.

Die überexprimierten Proteine waren entweder mit einem Oligohistidin-Tag und einem c-myc-Epitop (pTrcHis2-Vektor, beim T7-Vektor ein V5-Epitop) doppelt oder als GST-Fusionsprotein einfach markiert und konnten mithilfe entsprechender gerichteter Antikörper (siehe Tab. 1) im Western-blot (siehe 2.6.2) spezifisch nachgewiesen werden.

#### Silberfärbung:

40 min(-2h)	Gel fixieren, mehrfach wechseln
20 min	in 30% EtOH waschen, 3x wechseln
45-60 sec	imprägnieren, stark schütteln
3x1 min	sofort in Demin-Wasser waschen
20-60 min	in Silbernitratlösung inkubieren
3x1 min	gründlich in Demin-Wasser waschen
	Entwickler zugeben, sofort wechseln
	bei sichtbaren Banden mit Demin-Wasser abstoppen
10 min	fixieren,
	lagern in Wasser

Fixierer (kühlen):

50%	Methanol
12%	Essigsäure

Imprägnierlösung (frisch ansetzen):

150 ml	demin-Wasser
100 µl	37%ige Formaldehydlösung
75 µl	43%ige Natriumthiosulfatlösung

Silbernitratlösung (frisch ansetzen):

150 ml	0,2%ige Silbernitratlösung
100 µl	37%ige Formaldehydlösung

Entwickler (frisch ansetzen):

250 ml	6%ige Natriumcarbonatlösung
2,5 µl	43%ige Natriumthiosulfatlösung
125 µl	37%ige Formaldehydlösung

## 2.6.2 Western-blot

### Denaturierende Gele

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden unter Verwendung der Gelapparatur Mini Protean® II (71 x 102 x 0,75 mm) von BioRad (München) 10-15%ige denaturierende SDS-PA-Gele (PAGE) bei 15 mA/Gel gefahren.

Trenngel:

10-15%	30%iges PAA (30% / 0,8%)
1x	Tris-HCl / SDS (pH 8,8) (4x=1,5 mM Tris-HCl / 0,4% SDS)
ad 11,3 ml	dd-Wasser
50 µl	10% APS
8 µl	TEMED

Sammelgel (reicht bis ca. 5 mm unterhalb der Taschen):

4%	30%iges PAA (30% / 0,8%)
1x	Tris-HCl / SDS (pH 6,8) (4x=0,5 mM Tris-HCl / 0,4% SDS)
ad 7,5 ml	dd-Wasser
37 µl	10% APS
10 µl	TEMED

5x Laufpuffer:

35,28 g	Glycin
56,85 g	Tris
2,5 g	SDS
ad 0,5 l	dd-Wasser



## 3x Ladepuffer:

50 mM	Tris
0,15 M	NaCl
1%	NP-40
	pH 7,4 einstellen
0,25 TIU/ml	Aprotinin
30 µg/ml	DNase
0,5 mM	PMSF (Phenylmethylnsulphonylfluorid)
1 mM	EDTA
2 µg/ml	Leupeptin

## Elektrophorese:

1x Vol	denaturierender 3x Ladepuffer
2x Vol	Proteinlösung/Zellysat/Längenstandard
	94°C für 10 min denaturieren, dann Eis
	auf das Gel (unter 1x Laufpuffer) laden
	15 mA/Gel für ca 2 h

Anschliessend wurde eine Ladekontrolle mittels E-Zinc™-, Coomassie- oder Silberfärbung (siehe 2.6.1) durchgeführt, wobei für die letztere beiden irreversiblen Färbungen ein gesondertes, identisch präpariertes Gel zum Blotten benötigt wurde.

**Blotten**

Nach dem vollständigen Entfärben der Gele (E-Zinc™, Ponceau S) wurden die Proteine im Nassblotverfahren auf Nitrozellulosemembranen (Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Die durch das SDS negativ aufgeladenen Proteine wandern im elektischen Spannungsfeld zur Anode (+ Pol), so dass die Membran entsprechend positioniert sein muss: Auf der Anodenseite wurde in Blotpuffer getränkt ein Schwamm, ein Filterpapier, die Nitrocellulosemembran, das Gel, noch ein Filterpapier und abschliessend ein weiterer Schwamm in den Rahmen eingelegt und in den Tank überführt. Die Vollständigkeit des Transfers wurde anhand eines gefärbten Molekulargewichtsstandards bzw. Ponceau S-Färbung (Sigma, Deisenhofen) (nach Sambrook *et al.*, 1989) visuell überprüft.

## Blotpuffer:

20%	Methanol
3 g	Tris
14,4 g	Glycin
ad 1 l	dd-Wasser
	2 h bei 300 mA blotten

## Antikörperbindung und Detektion

	Gel direkt nach dem Blotten entnehmen
PBS	5 min schwenken
3% BSA in PBS	1 h blocken
alternativ	1 h in 5% Milchpulver in PBS blocken
+1. Antikörper	1:1000 bis 1:10 000 (siehe Tab. 1) für 1 h inkubieren
PBS-T	3x für 5 min waschen (PBS-T=1‰ Tween 20 in PBS)
2. $\alpha$ -HRP-Konjugat	1:2000 bis 1:12 500 (siehe Tab. 1) in 3% BSA in PBS für 45 min inkubieren
PBS-T	3x für 5 min waschen
ca. 2-4 ml	ECL-Substrat (40:1) für 1 min inkubieren
	Blot abtupfen, in Folie einschlagen
	0,5-5 min in Röntgenkassette auf Kodakfilm-MR exponieren

### 2.6.3 Expressions-Klonierung

#### Strategie

Die Herstellung der Fusionsproteine sollte der Produktion von Antisera dienen. Die Immunisierung erfolgt dabei gegen kurze Epitope der Aminosäuresequenz und ist daher nicht auf eine intakte Quartärstruktur der Proteine angewiesen, was die einfachere Expression in Prokaryonten und anschließende Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen anbot (siehe 2.6.4), unter denen die zur Isolation verwendeten Tags zudem sicher zugänglich sind. Zusätzlich besteht unter diesen Bedingungen Schutz vor Proteaseeinwirkungen.

Zur Proteinmarkierung wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurde die His-Tag Strategie gewählt, bei der das Gen durch Klonierung in einen TOPO™ TA Cloning® Expressionsvektor bei der anschließenden Expression in *E. coli* (Stamm: TOP 10 oder alternativ XL-1 Blue) mit einem C-terminalen 6x Histidinschwanz versehen wird und im weiteren durch Metall-Affinitäts-Chromatographie (Nickel-NTA-Matrix, Qiagen) aufgereinigt werden kann. Der andere Ansatz verfolgt die Fusions-synthese mit einer N-terminalen GST-Domäne (pGEX-KG-Vektor), so dass das Protein mit einem dagegen gerichteten matrix-gekoppeltem  $\alpha$ -GST Antikörper säulenchromatographisch aufzureinigen ist.

Das als kaum immunogen geltende, relativ kurze 6x Histidin-Tag kann bei der angestrebten Immunisierung vernachlässigt werden, so dass das aufgereinigte Protein nicht weiter bearbeitet zu werden braucht. Auch die GST-Domäne am GST-Fusionsprotein wird zur Immunisierung aufgrund geringer Immunogenität belassen (Dr. I. Augustin, persönliche Mitteilung, siehe Augustin *et al.*, 1999).

In beiden Fällen wird das Protein fusioniert durch die exakte Einklonierung des translatierten cDNA-Abschnitts (ORF ab Startcodon) in das Leseraster des Vektors. Dazu wurden entsprechende Primer konzipiert.

### **Primerdesign**

(siehe Tab. 3: PCR-Primer)

Der verwendete pTrcHis2-TOPO™ TA Cloning® His-Tag-Vektor (Invitrogen) mit C-terminaler Oligohistidinregion trug sowohl Start- als auch Stopcodon. Entsprechend wurde der Forwardprimer exklusiv des Startcodons direkt mit Beginn des zweiten Codons positioniert, ebenso der Reverseprimer exklusiv des Stopcodons bis zum vorletzten Codon des ORF. Zum Teil waren dabei Mutationen zur Vermeidung von Sekundärstrukturen erforderlich. Gemischte Basen (Wobble) wurden zur Anpassung der Sequenz an unterschiedliche Spezies eingesetzt.

Alternativ verwendet wurde der pCR®T7-CT-TOPO™ TA Cloning® His-Tag-Vektor (Invitrogen), ebenfalls mit C-terminaler Oligohistidinregion. Dieser Vektor ermöglicht die Proteinexpression unter dem potenteren T7-Promoter. Da dieser Vektor kein Startcodon beinhaltet, wurden die zuvor konzipierten Forwardprimer 5'-ständig um ATG-verlängert, die Reverseprimer konnten unverändert eingesetzt werden.

Sowohl Start- und Stopcodon befanden sich auf dem pGEX-KG Vektor (Pharmacia Biotech, Freiburg). Zur gerichteten Klonierung via kohäsive Enden in die multicloning-Sequenz des Vektors wurden Primer konzipiert, die auf dem Forwardprimer eine *Xba* I-Schnittstelle und auf dem Reverseprimer eine *Xho* I-Schnittstelle trugen. Nach der Forwardschnittstelle wurde zur Überleitung in das Leseraster eine Auffüllbase eingesetzt. Die Primer erhielten zusätzlich eine 5 bp 5'-Extension mit zufälliger Basenabfolge aber unter Vermeidung von Sekundärstrukturen, um ein nicht randständiges, effektives Schneiden der Restriktionsenzyme zu ermöglichen.

### **Klonierung**

Für die PCR-Amplifikation wurde zur Vermeidung von Punktmutationen ein *Taq*-Polymerasegemisch mit Fehlerkorrektur (Synergy-*Taq*, GeneCraft) nach Standardprotokoll (siehe 2.5.6) eingesetzt.

Die Ligation und Klonierung der TOPO™ TA-basierten Vektoren entsprach dem unter 2.5.2 beschriebenen Protokoll.

Zur T7-promoterbasierten Expression mussten die zunächst in TOP 10-Zellen propagierten Konstrukte ein zweites Mal in den BL21(DE3)pLysS-Zellstamm transformiert werden, da dieser Stamm keine stabile Kultivierung gewährleistet. Dazu reichte es aus, den Transformationsansatz mit einer Pipettenspitze aufgereinigter Plasmidlösung nach Protokoll zu infizieren.

Die GST-basierten Konstrukte wurden klassisch über kohesive Enden gerichtet ligiert. Zunächst wurden dazu die PCR-Produkte über eine Säule aufgereinigt (MoBiTec, siehe 2.5.3) und dem GST-Vektor (via Plasmidprep synthetisiert) entsprechend einzeln per Doppelverdau präpariert (*Xba* I und *Xho* I über Nacht zum Ausgleich reduzierter Effizienzen endständigen Verdau, dabei Thermoisolation gegen Kondensation erforderlich, anschliessend 65°C für 10 min Hitzeinaktivierung) und auf dem Agarosegel kontrolliert. Nach einer abermaligen Säulenaufreinigung wurden Insert und Vektor im stöchiometrischen Verhältnis von 2:1 zusammengegeben, bei 56°C für 10 min denaturiert und auf Eis überführt, bevor sie im 10 µl-Masstab (0,1-1 µg gesamt-DNA) mit T4-Ligase (Promega, Mannheim) über Nacht ligiert wurden. Zur Erzielung der optimalen Reaktionstemperatur wurde ein zeitlicher Temperaturgradient von RT auf 6°C eingesetzt (z.B. isoliertes Wasserbad im Kühlschrank). Transformation und Screening-PCR (Primer pGEX F/R) entsprachen dem Protokoll unter 2.5.2.

#### **2.6.4 Proteinextraktion aus *E. coli***

##### **Gesamtprotein-Zellysat**

Die Überprüfung der Klone auf Überexpression erfolgte durch SDS-PAGE-Analyse (E-Zinc™-, Coomassie- oder Silberfärbung) bzw. Western-blot (siehe 2.6.2) eines Gesamtproteinzellysats. Die Zellanzucht erfolgte in Vorkultur über Nacht. Daraus wurden die eigentlichen Expressionskulturen 1:20–1:100 angeimpft. Nach Erreichen einer OD von 0,8 (entspricht exponentiell wachsenden Zellen) wurden die Kulturen mit 1 mM IPTG zur Proteinexpression stimuliert. Durch Vorversuche mit einer Zeitreihe 0-24 h wurde der maximale Expressionszeitraum bestimmt. Als durchschnittlicher Standardwert erwies sich ein Zeitraum von 3 h. Anschliessend wurden die Zellen pelletiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

Die Zellyse erfolgte durch Auflösen und 10 minütiges Kochen des Pellets in einer Lösung aus einem Teil stark denaturierendem 3x Ladepuffer (siehe 2.6.2) und zwei Teilen denaturie-

renden Lysepuffers ‚B‘ (8 M Urea, pH 8, siehe unten). Für ein Zellpellet aus 2 ml Kultur wurden 240 µl verwendet und davon etwa 4-8 µl Lysat auf das PAA-Gel geladen.

### His-Tag

Lysatherstellung zur Aufreinigung:

Unter Verwendung des QIAexpress Proteinaufreinigungssystems (Qiagen) wurde nach den zugehörigen Protokollen des Herstellers zunächst ein Gesamtproteinlysate unter denaturierenden Bedingungen hergestellt.

- 5 ml Lysepuffer B je g Zellpellet (nass)  
auf Eis auftauen und Zellen durch vortexen lysieren  
1 h auf Eis inkubieren, alle 5 min vortexen
- optional Ultraschallstab bei 70 W für 1 min DNA scheren  
für 30 min bei 10 000 g pelletieren  
klares Proteinlysate abnehmen

Lysepuffer B (pH 8):

Waschpuffer C (pH 6,3):

Elutionspuffer E (pH 4,5):

- 8 M Urea
- 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 0,01 M Tris-HCl
- optional 1% Triton X-100
- 2 mM Imidazol
- Zusatz zu B Proteaseinhibitoren, je nach Protein
- z.B. 100 µg/ml Aprotinin
- 0,5 mM PMSF
- pH-Werte frisch einstellen mit HCl

Lysepuffer A alternativ (pH 8):

- 6 M GuHCl
- 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 0,01 M Tris-HCl

Elutionspuffer E alternativ (pH 4,5-7):

- zusätzlich 150 mM Imidazol

### Aufreinigung:

Aus den Proteinlysaten wurden die Histidin-markierten Proteine im Batchverfahren (Ni-NTA-Agarose/Proteinlysatzgemisch für 1,5 h bei 4°C schwenken) Metallchelate-Affinitätschromatographisch an das Säulenmaterial (1 ml, Bindekapazität 5-10 mg Protein) gebunden und in Säulen überführt. Dabei ist das Nickel<sup>2+</sup>-Ion als Zentralatom eines Chelatkomplexes über 4 seiner 6 Bindungsstellen mit NTA (Nitrilotriacetic Acid) an die Matrix (Sephrose) verknüpft und bindet über die zwei freien Bindungsstellen zwei benachbarte Histidinreste des Proteintags. Diese Verknüpfung kann entweder durch Senkung des pH-Wertes gelöst werden oder die Histidine durch überschüssig zugegebenes Imidazol aus dem Komplex kompetitiv verdrängt werden. Die Säulen wurden dann mit 10 Volumen Waschpuffer ‚C‘ im Gravitationsdurchfluss von nicht gebundenen Proteinen gereinigt und anschließend gebundene Proteine mit 4 Volumen Elutionspuffer ‚E‘ in etwa 5 Fraktionen eluiert und eingefroren, sowie photometrisch quantifiziert (siehe 2.6.1). Von sämtlichen Schritten wurden Proben für die spätere Kontrolle im SDS-PAGE/Western-blot (siehe 2.6.2) genommen.

## 2.7 BIOINFORMATISCHE METHODEN

### 2.7.1 Software und Datenbanken

Genauso selbstverständlich wie den Zugang zu den wissenschaftlichen Datenbanken bietet das Internet überwiegend kostenlos eine Fülle von *tools* und Software (z.T. als Demoversionen kommerzieller Software). Nach Möglichkeit wurden entsprechende *links* angegeben.

**Tab. 7: Software, Tools, Datenbanken**

<b>Software</b>	<b>Software, Bezugsquelle</b>
Grafik	Corel DRAW 8.232, © 1997, Corel Corporation Adobe Photoshop 5.5, © 1989-99, Adobe systems Inc.
Literaturverwaltung	EndNote 3.0.2 © 1988-98, <a href="http://www.niles.com">http://www.niles.com</a>
Primerdesign	Primer Designer 2.0, © 1990, 91 Scientific & Educational Software OK 74104 USA
Restriktionskarten	Clone Manager 3.11, © 1989, 90, 91 Scientific & Educational Software
Sequenzeditieren	Chromas 1.56, © 1998-99, <a href="http://www.technelysium.com.au/chromas.html">http://www.technelysium.com.au/chromas.html</a>
Sequenzierung	Sequence Navigator 2.1 (MacIntosh), PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Sequenzsubmission	Sequin 3.70, Standard Release, <a href="http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html">http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html</a>
Statistik	Statistica für Windows, Version 5.1.; Stat. Software, Inc. 1984-96, 2300 East 14 <sup>th</sup> Street, Tulsa
Textverarbeitung	MS Office 97 SR2 unter Windows 98, zweite Ausgabe, <a href="http://www.microsoft.com/">http://www.microsoft.com/</a>
Translation	Gene Runner Version 1.12, Hastings Software, Inc. 1992, 1993
<b>Tool</b>	<b>Internetadresse</b>
Primerdesign	<a href="http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi">http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi</a>
Protein- /Nukleotidalignment	<a href="http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html">http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html</a>
genomische Organisation	<a href="http://www.sanger.ac.uk/Software/Wise2/genewiseform.shtml">http://www.sanger.ac.uk/Software/Wise2/genewiseform.shtml</a>
Protein- Strukturprediktion	<a href="http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/struc-predict.html">http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/struc-predict.html</a> <a href="http://www.cmpharm.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html">http://www.cmpharm.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html</a> <a href="http://www.ch.embnet.org/">http://www.ch.embnet.org/</a>
Proteinprediktion subzell. Lokalisation	<a href="http://predict.sanger.ac.uk/nnpsl/">http://predict.sanger.ac.uk/nnpsl/</a>
<b>Datenbank</b>	<b>Internetadresse</b>
ATCC	<a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a>
Bodymap EST-DB	<a href="http://bodymap.ims.u-tokyo.ac.jp/">http://bodymap.ims.u-tokyo.ac.jp/</a>
Digitaler DD (DDD)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ddd.cgi?ORG=Hs">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ddd.cgi?ORG=Hs</a>
Genecards	<a href="http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards/">http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards/</a>
Medline	<a href="http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>
Nukleotid/Protein- DB	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?Jform=1">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?Jform=1</a> <a href="http://www.bork.embl-heidelberg.de:8080/Blast2/">http://www.bork.embl-heidelberg.de:8080/Blast2/</a>
OST-DB	<a href="http://omnibank.lexgen.com/lexdb-bin/obdemo?OB_SEQUENCE_SEARCH=1">http://omnibank.lexgen.com/lexdb-bin/obdemo?OB_SEQUENCE_SEARCH=1</a>
RZPD	<a href="http://www.rzpd.de/">http://www.rzpd.de/</a>
SAGE-DB	<a href="http://www.sagenet.org/">http://www.sagenet.org/</a> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/</a>
Tool-Hyperlinks	<a href="http://www.public.iastate.edu/~pedro/rt_all.html">http://www.public.iastate.edu/~pedro/rt_all.html</a>

### 2.7.2 EST-Integration

Mit den Sequenzen der im Northern-blot verifizierten DD-Fragmente wurde ein Abgleich gegen die Nukleotidbanken vom NCBI oder EMBL unter Verwendung des BLAST-Algorithmus durchgeführt (siehe 2.7.1). Unter Berücksichtigung der Speziesgrenze zwischen bovinen DD-Sequenzen und den verfügbaren humanen oder murinen EST-DB wurde eine Sequenz mit etwa 70% oder mehr Übereinstimmung über die gesamte Länge als homolog gesetzt.

Für neue, unbekannte Gene, die nur zu EST-Sequenzen Homologien zeigten, wurde versucht, aus den DB die Gesamtsequenz abzuleiten. Unter Verwendung des BLAST-Algorithmus wurden möglichst mehrere homologe ESTs gesucht, die über die bekannten Grenzen der Sequenz hinausgingen. Ausgehend von den neuen Enden wurde das Gen sukzessive komplettiert, indem die gefundenen EST unter Verwendung des Multialignprogrammes (siehe 2.7.1) zu einer Konsensussequenz zusammengesetzt wurden. Dabei galt das Northern-blot-signal als Richtlinie für die Sequenzgröße des Gens, ein ORF mit Start- und Stopcodon als Grundlage für eine putative Aminosäuresequenz. Diese AS-Sequenz wurde mithilfe des Programmes Genrunner deduziert und ihrerseits wieder gegen die Proteindatenbanken von NCBI und EMBL abgeglichen.

Als teilweise hilfreich erwies sich die gegen Ende der Arbeit zugängliche humane Consensus-DB des RZPD, welche durch Software automatisiert integrierte ESTs beinhaltet und eine BLAST-Suche ermöglicht.



### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 DIFFERENTIAL DISPLAY-STRATEGIE

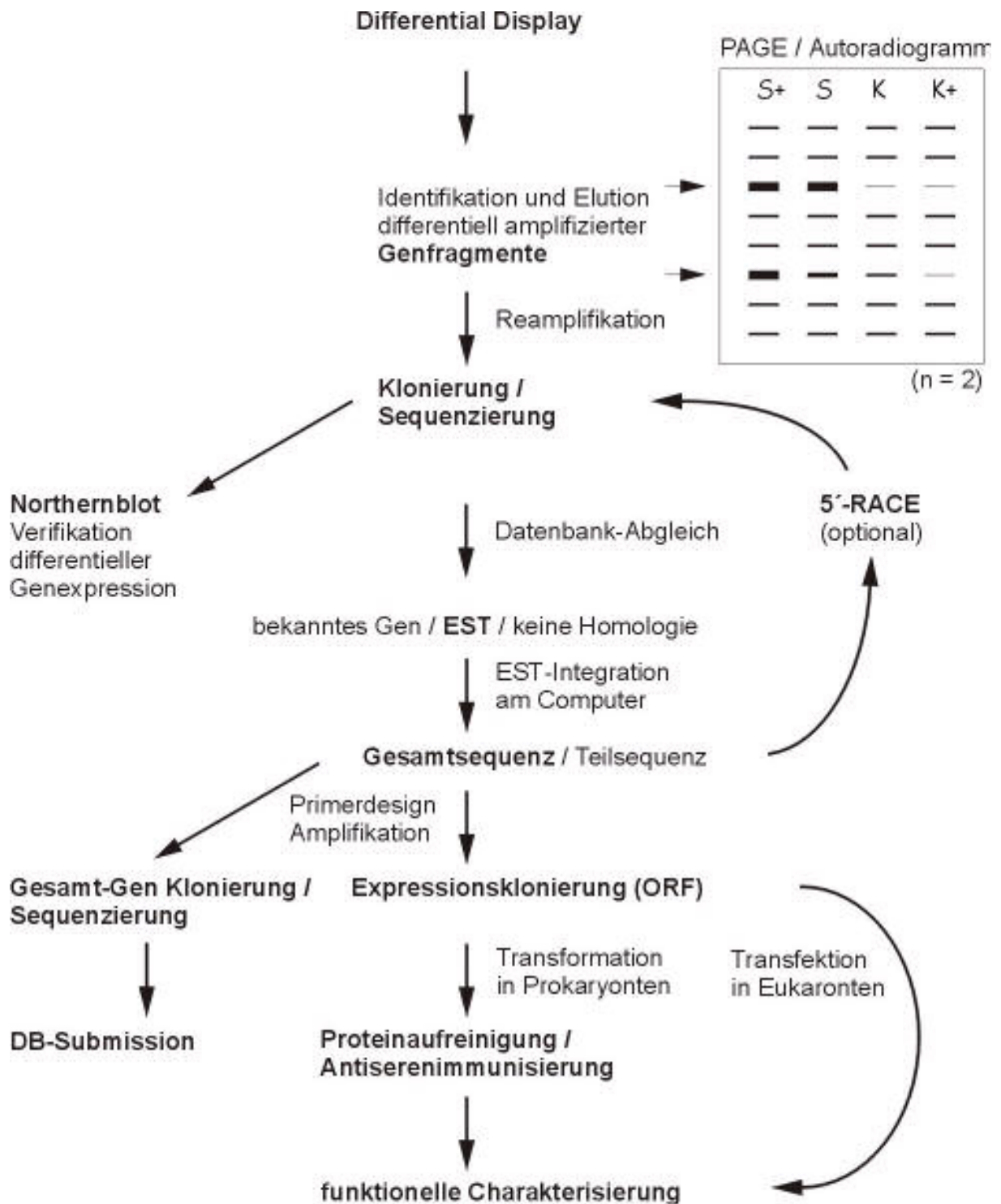


Abb. 3: DD-Strategie - Identifikation / Isolation differentiell exprimierter Gene

Differential Display (DD) ist eine Methode zum Vergleich der relativen Genexpression verschiedener Zellpopulationen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation relevanter Moleküle des angiogenen, also aktivierten Phänotyps von kultivierten Endothelzellen als *in vitro* Angiogenesemodell, schematisch dargestellt in Abb. 3. Im Vergleich der relativen Genexpression von vier verschiedenen BAEC-Zellpopulationen (subkonfluent-aktiviert versus konfluent-ruhend, siehe Tab. 6) mittels DD wurden die in aktivierten Zellen hochregulierten Genfragmente identifiziert, aus dem PAA-Gel ausgeschnitten, eluiert und reamplifiziert (siehe 2.5.8). Die mittels Klonierung aus den Reamplifikaten isolierten Genfragmente wurden vor einer weiteren Bearbeitung zusätzlich im Northern-blot auf Regulation verifiziert. Verifizierte Genfragmente wurden sequenziert und zur Identifikation gegen die Gendatenbanken abgeglichen. Für neue, unbekannte Gene mit EST-Homologie wurde am Computer versucht, durch Integration überlappender ESTs die Gesamtsequenz und daraus einen ORF zu erschliessen (siehe 2.7.2). Gelingt dies, wurden daraus Primer abgeleitet (siehe Liste 2.2.4) und die Gene möglichst vollständig kloniert und sequenziert. Auf diese Weise wurde die korrekte Integration der EST-Sequenzen überprüft.

Zur weiteren Charakterisierung der isolierten Gene (dargestellt in Tab. 8) waren die Expressionsmuster in verschiedenen Zelllinien sowie adulten und fetalen Geweben mittels PCR und per Northern-blot (MTN) zu erheben. Genauere Lokalisation der Expression sollten *in situ* Hybridisierungs-Experimente. Schliesslich waren Expressionsklonierungen durchzuführen (siehe 2.6.3), um durch Proteinüberexpression und Proteinaufreinigung (siehe 2.6.4) polyklonale Antiseren gegen diese Moleküle herstellen zu können. Mit diesen lässt sich einerseits die Expression auch auf Proteinebene ermitteln, wobei die Antiseren zum spezifischen Nachweis erforderlich sind (Western-blot, ELISA, Immunhistochemie). Aber auch Auswirkungen von Veränderungen der Proteinkonzentrationen auf spezifisch angiogene Vitalfunktionen von Endothelzellen wie Migration, Chemotaxis, Proliferation und In-gel-Angiogenese sowie die Auswirkungen der Proteine auf die Expression anderer Moleküle sollten im weiteren Verlauf adressiert werden: Zum einen durch exogene Zugabe des Proteins bzw. seines Antikörpers in das Zellkulturmedium. Durch entsprechende Mediumkonditionierung lässt sich auch die Abhängigkeit der jeweiligen Proteinexpression von bekannten Angiogeneseregulatoren ermitteln. Zum anderen, ebenfalls in der Zellkultur, lässt sich eine endogene Variation der Proteinkonzentration erzielen. Hierfür waren zur eukaryontischen

Überexpression einiger Proteine durch Transfektionsexperimente entsprechende Vektor-konstrukte zu klonieren, (die je nach verwendetem Zelltyp eine transiente oder stabile Transfektion ermöglichen). Umgekehrt ist eine Reduzierung der Expression durch Knockout-experimente möglich. Ein elegantes Verfahren bietet eine gewerbliche Knockoutbank mit mehreren tausend Zelllinien, deren jeweils randomisiert ausgeschaltetes Gen durch Sequenzierung identifiziert wurde, und die in einer Omnibank-Sequence-Tag (OST)-Datenbank zusammengefasst sind (Zambrowicz *et al.*, 1998; *link* siehe 2.7.1). So lässt sich eine homologe Knockout-Zelllinie zum untersuchten Molekül via BLAST-Suche ermitteln.

**Tab. 8: DD-Strategie - Charakterisierung differentiell exprimierter Gene**

<b>Expressionsmuster differentiell exprimierter Gene</b>			
<b>Gen</b>	<b>PCR-Screening</b> div. physiologische Zelllinien (hum) Tumorzelllinien (hum)	<b>Northern-blot</b> adult/fetal (Maus) div. Organgewebe (Rind) Ovarstadien (Rind)	<b>in situ-Hybridisierung</b> Gesamtembryo (Maus) div. Organgewebe
<b>Protein</b>	<b>ELISA</b>	<b>Western-blot</b>	<b>Immunhistochemie</b>
<b>Funktion differentiell exprimierter Gene</b>			
<b>Expression</b>	<b>+ / –</b>		<b>Charakterisierung in vitro (Zellkultur)</b>
<b>exogen (Protein)</b>	Mediumkonditionierung durch Proteinzugabe		<b>-Migration -Proliferation -Chemotaxis -In-gel-Angiogenese (Sphäroide) -Expressionsmuster anderer Moleküle</b>
	Mediumkonditionierung durch Antikörperzugabe		
<b>endogen (Gen)</b>	Überexpression durch Transfektion		
	Geninaktivierung durch Knockout		

### 3.2 DIFFERENTIAL DISPLAY

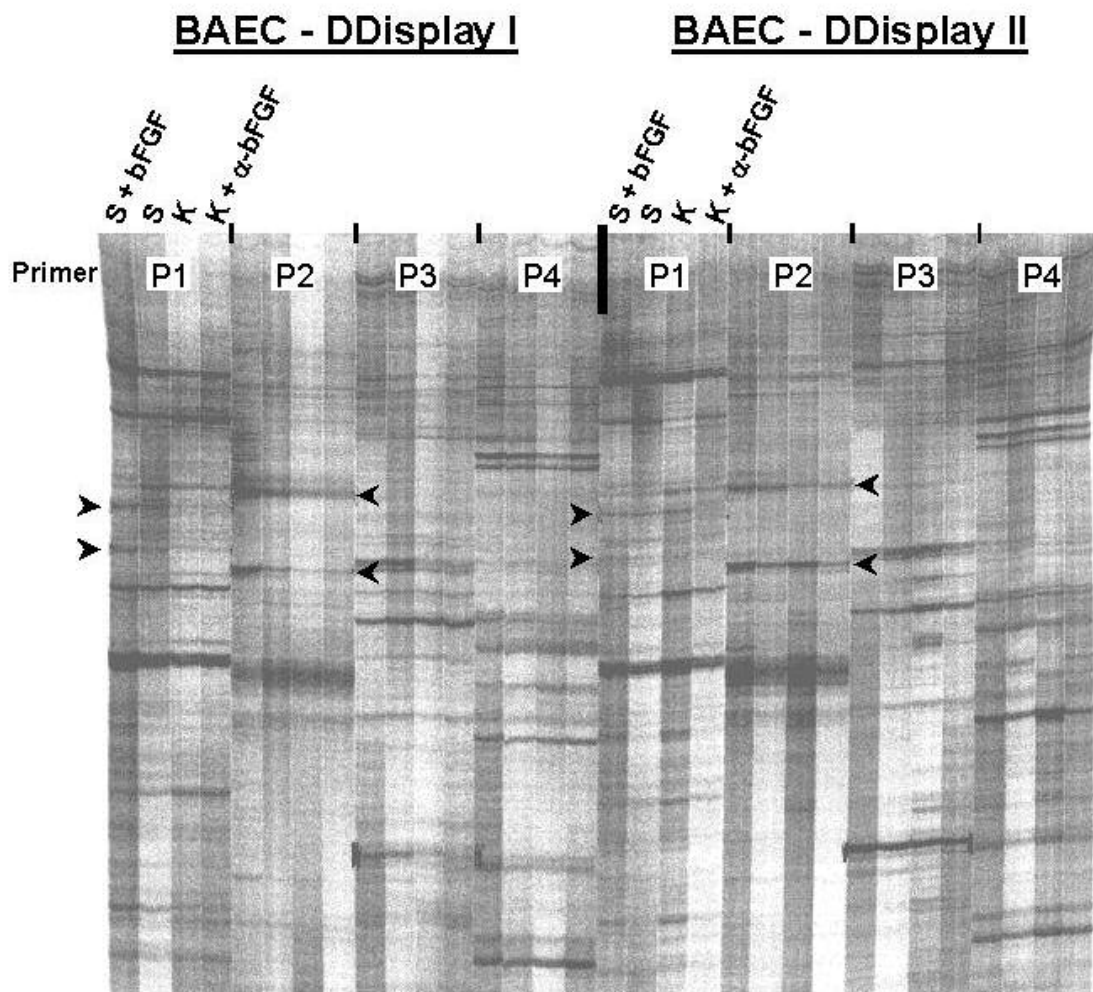
In der vorliegenden Arbeit wurden gemäss der Fragestellung aktivierte Gene angiogener Endothelzellen selektiert, also deren Hochregulation zum Suchkriterium erhoben. Dazu wurden bovine Aorten-Endothelzellen (BAEC) verwendet, da sich diese in Vorversuchen im Vergleich zu humanen (HUVEC) als vergleichsweise stärker reguliert und stimulierbarer erwiesen und überdies leichter zu kultivieren und länger zu passagieren waren (vgl. Augustin

Voss *et al.*, 1993). Einer zusätzlichen internen Referenz entsprechend wurden vier verschiedene BAEC-Zellpopulationen miteinander verglichen (Tab. 6): Je zwei ruhende (K, konfluent) mit zwei aktivierten (S, subkonfluent), wobei im Sinne einer Maximierung der Genregulation eine aktivierte Population zusätzlich mit dem Angiogenesestimulanz bFGF induziert (S+), eine ruhende Population mit einem funktionsneutralisierendem Antikörper gegen bFGF inhibiert wurde (K+).

Um präparative und biologische Varianzen auszuschliessen, wurden nur unabhängig reproduzierte Signalveränderungen berücksichtigt ( $n = 2$ ), deren Signalverlauf zudem noch stetig verlief, also sich die aktiven und ruhenden Populationen gleichläufig verhielten. Dabei ergaben sich für die beiden aktiven respektive beiden ruhenden Zellpopulationen jeweils gleichartige Signalintensitäten. Kontinuierliche Signalverläufe, wie etwa eine abnehmende Signalstärke von aktiverem zu ruhenderem Zustand, wurden selten beobachtet.

Abb. 4 zeigt exemplarisch eine Autoradiographie eines PAA-Gels, in dem mit  $^{35}\text{S}$ -markierte Amplifikate verschiedener P/T-Primerkombinationen aus zwei unabhängigen Experimenten im Vergleich aufgetragen wurden.

Sämtliche der 90 möglichen Zweierkombinationen aus P- und T-Primern wurden durchgeführt und 76 dieser Kombinationen mindestens einmal unabhängig reproduziert. Dazu wurde die RNA von insgesamt 4 unabhängig voneinander angezogenen Zellpopulationen verwendet, jeweils in die verschiedenen Konditionierungen unterteilt. Die etwa 100 Banden je Bahn des untersuchten Grössenbereichs von 300-1.300 bp ergeben 9.000 im reproduzierten Vierervergleich untersuchte Banden, insgesamt ungefähr 72.000 Einzelbanden.



#### Abb. 4: DD-Gel

Die angegebenen P-Primer waren hier mit dem T9-Primer kombiniert. Die Pfeile deuten auf vier verschiedene, in beiden Experimenten in den verglichenen BAEC-Populationen differenziell exprimierte Amplifikationsprodukte (74-1 bis 74-4, spaltenweise von oben), die nach Gelexcision reamplifiziert und kloniert wurden (vgl. Abb. 5).

### 3.2.1 Isolierung und Verifikation

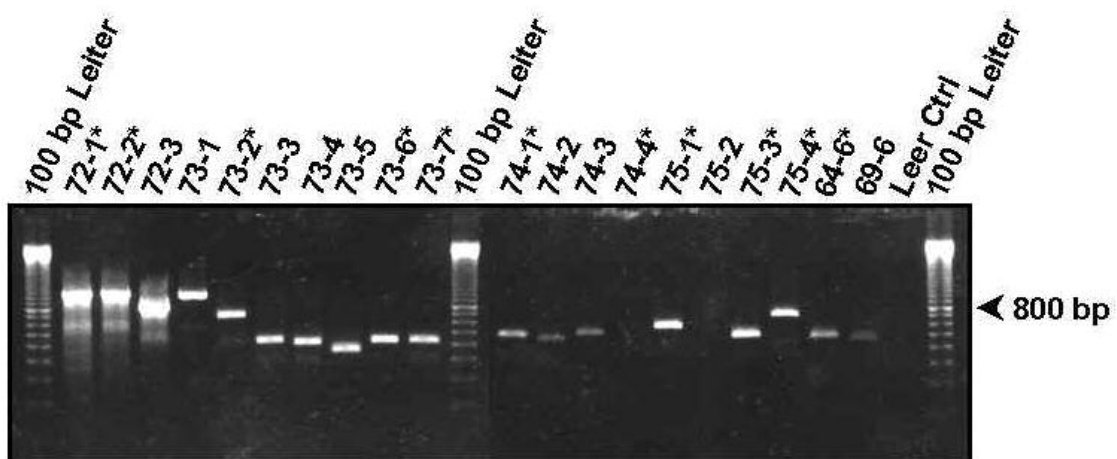
#### Reamplifikation und Klonierung differenziell amplifizierter cDNA-Fragmente

Aus dem Gel geschnittene Genfragmente wurden mit der gleichen P/T-Primerkombination wie im DD reamplifiziert. Falls notwendig, wurden die PCR-Bedingungen (Annealingtemperatur,  $MgCl_2$ -Konzentration, Zyklenzahl) so optimiert, dass sich ein spezifisches Produkt der entsprechenden Grösse amplifizieren liess.

Von insgesamt 107 reproduzierten Banden, die ausgeschnitten wurden, liessen sich 86 sowohl reamplifizieren als auch klonieren. Davon liessen sich 75 Genfragmente (87%) im Northern-blot detektieren. Für 47 dieser Genfragmente konnte im Northern-blot eine regulierte Expression bestätigt werden, das entspricht 55% der reamplifizierten Fragmente.

Da zunächst in aktivierten Zellen (BAEC<sub>s</sub>) auch herunterregulierte Genfragmente isoliert wurden, reduziert sich die Zahl der verifizierten hochregulierten Genfragmente auf 41 von 76 reamplifizierten, entsprechend 54%.

- 107 regulierte Banden reproduziert und ausgeschnitten
- davon 86 Genfragmente reamplifiziert und kloniert
- davon 75 Genfragmente im Northern-blot detektiert = 87%
- insg. 47 regulierte Fragmente (verifiziert im Northern-blot) von 86 = 55%
- bestehend aus:
  - 41 hochregulierte Fragmente (in BAEC<sub>s</sub>) von 76 = 54%
  - 6 herunterregulierte Fragmente (in BAEC<sub>s</sub>) von 10 = 60%



#### Abb. 5: Reamplifikation der eluierten DD-PCR-Fragmente

Abgebildet ist eine Serie von Reamplifikaten des bearbeiteten Grössenspektrums, die aus Bandeneluaten mittels der ursprünglichen Primerkombination wie im DD hergestellt wurden. Aus den gekennzeichneten (\*) Produkten liessen sich Klone differenziell exprimierter Gene isolieren. Sie sind in Tab. 9 und Tab. 10 aufgeführt. Fragment 74-4 liess sich in einer späteren, optimierten PCR reamplifizieren, die beiden 69 er Fragmente erwiesen sich hier nach einem optimiertem Protokoll als reamplifizierbar, im Gegensatz zu 75-2.

Für die überwiegende Anzahl der klonierten Fragmente fand sich nur ein Klon mit einer dem Reamplifikat entsprechenden Grösse. Die maximale Anzahl verschiedener Klone gleicher Grösse, die auf ein Reamplifikat zurückzuführen war, betrug 4.

### **Northern-blot**

Insgesamt 161 Northern-blots wurden zur Verifizierung der Regulation durchgeführt. Dies beinhaltet die direkte Verwendung von Reamplifikaten als Sonde, die Überprüfung verschiedener isolierter Klone sowie auch Wiederholungen von Experimenten. Die Grösse der identifizierten Gene variierte zwischen 0,8–10 kb. Die Ergebnisse der vergleichenden Northern-blots sind tabellarisch aufgelistet (siehe Tab. 9 und Tab. 10), beispielhafte Abbildungen der Autoradiographien sind im Abschnitt 3.4 aufgeführt.

## **3.3 IDENTIFIKATION DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE**

### **Sequenzierung**

Zur Sequenzierung war die vorherige Klonierung der Reamplifikate erforderlich. Sämtliche klonierte Genfragmente liessen sich sequenzieren, wobei die Sequenzierung nur für Northern-blot-verifizierte Moleküle durchgeführt wurde.

### **DB-Abgleich, EST-Integration**

Insgesamt 41 Gene oder Genfragmente liessen sich im Datenbankabgleich analysieren. Davon waren die Gene von 25 Klonen bekannt (siehe Tab. 9). Darin enthalten sind 6 Klone, die 4 Gene redundant identifizierten, teilweise in unterschiedlichen Sequenzbereichen, so dass sich insgesamt 19 Gene als bekannt herausstellten. Die übrigen 16 Klone kodierten für neue, unbekannte Gene (siehe Tab. 10). Nach dem letzten Aktualisierungsstand (97% des humanen Genoms identifiziert) ergibt sich für 14 der Genfragmente eine signifikante Homologie zu bekannten ESTs oder Genomsequenzen und lediglich für 2 Klone keinerlei Zuordnung. Für 5 dieser Kandidaten (siehe auch Gensteckbriefe 3.4) konnte die gesamte putativ kodierende Sequenz (cds) als offenes Leseraster (ORF) und die flankierenden UTRs (*untranslated regions*) aus ESTs (*expressed sequence-tags*) integriert werden. Eine vollständige cds besteht aus einem ORF, der mit einer Kozakkonsensussequenz beginnt (Translationsstartsignal, beinhaltet das Startcodon kodierend für Methionin) und bis zum Stopcodon für die Translation durchläuft. 5'- und 3'-UTRs (nicht translatierte mRNA Regionen) sind durch häufiges Auftreten von Stopcodons gekennzeichnet. Als Masstab für die mRNA-Gesamtsequenz wurde die jeweilige Grösse des Signals im Northern-blot als herangezogen.

Homologiekriterien: Innerhalb der gleichen Spezies wurde eine mehr als 95%ige Homologie gefordert. Eine signifikante Interspezies-Identität zwischen bovinen Klonen und i.d.R. humanen oder murinen Datenbanksequenzen wurde ab 70-75% Homologie definiert, je nachdem, ob sie sich gleichmässig über die volle Länge der Sequenz erstreckte oder nur auf Teilbereiche zutraf. Fanden sich Homologien zu genomischen Sequenzen, wurden auch Teilsequenzbereiche gewertet, da Exon- / Introngrenzen eine mögliche Erklärung dafür boten. Beim Zusammenfügen von ESTs zu einer kodierenden Sequenz zeigte sich, dass die Datenbanksequenzen häufig fehlerhaft waren, zumal es sich um Einzelsequenzierungen (*single reads*) handelte. Die Überlagerung mehrerer solcher ESTs brachte verschiedentlich keine eindeutige Konsensussequenz (Duplikationen, Deletionen oder Substitutionen einzelner Basenpaare), so dass im Zweifelsfall das offene Leseraster (ORF) zum Entscheidungskriterium gemacht wurde. Die Kontrolle durch anschliessende Gesamtgenamplifizierung und Sequenzierung bestätigte ausnahmslos derartige Plausibilitätsableitungen.

Da die DDs mit immer einem T-Primer amplifiziert wurden, der am Poly-A-Schwanz des Gens bindet und zudem die zugrundeliegende cDNA ausgehend von Poly-T-Primern synthetisiert wurde, stammten die identifizierten Sequenzen vorwiegend aus dem 3'-Endbereich der Gene. Für Caveolin 1 und ein 70 kD *heatshock* verwandtes Protein wurden neue 3'-UTR Sequenzen identifiziert.

### 3.3.1 Bekannte Gene

Verschiedene regulierte bekannte Gene konnten identifiziert werden, die sämtlich zu den mittel bis stark exprimierten gerechnet werden können (Ausnahme: Die erst nach Abschluss der experimentellen Arbeiten als hypothetisches Protein FLJ20276 identifizierten Klone 72-1-3 = 72-2-4).

Gemäss der Fragestellung der Arbeit „Identifikation neuer Gene“ wurde die Charakterisierung der bekannten Gene über einige initiale Experimente einer angiogenesebezogenen Auswahl (s.u.) hinaus nicht weiterverfolgt.



**Tab. 9: Liste der bekannten Gene**

Aufgeführt sind die Expressionsabstufungen der Gene in aktivierten BAECs differenziert in + schwache, ++ mässige und +++ starke Expression. Die Regulationsfaktoren sind angegeben für aktivierte BAECs im Vergleich zu ruhenden BAEC<sub>K</sub>.

Gen	Klon	Northernsignal		Genbank-No.	
		Größe / Expression	Regulation		
Endothelin 1, human	35-3-3	2,2 kb	+++	>10x	Y00749
Metallothionein-II (mt-II), human	35-4-1	1 kb	++	10x	J00271
putativer PKC Inhibitor $\beta$ 14-3-3, Ratte <i>prepro-nerve growth factor</i> RNH-1, Ratte	39-8-3	3,5 kb	+++	2-3x	D17446 S83440
inhibitorisches G-Protein, $\alpha$ -Untereinheit ( $\alpha$ G <sub>i</sub> ), bovin	40-1-1	4 kb	++	4x	X03642
Caveolin 1 (neues 3'-UTR), human Caveolin 1 (neue 3'-UTR-Teilseq.), bovin	40-5-3	2,4 kb	+++	1x bis >10x	Z18951 U86639
Acetyl CoA Acetyltransferase Thiolase	40-9-3	1,7 kb	++	3x	D90228
Annexin 1= Lipocortin 1, bovin	42-5-1	1,8 kb	++	2x	X56649
T-Zell Cyclophilin, human (17kD)	42-9-10	1 kb	+++	3x	Y00052
Lactat Dehydrogenase, bovin	64-2-2	2 kb	+++	10x	D90141
Proteasom Untereinheit HC8, human	64-5-3	1,5+3+4 kb	+++	2x	D00762
GRP78 Protein, porcine BiP Protein, human	67-1-2 67-2-3	3 kb	+++	10x 2x	X92446 X87949
Thrombospondin 1, bovin	67-3-3 67-6-3 73-1-1	6 kb	+++	>10x >10x 4x	AB005287
GTP bindendes Protein, murin ras-like Protein, human	67-4-2	1,2 kb	+++	2-3x	S83456 M31469
KIAA 0002 Gen, human zytosolisches Chaperon TCP-1, murin	69-5-2	2 kb	+++	3-4x	D13627 Z37164
hypothetisches Protein FLJ20276, human Chr. 9	72-1-3 72-2-4	4,8(+7)* kb	+	2x 3x	NM_0177 38.1
Annexin V bindendes Protein ABP7, rat	73-2-3	2,2+4 kb	++	3x	D64061
Ribophorin I, rat (66 kD)	73-3-1	2,3 kb	++	3x	X05300
<i>heatshock</i> verwandtes Protein (70 kD), neues 3'-UTR +185 bp, bovin	73-6-2 73-7-1 75-4-2	3 kb	+++	5x 2x 2x	X53827
Chaperon TCP 20, human	75-1-2	2,2+3 kb	++	4x	L27706

\* In den Multi-GewebeNorthern-blots von 72-1-3 / 72-2-4 trat wiederholt ein zweites Signal bei 7 kb auf.

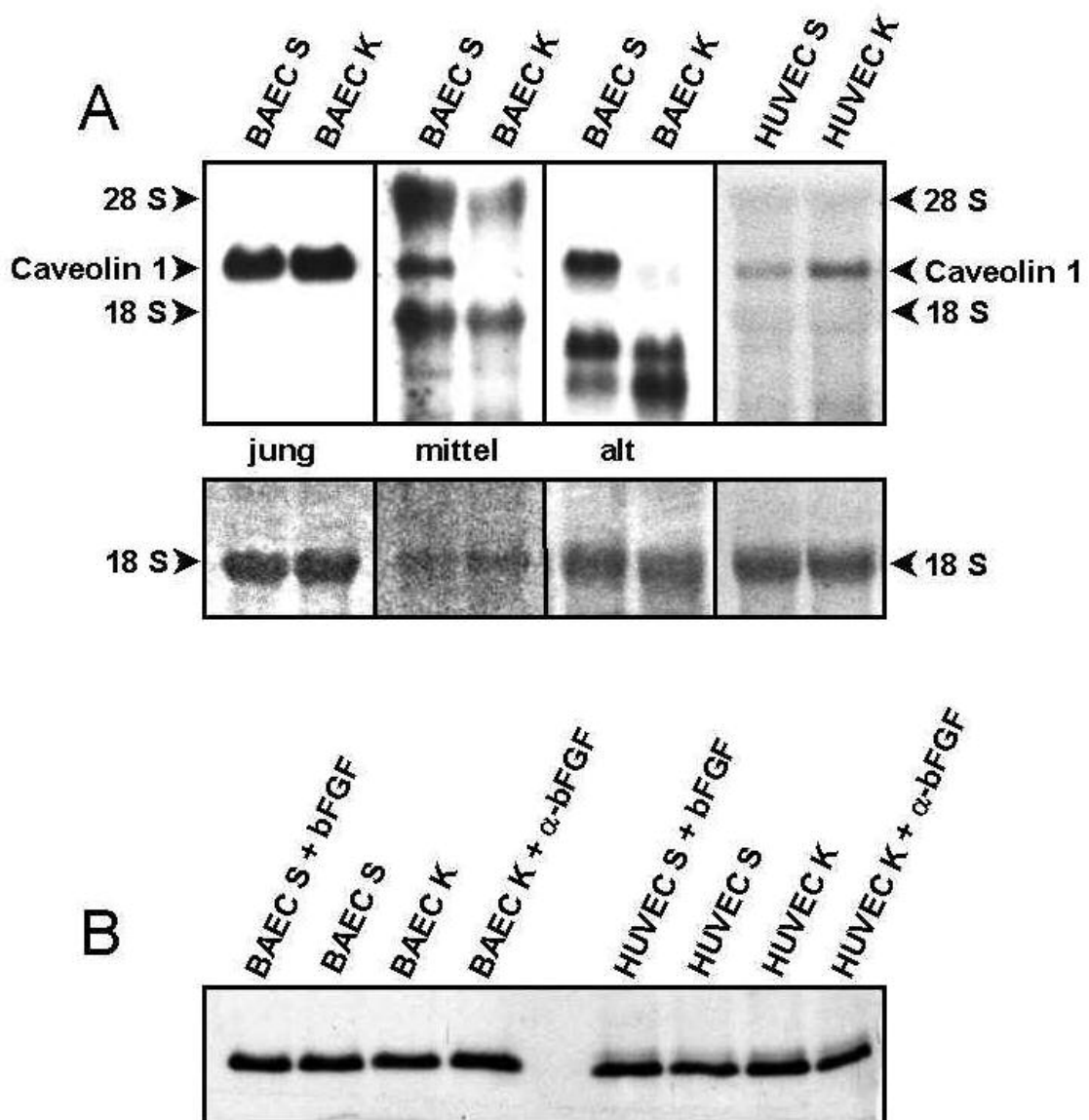
**Caveolin 1 (40-5-3)**

Caveolin 1 gehört zur Caveolin-Genfamilie mit derzeit 3 Mitgliedern. Das 21 kD Membranprotein ist der definierende Proteinbestandteil von Caveolen, invaginierten 50-100 nm Plasmamembran Microdomänen zum intrazellulären Transport von Makromolekülen (Transcytose) und zur endocytoseartigen Aufnahme kleinerer Moleküle (Potocytose) (Parton, 1996). Neueren Erkenntnissen zufolge spielen Caveolen auch eine wichtige Rolle in der (intra-) zellulären Signaltransduktion (Shaul & Anderson, 1998; Smart *et al.*, 1999).

Für humanes Caveolin 1 wurde eine neue 3'-UTR identifiziert, welche sich durch EST-Integration mit der bekannten Sequenz von 838 bp (Z18951) verbinden liess und diese 3'-ständig auf 2230 bp verlängert. Dieser erweiterte 3'-UTR-Bereich lässt sich mit der genomischen Sequenz (Chromosom 7q31.1) AF125348 90%ig homologisieren. Ausgegangen wurde dabei von dem isolierten bovinen 468 bp DD-Genfragment, welches dem 3'-Ende der neuen Caveolinsequenz homolog ist und diese mit 186 bp überragt, so dass sich die rechnerische Gesamtlänge der mRNA von 2,4 kb ergibt.

Zur Überprüfung der Identität wurden Northern-blots durchgeführt, die das Signal in erwarteter Grösse von 2,4 kb zeigten. Des weiteren zeigten sich im Northern-blot unterschiedliche Expressionsmuster von nicht nachweisbarer Regulation in jungen BAEC über 10-fache Aktivierung in mittleren und alten subkonfluenten bovinen Endothelzellen bis zu umgekehrt einer 3-fachen Deaktivierung in subkonfluenten HUVEC.

Die mittels Northern-blot erhobenen inkonsistenten Daten bezüglich der Regulation wurden auf Proteinebene überprüft. Dabei ergab sich keinerlei Veränderung der Caveolin 1-Proteinkonzentration für bovine junge, mittlere oder alte sowie humane Endothelzellen.



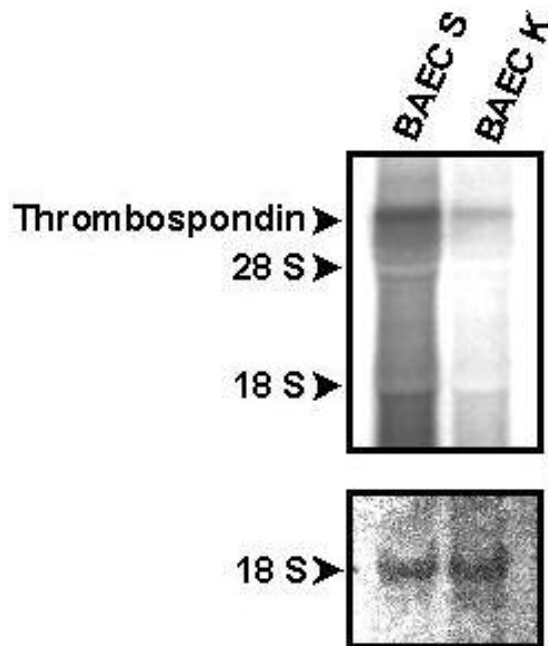
### Abb. 6: Caveolin 1 Northern-blot und Western-blot

- A)** Abgebildet sind Autoradiographien subkonfluent-konfluent vergleichender, junger, mittlerer und alter BAEC Zellpopulationen (Passagen 7, 20 und 38), sowie HUVEC Zellpopulationen mit den dazugehörigen Ladekontrollen (18 S-rRNA) sowie die Lage der 28 S (ca. 4,9 kb) und 18 S rRNA (ca. 1,9 kb). Je 10  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden geladen und mittels eines radioaktiv markierten Caveolin 1-PCR-Produktes gleicher Spezies detektiert.
- B)** Äquivalente Mengen (ca. 2  $\mu$ g) von Gesamtzellsatprotein verschiedener Zellpopulationen aufgetrennt auf einem 10%igen SDS-PAA-Gel, Caveolin 1 mittels Antikörper detektiert und chemilumineszent visualisiert. Stellvertretend sind hier bovine Endothelzellen mittleren Alters sowie humane abgebildet.

**Thrombospondin 1 (67-3-3, 67-6-3, 73-1-1)**

Beispielhaft für die Identifikation von 3'-Endsequenzen steht das grösste identifizierte bekannte Gen Thrombospondin 1 (TSP 1) mit einem Northern-blotsignal von 6 kb: Von den bekannten 5,8 kb der humanen TSP 1-Sequenz bzw. 5,3 kb des bovinen Pendant wurden drei verschiedenen Klone identifiziert, die aus dem 3'-Bereich zwischen 3,8-5,3 kb stammen.

Thrombospondine sind eine 5 Mitglieder zählende Familie (TSP 1-5) multimodularer Proteine mit starker Bindungsaffinität zur ECM. TSP 1 ist ein von Blutplättchen aus  $\alpha$ -Granula sezerniertes und in vielen Zelltypen (z.B. EC, SMC, Macrophagen, Tumorzellen) synthetisiertes Glycoprotein, welches einen transienten Bestandteil in ECM von sich entwickelndem und heilendem Gewebe darstellt (Raugi *et al.*, 1987). Es handelt sich um ein 420 kDa Homotrimer (Lawler *et al.*, 1978), das jeweils aus mehreren strukturellen Untereinheiten besteht. Verschiedene Faktoren wie beispielsweise Serum, bFGF, PDGF, TGF $\beta$  und Progesteron stimulieren seine Expression (Majack *et al.*, 1987; Donoviel *et al.*, 1990; Janat & Liao, 1992; Iruela Arispe *et al.*, 1996). Mittels vier adhesiver Domänen fungiert es als ein Zelladhäsionsmolekül (Tuszynski *et al.*, 1987; Mosher, 1990), welches Zellmigration, Proliferation, Neuronaussprossung, Angiogenese und Tumorprogression moduliert (Adams, 1997). Seine spezifische Funktion wird in der Literatur kontrovers diskutiert, insbesondere seine antiangiogenen versus angiogenen Effekte.

**Abb. 7: Thrombospondin 1 Northern-blot**

Abgebildet ist eine subkonfluent-konfluent BAE-Zellpopulationen vergleichende Autoradiographie mit den dazugehörigen Ladekontrollen (18 S-rRNA) sowie die Lage der 28 S (ca. 4,9 kb) und 18 S rRNA (ca. 1,9 kb), die eine mehr als 10-fache Aktivierung in BAEC<sub>S</sub> zeigt. Je 10 µg Gesamt-RNA wurden geladen und mittels eines radioaktiv markierten bovines Thrombospondin 1-PCR-Produktes (Insert von 73-1-1) detektiert.

### 3.3.2 Genfragmente / EST-Homologien

Für 14 der 16 neuen Genfragmente liessen sich im Datenbankabgleich homologe ESTs oder Genomsequenzen identifizieren. Davon liessen sich 5 Gene (grau unterlegt) aus den Datenbanken integrieren, von der Sequenz eine putativ vollständige kodierende Sequenz und Aminosäuresequenz ableiten und ihre cDNA zur Überprüfung ihrer Identität klonieren.

**Tab. 10: Genfragmente**

Aufgeführt sind die Expressionsabstufungen der Genfragmente in BAEC<sub>S</sub> differenziert in + schwache, ++ mässige und +++ starke Expression. Die Regulationsfaktoren sind angegeben für aktivierte BAEC<sub>S</sub> im Vergleich zu ruhenden BAEC<sub>K</sub>.

Klon	Northernsignal		integrierte Gensequenz	Genlocus	Genbank-No.
	Größe / Expression	Regulation			
40-2-3	3,5+3,8 kb	+++	10x	3544 bp, human	Chr. 3 AA143040
40-6-3	1,6 kb	++	2x	1555 bp, human	AF132856
40-9-1	6 kb	+++	3x	4816 bp, human	Chr. 12 AA370606 AB037803
42-6-3	1,6 kb	++	3x	1341 bp, human	Chr. 22q12-13 AA147979 HS508115
42-9-9	0,8 kb	++	3x	484 bp, bovin 731 bp, human 543 bp, murin	Chr. 17 AA316868 HUMZC48G12 AC004706
64-1-2	4,9 kb	+	2x	562 bp, bovin	--
64-4-3	4,9 kb	+	3x	395 bp, bovin 333 bp, human	Chr. 2 H77493 AC073284
64-6-4	1,9 kb	++	2-3x	453 bp, bovin	--
67-5-5	3,5 kb	+++	3x	850 bp, bovin	M95097 U15731
67-11-3	1,6 kb	+	4x	1577 bp, human	W80881 AK000572
68-4-1	1,7+3,5 kb	+	2-3x	441 bp, bovin 1122 bp, human	AC019025 AF064782
69-4-1	1 kb	+++	4x	445 bp, bovin 243 bp, human	Chr. 16 AC009079
74-1-5	4,5 kb	+	3x	496 bp, bovin	AW430532
74-4-3	4,5 kb	++	1,5-2x	532 bp, bovin	AA514079
75-3-3	1 kb	+	>10x	466 bp, bovin	U97688
76-2-1	10 kb	++	3-5x	1675 bp, human	Chr. 2 AC017079

Grau unterlegte Gene wurden weitergehend charakterisiert und sind unter 3.4 gesondert aufgeführt.

### **Expressionsmuster in verschiedenen Geweben**

Für den Grossteil der Genfragmente wurden die Expressionmuster in verschiedenen Gewebetypen bestimmt. Dazu wurden aus bovinen Organen extrahierte Gesamt-RNA-Mengenäquivalente parallel elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Das Ergebnis der Northern-blots ist im Folgenden tabellarisch aufgeführt; exemplarische Abbildungen einiger autoradiographischer Gelbilder sind im anschliessenden Abschnitt 3.4 dargestellt.

Von den Genfragmenten 64-1-2, 64-4-3, 68-4-1, 74-4-3 und 75-3-3 (siehe Tab. 10) wurden keine Multi-Gewebenorthern-blots angefertigt aufgrund ihrer schwachen Expression oder nur geringfügiger Regulation.

Die Expressionsmuster sollten einen ersten Anhaltspunkt darüber geben, ob die isolierten Moleküle eine angiogeneseassoziierte Funktion haben. Demnach wäre zu postulieren, dass sie in Geweben mit aktiver Angiogenese wie frühes oder mittleres Ovar stärker exprimiert werden; ebenso ist eine präferentielle Endothelzellexpression der Kandidatengene in stark vaskularisierten Geweben zu vermuten. Etwaige organspezifische Genexpression sollte erkennbar werden.

Eine erhöhte Expression in frühen-mittleren Ovarstadien konnte für die Gene 40-2-3, 40-9-1, 42-6-3, 42-9-9 und 67-11-3 nachgewiesen werden. Eine organspezifisch deutlich erhöhte Genexpression zeigten die Moleküle 40-2-3, 40-6-3, 40-9-1 und 69-5-2 für Muskelgewebe, 42-9-9 für Lebergewebe sowie 69-4-1 für Herz und Dünndarm. Aufgrund dieser interessanten Genexpressionsmuster und der Identifikation von ORFs wurden für die neuen, grau unterlegten Gene im folgenden Abschnitt weiterführende Experimente zur Sequenzidentifikation und Charakterisierung durchgeführt.

**Tab. 11: Expressionsmuster im Northern-blot (MTN)**

Aufgeführt sind die Expressionsabstufungen der Gene und Genfragmente in boviner Gewebe-RNA differenziert in – keine, + schwache, ++ mässige und +++ starke Expression. Die Werte in der Spalte BAE dienen als Anhaltspunkt und entsprechen den relativen Signalen von zum Grössenvergleich geladener Kontroll-RNA subkonfluenter Zellen. Sie können von den Werten der Verifikations-Northern-blots (siehe Tab. 9 und Tab. 10) abweichen.

Gen	Aorta	Herz	Mus- kel	Leber	Milz	Uter- us	Niere	Dünn Darm	Ovar			BAE
									früh	mittel	spät	
40-2-3	++	++	+++	+	+	++	++	++	+++	++	++	+++
40-6-3	+	+	+++	-	-	+	+	+	+	+	+	+
40-9-1	++	++	+++	++	+	++	++	++	+++	++	++	+++
42-6-3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
42-9-9	-	-	++	+++	-	+	++	++	++	+	-	++
64-6-4	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	++
67-5-5	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
67-11-3	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
69-4-1	-	+++	++	++	++	+	++	+++	++	++	++	+++
69-5-2	+	+	+++	+	+	++	++	++	++	++	++	+++
72-2-4	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
74-1-5	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
76-2-1	-	-	+	+	-	+	-	++	++	++	++	++

Grau unterlegte Gene wurden weitergehend charakterisiert und sind unter 3.4 gesondert aufgeführt.

### 3.4 STECKBRIEFE NEUER GENE

#### 3.4.1 Gen 40-2-3

Die 40-2-3 Gensonde erzeugt 2 Northern-blotssignale bei 3,5 und 3,8 kb, von denen eine 3511 bp Sequenz mit einem zum Genanfang offenen ORF inklusive Kozakkonsensussequenz (Translationsstartsequenz) identifiziert wurde. Zur Klärung, ob die nur 46 bp umspannende Sequenz vor dem putativen Startcodon und damit die cds vollständig ist, wurde ein 5'-RACE durchgeführt mit den Primern H 40-2-3 R3 (SP 1 Primer zur spezifischen reversen Transkription von HUVEC-RNA), H 40-2-3 R4 (SP 2 Primer zur 1. PCR) und H 40-2-3 R5 (SP 3 Primer zur 2. *nested* PCR). Dabei ergab sich eine 19 bp-Verlängerung der 5'-Sequenz auf insgesamt 3544 bp, so dass davon ausgegangen werden muss, dass das putative



Startcodon bereits identifiziert ist. Eine dem grösseren Transkript von 3,8 kb zugrundeliegende Sequenz liess sich nicht ermitteln.

### Identität

Gesamtgrösse (Northern-blot, bovin)	3,5 + 3,8 kb
identifizierte Sequenz, human	3544 bp
komplette cds inkl. Kozakkonsensussequenz, human	nt 66-1019, 318 AS
klonierte Sequenz, human	nt 1-1254
I.M.A.G.E.-Klon IMAGp998A02836, human	nt 462-3411
identifizierte und klonierte Sequenz, bovin	1196 bp
komplette cds inkl. Kozakkonsensussequenz, bovin	nt 14-970, 319 AS
identifizierte Sequenz, murin	1110 bp
komplette cds inkl. Kozakkonsensussequenz, murin	nt 85-1035, 317 AS
klonierte Sequenz, murin	nt 91-1035

### Homologien

Eine 82%ige Homologie der Aminosäuren 31-49 ergab sich zu den ersten 17 N-terminalen Aminosäuren des Transkriptionscoaktivator ALY (O08583). Diese hohe Homologie beschränkt sich ausschliesslich auf den aminoterminalen Bereich, dessen Funktion nicht näher bekannt ist (Bruhn *et al.*, 1997).

Ein Sequenzbereich von 2,5 kb inkl. der cds ist ca. 83% homolog zur genomischen Sequenz HS809F4 auf Chr. 1q23.1-24.3. Entsprechend den Homologiekriterien ist die identifizierte genomische Sequenz als verwandtes Gen einzuordnen und somit auf das Vorhandensein einer Genfamilie zu schliessen. Möglicherweise ist dieses Homolog im Northern-blot im Sinne einer Kreuzreaktivität bereits detektiert wurden (siehe Doppelbande in Abb. 8A). Dies unterstellte allerdings eine entsprechende Gesamtgrösse von 3,8 kb und somit noch nicht identifizierte chromosomal-homologe Bereiche. Alternativ könnte es sich dabei aber auch um eine Spleissvariante von 40-2-3 handeln.

Das Hydrophobizitätsprofil entspricht einem löslichen Protein mit einer 58%ig prädiktierten subzellulären Lokalisation im Zellkern.

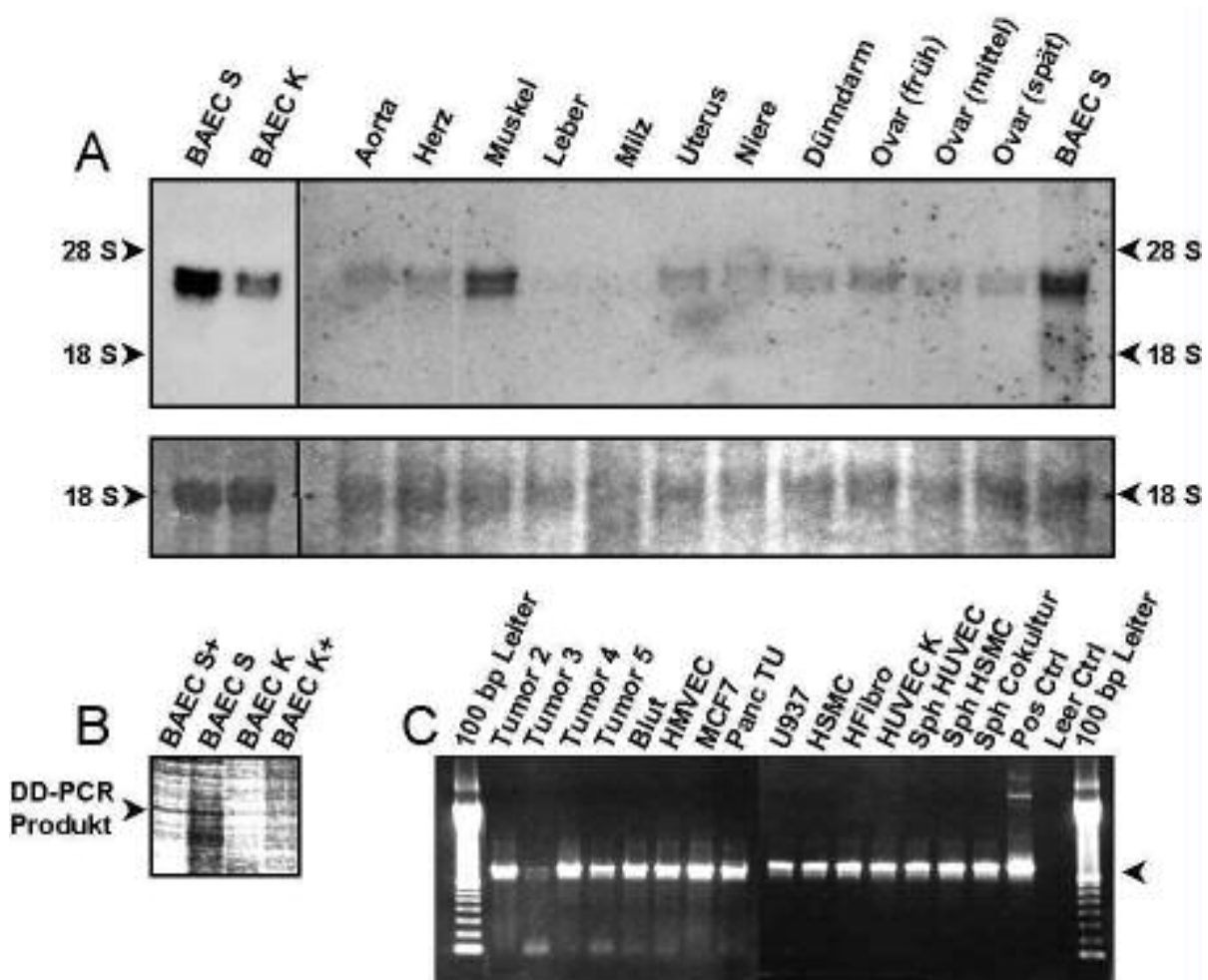
### Expressionsmuster

Im Northern-blot (siehe Abb. 8A) zeigte sich das Gen 40-2-3 10-fach hochreguliert in subkonfluenten BAEC im Vergleich zu arretierten. Es wurde prominent im Muskelgewebe exprimiert, liess sich aber auch in allen anderen der getesteten bovinen Gewebe mit geringerer

Intensität nachweisen (Aorta, Herz, Uterus, Niere, Dünndarm), in Milz und Leber an der Nachweisgrenze. Im ovariellen Zyklus war die Expression leicht erhöht während des massiv angiogenen frühen Stadiums.

Ebenfalls nachweisen liess sich 40-2-3 mittels PCR (Abb. 8C) in allen überprüften humanen Geweben (Blut und Mammatumoren A4/3, A14, A17-1, A19) und Zelllinien, sowohl blutgefässkonstituierende in Kultur (HUVEC<sub>K</sub>, HMVEC, HSMC, HFibro) als auch in deren differenziertem Zustand (Sphäroide aus HUVEC, HSMC und HUVEC/HSMC in Cokultur) sowie in Tumoren (MCF7, Panc TU, U937).

Initiale *in situ*-Experimente ergaben eine breite Expression im Mausembryo (E12,5-16,5), besonders stark in Muskel, Herz und neuronalen Geweben.



### Abb. 8: 40-2-3 DD, Northern-blot und PCR-screening

Abgebildet sind: **A)** der Verifikationsnorthern-blot an BAEC und der bovine Multigewebenorthern-blot mit den dazugehörigen Ladekontrollen (18 S-rRNA) sowie die Lage der 28 S (ca. 4,9 kb) und 18 S rRNA (ca. 1,9 kb). **B)** die ausgeschnittene Bande aus dem DD-Gel. **C)** ein PCR-Screening der Expressionsmuster von verschiedenen humanen Mammatumoren und Zelllinien.

### Proteinexpression

Murines 40-2-3 wurde zur Expression in den His-Tag-Vektor pTrcHis2-TOPO kloniert. Der isolierte Klon 327-4-8 produzierte das Plasmid in korrekter Sequenz, exprimiert das Protein aber nur im Western-blot in nachweisbaren Mengen (siehe Induktionsexperiment Abb. 9-A). Das Protein konnte zuvor mittels reversibler E-Zinc™-Färbung des gleichen SDS-PAA-Gels im Gesamtzellsat nicht detektiert werden. Der Versuch einer His-Tag-Aufreinigung aus bis zu 2 l *E. coli*-Kultur erbrachte nur etwa ein Milligramm Proteineluats mangelnder Reinheit, mit einem angenommenen Gehalt von 10% Fusionsprotein (siehe Abb. 9-B). Diese unspezifische Affinitätsaufreinigung am wahrscheinlichsten durch zu wenig angebotenes Fusionsprotein erklärlich.

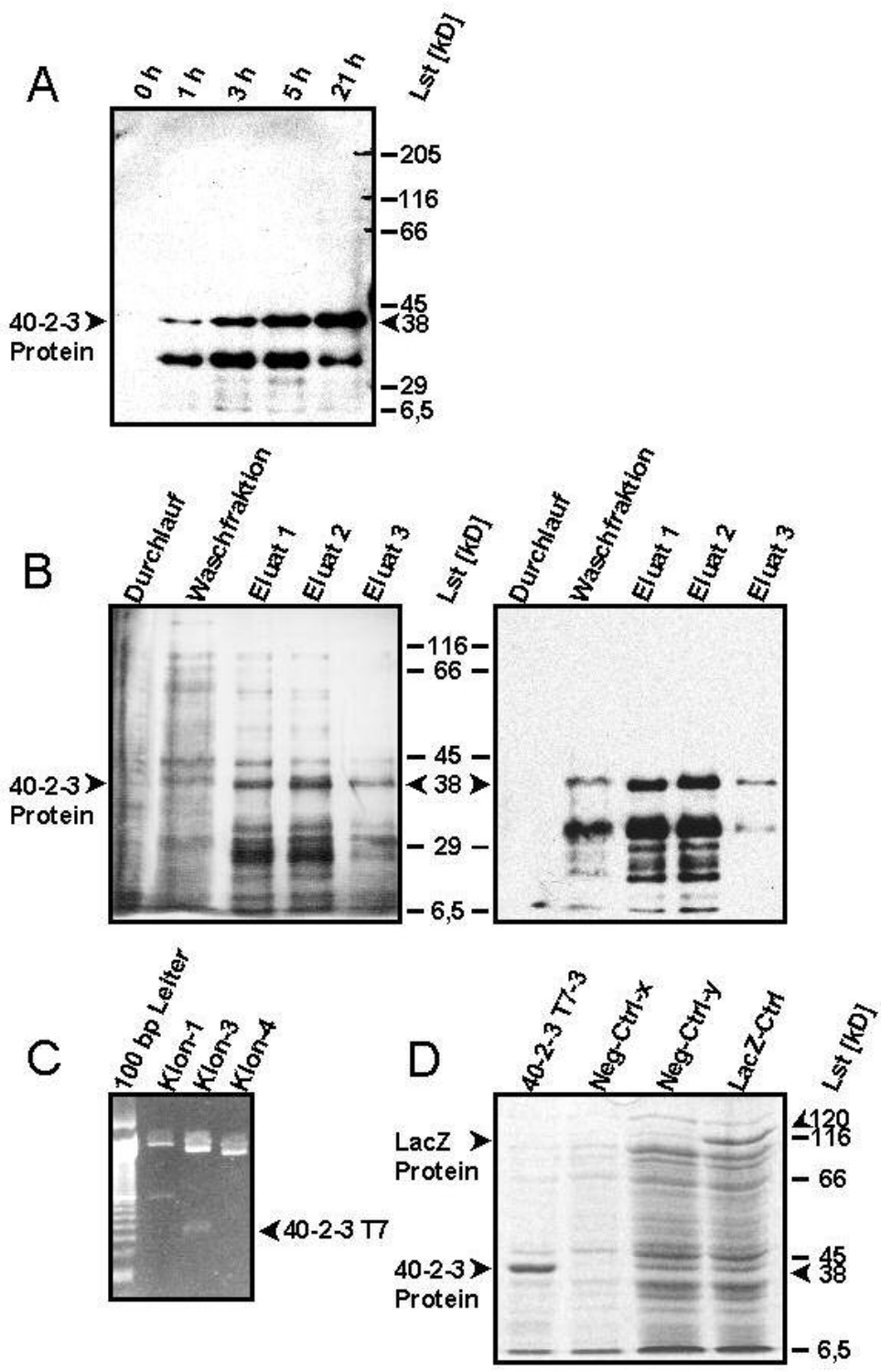
Alternativ wurde ein Expressionsvektor mit dem potenteren T7-Promoter verwendet, der eine Proteinüberexpression zeigte (siehe Abb. 9-C-D).

M40-2-3 Expressionsklon 327-4-8 (in pTrcHis2-TOPO-Vektor)	Fusionsprotein: 38 kD
muriner Expressionsklon M40-2-3 T7-3 (in pCR T7/CT-Vektor)	Fusionsprotein: 38 kD

### Abb. 9: 40-2-3 Proteinexpression

(folgende Seite)

- A)** Induktionsexperiment des M40-2-3 Expressionsklones 327-4-8 (His-Tag-Vektor pTrcHis2-TOPO): Der Western-blot zeigt mit  $\alpha$ -c-myc detektiertes 38 kD-Protein aus dem Gesamtproteinzellsat nach angegebenen IPTG-Stimulationszeiten. Bei den kleineren Banden handelt es sich möglicherweise um proteolytische Fragmente.
- B)** PAA-Gel (10%, reversible E-Zinc™-Färbung) und korrespondierender Western-blot ( $\alpha$ -tetra-His-detektiert) der His-Tag-Affinitätsproteinaufreinigung von Klon 327-4-8 aus 2 l Kultur nach GuHCl-Auflösung. Obwohl das Eluat noch stark verunreinigt ist, befindet sich ein Teil des Fusionsproteins bereits in der Waschfraktion.
- C)** Expressionsklon M40-2-3 T7-3: Nach Doppelverdau des aufgereinigten Plasmids mit *Eco* R1 / *Xba* 1 zeigt nur der Klon 3 ein spezifisches Verdauemuster und damit das Insert in richtiger Orientierung.
- D)** Expressionsklon M40-2-3 T7-3: Coomassie-gefärbtes PAA-Gel des Gesamtproteinzellsates nach Expression in BL21(DE3)pLysS-Zellen. Der Klon exprimiert ein prominentes Protein in prädiktierter Grösse des Fusionsproteins von 38 kD. Zwei Negativ-Kontrollklone sowie pCR T7/CT-LacZ als Positivkontrolle sind mitgeführt.



### 3.4.2 Gen 40-6-3

Die Gensonde von 40-6-3 erzeugt ein Northern-blotsignal von 1,6 kb. Durch EST-Integration liess sich eine Sequenz von 1651 bp identifizieren, an die sich mit unsicherem Übergang weitere 286 bp Sequenz anschliessen. Zur experimentellen Aufklärung der Sequenz wurde der Forwardprimer H 40-6-3 jeweils mit den Gegenprimern H 40-6-3 R1 im abgesicherten Sequenzbereich und H 40-6-3 R2 im fraglichen 3'-Ende kombiniert. Nur für den sicheren EST-Sequenzbereich liess sich ein Amplifikationsprodukt synthetisieren, dieses also bestätigen. Das Klonieren und Sequenzieren des Amplifikats ergab ein ALU-Repeatsequenz-Insert (Claverie, 1992; Claverie & Makalowski, 1994) von 96 bp in der cds zwischen nt 421 und nt 422. Dieser Sequenzabschnitt tritt weder in der später veröffentlichten SGT1-Sequenz noch in murinen Klonen und murinen ESTs auf, so dass die humane klonierte Sequenz folglich genauso einem Klonierungsartefakt zugrunde liegt, wie auch die humanen EST-Datenbanksequenzen.

#### Identität

Nach Abschluss der experimentellen Arbeiten wurde 40-6-3 als humanes SGT 1 identifiziert. Es handelt sich um einen dosisabhängigen Suppressor des G2-Allels von *skp1*, reguliert in Hefe die Zellzyklusprogression durch Konstituierung des Kinetochors und ist funktionell evolutiv konserviert. Konditionelle Mutanten sind G1 oder G2 arretiert (Kitagawa *et al.*, 1999).

SGT 1, human	AF132856
Gesamtgrösse (Northern-blot, bovin)	1,6 kb
identifizierte Sequenz, human	1555 bp
komplette cds = publizierte Sequenz AF132856, human	nt 94-1092, 333 AS
klonierte Sequenz, human	nt 51-1384
identifizierte und klonierte Sequenz, bovin	nt 905-1208, 304 bp
identifizierte Sequenz, murin	nt 51-1110, 1060 bp
klonierte Sequenz = komplette cds, murin	999 bp, 333 AS

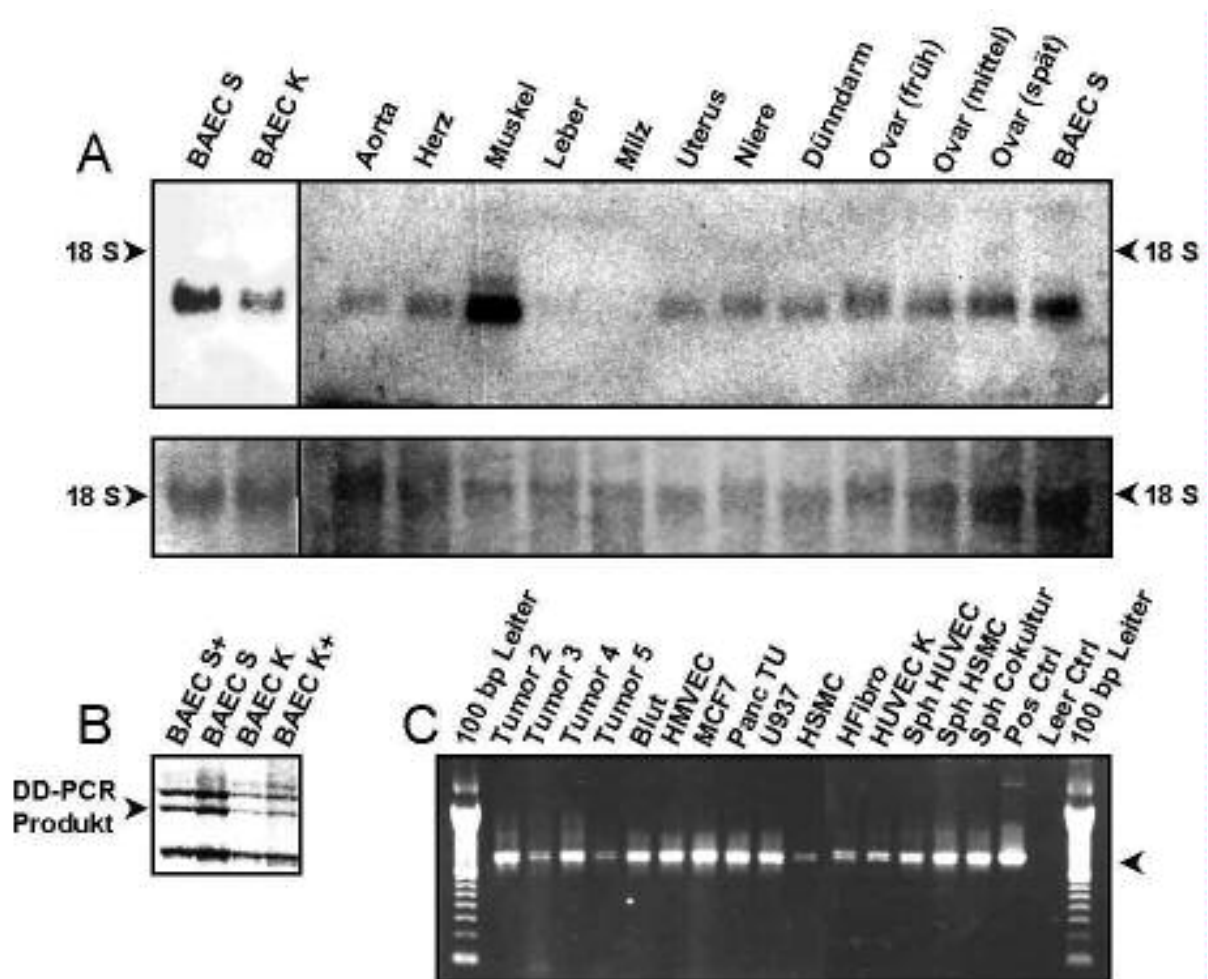
#### Expressionsmuster

Im Northern-blot (siehe Abb. 10A) zeigte sich das Gen 40-6-3 2-fach hochreguliert in subkonfluenten BAEC im Vergleich zu arretierten. Es wurde prominent im Muskelgewebe exprimiert, liess sich aber auch in einigen anderen der getesteten bovinen Gewebe mit

geringerer Intensität nachweisen (Aorta, Herz, Uterus, Niere, Dünndarm), hingegen nicht in Milz und Leber. Durch den ovariellen Zyklus war eine unveränderte Expression auf mittlerem Niveau festzustellen.

Ebenfalls nachweisen liess sich 40-6-3 mittels PCR (Abb. 10C) in allen überprüften humanen Geweben (Blut und Mammatumoren A4/3, A14, A17-1, A19) und Zelllinien, sowohl blutgefässkonstituierende in Kultur (HUVEC<sub>K</sub>, HMVEC, HSMC, HFibro) als auch in deren differenziertem Zustand (Sphäroide aus HUVEC, HSMC und HUVEC/HSMC in Cokultur) sowie in Tumoren (MCF7, Panc TU, U937).

Das Hydrophobizitätsprofil entspricht einem löslichen nukleären Protein.



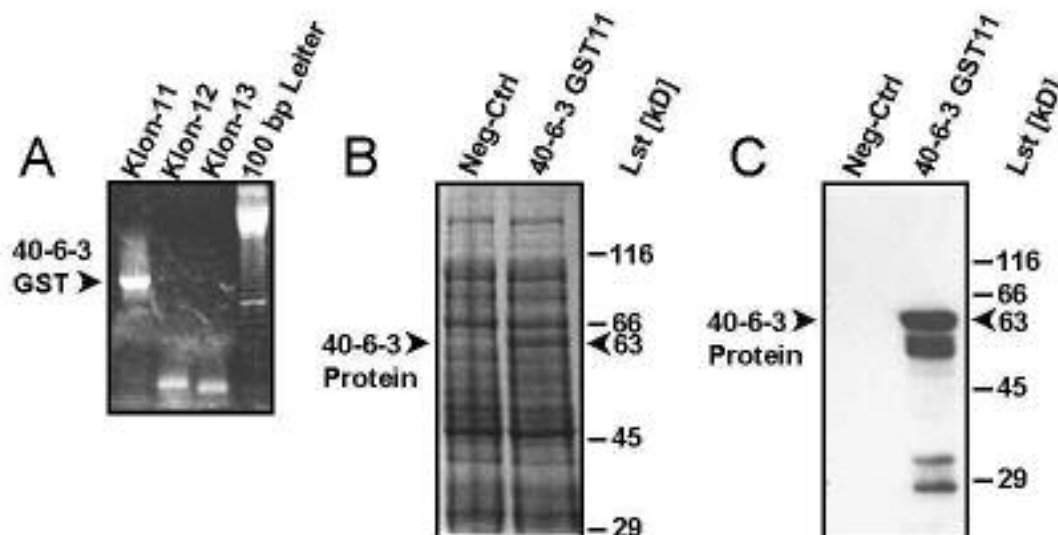
### Abb. 10: 40-6-3 DD, Northern-blot und PCR-screening

Abgebildet sind: **A)** der Verifikationsnorthern-blot an BAEC und der bovine Multigewebenorthern-blot mit den dazugehörigen Ladekontrollen (18 S-rRNA) sowie die Lage der 18 S rRNA (ca. 1,9 kb). **B)** die ausgeschnittene Bande aus dem DD-Gel. **C)** ein PCR-Screening der Expressionsmuster von verschiedenen humanen Mammatumoren und Zelllinien.

### Proteinexpression

Zur Herstellung eines GST-Fusionsproteins wurde M40-6-3 in den pGEX-KG-Vektor kloniert. Der mittels Screening-PCR identifizierte Klon M40-6-3 GST-11 mit ca. 1100 bp Amplifikat (siehe Abb. 11-A) exprimiert eine prominente 63 kD-Bande im Coomassie-gefärbten PAA-Gel (10%, siehe Abb. 11-B), die auch im Western-blot vom  $\alpha$ -GST detektiert wird (siehe Abb. 11-C), so dass der Klon als aussichtsreicher Kandidat zur quantitativen Proteinaufreinigung gelten kann. Initiale Versuche mit dem His-Tag-Vektor führten zu nur im Western-blot detektierbaren Expressionsleveln des Fusionsproteins, so dass eine Aufreinigung erfolglos blieb.

muriner Expressionsklon M40-6-3 GST-11 (in pGEX-KG-Vektor)      Fusionsprotein: 63 kD

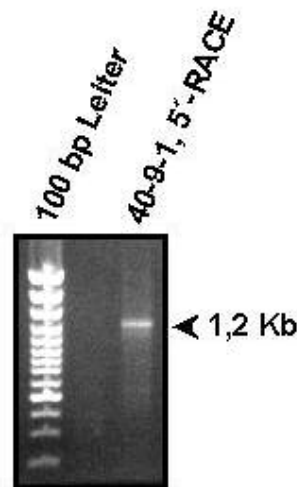


### Abb. 11: 40-6-3 Proteinexpression

- Screening PCR: Der Expressionsklon M40-6-3 GST-11 weist das gesuchte 1100 bp-PCR-Produkt auf.
- Expressionsklon M40-6-3 GST-11: Coomassie-gefärbtes PAA-Gel des Gesamtproteinzyllsates nach Expression in *E. coli*. Der Klon exprimiert ein prominentes Protein in prädiktierter Grösse des Fusionsproteins von 63 kD.
- Western-blot:  $\alpha$ -GST detektiert in Klon M40-6-3 GST-11 die Expression eines Proteins erwarteter Grösse von 63 kD, wenn auch weitere kleinere Banden auf proteolytischen Andau hindeuten.

### 3.4.3 Gen 40-9-1

Ausgehend von einem 6 kb-Northern-blotsignal, aber nur 1385 bp bekannter humaner Teilsequenz mit einem zum Genanfang hin offenen Leserahmen wurde zur Identifizierung der Gesamtsequenz ein 5'-RACE durchgeführt. Zunächst wurden anhand der mittels EST-Integration erstellten Teilsequenz zwei revers orientierte Primer H 40-9-1 R2 (als SP 1 am relativen 5'-Ende der Teilsequenz) und H 40-9-1 R3 (als SP 2 upstream zu SP 1) positioniert. Nach spezifischer reverser Transkription von eingesetzter HUVEC Gesamt-RNA mittels SP 1-Primer und darauffolgenden Tailingreaktion wurden 3 Zyklen Zweitstrangsynthese nach Protokoll (mit dT<sub>16</sub>-Anchorprimer) durchgeführt. Schon in der sich anschliessenden 1. PCR mit dem SP 2-Primer und dem Anchorprimer liess sich ein 1,2 kb-Fragment amplifizieren (siehe Abb. 12), welches nach Klonierung und Sequenzierung die bekannte Teilsequenz um 1015 bp genaufwärts verlängerte. Dabei liess sich die Sequenz mit einer Überlappung von zusätzlichen 76 bp sicher anschliessen. Gemessen am SP 1-Primer wurden knapp 1,4 kb bis zum Genanfang revers transkribiert.



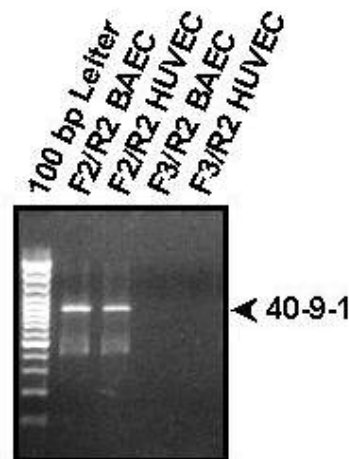
**Abb. 12: 5'-RACE-Produkt von H 40-9-1**

Abgebildet ist das 1,2 kb-Amplifikationsprodukt aus der 1. PCR aus HUVEC<sub>K</sub>-cDNA mit der Primerkombination Anchor / SP 2 nach 30 Zyklen. Längenstandard: MBI Fermentas GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus

Parallel wurde erfolgreich die alternative Strategie des *Gen-hoppings* zur Identifikation des Genanfangs verfolgt: Die bekannte humane 1385 bp Teilgensequenz liess sich über den gesamten Bereich des ORFs von 850 bp 60%ig mit dem humanen Transporterprotein g17 (Acc.-No. U47082) homologisieren. Da g17 die identifizierte Sequenz noch um 772 bp in



Richtung Genanfang überragte, wurde nun ausgehend von dessen Sequenz am Genanfang nach humanen ESTs mit ebenfalls ca. 60% Homologie gesucht. Es fanden sich zwei ESTs mit jeweils 65%iger Homologie, die aber untereinander nicht zu homologisieren waren und somit zu unterschiedlichen Genen zuzuordnen sind: AA314459 und T27030. Für jede der ESTs wurde nun ein spezifischer Primer in forward-Orientierung synthetisiert (H 40-9-1 F2 vs H 40-9-1 F3), der jeweils mit dem H 40-9-1 R2-Primer in einer PCR an HUVEC- (und zusätzlich BAEC-) cDNA kombiniert wurde. Dabei ergab sich nur für die F2 / R2-Kombination ein Amplifikationsprodukt, welches nach Klonierung und Sequenzierung die mittels 5'-RACE erhobene Sequenz bestätigte. Somit liess sich ausgehend von dem zugehörigen EST AA314459 auch auf diesem Weg die fehlende 5'-cvs-Gensequenz mittels weiterer EST integrieren.



### Abb. 13: Sequenzidentifikation 40-9-1

Nur die F2 / R2 Primerkombination liefert nach Standardamplifikation ein Produkt gesuchter Grösse und Sequenz sowohl an humaner als auch an boviner cDNA (hier liegt innerhalb der cds eine entsprechende interspezies Sequenzkonservierung vor). Längenstandard: MBI Fermentas GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus

Durch Sequenzabgleich mit der Consensusdatenbank des RZPD konnte die Gensequenz zusätzlich im 3'-UTR um 2423 bp (Cluster 9846.0.60, 323 bp Überlappung) auf insgesamt 4816 bp verlängert werden. Darin ist die gesamte cds einschliesslich einer Kozak-Konsensussequenz (Translationsstartsignal) am putativen Methionin-Startcodon enthalten. Die durch den Cluster angefügte Sequenz trägt noch einen zweiten ORF des hypothetischen, nicht experimentell bestätigten Proteins PRO1068 (NM\_018573) unbekannter Funktion, weicht von diesem allerdings in 5 Punktinsertionen ab.

### Identität

Nach Abschluss der experimentellen Arbeiten liess sich der inzwischen identifizierte Genabschnitt KIAA 1382 als Teilsequenz von 40-9-1 zuordnen.

Gesamtgrösse (Northern-blot, bovin)	6 kb
identifizierte Sequenz, human	4811 bp
komplette cds inkl. Kozakkonsensussequenz, human	nt 353-1870, 506 AS
klonierte Sequenz, human	nt 23-2236
KIAA1382 Gen inkl. partieller cds, human (AB037803)	nt 484-4805
2.ORF, cds des hypothetischen Proteins PRO1068 (NM_018573)	nt 3811-4119, 103 AS
I.M.A.G.E.-Klon IMAGp998K09179, human	nt 2321-4816

identifizierte und klonierte Sequenz, bovin                      nt 1017-2408, laut Sequenzierung 1400 bp

### Homologien

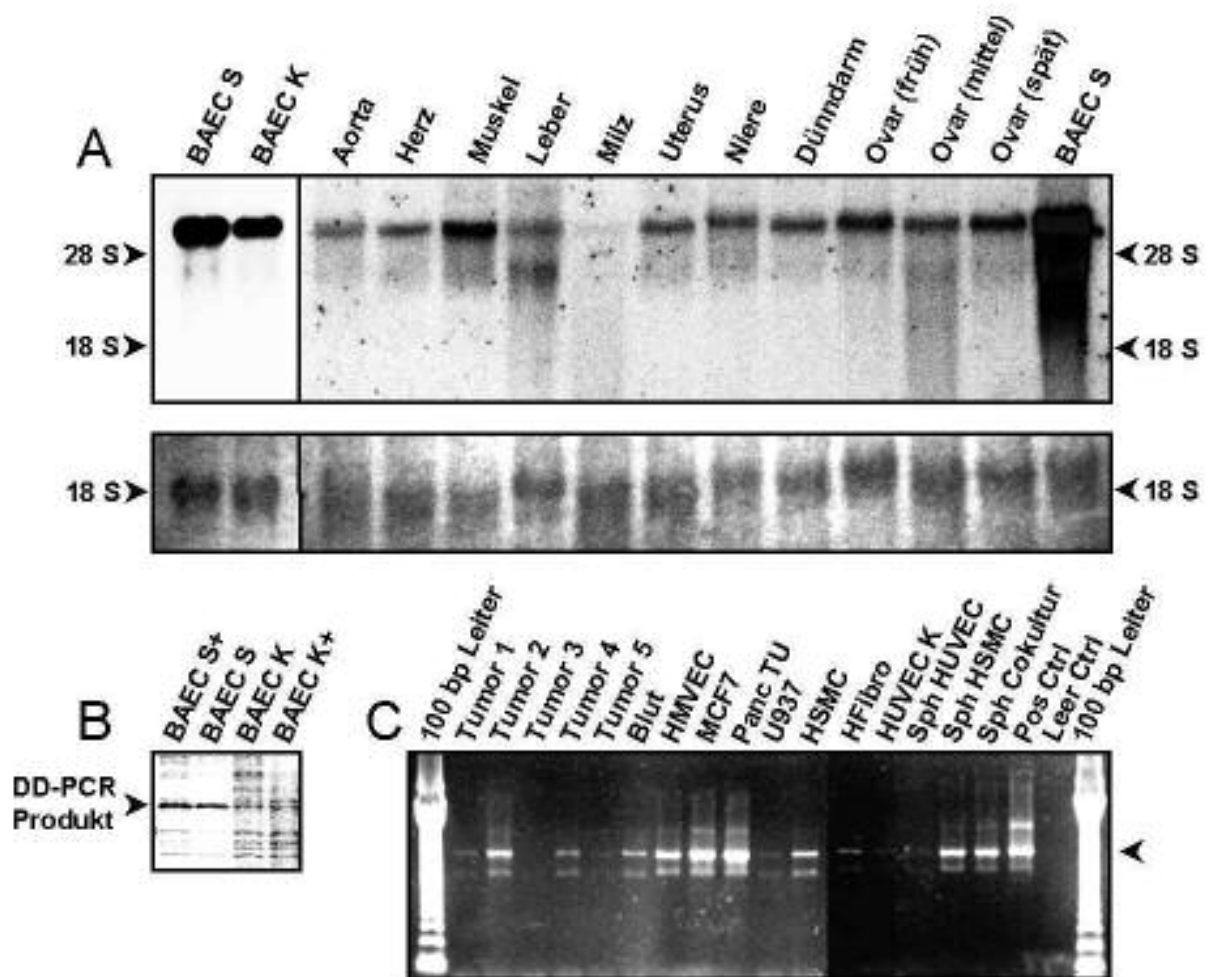
Das Hydrophobizitätsprofil entspricht einem Membranprotein mit 10 Transmembranloops und innenliegendem N-Terminus.

putatives Transmembran Transporterprotein g17, AS-Sequenz 57% homolog                      Q99624

### Expressionsmuster

Im Northern-blot (siehe Abb. 14A) zeigte sich das Gen 40-9-1 3-fach hochreguliert in subkonfluenten BAEC im Vergleich zu arretierten. Es wurde prominent im Muskelgewebe exprimiert, liess sich aber auch in allen anderen der getesteten bovinen Gewebe mit etwas geringerer Intensität nachweisen (Aorta, Herz, Leber, Uterus, Niere, Dünndarm), in Milz (RNA zeigt Andauspuren) an der Nachweisgrenze. Im ovariellen Zyklus war die Expression stark und leicht erhöht während des massiv angiogenen frühen Stadiums.

40-9-1 zeigt im initialen PCR-Screening (Abb. 14C) eine differentielle Expression in humanen Mammatumoren, Tumorzelllinien, in verschiedenen Zelllinien aus Blutgefässen (mit der geringsten Expression in konfluenten HUVEC) sowie in Sphäroiden differenzierter Zellen (ebenfalls die schwächste Expression in HUVEC). Dabei liess sich 40-9-1 ausser in Tumor A14 in allen überprüften humanen Geweben nachweisen (deutlich in Blut und Mammatumoren A4/3, A17-1, an der Nachweisgrenze A8/1, A19). In unterschiedlichen Intensitäten zeigten sämtliche Zelllinien ein 40-9-1-Signal, sowohl blutgefässkonstituierende in Kultur (HMVEC, HSMC, schwach in HFibro, HUVEC<sub>K</sub>) als auch in deren differenziertem Zustand (Sphäroide aus HUVEC schwach, deutliches Signal in HSMC-Sphäroiden und HUVEC/HSMC in Cokultursphäroiden) sowie in Tumoren (MCF7, Panc TU, schwach in U937).



#### Abb. 14: 40-9-1 DD, Northern-blot und PCR-screening

Abgebildet sind: **A**) der Verifikationsnorthern-blot an BAEC und der bovine Multigewebenorthern-blot mit den dazugehörigen Ladekontrollen (18 S-rRNA) sowie die Lage der 28 S (ca. 4,9 kb) und 18 S rRNA (ca. 1,9 kb). **B**) die ausgeschnittene Bande aus dem DD-Gel. **C**) ein PCR-Screening der Expressionsmuster von verschiedenen humanen Mammatumoren und Zelllinien.

#### 3.4.4 Gen 42-9-9

Das dem Northern-blot nach kleinste identifizierte Gen misst ca. 0,8 kb und birgt 2 gegenläufige ORFs. Der grössere kodiert für 123 AS, der kleinere für 65 AS ab dem ersten Startcodon, dessen Sequenz allerdings keine Übereinstimmung mit der Kozakkonsensussequenz zeigt. Da dieser ORF kurz davor genaufwärts durch ein Stopcodon begrenzt wird, muss die tatsächliche Expression des putativen Proteins als fraglich eingestuft werden.

Die Sequenzierung des zugehörigen Gens durch das Human Genom-Projekt ermöglicht die Aufklärung dessen genomischer Organisation. Indem die exprimierten Sequenzabschnitte (mRNA cds) mit der genomischen Sequenz in Beziehung gesetzt wird, lassen sich Exons und Introns identifizieren. Ein automatisiertes Werkzeug ist im Internet verfügbar (siehe Tab. 7).

### Identität

Gengesamtgrösse, human (auf Chr. 17)	2010 bp
5'-UTR	nt 1-76
Exon 1	nt 77-221, 49 AS
Intron 1	nt 222-746
Exon 2	nt 747-828, 27 AS
Intron 2	nt 829-1242
Exon 3	nt 1243-1318, 25 AS
Intron 3	nt 1319-1944
Exon 4	nt 1945-2010, 22 AS
mRNA-Gesamtgrösse (Northern-blot, bovin)	0,8 kb
identifizierte Sequenz, human	728 bp
komplette cds inkl. Kozakkonsensussequenz, human	nt 77-445, 123 AS
2. ORF mit Startcodon in gegenläufiger Orientierung, human	nt 558-364, 65 AS
klonierte Sequenz, human	nt 56-445
I.M.A.G.E.-Klon IMAGp998D23738, human	nt 46-521
identifizierte und klonierte Sequenz, bovin	nt 132-599, 468+15 bp-Insert = 483 bp
identifizierte Sequenz, murin	543 bp
klonierte Sequenz = komplette cds inkl. Kozakkonsensussequenz, murin	nt 77-445, 123 AS

### Homologien

Das putative Protein von 42-9-9 zeigt auf ganzer Länge eine 41%ige AS-Identität zum *Drosophila melanogaster* Genprodukt CG11024 (Acc.-No. AAF52253) von 126 AS mit unbekannter Funktion. Die Frequenz positiver AS-Austausche beträgt sogar 61%, so dass diese Gene als Speziesvarianten oder zumindest direkt homolog gelten können. Zu einem weiteren *D. melanogaster* Protein von 135 AS (Acc.-No. AL035395) beträgt die Identität 32%, die Homologie 52% auf ganzer Länge, zu einem dritten Gen (Acc.-No. AE003426) liegt die Ähnlichkeit in dieser Grössenordnung.

Das Protein 42-9-9 ist ferner zwischen AS 39-107 31% identisch und 55% homolog mit dem 104 AS großen Thioredoxin von *Helicobacter pylorii* (Acc.-No. O25996).

Das Hydrophobizitätsprofil entspricht einem löslichen Protein mit einer 81%ig prädiktierten Lokalisation im Zytoplasma oder extrazellulär.

### Expressionsmuster

Im Northern-blot (siehe Abb. 15A) zeigte sich das Gen 42-9-9 3-fach hochreguliert in subkonfluenten BAEC im Vergleich zu arretierten. Es wurde prominent im Lebergewebe exprimiert und trat in einigen anderen der getesteten bovinen Gewebe mit geringerer Intensität auf (Muskel, Niere, Dünndarm, weniger im Uterus). Keine Expression nachweisen liess sich in Milz, Aorta und Herz. Durch den ovariellen Zyklus nahm die Expression stetig ab und war im Regressionsstadium (spät) gar nicht mehr nachweisbar.

Mittels PCR (Abb. 15C) liess sich 40-2-3 in allen überprüften humanen Geweben nachweisen (Blut und Mammatumoren A8/1, A4/3, A14, A17-1, A19), ebenfalls in allen Zelllinien, sowohl blutgefässkonstituierende in Kultur (HUVEC<sub>K</sub>, HMVEC, HSMC, HFibro) als auch in deren differenziertem Zustand (Sphäroide aus HUVEC, HSMC und HUVEC/HSMC in Cokultur) sowie in Tumoren (MCF7, Panc TU, U937).

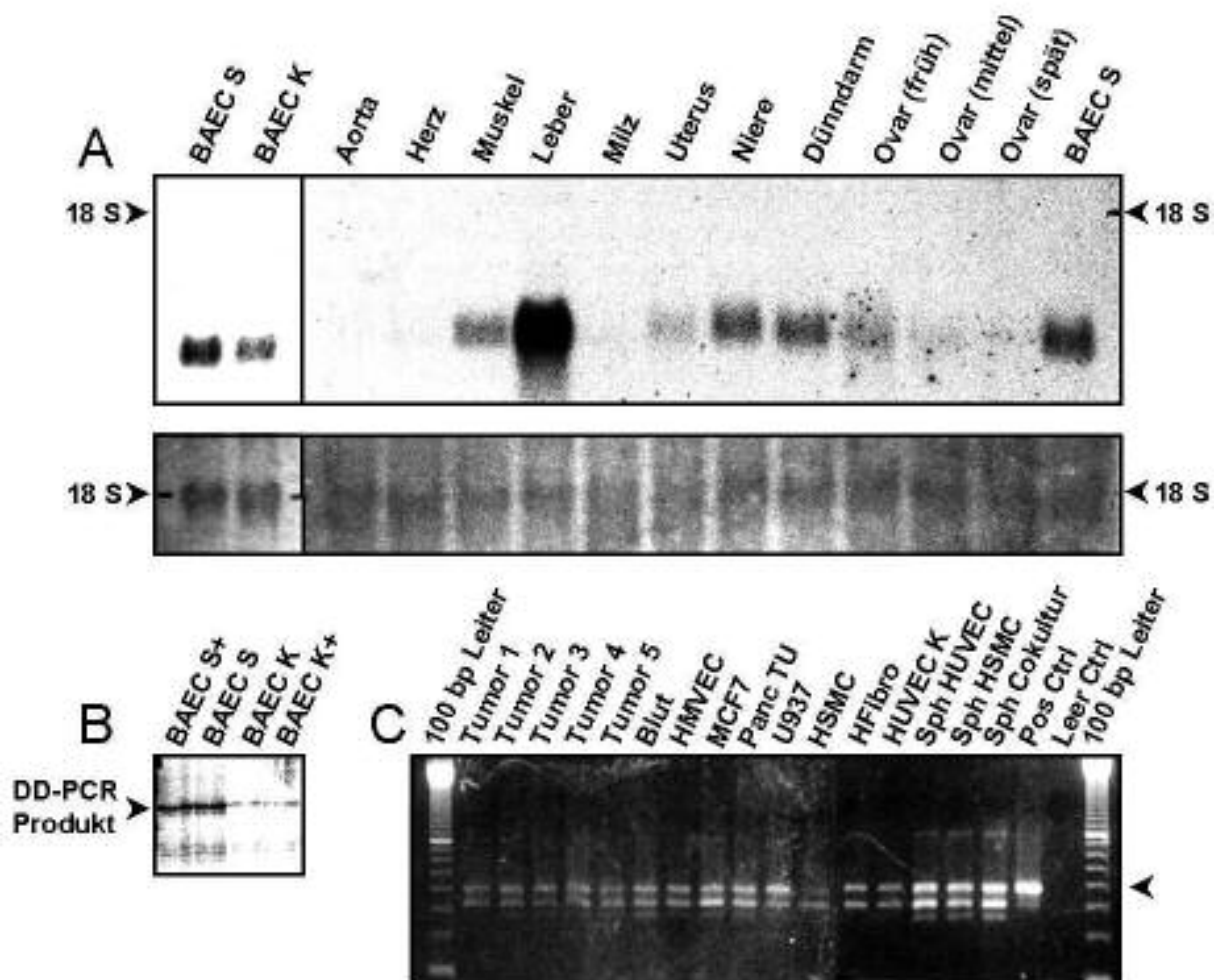


Abb. 15: 42-9-9 DD, Northern-blot und PCR-screening

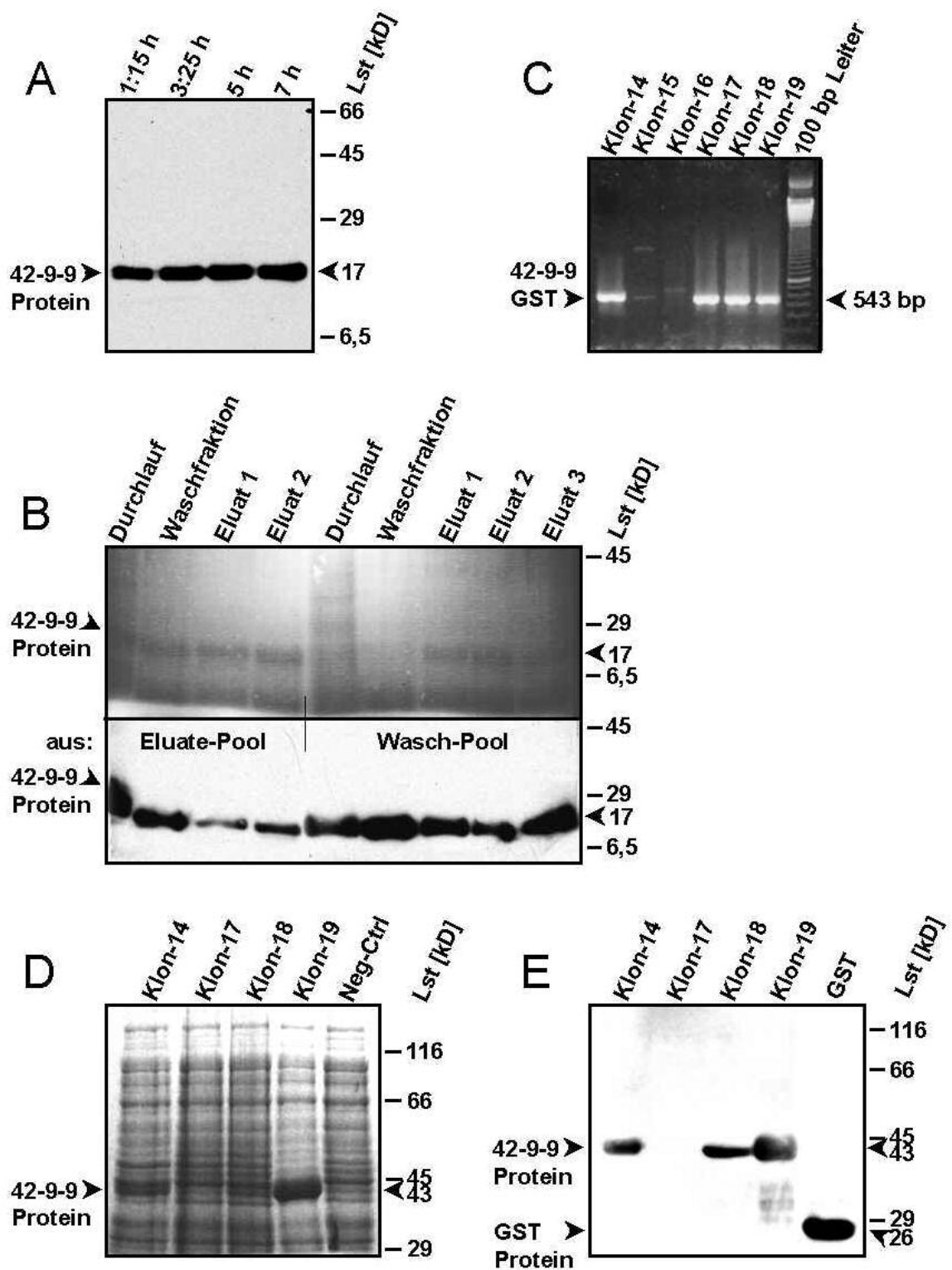
Abgebildet sind: **A)** der Verifikationsnorthern-blot an BAEC und der bovine Multigewebenorthern-blot mit den dazugehörigen Ladekontrollen (18 S-rRNA) sowie die Lage der 18 S rRNA (ca. 1,9 kb). **B)** die ausgeschnittene Bande aus dem DD-Gel. **C)** ein PCR-Screening der Expressionsmuster von verschiedenen humanen Mammatumoren und Zelllinien.

### **Proteinexpression**

Murines 42-9-9 wurde zur Expression in den His-Tag-Vektor pTrcHis2-TOPO kloniert. Der isolierte, zur Kontrolle zusätzlich subklonierte Klon 291-1-5-1 produzierte das Plasmid in korrekter Sequenz, exprimiert das Protein aber nur im Western-blot in nachweisbaren Mengen (wie auch bei 40-2-3, siehe Induktionsexperiment Abb. 16-A). Der Versuch einer His-Tag-Aufreinigung aus zusammen 4,5 l-*E. coli*-Kultur (reichhaltiges Medium) erbrachte nur etwa 500 µg Proteineluat mit guter Reinheit aus dem Eluatepool (doppelte Aufreinigung), brauchbarer Reinheit aus dem Waschpool (siehe Abb. 16-B). Die in etwa gleichstarken Signale in den Durchlauf- und Waschfraktionen der Affinitätsaufreinigung zeigen deutliche Verluste auf. Darüberhinaus ist das grundsätzliche Problem aber eine zu geringe Proteinexpression des Systems.

Alternativ wurde ein Expressionsvektor (pGEX-KG) zur Herstellung von GST-Fusionprotein verwendet. Obwohl die Expressionsklone M42-9-9 GST-14 und 17-19 in der Screening-PCR das korrekte 500 bp-Insert zeigen (siehe Abb. 16-C), wird das Protein nur von zwei Klonen (19 erheblich stärker als 14) so stark exprimiert, dass es im Coomassiegefärbten PAA-Gel deutlich hervortritt (siehe Abb. 16-D). Dies bestätigt der Western-blot, der zusätzlich noch Klon 18 als exprimierend identifiziert (siehe Abb. 16-E). Eingedenk der insuffizienten Proteinexpression im pTrcHis2-TOPO-Vektor wurde damit als aussichtsreichster Kandidat zur quantitativen Proteinaufreinigung M42-9-9 GST-19 ermittelt.

M42-9-9 Expressionsklon 251-1-5-1 (in pTrcHis2-TOPO-Vektor)	Fusionsprotein: 17 kD
muriner Expressionsklon M42-9-9 GST-19 (in pGEX-KG-Vektor)	Fusionsprotein: 43 kD



### Abb. 16: 42-9-9 Proteinexpression

- A) Induktionsexperiment des M42-9-9 Expressionsklones 251-1-5-1 (His-Tag-Vektor pTrcHis2-TOPO): Der Western-blot zeigt mit  $\alpha$ -c-myc detektiertes 17 kD-Protein aus dem Gesamtproteinzelllysate nach angegebenen IPTG-Stimulationszeiten.

- B) PAA-Gel (10%, reversible E-Zinc™-Färbung, obere Bildhälfte) und korrespondierender Western-blot (unten) der geschachtelten His-Tag-Affinitätsproteinaufreinigung von Subklon 251-1-5-1 aus gepoolten Eluaten von 5 Einzelaufreinigungen (linke Bildhälfte) und gepoolten Waschfraktionen aus 2 Einzelexperimenten (rechte Bildhälfte).
- C) Screening PCR: Das gesuchte 543 bp-Insert (Primer pGEX F/R) weisen die Expressionsklone M42-9-9 GST-14 und 17-19 auf.
- D) Expressionsklone M42-9-9 GST-14, 17-19: Coomassie-gefärbtes PAA-Gel des Gesamtprotein-zellysates nach Expression in *E. coli*. Nur Klon 19 exprimiert ein prominentes Protein in prädikierter Grösse des Fusionsproteins von 43 kD.
- E) Western-blot:  $\alpha$ -GST detektiert die Expression eines Proteins erwarteter Grösse von 43 kD in den Klonen M42-9-9 GST-14, 18 und 19. Zur Orientierung ist das 26 kD-GST-Tag mit aufgetragen.

### 3.4.5 Gen 67-11-3

67-11-3 beinhaltet zwei gegenläufige ORFs, dessen kleinerer mit 144 AS keinerlei Homologien im Datenbankabgleich zeigt. Da nur eine entfernte Homologie zur Kozakkonsensussequenz vorliegt, bleibt eine Expression des Proteins rein hypothetisch.

Der grössere ORF von 328 AS birgt noch drei weitere Startcodons (ATG). Da keines davon eine exakte Kozakkonsensussequenz aufweist wird das erste 5'-ständige Methionin als Translationsstartpunkt angenommen (entsprechend der *adherence to the 1st AUG rule*; Kozak, 1995) und die cds entsprechend angegeben. Alternativ dazu zeigt das genedwärts liegende letzte Initiationscodon am ehesten eine Kozaksequenzhomologie und wurde daher als Variante auch aufgeführt, so dass für das putative Protein eine Grösse zwischen 292 und 328 AS prädiktiert wird.

Nach Abschluss der experimentellen Arbeiten wurde 67-11-3 im Rahmen des Human-Genom-Projektes als cDNA (Acc.-No. AK000572) eines neuen Proteins (BAA91263.1) unbekannter Funktion identifiziert. Der ORF ist bis auf einen AS-Austausch identisch, jedoch im 3'-UTR verlängert es die DB-Sequenz um 194 bp, während diese im 5'-UTR 369 bp hinzufügt, so dass sich insgesamt 1947 bp humane Sequenz zusammensetzen lassen. Die Grösse der cDNA im Northern-blot (bovin und human) liegt im Gegensatz dazu aber bei 1,6 kb.

Die Datenbankrecherche ergab ausserdem die Homologie eines Proteinbereichs in der cds zu einer kommerziellen murinen Knockoutstammzelllinie (OST). Zum einen weist dies die tatsächliche Expression des Gens in dieser Orientierung nach, zum andern eröffnet sich damit die Möglichkeit weiterer Charakterisierung der Funktion (siehe Tab. 8).



**Identität**

cDNA FJ20565 fis, unbenanntes Protein AK000572, human	1755 bp
mRNA-Gesamtgrösse (Northern-blot, bovin und human)	1,6 kb
aus ESTs identifizierte Sequenz, human	1577 bp
komplette cds, human	nt 133-1116, 328 AS
cds, 2. Alternative	nt 241-1116, 292 AS
2. ORF mit Startcodon in gegenläufiger Orientierung, human	nt 972-541, 144 AS
klonierte Sequenz, human	nt 37-1500

identifizierte und klonierte Sequenz, bovin nt 562-962, 401 bp

klonierte Sequenz = putativ komplette cds, murin  
nt 241-1116, +6 AS Insert, -2 AS Deletion: 296 AS

**Homologien**

Das Protein von 67-11-3 zeigt auf ganzer Länge und beginnend am Startmethionin eine etwa 30%ige AS-Identität und 47%ige Frequenz positiver AS-Austausche zu zwei Genprodukten von *Caenorhabditis elegans* mit 339 AS (Acc.-No. T25204) und *Drosophila melanogaster* mit 726 AS (Acc.-No. AE003791). Zwei weitere Gene von *Saccharomyces cerevisiae* mit 271 AS (Acc.-No. NP\_011769.1) und *Schizosaccharomyces pombe* mit 284 AS (Acc.-No. AL133498) liegen bei einer Identität von 27% und etwa 45% positiver AS-Austausche, gemittelt über die Sequenzlänge. Diese Gene können als Speziesvarianten oder zumindest als direkt homolog gelten.

Das Hydrophobizitätsprofil entspricht einem löslichen Protein mit einer 82%ig prädiktierten subzellulären Lokalisation im Zellkern.

OST 39315, murine Stammzelllinie, Knockoutbereich: nt 641-962, AS 170-209

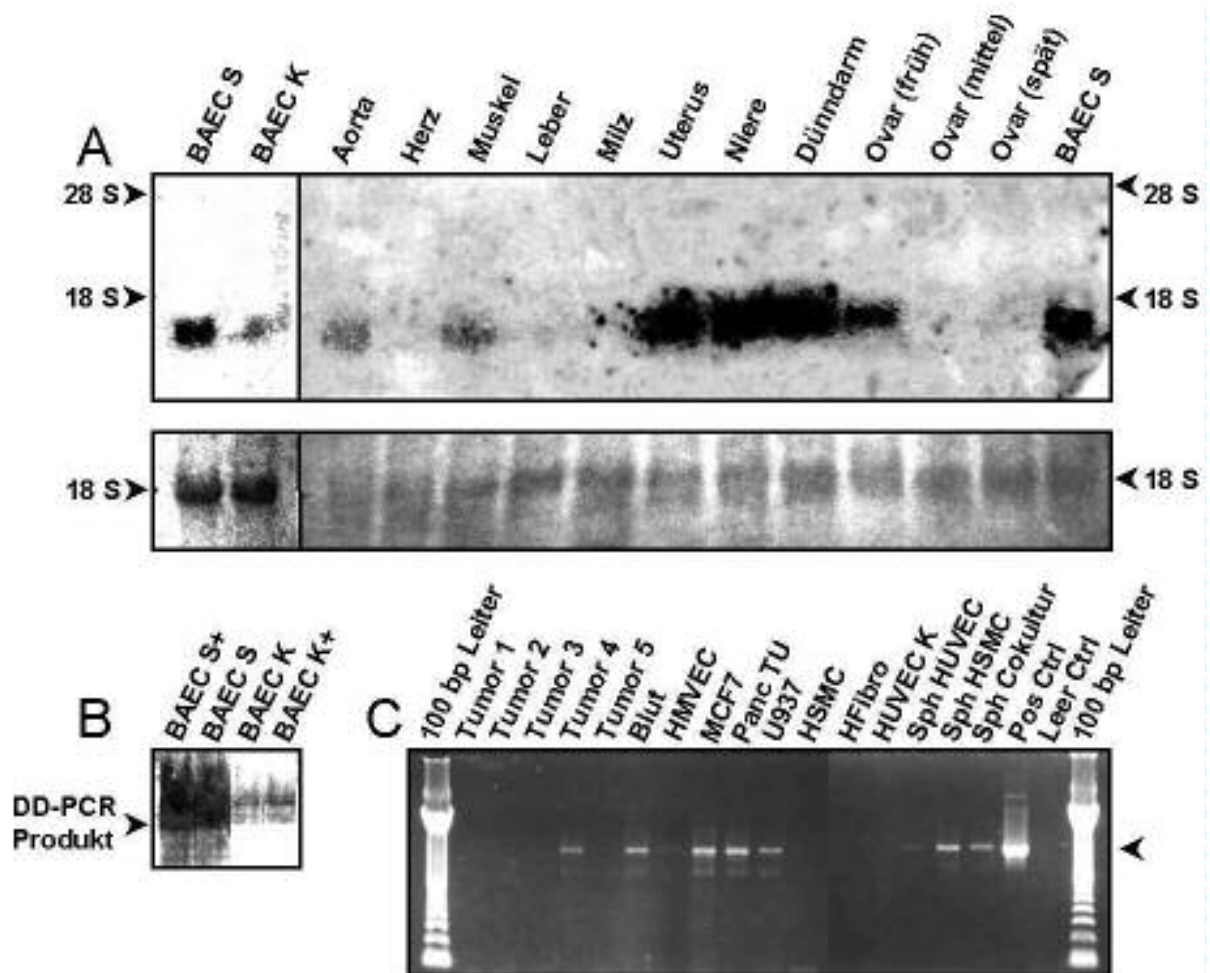
**Expressionsmuster**

67-11-3 wird von den vorgestellten Genkandidaten bei weitem am schwächsten exprimiert. Im Northern-blot (siehe Abb. 17A) zeigte sich das Gen 67-11-3 4-fach hochreguliert in subkonfluenten BAEC im Vergleich zu arretierten. Es wurde in bovinem Gewebe auf schwachem Niveau prominent in Uterus, Niere und Dünndarm exprimiert und war in Aorta und Muskelgewebe gerade noch nachweisbar (nicht in Herz, Leber, Milz). Ausschliesslich das frühe Ovarstadium, mit massiver Angiogenese assoziiert, zeigte 67-11-3 Expression.

67-11-3 zeigt im initialen PCR-Screening (Abb. 17C) eine exklusive Expression im humanen Mammatumor A17-1 (nicht in A8/1, A4/3, A14, A19). Ferner liess sich 67-11-3 in Blut und

allen Tumorzelllinien nachweisen (MCF7, Panc TU, U937). Ausser in HMVEC (an der Nachweisgrenze) war es in keiner blutgefässkonstituierenden Zelllinie detektierbar (HSMC, HFibro, HUVEC<sub>K</sub>).

Auffällig ist, dass 67-11-3 sich weder in HUVEC<sub>K</sub> noch HSMC nachweisen lässt, wohl aber in Sphäroiden aus diesen Zelltypen, einzeln oder in Kokulturen (in HUVEC-Sphäroiden an der Nachweisgrenze). Das deutet auf eine Expression in zunehmend matur differenzierten Zellen hin. Im Gegensatz dazu steht die Induktion durch Aktivierung (BAEC<sub>S</sub>, exklusiv im frühen massiv angiogenen Ovarstadium) sowie die Expression in den immortalisierten Zelllinien. Dieses uneinheitliche Bild spiegelt die differentielle Expression in humanen Mammatumoren.



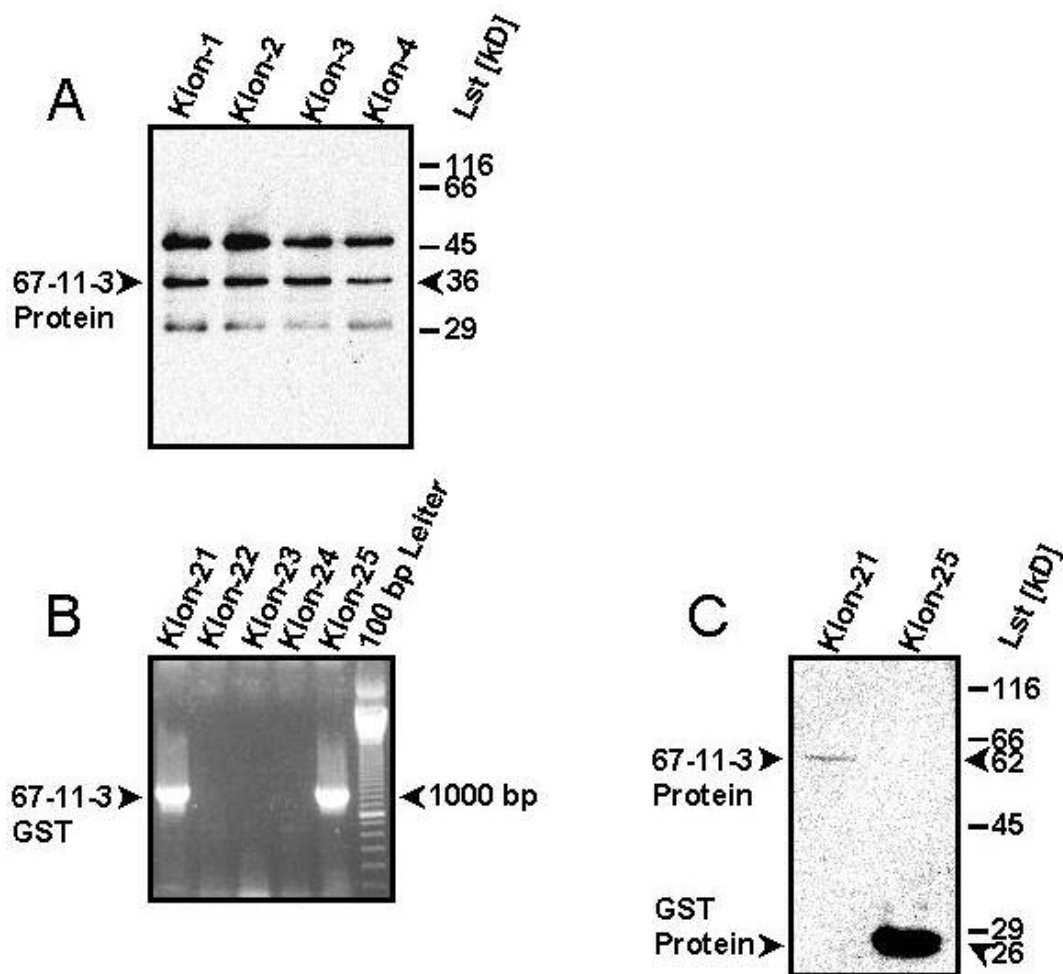
**Abb. 17: 67-11-3 DD, Northern-blot und PCR-screening**

Abgebildet sind: **A)** der Verifikationsnorthern-blot an BAEC und der bovine Multigewebenorthern-blot mit den dazugehörigen Ladekontrollen (18 S-rRNA) sowie die Lage der 28 S (ca. 4,9 kb) und 18 S rRNA (ca. 1,9 kb). **B)** die ausgeschnittene Bande aus dem DD-Gel. **C)** ein PCR-Screening der Expressionsmuster von verschiedenen humanen Mammatumoren und Zelllinien.

### **Proteinexpression**

Zur Fusionsproteinherstellung wurde M67-11-3 in alle drei verwendeten Expressionsvektoren kloniert, ohne über den Western-blot hinausgehend eine detektierbare Expression zu erzielen. Bei den beiden His-Tag-basierten Systemen traten unabhängig drei Banden ungeklärter Herkunft auf, deren mittlere der prognostizierten Grösse von 36 kD entsprach (siehe Abb. 18-A).

Von zwei PCR-identifizierten Klonen im GST-System (siehe Abb. 18-B) exprimierte nur einer ein Protein erwarteter Grösse von 62 kD, allerdings so schwach, dass es sich selbst im Western-blot an der Nachweisgrenze befand (siehe Abb. 18-C). Für diese eigentümlich schwachen Expressionslevel konnte keine Erklärung gefunden werden. Weder konnten zytotoxische Phänomene beobachtet werden, noch ist eine Sezernierung des in prokaryontischen *E. coli* synthetisierten Proteins in Ermangelung funktioneller Signalpeptidsequenzen denkbar. Somit bleibt die Konstruktion eines Überexprimierenden Klones noch offen.



### Abb. 18: 67-11-3 Proteinexpression

- A)** Screening verschiedener Expressionsklone im Westernblot:  $\alpha$ -*c-myc* detektiert in 4 verschiedenen pTrcHis2-TOPO-Klonen (ebenso wie  $\alpha$ -V5 in einem pCR T7/CT-TOPO-basierten Klon, ohne Abb.) 3 distinkte Banden ungeklärter Herkunft, deren mittlere nur der erwarteten Grösse des Fusionsproteins von 36 kD entspricht.
- B)** Screening PCR: Die Expressionsklone M67-11-3 GST-21 und 25 weisen das gesuchte ca. 1000 bp-PCR-Produkt auf.
- C)** Western-blot:  $\alpha$ -GST detektiert in Klon M67-11-3 GST-21 die Expression eines Proteins erwarteter Grösse von 63 kD. Klon 25 exprimiert hingegen nur das GST-Tag von 26 kD, was auf einen Insertionsfehler des Leserasters schliessen lässt.

## 4. DISKUSSION

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der mittels Differential Display-PCR identifizierten Gene diskutiert, gruppiert in bekannte und unbekannte Kandidaten. Dabei werden ebenso systematische Charakteristika der Ergebnisse herausgearbeitet als auch konkret eingegangen auf die einzelnen Moleküle, fokussierend auf die isolierten neuen Gene.

Hervorgegangen aus vorliegendem Projekt wird aber zunächst eine kritische Reflexion von Leistungen und Limitationen der Methode ‚DD‘ selbst vorangestellt, eingebettet in eine Übersicht einschlägiger Arbeiten. Im Ausblick schliesslich wird der Nutzen alternativer Identifikationsverfahren regulierter Gene besprochen, sowie der Trend gegenwärtiger Fragestellungen analysiert.

### 4.1 METHODENKRITIK

Ausgehend von der originären Differential Display-PCR (DD) von Liang & Pardee (1992) wurden inzwischen eine fast unüberschaubare Vielzahl an Protokollen und Optimierungen publiziert. Sie adressieren Limitationen der Methode selbst, bieten aber auch Varianten bezüglich technischer Ausstattung oder spezifischer Fragestellungen. Nachfolgend werden die mit der Methode verbundenen Komplikationen diskutiert und mit den eigenen Ergebnissen zusammengeführt, problemzentriert nach Falsch-Positivrate, Arbeitsaufwand und *bias*, die aber letztlich eng miteinander zusammenhängen.

#### **Falsch-Positivrate**

Die Verwendung der PCR zur Quantifikation ist durch deren exponentiellen Verstärkungseffekt generell fehleranfällig. Daher ist eine Kontrolle der im DD festgestellten Regulation über die simple Reproduktion des Experimentes hinaus erforderlich. Zu diesem Zweck wurde die DD-Regulation mit einem linearen Hybridisierungsverfahren überprüft, dem Northern-blot. Dabei liess sich die Regulation von 55% der Kandidaten (47 von 86) bestätigen. Kozian (1996) verifizierte in einer vergleichbaren Arbeit aus reproduzierten DDs 45% (9 von 20) nach Northern-blotkontrolle, Wan *et al.* (1996) 49% (39 von 80), Linskens *et al.* (1995) 36% (23 von 64), Tiao *et al.* (1996) und Yang *et al.* (1996) sogar nur 7% (2 von 30) bzw. 6% (2 von 35). Die erreichte Verbesserung in dieser Arbeit gründet mutmasslich in der Verwendung eines optimierten PCR-Systems: Aufgrund der stringenten PCR-Phase in Verbindung mit

entsprechend konzipierten Primern mit Ankersequenz wurde in der vorliegenden Arbeit die höhere Reproduzierbarkeit erzielt (vgl. Linskens *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1995; Malhotra *et al.*, 1998).

Schon die Reproduktion der DD-Amplifikation ( $n = 2$ ) führte bei Kozian (1996) zum Ausschluss mehr als der Hälfte der im ersten Durchgang differentiell reamplifizierten DD-Fragmente (20 von 45 = 44% DD-reproduziert) und unterstreicht die Notwendigkeit dieses Schrittes. Der Nachteil liegt in der vergleichsweise hohen Anzahl von DD-Gelen, kann aber gerechtfertigt werden durch die Einsparung vergeblicher Extraktions-, Reamplifikations-, Klonierungs- und Northern-blotschritte.

Miele *et al.* (1998) identifiziert für 75% seiner Reamplifikate aus dem DD mehr als ein PCR-Produkt gleicher Grösse, die er für die hohe Fehlerrate verantwortlich macht. Um sie zu eliminieren, schaltet er einen modifizierten *single-strand conformation polymorphism*-Amplifikationsschritt (mSSCP) mit Zufallsprimern und einem Oligo-dT-Primer ein, der zwischen Fragmenten ähnlicher Grösse mit unterschiedlicher Sequenz differenziert und bei dem das regulierte Molekül vereinzelt und autoradiographisch identifiziert wird. Anschliessende Elution, erneute Reamplifikation und Klonierung führte dort zu 90% per Northern-blot bestätigten, regulierten Kandidaten. Anstelle der eingeschobenen mSSCP-Autoradiographie ggf. mehrere Klone im Northern-blot zu testen (wie in der vorliegenden Arbeit), dürfte allerdings auf einen vergleichbaren Aufwand hinauslaufen.

Wie die zitierten Quoten deutlich zeigen, bleiben die trotz aller Bemühungen isolierten unregulierten Fragmente eine wesentliche Limitation des DD, die nur durch eine ausreichend hohe Zahl bearbeiteter Fragmente kompensiert werden kann, also entsprechenden Aufwand verursacht.

### **Experimenteller Aufwand, Procedere**

Zur Reduzierung des mit der Durchführung einer grossen Anzahl von PAA-Gelen verbundenen Aufwandes wurden alternative Protokolle basierend auf ethidiumbromidgefärbten Standard-Agarosegelen vorgeschlagen (Sokolov & Prockop, 1994; Rompf & Kahl, 1997), die allerdings wegen eingeschränkter Trennleistung und daraus resultierenden Fragmentgemischen bei der Extraktion (s.u.) bislang keine grössere Verbreitung fanden. Ebenso wenig durchsetzen konnten sich nicht-radioaktive Detektionsverfahren wie Chemiluminiszenz (An

*et al.*, 1996), Colorimetrie (Chen & Peck, 1996) oder klassische Silberfärbung (Lohmann *et al.*, 1995), da mit ihnen weder eine Arbeitersparnis noch eine Sensitivitätssteigerung verbunden war. Vreugdenhil *et al.* (1996) schlägt schliesslich eine Aufwandsreduzierung durch DD-Automatisierung vor, wiederum verbunden mit apparativem Zusatzaufwand.

Eine weitere Limitation des DD ist die hohe Northern-blotanzahl und der damit verbundene experimentelle Aufwand, der zur Bestätigung der Regulation notwendig ist: Zur Beurteilung der 86 reamplifizierten Fragmente wurden insgesamt 161 Northern-blots angefertigt, pro Kandidat also fast zwei Experimente, wofür folgende Ursachen in Betracht kommen:

Für die verifizierenden Northern-blots wurden zunächst reamplifizierte DD-Genfragmente direkt als Sonde verwendet. Das wiederholte Auftreten von Mehrfachbanden bzw. unspezifischen Signalen liess vermuten, dass sich hinter einer Bande multiple Reamplifikate mehrerer Moleküle gleicher Grösse (mit identischen Primerbindungsstellen) verbergen, was Miele *et al.* (1998) auf 75% seiner Reamplifikate beziffert, Buess *et al.* (1997) hingegen nur auf 20%. Darin spiegeln sich Unterschiede in der der Gel-Auftrennung, die Exaktheit beim Ausschneiden der Banden sowie DD-Produktvielfzahl und –Spezifitäten resultierend aus den verwendeten Amplifikationssystemen.

Zur Vereinzelung wurde im weiteren Verlauf der Experimente erst ein Klonierungsschritt eingeschaltet und dann der einzelne Klon als Sonde für den Northern-blot verwendet, folglich falsch-positive Ergebnisse aufgrund unreiner Sonden vermieden. Auf diese Weise konnten auch aus Reamplifikationsgemischen (mehrere Banden oder unspezifische Produkte) einzelne Fragmente isoliert werden. Zusätzlich entfiel die Reproduktion des Northern-blotexperiments mit Einzelklonen im Falle bestätigter Regulation nach einem direkten Reamplifikations-northern-blot. Dafür mussten ggf. mehrere Klone im Northern-blot überprüft werden, so dass sich nur eine geringfügige Senkung der Gesamtanzahl durchzuführender Experimente ergab. Dieses Vorgehen beugte zudem Sequenzierproblemen durch Fragmentgemische vor, so dass sich sämtliche klonierte Fragmente sequenzieren liessen, im Gegensatz zu den Reamplifikaten. Dies mag aber neben den auftretenden Fragmentgemischen auch in der etwas geringeren Reinheit der Reamplifikate im Vergleich zur aufgereinigten Plasmid-DNA begründet liegen. Die hohe Anzahl von Experimenten gründet aber auch in Wiederholungen, die teilweise bei nicht auswertbaren Ergebnissen durchgeführt wurden. Zusammenfassend dürfte in dieser Arbeit der Prozentsatz multipler Reamplifikate eher an der unteren zitierten

Grenze rangieren, wenn auch die abschliessende Klärung dieser Frage die Auswertung sämtlicher Subklone voraussetzte.

Obwohl es nur sinnvoll ist, tatsächlich regulierte Kandidaten weiterzubearbeiten, liessen methodische Erwägungen von dieser Kausalitätsreihenfolge teilweise abweichen: Die unaufwendigeren automatisierten Sequenzierungen erbrachten ‚über Nacht‘ schneller Ergebnisse als die Northern-blots, so dass sich bei gleichzeitigem Start der Experimente in der Serie die Reihenfolge umkehrte. Auf der Suche nach neuen Genen konnten durch vorgezogene Sequenzierungen die Kandidaten bekannter Identität ausgegrenzt, sowie Doppelbestimmungen einiger Klone unterbunden werden.

Buess *et al.* (1997) und Martin *et al.* (1998) verfolgen in ihren Arbeiten die Strategie direkter Sequenzierung der DD-Reamplifikate und Datenbankidentifikation, bevor die Regulation per Northern-blot verifiziert wird. Während ersterer den Klonierungsschritt ganz einspart und mit den DD-Primern erst direkt sequenziert und dann PCR-Produkte direkt als Sonde markiert, führt letzterer diesen nur im Falle unlesbarer Sequenzierungsergebnisse durch, die auf ein Fragmentgemisch schliessen lassen. Insgesamt 21% der Kandidaten mussten aufgrund nicht lesbarer Sequenzierungen (14%) oder wegen fehlender DB-Homologien dennoch kloniert werden. Linskens *et al.* (1995) beziffert die Zahl nicht direkt sequenzierbarer Reamplifikate sogar nach deren Aufreinigung (Primerentfernung) auf 50%. Weiter stellt Martin *et al.* (1998) fest, dass heterogene Sonden (aus nicht klonierten DD-Reamplifikaten) zur falsch-negativen Einstufung führen können, zumal testweise verglichene Regulationen bei Klonsonden um ein Vielfaches höher lagen. Das Auslassen der Klonierung führte auch nach eigenen Erfahrungen zu Sequenzier- und Northern-blotproblemen, so dass eine Vielzahl von Experimentwiederholungen die vermeintliche Arbeitseinsparung zunichte machten.

Zur Kontrolle der Regulation verwendet Martin *et al.* (1998) „Hybridisierungs-Arrays“, sozusagen „reverse Northern-blots“: Ein PCR-Produkt des jeweiligen Kandidaten aus einem genspezifisch abgeleiteten, synthetisierten Primer und einem DD-Anchorprimer wird in Verdünnungsreihe parallel auf mehrere Membranen aufgetropft, die dann gegen radioaktiv markierte cDNAs der zu vergleichenden Zustände hybridisiert werden. Es folgt eine densitometrische Auswertung und Normalisierung anhand von mitgeladenen *housekeeping*-Genen sowie eine Ladekontrollhybridisierung. Durch derartige Arrays können viele Kandidaten in einem Hybridisierungsexperiment überprüft werden: interessant für Frage-



stellungen, wo wegen geringer RNA-Ausbeute Northern-blots kaum realisierbar sind. Diesem Vorteil steht ein erheblicher Aufwand durch die exakte Arraypräparation und die Primersynthese entgegen. Dies berücksichtigt, relativiert sich die bemerkenswerte Falsch-Positivrate von 5-10%. Sie reflektiert geeignete DD-PCR Bedingungen und exakte Exzision der Fragmente, ist aber unabhängig vom verwendeten Hybridisierungsverfahren zur Regulationsverifikation. Unklar bleibt hingegen die Ursache für die hohe Quote von 60 identifizierten regulierten Genen aus 104 Banden bei Martin *et al.* (1998); gemessen an vorliegender Arbeit (35 Gene aus 86 Reamplifikaten aus 107 Banden) fast die doppelte Genanzahl.

Die Notwendigkeit der Regulationskontrolle ergibt sich aber auch bei alternativen Verfahren wie der Subtraktiven Hybridisierung, SAGE oder Arrays. Zum Teil werden in anderen Arbeiten Northern-blots umgangen und durch Expressionsanalysen wie der semiquantitativen RT-PCR (Ikonomov & Jacob, 1996; Soo *et al.*, 1999) oder *in situ*-Hybridisierung ersetzt (St Croix *et al.*, 2000). Erstere setzen die aufwendige Etablierung einer entsprechenden PCR für das nachzuweisende Gen voraus (spezifische Amplifikation an gesamt-cDNA ohne Nebenprodukte!), die zudem den allgemeinen Quantifizierungsungenauigkeiten beim Einsatz exponentieller Amplifikation unterliegt. Spencer & Christensen (1999) entwickelten in diesem Zusammenhang eine praktikable Multiplex RT-PCR zum Screening, bei der das Genamplifikat zyklusabhängig gegen ein koamplifiziertes Kontrollgen (18S rRNA der Ratte) im EtBr-Agarosegel densitometrisch normalisiert wird und eine relative Quantifizierung erlaubt, allerdings ohne erkennbare Arbeitseinsparung. Letztere hybridisierungsbasierte Quantifikationen liefern zusätzlich noch spezifische Expressionsmuster, sind aber noch erheblich aufwendiger in der Durchführung und erscheinen daher erst für validierte und identifizierte Kandidaten gerechtfertigt.

Ausgehend von im Gendatenbankabgleich gefundenen Sequenzabschnitten (ESTs) fehlt die zur Integration der Gesamtsequenz essentielle Grösseninformation aus dem Northern-blot, die ein ähnlich aufwendiger, aber weniger sensitiver Dot-Blot ebenfalls nicht liefert. Damit erweisen sich diese alternativen Verifikationsstrategien als ungünstig für die Identifikation unbekannter Gene. Weder Klonierung noch Northern-blot sind folglich entbehrlich, auch

wenn die praktische Reihenfolge von Northern-blot und Sequenzierung nicht eindeutig festzulegen ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass kein alternatives DD-Verfahren mit verhältnismässigem Aufwand vorliegt, welches eine niedrigere Falsch-Positivrate erzeugt oder eine vergleichbare bei geringerem Aufwand als in vorliegender Arbeit.

### **Redundanz und *bias***

Wan *et al.* (1996) ordnet 99% der mRNAs mit einer Kopienzahl bis 300 pro Zelle in die Kategorie ‚selten‘ ein. Diese 99% machen aber nur 50% der gesamten mRNA-Masse aus, so dass die andere Hälfte der mRNA-Masse einer gegebenen Zelle auf die mittel bis stark exprimierten Spezies entfällt. Damit ist zu erwarten, dass das Screeningverfahren DD-PCR, basierend auf Zufallsbindungen unter unstringenten Bedingungen, mit erheblich höherer Wahrscheinlichkeit häufige Moleküle identifiziert - und diese in Folge dessen redundant.

Nach Ledakis *et al.* (1998) führt die initiale Bindung der Primer unter unspezifischen Bedingungen zu degenerativer Amplifikation von erheblich weniger Genen, als es die Bandenanzahl suggeriert, also einer Unterrepräsentation und Redundanz der mRNA-Signale bei gleichzeitigem *bias* zugunsten hochfrequent vertretener *housekeeping*-Gene. In der vorliegenden Arbeit wurden diese ubiquitären, stark exprimierten Gene eben nicht identifiziert, was die Wahl geeigneter spezifischer Reaktionsbedingungen und Primer belegt. Von den insgesamt 35 verschiedenen regulierten Genen wurden 4 (entsprechend 11%) zwei- oder dreifach identifiziert. Wan *et al.* (1996) ermittelt beispielsweise 41% (16 von 39) Redundanzen. Da in allen Fällen der Mehrfachidentifikation in vorliegender Arbeit mit einem jeweils übereinstimmenden DD-Primer (derselbe P oder T-Primer) amplifiziert wurde, wobei z.T. DD-Produkte unterschiedlicher Grösse und Lage bezogen auf das entsprechende Gen auftraten, kann der methodenimannente Redundanzeinwand nur bedingt als bestätigt gelten. Da kein Produkt auffiel, bei dem nur einer der beiden eingesetzten Primer das DD-Produkt allein amplifiziert hatte, ist diese denkbare Monoprimeramplifikation als Erklärung unwahrscheinlich. Bei längeren Produkten wurden aber in der Regel für bekannte Gene nicht beide Klonenden sequenziert, sondern via Datenbank ergänzt, so dass im Einzelfall der tatsächliche Gegenprimer ungeklärt ist.

Ein weiterer Grund für die systematische Unterrepräsentation schwach exprimierter Gene ist deren erschwerte Nachweisbarkeit im Northern-blot. Entsprechend einer Zusammenfassung mehrerer Studien in Ledakis *et al.* (1998) wurden unter Standardbedingungen mit 10-20 µg eingesetzter Gesamt-RNA im Mittel 86% der isolierten DD-Signale im Northern-blot überhaupt detektiert, was die in dieser Arbeit ermittelte Quote von 87% genau bestätigt. Dies führt zwangsläufig dazu, dass die seltenen Transkripte, die nicht notwendigerweise schwach reguliert sind, zuerst herausfallen oder umgekehrt formuliert, zuletzt entdeckt werden.

Obwohl also einige Autoren auf das begrenzte Potential des DD hinweisen, in geringer Frequenz vertretene cDNAs aufzuspüren (z. B. Bertioli *et al.*, 1995; Ikonomov & Jacob, 1996; Wan *et al.*, 1996; Ledakis *et al.*, 1998), konnte in dieser Arbeit eine Reihe entsprechender Kandidaten identifiziert werden. Bemerkenswerterweise gehören die bekannten Gene ausschliesslich zu den stark exprimierten Genen (Ausnahme: 72-1-3 = 72-2-4 wurde erst nach Abschluss der Arbeiten als hypothetisches Protein FLJ20276 identifiziert); umgekehrt wird mehr als 1/3 der neuen Gene (7 von 17) laut Northern-blot schwach exprimiert. Damit liegt der Schluss nahe, dass die aufgrund starker Expression auffälligen Gene überwiegend schon identifiziert sind.

Dabei liegt die Quote von 47 isolierten Molekülen mit tatsächlich nachgewiesener Regulation aus 36.000 durchgemusterten Banden ( $n = 1$ , vgl. 3.2) im Bereich der Literaturwerte. Bauer *et al.* (1993) nennt 70 aus 38.000 Banden. Auch die Anzahl von 107 differentiell exprimierten Banden aus 90 Primerkombinationen liegt im angegebenen Rahmen von Graf *et al.* (1997) mit 100 Banden aus 60 Primerkombinationen. Somit wurde die Identifikation schwach exprimierter Moleküle nicht durch eine erhöhte Falsch-Positivrate erkauft im Sinne unkritischer Auswahl einer Vielzahl von Banden, sondern unterstreicht die Leistungsfähigkeit des etablierten, optimierten Amplifikationssystems.

Immerhin erscheint die absolute Anzahl regulierter Moleküle bezogen auf die Gesamtzahl gemusterter Banden gering. Von angenommenen 50.000-150.000 Genen<sup>1</sup> des humanen Genoms werden etwa 10.000-25.000 in einem (von etwa 200) gegebenen Zelltyp exprimiert<sup>2</sup>. Derzeit wird etwa 5-10% aller Gene des Genoms eine spezifische Funktion zugeschrieben, so dass demzufolge nur eine Minderheit der differentiell exprimierten Gene in EC bekannt ist (de Waard *et al.*, 1999). Ausgehend von 100.000 genomischen Genen entsprechen 10% mit spezifischer Funktion aufgeteilt auf 200 Zelltypen (ohne Redundanzen) etwa 50 regulierten Genen, eine sicherlich zurückhaltende Überschlagung, obwohl die von de Waard *et al.* (1999) tatsächlich ermittelte Anzahl von 56 Genen aus 12.000 humanen EC SAGE-Tags (entspricht 1% der 5448 korrespondierenden distinkten Gene; SAGE-Technik wird besprochen unter 4.4) gut darauf zutrifft. Auch St Croix *et al.* (2000) findet in der Analyse von insgesamt 193.000 SAGE-Tags humaner ECs aufgereinigt aus colorektalem Tumorgewebe versus Normalgewebe desselben Patienten nur 79 differentiell exprimierte Spezies. Bezogen auf die repräsentierten 32.703 Einzelgene<sup>2</sup> entspricht das 2,4%. Ebenfalls vergleichbar sind die Ergebnisse von Wan *et al.* (1996), nach denen mithilfe dreier verschiedener Screeningverfahren (mit geringer Überlappung) die Identifikation von insgesamt nur 59 regulierten Kandidaten aus angenommenen 24.000 exprimierten Genen in HeLa-Zellen gelang. Iyer *et al.* (1999) ermittelte mit 517 verschiedenen regulierten Gen-Klonen aus 8600 im DNA-Array getesteten, entsprechend 6%, erheblich mehr Kandidaten, allerdings ohne Angabe darüber, wieviele davon in den untersuchten Zellen überhaupt exprimiert wurden. Hochgerechnet auf 24.000 Gene ergeben sich rund 1500 regulierte Spezies. Als zusätzliche Variable muss

---

<sup>1</sup> Sämtliche Angaben der Genanzahl des humanen Genoms in der Literatur basieren auf Schätzungen und differieren mitunter beträchtlich (Review von Fields *et al.*, 1994). Die aktuellen Zahlen aus dem HGP von 11/2000 ordnen die knapp 2,7 Millionen humanen ESTs derzeit 86.213 distinkten Genen der UniGene-Cluster-Datenbank des NCBI zu, was einem Wert im mittleren Bereich entspricht. Diese Gencluster müssen aber noch experimentell validiert werden. Einer Pressemitteilung des HGP von 6/2000 zufolge ist dies für 38.000 Gene bereits erfolgt. Zum einen werden sich voraussichtlich nicht alle Cluster validieren lassen und einige sich noch zusammenfügen, zum anderen steht die Identifikation neuer ESTs / Cluster bis zur endgültigen Auswertung des HGP noch aus.

Das Problem bei der theoretischen Genprädiktion aus genomischer Sequenz besteht in der Zuordnung des Promotors (variabel in Abstand und Sequenz) zur cds, die sich zudem aus mehreren Exons, also ORFs zusammensetzen kann, die wiederum nur bei fehlerfreier Sequenz korrekt identifizierbar sind.

<sup>2</sup> Alberts *et al.* (1989): 10.000-15.000, Bauer *et al.* (1993): 15.000, Fields *et al.* (1994): 15.000-20.000, Miklos & Rubin (1996): 10.000 (15% des Genoms), Wan *et al.* (1996) aus Holland *et al.* (1980): 24.000 mRNAs für HeLa-Zellen, BodyMap (Homepage: <http://bodymap.ims.u-tokyo.ac.jp/>) / Hishiki *et al.* (2000) zitiert Bishop *et al.* (1974): 10.000-20.000. Obwohl sämtliche Angaben in vergleichbarer Größenordnung rangieren, ist deren Aktualität fraglich, da sie vor dem HGP datieren. St Croix *et al.* (2000) ermittelte jüngst nach zurückhaltender Abschätzung 33.000 SAGE-Tags in EC, liess dabei aber Redundanzen unberücksichtigt.

allerdings die schwer einzuschätzende Abhängigkeit vom jeweiligen biologischen Phänomen berücksichtigt werden.

Gängigen Kalkulationen zufolge wird in DD-Arbeiten mit etwa 300-450 (Wan *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1998) theoretisch zu identifizierenden regulierten Genen gerechnet.

Demnach wären mit 107 regulierten Banden in der vorliegenden Arbeit nur ein Bruchteil der regulierten Gene im DD dargestellt und davon schliesslich nur etwa 23% (35 von erwarteten 150) der einseitig (hoch-) regulierten Gene identifiziert worden, ein Umstand, der sowohl auf die angeführte systematische Unterrepräsentation schwach exprimierter Gene in den Libraries und Datenbanken hindeutet als auch auf einen entsprechenden methodischen *bias* bei der DD-PCR-Amplifikation und Expressionsverifikation. Andererseits entspricht dies genau der Grössenordnung der o.g. SAGE-Projekte von de Waard *et al.* (1999) und St Croix *et al.* (2000).

Die Bemühungen, im nächsten Schritt aus ESTs komplette Gene zu rekonstruieren, scheiterte für die meisten der neuen Gene (11 von 16 = 69%, 5 davon sind schwach exprimiert) aufgrund unvollständiger EST-Datenbanken. Nur ein Gen (67-11-3) der insgesamt 7 Kandidaten mit schwacher Expression liess sich aus ESTs zusammensetzen. Auch das einzige dieser Kategorie zugehörige und inzwischen bekannte Protein FLJ20276 (Klon 72-1-3 = 72-2-4) war zunächst aus ESTs nur bruchstückhaft zu integrieren. Damit sind die EST-Datenbanken nicht nur offenkundig unvollständig, in ihnen ist ebenfalls eine deutliche Verzerrung zugunsten häufiger mRNA-Transkripte zu konstatieren. Dies könnte an der randomisierten Auswertung der zugrundeliegenden, nicht-normalisierten cDNA-Libraries liegen, bei der die Wahrscheinlichkeit, schwach repräsentierte EST zu sequenzieren, stark herabgesetzt ist, möglicherweise in höherem Masse als bisher angenommen.

Zusätzlich sind die DB-Sequenzen in der Regel fehlerbehaftet. Angesichts der Tatsache, dass es sich um Einfachsequenzierungen von EST-Klonen mit möglichst hoher Leseweite handelt, mag dieser Umstand nicht verwundern. Durch die daraus vorwiegend entstehenden Leserasterverschiebungen wurde jedoch das Ableiten einer cds mit ORF sehr erschwert. Nur das parallele Auswerten mehrerer, nach Möglichkeit unabhängiger Klonsequenzen in Multialignments, Interspeziesvergleiche mit homologen ESTs (meist Maus) sowie Plausibilitätsableitungen führten zur computerbasierten ORF-Identifikation *in silico*. Dieser aufwendige

und handarbeitsintensive Prozess wurde erst gegen Ende der Studie durch automatisiert erstellte EST-Cluster-DB des RZPD erleichtert (*link* siehe Tab. 7), deren Vollständigkeit jedoch in vielen strittigen Sequenzbereichen eher zu wünschen übrig liess. Vermutlich liegt dies in der notwendigen Eindeutigkeit von Multialignments der Einzelsequenzen begründet, die die Software zur Consensussequenzintegration erfordert. Die tatsächliche Identität der entstandenen putativen Gensequenzen musste jedoch noch durch full-length-Klonierung belegt werden. Die dazu erforderlichen Primer wurden ökonomisch so gelegt, dass durch Klonierung in entsprechende Vektoren sowohl Full-length-Klone zur Sequenzierung als auch Expressionsklone zur Proteinaufreinigung synthetisiert werden konnten. Vom ursprünglichen Vorhaben, die Gesamtsequenzen in den den Expressionsklonen zur Kontrolle zu sequenzieren, musste zugunsten blosser Kontrolle korrekter Insertion abgerückt werden, da der TOPO-TA Expressionsvektor nur über insuffiziente Primerbindungsstellen verfügte, so dass selbst zwei zusätzlich hergestellte Alternativprimer nicht die erforderlichen Leseweiten ermöglichten.

All diese computerbasierten Klonierungsstrategien unterbieten den Aufwand experimenteller Sequenzermittlung bei weitem. Immerhin ermöglicht die elaborierteste Methode konventioneller Nylonmembran-cDNA-Klonierungstechniken die Handhabung von Klonzahlen in neuer Grössenordnung durch einen Trick: Beim Human Universal cDNA Array I (HUCL von Stratgene) repräsentieren 1536 Pools a' 96 Klone auf 4 Mastermembranen insgesamt 145.000 Klone aus 29 Gewebetypen (normalisierten cDNA-Libraries, d.h. jedes Transkript ist im Sinne reduzierter Redundanz gleich repräsentiert, siehe Soares *et al.*, 1994), für jeden Pool ist eine Sekundärmembran lieferbar, so dass mit zwei geschachtelten Hybridisierungsexperimenten einzelne cDNA-Klone identifiziert werden können.

Zu Recht merken Graf *et al.* (1997) und Ledakis *et al.* (1998) an, nur wenige neue Gene von Interesse wurden bislang per DD-PCR identifiziert, sicherlich eine Folge der o.g. Unterrepräsentation in EST-Datenbanken und Isolationsverfahren. Eine weitere Erklärung liegt in der Tatsache, dass der Weg von den in hoher Zahl identifizierten neuen Genen bis zu deren funktioneller Charakterisierung experimentell aufwendig ist, so dass eine immer noch hohe Anzahl neuer Kandidaten über die blosser Expressionscharakterisierung hinaus unbearbeitet bleibt. Ebenfalls unabhängig vom gewählten Genidentifikationsverfahren besteht ein anderes prinzipielles Problem in der biologischen Tatsache, dass dem Löwenanteil der regulierten

Kandidaten keine Schlüsselfunktion in Bezug auf die jeweilige untersuchte Ereignisinitiation zukommen kann. Konkret initiieren nur wenige Moleküle die angiogene Kaskade, in deren Folge aber eine Vielzahl allgemeiner Stoffwechselprozesse in proliferierenden, mitotischen Zellen aktiviert wird, so dass prinzipiell die Wahrscheinlichkeit als gering eingestuft werden muss, unter neuen Kandidaten auf spezifisch funktionell relevante zu stossen.

## 4.2 EXPRESSIONSMUSTER BEKANNTER GENE

Gemäss der Übersicht identifizierter bekannter Gene in Tab. 9 sind die interessantesten Kandidaten im angiogenen Kontext mit der Modulation des Zellstatus oder der Signaltransduktion verknüpft wie Endothelin 1,  $\alpha G_i$ , Caveolin 1, Thrombospondin 1, *prepro-nerve growth factor*, GTP-bindendes Protein oder Annexin 1. Letzterer wird auch Lipocortin 1 (LC 1) genannt und ist ein antiinflammatorischer induzierbarer Mediator (Smith, 1996), der in allen Geweben exprimiert wird. Stimuliert wird LC 1 durch Glukokortikoide, die zudem seine intra-perizelluläre Translokation im Zentralnervensystem fördern (Philip *et al.*, 1997).

Die intrazelluläre Protease ‚Proteasom‘ besteht aus 10 Untereinheiten, von denen HC8 separiert auf Chromosom 14q23 lokalisiert ist (Akioka *et al.*, 1995). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das humane Proteasom ein essentiell in Angiogenese involviertes Molekül ist (Oikawa *et al.*, 1998), dessen spezifische Inhibition bei leukämischen HL60-Zellen in Apoptose resultiert (Drexler, 1997). Auch das breit exprimierte Metallothionein II tritt apoptoseassoziiert auf, wenn auch die Funktion noch offen ist (Vasak & Hasler, 2000).

Ferner wurde auch eine Reihe stressinduzierter Moleküle isoliert, wie es für die Klasse der Hitzeschockproteine und Chaperone (Liang & MacRae, 1997) allgemein gilt (GRP78 Protein / BiP Protein, TCP-1, TCP 20, 70 kD *heatshock* verwandtes Protein, der zytosolische Rezeptor Cyclophilin). GRP78 / BiP (*glucose-related-Protein*) wurde zuvor schon in einer DD-Arbeit an aktivierten HUVEC identifiziert (Kokame *et al.*, 1996). Eine aktuelle Arbeit identifizierte ebenfalls mit Differential Display das zytosolische Chaperon TCP-1 (T-Komplex-Polypeptid-1) in einem fetalen Wundheilungsmodell an Kaninchenhaut (Darden *et al.*, 2000). TCP-1 wird zur Faltung und Zusammensetzung neusynthetisierter Proteine als notwendig eingestuft (Kubota *et al.*, 1995).

Schliesslich wurden auch verschiedene Kandidaten mit metabolischer Funktion ermittelt, deren Expression ebenfalls mit dem Aktivierungsstatus zusammenhängt (Acetyl CoA

Acetyltransferase Thiolase, Lactat Dehydrogenase, Annexin V-bindendes Protein, Ribophorin I aus dem rauhen Endoplasmatischen Retikulum, Kelleher *et al.*, 1992). FLJ20276 trat als bekanntes putatives Protein unbekannter Funktion auf.

Die überwiegende Mehrheit der Moleküle ist löslich, entweder im Zytoplasma lokalisiert oder sezerniert (Thrombospondin 1, Annexin 1). Nur Caveolin 1,  $\alpha G_i$  und das GTP-bindende Protein sind membranständig.

Im Folgenden wird auf eine Auswahl besonders interessanter Kandidaten ausführlicher eingegangen:

### **Caveolin 1**

Caveoline sind membranständige, zytoplasmaseitige Strukturproteine, welche zusammen mit Cholesterol die Zellorganellen Caveolen organisieren, Sphingolipid-Membraninvaginationen (nicht Phospholipid-basiert, wie die sonstigen Plasmamembranregionen) in möglichem Zusammenhang mit und Herkunft aus dem Golgiapparat.

In Caveolen sind im Vergleich zur restlichen Zelloberfläche spezifische Lipide angereichert (Glycosphingolipide, Sphingomyelin und Cholesterol) sowie lipidmodifizierte Signalmoleküle (G-Proteine, Rezeptortyrosinkinasen, Src-Tyrosinkinasen, H-Ras und endothelzell-Nitrooxidsynthase eNOS) (Engelman *et al.*, 1998). Caveoline bilden homo-oligomere Komplexe, die direkt an Cholesterol binden können und sich dadurch möglicherweise stabilisieren. Durch Interaktion dieser Komplexe untereinander erzeugen sie vermutlich die Membraninvaginationen Caveolen (Smart *et al.*, 1999). Morphologisch lassen sich Caveolen im Endothel, Lungenepithel, Adipozyten, verschiedenen Muskelzelltypen und im Nervensystem nachweisen.

Caveolen haben transzelluläre Transportfunktion für Moleküle. Weiter fungieren Caveolen als vorgefertigte Signalkomplexe, *cross-talk*-Nachrichtenzentren, die die Signaltransduktion integrieren (Transduktisomen oder Signalosomen). Dazu sind in Caveolen eine Vielzahl von Molekülen der intrazellulären Signaltransduktion angereichert wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, heterotrimere G-Proteine, Rezeptortyrosinkinasen, Src-Tyrosinkinasen, Komponenten des Ras-Mitogen-aktivierten Protein- (MAP)-Kinase Reaktionsweges, Proteinkinase C (PKC) und NO-Synthase (NOS) (Aktueller Review in Smart *et al.*, 1999).

Caveolin 1 wird ubiquitär exprimiert und bildet durch alternative Initiation bei der Translation zwei Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  (Scherer *et al.*, 1995). Unter normalen Gleichgewichtsbedingungen



ist mehr als 90% des Caveolin 1 in Caveolen lokalisiert; ein kleiner, signifikanter Anteil befindet sich im endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Trans-Golgi-Netzwerk und reflektiert einen dynamischen Verkehr zwischen diesen Kompartimenten. Über ihre Caveolen-konstituierende Funktion hinaus wird den Caveolinen eine Vehikelfunktion für den Cholesteroltransport zwischen ER und der Plasmamembran zugeschrieben sowie eine Rolle als Gerüstprotein zur Organisation und Inaktivierung der auf der zytoplasmatischen Caveolar-seite konzentrierten Signalmoleküle. Zudem mediiert es die intrazelluläre Bewegung von Cholesterol als Teil eines Immunophilinkomplexes mit Cyclophilinen und HSP (Uittenbogaard *et al.*, 1998), von denen im Rahmen dieses DD-Projektes ebenfalls Vertreter identifiziert wurden.

Auch via Cholesterol wird zellkonfluenzabhängiges funktionelles und strukturelles Remodeling endothelialer Plasmamembranen vermittelt, entscheidend für die Regulation vaskulärer Permeabilität und Angiogenese. Über Cholesterol wird in Monolayern boviner Lungen-Aorten EC zu Beginn der Konfluenzphase die Formierung von Adherens-Junctions reguliert, wozu das Membrancholesterol selbst stark angereichert wird. Begleitet wird dies von einer cholesterolabhängigen Umverteilung des Bindungspartners Caveolin in Kompartimente niedriger Dichte (Corvera *et al.*, 2000).

Entsprechend der hier beobachteten Hochregulation in mittleren und alten BAEC identifizierte auch de Waard *et al.* (1999) in seinem SAGE-Projekt Caveolin 1 in aktivierten HUVEC. Dabei verglich er konfluent ruhende mit aktivierten HUVEC-Kulturen, die mittels von Monozyten konditionierten Mediums stimuliert wurden, einem starken atheriogenem Stimulus. In guter Übereinstimmung mit den BAEC-Daten dieser Arbeit gibt er die ermittelte und per Northern-blot überprüfte Hochregulation mit 11-fach an. Caveolin 1 gehört neben dem dort ebenfalls identifizierten  $\alpha G_i$ -Protein (siehe Tab. 9) zu den 35 mehr als 5-fach aktivierten Kandidaten aus insgesamt 5448 distinkten differenzierten putativen Genen.

Konträr dazu wird in konfluenten NIH 3T3-Fibroblasten Caveolin 1 exprimiert, dagegen aber in subkonfluenten Zellen dramatisch herunterreguliert, so dass die Mediation der Kontaktinhibition über eine negative Regulation der p42/44 MAPK-Kaskade vermutet wird (Galbiati *et al.*, 1998). Diese Deaktivierung stimmt mit der im Northern-blot gezeigten in HUVECs überein, wenn sich auch eine nur geringe 3-fache Regulation ergab (siehe Abb. 6A) und sich das Verhalten von zwischen Fibroblasten und Endothelzellen nur bedingt vergleichen lässt.

Da der Befund zudem konträr zu bovinen EC's und den SAGE-Ergebnissen liegt, müssen die Daten nochmals validiert werden. Auf Proteinebene schliesslich war bei beiden Spezies für EC keinerlei Regulation nachweisbar (siehe Abb. 6B), entsprechend den Ergebnissen von Esser *et al.* (1998) nach VEGF-Stimulation kultivierter EC.

Die Rolle von Caveolin 1 in den NIH 3T3-Zellen wird als Tumorsuppressorgen interpretiert, dessen ubiquitäre Expression (Bretscher & Whytock, 1977) in transformierten Zellen reduziert ist (Koleske *et al.*, 1995). Eine konstitutive Caveolin 1-Expression in NIH 3T3 Zellen resultiert in der Aufhebung verankerungsunabhängigen Wachstums und Caveolenbildung, so dass die Caveolinexpression für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps kritisch ist (Engelman *et al.*, 1997). Diese Argumentation ist konsistent mit der Identifizierung der Lage eines Tumorsuppressors am Caveolin 1 Genlocus 7q31.1/D7S522 in verschiedenen Tumoren (Engelman *et al.*, 1998; Engelman *et al.*, 1999), wobei ebendiese Funktion auch angezweifelt wird (Hurlstone *et al.*, 1999). Umgekehrt kann das Caveolin 1 Protein als negativer Regulator des VEGF-Rezeptors (KDR) fungieren, so dass die Herunterregulierung von Caveolin 1 Voraussetzung für die VEGF-Induzierbarkeit bedeutet, die damit einen wichtigen Schritt in der angiogenen Aktivierung von EC darstellt (Liu *et al.*, 1999). Die Bedeutung der widersprüchlichen Daten bezüglich der Caveolin 1-Regulation zwischen den Spezies und innerhalb der BAEC-Altersgruppen bleibt offen und erfordert weitere Untersuchung, genauso wie die Abweichung von den Proteindaten.

### **Thrombospondin 1**

Obwohl die Identifizierung von TSP 1 inzwischen mehr als zwei Jahrzehnte zurückliegt, herrscht Uneinigkeit bezüglich seiner Funktion (Tuszynski & Nicosia, 1996). Es fungiert mittels vier adhäsiver Domänen als ein Zelladhäsionsmolekül (Tuszynski *et al.*, 1987; Mosher, 1990), welches Zellmigration, -Proliferation, Neuronaussprossung und Angiogenese moduliert (Adams, 1997), aber auch zur Tumorprogression beiträgt: Allein Tuszynski & Nicosia (1996) zitieren 28 Arbeiten, nach denen die Tumormetastasierung bei Mäusen TSP 1-gefördert wird, ebenso Tumorzelladhäsion, -Migration und -Invasion. Weiter werden bei Krebspatienten erhöhte TSP 1-Plasmakonzentrationen beobachtet sowie eine erhöhte TSP 1-Expression in humanen Tumoren. Auch bei der Wundreparatur neugebildete Gefässe färben sich intensiv mit  $\alpha$ -TSP 1 an. Schliesslich stimuliert es verschiedenen Autoren zufolge auch endotheliale Adhäsion, Migration und Angiogenese selbst (z.B. Nicosia & Tuszynski, 1994).

Damit vereinbar produzieren *in vitro* proliferierende EC mehr TSP 1 als ruhende (Canfield *et al.*, 1990). Nach Liaw & Schwartz (1993) wird TSP 1 in kultivierten BAEC<sub>K</sub> exprimiert, aber nicht in frisch isolierten BAE-Zellen. Betrachtet man die *in vivo*-Situation als vollständig wachstumsarretiert im Gegensatz zur Zellkultur (nach Bavisotto *et al.* (1990) nur 95%ig), so reflektiert dies eine Hochregulation bei EC-Aktivierung, wie sie vergleichbar in vorliegender Arbeit im Zellkulturmodell (BAEC<sub>S/K</sub>) um den Faktor zwischen 4-10x ermittelt wurde.

Im Gegensatz dazu inhibieren TSP 1 (und TSP 2) nach etlichen anderen Autoren (z.B. Tokunaga *et al.*, 1999; Volpert *et al.*, 1995; Tolsma *et al.*, 1993; Bagavandoss & Wilks, 1990) die endotheliale Zellmigration *in vitro* (Fusenig & Boukamp, 1998) und Neoangiogenese *in vivo* mediiert über die Interaktion mit dem Membranrezeptor CD 36 mit zwei kurzen Sequenzen des TSP-Typ I-Moduls (Iruela-Arispe *et al.*, 1999; Dawson *et al.*, 1997; Überblick in Feige, 1999). Da die Mutation oder der Verlust von Tumorsuppressorgenen während maligner Transformation zu Herunterregulierung von TSP 1 führt, wird es auch als natürlicher Angiogeneseinhibitor bezeichnet (Sheibani & Frazier, 1999). Die Bedeutung der beobachteten erhöhten Expression eines vermeintlichen Angiogeneseinhibitors TSP 1 in angiogenen EC bleibt jedoch völlig unklar. Übereinstimmend identifizierte auch de Waard *et al.* (1999) in seinem SAGE-Projekt TSP 1 in aktivierten HUVEC. Nach Stimulation mit monozytär konditioniertem Medium stellte er eine 2-fache Hochregulierung von TSP 1 fest, das er in der Expressionsstärke von 5448 Genen auf Rang 32 einordnet.

Diese offenkundigen Widersprüche könnten nach Spekulation von Roberts (1996) der Komplexität des Proteins mit multiplen Bindungsspezifitäten zugeschrieben werden. Nach Bornstein (1995) bindet es an mindestens 12 verschiedenen Rezeptoren. Dies erlaubt es TSP 1 unterschiedliche spezifische Signale zu initiieren, deren Integration wiederum verschiedene Reaktionen erlaubt. Nach Tuszynski & Nicosia (1996) eröffnet sich damit die Möglichkeit, TSP 1 sei ein Angiogenesemodulator mit komplexen pleiothropen Effekten u.a. auf EC, dessen Wirkungsspektrum bislang noch unvollständig verstanden wurde und eingehendere Untersuchungen erfordert. Dieser Gedanke bestätigt sich einer neueren Arbeit von Suzuma *et al.* (1999) zufolge tatsächlich: TSP 1 wird im murinen *in vivo*-Modell ischämischer retinaler Neovaskularisierung in einer biphasischen Reaktion VEGF-abhängig zunächst herunter, dann nach 24 Stunden aber entgegengesetzt hochreguliert, um im Sinne einer negativen Rückkopplung die VEGF-Expression zu inhibieren.

### **Endothelin 1 (ET 1)**

Die Endothelinfamilie besteht aus 3 Isoformen (ET 1-3) von je 21 AS. Während ET 2 möglicherweise als Mediator in der Niere fungiert und ET 3 im Nervensystem und dem Verdauungstrakt, ist das gut erforschte ET 1 als potentester endogener Vasokonstriktor bekannt (Yanagisawa *et al.*, 1988). Zusätzlich fungiert es als auto- und parakrines (co-) Mitogen beim Remodeling im kardiovaskulären System der Säugetiere. Das von vaskulären Endothelzellen exprimierte 2,2 kb-Transkript kodiert für das 212 AS Preproendothelin 1, welches mittels verschiedener Proteasen über Gross-Endothelin 1 (38 AS) schliesslich zum maturen ET 1-Protein prozessiert wird (Schmidt *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1994). Dieses wird vorwiegend zur abluminalen Seite der vaskulären Wand sekretiert. Da bislang kein zellulärer Speicher bekannt ist, wird angenommen, dass seine Regulation direkt auf Transkriptionsebene erfolgt. Verschiedene chemische Stimuli (vasoaktive Hormone wie Angiotensin II und Katecholamine, Inflammationsmediatoren, Zytokine), mechanische (Scher-Stress) und Hypoxie induzieren die Expression, der vasodilatatorische Antagonist NO (Stickstoffmonoxid) inhibiert sie. Die beiden 7-Transmembran-G-Protein-gekoppelten Endothelinrezeptoren ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> mediiern die ET 1-Effekte (Sakurai *et al.*, 1992). Endothelzellen exprimieren nur ET<sub>B</sub>, der über NO- und Prostacyclinausschüttung Vasodilatation vermittelt, die ET 1-Synthese aktiviert und ET 1 aus der Zirkulation klärt (Dupuis *et al.*, 1998). ET<sub>A</sub> ist neben Kardiomyozyten und Fibroblasten vorwiegend auf SMCs lokalisiert und mediiert bei den Muskelzelltypen den mitogenen Effekt von ET 1. Bei Fibroblasten stimuliert ET 1 via ET<sub>A</sub> die Synthese von Kollagen Typ IV, ohne einen direkten mitogenen Effekt auszuüben, was auf eine wichtige Rolle bei der ECM-Formation (Extrazelluläre Matrix) und beim Remodeling hinweist. Eine neuere Zusammenfassung des Endothelin 1-Systems mit Fokus auf die therapeutischen Anwendungen bei kardiovaskulären Erkrankungen findet sich bei Kirchengast & Munter (1999).

Flowers *et al.* (1995) zeigte in guter Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten (etwa 10-fache Aktivierung, siehe Tab. 9) eine 4-fache Hochregulation von ET 1-mRNA in kultivierten aktivierten BAEC im Northern-blot und in *in situ*-Experimenten an der Regenerationsfront nach Verletzung im Zellkulturmodell. Nach Goligorsky *et al.* (1999) stimulieren Endotheline ET<sub>B</sub>-vermittelt Transmigration von EC im Boyden-chamber-Experiment. In einem *in vivo*-Angiogenesemodell verstärkt ET zudem die Formation neuer Gefässe, wozu funktionelle endotheliale NO-Synthase (eNOS) erforderlich ist. Zusammengenommen sind dies Hinweise

auf eine para-/ autokrine Mediatorfunktion von ET 1 beim EC-Wachstum in Angiogenese und subsequenter Maturation durch SMC-vermittelte ECM-Synthese. Schliesslich wird das ET 1-System auch mit der Signaltransduktion im Tumor und Tumorangiogenese in Verbindung gebracht (Asham *et al.*, 1998; Dawas *et al.*, 1999).

### 4.3 EXPRESSIONSMUSTER NEUER GENE

Die wesentliche Limitation bei der Bearbeitung der identifizierten neuen Gene besteht in der Vervollständigung ihrer (kodierenden) Sequenz mittels EST-Datenbankabgleich. Dem absehbaren Ende des Human-Genom-Projektes zum Trotz und entgegen gängiger Annahmen haben sich die entsprechenden Datenbanken über die gesamte Projektzeit als äusserst lückenhaft erwiesen. Daraus ergab sich die Komplikation, nur für einen geringen Bruchteil der Kandidaten eine vollständige Sequenzinformation generieren zu können. Die gesamte kodierende Sequenz (cds) ist Grundlage für eine Vielzahl weiterführender Charakterisierungsexperimente wie beispielsweise Expressionsklonierung, Proteinaufreinigung und Antiserenherstellung sowie Überexpression in eukaryontischen (EC-) Zellen. Aber auch für die neuen Gene mit vollständig ermittelten Sequenzen war für deren deduzierte Aminosäuresequenzen wenig an weiterführenden Informationen aus den Datenbanken ableitbar. Etwa die Erwartung der Identifikation funktioneller Domänen fand sich in keinem Fall bestätigt.

Das führte schliesslich zu der pragmatischen Strategie, zur Weiterbearbeitung bestimmte Kandidaten aus der Untergruppe mit ermittelter Sequenz auszuwählen. Diese zwar allgemein übliche Praxis der praktikablen Eingrenzung spiegelt jedoch nicht notwendigerweise eine relevante Auswahl bezüglich des biologischen Phänomens wider.

Zwei aktuelle Screening-Arbeiten ermitteln im großen Masstab eine Reihe differentiell exprimierter, neuer und bekannter Gene in unterschiedlich aktivierten Endothelzellen (de Waard *et al.*, 1999; St Croix *et al.*, 2000). Keine der Arbeiten geht über die blosser Identifikation der zum SAGE-Tag homologen ESTs hinaus, so dass weder der Versuch unternommen wurde, die Gesamtsequenzen neuer Gene zu ermitteln, noch den, weitere funktionelle Daten zu erheben.

St Croix *et al.* (2000) identifizierte 170 dominant-endothelial exprimierte Transkripte, davon 79 differentiell regulierte Gene, die 46 in malignem Tumorendothel mehr als 10-fach hochregulierte bekannte und unbekannte einschliessen, verglichen mit colokrektalem normal-

Endothel. Lediglich für 7 von 9 SAGE-identifizierten „Tumor-Endothel-Markern“ (neue Gene) und für 2 ausgewählte „pan-endotheliale Marker“ bestätigte St Croix *et al.* (2000) eine entsprechende Expression mittels *in situ*-Hybridisierung. Zur Sondensynthese der verwendeten 500-600 bp-PCR-Fragmente, abgeleitet aus EST-Sequenzen, war aber zunächst eine erfolgreiche Datenbankrecherche ausgehend von den 11 bp-SAGE-Tags erforderlich. Die Aufwendigkeit von *in situ*-Experimenten schliesst jedoch ein breitangelegtes Routine-screening nahezu aus. Auch andere endotheliale Expressions-Screenings beschränken sich auf die Analyse einzelner neuer Kandidaten oder bearbeiten schon bekannte: Dragoni *et al.* (1998) isolierte EDF-1, ein neues bei der HUVEC-Differenzierung herunterreguliertes Gen, Robinson *et al.* (1997) identifizierte das schon bekannte *early-growth-response-Gen-1* (EGR1) in einem DD-basierten Ansatz zur Suche nach Zielmolekülen der endothelialen ETS-Transkriptionsfaktorenfamilie, Topper *et al.* (1997) ermittelte und charakterisierte zwei Mitglieder einer neuen ‚vaskulären‘ MAD-Familie (Smad6/7), intrazelluläre Signaltransduktionskomponenten der TGF-Rezeptoren -Superfamilie, per DD aus strömungsinduzierten HMVEC, Wang *et al.* (1997) isolierte mittels DD in pinealspezifischem Kontext PG25, ein Homolog zum endothelzellspezifischen Molekül 1 (ESM-1), welches zuvor Lassalle *et al.* (1996) aus einer HUVEC-cDNA-Library kloniert und charakterisiert hatte.

Diese Beispiele reflektieren zwei generelle Probleme: Zum einen bleibt der überwiegende Teil der ermittelten regulierten Kandidaten bis auf weiteres unbearbeitet, zum anderen werden die eingehender charakterisierten Gene massgeblich auch durch ihre Zugänglichkeit, also Datenbankrepräsentanz eingegrenzt. Gerade die nicht in den Datenbanken repräsentierten Gene könnten sich als die interessantesten, eben noch zur Identifikation ausstehenden Effektoren herausstellen, sei es, weil sie den schwach exprimierten zugehören oder aus anderen Gründen schwer zugänglich sind.

Es wurde schon darauf hingewiesen, dass nur einem geringen Anteil der Kandidaten mit regulativer und signalübermittlender Funktion eine Schlüsselstellung an der Spitze einer Kaskade zukommen kann (wie Ligand oder Rezeptor), da vergleichsweise erheblich mehr Genprodukte die weitere Signaltransduktion mediiieren. Aber auch für diese nachgeschalteten signalassoziierten Gene ist eine relativ mässige bis geringe Expressionsstärke wahrscheinlich. Die sowohl anzahlmässig als auch nach Expressionsstärke grössten Gruppen stellen Strukturproteine und metabolisch notwendige *housekeeping*-Gene dar, in aktivierten Zellen

ebenfalls hochreguliert. Zwar charakterisiert die Gesamtheit aller differentiell exprimierten Gene den aktivierten endothelialen Phänotyp, die besonders interessanten regulatorisch relevanten Elemente sind aber nur funktionell in der Masse auszumachen, deren Identifikation deshalb schwierig. Aber auch nicht alle Moleküle mit regulativer Funktion sind spezifisch angiogeneserelevant, da zur Zellaktivierung z.B. allgemeine Zellzyklusregulatoren erforderlich sind.

Vier der fünf isolierten und eingehender charakterisierten aktivierten neuen Gene gehören mit 123-333 AS den kleinen bis mittleren Proteinen an. Tatsächlich wurde ein Zellzyklusprogressionsregulator isoliert, 40-6-3 kodiert für SGT 1, Suppressor von *skp1*. Interessanter im Angiogenese-kontext erscheint 40-2-3 mit seiner 17 AS spannenden, 82%igen Homologie zum N-Terminus des Transkriptionscoaktivators ALY. Seine prädiktive subzelluläre Lokalisation im Zellkern ist mit einer entsprechenden Funktion gut vereinbar. Ferner lässt eine weitere homologe genomische Sequenz von 2,5 kb (Acc.-No. HS809F4) auf die Existenz einer Genfamilie schließen. Ob dieses Homolog bereits im Northern-blot anhand der Doppelbande detektiert wurde oder ob es sich um eine Spleissvariante handelt, ist durch weitere Klonierungsexperimente abzuklären. Für das ebenfalls lösliche 67-11-3 ist keinerlei Funktion bekannt, interessanterweise spricht sein Expressionsmuster für eine Induktion sowohl im Kontext angiogener Aktivierung (frühes Ovarstadium, Tumorzelllinien, Subkonfluenz) als auch nach der Differenzierung (Sphäroide, Blut, einige Organe). Zudem ist eine murine Knockoutstammzelllinie kommerziell verfügbar. 42-9-9 als kleinster Kandidat zeigt eine Thioredoxin-homologie, also metabolischen Bezug. Neben 67-11-3 ist er der einzige Kandidat mit deutlicher Expressionssenkung durch die Stadien des physiologischen Angiogenesemodells Ovar. Die Ausnahme bildet 40-9-1 mit 506 AS als einziges neues, eindeutig membranständiges Protein mit 10 transmembranösen  $\alpha$ -Helix-Domänen. Seine hohe Homologie zum Transporterprotein g17 lässt eine metabolische Funktion erwarten, auch wenn das Zielmolekül offen ist.

Auffällig an den Expressionsmustern der stark exprimierten neuen Gene ist die deutlich erhöhte Präsenz in Muskelgewebe von 3 Kandidaten, fehlend oder reduziert in Leber (40-2-3, 40-6-3, 40-9-1), komplementär dazu ein dominantes Auftreten von 42-9-9 in Leber, nicht aber in Muskel.

Bei den näher charakterisierten neuen Genen in dieser Arbeit handelt es sich um überwiegend lösliche Moleküle (4 von 5). Dieses Ungleichgewicht könnte abhängen von der Grösse der identifizierten Gene. Der einzige als Membranprotein identifizierte Kandidat 40-9-1 zeigt ein Northern-blotsignal von 6 kb, alle anderen nur 1,6 kb oder kleiner bis auf 40-2-3 mit 3,5 + 3,8 kb. Diese Verzerrung spiegelt sich in doppelter Hinsicht wider: Zum einen wurden insgesamt überwiegend kleine neue Gene identifiziert (10 von 16 kleiner als 4 kb; 14 von 16 kleiner als 5 kb). Zum anderen waren von den 5 Kandidaten (von 16) mit vollständig identifizierter cds 4 kleiner als 4 kb, was sowohl die Unvollständigkeit der EST-Datenbanken reflektiert als auch deren 3'-bias. Den Grössenbereich von Membranproteinen wie den VEGF-Rezeptoren mit 7-8 kb erreicht überhaupt nur ein neues Gen (76-2-1 mit 10 kb) sowie mit Thrombospondin 1 (6 kb) auch nur ein bekanntes (von 19). Ein weiterer Aspekt der Erklärung könnte aber auch sein, dass derartige spezialisierte Moleküle eher schwach exprimiert werden, was deren Identifikation sicherlich erschwert. Andererseits ist die Wahrscheinlichkeit höher, ein EST zugehörig zu einem großen Molekül in einer Library aufzufinden als zu einem gleichstark exprimierten kleinen, und damit auch dessen Identifikation selbst. Demnach sind entsprechende Rezeptoren in der Tendenz inzwischen eher bekannt.

Verschiedene Erklärungen sind denkbar für das Fehlen jeglicher EST-Homologien zu den zwei Kandidaten 64-1-2 und 64-6-4: Entweder das Auffinden gänzlich unbekannter humaner Gene oder Gene mit geringer Interspezieshomologie zwischen Rind und Mensch. Auch für nicht exprimierte Genomabschnitte ist aufgrund fehlender funktionsabhängiger Sequenzkonservierung eine hohe interspezielle Divergenz typisch, deren Auftreten aber durch cDNA als Ausgangsmaterial ausgeschlossen wurde, also nur als Kontamination denkbar erscheint. Tatsächlich ist 64-6-4 (bovin, 473 bp) 74% homolog zur Intronsequenz von humanem Osteonidogen (Acc.-No. AB0098), was angesichts gegenläufiger Orientierung der P- und T-Primer auch zufallsbasiert sein kann. Gegen Kontaminationen spricht, dass bei keinem der weiteren 39 Gene oder Genfragmente ein Hinweis auf eine genomische, nicht exprimierte Sequenz wie z.B. ein Intron auffindig zu machen war, dafür aber immer ESTs oder Exonbereiche von Genen. Allerdings ist einzuräumen, dass von den 16 identifizierten neuen Genfragmenten für 11 ein nur geringer Teil der Gesamtsequenz vorliegt (die beiden o.g. Kandidaten eingerechnet). Da die Zielgene im DD immer mit einem T-Primer amplifiziert



wurden, der am Poly-A-Schwanz des Gens bindet und zudem die zugrundeliegende cDNA ausgehend von genendständig bindenden Poly-T-Primern synthetisiert wurde, stammen die identifizierten Sequenzen vorwiegend aus dem 3'-Endbereich der Gene (Sompayrac *et al.*, 1995), übereinstimmend mit z.B. Linskens' *et al.* (1995) Ergebnissen. Durch diese methodenimmanente Limitation ist im Falle grosser Gene oder 3'-UTRs die Identifikation der cds nur über Datenbanksequenzintegration möglich.

Die Expressionsklonierungen erfolgten mit 3 verschiedenen Systemen. Von den beiden Histidin-Tag-basierten führte der pTrcHis2-TOPO-Vektor unter dem Trc-Promoter trotz korrekter Insertionen und erheblichen Optimierungsaufwandes in keinem Fall zu quantitativer Expression, die über den sensitiven Western-blot hinaus detektierbar war und eine Aufreinigung ermöglichte. Mit den beiden anderen Expressionsvektoren (ebenfalls His-Tag-basiert: pCR T7/CT-TOPO unter dem T7-Promoter und der GST-Tag basierte pGEX-KG-Vektor) liessen sich 3 von 4 Proteinen stark überexprimieren, so dass eine Aufreinigung aussichtsreich erscheint. Das fünfte der näher bearbeiteten neuen Gene, 40-9-1, wurde aufgrund seiner hohen Homologie zum g17-Transporterprotein (Q99624) im Sinne der Vermeidung von Kreuzreaktionen für eine Epitopimmunisierung vorgesehen.

#### 4.4 AUSBLICK

Über die erhobenen strukturellen Daten hinaus steht eine weitere funktionelle Charakterisierung der neuen Gene noch aus. Von besonderem Interesse sind dabei das teilweise transkriptionscoaktivator-homologe 40-2-3 sowie das dem 7-transmembran-Helix Transporterprotein g17 verwandte 40-9-1, aber auch 67-11-3 mit völlig unklarer Funktion. Die dazu erfolgten Vorarbeiten wie Expressionsklonierung zur Proteinaufreinigung oder eukaryontischen Überexpression (Transfektion in EC) bieten dabei aussichtsreiche Ansatzpunkte. Zunächst jedoch sind zellspezifische Expressionsdaten der Kandidaten noch zu ermitteln, wozu entsprechende *in situ*-Sonden bereits vorliegen.

Darauf aufbauende Experimente wie die Funktionsneutralisierung (*loss of function*) lassen sich durch neue Ansätze zunehmend leichter realisieren. Namentlich für 67-11-3 liegt ein muriner OST-Stammzellklon vor, der Knockoutexperimente dieses Kandidaten ermöglicht.

Für die verbleibenden 11 neuen Genfragmente (von 16) muss zuvor noch die Gesamtsequenzen inklusive der cds's identifiziert werden. Bemerkenswert erscheint in diesem Zusammenhang die offenkundig immer noch erhebliche Unvollständigkeit der UniGene-Cluster-Datenbanken. Da eine experimentelle Sequenzidentifikation zu Screeningzwecken zu aufwendig ist, müssen zur Eingrenzung entweder weitere funktionelle Daten mit den vorhandenen Fragmenten erhoben werden oder der Eingang entsprechender Homologe in den Datenbanken abgewartet werden, in beiden Fällen unbefriedigend. Darüberhinaus blieb die Erwartung weitgehend uneingelöst, selbst für die Kandidaten mit ermittelter Proteinsequenz via Datenbankinformationen und Algorithmen zur funktionellen Prediktion (z.B. Domänenbasiert) zu gelangen, so dass sich diesbezüglich noch ein erheblicher Entwicklungsbedarf geeigneter Werkzeuge und Methoden manifestiert.

Aber auch bekannte Gene wie z.B. das Proteasom, Annexin 1 / Lipocortin 1 oder die stressinduzierten Kandidaten KIAA 2, TCP 1, TCP 20 sollten in die Funktionsanalyse einbezogen werden. In Kürze, nach endgültiger Auswertung des Human-Genom-Projektes, werden sämtliche Proteine putativ bekannt sein. Der nächste Schritt wird die experimentelle Bestätigung der identifizierten und mit EST-Datenbanken abgeglichenen ORFs (86.000 UniGene-Cluster, Stand 11/2000) als tatsächlich exprimierte Proteine sein (davon 38.000 bestätigt, Stand 6/2000) und damit einhergehend die Erhebung ihrer Expressionsmuster. Zwar zeichnen sich bekannte Moleküle durch das Vorliegen dieser Informationen aus, deren kontextbezogene Funktion ist aber häufig nicht oder nicht vollständig geklärt. Erst daran schliesst sich deren Funktionsanalyse in konkreten Szenarien an, wie z.B. Angiogenese-relevanz.

## **Und in Zukunft?**

### **Alternative Screeningverfahren**

Verschiedene andere Verfahren zur vergleichenden Genexpressionsanalyse (*expression profiling*) sind etabliert, einen Überblick geben Kozian & Kirschbaum (1999) und Carulli *et al.* (1998). Jeder der Ansätze ist dabei sinnvoll, abhängig von der Fragestellung und den Laborkapazitäten.

Das experimentelle Alternativsystem zur Identifikation neuer, differentiell exprimierter Gene ist die **subtraktive Hybridisierung** (SH) nach Diatchenko *et al.* (1996), inzwischen auch in kommerziellen Varianten erhältlich, z.B. das PCR-Select™-cDNA-Subtraction-Kit von

Clontech (Heidelberg). Im Prinzip wird aus zwei Vergleichsproben zunächst die in beiden verbreiteten cDNAs entfernt (Subtraktion). Dies erzielt eine Ligation entsprechender Hybridisierungs-Linker an die Testerpopulation (mit den zu isolierenden cDNAs), anschließender Hybridisierung von Tester- und Driverpool (Kontrolle) und Separation von ssDNA (einzeltsträngige, differentiell exprimierte cDNA Spezies) und dsDNA. Das Clontech-Kit führt eine methodische Modifikation ein, die ohne diesen Separationsschritt auskommt: Dazu wird der Tester-cDNA-Pool in zwei Hälften geteilt, die mit unterschiedlichen Linkern (Primerbindungsstellen) 5'-endständig verknüpft werden. In einer ersten Hybridisierung wird dann jeder Tester-Pool einzeln mit einem Driver-Pool hybridisiert, so dass nur differentielle cDNA-Spezies einzelsträngig vorliegen. Dann werden die beiden Pools ohne erneute Denaturierung miteinander hybridisiert, was zu doppelsträngigen cDNAs mit unterschiedlichen Primerbindungsstellen der differentiell exprimierten Targets führt. Nur diese werden angereichert in den darauffolgenden, *nested* PCR-Amplifikationsschritten inkl. Suppressions-PCR (Clontech-Kit: Templates gleichen Adapters an beiden Enden formen Loops, die nicht amplifiziert werden). Mit den isolierten differentiell exprimierten cDNA-Spezies wird dann entweder, markiert als Sonde, eine Library gemustert oder üblicherweise direkt eine Library konstruiert. Aus dieser werden nach dem Zufallsprinzip Klone isoliert und sequenziert, was häufig zu Redundanzen führt (Wan *et al.*, 1996; Carulli *et al.*, 1998). Einschränkend können immer nur zwei Proben miteinander verglichen werden und entweder nur erhöhte oder reduzierte Expression, je nach Zuordnung von Kontroll- und Referenzpopulation. Das Verfahren führt vornehmlich zur Isolierung stark regulierter Moleküle, subtile quantitative Unterschiede fehlen oft. Dafür ist die zur Detektion erforderliche absolute Expressionsstärke sekundär.

Wan *et al.* (1996) führte eine Vergleichsstudie durch, bei der er im selben experimentellen System an HeLa-Zellen die Leistungsfähigkeit konkurrierender Genexpressionsverfahren testet. Dabei zeigte sich neben den genannten Einschränkungen, dass DD relativ zu SH 1.) eine verbesserte Rate bestätigter Regulation erbringt (49% statt 18%), 2.) weniger RNA erfordert, 3.) mRNA sequenzabhängig identifiziert unabhängig von der Expressionsstärke, 4.) zu schnelleren Ergebnissen mit entsprechender Evaluationsmöglichkeit des experimentellen Systems führt.

In Kontrast zu allen anderen Expressionsanalysen ist „**Antisense Display**“ eine Methode zur Isolation neuer Gene basierend auf deren Funktion, entwickelt von Yonekura *et al.* (1999) zur Identifikation Angiogenese-relevanter Gene. Er konnte zeigen, dass bereits ein Oligomer von

10 bp komplementär zur Kozak-Konsensussequenz (Kozak, 1991) spezifisch bindet und die Proteinsynthese ( $^{35}\text{S}$ -Methionininkorporation) dosisabhängig blockiert. Ausgehend von einem 10 bp-Antisense-Oligomer-Zufallsgemisch wurden durch Musterung verschiedener Subpopulationen die aktiven Antisense-Spezies (aus 8192 Oligos) mit dem gesuchten Effekt isoliert und anschliessend die zugehörige cDNA mit einem Oligo-dT als Gegenprimer per RT-PCR amplifiziert und kloniert. Die ermittelten Gen-Kandidaten werden funktionell im Anti-Angiogeneseassay (Proliferationsinhibition von HMVEC) getestet. Bemerkenswerterweise lässt sich der *in vitro*-Effekt im zellfreien System auch *in vivo* unter physiologischen Bedingungen durch simple Zugabe der Oligonukleotide zum Zellkulturmedium reproduzieren. Trotz einiger Schwierigkeiten der Methode bezüglich der Spezifität und der Sensitivität, die der Autor selbst adressiert, sowie einigen Syntheseaufwands, liegt der entscheidende Vorteil in der Isolation neuer Gene basierend auf deren Funktion *per se*. Zudem wird automatisch die gesamte kodierende Sequenz kloniert, so dass sich unabhängig von deren Repräsentation in Datenbanken vollständige neue Gene isolieren lassen.

Die Komplexität verfügbarer (EST-) Datenbanken ist Voraussetzung für die erfolgreiche Genidentifikation mittels weiterer alternativer Screeningverfahren wie SAGE, Arrays und Homology cloning.

Die der elektronischen Hybridisierung (ES, s.u.) verwandte Methode **SAGE** (Serial Amplification of cDNA Ends, Velculescu *et al.*, 1995) ist letztlich eine elaborierte Methode zur EST-Sequenzierung. Dabei werden 13-20 bp kurze Tags generiert, mithilfe deren Sequenz sich in den allermeisten Fällen die zugehörige EST-Sequenz aus den Datenbanken eindeutig identifizieren lässt. Im Prinzip wird für jede zu vergleichende Population doppelsträngige cDNA synthetisiert und mittels eines häufig schneidendes Restriktionsenzym (Ankerenzym, mit vier-bp-Erkennungssequenz) randomisiert in kurze Abschnitte zerlegt. Die 3'-endständigen Sequenzabschnitte werden dann aufgereinigt, entweder über ihren Poly-A-Schwanz oder eine zuvor erfolgte Biotinylierung. Dieser Pool wird in zwei Hälften geteilt, die mit jeweils einem unterschiedlichen Linker über die erzeugten adhäsiven Enden (dem Poly-A-Schwanz gegenüberliegend) ligiert werden. Am Linker ist eine Erkennungssequenz für ein weiteres Restriktionsenzym (Tagging Enzym) integriert, mit dem nun ein 20 bp entferntes blunt-Ende generiert und so auch das 3'-Ende mit dem Poly-A-Schwanz des Fragmentes gekappt wird. Die Fragmente der beiden Pools werden nun ligiert (in gegenläufiger

Ausrichtung) und per PCR amplifiziert, wobei mithilfe der unterschiedlichen verknüpften Linker entsprechende Primerbindungsstellen eingebracht wurden. Nach dem Abtrennen der Linker erhält man aus zwei gegenläufig angeordneten, 13-20 bp kurzen Sequenzabschnitten bestehende *digitags*, die von der Vier-Basen Kennsequenz des Ankerenzym eingeraht sind. Diese werden 20-40-fach in Serie ligiert und zur Sequenzierung in einen Vektor kloniert. Die Sequenzen müssen anschliessend am Computer in die das Gen repräsentierenden Tags zerlegt und analysiert werden. Dabei korrespondiert die Expressionsstärke eines Gens mit der Anzahl zuzuordnender Sequenztags, deren Informationen in einer Datenbank abgelegt werden. Die Identifikation regulierter Gene ergibt sich aus dem Tag-Vergleich verschiedener Populationen (Gewebe oder Zustände).

Damit lassen sich mit entsprechender Automatisierung mehrere zehntausend Transkripte auswerten. Die Hauptnachteile der Methode liegen neben dem massiven Sequenzieraufwand (Wan *et al.*, 1996) und der erforderlichen spezifischen Software zur Auswertung der Sequenztags vor allem in der Tatsache, dass die korrespondierenden Gene nur für in der Genbank deponierte Sequenzen identifiziert werden können (Carulli *et al.*, 1998). Öffentliche SAGE-Datenbanken finden sich z.B. unter <http://www.sagenet.org/> und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/> (Lal *et al.*, 1999).

Inzwischen wurde SAGE auch zur Bearbeitung von Fragestellungen im Angiogenesekontext erfolgreich eingesetzt, wie neuere Arbeiten von St Croix *et al.* (2000) und de Waard *et al.* (1999) belegen.

Eine ähnliche Vorgehensweise zur Konstruktion von 3'-endständigen Genfragmenten verfolgt übrigens Kato (1995) in einem modifizierten DD-PCR Ansatz zum Vergleich von doppelsträngigen cDNA-Pools verschiedener Populationen, indem er anstelle der einfacheren Verwendung eines Satzes von Forward-Zufallsprimern einen randomisierten Verdau mit ebenfalls einem Klasse II S-Restriktionsenzym durchführt. An die resultierenden, 64 möglichen unterschiedlichen, in diesem Fall adhäsiven Enden ligiert er sukzessive in 64 Einzelreaktionen einen Pool von ebensovielen Linkern, biotinyliert zur späteren Aufreinigung. Diese 3'-genendständigen Fragmente werden mittels PCR amplifiziert (5'-Primer bindet am Linker, Gegenprimer ist Oligo-dT), aufgereinigt und auf einem PAA-Gel in gewohnter Weise differentiell analysiert. Die Verwendung von mehreren II S-Restriktionsenzymen und Oligo-dT-Primern führt zu einer guten Repräsentation des cDNA-Pools.

Auf der Suche nach verwandten Genen hat sich das *homology* oder *family cloning* erfolgreich einsetzen lassen. Durch die Verwendung eines bekannten Moleküls als Sonde zum Screening einer cDNA-Library unter unstringenten Bedingungen (oder wahlweise degenerierter Primer in konservierten Bereichen von bekannten Genen) lassen sich mitunter neue Mitglieder einer Genfamilie klonieren. Als Beispiel im Angiogenesekontext seien die nach ersterer Strategie identifizierten Angiopoietine 2-4 genannt (Maisonpierre *et al.*, 1997; Valenzuela *et al.*, 1999). Eine computerbasierte Variante durchmustert die vorhandenen EST-Datenbanken nach homologen Gensequenzen, die dann wiederum zu Gesamtgenen integriert und kloniert werden können.

Einen Schritt weiter geht die Arbeit von Vasmatazis *et al.* (1998), der durch den Vergleich des Vorkommens von ESTs aus Prostatakrebs-cDNA-Libraries gegen solche aus Normalgewebe durch elektronische Hybridisierung (ES) Onkogene identifiziert, die er danach im Dotblot und Northern-blot validiert. Die professionelle Umsetzung dieser Intention repräsentiert das EST-Projekt „**BodyMap**“ von 1993 (<http://bodymap.ims.u-tokyo.ac.jp/>, Hishiki *et al.*, 2000): Durch die quantitative Umsetzung von (nicht normalisierten) mRNA-Populationen in 3'-endständige cDNA-Libraries, PCR-Amplifikation und automatisierte Sequenzierung und Sequenzanalyse jeder cDNA soll nach und nach eine vollständige Expressionsdatenbank sämtlicher Gewebetypen oder Zellsorten des Menschen und der Maus entstehen. Die Expressionsstärke eines Genes wird durch die Anzahl des Auftretens seiner 3'-Sequenztags (Signatur) reflektiert. Die Expressionsdaten in Bezug auf ein bestimmtes Gen werden dabei in Gen-Signatur-Profilen zusammengefasst und sind via Acc.-No. abrufbar. Eine FASTA-sequenzbasierte Suche ist in Vorbereitung.

Auch vorhandene DB werden inzwischen hinsichtlich ihrer enthaltenen Expressionsdaten für Gene systematisch ausgewertet und mit experimentellen Daten zusammengeführt, was wiederum in neue Datenbanken mündet. Stellvertretend genannt seien hier die Genecards des RZPD, Weizman Institut (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards/>) sowie weitere DB basierend auf SAGE-Daten (s.o.; Lal *et al.*, 1999). Unter dem Namen „digitaler DD“ (DDD) bieten NCI / NCBI einen Algorithmus zur vergleichenden Expressionsanalyse aller in der UniGene-Datenbank verzeichneten Gen-Cluster, quantifiziert nach Frequenz in ihren zugrundeliegenden Libraries und mittels statistischen Tests auf signifikante Unterschiede geprüft (auch als „elektronischer Northern-blot“ bezeichnet). Möglich sind derzeit unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ddd.cgi?ORG=Hs> multiple Vergleiche zwischen

Libraries verschiedener humaner Organe oder zwischen verschiedenen Stadien humanen Prostata-Krebs.

Diese im Oberbegriff *data-mining* benannten Strategien ziehen mit einem Minimum an experimentellem Aufwand ‚*in silico*‘ aus den vielfältigen EST-Datenbanken nutzbare Informationen, eine aktuelle Zusammenfassung bieten Gill & Sanseau (2000). Ein Anwendungsbeispiel zur Identifikation regulatorischer Elemente im Hefegenom zeigt Vilo *et al.* (2000). Die Notwendigkeit neuer Werkzeuge zur Interpretation der gewonnenen Daten reflektiert sich auch in der zunehmenden Verfügbarkeit kommerzieller Software: Interessant vor diesem Hintergrund und masstabsetzend ist bioSCOUT® von Lion-Bioscience, das automatisch die strukturellen und funktionellen Informationen zu einer eingesetzten Gensequenz aus ca. 300 Datenbanken zusammenträgt, mit den Ergebnissen weiterrecherchiert und dessen Algorithmen ein bewertetes Endergebnis ermitteln (Dr. A. Schmidt, Lion-Bioscience, persönliche Mitteilung).

Eine grundsätzlich andere Strategie zur Identifikation von regulierten Genen verfolgen sogenannte *arrays*. Bei ihnen werden zuvor identifizierte Gene oder Genabschnitte im Dotblotverfahren auf einen Träger wie eine Membran oder einen Glas-Chip aufgebracht, um dann in vergleichender Hybridisierung mit verschiedenen markierten cDNAs die regulierten Exemplare zu identifizieren. Auf diese Weise können ausschliesslich Gene identifiziert werden, die im Array enthalten, also schon bekannt sind. Die Entwicklung und Herstellung eines solchen Arrays ist zunächst mit hohem präparativen Aufwand und Kosten verbunden, so dass die ersten verfügbaren Arrays zunächst eine Auswahl bekannter und in bestimmtem Kontext relevante Gene enthielten, wie z.B. der seit 1997 kommerziell erhältliche Human-cDNA-Expression Array I der Firma Clontech (Heidelberg) mit 588 Genen. Durch die Einführung von Robotertechnik und das Voranschreiten der cDNA-Projekte mittels Sequenzierung von Libraries im Grossmasstab mündend in zunehmend vollständige EST-Datenbanken konnten inzwischen auch hochdichte EST-Arrays anderer Grössenordnung realisiert werden, wie komplementäre **ssDNA-Microarrays** (Schena *et al.*, 1995) oder **Oligonukleotidarrays** (Lockhart *et al.*, 1996); die spezifischen Vorteile beider Techniken referieren Watson & Akil (1999).

Dies führt zu Alternativen, die in einem Experiment eine vollständige Repräsentation aller exprimierten Gene einer Zelle, eines Gewebes oder sogar des gesamten Organismus, des Transkriptoms ermöglichen (ausführlicher DNA-Array-Review von Lockhart & Winzeler, 2000). Iyer *et al.* (1999) hat in einer richtungsweisenden Arbeit aus damaligen 40.000 humanen UniGene Clustern des I.M.A.G.E.-Konsortiums (Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression, Lennon *et al.*, 1996) 10.000 ausgewählt, für die ein physikalischer Klon zur Verfügung stand. Dieses 10 k-Set enthält so vollständig wie möglich 4000 benannte Gene, weitere 2000 mit anderen Organismen eng verwandte sowie 4000 anonyme Gene. Nach automatisierter Amplifikation wurden die aufgereinigten PCR-Produkte auf einen Glasträger aufgebracht und fixiert (1,8 x 1,8 cm<sup>2</sup> enthält 9996 Elemente im Abstand von 175 µm). Nach dem Design lässt sich dieser Microarray anschliessend zur Messung relativer Expression zweier cDNA-Pools im Vergleich verwenden. Dazu wurden die cDNA-Populationen unterschiedlich farbmarkiert und zu gleichen Teilen gemischt. In der anschliessenden Hybridisierung mit dem Microarray kompetieren die beiden Populationen um spezifische Bindungspartner. Das präferentielle Vorkommen einer cDNA in einer der beiden Populationen (die Expressionsregulation) wird durch die relative Anreicherung des entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffes an der Klonposition reflektiert. Somit lässt sich in einem Hybridisierungsschritt simultan Induktion als auch Inhibition für die Gesamtzahl der aufbrachten Gene ermitteln (Prinzip / Protokoll z.B. bei Brown & Botstein, 1999; Duggan *et al.*, 1999). Nach Abschluss des Human-Genom-Projektes werden in naher Zukunft vollständige cDNA-Pools von Zell- oder Gewebetypen konstruiert sein, ein 15 k-Set aus der gleichen Arbeitsgruppe ist bereits angekündigt. Einmal konstruiert, lässt sich ein solcher Chip maschinell schnell vervielfältigen (pro Tag 150 Kopien eines 12.000 Gen-Arrays) und in der Folge zunehmender Verbreitung sinkt auch die Technik in den üblichen finanziellen Bereich von Grossgeräten, bei nur marginalen Chip-Kopienkosten (ca. 40 DM für ein Hefe-Genom-Array; alle Angaben aus Brown & Botstein, 1999).

Die Handhabung derartiger Genzahlen erfordert neben Robotern zur Microarrayherstellung massiven Computereinsatz. Der Umgang mit und die Analyse dieser massenhaft auftretenden, in ein elektronisches Format umgewandelten und erst noch zu bewertenden biologischen Daten wird zu dem ‚Flaschenhals‘ dieser Technologie; dabei kommt es auf die Umwandlung der Daten in Information und diese wiederum in Wissen an. Die Strategie bioinformatischer



Vorgehensweise wird beispielsweise diskutiert in Bassett *et al.* (1999), Zweiger (1999) und Brazma & Vilo (2000).

In der zitierten Schlüsselarbeit erfolgte die automatisierte Auswertung mit speziell entwickelter Software zur Regulationsberechnung aus dem Verhältnis der beiden Fluoreszenzen. Des Weiteren ist erstmals eine Clusterung der Ergebnisse nach **Expressionsprofilen** in Regulationsstärke und Zeitverlauf sowie funktionellen Gruppen bekannter Gene möglich. Darin lassen sich dann die Expressionsprofile unbekannter Gene einordnen und so über deren Identifikation der Regulation hinaus eventuell erste Hinweise auf deren Funktion ziehen. Damit lässt sich erstmals das gesamte **Zellverhalten auf Genexpressionsebene** erfassen, da die erstellten Karten auch als Darstellung des zugrundeliegenden genetisch-transkriptionellen Programms betrachtet werden können, als zusammenhängendes, dynamisch-molekulares Bild der lebenden Zelle (Brown & Botstein, 1999). Auf diese Weise erscheint eine Perspektive zur Überwindung der Limitation zeitgenössischer Molekularbiologie, die eben auch methodisch verursacht ist: Die Ablösung der Deskription statischer Regulations-Kaskaden durch **dynamische Balancemodelle** (für Angiogenese z.B. vorgeschlagen von Iruela-Arispe & Dvorak, 1997; Hanahan & Folkman, 1996; Folkman, 1995) kommt einer Dogmaablösung weg von gleichermassen monokausalen Erklärungs- und Untersuchungsmustern gleich. Verschiedene Autoren lenken die Aufmerksamkeit auf den Aspekt, dass sich für eine komplexe Erkrankung oftmals kein einzelnes Gen verantwortlich machen lässt; sie ist vielmehr abhängig von einem ganzen Expressions-Set (Eisenberg *et al.*, 2000; Risch, 2000; im vaskulären Kontext: Rubin & Tall, 2000), dessen Gene alle für sich genommen ‚normal‘ erscheinen können (Watson & Akil, 1999). Entsprechend der Erkenntnis, dass die Transkription einer Vielzahl von Genen nicht ‚an- oder ausgeschaltet‘ wird, sondern ein relatives ‚mehr oder weniger‘ seiner Genprodukte in Bezug zu den Gegenspielern in einem kompliziert verschachteltem, analogen Netzwerk (wiederum ausgelöst durch die Summe oftmals gegensätzlicher Stimuli) den Effekt bestimmt (Duggan *et al.*, 1999; Chien, 2000 für kardiologische Erkrankungen), können mit entsprechenden Werkzeugen qualitativ völlig neue Kategorien von Fragen adressiert werden (Vukmirovic & Tilghman, 2000). Allerdings schränkt Duggan *et al.* (1999) ein, dass die Ermittlung purer Expressionsprofile allein nicht zum Verständnis der hochverknüpften und verschachtelten Kontrollregelkreise des Zellverhaltens führen kann, sondern statistisch mathematische Ansätze zusätzlich erforderlich sind. Beispielsweise könnte eine schrittweise Diskriminanzanalyse aufdecken, welche Gengruppe

am besten zwischen verschiedenen Probenotypen diskriminiert (Zweiger, 1999). In seinem aktuellen Review stellt Eisenberg *et al.* (2000) mehrere sowohl experimentelle als auch computerbasierte Methoden zur funktionellen Clusterung von Proteinen zusammen. Die funktionellen Netzwerke können dann metabolische Stoffwechselwege spiegeln, genauso wie Signalkaskaden oder die Formierung komplexer Makromoleküle wie etwa Ribosomen.

Damit erlaubt die neuartige Erstellung vollständiger **genomischer Karten genetischer Expression oder Funktion** die freie Erkundung eines integrierten Bildes des Gesamtsystems, im Gegensatz zur Überprüfung von Theorien und Modellen (Brown & Botstein, 1999). Die Autoren prophezeien ferner, die daraus abzuleitenden neuen Modelle werden konventionellen Überzeugungen widersprechen.

Grosse Bedeutung erlangt vor diesem Hintergrund die vergleichende Untersuchung etablierter **Modellorganismen**, deren gesamtes Genom bereits entschlüsselt ist, wie Hefe, Fadenwurm, mehr als ein Dutzend Bakterien und bald die Fliege; Makalowski & Boguski (1998) analysierten bereits 2800 Sequenzen orthologer Gene von Nagern und Mensch. Nach der Sequenzierung des humanen Genoms wird die Identifikation von neuen Genen abgelöst durch deren Funktionsbestimmung. Der erste Schritt dorthin ist zwangsläufig die Ermittlung von Expressionsmustern und die Analyse der Regulation, so dass den neuen Ansätzen zweifellos der Status eines Durchbruchs zukommt. So gesehen hat sicherlich schon eine „molekulare Revolution“ in der Pathologie stattgefunden, eine neue „Genom-Ära“ eingesetzt (Going & Gusterson, 1999). Im nächsten Schritt zu einem umfassenden Verständnis des Lebens auf molekularer Basis folgt dann die funktionelle Charakterisierung auf Proteinebene, kurz **„Proteomics“**, (umfassend definiert im Review von Pandey & Mann, 2000). Diese wird münden in das Design auf rationaler Grundlage spezifisch zugeschnittener Wirksubstanzen (*biomolecular engineering*) durch *DNA-shuffling*, die Rekombination grosser funktioneller Domänen (aktueller Review von Ryu & Nam, 2000). Erst auf Grundlage dieser Erkenntnisse werden wirklich aussichtsreiche Ansätze therapeutischer Intervention für genetisch verursachte Leiden realisierbar sein.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Differential Display-PCR (DD) ist eine komparative mRNA-Fingerprinttechnik zur Identifikation differentiell exprimierter Gene durch die vergleichende Darstellung randomisiert amplifizierter cDNA-Teilpopulationen. Ein optimiert elaboriertes Protokoll dieses Verfahrens wurde eingesetzt zur genetischen Expressionsanalyse aktivierter Endothelzellen als *in vitro*-Modell für die Biologie der Angiogenese, der Sprossung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden. Dabei kam ein zweidimensionales *in vitro*-Modell boviner Aortenendothelzellen (BAEC) zum Einsatz, bei dem zwei aktivierte, subkonfluent proliferierende Zellpopulationen ohne und mit Zytokinstimulation (bFGF, Fibroblasten-Wachstumsfaktor II) gegenüber zwei konfluent arretierten Populationen ohne und mit Inhibitor (funktionsneutralisierender Antikörper) desgleichen Zytokins verglichen wurden.

Von den bearbeiteten 107 reproduzierten regulierten Banden aus 90 DD-Primerkombinationen liessen sich 86 Genfragmente zwischen 300-1200 bp reamplifizieren und klonieren. Davon konnte für 47 Fragmente (55%) die Regulation im Northern-blot verifiziert werden, eine methodenspezifisch überdurchschnittliche Positivrate. Die bearbeiteten 41 hochregulierten Fragmente liessen sich im Sequenzdatenbankabgleich auf 35 distinkte Gene zurückführen, 16 neue und 19 bekannte Gene, darunter das Proteasom, Endothelin 1, Thrombospondin 1, Caveolin 1, Lipocortin 1,  $\alpha G_i$  sowie verschiedene Hitzeschockproteine. Für sämtliche neuen Gene wurden die Expressionsmuster in 8 verschiedenen Organgeweben und dem physiologischen Angiogenesemodell des weiblichen ovariellen Zyklus im Northern-blot bestimmt. Fünf ausgewählte neue Gene konnten mittels EST-Datenbank (expressed sequencetags) durch überlappende Integration vollständig identifiziert und kloniert werden und sind in der EMBL-Datenbank deponiert. Deren eingehendere Charakterisierung erbrachte einen membranständigen (40-9-1) und 4 lösliche Proteinkandidaten, darunter zwei mit metabolischem Bezug (40-9-1, 42-9-9), ein Zellzyklusregulator (40-6-3) sowie einer mit partieller Homologie zu einem Transkriptionscoaktivator (40-2-3). Von besonderem Interesse im angiogenen Kontext sind davon das 10-transmembranöse Transporterproteinhomolog (40-9-1) und die regulativen Elemente (40-2-3, 40-6-3), sowie der verbleibende Kandidat (67-11-3) ohne näher bestimmte Funktion, für deren weitere Analyse strategische Ansätze erstellt wurden.

Die Arbeit adressiert die generellen Vor- und Nachteile von DD und diskutiert sie ausführlich im Spiegel aktueller Ansätze des Expressions-*profilings*. Dabei werden die beiden gegenwärtigen Limitationen von Expressionsanalysen herausgearbeitet, nämlich die überwiegend noch ausstehende Bearbeitung der meisten identifizierten Kandidaten sowie die Unvollständigkeit und Ungenauigkeit gegenwärtiger Datenbanken mündend in die Auswahl bearbeiteter Kandidaten nach pragmatischen anstelle biologischer Kriterien. Demgegenüber steht das beachtliche Potential der neuen genomweiten Expressionsanalysen in der angehenden ‚genomischen Ära‘ nach der vollständigen Sequenzierung des humanen Genoms.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams JC (1997)** Thrombospondin-1. *Int J Biochem Cell Biol* **29**(6): 861-5
- Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, Risau W und Klein R (1999)** Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* **13**(3): 295-306
- Akioka H, Forsberg NE, Ishida N, Okumura K, Nogami M, Taguchi H, Noda C und Tanaka K (1995)** Isolation and characterization of the HC8 subunit gene of the human proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **207**(1): 318-23
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K und Watson JD (1989)** Molecular Biology of the Cell. *3rd edition* Garland, New York
- An G, Luo G, Veltri RW und O'Hara SM (1996)** Sensitive, nonradioactive differential display method using chemiluminescent detection. *Biotechniques* **20**(3): 342-4, 346
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M und Isner JM (1999)** Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* **85**(3): 221-8
- Asham EH, Loizidou M und Taylor I (1998)** Endothelin-1 and tumour development. *Eur J Surg Oncol* **24**(1): 57-60
- Augustin HG (1998)** Antiangiogenic tumour therapy: will it work? *Trends Pharmacol Sci* **19**(6): 216-22
- Augustin HG, Braun K, Telemenakis I, Modlich U und Kuhn W (1995)** Ovarian angiogenesis. Phenotypic characterization of endothelial cells in a physiological model of blood vessel growth and regression. *Am J Pathol* **147**(2): 339-51
- Augustin HG, Kozian DH und Johnson RC (1994)** Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* **16**(12): 901-6
- Augustin I, Betz A, Herrmann C, Jo T und Brose N (1999)** Differential expression of two novel Munc13 proteins in rat brain. *Biochem J* **337**(Pt 3): 363-71
- Augustin Voss HG, Voss AK und Pauli BU (1993)** Senescence of aortic endothelial cells in culture: effects of basic fibroblast growth factor expression on cell phenotype, migration, and proliferation. *J Cell Physiol* **157**(2): 279-88
- Bagavandoss P und Wilks JW (1990)** Specific inhibition of endothelial cell proliferation by thrombospondin. *Biochem Biophys Res Commun* **170**(2): 867-72
- Bassett DE, Jr., Eisen MB und Boguski MS (1999)** Gene expression informatics--it's all in your mine. *Nat Genet* **21**(1 Suppl): 51-5
- Bauer D, Muller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P und Strauss M (1993)** Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res* **21**(18): 4272-80

- Bavisotto LM, Schwartz SM und Heimark RL (1990)** Modulation of Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent intercellular adhesion in bovine aortic and human umbilical vein endothelial cells by heparin-binding growth factors. *J Cell Physiol* **143**(1): 39-51
- Bertioli DJ, Schlichter UH, Adams MJ, Burrows PR, Steinbiss HH und Antoniow JF (1995)** An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res* **23**(21): 4520-3
- Bishop JO, Morton JG, Rosbash M und Richardson M (1974)** Three abundance classes in HeLa cell messenger RNA. *Nature* **250**(463): 199-204
- Boehm T, Folkman J, Browder T und O'Reilly MS (1997)** Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance [see comments]. *Nature* **390**(6658): 404-7
- Bornstein P (1995)** Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol* **130**(3): 503-6
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54
- Brazma A und Vilo J (2000)** Gene expression data analysis. *FEBS Lett* **480**(1): 17-24
- Bretscher MS und Whytock S (1977)** Membrane-associated vesicles in fibroblasts. *J Ultrastruct Res* **61**(2): 215-7
- Brown PO und Botstein D (1999)** Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* **21**(1 Suppl): 33-7
- Bruhn L, Munneryn A und Grosschedl R (1997)** ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCR $\alpha$  enhancer function. *Genes Dev* **11**(5): 640-53
- Buess M, Moroni C und Hirsch HH (1997)** Direct identification of differentially expressed genes by cycle sequencing and cycle labelling using the differential display PCR primers. *Nucleic Acids Res* **25**(11): 2233-5
- Canfield AE, Boot-Handford RP und Schor AM (1990)** Thrombospondin gene expression by endothelial cells in culture is modulated by cell proliferation, cell shape and the substratum. *Biochem J* **268**(1): 225-30
- Carmeliet P (2000)** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**(4): 389-95
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compennolle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin Met al. (1999)** Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**(2): 147-57
- Carulli JP, Artinger M, Swain PM, Root CD, Chee L, Tulig C, Guerin J, Osborne M, Stein G, Lian J und Lomedico PT (1998)** High throughput analysis of differential gene expression. *J Cell Biochem Suppl* **31**: 286-96
- Chen JJ und Peck K (1996)** Non-radioisotopic differential display method to directly visualize and amplify differential bands on nylon membrane. *Nucleic Acids Res* **24**(4): 793-4

- Chien KR (2000)** Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases. *Nature* **407**(6801): 227-32
- Chomczynski P und Sacchi N (1987)** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**(1): 156-9
- Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J und Bloch W (1992)** Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res* **20**(7): 1717-23
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM und Stern DM (1998)** Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**(10): 3527-61
- Clark JM (1988)** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **16**(20): 9677-86
- Claverie JM (1992)** Identifying coding exons by similarity search: alu-derived and other potentially misleading protein sequences. *Genomics* **12**(4): 838-41
- Claverie JM und Makalowski W (1994)** Alu alert [letter]. *Nature* **371**(6500): 752
- Corvera S, DiBonaventura C und Shpetner HS (2000)** Cell confluence-dependent remodeling of endothelial membranes mediated by cholesterol. *J Biol Chem*
- Darden DL, Hu FZ, Ehrlich MD, Gorry MC, Dressman D, Li HS, Whitcomb DC, Hebda PA, Dohar JE und Ehrlich GD (2000)** RNA differential display of scarless wound healing in fetal rabbit indicates downregulation of a CCT chaperonin subunit and upregulation of a glycophorin-like gene transcript. *J Pediatr Surg* **35**(3): 406-19
- Dawas K, Loizidou M, Shankar A, Ali H und Taylor I (1999)** Angiogenesis in cancer: the role of endothelin-1. *Ann R Coll Surg Engl* **81**(5): 306-10
- Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA und Bouck NP (1997)** CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* **138**(3): 707-17
- de Waard V, van den Berg BM, Veken J, Schultz-Heienbrok R, Pannekoek H und van Zonneveld AJ (1999)** Serial analysis of gene expression to assess the endothelial cell response to an atherogenic stimulus. *Gene* **226**(1): 1-8
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED und Siebert PD (1996)** Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 6025-30
- Donoviel DB, Amacher SL, Judge KW und Bornstein P (1990)** Thrombospondin gene expression is associated with mitogenesis in 3T3 cells: induction by basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* **145**(1): 16-23
- Dragoni I, Mariotti M, Consalez GG, Soria MR und Maier JA (1998)** EDF-1, a novel gene product down-regulated in human endothelial cell differentiation. *J Biol Chem* **273**(47): 31119-24
- Drexler HC (1997)** Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(3): 855-60

- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P und Trent JM (1999)** Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* **21**(1 Suppl): 10-4
- Dupuis J, Rouleau JL und Cernacek P (1998)** Reduced pulmonary clearance of endothelin-1 contributes to the increase of circulating levels in heart failure secondary to myocardial infarction [see comments]. *Circulation* **98**(16): 1684-7
- Dvorak HF (1986)** Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* **315**(26): 1650-9
- Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF und Dvorak AM (1999)** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **237**: 97-132
- Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH und Augustin HG (2000)** Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies [published erratum appears in *Cancer Res* 2000 Jul 1;60(13):3668]. *Cancer Res* **60**(5): 1388-93
- Eisenberg D, Marcotte EM, Xenarios I und Yeates TO (2000)** Protein function in the post-genomic era. *Nature* **405**(6788): 823-6
- Engelman JA, Wykoff CC, Yasuhara S, Song KS, Okamoto T und Lisanti MP (1997)** Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J Biol Chem* **272**(26): 16374-81
- Engelman JA, Zhang X, Galbiati F, Volonte D, Sotgia F, Pestell RG, Minetti C, Scherer PE, Okamoto T und Lisanti MP (1998)** Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer disease, and muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* **63**(6): 1578-87
- Engelman JA, Zhang XL und Lisanti MP (1999)** Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Lett* **448**(2-3): 221-30
- Eriksson U und Alitalo K (1999)** Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors. *Curr Top Microbiol Immunol* **237**: 41-57
- Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T und Risau W (1998)** Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* **140**(4): 947-59
- Feige JJ (1999)** [Thrombospondins: multimodular proteins with angiostatic function]. *Pathol Biol (Paris)* **47**(4): 339-44
- Feil C und Augustin HG (1998)** Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* **247**(1): 38-45
- Fields C, Adams MD, White O und Venter JC (1994)** How many genes in the human genome? [news] [see comments]. *Nat Genet* **7**(3): 345-6
- Flowers MA, Wang Y, Stewart RJ, Patel B und Marsden PA (1995)** Reciprocal regulation of endothelin-1 and endothelial constitutive NOS in proliferating endothelial cells. *Am J Physiol* **269**(6 Pt 2): H1988-97



- Folkman J (1995)** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1**(1): 27-31
- Frohman MA, Downs TR, Chomczynski P und Frohman LA (1989)** Cloning and characterization of mouse growth hormone-releasing hormone (GRH) complementary DNA: increased GRH messenger RNA levels in the growth hormone-deficient lit/lit mouse. *Mol Endocrinol* **3**(10): 1529-36
- Fusenig NE und Boukamp P (1998)** Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog* **23**(3): 144-58
- Galbiati F, Volonte D, Engelman JA, Watanabe G, Burk R, Pestell RG und Lisanti MP (1998)** Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *Embo J* **17**(22): 6633-48
- Gale NW und Yancopoulos GD (1999)** Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* **13**(9): 1055-66
- Gill RW und Sanseau P (2000)** Rapid in silico cloning of genes using expressed sequence tags (ESTs). *Biotechnol Annu Rev* **5**: 25-44
- Goede V, Brogelli L, Ziche M und Augustin HG (1999)** Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int J Cancer* **82**(5): 765-70
- Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Koziar D und Augustin HG (1998)** Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* **78**(11): 1385-94
- Going JJ und Gusterson BA (1999)** Molecular pathology and future developments. *Eur J Cancer* **35**(14): 1895-904
- Goligorsky MS, Budzikowski AS, Tsukahara H und Noiri E (1999)** Co-operation between endothelin and nitric oxide in promoting endothelial cell migration and angiogenesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**(3): 269-71
- Graf D, Fisher AG und Merckenschlager M (1997)** Rational primer design greatly improves differential display-PCR (DD-PCR). *Nucleic Acids Res* **25**(11): 2239-40
- Hanahan D und Folkman J (1996)** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**(3): 353-64
- Hishiki T, Kawamoto S, Morishita S und Okubo K (2000)** BodyMap: a human and mouse gene expression database. *Nucleic Acids Res* **28**(1): 136-8
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD und Wiegand SJ (1999a)** Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**(5422): 1994-8
- Holash J, Wiegand SJ und Yancopoulos GD (1999b)** New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* **18**(38): 5356-5362
- Holland CA, Mayrand S und Pederson T (1980)** Sequence complexity of nuclear and messenger RNA in HeLa cells. *J Mol Biol* **138**(4): 755-78

- Hurlstone AF, Reid G, Reeves JR, Fraser J, Strathdee G, Rahilly M, Parkinson EK und Black DM (1999)** Analysis of the CAVEOLIN-1 gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumours and tumour-derived cell lines. *Oncogene* **18**(10): 1881-90
- Ikonomov OC und Jacob MH (1996)** Differential display protocol with selected primers that preferentially isolates mRNAs of moderate- to low-abundance in a microscopic system. *Biotechniques* **20**(6): 1030-4, 1036-8, 1040-2
- Iruela Arispe ML, Porter P, Bornstein P und Sage EH (1996)** Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis, is regulated by progesterone in the human endometrium. *J Clin Invest* **97**(2): 403-12
- Iruela-Arispe ML und Dvorak HF (1997)** Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost* **78**(1): 672-7
- Iruela-Arispe ML, Lombardo M, Krutzsch HC, Lawler J und Roberts DD (1999)** Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats [In Process Citation]. *Circulation* **100**(13): 1423-31
- Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JCF, Trent JM, Staudt LM, Hudson J, Jr., Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D und Brown PO (1999)** The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum [see comments]. *Science* **283**(5398): 83-7
- Janat MF und Liau G (1992)** Transforming growth factor beta 1 is a powerful modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **150**(2): 232-42
- Kato K (1995)** Description of the entire mRNA population by a 3' end cDNA fragment generated by class IIS restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* **23**(18): 3685-90
- Kelleher DJ, Kreibich G und Gilmore R (1992)** Oligosaccharyltransferase activity is associated with a protein complex composed of ribophorins I and II and a 48 kd protein. *Cell* **69**(1): 55-65
- Kirchengast M und Munter K (1999)** Endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in cardiovascular remodeling. *Proc Soc Exp Biol Med* **221**(4): 312-25
- Kitagawa K, Skowrya D, Elledge SJ, Harper JW und Hieter P (1999)** SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Mol Cell* **4**(1): 21-33
- Kokame K, Kato H und Miyata T (1996)** Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. *J Biol Chem* **271**(47): 29659-65
- Koleske AJ, Baltimore D und Lisanti MP (1995)** Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(5): 1381-5
- Korff T und Augustin HG (1998)** Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* **143**(5): 1341-52
- Korff T und Augustin HG (1999)** Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J Cell Sci* **112**(Pt 19): 3249-58
- Kozak M (1991)** An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J Cell Biol* **115**(4): 887-903

- Kozak M (1995)** Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1995 Jul 18;92(15):7134]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7): 2662-6
- Kozian DH (1996)** Genexpressionsanalyse aktivierter Endothelzellen mittels Differentiellem RNA-Display: Identifizierung und Regulation von Follistatin in migrierenden Endothelzellen. Dissertation, Georg-August Universität, Göttingen
- Kozian DH und Kirschbaum BJ (1999)** Comparative gene-expression analysis. *Trends Biotechnol* **17**(2): 73-8
- Kubota H, Hynes G und Willison K (1995)** The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1). Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol. *Eur J Biochem* **230**(1): 3-16
- Kwok S und Higuchi R (1989)** Avoiding false positives with PCR [published erratum appears in Nature 1989 Jun 8;339(6224):490]. *Nature* **339**(6221): 237-8
- Lal A, Lash AE, Altschul SF, Velculescu V, Zhang L, McLendon RE, Marra MA, Prange C, Morin PJ, Polyak K, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Strausberg RL und Riggins GJ (1999)** A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res* **59**(21): 5403-7
- Lampugnani MG und Dejana E (1997)** Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol* **9**(5): 674-82
- Lassalle P, Molet S, Janin A, Heyden JV, Tavernier J, Fiers W, Devos R und Tonnel AB (1996)** ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem* **271**(34): 20458-64
- Lawler JW, Slayter HS und Coligan JE (1978)** Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J Biol Chem* **253**(23): 8609-16
- Ledakis P, Tanimura H und Fojo T (1998)** Limitations of differential display. *Biochem Biophys Res Commun* **251**(2): 653-6
- Lennon G, Auffray C, Polymeropoulos M und Soares MB (1996)** The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* **33**(1): 151-2
- Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, Sager R und Pardee AB (1992)** Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res* **52**(24): 6966-8
- Liang P, Averboukh L und Pardee AB (1993)** Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res* **21**(14): 3269-75
- Liang P und MacRae TH (1997)** Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J Cell Sci* **110**(Pt 13): 1431-40
- Liang P und Pardee AB (1992)** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [see comments]. *Science* **257**(5072): 967-71
- Liaw L und Schwartz SM (1993)** Comparison of gene expression in bovine aortic endothelium in vivo versus in vitro. Differences in growth regulatory molecules. *Arterioscler Thromb* **13**(7): 985-93

- Linskens MH, Feng J, Andrews WH, Enlow BE, Saati SM, Tonkin LA, Funk WD und Villeponteau B (1995)** Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucleic Acids Res* **23**(16): 3244-51
- Liu J, Razani B, Tang S, Terman BI, Ware JA und Lisanti MP (1999)** Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. Angiogenesis inhibitors block vascular endothelial growth factor-induced down-regulation of caveolin-1. *J Biol Chem* **274**(22): 15781-5
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H und Brown EL (1996)** Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays [see comments]. *Nat Biotechnol* **14**(13): 1675-80
- Lockhart DJ und Winzler EA (2000)** Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**(6788): 827-36
- Lohmann J, Schickle H und Bosch TC (1995)** REN display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *Biotechniques* **18**(2): 200-2
- Lusis AJ (2000)** Atherosclerosis. *Nature* **407**(6801): 233-41
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN und Yancopoulos GD (1997)** Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis [see comments]. *Science* **277**(5322): 55-60
- Majack RA, Mildbrandt J und Dixit VM (1987)** Induction of thrombospondin messenger RNA levels occurs as an immediate primary response to platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* **262**(18): 8821-5
- Makalowski W und Boguski MS (1998)** Evolutionary parameters of the transcribed mammalian genome: an analysis of 2,820 orthologous rodent and human sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9407-12
- Malhotra K, Foltz L, Mahoney WC und Schueler PA (1998)** Interaction and effect of annealing temperature on primers used in differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **26**(3): 854-6
- Martin KJ, Kwan CP, O'Hare MJ, Pardee AB und Sager R (1998)** Identification and verification of differential display cDNAs using gene-specific primers and hybridization arrays. *Biotechniques* **24**(6): 1018-26
- Miele G, MacRae L, McBride D, Manson J und Clinton M (1998)** Elimination of false positives generated through PCR re-amplification of differential display cDNA. *Biotechniques* **25**(1): 138-44
- Miklos GL und Rubin GM (1996)** The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms. *Cell* **86**(4): 521-9
- Mosher DF (1990)** Physiology of thrombospondin. *Annu Rev Med* **41**: 85-97
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**(Pt 1): 263-73

- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S und Poltorak Z (1999)** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* **13**(1): 9-22
- Nicosia RF und Tuszynski GP (1994)** Matrix-bound thrombospondin promotes angiogenesis in vitro. *J Cell Biol* **124**(1-2): 183-93
- Oikawa T, Sasaki T, Nakamura M, Shimamura M, Tanahashi N, Omura S und Tanaka K (1998)** The proteasome is involved in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **246**(1): 243-8
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR und Folkman J (1997)** Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**(2): 277-85
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Cao Y, Moses M, Lane WS, Sage EH und Folkman J (1994a)** Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**: 471-82
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH und Folkman J (1994b)** Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma [see comments]. *Cell* **79**(2): 315-28
- Pandey A und Mann M (2000)** Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**(6788): 837-46
- Parton RG (1996)** Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol* **8**(4): 542-8
- Pauli BU, Augustin Voss HG, el Sabban ME, Johnson RC und Hammer DA (1990)** Organ-preference of metastasis. The role of endothelial cell adhesion molecules. *Cancer Metastasis Rev* **9**(3): 175-89
- Philip JG, Flower RJ und Buckingham JC (1997)** Glucocorticoids modulate the cellular disposition of lipocortin 1 in the rat brain in vivo and in vitro. *Neuroreport* **8**(8): 1871-6
- Raugi GJ, Olerud JE und Gown AM (1987)** Thrombospondin in early human wound tissue. *J Invest Dermatol* **89**(6): 551-4
- Risau W (1995)** Differentiation of endothelium. *Faseb J* **9**(10): 926-33
- Risau W (1997)** Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**(6626): 671-4
- Risau W und Flamme I (1995)** Vasculogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol* **11**: 73-91
- Risch NJ (2000)** Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* **405**(6788): 847-56
- Roberts DD (1996)** Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *Faseb J* **10**(10): 1183-91
- Robinson L, Panayiotakis A, Papas TS, Kola I und Seth A (1997)** ETS target genes: identification of *egr1* as a target by RNA differential display and whole genome PCR techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7170-5
- Rompf R und Kahl G (1997)** mRNA differential display in agarose gels. *Biotechniques* **23**(1): 28, 30, 32
- Rubin EM und Tall A (2000)** Perspectives for vascular genomics. *Nature* **407**(6801): 265-9

- Ryu DD und Nam DH (2000)** Recent progress in biomolecular engineering. *Biotechnol Prog* **16**(1): 2-16
- Sakurai T, Yanagisawa M und Masaki T (1992)** Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* **13**(3): 103-8
- Sambrook J, Maniatis T und Fritsch EF (1989)** Molecular Cloning. *2nd edition* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7
- Schaefer BC (1995)** Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal Biochem* **227**(2): 255-73
- Schena M, Shalon D, Davis RW und Brown PO (1995)** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [see comments]. *Science* **270**(5235): 467-70
- Scherer PE, Tang Z, Chun M, Sargiacomo M, Lodish HF und Lisanti MP (1995)** Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* **270**(27): 16395-401
- Schmidt M, Kroger B, Jacob E, Seulberger H, Subkowski T, Otter R, Meyer T, Schmalzing G und Hillen H (1994)** Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett* **356**(2-3): 238-43
- Schmidt T, Hummel S und Herrmann B (1995)** Evidence of contamination in PCR laboratory disposables. *Naturwissenschaften* **82**(9): 423-31
- Semenza GL (1998)** Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* **8**(5): 588-94
- Shaul PW und Anderson RG (1998)** Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol* **275**(5 Pt 1): L843-51
- Sheibani N und Frazier WA (1999)** Thrombospondin-1, PECAM-1, and regulation of angiogenesis. *Histol Histopathol* **14**(1): 285-94
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T und Lisanti MP (1999)** Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* **19**(11): 7289-304
- Smith SF (1996)** Lipocortin 1: glucocorticoids caught in the act? *Thorax* **51**(10): 1057-9
- Soares MB, Bonaldo MF, Jelene P, Su L, Lawton L und Efstratiadis A (1994)** Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(20): 9228-32
- Sokolov BP und Prockop DJ (1994)** A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* **22**(19): 4009-15
- Sompayrac L, Jane S, Burn TC, Tenen DG und Danna KJ (1995)** Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res* **23**(22): 4738-9

- Soo C, Shaw WW, Freymiller E, Longaker MT, Bertolami CN, Chiu R, Tieu A und Ting K (1999)** Cutaneous rat wounds express c49a, a novel gene with homology to the human melanoma differentiation associated gene, mda-7 [In Process Citation]. *J Cell Biochem* **74**(1): 1-10
- Spencer WE und Christensen MJ (1999)** Multiplex relative RT-PCR method for verification of differential gene expression. *Biotechniques* **27**(5): 1044-6, 1048-50, 1052
- Springer TA (1994)** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**(2): 301-14
- St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, Lal A, Riggins GJ, Lengauer C, Vogelstein B und Kinzler KW (2000)** Genes expressed in human tumor endothelium [see comments]. *Science* **289**(5482): 1197-202
- Suzuma K, Takagi H, Otani A, Oh H und Honda Y (1999)** Expression of thrombospondin-1 in ischemia-induced retinal neovascularization. *Am J Pathol* **154**(2): 343-54
- Tiao GM, Hudson K, Lieberman MA, Fischer JE und Hasselgren PO (1996)** Identification of altered gene expression in skeletal muscle during sepsis using differential display. *J Surg Res* **64**(1): 63-7
- Tokunaga T, Nakamura M, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Fukushima Y, Hatanaka H, Sadahiro S, Kijima H, Tsuchida T, Yamazaki H, Tamaoki N und Ueyama Y (1999)** Thrombospondin 2 expression is correlated with inhibition of angiogenesis and metastasis of colon cancer. *Br J Cancer* **79**(2): 354-9
- Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ und Bouck N (1993)** Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* **122**(2): 497-511
- Topper JN, Cai J, Qiu Y, Anderson KR, Xu YY, Deeds JD, Feeley R, Gimeno CJ, Wolf EA, Tayber O, Mays GG, Sampson BA, Schoen FJ, Gimbrone MA, Jr. und Falb D (1997)** Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(17): 9314-9
- Tuszynski GP und Nicosia RF (1996)** The role of thrombospondin-1 in tumor progression and angiogenesis. *Bioessays* **18**(1): 71-6
- Tuszynski GP, Rothman V, Murphy A, Siegler K, Smith L, Smith S, Karczewski J und Knudsen KA (1987)** Thrombospondin promotes cell-substratum adhesion. *Science* **236**(4808): 1570-3
- Uemori T, Asada K, Kato I und Harasawa R (1992)** Amplification of the 16S-23S spacer region in rRNA operons of Mycoplasmas by the polymerase chain reaction. *System Appl Microbiol* **15**: 181-186
- Uittenbogaard A, Ying Y und Smart EJ (1998)** Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem* **273**(11): 6525-32
- Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, McClain J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Huang T, Papadopoulos N, Maisonpierre PC, Davis S und Yancopoulos GD (1999)** Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 1904-9

- Vasak M und Hasler DW (2000)** Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol* **4**(2): 177-83
- Vasmatazis G, Essand M, Brinkmann U, Lee B und Pastan I (1998)** Discovery of three genes specifically expressed in human prostate by expressed sequence tag database analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(1): 300-4
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B und Kinzler KW (1995)** Serial analysis of gene expression [see comments]. *Science* **270**(5235): 484-7
- Vilo J, Brazma A, Jonassen I, Robinson A und Ukkonen E (2000)** Mining for putative regulatory elements in the yeast genome using gene expression data [In Process Citation]. *Ismb* **8**: 384-94
- Volpert OV, Tolsma SS, Pellerin S, Feige JJ, Chen H, Mosher DF und Bouck N (1995)** Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-2. *Biochem Biophys Res Commun* **217**(1): 326-32
- Vreugdenhil E, de Jong J, Schaaf MJ, Meijer OC, Busscher J, Vuijst C und de Kloet ER (1996)** Molecular dissection of corticosteroid action in the rat hippocampus. Application of the differential display techniques. *J Mol Neurosci* **7**(2): 135-46
- Vukmirovic OG und Tilghman SM (2000)** Exploring genome space [see comments]. *Nature* **405**(6788): 820-2
- Wan JS, Sharp SJ, Poirier GM, Wagaman PC, Chambers J, Pyati J, Hom YL, Galindo JE, Huvar A, Peterson PA, Jackson MR und Erlander MG (1996)** Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat Biotechnol* **14**(13): 1685-91
- Wang HU, Chen ZF und Anderson DJ (1998)** Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4 [see comments]. *Cell* **93**(5): 741-53
- Wang X, Brownstein MJ und Young WS (1997)** PG25, a pineal-specific cDNA, cloned by differential display PCR (DDPCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). *J Neurosci Methods* **73**(2): 187-91
- Watson SJ und Akil H (1999)** Gene chips and arrays revealed: a primer on their power and their uses. *Biol Psychiatry* **45**(5): 533-43
- Wilkinson DG (1992)** *In situ* Hybridization. II. Series Oxford University Press, Oxford, New York
- Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D und Yanagisawa M (1994)** ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* **78**(3): 473-85
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K und Masaki T (1988)** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells [see comments]. *Nature* **332**(6163): 411-5
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ und Holash J (2000)** Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**(6801): 242-8
- Yancopoulos GD, Klagsbrun M und Folkman J (1998)** Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border [comment]. *Cell* **93**(5): 661-4



- Yang X, Nakao Y, Pater MM und Pater A (1996)** Identification of two novel cellular genes associated with multistage carcinogenesis of human endocervical cells by mRNA differential display. *Carcinogenesis* **17**(3): 563-7
- Yonekura H, Migita H, Sakurai S, Wang H, Harada S, Abedin MJ, Yamagishi S und Yamamoto H (1999)** Antisense display--a method for functional gene screening: evaluation in a cell-free system and isolation of angiogenesis-related genes. *Nucleic Acids Res* **27**(13): 2591-600
- Zambrowicz BP, Friedrich GA, Buxton EC, Lilleberg SL, Person C und Sands AT (1998)** Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature* **392**(6676): 608-11
- Zhao S, Ooi SL und Pardee AB (1995)** New primer strategy improves precision of differential display. *Biotechniques* **18**(5): 842-6, 848, 850
- Zweiger G (1999)** Knowledge discovery in gene-expression-microarray data: mining the information output of the genome. *Trends Biotechnol* **17**(11): 429-36

## 7. ANHANG

### 7.1 EMBL-GENBANK-SUBMISSION

Im folgenden aufgeführt sind die -im Zuge der Arbeit- in der EMBL-Gendatenbank deponierten neuen Gene bzw. Genfragmente mit den dazugehörigen Acc.-Nos.:

**Tab. 12: Gensubmissions**

Gen	Spezies	cds	Sequenz	Genbank-No.
<b>40-2-3</b>	human	Gen komplett	3450 bp	AJ344094
	bovin	komplett	1196 bp	AJ344095
	murin	partiell	945 bp	AJ344096
<b>40-6-3</b>	human	komplett	1555 bp	AJ344097
	bovin	partiell	304 bp	AJ344098
<b>40-9-1</b>	human	komplett	4811 bp	AJ344099
	bovin	partiell	1400 bp	AJ344100
<b>42-9-9</b>	human	komplett	728 bp	AJ344101
	bovin	partiell	484 bp	AJ344102
	murin	komplett	543 bp	AJ344103
<b>67-11-3</b>	human	komplett	1577 bp	AJ344104
	bovin	partiell	401 bp	AJ344105
	murin	komplett	947 bp	AJ344106

## 7.2 ABKÜRZUNGEN

$\alpha$	Antikörper	h	Stunde(n)
Acc.-No.	<i>Accession</i> -Nummer	HGP	Human-Genom-Projekt
ad	bis auf ... hinzugeben	HRP	Horseradish-Peroxidase
Amp	Ampicillin	IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
AP	alkalische Phosphatase	kb	kilobasen
APS	Ammoniumpersulfat	kD	Kilodalton
AS	Aminosäure	l	Liter
ATCC	<i>american type culture collection</i>	LB	Luria-Bertani
ATP	Adenosintriphosphat	Lsg.	Lösung
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	Lst	Längenstandard
bidest.	zweifach destilliert	M	molar
bp	Basenpaar	m	milli oder Meter, kontext abhängig
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin	$\mu$	micro
BSA	Rinderserumalbumin	mA	Milliampere
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	min	Minute(n)
cpm	<i>counts per minute</i>	mol	Mol
C-Terminus	Carboxyl-Terminus eines Proteins	MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
cds	kodierende Sequenz	mRNA	messenger Ribonukleinsäure
d	Tag(e)	n	nano
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	NBT	p-Nitrotetrazoliumblauchlorid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	NCBI	National Center of Biotechnology Information
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat	No	Nummer
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat	OD	optische Dichte
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	opt.	optional
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat	ORF	offener Leserahmen zur Analyse
DD	Differential Display	p.a.	zur Analyse
DEPC	Diethylenpyrophosphat	PAA	Polyacryamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
DNase	Desoxyribonuklease	PBS	Phosphat gepufferte Saline
dsDNA	doppelsträngige DNA	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
DTT	Dithiothreitol	PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PVA	Polyvinylalkohol
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>	RNase	Ribonuklease
EMBL	European Molecularbiology Laboratory	rpm	Umdrehungen pro Minute
EtOH	Ethanol	RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase, (je nach Kontext)
FCS	fetales Kälberserum	s	Sekunde(n)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
g	Gramm		

ssDNA	einzelsträngige DNA	UTR	untranslatierte Region (eines Gens)
TAE	Tris-Acetat-EDTA	V	Volt
TE	Tris-EDTA	VEGF	vascular endothelial growth factor
TBE	Tris-Borat-EDTA	x	-fach
TBS	Tris-Borat-Saline	xg	fache Erdbeschleunigung
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethyldiamin	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ - D-Galaktosid
T <sub>m</sub>	Annealingtemperatur	Zellen <sub>K</sub>	konfluent kultiviert
Tris	Tris(hydroxymethyl)amino- methan	Zellen <sub>S</sub>	subkonfluent kultiviert
Tween	Polyoxyethylensorbitanmono- laurat	$\infty$	unbegrenzt
U	unit		
ü/N	über Nacht		

### 7.3 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

#### Abbildungen

Abb. 1: DD-Schema	32
Abb. 2: Prinzip des 5'-RACE	39
Abb. 3: DD-Strategie - Identifikation / Isolation differentiell exprimierter Gene	52
Abb. 4: DD-Gel	56
Abb. 5: Reamplifikation der eluierten DD-PCR-Fragmente	57
Abb. 6: Caveolin 1 Northern-blot und Western-blot	62
Abb. 7: Thrombospondin 1 Northern-blot	64
Abb. 8: 40-2-3 DD, Northern-blot und PCR-screening	69
Abb. 9: 40-2-3 Proteinexpression	70
Abb. 10: 40-6-3 DD, Northern-blot und PCR-screening	73
Abb. 11: 40-6-3 Proteinexpression	74
Abb. 12: 5'-RACE-Produkt von H 40-9-1	75
Abb. 13: Sequenzidentifikation 40-9-1	76
Abb. 14: 40-9-1 DD, Northern-blot und PCR-screening	78
Abb. 15: 42-9-9 DD, Northern-blot und PCR-screening	80
Abb. 16: 42-9-9 Proteinexpression	82
Abb. 17: 67-11-3 DD, Northern-blot und PCR-screening	85
Abb. 18: 67-11-3 Proteinexpression	87

#### Tabellen

Tab. 1: Antikörper	11
Tab. 2: Differential-Display-Primer	14
Tab. 3: PCR-Primer	15
Tab. 4: Sequenzierprimer	17
Tab. 5: 5'-RACE-Primer	18
Tab. 6: Zellpopulationen	33
Tab. 7: Software, Tools, Datenbanken	50
Tab. 8: DD-Strategie - Charakterisierung differentiell exprimierter Gene	54
Tab. 9: Liste der bekannten Gene	60
Tab. 10: Genfragmente	65
Tab. 11: Expressionsmuster im Northern-blot (MTN)	67
Tab. 12: Gensubmissions	133

## 7.4 LEBENSLAUF

Name: Tobias Schmidt  
Geburtsdatum/-ort: 27.05.1968 in Stuttgart  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1974-1978 Grundschole Holtorf und Langendam  
1978-1980 Orientierungsstufe II Nienburg  
1980-1987 Hindenburggymnasium Nienburg  
1987 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst

1987-1989 Rettungshelfer beim Deutschen Roten Kreuz-Nienburg

### Wissenschaftlicher Werdegang

Oktober 1989 Studium der Biologie an der Georg August  
Universität Göttingen  
Oktober 1991 Vordiplom im Studiengang Biologie in den Fächern  
Zoologie, Genetik, anorganische und physikalische  
Chemie  
1994-1995 Diplomarbeit "Aufdeckung von Kontaminationsquellen  
durch Amplifikation hochrepetitiver DNA-Sequenzen" im  
Institut für Anthropologie, Abteilung Prof. Dr. B. Herrmann  
April 1995 Biologie-Diplom mit dem Hauptfach Anthropologie,  
Nebenfächer Zoologie und physikalische Chemie  
seit 1996 Beginn der experimentellen Arbeiten zu vorliegender  
Dissertation im Zellbiologischen Labor der Universitäts-  
frauenklinik Göttingen in der Arbeitsgruppe von  
PD Dr. PhD H.G. Augustin

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die Dissertation mit dem Titel „Differentielle Genexpressionsanalyse aktivierter Endothelzellen“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde und daß ich mich noch an keiner anderen Universität um einen Doktorgrad beworben habe.

Meldetag 21.03.2001

Göttingen, den \_\_\_\_\_