

Adenovirale Vektoren zur doxycyclin-regulierten Expression in Endothelzellen

Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades
Magister rerum naturalium
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
Universität Wien, Alma Mater Rudolphina

Verfasst von **Horst-Dietmar Müller**
Eingereicht im November 2001

Die Arbeit wurde durchgeführt im
Institut für Gefäßbiologie und Thromboseforschung
unter der Betreuung von Univ. Prof. Dr. Erhard Hofer

Mein kollegialer Dank an: Dr. Renate Hofer-Warbinek, Dr. Markus Döchler,
Mag. Christoph Wiesner, Mag. cand. Bernhard Schweighofer,
und alle Institutsmitarbeiter, die mich hilfreich unterstützt haben.

Mein Dank gilt außerdem: Meiner Mutter,
meinen Geschwistern Mag. cand. Inez Grumer u. Dr. Andreas-L. Müller,
sowie Ing. Günter Grumer und insbesondere Mag. Ingeborg Mayer.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG	2
1.1. ENDOTHELZELLEN, VERMITTLER ZWISCHEN BLUT UND GEWEBE	2
1.1.1. <i>Vielfältige Funktionen</i>	2
1.2. ENDOTHELSPZIFISCHE WACHSTUMSFAKTOREN	4
1.2.1. <i>Vaskulogenese, die Entstehung von Adern</i>	5
1.2.2. <i>Angiogenese geht von vorhandenen EC aus</i>	5
1.2.3. <i>Der vaskuläre Wachstumsfaktor VEGF</i>	6
1.2.3.1. <i>VEGF-Rezeptoren sind membranständige Tyrosinkinasen</i>	7
1.2.3.2. <i>Angiopoietine begünstigen die Strukturierung von Adersystemen</i>	8
1.2.3.2.1. <i>Angiopoietin 1 stabilisiert die Gefäßwände</i>	8
1.2.3.2.2. <i>Angiopoietin 2 steuert postnatale Gefäßstrukturierung</i>	8
1.2.3.3. <i>Ephrine steuern die Entwicklung und Fusionierung von Arterien und Venen</i>	9
1.3. ANGIOGENESE IN TUMOREN	9
1.4. SIGNALWEGE UND INDUZIERT GENE: VOM VEGF-REZEPTOR ZU EGR-1 UND NFAT	12
1.4.1. <i>NFAT und EGR-1 sind nötig für die Expression des TF</i>	13
1.4.2. <i>Die bedeutende Funktion von EGR-1 im VEGF-Signalweg</i>	14
1.4.3. <i>Sind die Promotoren von VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-2) spezifisch für EC?</i>	14
1.5. THERAPEUTISCH RELEVANTE GENE	14
1.6. GENTHERAPEUTISCHE VEKTOREN	15
1.6.1. <i>Direkte Aufnahme von DNA</i>	16
1.6.2. <i>Lipidvermittelter Gentransfer</i>	16
1.6.3. <i>Rezeptorvermittelte Aufnahme von Konjugaten</i>	17
1.6.4. <i>Adenovirale Vektoren</i>	17
1.6.5. <i>Adenovirus-assoziiertes Virus</i>	18
1.6.7. <i>Retrovirale Vektoren</i>	18
1.7. DER ADENOVIRUS ALS BEVORZUGTES GENTRANSFERSYSTEM	18
1.7.1. <i>Beschreibung und Ätiologie</i>	18
1.7.2. <i>Kapsidstruktur</i>	19
1.7.3. <i>Replikation</i>	19
1.7.4. <i>Aufbau von Adenovirusvektoren der ersten Generation</i>	20
1.8. FRAGESTELLUNG	21
2. ERGEBNISSE	22
2.1. KONSTRUKTION DER TRANSFERVEKTOREN	22
2.1.1. <i>Konstruktion der Flk-1-Promoter-Enhancer-Kassette</i>	22
2.1.1.1. <i>Subklonierung des KpnI-HindIII-Flk-1-Promoterfragmentes aus VR83 in pSK-II</i>	23
2.1.1.2. <i>Verarbeitung des Enhancerelements von Flk-1</i>	23
2.1.1.3. <i>Assemblierung der Flk-1-tTA-Expressionsskassette</i>	24
2.1.1.3.1. <i>Subklonierung des Flk-1-Promoterfragmentes in pSP73</i>	24
2.1.1.3.2. <i>Konstruktion der Flk-1-Expressionsskassette in pSP73-Flk1</i>	24
2.1.1.4. <i>Konstruktion von pΔE1-Flk-1(Promoter)-tTA-PolyA(nls)-O1-Enhancer</i>	25
2.1.2. <i>Konstruktion der Flt-1-Promoter-Kassette</i>	25
2.1.2.1. <i>Subklonierung eines Flt-1-Promoterfragmentes in pSK-II</i>	26
2.1.2.1.1. <i>Konstruktion von Flt-1-pSK-II</i>	26
2.1.2.2. <i>Subklonierung des Flt-1-Promoter-Fragmentes und des tTA-PolyA-Fragmentes in pBS</i>	26
2.1.2.3. <i>Konstruktion von pΔE1-Flt-1-Promoter(1,4kB)-tTA-PolyA(nls)</i>	26
2.1.3. <i>Das Reporterkonstrukt pΔE1-TRE-EGFP</i>	27
2.1.3.1. <i>Konstruktion von pΔE1sp1A-TRE-CMVmin-EGFP-PolyA_{SV40}</i>	27
2.1.4. <i>Verarbeitung der gelieferten Transfer-Vektoren pΔE1-CAG-tTA(nls) und pΔE1a-TRE*</i>	29
2.1.4.1. <i>Isolierung des tTA-Elements</i>	29
2.1.4.2.1. <i>Subklonierung des tTA-Poly-A-Fragmentes in pSK-II</i>	30
2.1.5. <i>Verifizierung der konstruierten Transfervektoren</i>	30
2.1.5.1. <i>Verifizierung des Flk-1-Konstruktes</i>	30
2.1.5.1.2. <i>Sequenzierung von pΔE1sp1B-Flk-1-Kassette</i>	31
2.1.5.2. <i>Verifizierung des Flt-1-Konstruktes</i>	31
2.1.5.2.1. <i>Sequenzierung von pΔE1sp1B-Flt-1-Promoter(1,4kB)-tTA-PolyA(nls)</i>	32
2.1.5.3. <i>Verifizierung des EGFP-Reporterkonstruktes</i>	32
2.2. SELEKTION WEITERER PROMOTOREN UND POTENTIELLER THERAPIEGENE	33
2.2.1. <i>Datenbanksuche nach cDNA und genomischer DNA des Tissue Factor (F3)</i>	33

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.1. Analyse vorhandener TF-PAC-Klone	33
2.2.1.1.1. Erstellung von spezifischen Primern für den TF-Promotor	33
2.2.1.2. PCR und Sequenzierung der mutmaßlich positiven PAC-Klone	34
2.2.1.3.1. Verifizierung des TF-Promoters im genomischen Pac-Klon	35
2.2.2. Datenbanksuche nach <i>Angiopoietin 2</i>	35
2.2.2.1. Sequenzierung der ESTs von <i>Angiopoietin 2</i>	35
2.2.2.2. Hybridisierung von PAC-Klon-Filtern	36
2.2.2.3. Überprüfung der gelieferten PAC-Klone	36
2.3. HERSTELLUNG REKOMBINANTER ADV	37
2.3.1. Kontrolle der präparierten Viren durch PCR ihrer Extrakte	37
2.3.2. Produktion von <i>Adv-Flt-1-Promoter(1,4kb)-tTA(nls)</i>	37
2.3.2.1. PCR des Extraktes aus <i>Adv-Flt-1-Promoter-tTA-PolyA</i>	38
2.3.3. Produktion von <i>Adv-Flk-1-Promoter-tTA(nls)-Enhancer</i>	38
2.3.4. Vermehrung des Kontrollvirus <i>Adv-CMV-tTA</i>	38
2.3.5. Produktion des Reporters <i>Adv-TRE-CMVmini-EGFP-SV40-PolyA</i>	38
2.3.5.1. PCR mit DNA-Extrakt aus <i>Adv-CMVmini-EGFP-TRE-PolyA</i>	39
2.4. EVALUIERUNG DER REKOMBINANTEN VIREN	40
2.4.1. Erste Infektionsstudie an HUVECs	40
2.4.2. Zweite Infektionsstudie an HUVECs	41
3. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	45
3.1. GENTHERAPEUTISCHE VERSUCHE MIT ENDOTHELIIEN	45
3.2. ENTWICKLUNG EINES EC-SPEZIFISCHEN ADV-VEKTORSYSTEMS	45
3.3. HERSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN DER VEKTOREN	46
3.3. PERSPEKTIVEN	47
4. METHODEN	48
4.1. KLONIERUNGEN IN VEKTOREN	48
4.1.1. Konzentrationsmessung gereinigter Plasmide	48
4.1.2. Restriktionsverdau von Plasmiden	48
4.1.3. Gelelektrophorese von verdauten Plasmiden und Nukleinsäurefragmenten	49
4.1.3.1. Bereitung des Gels	49
4.1.3.2. Durchführung	49
4.1.4. Ausschneiden von Banden gereinigter Nukleinsäurefragmente	49
4.1.5. Phenolextraktion von DNA aus Agarose	50
4.1.6. Phosphatase vermindert Religation	51
4.1.7. Eluieren von Plasmid-DNA mittels <i>QIAGEN-Gel-Extraction-Kit (QGEK)</i>	51
4.1.8. Ligieren des Vektors mit einem Genfragment	52
4.1.8.1. Durchführung problematischer Ligationen	53
4.2. TRANSFORMATION VON E.COLI	54
4.2.1. Hitzeschock-Trafo	54
4.2.1.1. Herstellung chemisch kompetenter Hitzeschock-Zellen aus E.coli	54
4.2.1.2. Hitzeschock-Trafo von E.coli-Zellen mit Ligationsansätzen	55
4.2.1.3. Retrafo von E.coli mit präparierten Plasmiden	56
4.2.2. Elektrotrafo von E.coli	56
4.2.2.1. Herstellung elektrokompenter E.coli-Zellen	56
4.2.2.2. Durchführung der Elektrotrafo	57
4.3. KLONALE SELEKTIONSTECHNIKEN UND PRÄPARATION VON PLASMIDEN	57
4.3.1. Herstellung einer <i>IPTG-Xgal-Platte zur Selektion von Plasmiden der pSK-Familie</i>	57
4.3.2. Ansetzen einer Übernachtskultur von E.coli-Klonen	58
4.3.2.1. Herstellung eines Glycerinstocks von E.coli-Kulturen	58
4.3.3. Minipräparation von Plasmiden mit dem <i>QIAGEN-Vacuum-Miniprep-Kit</i>	58
4.3.4. Minipräparation von Plasmiden mit dem <i>QIAGEN-Spincolumn-Miniprep-Kit</i>	59
4.3.5. Plasmid-Midipräparation	59
4.3.6. Midipräparation von genomischen PAC- oder BAC-Klonen	60
4.4. PCR-TECHNIKEN	61
4.4.1. Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR)	61
4.4.1.1. Rechnerische Ermittlung der Annealingtemperatur von Oligoprimer-Paaren	62
4.4.1.2. Programmierung der PCR-Zyklen	62
4.4.1.3. Behandlung von Oligoprimern	62
4.4.1.4. Überprüfung der PCR auf einem Agarosegel	63
4.4.2. Sequenzieren von DNA mit PE-Systemen	63

Inhaltsverzeichnis

4.5. TECHNIKEN DER ZELLKULTUR.....	64
4.5.1. <i>Bereitung, Aufbewahrung und Verwendungsdauer von Nährmedien</i>	64
4.5.1.1. Wachstumsmedium für HUVECs	65
4.5.1.2. Wachstumsmedium für Kulturzellen der Linie 293	65
4.5.1.2.1. Wachstumsmedium für die Produktion von Adenoviren	65
4.5.1.3. Wachstumsmedium für Fibroblasten und humane glatte Muskelzellen (HUSMC)	65
4.5.2. <i>Isolierung von HUVECs aus Nabelschnüren</i>	65
4.5.3. <i>Auftauen eingefrorener Zellkulturen</i>	66
4.5.4. <i>Ausschwemmen von Zellen aus Kulturflaschen</i>	67
4.5.4.1. Schnelles Ausschwemmen von 293-Zellen	67
4.5.5. <i>Überführen von Kulturzellen in andere Kulturflaschen</i>	67
4.5.6. <i>Zählen von Zellen in der Neubauer'schen Kammer</i>	68
4.5.7. <i>Auftragen der Zellen auf 6-Well-Platten</i>	68
4.5.7.1. <i>Bereitung der 6-Well-Platten</i>	68
4.5.8. <i>Benutzen von 12-Well-Platten</i>	69
4.5.9. <i>Einfrieren von Zellen zur Lagerung in flüssigem Stickstoff</i>	69
4.5.10. <i>Transiente Transfektion nach der Lipofectamine-Methode</i>	69
4.5.10.1. <i>Bereitung der Transfektionsansätze für 6-Wells</i>	69
4.5.11. <i>Induzierung von Kulturzellen in 6-Wells mit Signalproteinen</i>	70
4.6. ASSAYS VON KULTURZELLEN UND ERMITTLUNG VON REPORTERGENAKTIVITÄTEN	70
4.6.1. <i>Freeze-Thaw von Transfektionsansätzen</i>	70
4.6.2. <i>Normierung von Assays</i>	71
4.6.3. <i>Messung der Fluoreszenz von GFP</i>	71
4.6.4. <i>Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration über einen Bradfordassay</i>	71
4.7. SCREENING VON KLON-BIBLIOTHEKEN	71
4.7.1. <i>Markierung der Sonden mit radioaktivem ATP</i>	72
4.7.1.1. <i>Fraktionierung der markierten DNA</i>	73
4.7.1.2. <i>Bestimmung der Strahlungsdichte markierter DNA</i>	73
4.7.2. <i>Durchführung der Hybridisierung</i>	73
4.7.3. <i>Exponieren der hybridisierten Filter auf Röntgenfilm</i>	74
4.8. ADENOVIREN ALS TRANSFIZIERUNGSSYSTEM.....	75
4.8.1. <i>Vorbereitung der zur Produktion von Adenoviren bestimmten 293-Zellen</i>	75
4.8.2. <i>Herstellung von Primärviren</i>	75
4.8.2.1. <i>Vorbereitung der Zellen</i>	75
4.8.2.2. <i>Durchführen der Transfektion</i>	75
4.8.2.3. <i>Isolierung der Primärviren</i>	76
4.8.3. <i>Herstellung monoklonaler Viren</i>	76
4.8.3.1. <i>Vorbereitung der Zellen</i>	76
4.8.3.2. <i>Erstellung der Verdünnungsreihe</i>	77
4.8.3.3. <i>Isolierung der monoklonalen Adenoviren</i>	77
4.8.4. <i>Expansion von monoklonalen Adenoviren</i>	77
4.8.4.1. <i>Expansion in 6-Wells</i>	77
4.8.4.2. <i>Expansion in Kulturflaschen</i>	78
4.8.4.3. <i>Expansion in Petrischalen</i>	78
4.8.5. <i>Aufreinigung von Adenoviren</i>	79
4.8.6. <i>Dialyse des gewonnenen Viruspräparates</i>	79
4.8.7. <i>Bestimmung des Titors von Adenoviren</i>	80
4.8.8. <i>Kontrollierte Infektion von 293-Zellen oder HUVECs mit Adenoviren</i>	80
REFERENZEN	82
A. APPENDIX	A
A.1. ABKÜRZUNGEN	A
A.2. GERÄTELISTE	C
A.3. MATERIALIEN UND REAGENZIEN	D
A.4. VERWENDETE SEQUENZEN	E
A.4.1. <i>Promoter und mRNA von VEGFR-2</i>	E
A.4.2. <i>Enhancer des VEGFR-2</i>	F
A.4.3. <i>Untranslatierter 5'-Bereich von VEGFR-1</i>	G
A.4.4. <i>EST des Tissue Factor</i>	I
A.4.5. <i>EST von Angiopoietin 2</i>	K
A.5. DAS TET-SYSTEM	M

Inhaltsverzeichnis

A.6. VERWENDETE PLASMIDE N
A.7. DNA-MARKER S
A.8. CURRICULUM VITAE T

Zusammenfassung

Endothelzellen (EC) kleiden die Innenwände von Blutgefäßen aus, stehen mit Blut und den umliegenden Geweben in direktem Kontakt und müssen deshalb eine Fülle von Signalen verarbeiten können. Durch Fehlinterpretation solcher Signale können EC die Ausbildung von krankhaften Zuständen begünstigen, wenn z.B. aufgrund von Verwirbelungen im Blutstrom die lokale Sezernierung inflammatorischer Botenstoffe die verstärkte Migration von Makrophagen in das darunterliegende Gewebe bewirkt und Atherosklerose ausgelöst. Ferner können EC von entartetem Gewebe gleichsam überlistet werden, indem sie durch den lokalen O₂-Mangel und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren - ähnlich wie bei der Wundheilung - dazu angeregt werden, versorgende Adern in Tumorgewebe einsprossen zu lassen. Die gezielte Manipulation von EC zu therapeutischen Zwecken ist somit aufgrund der besonderen Funktionen dieses Zelltyps ein medizinisch bedeutsames Ziel.

Die Aufgabenstellung vorliegender Arbeit war die Entwicklung eines Expressionssystems, welches Therapiogene in Endothelzellen zur Angiogenesehemmung wirksam werden lassen soll. Zu diesem Zweck wurden replikationsinaktive Adenoviren konstruiert, die für die Expression von gentherapeutischen Proteinen eingesetzt werden können. In den hergestellten Transfektor-Konstrukten wurde das TEToff-Expressionssystem bestehend aus zwei getrennten Komponenten eingesetzt:

- Das erste Konstrukt exprimiert den Tetracyclinrezeptor tTA unter der Kontrolle von Promotoren, von denen bekannt ist, dass sie bevorzugt in EC während der Angiogenese aktiv sind. Aus diesem Grund wurden die Promotoren der VEGF-Rezeptoren 1 und 2 (Flk-1, Flt-1) ausgewählt; als Kontrolle kam der hCMV-Promoter zum Einsatz.
- Die Expressionskassette für das Reportergen EGFP im zweiten Konstrukt wird durch die Bindung des tTA-Proteins an das TRE-Element kontrolliert.

Die Expressionskassetten wurden mittels der Transfektoren in Adenoviren eingeführt. Für das erstellte System konnte gezeigt werden, dass die Signale des Flk-1-Promoters durch das TEToff-System amplifiziert werden können. Es ist ferner möglich über Titration mit Doxycyclin die Stärke der Expression stufenlos bis auf die Hintergrundaktivität zu regeln. Die im Verlauf der Arbeit aufgebauten Vektoren und Techniken sind Schritte in Richtung der Konstruktion eines Vektorsystems, das nach Einbau von therapeutischen Genen zur Hemmung der Tumorangioese Verwendung finden soll.

1. Einleitung

1.1. Endothelzellen, Vermittler zwischen Blut und Gewebe

Die komplexen Gewebe in Vertebraten müssen jederzeit ausreichend mit Nährstoffen und O₂ versorgt werden, damit sie ihren Aufgaben im Organsystem des Körpers gerecht werden können [1]. Schon in der zweiten Woche der Schwangerschaft bilden humane Embryonen die ersten Blutgefäße aus, um das Vorantreiben einer raschen Entwicklung verschiedener Gewebetypen zu gewährleisten, denn Diffusion von lebensnotwendigen Gasen und Nährstoffen reicht allein nicht aus, um vielzelligen Organsystemen ihre weitreichenden Funktionen zu ermöglichen: Jede Zelle des Körpers ist daher nur soweit vom Blutstrom entfernt, wie es die Diffusionskonstanten (~100-200µm) der einzelnen Nährstoffe zulassen, die an und abtransportiert werden müssen [1]. Das im Gefäßsystem zirkulierende Blut hat jedoch nicht nur die Aufgabe, Benötigtes anzuliefern und Reaktionsprodukte des Metabolismus wieder abzuführen, es erreicht durch das Gefäßsystem nahezu alle Zellen und kann daher innerhalb weniger Minuten Botenstoffe, die von einem Organsystem ins Blut sezerniert werden, ± gleichmäßig im Körper verbreiten (z.B.: Insulin des Pankreas, Adrenalin der Nebenniere, Interleukine der Immunzellen). Auf

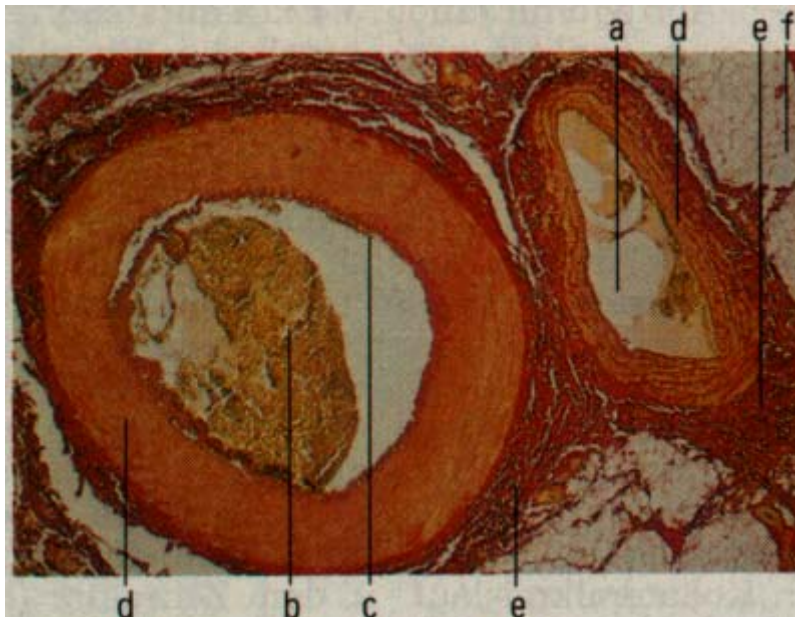


Abb. 1.1.1.: Histologischer Schnitt durch eine dickwandige Arterie und die Vena radialis (Gieson-Färbung):

- a) Venenlumen
- b) Arterienlumen
- c) Membrana elastica interna (Endothel)
- d) Tunica media (glatte Muskelzellen)
- e) Tunica adventitia (Kollagenfasern)
- f) univakuoläres Fettgewebe

Entnommen aus [2]

diese Weise kann jede beliebige Zelle des Organismus den Zustand einer anderen mit Hilfe des Gefäßsystems durch Freisetzung einer Fülle von Hormonen verschiedenster Substanzklassen beeinflussen und die Gesamtreaktionen des Organismus miteinander koordinieren. Das Gefäßsystem besteht aus zumeist von glatten Muskelzellen umgebenen Röhren mit kollagenreicher Matrix und einem Innendurchmesser von 6µm (Kapillaren) bis 5cm (Bauchaorta) [2]. Der von diesen Röhren umschlossene Innenraum wird vollständig von einem einschichtigen Endothelium ausgekleidet. Die Endothelialzellen (EC) gehören somit zum einzigen sessilen Zelltyp, der im Normalfall direkten und dauerhaften Kontakt zum Blutstrom hat. Aufgrund dieser exponierten Lage besitzen die EC ein breites Funktionsspektrum, um auf die Vielzahl von Signalen aus dem Blutstrom einerseits und dem umliegenden Gewebe andererseits reagieren zu können.

1.1.1. Vielfältige Funktionen

Endothelzellen reichen mit den durch sie ausgekleideten Gefäßen in jedes Organsystem hinein. Sie müssen daher auch im jeweiligen Gewebetyp verschiedenartige Aufgaben erfüllen: Die mikrovaskulären Kapillarsysteme der Lunge etwa stellen aufgrund des massiven Gasaustausches andere Anforderungen an das Endothel als die Adern der Peripherie oder Herzmuskulatur. Auch die Fließgeschwindigkeit, der Unterschied in der Sauerstoff- oder Kohlendioxidsättigung des Blutes in venösen oder arteriellen Gefäßsystemen ist ausschlaggebend für das differente Expressionsmuster von EC. Es ist daher nicht verwunderlich, dass sich je nach Lokalisation auch verschiedene Subtypen dieser Zellart herausgebildet haben. Damit können sie auf die verschiedenen Anforderungen im Gefüge der Organsysteme bestmöglich reagieren. Trotz allem sind die EC insgesamt durch erstaunlich viele Gemeinsamkeiten zu einem Zelltyp zusammenzufassen:

1. Einleitung

1. **Auskleiden nahezu aller Gefäßinnenwände** sowohl der blutführenden Adern als auch der Lymphgefäße in Form einer einschichtigen Intima. In adulten Organismen führen von allen EC (mit Ausnahme der an Wundheilungsprozessen beteiligten Gewebe) maximal 0,01% Zellteilungen durch [1].
2. **Sensitierung entzündlicher Prozesse** im umliegenden Gewebe und Expression chemotaktischer Botenstoffe zur Rekrutierung von Makrophagen und neutrophilen Phagozyten. Das in die Membran der EC inkorporierte E- und P-Selektin ermöglicht den Leukozyten im Bedarfsfall die Adhäsion an der Zellmembran und das als Rollen bezeichnete Herangleiten bis zum Ort der Infektion. Dort kommt es durch die Wirkung des vermehrt gebildeten Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF) sowohl zur Verminderung der Konvektivität durch Proteinaseverdau der zwischen den EC befindlichen tight junctions (VE-cadherin) als auch zur Lockerung der Kollagenmatrix, wobei die durch den Platelet-Endothelial-Cell-Adhesion-Molecule (PECAM) vermittelte Verbindung der EC zur Matrix geschwächt wird. Die Immunzellen hingegen produzieren verstärkt die membranständigen Integrine CR3 und LFA-1. Dadurch erhöhen sie die Adhäsion an die am Ort der Entzündung gebildeten Cellular Adhesion Molecules (CAMs) der Endothelzellen. Den Immunzellen ist es so möglich, den als Diapedese bezeichneten Durchtritt aus dem Blut oder der Lymphe in das entzündliche Gewebe durchzuführen [1].
3. **Sezernierung von Blutgerinnungsfaktoren:** Im Normalfall hält die EC einen antikoagulativen Zustand aufrecht. Bei Aktivierung durch $TNF\alpha$ oder VEGF werden jedoch verschiedene Faktoren der Blutgerinnung u.a. auch Faktor VIII und Gewebefaktor (TF) exprimiert [3].
4. **Erkennen einer Reihe immunologisch relevanter Verbindungen:** Hier sind nicht nur die verschiedenen Botenstoffe wie $TNF\alpha$, Interleukine, Interferone und Komplementbestandteile, sondern auch Immunglobuline, oxidierte Lipide und LPS zu nennen. Letzteres erzeugt besonders heftige Reaktionen in EC, welche daraufhin in einen aktiven Zustand wechseln, der von Immunzellen rasch erkannt wird. In dem Zusammenhang ist auch der septische Schock zu sehen: Dieser tritt ein, wenn aufgrund einer massiven Infektion mit gramnegativen Mikroorganismen und deren Vernichtung durch Immunzellen oder Komplement eine hohe Menge LPS freigesetzt wird. Dabei kommt es über die Komplementfaktoren C3a und C5a zu einer generellen Aktivierung nahezu aller EC mit einsetzender Zytokinsezernierung, Permeabilisierung von Kapillaren und Austritt von Blut ins Gewebe (Hämorrhagie), Vasodilatation und Blutdruckabfall sowie Einleitung der Blutgerinnungskaskade mit einhergehender Thrombosenbildung. Die Symptome werden durch die erhöhte Prostaglandinbildung weiter verstärkt. Dies führt sehr häufig zu einer lebensbedrohlichen Situation, die in den meisten Fällen tödlich verläuft. Die Gabe von Antibiotika kann wegen der dadurch erweiterten Zerstörung der Mikroorganismen und der daraufhin freigesetzten Membranbestandteile den Zustand verschlechtern, wenn nicht zuvor massiv mit Prostaglandinsynthesehemmern (Azetylsalicylate) behandelt wurde. Salicylate erhöhen wiederum das Risiko einer Hämorrhagie. Das Verständnis der Beteiligung der EC an der Immunantwort ist aus diesen Gründen von großem Interesse.
5. **Erfassen von O_2 -Mangelzuständen** in unterversorgtem Gewebe. Endothelzellen leiten daraufhin einen aktivierten Zustand ein, der die Kommunikationsbereitschaft mit dem umliegenden Gewebe fördert und das Einsprießen von neuen Gefäßen durch EC in das Zielgewebe vorantreibt. Neben der Notwendigkeit der Angiogenese wie sie etwa in der Wundheilung vorliegt, können hypertrophe oder maligne Gewebe auf diese Art auch ihr unkontrolliertes Wachstum begünstigen: Schnellwachsende Tumoren sind besonders aktiv in der Rekrutierung einsprießender Endothelzellen, weshalb die Anstrengungen in der medizinischen Forschung zunehmend auf die Inhibierung der Angiogenese in pathogenen Situationen abzielen.
6. **Reaktion auf bestimmte Zytokine** in ähnlicher bzw. gleicher Weise. Dies ist eines der wichtigsten Merkmale der EC, weshalb ihren verschiedenen, spezifischen Wachstumsfaktoren in der Forschung besondere Aufmerksamkeit gewidmet wird.

1. Einleitung

1.2. Endothelspezifische Wachstumsfaktoren

Lange Zeit galt VEGF als einziger EC-spezifischer Wachstumsfaktor, dessen gefäßbildende Funktion bewiesen war [4, 5]. Andere Faktoren wie der Fibroblast Growth Factor (FGF) zeigten zwar deutliche Effekte in verschiedenen EC-Assays, entfalten ihre Wirkung jedoch auf mehrere anderer Zelltypen [6]. In den Jahren zwischen 1990-2000 sind zusätzlich eine ganze Reihe sehr spezifisch wirkender Proteine charakterisiert worden, die präferentiell auf EC wirken [7, 8]. Meist werden sie in der Angiogenese (das Einsprießen von Gefäßen aus schon vorhandenen Adern ins Gewebe) oder der Vaskulogenese (die Neubildung von Adern in embryonalem Gewebe) benötigt. Neben diesen scheinen noch eine Anzahl EC-unspezifischer Zytokine wie der Platelet Derived Growth Factor oder die Transforming Growth Factor β -Familie, für die Bildung von Gefäßen wichtig zu sein, so wie eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren [9, 10]. In allen Fällen ist jedoch ein besonders ausgewogenes Verhältnis der einzelnen Faktoren zueinander nötig, um das Einsprießen der Adern ins Gewebe zu ermöglichen. Die Blockierung der Funktion auch nur eines Wachstumsfaktors kann die Ausbildung von Gefäßen einschränken oder sogar verhindern [11]. In dieser Arbeit sind vor allem die EC-spezifischen Wachstumsfaktoren von Bedeutung: Zur Generierung eines speziell in EC wirksamen Vektors sollen Promotoren jener Gene genutzt werden, von denen bekannt ist, dass sie nahezu ausschließlich in EC aktiv sind [7, 12].

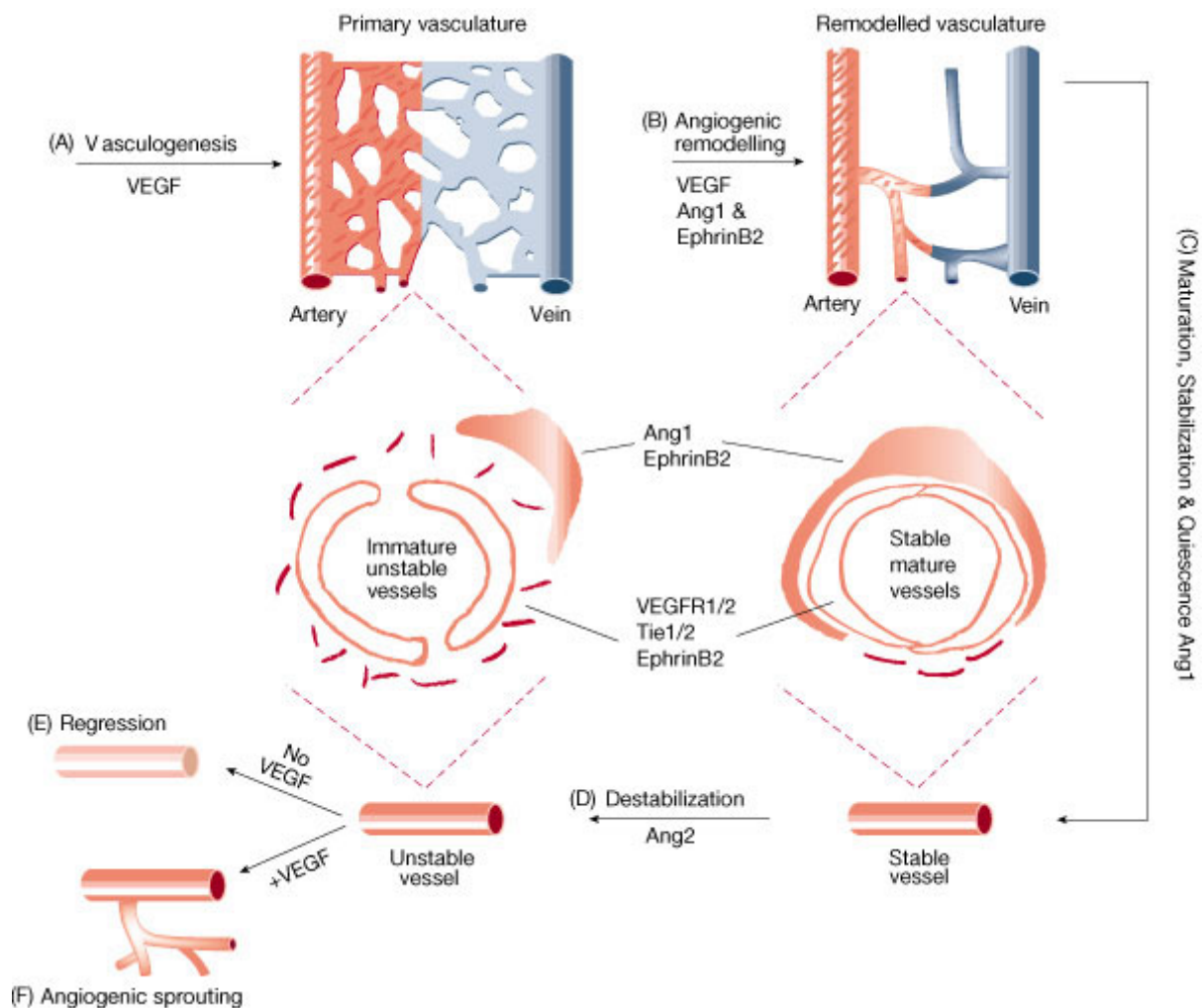


Abb. 1.2.1.: Schematische Darstellung der Funktionen von VEGF, Ang1, Ang2 und Ephrin-B2 während der Gefäßbildung. Der Vorgang beinhaltet Vaskulogenese (A), Remodulierung (B), Stabilisation und Reifung des Gefäßes (C), Destabilisierung (D), Rückbildung (E) und Einsprießen (F). Die angegebenen Wachstumsfaktoren sind den einzelnen Prozessen zugewiesen. Die Expression von Ephrin-B2 zeichnet die Arterien vom frühesten Stadium der Entwicklung aus (nicht eingezeichnet). Entnommen aus [11]

1. Einleitung

1.2.1. Vaskulogenese, die Entstehung von Adern

Die Angioneogenese, also die Neubildung von Gefäßen in bis dahin unversorgtem Gewebe, erfolgt durch in-situ-Differenzierung von Angioblasten zu Endothelzellen. Diese formen daraufhin Tubuli, die sich in weiterer Folge mit Kollagenfasern und glatten Muskelzellen umgeben und zu einem Netzwerk zusammenschließen, aus dem sich auch die Aorta und die großen Venen des Embryos herausbilden. Solche relativ großen Gefäße sind zunächst durch einen unregelmäßigen Plexus miteinander verbunden, bis sie durch angiogene Remodulierung zur tubulären Struktur finden. In dieser Phase nehmen die EC engen Kontakt zu den unterstützenden Muskelzellen, den Perizyten und der kollagenösen Matrix auf. Die Vaskulogenese tritt besonders in der frühen und späten Embryonalphase (ab der zweiten Woche) in schnell wachsendem Gewebe auf und ist mit dem Ende der Organogenese (zweiter Monat) weitgehend beendet. Trotzdem kommt es auch zur postnatalen Vaskularisierung z.B. in der Netzhaut. Tumoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie für die Aktivierung des Einsproßens von Gefäßen in ihre Masse ein ähnlich balanciertes Set an Zytokinen einsetzen, wie es in Embryonalgeweben vorherrscht [13-15].

1.2.2. Angiogenese geht von vorhandenen EC aus

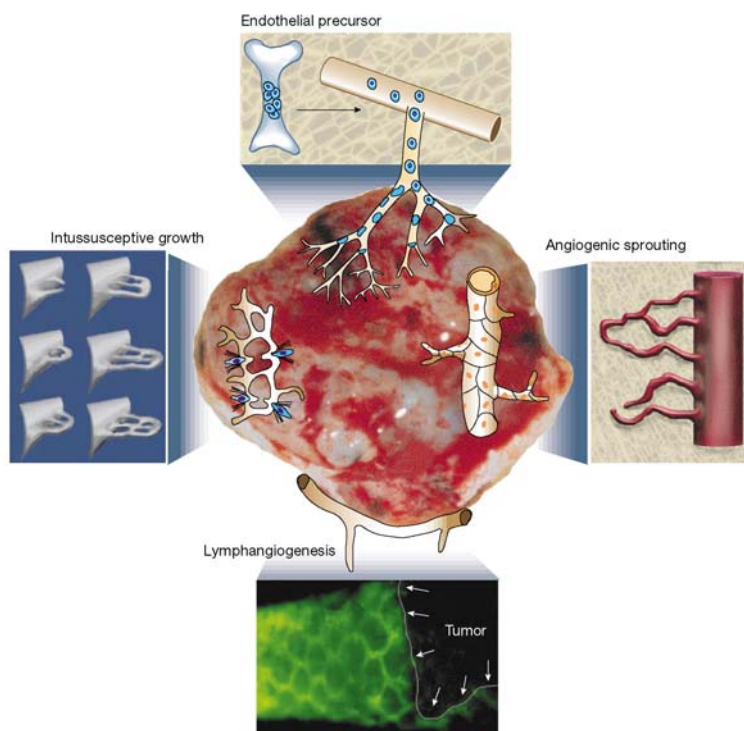


Abb. 1.2.2.1.: Verschiedene Formen der Angiogenese durch endotheliale Vorläuferzellen, Einwachsen von Gefäßsträngen in vorhandene Gefäße, Einsproßen von Adern in unversorgtes Gewebe und Lymphangiogenese. Über die abführenden Lymphgefäße werden häufig metastasierende Tumorzellen in andere Gewebe verschleppt.

Entnommen aus [1]

Das Einsproßen von Gefäßen in minderversorgte Regionen kennzeichnet die Angiogenese der differenzierten Gewebe. Dabei kommt es bei den im Umfeld existierenden Kapillaren zur teilweisen Destabilisierung der Gefäßwände durch VEGF, so dass Endothelzellen austreten und proliferieren können [11]. Auch freie EC aus dem Knochenmark können eine Neubildung von Gefäßsystemen herbeiführen [16, 17]. Die sich ausbildenden Tubuli reifen durch Einwirkung von Angiopoietin 2 zu belastbaren Adern heran. VEGF als Signal allein reicht nicht aus, um das Sproßen neuer Gefäße zu ermöglichen. Zusätzlich müssen Stress-Signale aus dem umliegenden Gewebe die Endothelzellen für diesen Prozess vorbereiten. Dies kann durch niedrigen pH, Inflammationen, mechanischen Druck proliferierender Zellen, Hypoglykämie und vor allem durch Hypoxie, wie es bei Wundheilungsreaktionen oft der Fall ist, hervorgerufen werden [9, 18]. Bei vielen oberflächlichen Verletzungen scheint oft keine Unterversorgung an O₂

vorzuliegen, die Produkte des Metabolismus werden jedoch nicht in ausreichendem Maß abgeführt, wobei die Akkumulation von Metaboliten den EC auch als aktivierendes Signal dienen könnte. Viele Krankheiten erzeugen durch massive extrazelluläre Ablagerungen hypoxischen Stress und damit erhöhte Bereitschaft zur Angiogenese, wie z.B. Diabetes [19, 20], die Plaquebildung durch Alzheimer und Vasokonstriktion bei Asthma etc. Hypoxie induziert eine Reihe von HIFs (Hypoxie-induzierte Transkriptionsfaktoren), die als Hauptschalter für die Expression verschiedener Proteine dienen, welche bei der Gefäßbildung benötigt werden: VEGF, Nitrattoxidsynthase (NOS), PDGF, Ang2, etc. [21]. Nicht nur das Einsproßen von Gefäßen, auch das Einwachsen eines interstitiellen Gewebestranges in ein vorhandenes Blutgefäß und dessen Teilung in zwei unabhängige Adern ist Teil der Angiogenese [22]. Hypoxie ist nicht nur ein Angiogenese-Stimulator, es führt auch zur Reorganisation von vorhandene Gefäßen: Sauerstoffunterversorgung der Lunge führt zum irreversiblen Verlust von Kapillaren und zur Verdickung vorhandener Gefäße mit verstärkter Muskulatur, was lebensbedrohlichen Gefäßüberdruck in der Lunge zur Folge hat [23].

1. Einleitung

Chronische Inflammationen sind der Anlass zur übermäßigen Gefäßbildung: Aktivierte Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und Blutplättchen setzen eine Vielzahl angiogener Faktoren frei, von denen neben den schon bekannten TGF- β 1, TNF α , Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), Insuline-Like-Growth-Faktor (IGF-1) und Monozyten-Chemotaxis-Protein (MCP-1) die wirksamsten darstellen [24-26]. Haematopoietische Zellen wiederum sind in der Lage durch Freisetzung von Platelet-Factor-4 und Thrombospondin die proteolytische Konversion von Plasminogen zu Angiostatin und Kollagen XVIII zu Endostatin zu ermöglichen: Angiostatin und Endostatin sind potente Inhibitoren der Gefäßbildung durch Einleitung der Apoptose von EC [27, 28]. Bezeichnend ist, dass die meisten Inhibitoren der Gefäßbildung auch die Apoptose einleiten können, während Angiogenesefaktoren potente Überlebensfaktoren für EC sind [1].

1.2.3. Der vaskuläre Wachstumsfaktor VEGF

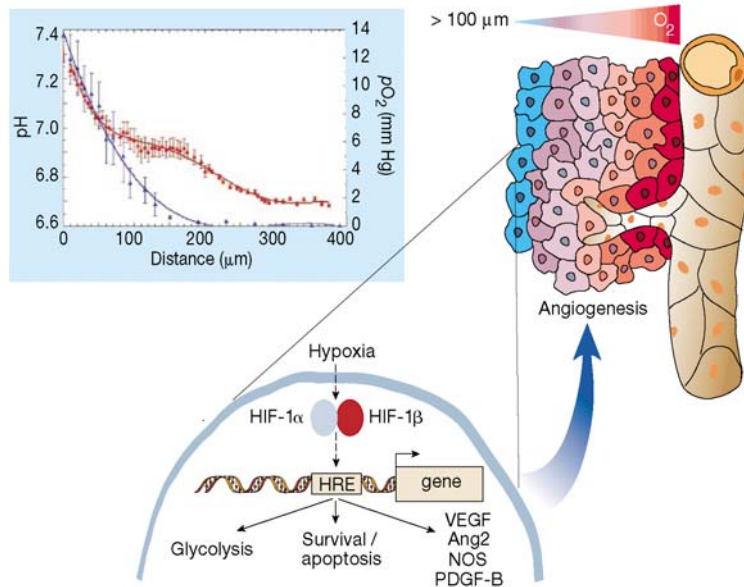


Abb. 1.2.3.I.: Hypoxie führt zur Aktivierung des Hypoxic-Induced-Factor (HIF), der über die HRE-Sequenz die Expression der Angiogenesefaktoren steuert. Entommen aus [1]

Ursprünglich wurde VEGF wegen der Fähigkeit zur Permeabilisierung von Gefäßen auch Vaskulärer Permeabilitätsfaktor genannt [4, 29]. VEGF ist jedoch ein Zytokin mit bemerkenswert vielfältiger Funktion, denn EC, die mit VEGF behandelt werden, zeigen verstärkte Tendenz zur Proliferation, Migration und überleben länger [30]. Unter der Einwirkung dieses Zytokins lösen sich die tight junctions zwischen den Endothelzellen und ermöglichen den Übertritt von Leukozyten ins Gewebe. Außerdem zeichnet VEGF auch eine vasodilatative Wirkung während entzündlicher Reaktionen [4, 29] aus. Dass VEGF auch der Angiogenese dient, wurde erst durch Studien an Mausmodellen bestätigt, nachdem VEGF-signaldefiziente knock-out-Mäuse schon im frühen

Embryonalstadium wegen fehlender Gefäßbildung abstarben [31, 32]. Auch in Wundheilungsprozessen ist das Vorhandensein von VEGF unerlässlich, um ein korrektes Einwachsen von Gefäßen zu ermöglichen. Aufgrund der Homologie zu VEGF konnten noch wenigstens vier weitere Vertreter von endothelialen Wachstumsfaktoren gefunden werden: Zuerst konnte PlGF aus der Plazenta isoliert werden, welcher im Zusammenhang mit Wundheilung in adulten Organismen steht [8, 33]. Weiter werden zum ursprünglichen Zytokin VEGF-A, das durch alternatives Spleißen in die Isoformen A₁₆₅ und A₁₂₁ zu unterteilen ist, die Vertreter B,C und D gezählt [5]. Zusätzlich wurde das viral kodierte VEGF-E charakterisiert, das in seiner Effektivität auf EC mit VEGF-A vergleichbar ist [34]. Trotz der großen Homologie ist ihre Wirkung nur ähnlich: Von den bisher drei VEGF-Rezeptoren kann jeder VEGF-Vertreter maximal zwei bedienen [5]. Auf diese Weise werden überlappende Wirkungen auf die EC erzielt, wobei jene von VEGF-A am effektivsten sind. Für eine geregelte Funktion ist die Dosierung in örtlicher und zeitlicher Hinsicht von größter Bedeutung, wenn ein strukturelles Chaos durch unregelmäßige Gefäßbildung vermieden werden soll [11]. k.o.-Mäuse mit fehlenden Allelen von VEGF-A zeigen den selben Phänotyp wie jene mit disruptierten VEGFR-2-Rezeptor, bei denen schwache bis keine Gefäßbildung in der Embryonalentwicklung festgestellt werden kann [10, 31]. Auch die Disruption nur eines VEGF-A-Allels bewirkt ein vorzeitiges Absterben des Embryos aufgrund zu geringer Gefäßbildung [31, 32]. Geringere Schwankungen in der Dosis von VEGF-A können zu schweren Fehlbildungen des Fötus oder zum Abort führen [35, 36]. Die postnatale Inhibition von VEGF-A durch Injektion der löslichen Form seines Rezeptors führt zu schweren Störungen in der Ausbildung der Wachstumsfugen des Skeletts [37, 38], des corpus luteum [39] oder der Vaskularisierung der Retina [20, 33, 40]. In älteren Individuen mit abgeschlossener Vaskularisierung zeigen Ausfälle von VEGF-A weniger traumatische Effekte, weshalb angenommen wird, dass dieser Wachstumsfaktor nicht für die andauernde Instandhaltung des Gefäßsystems benötigt wird [11]. Auch zu hoher O₂-Partialdruck kann die VEGF-A-gesteuerte Ausbildung von Gefäßen in wachsendem Gewebe behindern. Es kann sogar der Rückzug von Adern aus hyperoxischem Gewebe beobachtet werden. Sinkt dann der O₂-Druck wieder

1. Einleitung

auf den Normalwert, kommt es zur Überexpression von VEGF im jetzt hypoxischen Gewebe, was übermäßiges und chaotisches Einsprossen von unbelastbaren, haemorrhagischen Gefäßen zur Folge hat [41, 42]. Dies wurde bei Frühgeburten beobachtet, die mit erhöhtem pO_2 im Atemgas versorgt wurden, was zum Funktionsverlust der noch nicht vollständig entwickelten Retina führte [20, 43]: VEGF braucht alle bei der Angiogenese beteiligten Faktoren in einem besonders ausbalancierten Verhältnis, um seine eigentliche Funktion erfüllen zu können [7].

1.2.3.1. VEGF-Rezeptoren sind membranständige Tyrosinkinasen

Die Spezifität der Wirkung von VEGF kommt aufgrund der in EC exprimierten VEGF-Rezeptoren zustande. Diese binden das Protein und leiten das Signal in das Zytosol weiter: Die VEGF-Rezeptoren 1-3 sind daher auch geeignete Marker für die Identifizierung von Endothelzellen. Die Wirkung dieser Rezeptoren ist jeweils stark verschieden. Sie entfalten ihre Aktivität durch die Autophosphorylierung von Tyrosinen, die im zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors zu finden sind.

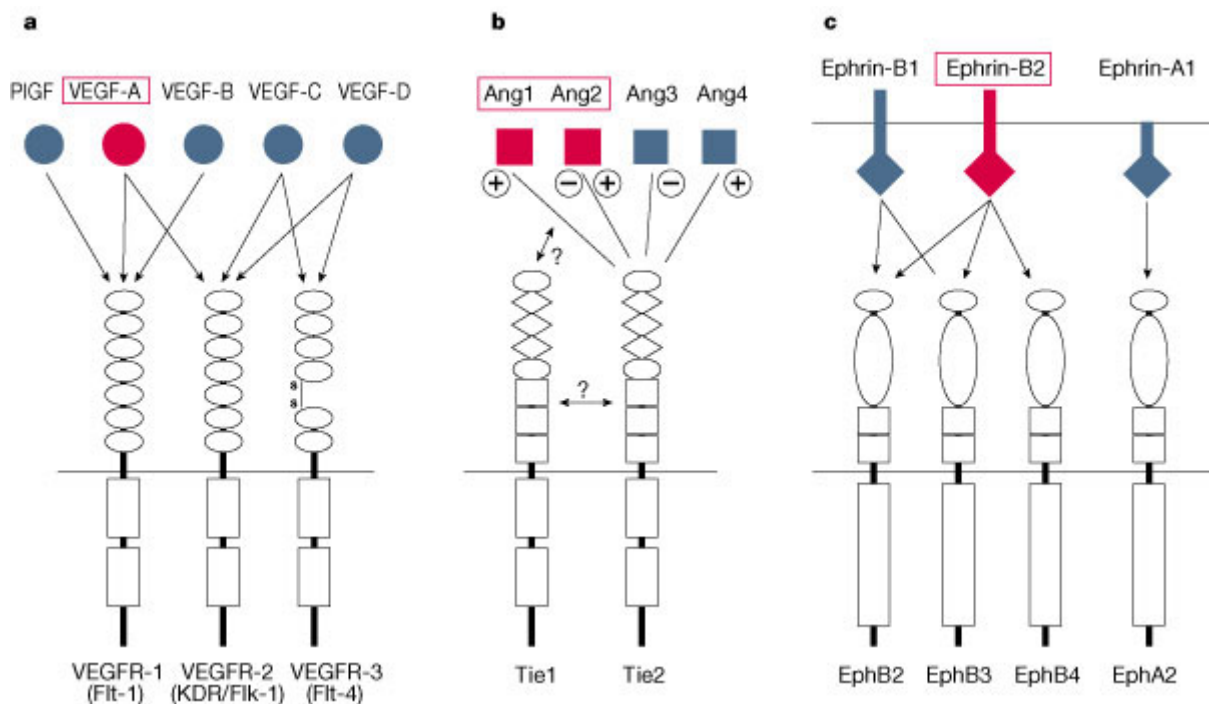


Abb. 1.2.3.1.1.: Schematische Darstellung der drei Familien der vaskulären Wachstumsfaktoren und der Interaktion mit ihren Rezeptoren. **a**, VEGFs; **b**, Angiopoietine; **c**, Ephrine. Die für die Angiogenese und Vaskularisierung besonders wichtigen Faktoren sind in rot gehalten. In **b**, zeigen "+" oder "-" an ob das spezielle Angiopoietin den Tie2-rezeptor aktiviert oder inhibiert, ein "?" heißt, dass eine potentielle Interaktion noch nicht experimentell bestätigt werden konnte. In **c**, werden nur jene Vertreter der großen Ephrin-Liganden Familie dargestellt, die sich in der Gefäßbildung als wirksam erwiesen haben. Entnommen aus [11]

VEGFR-1 (oder Flt-1) bindet PIGF, VEGF-A+B und scheint die Aktivität von VEGF-A₁₆₅ zu inhibieren. Mausmodelle haben gezeigt, dass fehlendes VEGFR-1 zu Supervaskulation mit ungeordneter Struktur führt, während VEGFR-1 ohne Tyrosinkinasedomäne keinen Einfluss auf die Gefäßbildung nimmt [12, 44]. VEGFR-1 könnte auch als VEGF-Fänger die Wirkung des Proteins abfangen und so das Signal schwächen. Trotz allem wird er auch für Gefäßentwicklung und -reifung sowie für die Umgestaltung bestehender Gefäßstrukturen in adulten Organismen in Zusammenhang mit PIGF benötigt. Mausmodelle mit fehlendem VEGF-B zeigten eine Verkleinerung des Herzens, was auf Defekte in der Bildung kardiovaskulärer Strukturen schließen lässt [45].

VEGFR-2 (oder Flk-1) ist hauptsächlich für die Proliferation von EC und die Permeabilität des Endothels verantwortlich. Die Tyrosine, die im Zuge der Aktivierung autophosphoryliert werden befinden sich an den Positionen 951, 996, 1054 und 1059 [46, 47]. VEGFR-2 ist Teil eines multimeren Rezeptorkomplexes, der die Zellbindungsproteine VE-cadherin, β -Catenin und die PI3-Kinase enthält. Verkürztes VE-Cadherin ohne die Bindungsstelle für β -Catenin vermindert die Komplexbildung und verhindert die Aktivierung der PI3-Kinase, was das VEGF-vermittelte Überleben von EC deutlich vermindert. VEGFR-2 steht in diesem Komplex im direkten Zusammenhang der Apoptoseregulation in

1. Einleitung

EC [48]. Einer seiner Hauptfunktionen ist jedoch die Verarbeitung angiogener Signale: k.o.-Mausmodelle mit VEGF-2 ohne Tyrosinkinasefunktion zeigen einen beinahe völligen Ausfall der Gefäßbildung. Der Rezeptor bindet VEGF-A₁₆₅, A₁₂₁, C und E [34, 49]. Im Komplex mit dem Neuropilinrezeptor-1 werden Signale von VEGF-A₁₆₅ und A₁₂₁ unterschiedlich verarbeitet [50].

VEGFR-3 (oder Flt-4) ist jener Rezeptor, der insbesondere für die Ausbildung von Lymphgefäßen gebraucht wird [51]. Er bindet VEGF-C und D. Transgene Überexpression von VEGF-C führt zur lymphatischen Hyperplasie [52].

1.2.3.2. Angiopoietine begünstigen die Strukturierung von Adersystemen

Die wichtigsten Partner für VEGF sind die Angiopoietine, von denen bisher vier Isotypen bekannt sind. Sie binden an die vorrangig im Endothelium exprimierte Tie1+2 Rezeptoren, wobei die Funktion von Tie1 noch nicht klar definiert werden konnte [53-57]. In der Maus sind die Wirkungen von Ang1 und Ang2 funktionell einander entgegengerichtet, genauso wie jene von Ang3 und Ang4 [58, 59]. Über die Effekte von Ang3+4 auf das Endothelium ist bisher noch wenig bekannt. Die Wechselwirkungen des Tie2-Rezeptors mit Ang1+2 sind hingegen schon gut erforscht [11].

1.2.3.2.1. ANGIOPOIETIN 1 STABILISIERT DIE GEFÄßWÄNDE

In Mausmodellen wurde dargestellt, dass durch Fehlen des Ang1 oder des Tie2-Rezeptors die Vasculogenese zunächst ohne auffällige Missbildungen durchgeführt werden kann. Später kommt es während der Reorganisation der bestehenden Gefäßsysteme vor allem der Kardiovaskulatur ohne Ang1-Signal zu Problemen in der Verbindung zwischen Endokardium und dem darunterliegenden Myokardium. Auch die Bildung von Trabeculae und die Restrukturierung von Aderanlagen zu großen und kleinen Gefäßsystemen scheint durch fehlendes Ang1 gestört zu sein [60-62]. Ultrastrukturaufnahmen von Gefäßsystemen zeigen, dass die EC bei Mangel an Ang1 nur schwache Verbindung zu den darunterliegenden unterstützenden Zellen aufnehmen können [60]. Die unterstützenden Zellen der Gefäßwände gelten als die wichtigsten Produzenten von Ang1. Solche Ergebnisse zeigen, dass Ang1 wahrscheinlich weniger eine instruktive Funktion für die Neuorganisation von Gefäßen hat, sondern es erlaubt den EC aufgrund erhöhter Bereitschaft für andere Signale vielmehr, Umstrukturierungen in optimaler Weise im Zusammenwirken mit den Wandzellen durchführen zu können. Transgene Überexpression von Ang1 bewirkt supervaskuläre Strukturen, die durch erhöhte Durchmesser der Gefäße gekennzeichnet sind. Im Gegensatz dazu führt VEGF-Überexpression zu einer erweiterten Anzahl der Blutgefäße. Dies zeigt, dass Ang1 für die Erweiterung von Gefäßen und nicht für das Einsprießen von Adern in unversorgtes Gewebe benötigt wird. Bei gleichzeitiger Überexpression von Ang1 und VEGF kommt es nicht zur Normalisierung der Gefäßbildung, sondern zur Supervaskulierung, die sowohl in Gefäßzahl als auch im Durchmesser der Adern inkrementiert von den Normalwerten abweicht [63]. Bezeichnend ist, dass in der embryonalen Situation die Ang1-Expression immer auf die VEGF-Expression folgt, damit neugebildete Gefäße durch die Einwirkung von Ang1 reifen und funktionell werden können. Während Überexpression von VEGF allein zu unreifen und haemorrhagischen Gefäßsystemen führt [63, 64], stärkt die Überexpression von Ang1 die Gefäßwände und macht sie relativ unempfindlich gegen die Einflüsse von VEGF oder anderer inflammatorischer Signale [63]. Dies ist auf die Neigung von EC zur verstärkten Kontaktaufnahme mit Perizyten und Kollagenmatrix unter Ang1-Einfluss zurückzuführen [63]. Die Verwendung von Ang1 als Therapeutikum z.B. bei Ischämie oder Infiltrationen des Gehirns könnte das Risiko von Ödemen und einhergehender Apoplexie stark vermindern ohne eine sofortige Restrukturierung von Gefäßen befürchten zu müssen [63]. Wie Experimente an erwachsenen Mäusen deutlich gemacht haben, bleibt nach Verabreichung adenoviraler Ang1-Expressionsvektoren die Stabilität des Gefäßsystems auch während starker inflammatorischer Signale gewährleistet. Ang1 ist daher ein vielversprechender Wirkstoff zur Bewältigung von Krankheiten, die durch haemorrhagische Veränderungen in Organen zu lebensbedrohlichen Zuständen führen können.

1.2.3.2.2. ANGIOPOIETIN 2 STEUERT POSTNATALE GEFÄßSTRUKTURIERUNG

Aufgrund seiner ausgeprägten Homologie und seiner gleichen Affinität zum Tie2-Rezeptor konnte Ang2 charakterisiert und geklont werden [58]. Je nach Zustand der EC ist Ang2 *in vitro* dazu befähigt, die Aktivität des Rezeptors entweder zu stimulieren oder zu inhibieren. Transgene Überexpression von Ang2 in Embryonen resultiert in den gleichen Defekten, wie sie in Ang1- und Tie2-disruptierten Mäusen gefunden werden können [65]. Die Rolle von Ang2 lässt sich somit unter bestimmten Bedingungen *in vivo* als Ang1-Tie2-Antagonist umschreiben. In adulten Mäusen wird Ang2 während der Neuorganisation von Gefäßen z.B. beim Einsprießen in oder dem Rückzug aus gesunden oder entarteten Geweben exprimiert [58, 65-69]. Dies legt nahe, dass Ang2 eine Schlüsselposition zur Destabilisierung in Zusammenhang mit Reorganisation von Gefäßen z.B. in Ovarien zukommt [65].

1. Einleitung

Während Ang1 die Umstrukturierung von Gefäßen unterdrückt, treibt die Überexpression von Ang2 diesen Vorgang wieder an. Die durch Ang2 destabilisierten Gefäße leiten je nach Zytokinangebot entweder ihre Regression oder ein weiteres Sprießen ein. In Retinamodellen neugeborener Mäuse konnte nachgewiesen werden, dass bei fehlendem Ang2 weder ein Gefäßrückzug noch das Einwachsen von Adern aus der hyaloiden Vaskulatur stattfindet [11]. Zusätzlich zu seiner Funktion als Ang1-Antagonist wird Ang2 für die Entwicklung der Aortenwände benötigt, da diese sich in Mäusen mit Ang2-Defizit nur unvollkommen entwickeln [11].

1.2.3.3. Ephrine steuern die Entwicklung und Fusionierung von Arterien und Venen

Obwohl die Ephrine zunächst im Nervensystem entdeckt wurden, zeigten k.o.-Studien in Mäusen ihre Funktionen in der Vaskularisierung von Geweben auf [7, 70-72]. Die Ephrine umfassen eine große Anzahl an Vertretern, von denen in der Gefäßentwicklung bislang nur Ephrin-A1, B1 und B2 Bedeutung zugemessen wird. Ebenso zahlreich wie ihre Liganden sind die Eph-Rezeptoren, jedoch nur EphA2, B2-4 kommen bislang für die Erfüllung ihrer Funktionen in der Angio- und Vaskulogenese in Frage. Ephrine müssen, bevor sie die Tyrosinkinaseaktivität ihrer Rezeptoren aktivieren können, mit der Membran der EC in Kontakt treten [7, 71]. Mäuse mit fehlender Expression von Ephrin-B2 und/oder EphB4 zeigen schwere Defekte in der frühen Gefäßstrukturierung, welche Ähnlichkeit zu Ang1- oder Tie2-k.o.-Mäusen zeigen [72, 73]. Die während der Gefäßbildung beobachtete Verteilung der Expression von Ephrin-B2 in arteriellen Endothelien und dem Rezeptor EphB4 in venösen Endothelien ist deshalb bemerkenswert, weil dadurch anscheinend nicht nur die Differenzierung, sondern auch die Fusionierung von Arterien und Venen gesteuert wird [72, 73]. Während der weiteren Embryonalentwicklung bleibt Ephrin-B2 als Marker der arteriellen Endothelien erhalten, obwohl sich die Expression auch auf die umliegenden Perizyten und die glatten Muskelzellen ausweitet, wahrscheinlich, um die muskulären Arterienwände ausbilden zu können [11]. Angiogenese in adulten Organismen, z.B. in der uterinen Schleimhaut oder in Tumoren, zeigen die Wiederaufnahme einer hohen Expression von Ephrin-B2 in neugebildeten Arterien. Damit wird die These eingeschränkt, die besagt, dass Angiogenese nur von venösen oder undifferenzierten Gefäßen ausgehen kann [11].

1.3. Angiogenese in Tumoren

Jedes Gewebe gibt bei Unterversorgung mit O₂ oder Nährstoffen Signale in die Umgebung ab, welche die umliegenden Gefäße zur Neubildung von Adern veranlasst. Dies ist gültig für gesundes Gewebe wie für maligne Zellverbände [74-76]. Eine Großzahl von Tumoren entsteht durch das Heranwachsen einer geringen Zellmenge zu einer großen, relativ ungeordneten Masse. Die Diffusionskonstanten erlauben dem Tumor nur eine limitierte Ausdehnung zu erreichen, die nur dann überschritten werden

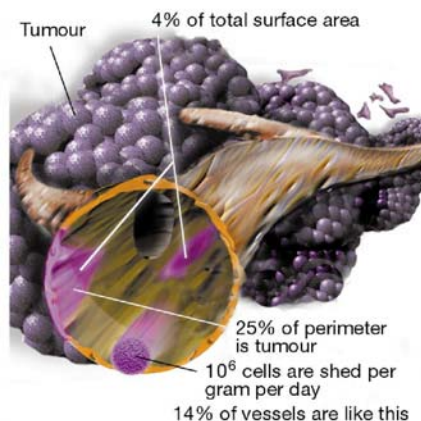


Abb. 1.3.1.: Die in Tumoren einwachsenden Gefäße sind undicht und enthalten neben Endothelzellen auch Tumorzellen, die durch den Blutstrom in gesunde Organe des Körpers verschleppt werden und dort Metastasen ausbilden. Die Ausbildung der Gefäßwand und der glatten Muskulatur ist unvollständig und lässt keine Adaption der Blutversorgung zu.

Entommen aus [1]

kann, wenn die entarteten Körperzellen in der Lage sind, die richtigen Signale an die in der Nähe befindlichen EC abzugeben [77-80]. Tumoren überleben deshalb, weil sie die Fähigkeit zur Stimulierung der Angiogenese nicht verloren haben. Dies konnte gezeigt werden, indem man Mäusen Tumorzellen in avaskuläre Strukturen unterhalb der Haut transplantierte, die dann beim Heranwachsen die Angiogenese eingeleitet haben [11]. Viele metastasierende Tumorenarten bilden noch weit aggressivere Strategien zur Besiedelung von gesundem Gewebe aus, indem sie sich direkt an Kapillaren festsetzen und versuchen mit den Epithelien zu kooperieren [66, 69, 81, 82]. Die Verteidigungsstrategie gegen solche gut versorgten Metastasen [65, 66] ist die Sezernierung von Ang2 durch die Epithelien und der damit verbundene Rückzug der Gefäße aus der Tumormasse [11]. Dabei bildet sich ein sekundär hypoxischer Tumor, der entweder eine Angiogenese erzwingen kann oder von der Versorgung abgeschnitten wird und abstirbt. Die Gegenstrategien der EC sind häufig auch für den Rückzug der Gefäße aus gesunden Geweben aufgrund verstärkter Ang2-Produktion verantwortlich.

1. Einleitung

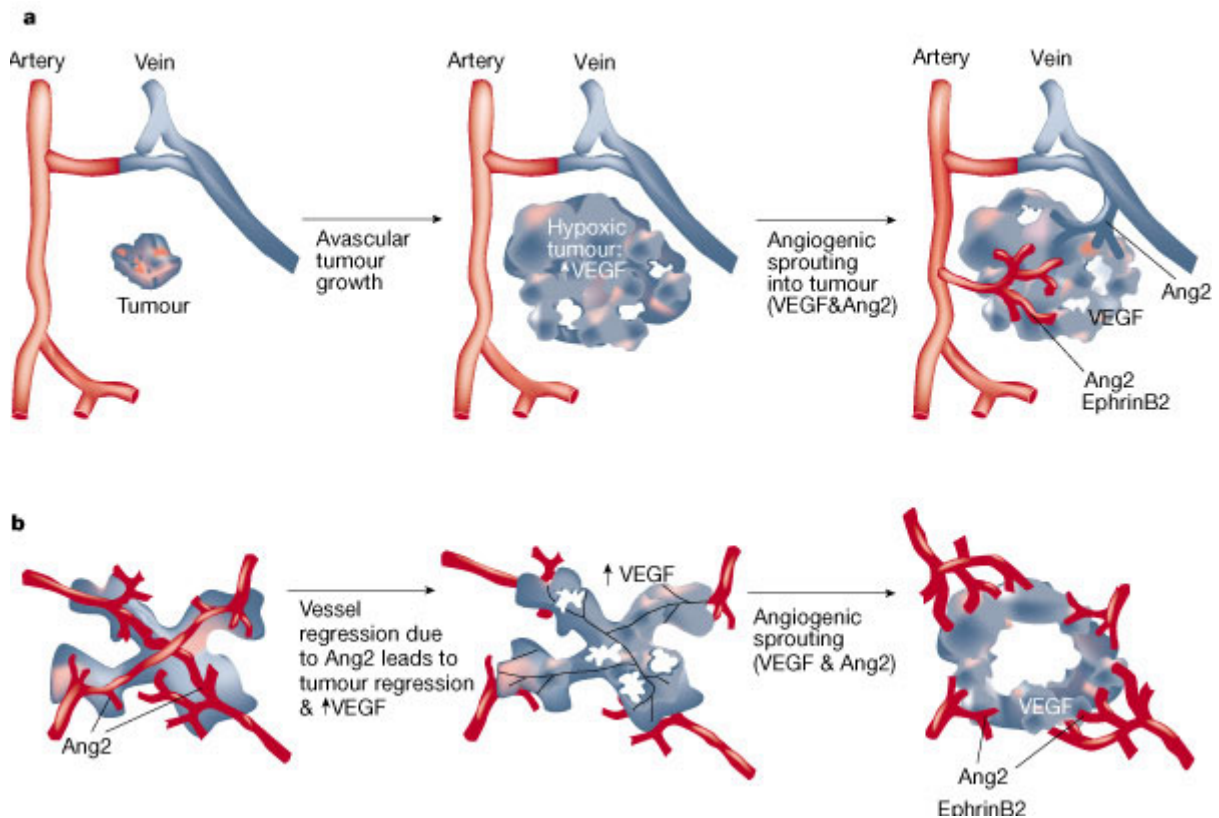


Abb. 1.3.II: Modell der Angiogenese in Tumoren. **a**, Angiogenese-Modell eines avaskulären Tumors im Vergleich zu **b**, Reinitiation der Angiogenese nach Gefäßregression: Die Zuordnung der vaskulären Wachstumsfaktoren und ihrer Expressionsmuster zu den einzelnen Stufen der Tumorentwicklung ist angedeutet. Entnommen aus [11]

In Regionen der Tumorbildung lässt sich sowohl verstärkte Ang2- als auch eine erhöhte VEGF-Expression feststellen. Ang2 gilt daher als allgemeiner Tumormarker, der die Entwicklung der meisten krebsartigen Geschwüre anzeigt, denn Ang2 wird nicht vom Tumor, sondern in befallenen Gefäßen sezerniert [11]. Die durch Ang2 destabilisierten Gefäße gehen ohne VEGF-Signal durch apoptotische Vorgänge zugrunde. Der unversorgte Tumor gibt daher VEGF für das Einsprießen von Gefäßen an die Umgebung ab: Ang2-Expression gefolgt von VEGF-Signalen ist ein beinahe sicheres Zeichen für die Entwicklung maligner Zellverbände [1]. Durch die dauernde Produktion von Ang2 als Gegenmaßnahme der EC und das VEGF-Signal der Tumoren sind die einsprießenden Gefäße im Tumor sowohl unfertig als auch hämorrhagisch. Vielfach ist das Endothelium nur unvollständig ausgebildet und wird durch Tumorzellen teilweise ersetzt, die auf diese Weise leicht in den Blutstrom verschleppt werden können, um an anderer Stelle Kolonien zu bilden [83]. Es ist nicht klar, ob Tumorzellen in das Gefäßlumen einwachsen, oder ob sie die Funktion von Endothelzellen imitieren (vaskuläre Mimikry). Das Gefäßsystem in Tumoren ist strukturlos und chaotisch. Es ist übermäßig verzweigt und weist unregelmäßige Aderdurchmesser auf, wodurch es zu Verwirbelungen und Strömungsumkehrungen kommt [84]. Dies erzeugt unterversorgte, saure Regionen im Tumor, was die Epithelien zu weiterer angiogener Aktivität verleitet [85]. Auch die muskuläre Kontrolle der Gefäße oder deren Verfestigung durch Perizyten ist unvollständig oder fehlt völlig. Damit ist eine Anpassung solcher Gefäße an wechselnde Bedingungen unmöglich [40, 86]. Die Ultrastruktur von Tumorgefäßen ist ähnlich abnormal: Öffnungen in der Gefäßwand, endotheliale Fenster, Vesikelbildung und transzelluläre Löcher, geschwächte Zell-Zell-Verbindungen, unvollständige Basalmembranen sind nur einige Defekte, die in der Regel auftreten [29, 87, 88]; ihre Ausprägung ist abhängig von der Art der Tumoren und deren Wirtsorgane, da letztere verschieden differenzierte Stromazellen aufweisen, die unterschiedliche angiogene Signale abgeben [87, 89]. Dies alles führt zu selektiven Bedingungen, in denen sich Tumorzellen mit höherer Malignität durchsetzen und die Aggressivität der sich daraus entwickelnden Metastasen steigert. Die solchermaßen selektive, klonale Expansion bevorzugt jene Zellen, die die Fähigkeit zur Apoptose völlig verloren haben [90]. Die vom Tumor sezernierten Zytokine verändern die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelien, weshalb Immunzellen nur schwer an die Tumorgefäße binden und den Zellverband infiltrieren können [91-93].

1. Einleitung

Das Modell für die mit Adern kooperierenden Tumoren wurde dadurch bestätigt, dass die Blockierung von VEGF oder VEGFR-2 z.B. durch AK oder löslichen VEGFR-2 in vielen, jedoch nicht in allen Fällen zur Regression von Tumoren führt [94]. Trotzdem ist die Repression von VEGF in Tumoren ein vielversprechender Ansatz im Kampf gegen Krebs. Einige Tumoren sind jedoch in der Lage von VEGF auf die Expression anderer, ähnlich wirkender Proteine wie bFGF, Granulocyte-Makrophage-Colony-Stimulating-Faktor (GM-CSF) oder IGF-1 umzuschalten und damit einer wirksamen Bekämpfung durch VEGF-Inhibitoren zu entkommen. Bestrahlungen von Tumoren hat aufgrund des erhöhten Stresses oft einen Anstieg von Angiogenese-Signalen im Tumor zur Folge, was unerwünschte Nebenwirkungen haben kann. Interferone hingegen inhibieren unabhängig solcher Stress-Signale das Wachstum von neoplastischen Zellverbänden. Besonderes Augenmerk wird auch auf jene Moleküle gelegt, die hauptsächlich während der Tumorangiogenese zu finden sind, wie NO (vasodilatativ), Zykllooxygenase (COX-2), Thrombospondin-2 (TSP-2) und die während der Abwehr von Tumoren gebildeten Angiogeneseinhibitoren [1]. Ähnlich wie die Blutgefäßbildung ist in malignen Zellverbänden auch die Lymphangiogenese beeinträchtigt. Innerhalb der Tumormasse sind wenig bis keine Lymphgefäße vorhanden, an der Peripherie sind stark vergrößert [95]. Es ist möglich, dass der schnellwachsende Tumor die neu gebildeten Lymphgefäße aufgrund ihrer Labilität einfach zusammenpresst [96], dagegen wachsen an seiner Peripherie aufgrund übermäßiger Expression von VEGF-C die Lymphgefäße zu stark an [97]. Durch die mangelnde Abfuhr von Gefäßflüssigkeit kommt es zu einem Gewebsüberdruck im Tumor, der die Verabreichung von Wirkstoffen über den Blutstrom erschwert [98]. Tumoren können in einer Jahre andauernden Phase ohne Wachstum bestehen. Die systemische Konzentration von Angiogenesehemmern kann jene der Stimulatoren übersteigen und somit auch das Wachstum von Metastasen verhindern. Dieses Phänomen führte zur Erforschung und Entdeckung von Angio- und Endostatin sowie anderer Angiogenesehemmer [27]. Die Entdeckung dieser Faktoren war ein wichtiger Schritt für die Entwicklung von Wirkstoffen, die darauf aufbauen, Tumorstromung durch die Inhibition seiner Versorgung zu stoppen [99, 100].

Organsystem	Abnormale Gefäßbildung
Blutgefäße	a) Atherosklerose, Haemangiom, Haemangioendothelom c) Gefäßmissbildung
Haut	a) Warzen, pyogenisches Granulom, Kaposi Sarkom, keloides Narbengewebe, allergisches Ödem, Neoplasmen c) Schuppenflechte mit Adervergrößerung, Magen- und Darmgeschwüre
Uterus, Ovarien, Plazenta	a) Dysfunktionale Monatsblutung durch Kontrazeptiva, follikuläre Zysten, Hyperstimulation der Ovarien, Endometriose, Neoplasmen b) Plazentale Insuffizienz c) Gestose
Peritoneum, Pleura	d) Respiratorischer Stress, Aszites, peritoneale Sklerotisierung bei Dialysepatienten, intraabdominale Verwachsungen nach chirurgischen Eingriffen, Metastasierung
Herz- und Skelettmuskulatur	a) Überlastung, Hypertrophierung b) Ischämische Herz- und Muskelerkrankungen
Fettgewebe	a) Fettsucht
Knochen, Gelenke	a) Rheumatische Arthritis, Gelenksentzündung, Knochen und Knorpelschwund, Osteomyelitis, Pannus, Osteophyt, Knochenkrebs b) Aseptische Nekrosen, schlecht verheilende Frakturen
Innere Organe, Gehörssystem, Epithelien	a) Inflammatorische und infektiöse Prozesse (Hepatitis, Pneumonie, Nephritis), Asthma, Nasalpolypen, Transplantationen, gestörte Leberregeneration, Krebs b) Lungenüberdruck, systemischer Überdruck c) Lungenüberdruck, Diabetes
Cerebrum, Innervierung, Augen	a) Retinopathie bei Frühgeborenen, diabetische Retinopathie, choroidale und intraokulare Gefäßmissbildungen, Leukodermie, Krebs b) Schlaganfälle, vaskuläre Demenz, Alzheimer'sche Krankheit
Endokrine Organe	a) Schilddrüsenentzündung, -vergrößerung, Pankreatitis b) Pseudozysten der Schilddrüse
Lymphgefäße	a) Metastasen, Störungen der Lymphgefäßbildung b) Lymphödem
Haematopoese	a) HIV generiertes Kaposi Sarkom, Blutkrebsarten

Tabelle 1.3.1.: Eine Auswahl von krankhaften Gefäßbildungssituationen: a) Supervaskulär, b) hypovaskulär, c) abnormale Organisation, d) vermehrte Gefäßbildung und/oder Permeabilität. Entnommen aus [1]

1. Einleitung

1.4. Signalwege und induzierte Gene: Vom VEGF-Rezeptor zu EGR-1 und NFAT

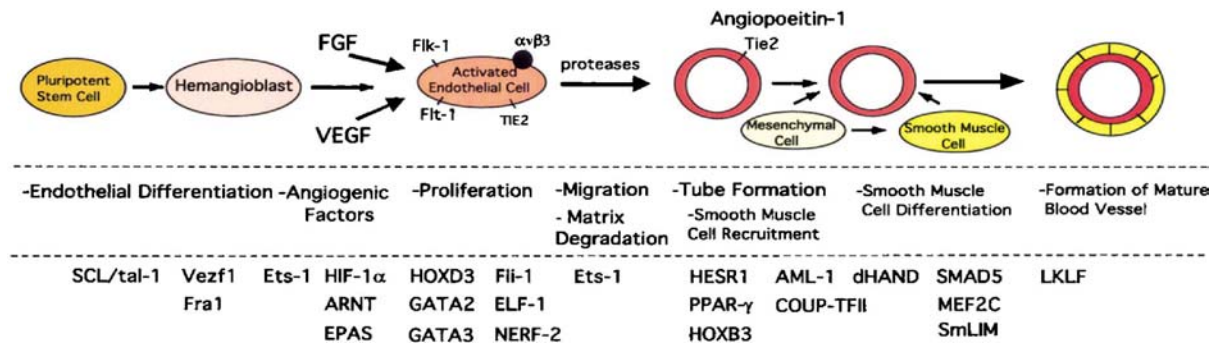


Abb. 1.4.I.: Für die Entwicklung einer pluripotenten Stammzelle über aktivierte EC bis zum fertigen Gefäß bezieht eine Großzahl verschiedener Transkriptionsfaktoren ein. EGR-1 wird in der Signaltransduktion der aktivierten EC gebraucht.

Entnommen aus [101]

Angiogene und inflammatorische Signalweiterleitung in der Zelle konvergieren u.a. in der Induktion des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors EGR-1. Diese Überlappende Antwort beider Reizleitungswege erklärt möglicherweise Phänomene der Angiogenese, die durch chronische Entzündungsreaktionen ausgelöst werden. Der gemeinsamen Antwort stehen noch separierte Signalverarbeitungswege gegenüber, von denen VEGF den Transkriptionsfaktor NFAT bzw. der Tumor Nekrose Faktor (TNF-α) den Nuclear Factor of κ-B-Cells (NFκB) aktiviert [49]. Die Hauptinduktoren inflammatorischer Antwortreaktionen in EC sind z.B. TNFα, Interleukin-1 (IL-1) und der bakterielle Membranbestandteil LPS [101-103]. Während die VEGF-Rezeptoren über ihre Tyrosinkinasedomänen die Signaltransduktion vermitteln, wird die TNF-rezeptor-induzierte Reizweiterleitung über zytoplasmatische Adaptoren abgewickelt, die mit den funktionellen Domänen des TNFR interagieren. Die verschiedenen TNF-Rezeptoren besitzen innerhalb eines Moleküls oft mehrere Domänen. Eine der wichtigsten ist die sogenannte Death-Domain, die letztendlich für die mögliche Einleitung der Apoptose verantwortlich ist [49]. Die Death-Domain von TNFR-1 bindet das TNFR-1 Associated Death Domain Protein (TRADD), was entweder in der Aktivierung des NFκB-Pfades oder der Apoptose resultiert: Die Gabelung erfolgt durch die Anlagerung von TRADD an den TNFR Associated Faktor 2 (TRAF-2). Dies führt zur Expression von NFκB, während die Anlagerung von TRADD an das Fas Associated Protein With Death Domain (FADD) die Apoptose vorantreibt. Sowohl die angiogenen als auch die inflammatorischen Signale sind befähigt die Expression des Tissue Factor (TF) in Gang zu setzen. Somit scheint TF in Zusammenhang mit der Angiogenese und während entzündlicher Reaktionen mehrere Funktionen zu erfüllen [104-107].

Der TF, ein Transmembran-Glykoprotein, dient als hochaffiner Rezeptor und essentieller Kofaktor der Plasma-Serin-Protease VII/VIIa und spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung der extrinsischen Koagulationkaskade der Blutgerinnungsfaktoren. TF wird konstitutiv in relativ hoher Menge im Gewebe gebildet, um undichte Gefäße bei Austreten von Blutflüssigkeit verschließen zu können. EC erhalten im Normalfall einen antikoagulativen Zustand bis zu ihrer Aktivierung ein. In vielen krankhaften Situationen, die angiogene oder inflammatorische Reize hervorrufen, wird von EC auch TF gebildet, was zu lebensbedrohlichen Gefäßverschlüssen führen kann [3].

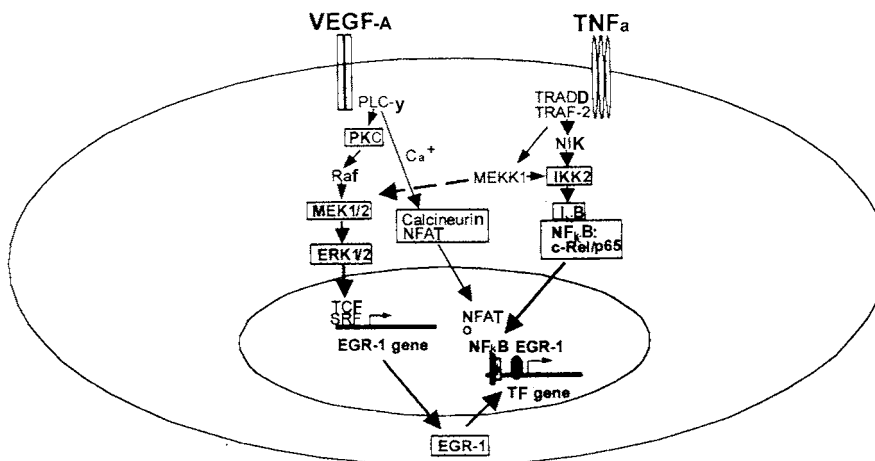


Abb. 1.4.II.: Das VEGF-Signal wird durch einen Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität verarbeitet und führt letztlich zur Expression des Transkriptionsfaktors EGR-1. Der TNFα-Rezeptor-1 assoziiert an seiner Death-Domain den TRADD/TRAF-2-Komplex und führt über die Aktivierung von NFκB in Kombination mit EGR-1 zur Expression von TF.

Entnommen aus [49]

1. Einleitung

Dies zeigt beispielhaft die durch EGR-1 kontrollierte Expression von Genen, die einerseits durch VEGF, andererseits durch $\text{TNF}\alpha$ induziert werden können. Die distinkten Signale aus dem VEGFR- und dem TNFR-Pfad überschneiden sich an einem MAP-Kinase-Modul, das sich aus der Extracellular-Signal Regulated Kinase (ERK) und MEK zusammensetzt. Der TNFR aktiviert über TRADD und TRAF die MEKK-1, die dann die im VEGF-Signalweg liegenden MEK-1/2 phosphoryliert. Eine zweite Überschneidung der Signalwege wirkt vom VEGF-Pfad auf den TNF-Pfad über die Phospholipase-C γ (PLC): Durch die PLC-vermittelte Freisetzung von Ca^{++} -Ionen ins Zytosol wird die Kinase Calcineurin induziert, wodurch es zur Aktivierung des am unteren Ende der Kaskade liegenden Nuclear Factor Activated in T-Cells (NFAT)¹ kommt, der durch Zusammenwirken mit EGR-1 die Expression von TF reguliert [49, 108-110]. NFAT regelt in EC aber auch die Expression einer Reihe weiterer Gene, wie GM-CSF und IL6 nach Stimulation mit Ionomycin und PMA [108], aber auch IL-8 nach Histaminbehandlung [109]. EGR-1 wiederum wird zusätzlich über den stressinduzierten Janus-Kinase-Weg (JNK) sowie über p38 induziert [111]. Hier wird deutlich, dass angiogene, inflammatorische und stressinduzierte Signale sich ineinander verschränken und im Überschneiden ihrer Wirkung ähnliche Resultate oder Krankheitsbilder hervorrufen können. Damit verändert die Manipulierung eines Signalpfades auch die von ihm beeinflussten Kaskaden anderer Signaltransduktionswege, weshalb der Einsatz eines therapeutisch wirksamen Agens ein Bündel von Nebenwirkungen erzeugt und dadurch nur allzu oft den erhofften Erfolg wieder zunichte macht. Dies wird deutlich, wenn man in Betracht zieht, wie viele Signalleitungsproteine durch VEGF aktiviert werden: PLC- γ , PI-3-Kinase, Focal Adhesion Kinase und die Act/protein Kinase B werden durch den VEGF-Signalleitungsweg \pm direkt beeinflusst [112-114]; zusammenhängend damit wird über PLC nicht nur der Ca^{++} -Influx ins Zytosol gehoben, sondern auch die Umsetzung von Inositolphosphat gesteigert.

1.4.1. NFAT und EGR-1 sind nötig für die Expression des TF

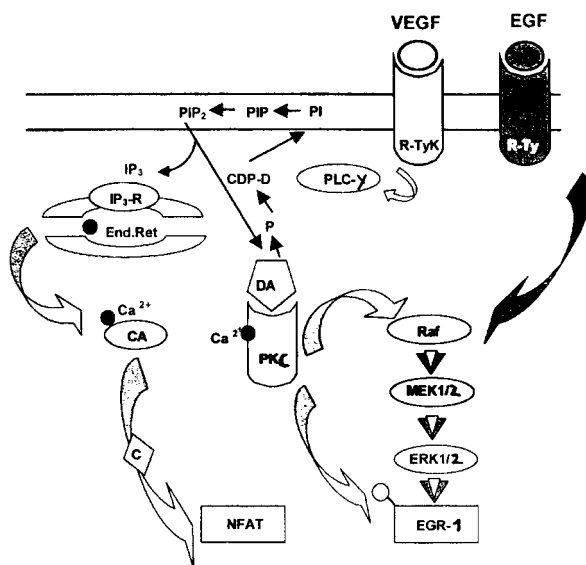


Abb. 1.4.1.I.: Während das VEGF-Signal ab IP $_3$ in zwei verschiedenen Signalwege gabelt, die NFAT und EGR-1 aktivieren, führt der EGF-Weg direkt von Raf über MEK/ERK zu EGR-1.

Entnommen aus [49]

aktiviertes PKC zur Phosphorylierung von Raf und weiter zu MEK1/2 und ERK1/2, was letztendlich EGR-1-Aktivierung bedingt. EGF hingegen aktiviert Raf \pm direkt ohne eine Ca-Freisetzung zu benötigen oder zu beeinflussen. Somit wird durch EGF nur EGR-1 aktiviert. VEGF zeichnet sich dabei durch einen bifokalen Signalleitungsweg aus, der mit der Aktivierung von EGR-1 und der Translokation von NFAT in den Nukleus endet. Beide regeln erst im Verein mit NF κ B unter anderem die Expression von $\text{TNF}\alpha$ und des TF. Studien an EC belegten den bifokalen Signalweg von VEGF indem sie zeigten, dass nach EGF-Behandlung der intrazelluläre Ca^{++} -Level unverändert bleibt und somit weder die Expression von PLC- γ noch die von PKC gesteigert wird [109, 112].

¹ NF κ B und NFAT belegen überlappende Bereiche in den von ihnen kontrollierten Promotoren.

1. Einleitung

1.4.2. Die bedeutende Funktion von EGR-1 im VEGF-Signalweg

EGR-1 ist ein zentraler Regulator für Differenzierungsprozesse in vielen Zelltypen [115, 116]. Außerdem dient dieser Transkriptionsfaktor als Antwortreaktion auf Gefäßrupturen, zeigt langanhaltende Signale bei Atherosklerose und verschiedenen akuten oder chronischen Infektionen [117-119] und ist an Wundgrenzen zu finden [120]. Bei Hypoxie in der Lunge kommt es zur PKC β II gesteuerten Überexpression von EGR-1 aufgrund langanhaltender VEGF- und TF-Signale von EC, Phago- und Monozyten, was Fibrinablagerungen in den Lungenkapillaren hervorruft, die zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen können [121, 122]. Darüber hinaus scheint langanhaltendes EGR-1-Signal in Verbindung mit Stenosen, Thrombosebildung und atherosklerotische Läsionen zu stehen. Es ist aus diesen Gründen verständlich, dass EGR-1 über ein Set von Inhibitoren kontrolliert werden muss, von denen die wichtigsten Vertreter NAB1+2 sind, welche über einen Yeast Two Hybrid Screening identifiziert werden konnten [123]. Die Inhibitoren binden EGR-1 durch direkte Interaktion an dessen konservierter Region. Überexpression von NAB2 kann die Aktivität von EGR-1 völlig zum Erliegen bringen; die VEGF- bzw. TNF α -induzierte TF-Expression wird so unterdrückt [124].

1.4.3. Sind die Promotoren von VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-2) spezifisch für EC?

VEGF wird von Zellen exprimiert, die unter hypoxischem Stress stehen: Die Unterversorgung mit O₂ kann nur bewältigt werden, wenn dieses Signal zusammen mit anderen metabolischen Stressfaktoren von den EC dahingehend gedeutet wird, Angiogenese durchzuführen, um Gefäße in die Nähe der minderversorgten Region zu bringen und damit die Diffusionskonstante des O₂ von maximal 200 μ m zu unterschreiten [8]. Es konnte gezeigt werden, dass viele Stresssignale die Gefäßbildung beeinflussen, jedoch ist bei keinem dieser Faktoren die Wirkung auf einen bestimmten Zelltyp beschränkt. Dies ist gültig für alle bis VEGF, welcher in seiner Funktion auf EC optimiert ist. Es ist nicht bekannt, dass derart heftige Effekte, wie sie von VEGF in EC hervorgerufen werden, auch in anderen Zelltypen beobachtet werden konnten, was den Schluss nahelegt, dass die VEGF-Rezeptoren auf EC beschränkt sind [7]. Folglich sollten die Promotoren, die für die Expression der VEGFR verantwortlich sind, auch im selben Maße spezifisch sein. Sie sind insoweit für die Entwicklung eines EC-spezifischen Expressionssystems geeignet, wie sie ihre Funktion in EC ausführen; sie werden nicht oder nur sehr beschränkt in anderen Zellen angesteuert. Die Promotoren von VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-2) scheinen deshalb für diese Aufgabe ideal zu sein: Sie kontrollieren die Expression jener EC-spezifischen Rezeptoren, über die bislang am meisten bekannt ist und von denen auch eine Auswahl geprüfter Sequenzen zur Verfügung steht. Darüber hinaus sind die Sequenzen, welche die Promotoren enthalten, \pm leicht zu beschaffen. Diese Eigenschaften sind der Grund, der die Kontrollregionen der VEGF-Rezeptoren zum Gegenstand dieser Arbeit macht.

1.5. Therapeutisch relevante Gene

Die Gründe für Gefäßerkrankungen, so viele auch bekannt sind, laufen fast immer im Signalverarbeitungssystem der EC zusammen. Die Endothelzelle ist daher auch der Kernpunkt für Forschungsansätze, die das Ziel haben, gentherapeutische Strategien gegen Gefäßerkrankungen zu entwickeln. Im Zusammenhang mit EC treten eine Reihe Krankheitsbilder und Symptome auf:

- Inflammatorische Prozesse, metabolischer Stress, Hypoxie, Verletzungen, Tumorbildung, genetisch bedingte Hyper- oder Hypovaskulierung, Asthma, Ischämie, Fehler in der Ausbildung der Blutgerinnungskaskade, Hämorrhagie, Fehlbildungen der plazentalen Vaskulierung etc. sind nur einige Komplikationen, die ihren Ursprung im Wechselspiel der Signalleitung zwischen Blut, Endothel und Gewebe haben.
- Entweder ist ein Wachstums- oder Transkriptionsfaktor im Übermaß oder mangelhaft vorhanden (z.B. VEGF, EGR-1), allergische Reaktionen sind nur über die Beeinflussung der EC denkbar (z.B. durch Histamin), der septische Schock wird durch die Überproduktion von immunkompetenten Botenstoffen bewirkt und führt durch die dadurch hervorgerufene Überproduktion von VEGF und TF zu den bekannten, lebensbedrohlichen Symptomen, die nur über die Eindämmung der Reaktion von Endothelien auf den inflammatorischen Stimulus bewältigt werden können.

Je nach Problemstellung sind verschiedene Genprodukte \pm geeignet in das endotheliale Regelsystem einzugreifen, um eine Linderung der Symptome herbeizuführen. Gegen hämorrhagisches Fieber scheint Angiotensin-1 Wirkung zu versprechen. Die Behinderung der Signalleitungskaskade zu EGR-1 könnte die Auswirkungen chronischer Inflammationen eindämmen. Es ist möglich, Thrombosebildung durch die Expression löslicher VEGF-Rezeptoren zu vermindern. Angiogenese in Tumoren wäre durch das Einleiten von apoptotischen Signalen in aktivierten EC durch Angiostatin zu hemmen. Die Möglichkeiten sind vielfältig, doch nur die wenigsten können zum Ziel führen: Das Regelsystem der

1. Einleitung

EC kann nicht ohne Folgen für den Gesamtorganismus beeinflusst werden und so muss klar sein, dass potente Faktoren auch enorme Nebenwirkungen zeigen werden. Daher muss die Entwicklung gentherapeutischer Systeme in Richtung schnell wirkender, ein- und ausschaltbarer Konstrukte gehen, die transient in die Zelle eingeführt werden und nach der Behandlung folgenlos wieder aus dem System entfernt werden können. Einige wenige Faktoren, die für gentherapeutische Anwendungen in Frage kommen, sind in der folgenden Liste zusammengefasst. Bestrebungen, den TF in Endothelzellen erhöht zu exprimieren, um z.B. die in der Tumorangio-genese beteiligten EC zu eliminieren, ist wahrscheinlich ein ungeeigneter Ansatz: TF birgt als potenter Blutgerinnungsfaktor die Gefahr eines generellen Aderverschlusses durch Blockierung der Kapillaren in sich, so dass Denkansätze in diese Richtung nicht zielführend erscheinen.

Aktivatoren	Funktion	Inhibitoren	Funktion
VEGF-Familie	Stimulation der Angio- und Vaskulogenese, Permeabilität, Adhäsion von Leukozyten	VEGFR-1, lösliche VEGFR und NRP-1	VEGF- und PlGF-Fänger
VEGFR, NRP-1	Verarbeitung der angiogenen Signale	Ang2	Ang1-Antagonist
Ang1, Tie2	Gefäßstabilisierung, vermindern Permeabilität	TSP-1+2	Inhibieren EC-Migration, -Wachstum, -Adhäsion und -Überleben
PDGF-BB und dessen Rezeptoren	Rekrutierung der glatten Muskelzellen	Angiostatin und andere Plasminogen-Fragmente	Supprimieren Tumor-Angiogenese
TGF- β , dessen Rezeptoren, Endoglin	Stimuliert die extrazelluläre Produktion der Gefäßmatrix	Endostatin (Fragment aus Kollagen XVIII)	Inhibiert EC-Migration und -Überleben
FGF, HGF, MCP-1	Stimulation der Angio- und Arteriogenese	Vasostatin, Calreticulin	Inhibieren EC-Wachstum
Integrine	Rezeptoren für Makromoleküle der Gefäßmatrix und Proteinase (Zymogene)	Platelet-Faktor-4	Verhindert die Bindung von bFGF und VEGF
VE-Cadherin, PECAM (CD31)	Moleküle der endothelialen tight junctions, VEGF-Korezeptoren	TMPs, MMP-Inhibitoren, PEX	Supprimieren krankhafte Angiogenese
Ephrine	Regulieren die Spezifität von Arterien und Venen	Meth-1, Meth-2	Inhibitoren mit MMP-, TSP,- und Desintegrin-Domänen
Plasminogen Aktivatoren, MMPs	Neuorganisation der Gefäßmatrix, aktivieren durch Verdau die Zymogene verschiedener Wachstums- und Gerinnungsfaktoren	IFN- α , β , γ , IP-10, IL-4, IL-12, IL-18	Verhindern EC-Migration, regulieren die bFGF-Funktion herunter
PAI-1	Stabilisieren naszierende Gefäße	Prothrombin-2, Fragment aus Antithrombin III	Supprimiert EC-Wachstum
NOS, COX-2	Stimulieren Angiogenese und Vasodilatation	Prolaktin (Mr, 16K)	Inhibiert bFGF/VEGF
AC133	Reguliert Angioblastendifferenzierung	VEGI	Moduliert Zellwachstum
Chemokine	Vielfältige Aufgaben in der Angiogenese	SPARC-Fragment	Inhibiert Bindung und Aktivität von VEGF
Id1/Id3	Determinieren die Plastizität des Endothels	Osteopontin-Fragment	Interferiert mit den Integrin-Signalwegen
		Maspin	Proteaseinhibitor
		Canstatin, proliferinverwandtes Protein, Restin	Mechanismen unbekannt

Tabelle 1.5.I.: Auswahl der wichtigsten angio/vaskulogenisch wirksamen Proteine oder Wirkstoffe. Viele sind schon im klinischen Versuch. Entnommen aus [1]

1.6. Gentherapeutische Vektoren

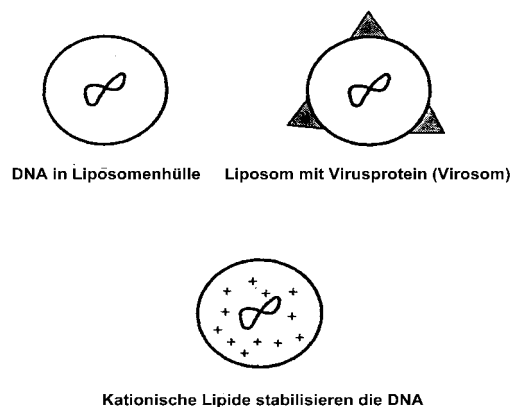
Die Techniken der Gentherapie werden häufig als Manipulation der Genaktivität in Geweben von Mammaliern umschrieben. Sie dienen dazu, genetisch determinierte Krankheiten soweit zu beeinflussen, dass ein Funktionieren des erkrankten Organs wieder gewährleistet werden kann. Diese Manipulation stützt sich zumeist auf das Einführen fremder DNA in erkrankte oder noch gesunde Zellen. Dies können ganze Expressionskassetten sein, die fehlende oder fehlerhafte Gene unterstützen oder ersetzen sollen oder nur kurze Oligodeoxynukleotide (ODN), die als Antisense-DNA die Expression

1. Einleitung

eines Gens durch Bindung an die mRNA blockieren sollen [125]. Doppelsträngige ODNs können Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren simulieren und diese somit von ihren Zielsequenzen ablenken. Daneben existiert noch die Einfuhr von Ribozymen, kurze RNA-Fragmente, die an ihrer Targetsequenz auf der mRNA als zerstörendes Enzym wirken [126]. Auch die Überexpression von Genen in gesunden Zellen zur Verbesserung des Gesamtzustandes eines Patienten (z.B. Ang1 zur Gefäßstabilisierung) gilt als gentherapeutische Maßnahme, obwohl damit kein Gendefekt im eigentlichen Sinne ausgeglichen werden soll [127]. Die eingeführten Gene und/oder Kontrollelemente können entweder nativ sein, aus fremden Organismen stammen oder für spezielle Zwecke modifiziert worden sein. Soll das Genprodukt bzw. die Kontrollfunktion nur intrazellulär wirksam werden, so muss der Gentransfer mit großer Effizienz durchgeführt werden, damit eine wirksame Beeinflussung des gesamten Organs stattfinden kann. Ist es dagegen erwünscht ein Genprodukt zu sezernieren, reichen geringere Transfereffizienzen aus, um das Genprodukt von einer kleinen Subpopulation manipulierter Zellen ausgehend auf das ganze Organ zu verteilen. Um bestimmte Genaktivitäten sichtbar zu machen, können auch Konstrukte in die Zellen eingeführt werden, die unter bestimmten Bedingungen visuelle, enzymatische oder chemisch messbare Signale abgeben können. Sollen sie in Organismen eingesetzt werden, dürfen sie die Zellaktivität nicht oder nur gering beeinflussen (z.B.: Lac-Z aus E.coli, Green Fluorescent Protein). Die Strategien zur Einfuhr genetischen Materials sind vielfältig: So lassen sich Kalziumsalzpräzipitate von DNA herstellen, die von Zellen über Pinozytose aufgenommen werden können. Elektroporation und Beschuss von Zellen mit DNA-ummantelten Partikeln sind Methoden, wie sie für in-vitro-Versuche durchaus Zweckmäßig erscheinen, bei in-vivo-Experimenten aber ungeeignet sind. Alle nichtviralen Prozeduren sind ab Verabreichung höherer Konzentrationen aufgrund unregelmäßiger Aufnahme der DNA zytotoxisch. Die folgende Beschreibung sollen einen kurzen Überblick über die gängigsten in-vivo-Verfahren liefern und erhebt keinesfalls Anspruch auf Vollständigkeit.

1.6.1. Direkte Aufnahme von DNA

Einige Zelltypen, vor allem Muskelzellen, sind in der Lage, frei gelöste DNA direkt durch Pinozytose aufzunehmen. Direkte intramuskuläre Injektion von Plasmid-DNA resultiert in Transfektionsraten, die in etwa bei jenen liegen, wie sie bei in-vitro-Transfektionen von Fibroblasten zu finden sind (max. 10% Effizienz / μg DNA auf 10^5 Zellen). Die Transfektion bleibt transient, obwohl monatelange Expression von eingeführten Genen beobachtet werden konnte. Aufgrund der transversalen Tubuli der Myofibrillen, die in direktem Kontakt zur extrazellulären Matrix stehen, persistiert die eingeführte DNA lange genug auf den Zelloberflächen, so dass sie effizient aufgenommen werden kann. Für die meisten Anwendungen, in denen durch fließende Medien die DNA in ständiger Bewegung ist (z.B. bei Injektion von DNA in das Blutgefäßsystem), können mit dieser Methode keine Resultate erzielt werden [128]. Außerdem ist die Größe des Plasmides auf maximal 4-6kB beschränkt. Für die Überwindung dieser Probleme müssen aggressive Maßnahmen zur Adhäsion der Genpakete an die Zelloberflächen und zum Eintritt durch die Membranen eingesetzt werden.



1.6.2. Lipidvermittelter Gentransfer

Eine Möglichkeit die Aufnahmebereitschaft von Zellen für DNA zu erhöhen ist die Umhüllung des genetischen Materials mit einer Lipidschicht. Die Lipidhülle kann mit der apolaren Membran Kontakt aufnehmen und ihren Inhalt in das Zellinnere abgeben. Dies erfolgt unter Laborbedingungen mit einer Effizienz von ca. 30% transfektierter Zellen / μg DNA berechnet auf 10^5 Zellen bei Ladekapazitäten von maximal 10 Kilobasen. Die Herstellung solcher Liposomen ist in der Regel nicht mit großem Aufwand verbunden, da deren Bildung thermodynamischen Gesetzen folgt. Die Aufnahmebereitschaft für Zellen wird durch die Verwendung von kationischen Lipiden, Lipopolyamiden und kationischen Polypeptiden noch erhöht [129]. Ins-



Abb. 1.6.2.1.: Liposomenhüllen erhöhen die Effizienz der Aufnahme von DNA um ein Vielfaches. Virosomen sind mit viralen Fusionsproteinen ausgestattet (z.B. Influenza Hämagglutinin) und können so auch rigide Zellmembranen überwinden. Die mit poly-L-Lysinen konjugierte DNA kann über Koppellung an Virushüllen an die entsprechenden Rezeptoren der Zielzellen binden und so die Aufnahme von großen DNA-Fragmenten jenseits der 10kB-Grenze ermöglichen. Entnommen aus [129]

1. Einleitung

gesamt bleibt bei all diesen Modifikationen das Prinzip gleich: Die Lipidhülle und die Membran sollen bei Kontakt miteinander verschmelzen und dabei die DNA in das Zytosol abgeben. Mehr als häufig sind aufgrund rigider extrazellulärer Ablagerungen oder glykosylierter Oberflächenproteine solche Transportmittel nicht in der Lage, bis zur Membran vorzudringen, weshalb nur die wenigsten Liposomen ihre Aufgabe wirklich erfüllen können. Außerdem ist es nicht möglich, sie für einen spezifischen Zelltyp zu konzipieren [127]. Diese Probleme werden teilweise überwunden, wenn das Liposom mit viralen Fusionsproteinen ausgestattet wird. Die Kombination von Hüllproteinen (HN- und F-Protein) aus dem HVJ-Virus (japanischer hämagglutinierender Virus) mit Liposomen führt zur Bindung an Sialinsäure- Reste der Zellmembran und ermöglicht somit eine erhöhte Aufnahme in alle Zelltypen. Die Effizienz kann dabei um 50% gesteigert werden, gemessen an konventionellen Methoden.

1.6.3. Rezeptorvermittelte Aufnahme von Konjugaten

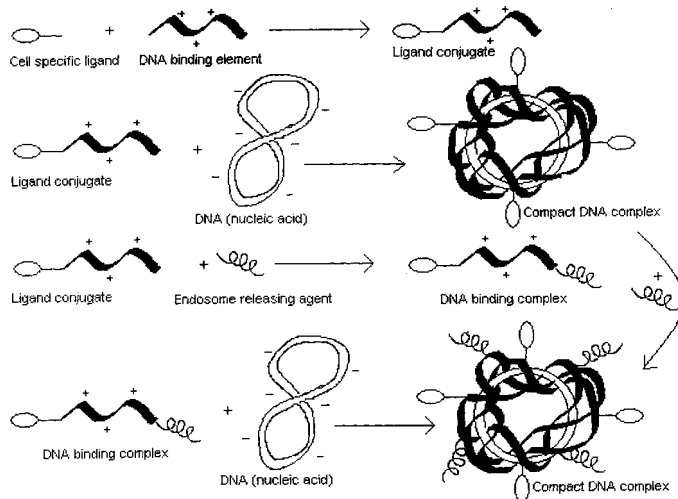


Abb. 1.6.3.1.: Die einzelnen Schritte der Konjugatbildung umfassen die kovalente Bindung des Liganden und eventuell eines endosombrechenden Enzyms an das Polyamin und die ionische Konjugation des kationischen Teils mehrerer solcher Komplexe mit der DNA. Entnommen aus [131]

Große Genpakete jenseits der 20kB-Grenze sind in vivo meist sehr schlecht in Zellen einzuführen. Wird die anionische DNA mit kationischen Polyaminen konjugiert kommt es zu kompakten Transferpaketen, die aufgrund der im Vergleich zur freien DNA leicht erhöhten Lipophilie von Polyaminen mit Membranen Kontakt aufnehmen können. Über Peptidbrücken sind an solche Polyamine Liganden gekoppelt, die dem Konjugat nicht nur eine erhöhte Verweildauer an der Membran ermöglichen, sondern bei internalisierenden Rezeptoren (z.B.: Clathrin) auch die Aufnahme des genetischen Materials über die Coated Pits garantieren [130]. Darüber hinaus ist es möglich, über den Liganden eine gewisse Zellspezifität festzulegen. Additional können Virusfragmente oder leere Hüllen mit dem Konjugat gekoppelt werden, welche so die Aufnahme vermitteln oder diese deutlich erleichtern [127,128]. Die Transfektion bleibt auch hier transient.

1.6.4. Adenovirale Vektoren

Rekombinante, replikationsinaktive Adenoviren haben als Vektoren mehrere Vorteile:

1. Die Ladekapazität für genetisches Material beträgt je nach verwendeten Viruskonstrukt zwischen maximal 6 oder 10kB.
2. Die Infektionswahrscheinlichkeit liegt in vitro bei nahezu 100%, in vivo bei bis zu 60% aller in Reichweite liegender Zellen.
3. Auch Zellen, die sich nicht in Teilung befinden, können transfiziert werden - ein Zustand, der für die meisten Zellen in adulten Organismen gilt.
4. Der Adenovirus ist ein bekanntes und weit verbreitetes System für in-vivo- und in-vitro-Transfizierungen, so dass entsprechende Konstruktions-Kits mit Packaging-Zell-Linien zur Verfügung stehen.

Limitierend ist die starke Immunantwort bei Verabreichung der Partikel. Für eine ausreichende Infektion von Körperzellen mit insgesamt 1kg Masse sind zumindest 10^{12} Plaque Forming Units nötig. Dementsprechend hoch fiele eine nicht unterdrückte Immunantwort aus.

Die Transfizierung bleibt transient für maximal 2 Wochen bestehen, da infizierte Zellen durch das Immunsystem erkannt und ausgeräumt werden. Infektionen des Endotheliums können durch die Gefäßwände abgefangen werden, wenn der Virus nicht intravenös verabreicht wird. Auch atherosklerotische Ablagerungen beeinträchtigen die Infektionseffizienz des Virus [127].

1. Einleitung

1.6.5. Adenovirus-assoziiertes Virus

Der AAV ist ein unselbständig replizierendes Parvovirus, das bislang noch mit keiner Erkrankung des Menschen in Verbindung gebracht werden konnte [131]. Er kann eine breite Palette von Zielzellen infizieren und etabliert eine latente Infektion durch Integration in das Genom der infizierten Zelle. Dies führt zum stabilen Gentransfer, wie es auch für Retroviren der Fall ist. Dabei tritt das Problem auf, dass die Integration ins Genom unreguliert erfolgt. Die Deregulierung von Onkogenen und die Transformation von gesunden Zellen zu Krebszellen ist somit möglich, wenn auch unwahrscheinlich. Obwohl der AAV in Teilung befindliche Zellen effizienter transduziert, besitzt er die Fähigkeit, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die sich nicht teilenden Zellen zu infizieren. Die Ladekapazität des AAV ist mit 4kB sehr begrenzt. Das Viruspräparat muss vor dem Einsatz von Helferviren gereinigt werden, um eine Replikation im Organismus zu vermeiden. Die Effizienz von AAV in der Infektion von Endothelien ist noch nicht determiniert. Stabile Infektionen mit über 60 Tagen andauernder Expression sind bei direkter Injektion von Viruspräparat in das Myokard von Mäusen beobachtet worden [132]. Im Allgemeinen erfolgt die Expression des transgenen Materials erst zwei bis vier Wochen nach der Infektion, wobei nicht klar ist, warum es zu dieser Verzögerung kommt [127].

1.6.7. Retrovirale Vektoren

Retroviren zeichnen sich durch ein Genom aus, das als RNA-kodiert vorliegt. Nach Einschleusen des Virus wird die RNA mittels der im inneren des Kapsides vorhandenen reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben und stabil ins Erbmateriale der Wirtszelle integriert. Rekombinante, replikationsinaktive Retrovirussysteme auf Basis des Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) sind häufig genutzte Werkzeuge für den Gentransfer in kultivierten Gefäßen. Die Nutzung dieser Systeme *in vivo* ist wegen niedriger Infektionsraten stark eingeschränkt, da sie vor allem in Teilung befindliche Zellen zur Infektion benötigen. In Gefäßkulturen wurde gezeigt, dass neben Endothelien auch die glatten Muskelzellen und die Perizyten transduziert werden konnten [133]. Die Dauer der Expression von eingeführten Genen liegt bei bis zu 5 Wochen *in vivo*, dann werden die meisten infizierten Zellen durch das Immunsystem eliminiert. Die Integration von Retroviren ist unreguliert und schafft so die Möglichkeit einer Onkogenaktivierung durch Zerstörung regulatorischer Sequenzen bei der Integration ins Wirtsgenom, auch wenn dieses Risiko als niedrig einzustufen ist. Die Ladekapazität liegt wie beim Adv bei maximal 10kB, je nach verwendetem Konstrukt [127].

1.7. Der Adenovirus als bevorzugtes Gentransfersystem

In dieser Arbeit werden murine Promotersequenzen in humane Endothelzellen eingebracht: Ein Reporter-genkonstrukt soll ermöglichen, die Aktivität der Promotoren der murinen VEGF-Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 auszutesten. Um möglichst eindeutige Aussagen machen zu können, muss die Transduktionsrate sehr hoch sein und die erzeugten Vektoren sollen nicht nur *in vitro*, sondern auch in Mausmodellen Verwendung finden können. Der Adenovirus sollte diese Anforderungen in genügender Weise erfüllen:

- Seine Ladekapazität ist bei Adv-Vektoren der ersten Generation mit 5,2kB ausreichend.
- Die Infektionshäufigkeit liegt bei Kulturzellen und entsprechend hoher Dosierung (100 MOI) bei nahezu 100%.
- Adv-Vektoren können auch *in vivo* eingesetzt werden.
- Die eingeführte DNA ist transient wirksam, eine unerwünschte Wechselwirkung mit dem Wirtsgenom kann so ausgeschlossen werden; die Resultate werden dadurch \pm unverfälscht sein.
- Einmal erzeugte Vektoren sind leicht weiterzuvermehren.

Die Nachteile liegen einerseits im komplexen Arbeitsvorgang von der Konstruktion des Transfervektors bis hin zum fertigen Viruspartikel, andererseits in der Humanpathogenizität von Adv, was die Handhabung während der Experimente stark erschwert.

1.7.1. Beschreibung und Ätiologie

Die Adenoviridae sind eine Familie unverhüllter, kubischer bzw. ikosaedrischer DNA-Viren mit einem Durchmesser von 60-100 nm. Das Kapsid besteht aus 252 Kapsomeren, die das Genom, eine linear-doppelsträngige DNA mit ca. 50 Genen und 36kB Länge, umfassen. Der Virus weist eine Bindungsaffinität zum retikuloendothelialen System auf, was ihn zur Infektion von EC prädestiniert. Die Unterteilung der Familie wird in die Genera Mastadenovirus (ca. 80 Serotypen, davon 32 humanpathogene Typen in den Subgenera A-E) und Aviadenovirus (v.a. Geflügelviren) vorgenommen. Sie infizieren Nagetiere, Hühner und Primaten. Die Übertragungswege sind Schmier- und Tröpfcheninfektion sowie

1. Einleitung

iatrogen (Glaukomuntersuchung, Tonometer, Korneatransplantation). Der Zelleintritt erfolgt über die $\alpha_v\beta_3+\beta_5$ -Integrine [134, 135]. Die leichte Verbreitung der Adenoviridae verursacht weltweit endemische (v.a. Typen 1, 2, 5 u. 6) und epidemische (v.a. Typen 3, 4, 7, 7a, 14 u. 21) sowie sporadisch akute Infektionen des Respirationstraktes meist mit leichten (häufig inapparenten) Verläufen und Neigung zur Latenz. Einige humanpathogene Typen (v.a. 12, 18, 31) sind bei Versuchstieren onkogen. Klinische Symptome sind eine akute respiratorische Erkrankung (v.a. durch Typ 4 u. 7) und ein Pharyngokonjunktivalfieber (v.a. durch Typen 3, 7 u. 7a), beide mit anginaähnlichem Verlauf und Verlust an Epithelzellen; Keratoconjunctivitis epidemica (Typ 8, meist gutartiger Verlauf). Auf Adv sind bei massiver Infektion auch atypische Pneumonien (Typen 1-4, 7, 14 u. 21, meist gutartiger Verlauf) zurückzuführen, seltener Lymphadenitis, Gastroenteritis u.a. Die Diagnose kann über Viruskultur auf 293-Zellen aus Rachenspülwasser oder Stuhl vorgenommen werden, serologischer Antikörpernachweis ist möglich und weist auf insgesamt 49 verschiedene Serotypen hin, die aufgrund ihrer Fähigkeit der Zelltransduktion, GC-Gehalt und Eigenschaften der Hämagglutininierung in 6 Subgruppen unterteilt werden [136]. Die Therapie ist nur über Symptombekämpfung vorzunehmen. Prophylaktisch werden Adv durch Chlorierung in Schwimmbädern bekämpft. Poly- u. monovalente Impfstoffe werden bisher nur in Endemiebereichen eingesetzt [2]. Im Bereich der Entwicklung von gentherapeutischen Vektoren sind bisher ausschließlich die Vertreter der Serotypen 2 und 5 zum Einsatz gekommen, weil über sie am meisten betreffend Struktur, Genomorganisation und Verhalten bei Infektionen bekannt ist [136].

1.7.2. Kapsidstruktur

Das adenovirale Kapsid ist üblicherweise ein 20-flächiger Icosaeder mit 12 Kanten. Die Flächen setzen sich aus dem Kapsidprotein Hexon zusammen, das aus drei 105kD UE zusammengesetzt ist. Die Hexons sind trapezoidförmig und enthalten drei Schleifen, die aus dem Kapsid herausragen [137]. Sie sind die variablen Epitope, die in den verschiedenen Serotypen differenzieren und an denen die AK ansetzen [138]. Die Hexonen werden

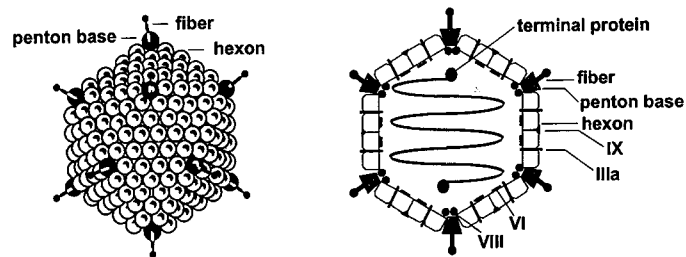


Abb. 1.7.2.1.: Die Struktur des Adenovirus-Kapsides. Links die dreidimensionale Repräsentation und rechts ein vereinfachter Querschnitt mit angezeigter Positionierung der Kapsidproteine und des Genoms. Entnommen aus [137]

durch die Hilfsproteine IIIa, VI, VIII und IX stabilisiert. Die Kanten werden durch Penton gebildet, einen Komplex aus fünf Base-Proteinen und drei Kopien von Fiber. Jedes Penton-Kapsomer bindet an 5 Hexon-Kapsomere. Die Fiberproteine bilden drei Domänen aus: Die Basis-, die Schaft- und die am Ende des Schafts befindliche Knopf-Domäne, wobei letztere aus dem Kapsid herausragt und mit dem Corsackie-Adeno-Virus-Rezeptor (CAR) der Zielzelle interagiert. Dies ermöglicht das Andocken von Penton mit den Integrinen, gefolgt von der Internalisierung des Partikels. Die DNA ist um das histonähnliche Kernprotein VII geschlungen und das Terminal-Protein schützt die Enden vor Verdauung nach Freisetzung des Genoms ins Zytosol.

1.7.3. Replikation

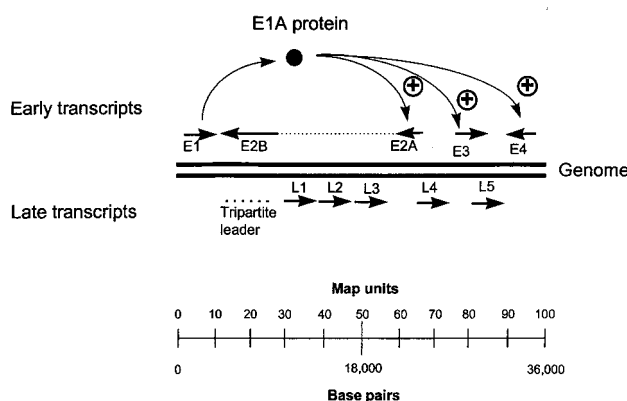


Abb. 1.7.3.1.: Das 35935 bp umfassende Genom des Adenovirus Serotyp 5 ist vollständig bekannt. Es ist in 100 gleich lange Abschnitte geteilt, auf die sich die Positionsangaben zu den kodierten Genen stützen. Detaillierte Transkriptionskarten nehmen Bezug auf verschiedene Zeitpunkte nach der Infektion und teilen die exprimierten Gene in frühe (E) und späte (L) Klassen ein. Die Indexnummer zeigt die Reihenfolge auf, in denen die Gene abgerufen werden. Überlappende Gene machen Manipulationen am Genom sehr schwierig: Einige können nicht deletiert werden, ohne damit teilweise andere zu beschädigen. Die Adv-Vektoren der ersten Generation, die heute noch am weitest verbreiteten Vektoren für in-vitro-Transduktionen, weisen Deletionen in der E1-Region auf, was sie replikationsinaktiv macht. Entnommen aus [137]

Der adenovirale Replikationszyklus wird am besten für den Serotyp C verstanden. Die Knopfdomäne des Schaftes am Penton des Adv-Kapsides bindet an die Zelloberfläche über den CAR, gefolgt von der Interaktion der RDG-Sequenz des Penton-Basisproteins mit den Integrinen. Die Kontaktaufnahme steigert die Effizienz der Aufnahme, ist dafür aber nicht essentiell [134]. Der Eintritt in die Zelle erfolgt

1. Einleitung

über clathrin-vermittelte Pinozytose [139]. Nach der Internalisierung des Virus wird das Endosom schnell aufgelöst und der Virus entlang von Mikrotubuli an den Kern transportiert, an dessen Membrane er in Porennahe innerhalb einer Stunde bindet [140-142]. Hier wird die DNA zusammen mit dem terminalen Protein in den Nukleus eingeschleust, während das Kapsid im Zytosol verbleibt. Im Wildtyp des Adenovirus wird das E1A-Gen sofort nach der Injektion des viralen Genoms in den Kern transkribiert [136]. Durch alternatives Spleißen der Prä-mRNA werden die mRNAs für die beiden unterschiedlichen E1A-Proteine gebildet. Dieses Protein kontrolliert die Expression der Wirtsgene, die für die Replikation des adenoviralen Genoms benötigt werden. Sie bilden durch Komplexierung anderer Wirtsfaktoren jene Transkriptionsfaktoren, die die Aktivierung der anderen frühen Gene des Virus einleiten. Zusätzlich bindet E1A das Retinoblastoma-Protein (Rb), das im Normalfall die Zelle am Eintritt in die Synthesephase hindert und wirkt somit deregulierend auf den Zellzyklus ein. Das kurz darauf gebildete E1B-Protein blockiert die Einleitung der antiviralen Apoptose durch Interaktion mit p53 gerade so lange, dass eine erfolgreiche Virusproduktion durchgeführt werden kann. Das 55kDa-Protein E1B komplexiert am Ende der frühen Phase mit E4-Proteinen, um die Späte-Phase-Gene aktivieren zu können, welche etwa sechs Stunden nach Infektion ihre Tätigkeit zur Produktion der selbstassemblierenden Kapsidkomponenten aufnehmen [136]. Die E4-Region ist besonders für die selektive Expression der viralen Gene verantwortlich, ist daher ein essentieller Bestandteil des Adenovirusgenoms und bietet deshalb nur wenig Möglichkeiten zur Manipulation [143]. Die Virionen setzen sich im Nukleus zusammen, was einen Transport der Kapsidproteine in den Zellkern nötig macht. Interessant ist

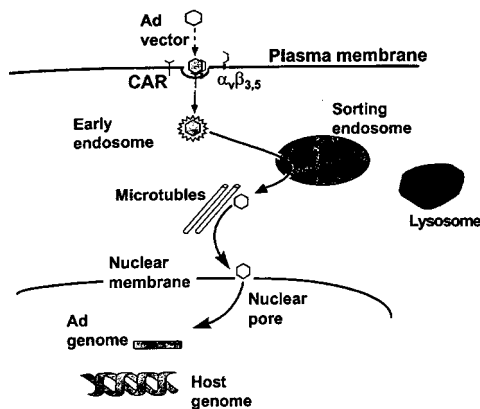


Abb. 1.7.3.II.: Infektionsweg von Adenoviren. Der Kontakt wird an der Knopfdomäne des Virus und dem CAR hergestellt. Darauf folgt eine integrinvermittelte Aufnahme des Virus durch ein Coated Pit. Der Virus entkommt aus dem Endosom durch kapsidgekoppelte Befreiungsmechanismen. An den Mikrotubuli gelangt er in die Nähe einer Kernpore, durch die das genetische Material eingeschleust und aktiviert wird. Entnommen aus [136]

die immunsuppressive Wirkung des E3-gp-19kDa-Proteins. Es verhindert die durch den Major Histocompatibility Complex Class II (MHC-II) durchgeführte Antigenpräsentation an der Zelloberfläche. Die infizierte Zelle bleibt somit unerkant für die zytotoxischen T-Zellen [144]. Andere Spleiß-Varianten von E3-Proteinen verhindern die Apoptose beispielsweise durch Behinderung des durch $TNF\alpha$ initiierten Signalweges [145]. Der Promoter der E3-Region benötigt die E1-Produkte zur Aktivierung. Bei replikationsinaktiven, E1-defizienten-Viren kann diese obsolet gewordene Region dazu genutzt werden, fremdes Genmaterial in die Zielzellen zu transportieren. Die E2-Region-Proteine kodieren für drei Produkte, die direkt an der DNA-Replikation des Virus beteiligt sind, ohne Komplexbildung mit Wirtspoteinen eingehen zu müssen: Die virale DNA-Polymerase, ein einzelstrangbindendes Protein (ssDBP) und das präterminale Protein. Die Adenoviren haben eine Strategie ausgebildet, die es ihnen ermöglicht auch die Enden des Genoms zu replizieren, indem Nukleinsäureanteile des terminalen Proteins an das 5'-Ende des einen oder anderen Stranges binden und so die Funktion eines Primers für den Start der DNA-Synthese übernehmen. Die DNA-Stränge des viralen Genoms, die an der Replikation teilnehmen sind in einer anderen Region des Zellkerns zu

finden als jene, die für die Transkription benötigt werden [146]. Die Verpackung des Genoms in das Kapsid wird durch DNA-Sequenzen nahe der E1-Region gesteuert. Für die Erstellung von Adenovirusvektoren ist von Interesse, dass jene Konstrukte, die von der normalen Viruslänge um mehr als 5% abweichen, deutlich weniger effizient als das Wildtyp-Genom verpackt werden [143].

1.7.4. Aufbau von Adenovirusvektoren der ersten Generation

Trotz milder Ätiologie sind manipulierte $E1^+$ -Adv aufgrund ihrer Fähigkeit zur Replikation mit einem gewissen Risiko behaftet. Sie können vom Ort der Wirkung durch Verschleppung in andere Organe gelangen, auf andere Wirte übergehen und in immundefizienten Organismen durch exzessive Vermehrung zu lebensbedrohlichen Situationen vor allem nach intravenöser Verabreichung führen. Um dies zu umgehen, sind schon sehr früh

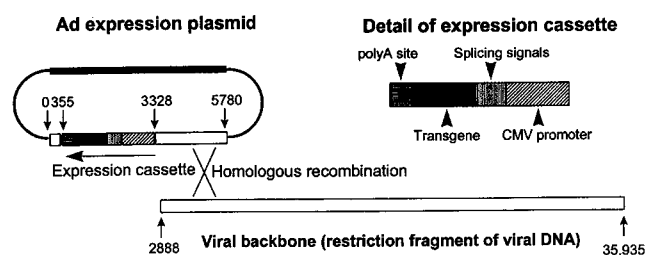


Abb. 1.7.4.I.: Die Konstruktion eines Adenovirusvektors der ersten Generation: Durch homologe Rekombination wird der Transfervektor mit der Expressionskassette an das Virusgenom gekoppelt. Entnommen aus [137]

1. Einleitung

Adenovirensysteme entwickelt worden, in denen die E1A-Region deletiert worden ist. Zur Replikation dieser Konstrukte, müssen sie in eine Packaging-Zell-Line eingebracht werden. Immortale 293-Zellen sind beispielsweise durch die Infektion embryonaler Nierenzellen mit Ad5 entwickelt worden. In diesen Zellen ist der seltene Fall einer stabilen Integration von 11 adenoviralen Genomeinheiten (~4kB) inklusive des E1-Anteils eingetreten [147, 148]. Um nennenswert große Genfragmente in das Virusgenom einbringen und verpacken zu können, muss die E1-Deletion noch durch die Entfernung von nicht essentiellen E3-Anteilen erweitert werden. Der so konstruierte Virus kann damit bis zu 6kB Fremdmaterial aufnehmen und in infektiöse, replikationsinaktive Partikel verpacken. Für die Konstruktion des Vektors werden nun zwei Plasmide gebraucht:

1. Transferplasmid: Bestehend aus Adenovirusanteilen ab Bp 0-355 und 3328-5780. Dazwischen liegt eine Polycloning-Site mit Expressionskassette, die zum Einklonen von Fremdgenen geeignet ist. Diese Anteile sind eingefasst in ein Plasmidrückgrad, das die selektive Vermehrung dieses Vektors in E.coli ermöglicht.

2. Rekombinationsplasmid: Umfasst den Hauptteil des viralen Genoms von Bp 2888 – 35935. Auch dieser Anteil wird von einem Plasmid getragen, das die selektive Vermehrung und Präparation des Genoms in E.coli ermöglicht.

Über die homologen Bereiche von 3328-5780 wird aufgrund eines zwar seltenen, aber wegen der Anzahl der eingesetzten Plasmide durchaus wahrscheinlichen Rekombinationsereignisses der Transfervektor mit der Expressionskassette an das Virusgenom gekoppelt. Dieses Ereignis findet in der Helferzell-Linie 293 statt, welche durch die enthaltene E1-Region den rekombinanten Virus aktivieren und replikationsinaktive Viruspartikel bilden kann [149]. Die aus dem Zell-Lysat gewonnenen Viruspartikel werden durch Ultrazentrifugation auf CsCl-Gradienten gereinigt. Hierbei können Partikel mit bis zu 10^{13} PFU / Präparation erzielt werden [150, 151].

1.8. Fragestellung

Das Augenmerk wird bei der Entwicklung von gentherapeutischen Systemen auf Ort, Zeitpunkt, Spezifität und Art der Wirkung gelenkt. Daraus ergeben sich für das hier vorgestellte virale System mehrere Fragen, die darüber entscheiden können, inwieweit das System für weiterführende Experimente bis hin zum möglichen klinischen Einsatz geeignet ist:

- 1) Sind die eingesetzten Promotoren der VEGF-Rezeptoren 1+2 (Flt-1 und Flk-1) im Adenovirus-system funktionell und aktivierbar? Können die Signale soweit verstärkt werden, dass sie wenigstens das 10fache der Hintergrundaktivität des Reportergens übersteigen? Wie ist die Hintergrundaktivität des TEToff-Systems zu bewerten? Eine zu hohe Aktivität könnte den Einsatz von toxischen Proteinen zu gentherapeutischen Zwecken mit diesem System in Frage stellen.
- 2) Ist das TEToff-System durch Zugabe von Doxycyclin zuverlässig abschaltbar, so dass auch die Signale eines starken Promoters bis auf die Hintergrundaktivität heruntergeregelt werden können? Kann die Aktivität des TEToff-Systems über Titration mit Doxycyclin geregelt werden? Dies wäre bei gentherapeutischen Versuchen wünschenswert, bei welchen z.B.. toxische Genprodukte einen gewissen Wert nicht überschreiten dürfen.
- 3) Wie hoch muss der PFU-Titer der Adenoviren für eine vollständige Infektion einer gewissen Anzahl von EC angesetzt werden, damit eine ausreichende Expression des Reportergens stattfinden kann.

2. Ergebnisse

Dieses Kapitel liegt in mehrere Abschnitte unterteilt vor:

1. Zunächst wird die Konstruktion und Klonierung der einzelnen Expressionskassetten (Flk-1-tTA, Flt-1-tTA und TRE-EGFP) in die Transfervektoren behandelt: **2.1.1. – 2.1.3.**
2. Der Vorbereitung der Transfervektoren wird ein eigener Abschnitt gewidmet: **2.1.4.**
3. Anschließend werden die Transfervektoren evaluiert: **2.1.5.**
4. Dieser Punkt beschreibt die Suche nach weiteren Promotoren und möglichen Therapiegenen: **2.2.**
5. Die evaluierten Transfervektoren werden genutzt, um die Expressionskassetten in das Genom der Adenoviren durch Rekombination einzuführen: **2.3.**
6. Die daraus entwickelten Adenoviren werden schließlich auf ihre Funktionalität getestet: **2.4.**

2.1. Konstruktion der Transfervektoren

Die Transfervektoren dienen der Überführung der konstruierten Expressionskassetten in das adenovirale Genom. Zu diesem Zweck wurden die endothelzellspezifischen Promotoren von Flk-1 und Flt-1 vor das tTA-Element, das an eine SV40-PolyA-Sequenz gekoppelt wurde in passende Vektoren subkloniert, um sie dann mit geeigneten Schnittstellen auszuschneiden und im Transfektor zur funktionellen Kasette zu assemblieren. Der Tetracyclinrezeptor aktiviert das TRE auf dem konstruierten Reporterplasmid. Als Reportergen wurde EGFP verwendet, da es sich durch einfache Detektion des Signals sowohl in der Zelle, als auch im Zellextrakt auszeichnet. Das tTA-Element und der zugehörige TRE-Promoter wurden aus vorhandenen, neurotrophen Transfervektorkonstrukten, pΔE1-CAG-tTA(nls) und pΔE1a-TRE*, isoliert (**2.1.4.**)

2.1.1. Konstruktion der Flk-1-Promoter-Enhancer-Kassette

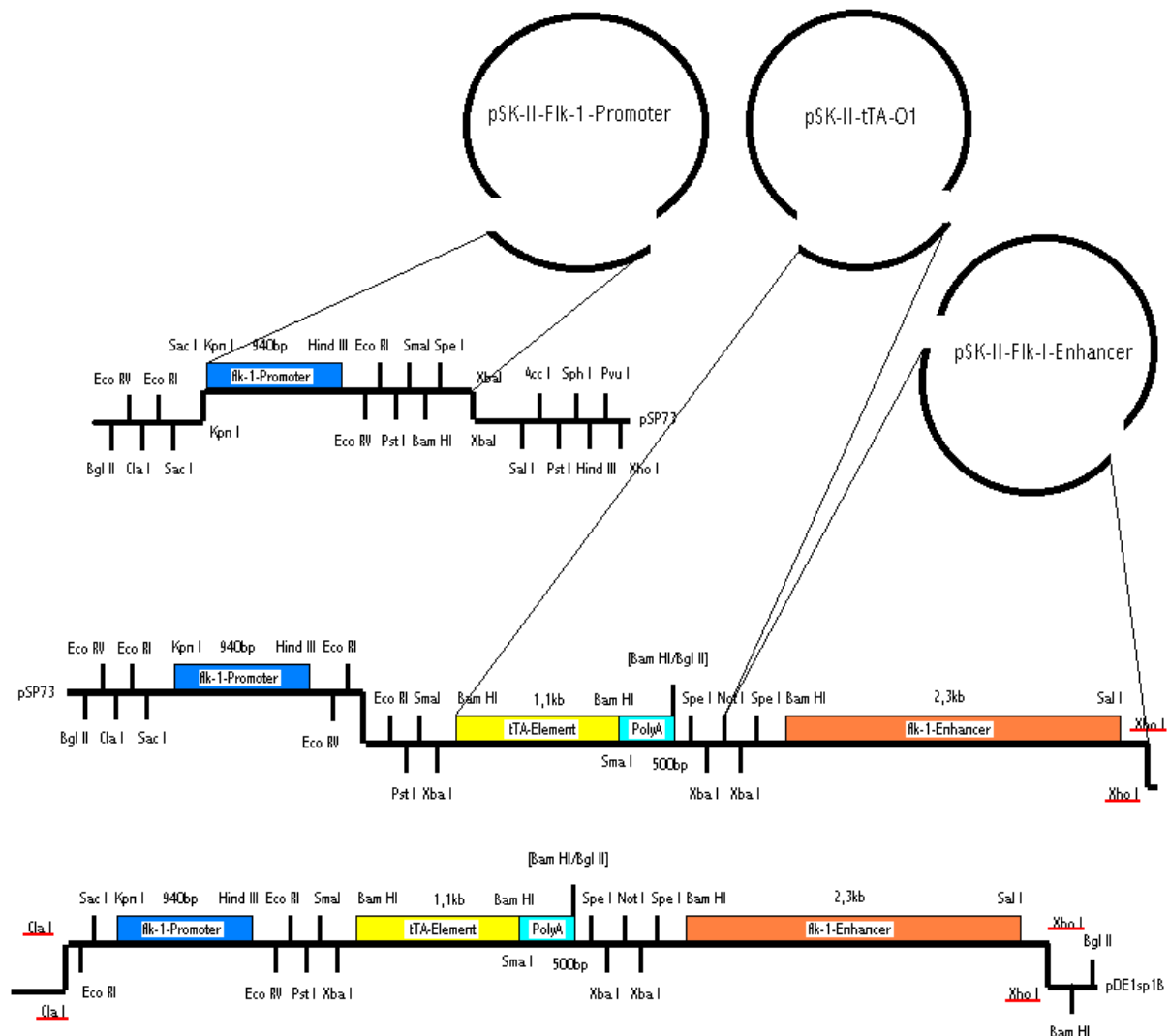


Abb. 2.1.1.I.: Konstruktionsschema für pΔE1sp1B-Flk-1-Promoter(940Bp)-tTA-PolyA(nls)

2. Ergebnisse

Das vereinfachte Konstruktionsschema zeigt, wie der Transfervektor p Δ E1sp1B-Flk-1-tTA-polyA-Enhancer zum funktionellen Vektor assembliert wurde:

1. Subklonierung des Flk-1-Promoters und des Enhancers in pSK-II
2. Subklonierung von tTA-polyA in pSK-II
3. Verdau von pSK-II-Flk-1-Promoter und pSP73 mit KpnI und XbaI.
4. Klonierung des Flk-1-Fragmentes (~1kB) in pSP73: pSP73-Flk-1-Promoter.
5. Verdau von pSK-II-tTA-PolyA(nls)-O1 mit PstI und XbaI: Befreiung des tTA-Fragmentes
6. Verdau von pSK-II-Flk-1-Enhancer mit XbaI und XhoI: Befreiung des 2,3kB-Enhancers.
7. Verdau von pSP73-Flk1 mit PstI und XhoI.
8. 3-Wegligierung des ~1,5kB-tTA-PolyA-Fragmentes und des ~2,3kB-Enhancers mit pSP73-Flk1.
9. Verdau von pSP73-Flk-1-Kassette und p Δ E1sp1B mit ClaI und XhoI.
10. Klonierung der Flk-1-Kassette in p Δ E1sp1B: Transfervektor p Δ E1sp1B-Flk-1-Promoter-Kassette

2.1.1.1. Subklonierung des KpnI-HindIII-Flk-1-Promoterfragmentes aus VR83 in pSK-II

Die Plasmide VR83 und Flk144 wurden vom Kerckhoff Institut / Bad Nauheim / Deutschland bezogen. Beide enthalten sowohl den Flk-1-Promotor als auch den zugehörigen Enhancer. Sie lagen kloniert im pGL2 Vector von Stratagene vor und wurden wie unter **4.2.1.3.** in *E.coli* vermehrt und präpariert (**4.3.5.**). Um die Plasmide zu identifizieren, wurden sie mit den Restriktionsenzymen KpnI und HindIII auf ihr Insert überprüft (**4.1.2.**).

Der Kontrollverdau wurde folgendermaßen interpretiert:

- VR83 zeigt eine Bande bei ca. 1kB und wurde somit positiv identifiziert.
- Flk-144 zeigte eine starke Bande bei etwa 700Bp und galt somit als positiv identifiziert.

Um erweiterte Planungsmöglichkeiten zu schaffen wurde das größere Promoterfragment aus VR83 zunächst in pSK-II subkloniert. Zu diesem Zweck wurde eine pSK-II Präparation in einem 10 μ l Ansatz mit KpnI und HindIII umgesetzt. Die Bande des linearisierten Vektors wurde ausgeschnitten und die enthaltene DNA eluiert. (**4.1.7.**) Um das Promoterfragment aus dem Vektor V83 zu befreien wurde das Plasmid zunächst in einem 10 μ l-Ansatz in Puffer-L mit KpnI umgesetzt. Danach wurde der Ansatz auf einen 20 μ l umfassenden Verdau in Puffer B aufgefüllt und HindIII zugefügt. Der Gesamtansatz wurde auf einem 0,8%igen low-melt-Agarosegel aufgetrennt und die ausgeschnittene 940Bp-Promoterbande extrahiert (**4.1.7.**). Die Ligation wurde mit einem 3-fach molekularen Überschuss an Promoterfragment wie unter **4.1.8.** durchgeführt.

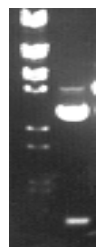


Abb. 2.1.1.2.1.: Kontrollverdau von pSK-II-Flk-1 mit KpnI und HindIII zeigt das Flk-1-Promoterfragment bei ~1kB.

4 μ l davon wurden in 50 μ l elektrokompetenten *E.coli*-Zellen (XL1-blue) eingesetzt (**4.2.2.2.**). Zur Identifizierung der positiven Klone wurde die Trafo auf einer IPTG-Xgal-LB-Amp-Platte selektioniert (**4.3.1.**). Die weißen Kolonien wurden für eine Plasmid-Minipräparation herangezogen (**4.3.3.**). Die Präparationen wurden einem Kontrollverdau mit KpnI und HindIII unterzogen: Dies zeigt, dass das Promoterfragment in pSK-II kloniert werden konnte.

2.1.1.2. Verarbeitung des Enhancerelements von Flk-1

Der Flk-1-Promoter ist nur funktionell in Verbindung mit seinem Enhancer, der aus dem ersten Intron des Flk-1-Genes isoliert wurde (Breier et al.). Die Orientierung dieses Elementes ist dabei ohne Bedeutung. Analog zur Subklonierung des Promoterfragmentes von Flk-1 wurde auch der Enhancer in pSK-II kloniert, um die Möglichkeiten während der folgenden Konstruktionsvorgänge zu erweitern. Im wesentlichen verlief diese Subklonierung wie jene unter **2.1.1.2.**, jedoch wurden pSK-II und VR83 in einem Schritt mit SalI und BamHI in Puffer-B umgesetzt. Der Ligationsansatz wurde wie unter **2.1.1.2.** durchgeführt. 2 μ l der Ligation wurden in 100 μ l chemisch kompetente XL1-blue von Stratagene (Epicureian) zur Trafo eingesetzt (**4.2.1.2.**). Einige der angewachsenen Kolonien wurden für eine Minipräparation herangezogen (**4.3.3.**). Der Kontrollverdau mit SalI und BamHI zeigte, dass die untersuchten pSK-Plasmide das Enhancerfragment aufgenommen hatten.

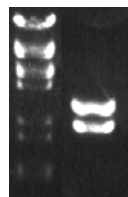


Abb. 2.1.1.3.1.: Die Gelelektrophorese auf einem Trenngel zeigt das Enhancerfragment (untere Bande) nach Verdau von pSK-II-Enhancer (Flk-1).

2. Ergebnisse

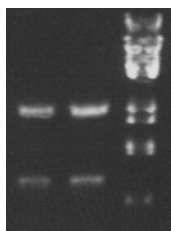
2.1.1.3. Assemblierung der Flk-1-tTA-Expressionsskassette

Die Klonierungskassette für Flk-1-tTA-PolyA(nls)-Enhancer sollte in pSP73 assembliert werden, da dessen Polylinker geeignet war, die Kassette für die Insertion in p Δ E1sp1A mit den passenden Schnittstellen auszustatten. Die Fragmente mussten jedoch nacheinander in pSP73 eingefügt werden, weil sie dadurch die benötigten Schnittstellen für die Klonierung aus pSK-II in das Konstrukt importieren konnten. Die fertige Kassette stellte die Expression des Tetracyclinrezeptors (tTA) unter die Kontrolle des Flk-1-Promoters, dessen Signal durch den Enhancer verstärkt wurde. Das Poly(A)-Element, das dem tTA-Element nachgeschaltet war, hatte die Aufgabe, das 3'-Ende der mRNA zu schützen und die Halbwertszeit der gebildeten mRNA im Zytosol zu erhöhen.

2.1.1.3.1. SUBKLONIERUNG DES FLK-1-PROMOTERFRAGMENTES IN PSP73

Der Flk-1 Promoter wurde zunächst aus pSK-II-Flk-1 durch Verdau mit KpnI und XbaI befreit. Gleichzeitig wurde das Empfängerplasmid pSP73 mit den selben Enzymen umgesetzt. Die Ansätze wurden auf einem 0,8%igen Trenngel² gereinigt und die enthaltenen DNA-Fragmente wie unter 4.1.7. eluiert.

Abb. 2.1.1.3.1.I.: EcoRV-Verdaue von pSP73-Flk1 zeigen die erwarteten Banden.



Zur Vorbereitung der Kassettenkonstruktion wurde der Flk-1-Promoter in pSP73 in die Schnittstellen KpnI und XbaI ligiert (4.1.8.). Die Ligation wurde in E.coli-XL1-blue für eine Hitzeschock-Trafo (4.2.1.2.) eingesetzt. Die sich entwickelnden Klone wurden für eine Minipräp genutzt (4.3.4.), die im Anschluss für einen Kontrollverdau mit EcoRV herangezogen wurde, wobei gezeigt werden konnte, dass der pSP73-Vektor den Flk-1-Promoter enthielt.

2.1.1.3.2. KONSTRUKTION DER FLK-1-EXPRESSIONSKASSETTE IN PSP73-FLK1

Um tTA-PolyA(nls)-O1 (2.1.4.2.1.) und den Flk-1-Enhancer in pSP73 zur funktionellen Kassette zusammenzusetzen, mussten diese erst aus pSK-II befreit werden. Die Konstruktion konnte nur in einer 3-Wegligierung durchgeführt werden. Der Vorteil einer solchen Ligierung ist jedoch, dass hochwachsende Klone mit großer Sicherheit alle eingesetzten Fragmente in der korrekten Orientierung enthalten.

Vorbereitung:

- Linearisierung von pSP73-Flk1 mit PstI und XhoI
- Befreiung von tTA-PolyA(nls)-O1 mit PstI und NotI
- Befreiung des Flk-1-Enhancers mit XhoI und NotI

Die Ansätze wurden auf ein 0,8%iges Trenngel aufgetragen, anschließend wurden die Banden des linearisierten Promoter-Vektors (~3kb), tTA-PolyA (~1,5kb) und des Enhancers (~2,3kb) ausgeschnitten, eluiert (4.1.7.) und auf 1%iger Agarose kontrolliert.

Die Ligation wurde so durchgeführt, dass die Molekülzahl der in pSP73-Flk-1 einzusetzenden Fragmente jene des Trägerplasmides jeweils um Faktor 10 überstieg (4.1.8.).

Die Ansätze wurden in 100 μ l einer Suspension aus chemisch kompetenten E.coli-XL1-blue eingesetzt (4.2.1.2.). Mehrere der angewachsenen Kolonien wurden für eine Minipräp (4.3.4.) eingesetzt. Die erhaltenen Eluate wurden mit Verdau durch ClaI und XhoI auf die ~4,8kb umfassende Flk-1-Kassette überprüft, wodurch die Flk-1-Kassette bestätigt werden konnte.

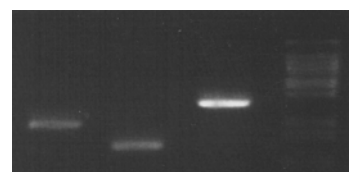


Abb. 2.1.1.3.2.I.: Kontrolle der Eluate (von links): Enhancer, tTA-PolyA, pSP73-flk-1.

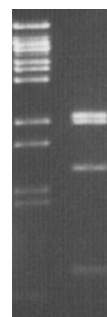


Abb. 2.1.1.3.2.II: Kontrollverdau von pSP73-Flk-1-Kassette mit EcoRI, XbaI und XhoI. Das Bandenmuster zeigt den 2,4kB-Restvektor, den 2,3kB Enhancer, das 1,5kB tTA-polyA-Fragment und den ~1kB Flk-1-Promoter.

² Im Verlauf der Vektorkonstruktion konnte deutlich gemacht werden, dass die Exposition von Trenngelen auf UV-Licht (280nm) in nur wenigen Sekunden DNA-Fragmente unbrauchbar machen kann. Die Wahrscheinlichkeit der Schädigung scheint dabei exponentiell mit der Größe des Fragmentes anzusteigen. Die Anleitung zum sicheren Ausschneiden von Banden auf UV-Licht findet sich im Kapitel 4.1.4.

2. Ergebnisse

2.1.1.4. Konstruktion von pΔE1-Flk-1(Promoter)-tTA-PolyA(nls)-O1-Enhancer

In diesem Schritt wurde die Flk-1-Expressionskassette mit pΔE1 zum fertigen Transfervektor ligiert. Die 4,8kB umfassende Kassette wurde zunächst durch einen ClaI-XhoI-Verdau aus pSP73 befreit und der Transfervektor pΔE1sp1B mit den gleichen Enzymen linearisiert.

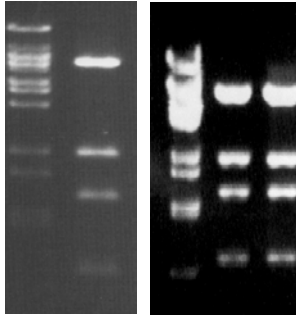


Abb. 2.1.1.4.I.: Links: Der Kontrollverdau aus der Minipräp von pΔE1sp1B-Flk-1(Promoter)-tTA-PolyA(nls)-O1 mit EcoRI, XhoI und XbaI zeigt alle in der Konstruktion verwendeten Fragmente: ~6,4kB pΔE1, 2,3kB Enhancer, 1,5kB tTA-PolyA(nls)-O1 und ~1kB Flk-1-Promoter. **Rechts:** Auch die Minipräparationen zeigen das korrekte Bandenmuster.

Die Ligation wurde für einen 5x molekularen Überschuss der Flk-1-Kassette zu pΔE1 ausgerichtet (4.1.8.). Die Ligation wurde in E.coli vermehrt (4.2.1.2.) und die anwachsenden Klone für eine Plasmidpräparation (4.3.4.- 4.3.5) verarbeitet. Zur Kontrolle wurden Verdauungen mit EcoRI, XhoI und XbaI durchgeführt, die alle verwendeten Fragmente sichtbar machten.

2.1.2. Konstruktion der Flt-1-Promoter-Kassette

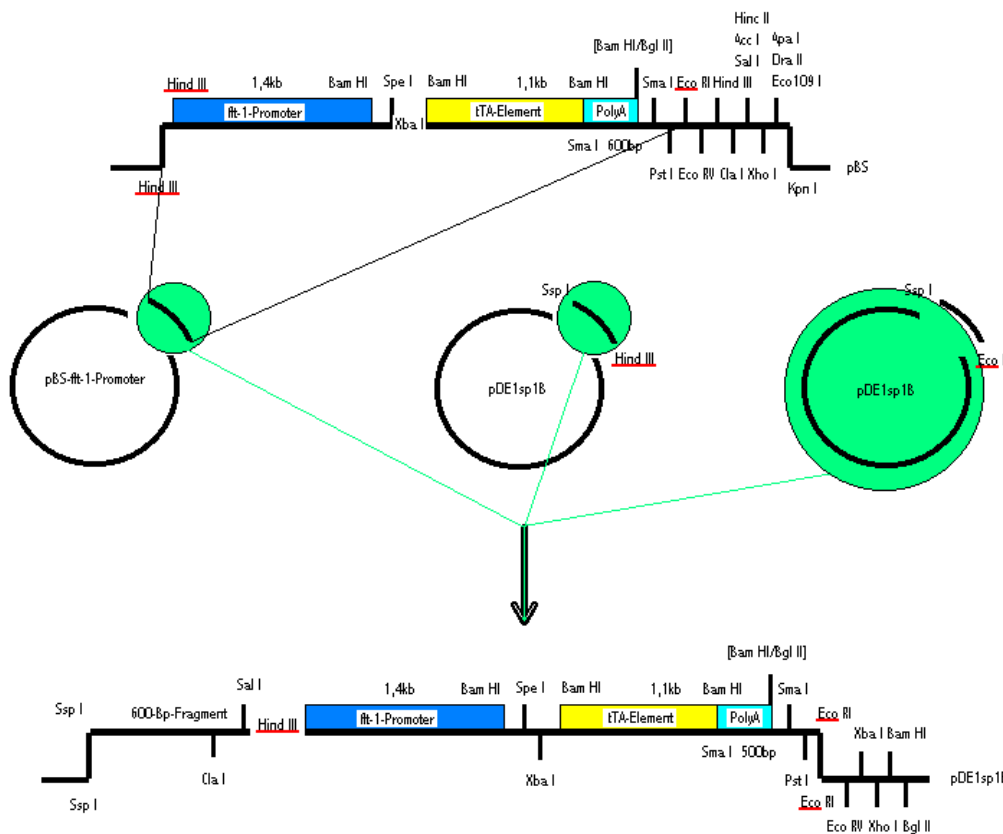


Abb. 2.1.2.I.: Konstruktionsschema für pΔE1-Flt-1-Promoter(1,4kB)-tTA-PolyA(nls)

Das vereinfachte Konstruktionsschema zeigt, wie der Transfervektor pΔE1sp1B-Flt-1-tTA-polyA-Enhancer zum funktionellen Vektor assembliert wurde.

1. Subklonierung des Flt-1-Promoter in pSK-II
2. Subklonierung von tTA-PolyA in pSK-II
3. Verdau von pSK-II-Flt-1 mit HindIII und XbaI: 1,4kB-Fragment isolieren.
4. Verdau von pSK-II-tTA-PolyA(nls)-Orientierung-2 mit XbaI und KpnI: 1,5kB-Fragment isolieren.
5. Verdau von pBS mit HindIII und KpnI: Linearisierten Vektor isolieren.
6. Ligation von pBS mit den isolierten Fragmenten: pBS-Flt-1-Kassette.
7. Verdau von pBS-Flt-1-Kassette mit HindIII und EcoRI: 3kB-Fragment isolieren.
8. Verdau von pΔE1sp1B mit SspI und EcoRI: Restvektor isolieren.
9. Verdau von pΔE1sp1B mit SspI und HindIII: 600Bp-Fragment isolieren.
10. Ligation von pΔE1-Restvektor mit dem 600Bp-SspI-HindIII-Fragment und der 3kB-Flt-1-Kassette.

2. Ergebnisse

Die Plasmide pBF52 (9kb-Fragment) und pLZ23 (6,5kb-Fragment) vom Lawson Research Institute, London enthalten jeweils Anteile des Flt-1-Promoters. Die Vorgangsweise entsprach zu Beginn jener aus 2.1.1. Siehe dazu Methodikteil 4.2.1.3. und Anmerkungen. Von zwei der angewachsenen Klone wurden Midipräparation der Plasmid-DNA durchgeführt wie unter 4.3.5. Um die Plasmide zu identifizieren, wurde pBF52 mit NotI und pLZ23 mit NcoI auf das Insert überprüft (4.1.2.).

Der Kontrollverdau wurde folgendermaßen interpretiert:

- PBF52 wies die 9kb-Bande auf und galt daher als positiv identifiziert.
- PLZ23 zeigte die erwartete Bande bei ~3kb.

2.1.2.1. Subklonierung eines Flt-1-Promoterfragmentes in pSK-II

Da die gesamten 6,5kb des Flt1-Promoterfragmentes für die Generierung eines Adv aufgrund seiner Größe ungeeignet waren, wurde für die Klonierung ein 1,4kb großes HindIII-BamHI-Fragment des Promoters verwendet. Dieses Fragment konnte in einen HindIII-BamHI-Verdau des Vektors pSK-II über eine einfache sticky-end-Ligierung in den Vektor kloniert werden. Nach Vermehrung des Konstruktes in E.coli konnte das Fragment aus der Polycloning-Site des Vektors befreit und in den adenoviralen Vektor eingefügt werden. Siehe dazu auch 2.1.4.

2.1.2.1.1. KONSTRUKTION VON FLT-1-PSK-II

Auch hier wurden die Möglichkeiten zur Konstruktion durch die Subklonierung des Promoterfragmentes in pSK-II erweitert. Dazu wurde in einem 10 μ l-Verdauansatz mit Puffer-B pLZ23 mit den Enzymen HindIII und BamHI umgesetzt und auf einem 1%igen Agarosegel auf das ~1,4kb-Fragment überprüft. Parallel dazu wurde das Plasmid pSK-II in einem 20 μ l Verdauansatz mit den gleichen Enzymen linearisiert. Die Gesamtansätze aller Verdauungen wurden auf einem 1%igen Sea-Plaque-Agarosegel in möglichst wenigen Slots aufgetragen und von Verunreinigungen befreit. Die Banden des linearisierten Vektors und die 1,4kb-Bande des Flt-1-Promoterfragmentes wurden wie unter 4.1.7. eluiert. Die Ligation wurde mit 10fach-molekularem Überschuss von Promoterfragment zu Plasmid durchgeführt und erfolgte wie unter 4.1.8.

Danach wurde der Ligationsansatz zur Trafo E.coli-XI1-blue-Zellen eingesetzt (4.2.1.2.). Diese wurden auf IPTG-Xgal-Platte selektioniert (4.3.1.) Alle Kolonien blieben weiß und waren für eine Minipräparation (4.3.3.) geeignet. Zur Kontrolle wurden die Minipräparationen mit BamHI und HindIII umgesetzt: Bei positiver Ligation sollte das ~1,4kb-Flt1-Promoterfragment vom ~3kb pSK-II getrennt werden (siehe **Abb. 2.1.2.1.1.I.**).

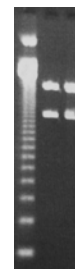


Abb. 2.1.2.1.1.I.: Kontrollverdau aus den Minipräparationen der angewachsenen, positiven (weißen) gefärbten Klone von pSK-II-Flt-1. **Von links:** 123-Marker, Kolonien 1 + 2. Deutlich ist das 1,4kb-Insert zu erkennen.

2.1.2.2. Subklonierung des Flt-1-Promoter-Fragmentes und des tTA-PolyA-Fragmentes in pBS

Um den Promoter von Flt-1 mit dem tTA-PolyA-Fragment zur funktionellen Expressionskassette zusammenzusetzen, wurde das Plasmid pBS verwendet, weil das Insert durch diese Subklonierung mit den passenden Schnittstellen für die weiteren Schritte ausgestattet werden konnte. Die Assemblierung selbst erfolgte als Dreiwegligation. Zunächst wurden die Plasmide pBS, pSKII-Flt-1 (aus 2.1.2.1.), pSK-II-tTA-PolyA(nls)-1-O2 (aus 2.1.4.2.1.) durch entsprechende Verdauungsreaktionen für die Ligation vorbereitet:

- pSK-II-Flt-1 mit HindIII und EcoRI
- 2 μ l pSK-II-tTA-PolyA(nls)-O2 mit XbaI und KpnI
- 3 μ l pBS (1 μ g) mit HindIII und KpnI

Die Ansätze wurden anschließend auf ein 0,8%iges Trenngel aufgetragen und wie unter 4.1.7. eluiert. Die Ligation wurde wie unter 4.1.8. durchgeführt. Diese wurde zur Trafo von E.coli-XL1-blue eingesetzt. Der Ansatz wurde auf einer IPTG-Xgal-Platte selektioniert, wobei ausschließlich weiße Kolonien anwuchsen, die für eine Minipräp (4.3.4.) geeignet waren.

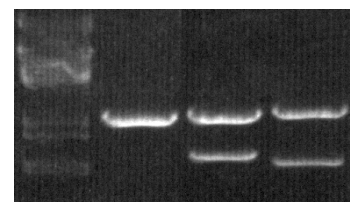


Abb. 2.1.2.2.1.: Kontrollgel zur Vorbereitung der Kassettenkonstruktion. Von links nach rechts: λ BstEII-Marker, pBS, pSK-II-Flt-1, pSK-II-tTA-PolyA(nls)-O2.

2.1.2.3. Konstruktion von p Δ E1-Flt-1-Promoter(1,4kb)-tTA-PolyA(nls)

Da nun alle Subkonstrukte vorhanden waren, konnte die Fertigung des Transfervektors in Angriff genommen werden. Die dabei benötigten Schnittstellen HindIII und EcoRI in der poly cloning site von p Δ E1sp1B liegen unmittelbar nebeneinander, weshalb aus p Δ E1sp1B mittels einer ~600Bp upstream

2. Ergebnisse



Abb. 2.1.2.3.I.: Von links: Die Eluate vom pΔE1-Restvektor, der Flt-1-Kassette und dem 600Bp-Fragment sind deutlich auf der 1%igen Agarose zu identifizieren.

der poly cloning site gelegenen SspI-Schnittstelle und der innerhalb der poly cloning site gelegenen HindIII-Schnittstelle ein Fragment generiert wurde, das mit dem durch SspI-EcoRI-Verdau erzeugten pΔE1-Restvektor und dem aus pBS-II durch HindIII-EcoRI-Verdau befreiten Flt-1-tTA-PolyA-Fragment in einer 3-Wegligierung zum vollständigen Konstrukt assembliert werden sollte. Die Verdauungen wurden mit low-melt-Agarose aufgetrennt und die Banden (~6kB Restvektor, ~600Bp Fragment, ~3kB Flt-1-Kassette) eluiert (4.1.7.).

Der Ligationsansatz wurde wie unter 4.1.8. durchgeführt und in *E. coli* XL1-blue eingesetzt (4.2.1.2.). Die Klone wurden für Minipräparationen (4.3.4.) eingesetzt. Die Präparationen wurden mit HindIII, BamHI und EcoRI umgesetzt. Die erwarteten Banden (6,5kB pΔE1, 1,4kB Flt-1-Promoter, ~1kB tTA und ~500Bp PolyA) konnten die Expressionskassette bestätigen. Einer der Klone wurde für eine Midiprep genutzt (4.3.5.).

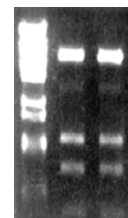


Abb. 2.1.2.3.II.: Der Testverdau mit HindIII, EcoRI und BamHI zeigt das erwartete Bandenmuster.

2.1.3. Das Reporterkonstrukt pΔE1-TRE-EGFP

Ein Reporter gen codiert für ein Protein, das bei seiner Expression leicht durch eine ausgeprägte Enzymreaktion, Verfärbung oder Fluoreszenz erfasst werden kann. Der Vorteil visueller Reporter liegt darin, dass eine erfolgreiche Aufnahme von DNA durch die Zielzelle bei entsprechenden Bedingungen mit einfachen Mitteln nachweisbar ist. Die verwendete EGFP-Sequenz ist eine für das Expressionssystem der Mammalier optimierte Version des GFP³. Die Möglichkeit der Visualisierung sollte hier zur Darstellung der Effizienz der verwendeten murinen Promotoren (Flk-1 und Flt-1) genutzt werden. Dazu wurde aus dem Plasmid pEGFP-N1 von Promega die EGFP-kodierende Sequenz in den Transfervektor pΔE1sp1A überführt.

2.1.3.1. Konstruktion von pΔE1sp1A-TRE-CMVmin-EGFP-PolyA_{SV40}

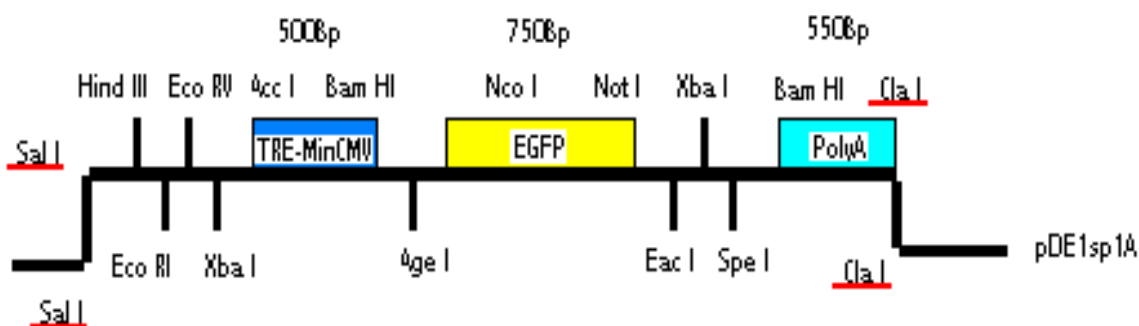


Abb. 2.1.3.1.I.: Die Fragmentverteilung des Reporterkonstrukt pΔE1-EGFP

³ GFP und seine Varianten sind aus 238 AS aufgebaut. Die Struktur des Enzyms lässt sich durch elf β -Faltblätter mit je 9 bis 13 Aminosäuren beschreiben, die als β -barrel um eine zentrale α -Helix gewunden sind. Der so entstehende Zylinder ist ca. 42 Å lang und hat einen Durchmesser von 24 Å. Es wird angenommen, dass der Zylinder frei in der Zelle beweglich ist und nicht an Zellbestandteile bindet. Das zentral kovalent gebundene Chromophor wird von modifizierten Aminosäureresten (SerdehydroTyr-Gly) gebildet. Es weist zwei Absorptionmaxima, bei 295nm und bei 475nm auf. In EGFP wurde mittels einer Punktmutation Ser65 gegen Thr ausgetauscht. Es resultiert ein Absorptionsmaximum bei 488 nm. Bei 508 nm können die vom Chromophor nach Anregung emittierten Photonen detektiert werden.

2. Ergebnisse

Das vereinfachte Konstruktionsschema zeigt, wie der Transfervektor p Δ E1sp1A-TRE-EGFP zum funktionellen Vektor assembliert wurde.

1. Verdau von pEGFP-N1 mit Sal-I und BamHI: Linearisierten Vektor isolieren.
2. Gleicher Verdau von p Δ E1a-TRE*: TRE-CMV, 535Bp-Fragment isolieren.
3. Ligation von TRE-CMV in pEGFP-N1: pEGFP-TRE.
4. Verdau von pSK-II mit BamHI und ClaI: Linearisierten Vektor isolieren.
5. Verdau von p Δ E1a-TRE*: SV40-PolyA, 470Bp-Fragment isolieren.
6. Subklonierung des PolyA-Fragmentes in pSK-II: pSK-II-SV40-PolyA.
7. Verdau von pEGFP-TRE-CMV mit Sal-I und NotI: ~1,3kB-Kassette isolieren.
8. Verdau von pSK-II-SV40-PolyA mit NotI und ClaI: SV40-PolyA, ~470Bp-Fragment isolieren.
9. Verdau von p Δ E1sp1A mit Sal-I und ClaI: Linearisierten Vektor isolieren.
10. Ligation von p Δ E1sp1A mit TRE-CMV-EGFP u. PolyA: p Δ E1sp1A-TRE-CMVmin-EGFP-PolyA_{SV40}

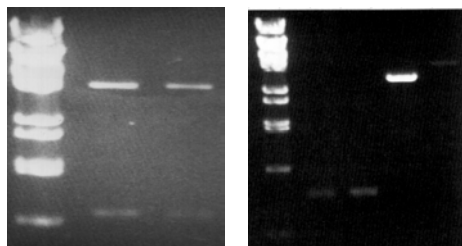


Abb. 2.1.3.1.II.: Links: Der Kontrollverdau aus den Minipräps zeigt den Restvektor und die 750Bp Bande des EGFP. Rechts: Kontrolle der Eluate vor der Ligation. Von links: λ -BstEII-Marker, TRE-Element, SV40-PolyA-Fragment, pSK-II und pEGFP-N1.

Das Plasmid pEGFP-N1 von Promega wurde im methylierungsinaktiven E.coli DM-1-Stammes vermehrt (4.2.1.3.) und die angewachsenen Klone wurden wie unter 4.3.4. für eine Plasmid-Minipräparation verarbeitet. Ein Verdau mit XhoI und XbaI bestätigte die Identität von pEGFP-N1: Die Kontrolle auf 1%iger Agarose zeigte eine 4,2kB Restvektorbande und die erwartete, ~750Bp umfassende EGFP-Bande. Die vorläufige EGFP-Kassette bestehend aus dem BamHI-Sal-I-Fragment von TRE-CMVmin und EGFP wurde im Vektor pEGFP-N1 zusammengesetzt, der mit den gleichen Enzymen linearisiert wurde. Das BamHI-ClaI-Fragment von SV40-PolyA, das für die Stabilität der mRNA im Zytosol sorgen soll, wurde hingegen in pSK-II kloniert.

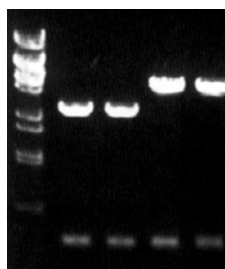


Abb. 2.1.3.1.III.: Von links: λ -BstEII-Marker, Kontrollverdau von pSK-II-PolyA, sowie pEGFP-TRE weisen ein Insert bei ~500Bp auf.

Von den erstellten Subklonen ausgehend sollten die Kassette und das PolyA in den Vektor p Δ E1sp1A eingefügt werden. Die Ligationen wurden wie unter 4.1.8. durchgeführt. Anschließend wurden E.coli XL1-Blue mit den Ansätzen transformiert (4.2.1.2.).

Die Kolonien von pSK-II-SV40-Poly-A und pEGFP-TRE wurden für eine Minipräparationen herangezogen (4.3.4.) und jeweils durch einen Kontrollverdau mit ClaI und BamHI überprüft.

Die Assemblierung des Transfervektors wurde folgendermaßen vorbereitet:

- p Δ E1sp1A wurde mit Sal-I und ClaI linearisiert.
- pSK-II-PolyA wurde mit NotI und ClaI umgesetzt.
- pEGFP-TRE wurde mit Sal-I und NotI verdaut.

Die Ansätze wurden anschließend auf 0,8%igem Trenngel aufgereinigt und die entsprechenden Fragmente eluiert (4.1.7.) und mit den so generierten Fragmenten wurde ohne vorherige Bestimmung der Konzentration der Eluate in einer 3-Weg-Ligierung der Transfervektor p Δ E1sp1A-TRE-CMVmin-EGFP-SV40-PolyA erstellt (4.1.8.) Die Ligation wurde für eine Trafo genutzt (4.2.1.2.). Die anwachsenden Klone wurden für eine Plasmidpräparation (4.3.4.-4.3.5.) eingesetzt und einem Kontrollverdau mit Sal-I, NotI und ClaI unterzogen: Sie zeigen das erwartete Bandenmuster.

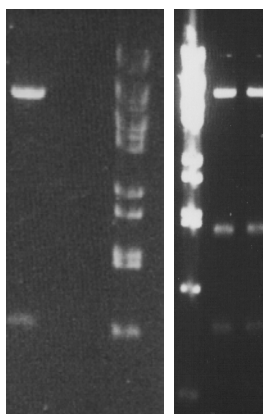


Abb. 2.1.3.1.IV.: Links: Der Kontrollverdau der Minipräparationen 1+2 mit Sal-I, NotI und ClaI von p Δ E1-TRE-CMVmin-EGFP-PolyA zeigt die Bande von p Δ E1 bei 6,4kB, die TRE-EGFP-Bande bei ~1,25kB und das PolyA bei ~ 500bp. Rechts: Kontrollverdau der Midipräparationen 1+2 mit BamHI. Präparation 1 zeigt die Restvektorbande und die 750Bp-EGFP-Bande.

2. Ergebnisse

2.1.4. Verarbeitung der gelieferten Transfer-Vektoren pΔE1-CAG-tTA(nls) und pΔE1a-TRE*

Eine Grundlage dieser Arbeit bildeten Plasmidkonstrukte, die in Form adenoviraler, neurotroper Vektoren vorlagen [152]. Sie wurden konstruiert, um neurospezifische Transfizierung zu ermöglichen. Mittels des Promotors der Enolase (NSE) wurde speziell in Neuronalzellen ein Signal generiert, das mittels des **TETon/off**-Systems von Clontech verstärkt wurde. Da die poly cloning site der verfügbaren Vektoren konstruktionsbedingt stark reduziert vorlag, musste das tTA-PolyA-Fragment aus dem Vektor entfernt und in pSK-II subkloniert, damit es für die Konstruktion der neuen, in **2.1.1. – 2.1.2.** beschriebenen Transfervektoren genutzt werden konnte. Ferner wurde aufgrund der fehlenden polycloning site entschieden den Originalvektor von Microbix zur Konstruktion der Transfervektoren heranzuziehen.



Abb. 2.1.4.I.: Kontrollverdau der Basis-Plasmide. Von links nach rechts: 123-Marker, pΔE1a-TRE (HindIII-Verdau), pΔE1-CAG-tTA (BamHI-Verdau). Die neurotrophen Transfervektoren zeigen die erwarteten Banden bei 1kB und 1,1kB.

Die Plasmide pΔE1-CAG-tTA(nls) und pΔE1a-TRE* mussten zunächst in den E.coli-Stamm XL1-blue mittels des Hitzeschockverfahrens (**4.2.1.3.**) eingeführt werden. Die entstehenden Kolonien wurden für eine Plasmidpräparation angesetzt (**4.3.2. - 4.3.5.**). Zur Überprüfung der Plasmide wurden die Präparationen mit den jeweils entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (**4.1.2.**) und auf charakteristische Fragmente getestet. Die Plasmide wurden dadurch positiv identifiziert.

2.1.4.1. Isolierung des tTA-Elements

Das tTA-Element kodiert für die tetracyclinkontrollierte, transaktivierende Domäne, welche im TET-System den TRE-Promoter aktiviert. Die Expression des tTA sollte in vorliegender Arbeit durch die Promotoren von Flk-1 und Flt-1 kontrolliert werden. Der durch das tTA aktivierte TRE-Promoter kontrolliert die Expression des Reportergenes. Die Expression des Reportergenes wird zwar durch das zwischengeschaltete tTA verstärkt, ist aber proportional zur Aktivität des zu analysierenden Promotors im tTA-Plasmid. Um das tTA-Element mit der angehängten SV40-PolyA-Sequenz isolieren zu können, musste ein vollständiger Bgl-II- und anschließend ein partieller BamHI-Verdau an pΔE1-CAG-tTA(nls)-1 durchgeführt werden.

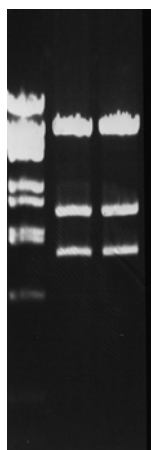


Abb. 2.1.4.1.I.: Gelelektrophorese des vollständigen Clal-BamHI-Verdau von pΔE1-CAG-tTA(nls). Der linearisierte Restvektor (oberste Bande) und das tTA-Element (unterste Bande bei 1,1kB) sind deutlich zu identifizieren. Statt der in der Plasmidkarte angegebenen 780Bp-Bande tritt für den hCMV-Promoter jedoch ein ~1,8kB-Fragment auf. **Von links:** λ-BstEII-Marker, Verdau.

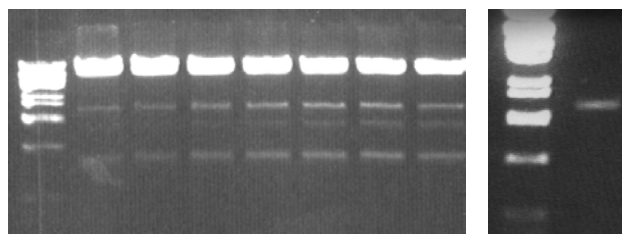


Abb. 2.1.4.1.II.: **Links:** Partielle, gradieller BamHI-Verdau des mit Bgl-II linearisierten pΔE1-CAG-tTA(nls) auf 0,8% low-melt-Agarose. Jeder Ansatz enthält 2μg des Vektors. **Von links:** λ-BstEII-Marker, 0,1U, 0,2U, 0,3U, 0,4U, 0,5U, 0,6U, 0,7U BamHI. Die unterste Bande entspricht der Poly-A-Sequenz, die hier deutlich länger (ca. 550Bp) erscheint, als in der Vektorkarte angegeben. **Rechts:** Eluat aus den gelextrahierten Banden auf 1%iger Agarose. Das ~1,5kB-Fragment ist eindeutig zu erkennen.

Durchführung:

- Zunächst wurde ein vollständiger Bgl-II-Verdau von 14μg pΔE1-CAG-tTA(nls) angesetzt: 20μl Vektor-Präparation in 43μl Aquadest mit 7μl Puffer-B zuzüglich 14μl Bgl-II-Enzym (84μl Gesamtvolumen). Dieser Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert.
- Danach wurden diesem Verdau weitere 7μl Puffer-B zugefügt.
- Der Verdau wurde auf 7x 1ml MCT aliquotiert (je 12μl) und mit einer Verdünnung von BamHI (0,1U/μl) in steigender Menge versetzt (0,3U Ansatz 1 bis 0,9U Ansatz 7 in 0,1U-Schritten).
- Diese Ansätze wurden 20min bei 37°C inkubiert.
- Um einen vollständigen Verdau durch BamHI zu verhindern, wurde das Enzym 20min auf 85°C hitzeinaktiviert.
- Der Ansatz mit insgesamt 0,6U BamHI (= 0,3U Enzym / μg DNA) erreichte die höchste Ausbeute an gesuchtem 1,5kB-Fragment, so dass ein partieller Verdau von 14μg pΔE1-CAG-tTA(nls) mit 0,3U/μg DNA angesetzt wurde.

2. Ergebnisse

Isolierung des tTA-Poly-A-Fragmentes:

- Der Ansatz wurde auf 0,8%iger low-melt-Agarose aufgetrennt.
- Die Banden des gesuchten 1,5kB-tTA-PolyA-Elements aus den einzelnen Ansätzen wurden ausgeschnitten und in einem MCT vereinigt.
- Das Volumen der Agarose wurde auf 300µl geschätzt, aufgrund des großen Volumens in zwei getrennten Spincolumns gereinigt und in 2x 30µl Eluationspuffer eluiert (4.1.7.).
- Die Eluate wurden vereinigt und die DNA wurde ethanolpräzipitiert. Das Präzipitat musste nun für Klonierungszwecke in der Lösung des linearisierten Vektors aufgelöst werden, da die DNA-Konzentration des Eluats zu gering gewesen wäre, um für Ligationsreaktionen verwendbar zu sein.

2.1.4.2.1. SUBKLONIERUNG DES TTA-POLY-A-FRAGMENTES IN PSK-II

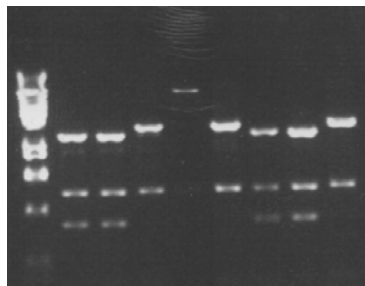


Abb. 2.1.4.2.1.1.: Verdau der Präparationen von tTA-PolyA mit EcoRI und BamHI: Die Ansätze zerfallen in 3 Fragmente von 3kB, 1,1kB und 0,5kB Größe (Orientierung 2), die Ansätze 3, 5+7zerfallen in 2 Fragmente von 3,5kB und 1,1kB (Orientierung 1). Erklärung siehe Text.

Um die Möglichkeiten der Klonierung in die Polylinker von adenoviralen Transfervektoren zu erweitern, wurde das tTA-Element aus 2.1.4.2. in einen mit BamHI verdauten pSK-II einkloniert. Der Vektor wurde zuvor dephosphoryliert, um Religation zu behindern (4.1.5.). Die Bande des Vektors wurde mittels Phenolextraktion präpariert (4.1.4.). Der Ansatz wurde wie

unter 4.1.8.1. beschrieben ligiert. Danach wurden E.coli XL1-blue mit der Ligation transformiert (4.2.1.2.) und die angewachsenen Kolonien wurden für eine Minipräp herangezogen (4.3.4.). Durch einen Verdau mit EcoRI und BamHI sollte abgeklärt werden, in welcher Orientierung das Insert vorlag (4.1.2.): Es enthält eine BamHI-Schnittstelle an seinem 5'-Ende, sowie nach etwa 1,1Kb in 3'-Richtung. Am 3'-Ende wurde durch die Ligation des Bgl-II-Endes an die kompatible BamHI-Site die Schnittstelle inaktiviert. Liegt nun das Fragment so vor, dass sein 5'-Ende in Richtung EcoRI zeigt, würde der EcoRI-BamHI-Verdau 2 Fragmente generieren: Das Restplasmid mit dem PolyA-Anteil (ca. 3,5Kb) und dem tTA (1,1kB). Dies wurde als **Orientierung 1** bezeichnet. Liegt das Insert in umgekehrter **Orientierung 2** vor, so würde der gleiche Verdau das 1,1kB-tTA-Fragment, das 500Bp-Poly-A-Fragment und das 3Kb-Restplasmid freisetzen. Der Verdau zeigte, dass die Plasmide pSK-II-tTA-PolyA sowohl in der Orientierung 1 als auch in der Orientierung 2 vorlagen.

2.1.5. Verifizierung der konstruierten Transfervektoren

Die in 2.1.1. – 2.1.3. erstellten Transfervektorstrukturen mussten vor der Generierung der daraus rekombinierten Adenoviren validiert werden. Ein Großteil der Überprüfung der Konstrukte wurde mittels PCR und Sequenzierung durchgeführt. Die Primer wurden so erstellt, dass damit die Inserts sowohl amplifiziert als auch die einzelnen zur Konstruktion verwendeten Fragmente bestätigt werden konnten. Die Oligos wurden anhand der Sequenzen⁴ von pΔE1sp1A+B und dem tTA-Fragment computergestützt generiert und bei MWG-Biotech angefordert.

Oligo 1: pDE0280-0298HDM: 5'-CGGGAAAACACTGAATAAGAG-3' (52,4°C Schmelztemperatur)
Insertgrenze pΔE1 und Promoter in Richtung 3'-OH

Oligo 2: pDE10437-0419HDM: 5'-ATTCTTTCCCACCCTTAA-3' (52,4°C Schmelztemperatur)
Insertgrenze pΔE1 und Kassette in Richtung 5'-OH

Oligo 3: HDMtTA806-829: 5'-TCCACTTAGACGGCGAGGAC-3' (61,4°C Schmelztemperatur)
Grenze zwischen tTA und SV50-PolyA in Richtung 3'-OH

Oligo 4: HDMtTA176-159 5'-ATCTCAATGGCTAAGGCG-3' (53,7°C Schmelztemperatur)
Grenze zwischen tTA und Promoter in Richtung 5'-OH

2.1.5.1. Verifizierung des Flk-1-Konstruktes

Die einzelnen Fragmente der Expressionskassette wurden schon durch Verdaureaktionen beschrieben (2.1.1.4.). Durch die Größe der Flk-1-Kassette von ~5kB war eine Amplifikation des Inserts aus dem Transfervektor relativ problematisch:

⁴ Die Sequenzen wurden auf der Website von Microbix bzw. Promega zur Verfügung gestellt.

2. Ergebnisse

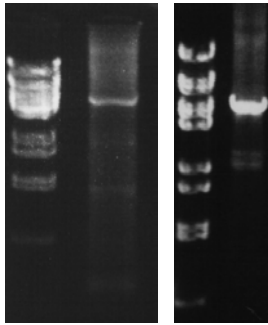


Abb. 2.1.5.1.1.: PCR aus pΔE1-Flk-1-Kassette. **Links:** Programmierung mit 60°C Primerannealing-Temperatur und 2min Elongationszeit. Die unspezifischen Banden sind zahlreich, die ~5kB-Bande jedoch noch sichtbar. **Rechts:** Programmierung des Cyclers mit den angepassten Werten zeigt eine Minimierung der unspezifischen Banden und eine starke Amplifizierung des Inserts.

1. Die Polymerase brauchte mehr Zeit, um 5kB zu amplifizieren.
2. Lange Elongationszeiten machten unspezifische Amplifikate durch False-Priming möglich.
3. Die Primerannealingtemperatur musste deshalb zur Erhöhung der Spezifität angepasst werden (im allgemeinen deutlich höher als der vom Supplier vorgeschlagene Nominalwert).

Die PCR wurde, wie unter 4.4.1. für einen 50µl Ansatz mit dem Biotherm-PCR-Kit beschrieben, durchgeführt.

2.1.5.1.2. SEQUENZIERUNG VON PΔE1SP1B-FLK-1-KASSETTE

Die einzelnen Fragmente der Expressionskassetten in den Transfervektoren mussten durch Sequenzierungen bestätigt werden. Die für die Sequenzreaktionen eingesetzten Oligos sind die gleichen, wie sie schon für die PCRs eingesetzt wurden. Die Vorgangsweise wird unter 4.4.2. beschrieben. Die Sequenzen waren deutlich und klar erkennbar, jedoch konnten die Fragmentgrenzen der Inserts nicht ausgelesen werden. Die Fragmente an sich wurden jedoch einwandfrei identifiziert. Parallel wurden auch die Sequenzreaktionen für den Transfervektor pΔE1-Flt-1-Kassette durchgeführt (2.1.5.2.1.):

Oligo	1	2	3	4	1	2	3	4
Konstrukt	Flk-1	Flk-1	Flk-1	Flk-1	Flt-1	Flt-1	Flt-1	Flt-1
Ergebnis	Vektoranteil und Promoter erkannt	Mit Mac-Vector Enhancer erkannt	tTA-Element erkannt	Promoter Erkannt	Vektoranteil und Promoter Erkannt	k.A.	tTA-Element erkannt	Flt-1-Promoter Erkannt

Tabelle 2.1.5.1.2.1.: Alle vorhandenen Fragmente der Expressionskassetten konnten über Datenbankvergleich (blast) einwandfrei identifiziert werden. Der Enhancer war anhand der Sequenz AF153058 mittels Mac-Vektor zu bestätigen.

2.1.5.2. Verifizierung des Flt-1-Konstruktes

Die einzelnen Fragmente der Expressionskassette konnten durch Verdaureaktionen beschrieben werden (2.1.2.4.). Das Insert von pΔE1-Flt-1-Kassette ließ sich nicht über die Oligos 1+2 amplifizieren. Deshalb wurden zwei weitere Primer generiert, die innerhalb des Flt-1-Promoterfragmentes liegen (HindIII und BamHI-Fragment der Genbank-Sequenz mit der Acc.No.: AJ224863).

HindIII

AAGCTTGTAGAGAAATCAGAATTGGCTGGGGAAGTCCGCAGGTGAGCTTAGGCTCACAGCGGTCTTCCCTTCTGCTAGACCATGAAGGAGAAA

Oligo 5

AGGAATCTCACTTGCCTTGGCTCAGAGGCTCCCGGTGCCTTAGTAGAGCTGCGGTGGTGGTGGCCAGACTCTCTTAGGAATGAGGCAACTCAAGTTGCGCAACCTTCCCTACCGGAGGTTAGTCTAGTCTTCCAGGAAAAGCCTCTGGTCCCATTTAGGAGCCATTTATCACGGGTACTGGCAAGTTCTATTGAGGCTATTTTCAACCTGCAGTATTTACAGGGACAAGACTGGGCTGCTCCGGGAGGCCGGGACGACTTCAGCCTCCAGTTA

Oligo 6

ATGGATGCATAATTGAGGAACAACTGGGAATTAGTGTATCGTAAATGATCTAGTGTCTCAAGTTAATTTACCCGTTTTTTGTTCCAAGAACAATTCAGTCACTCTTGGCTAGCCGGCTCCACCAAAAAGATTGTTTTCCATCCAGCGTTTTAGACCTAGAGTTCAAGTTCTTGGCCCTTACAGTTGCGAGAGCGTGTCTCACGCTTGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGGTAACATGTTATTCCTGTTTTGCTTTAGGAAAGCAGAGGTTGAGGAAATGGCTTGGGCGGTGCATTAATGCAGCCGAAAAGACACAGACTCCCTCCCTTGGGACCCGCGGGCCCGCGCTCTTCCGAAGGTGCTTGGCAAGGCGTCCGGTCCCTCGGACGCTCCGGTCCAAGTGCCTTAAGCGGAGGGTCTCTGGCGCTTCTTCCGCTGTCTGGCAACAGTCTGGCGGGTTCAGGACCGCGGGACCGCTCGGAGAGGGCTCGACTGCGCTCGTTCTCGGTGCCAGGACACCGTCCGGGAGGCGGCCAGCTTCCCTAGGATAAGACTTCCCGCCCGGGGGCAGGGCGGTGCACTTAGACGGTCCCTCCCTCAGTTTCCGGCGGTCAACAGAGCTAGTAAGCTCGGTGGAGGAGCTGGGTAAGGATTTCTGAGAGCGATGGGAGGAGGGGCTGGGCGAGAGCAGAGCAAGGACCCGTAACCTGCGAACCTGTCCGGGACCCGCGCGCTAGCGCCACCGCAGCGCGCTCTGGCCCCGGGCTACCCGCTTCCCGGGCCCCCGCCCCCTCCGGGAGGAAGAAGAGGTTAGTGGGAGGCGGATGAGGGTGGGGACCCCTTGCAGTCACTGGAAGGAGGTGCGGGGTAGGAAAGTGGGCTGGGAAAAGGTTATAAATCGCCCCCGCTCGGCTGCACTTTCAGGAGGTCCTTGCAGAGGCTCGGAGCGCGGTGGCGGACTCCCGGGAGGTTAGTGTGGTGGCTGCTGCTCGGAGCGGGTCCGGGACTCAAGCGCAGCGGCTAGCGGACCGGGACGGCGA

BamHI

Abb. 2.1.5.2.1.: Fragment des murinen Flt-1-Promoters, wie es in den Transfervektor integriert worden ist

Oligo 5: Flt1200-1181HDM: 5'-AGTTGCCTCATTCCCTAAGAG-3' (55,4°C Schmelztemperatur)
Insertgrenze nach außen in Richtung 5'-OH

Oligo 6: Flt1414-1432HDM: 5'-CGTGGAAATTAGTGTATC-3' (54,5°C Schmelztemperatur)
Fragmentgrenzen Flt-1-Promoter und tTA(nls) in Richtung 3'-OH

2. Ergebnisse

Die PCR wurde wie unter **4.4.1.** für einen 50µl Ansatz mit dem Biotherm-PCR-Kit beschrieben durchgeführt.

Reaktion 1: Oligos 1+5

Reaktion 2: Oligos 6+2

Die Reaktion zeigte die erwartete Bande bei 250Bp. Bei der Sequenzierung der Virusextrakte konnten zusätzlich Oligo 2 und Oligo 3 verwertbare Sequenzen generieren (**Tabelle 2.1.5.1.2.I.**).

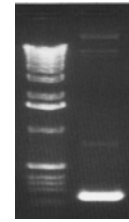


Abb. 2.1.5.2.II.: Von links: n-kB-Ladder, PCR. Die Reaktion zeigt bei ~250Bp die erwartete Bande.

2.1.5.2.1. SEQUENZIERUNG VON pΔE1SP1B-FLT-1-PROMOTER(1,4kB)-TTA-POLYA(NLS)

Zusätzlich zur PCR wurde eine Sequenzierung durchgeführt, um die einzelnen Fragmente (Flt-1-Promoter und tTA) zu verifizieren. Die Reaktion wurde wie unter **4.4.2.** durchgeführt: Mit dem Oligo 1 konnte Flt-1-Promoter eindeutig über eine Blast-Suche über eine Länge von 400 BP verifiziert werden. Zur zweiten Sequenzierungsanalyse siehe auch **2.1.5.1.2.**

2.1.5.3. Verifizierung des EGFP-Reporterkonstruktes

Die Kassette des Reporterkonstruktes ist verhältnismäßig klein, weshalb die Oligos 1+2 für eine Verifizierung ausreichten. Außerdem war das Konstrukt sowohl durch Verdaureaktionen als auch durch Transfektionen in 293-Zellen bestätigt worden (siehe **2.1.3.1.** und **2.3.1.**). Die PCR wurde wie unter **4.4.1.** für einen 50µl Ansatz mit dem Biotherm-PCR-Kit beschrieben durchgeführt.

Zur Kontrolle wurde 1µl einer solchen PCR einem Kontrollverdau mit BamHI in Puffer B unterzogen, der bei Kontrolle auf 1%iger Agarose das erwartete Bandenmuster zeigt: ~750Bp-EGFP, ~530Bp-TRE-CMV und ~400Bp-SV40-PolyA. Aufgrund der größtenteils befriedigenden Ergebnisse kann auf eine Sequenzierung des Konstruktes verzichtet werden.

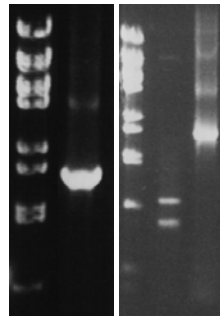


Abb. 2.1.5.3.I: Links: Die optimierte PCR mit Oligo 1+2 zeigt die erwartete ~1,7kB-Bande aber kaum Nebenreaktionen.

Rechts: Kontrollverdau mit BamHI aus einer vorangegangenen PCR mit nicht optimierten Parametern. Deutlich sind die Banden bei ~750Bp und ~500Bp (bestehend aus dem TRE-CMV- und dem SV40-PolyA-Fragment) zu erkennen. Rechts daneben die unverdaute PCR mit zahlreichen Nebenprodukten..

2. Ergebnisse

2.2. Selektion weiterer Promotoren und potentieller Therapiogene

Parallel zur Konstruktion der Transfervektoren wurde eine Suche nach weiteren Promotoren und Genprodukten eingeleitet, die für weiterführende Studien verwendung finden könnten. Dazu mussten einerseits Sequenzen geeigneter mRNAs (Expressed Sequence Tags = ESTs) gefunden werden, die das Reportergen im TRE-Vektor ersetzen könnten, andererseits sollte für eine mögliche Isolierung von Promotoren mittels geeigneter EST-Klone die genomische DNA durch Screening ermittelt und verifiziert werden können. Die Suche wurde auf Angiopoietin 2 und den Tissue-Factor (TF) eingeschränkt. Sei schien geeignet, das Reportergen EGFP bei weiterführenden Studien zur Inhibierung der Angiogenese zu ersetzen: Während Angiopoietin 2 als Inhibitor des proangiogenen Angiopoietin 1 eingesetzt werden könnte, wäre mittels der Expression des TF innerhalb der Tumormasse ein Verschluss der Adern durch Koagulation in den versorgenden Kapillaren möglich. Beides hätte die Unterbindung der Versorgung des Tumors zur Folge. Von Angiopoietin 2 und TF ist zusätzlich bekannt, dass ihre Promotoren durch die VEGF-induzierte Reizleitungskaskade aktiviert werden, was sie zu möglichen Alternativen zu den Promotoren von Flk-1 und Flt-1 macht. Deshalb erstreckte sich die Suche nach verwendbaren Sequenzen auch auf die genomischen Klone, welche die entsprechenden Promotoren enthalten. Die Sequenzen der Gene wurden aus den zugehörigen Publikationen und mit dem webgestützten SRS-5-Programm ermittelt, wobei oft nur die cDNA-Sequenzen zur Verfügung standen. Sie wurden mit einer blast-Suche auf dem NCBI-Server gegen verschiedene Datenbanken auf ähnliche Sequenzen untersucht, wobei einerseits ESTs andererseits auch genomische PAC- oder BAC-Klone aus humanen Gen-Bibliotheken gefunden werden sollten.

2.2.1. Datenbanksuche nach cDNA und genomischer DNA des Tissue Factor (F3)

Die genomische Sequenz des TF war auf der NCBI-Datenbank zu finden. Mittels einer blast-Suche, wurden ähnliche Sequenzen gesucht, um einerseits die für die Hybridisierung während des Screeningvorganges benötigten cDNA-Klone und andererseits einen Hinweis auf einen geeigneten PAC- oder BAC-Klon zu erhalten. Die in den cDNA-Sequenzen enthaltene zytogenetische Lokalisationsbeschreibung (1p22 – p21) wurde dazu genutzt, den entsprechenden Contig zu ermitteln und daraus Klone für ein PCR-Screening zu bestellen. Auf der Homepage des NCBI konnte bei den Human-Genome-Ressources das Chromosom 1 grafisch dargestellt werden. Im gesuchten Areal wurde eine EST-Mappe aufgerufen und die verschiedenen Namen der Sequence Tags (STS), die als Marker genutzt werden konnten, als Liste angezeigt. Zunächst musste mit der Textsuche das Gen gefunden werden, nachdem gesucht werden sollte (F3). Dann wurden die Namen der ESTs, die sich in mittelbarer oder unmittelbarer Nähe des Gens befanden, ermittelt. Danach wurde zur Datenbank-Ressource jener Organisation gewechselt, die sich mit der Sequenzierung des Chromosoms Nr. 1 beschäftigt. Hier wurden in einem Suchsystem die Namen der ESTs eingegeben, worauf die zugehörigen Contigs und ihre PAC- oder BAC-Klone angezeigt wurden. Es wurde versucht jene Contigs zu ermitteln, die eine Region des Chromosoms abdeckten, die mit großer Wahrscheinlichkeit das gesuchte Gen enthielt. Es konnten Sequenzen von cDNA-Klonen ermittelt werden, die durch ihre Accession-No. von EMBL-NEW und GENBANK bei der Firma INCYTE aus der Bank No. CDNA-1401.1 ermittelt wurden.

Klon	Vector	Insertlänge in Bp	Restriktionsenzyme
AI085165	pT7T3D (2,9kB)	1891	NotI, EcoRI
R21396	Lafmid BA (3,2kB)	1816	NotI, HindIII

Tabelle 2.2.1.1.: Beschreibung der EST-Klone des TF

Gleich nach Zustellung der Klone wurden diese auf einzelne LB-Platten mit 50µg/ml Ampizillin ausgestrichen. Aus den angewachsenen Kolonien wurden Minipräparation wie unter Punkt 4.3.3. im Methodikteil beschrieben durchgeführt und Stocksuspension wie unter Punkt 4.3.2.1. hergestellt.

2.2.1.1. Analyse vorhandener TF-PAC-Klone

Genomische PAC-Klone, die bei vorangegangenen Hybridisierungsanalysen positiv auf den TF angesprochen hatten, sollten für weitere Analysen herangezogen werden. Da sie nicht mehr lebensfähig waren, wurden sie für eine PCR mit den unter 2.2.1.2. beschriebenen Primern vorbereitet.

2.2.1.1.1. ERSTELLUNG VON SPEZIFISCHEN PRIMERN FÜR DEN TF-PROMOTOR

Aus der in der EMBL-Genbank enthaltenen Sequenz mit der Acc.-Nr. J02846 wurde die Promoterregion unter Beziehung der Publikation [3] ausgeschnitten, identifiziert und die dafür geeigneten Oligos für eine PCR erzeugt. Die Oligos der Promoterregion sollten möglichst weit upstream vom Transkriptionsstart liegen, da erfahrungsgemäß die downstream generierten Oligos keine Ergebnisse lieferten.

2. Ergebnisse

```

-799 gaattctccc agaggcaaac tgccagatgt gaggctgctc ttcctcagtc actatctctg
-739 gtcgtaccgg gcgatgcctg agccaactga ccctcagacc tgtgagccga gccggtcaca
-679 ccgtggctga caccggcatt cccaccgect ttctcctgtg cgacccgeta agggccccgc
-619 gaggtgggca ggccaagtat tcttgacct cgtagggtag aagaagccac cgtaggtggg Primer 1
-559 agagggccct gtcacagcc acacgtttac ttcgctgcag gtcccagct tctgccccag PCR-Produkt
-499 gtgggcaaag catccgggaa atgcctccg ctgcccagg ggagcccaga gcccggtgctt
-439 tctattaaat gttgtaaag cgcctctcc cactttatca caaaatggaa gggaagaatt anti Primer 2
-379 cttccaaggc gccctccctt tcttgccata gacctgcaac ccacctaacg tgcacgtcgg
-319 agtcgcgggc ctgggtgaat ccgggggect tgggggacc gggcaactag acccgctctc
-259 gtctccagc gcagctccgc gctcggtagc ggggtTGAAT cactggggtg agtcatcct AP1
-199 tgcaggtcc CGGAGTTTC taccgggag aggggggca ggggtgtgga ctgccggg NFkB
-139 gccgccacc gcgacggcaa gtgaccggg ccgggggcg ggagtcggga ggagcggcg
- 79 gggcgggcgc cgggggcggg cagagggcg ggagagcgc ccgccggccc TTTATAgcgc TATA
- 19 gcggggcacc ggctccccA gactgcgag tccccgacc ccctgcact ccctctggc Transkript
+ 42 ggcccaggc gccttcagc caacctccc agccccacg gcgccacgga acccgctcga
+102 tctcgccgcc aactggtaga cATG Translation

```

Abb. 2.2.1.1.1.: Ausschnitt aus der Sequenz des TF, EMBL-Genbank Acc.-Nr. J02846. Angemerkt sind die erste AP1-Bindungsstelle, die Bindungsstelle für NFκB und die TATA-Box. Das Nukleotid des Transkriptionsstarts, A, wird mit 1 beziffert. Die hier dargestellte Promoter-Sequenz reicht somit vom Nukleotid -799 bis +125

Um sicherzugehen, dass die entstehenden PCR-Produkte wirklich ein genomisches Fragment der Promotorregion des TF enthalten, wurden die Oligos innerhalb der Promoter- und der gleich anschließenden Downstream-Region gesucht. Die vom Programm **MacVector 6.5** ermittelten Oligos besitzen folgende Eigenschaften:

- Oligo A : -604 5'-AGTATTCTTGACCTTCGTGGGGTAG-3' -579
Oligoname : TF PROM 196-220 HDM
- Oligo B : - 474 5'-TTTGGTGATAAAGTGGGAGAGGC-3' -452
Oligoname : TF PROM 405-383 HDM
Zu erwartende Länge des PCR-Produktes: 210Bp
Optimale Annealingtemperatur des Primerpaares: MacVector: 58,1°C; rechnerisch: 64°C
- Oligo C : +371 5'-GCTTGAATGAACCGAGTCCGTC-3' +392
Oligoname : TF ING 1170-1191 HDM
- Oligo D : +621 5'-CAGCCCTTTTGGATTGCCTC-3' +601
Oligoname : TF ING 1520-1521 HDM
Zu erwartende Länge des PCR-Produktes: 351Bp
Optimale Annealingtemperatur des Primerpaares: MacVector: 57,9°C; rechnerisch: 60°C

2.2.1.2. PCR und Sequenzierung der mutmaßlich positiven PAC-Klone

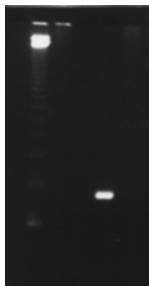


Abb. 2.2.1.2.1.: Gelelektrophorese der PCRs. Eine Positive Amplifikation ist bei ca. 200Bp auf Bahn 4 vom Klon C031075Q2 erkennbar. Die Amplifikation wurde ausgeschnitten, extrahiert und für eine Sequenzierung vorbereitet. Von links nach rechts: 123-Marker (10µl), PCR-Ansätze.

Die PCR wurde den Anweisungen unter **4.4.1.** entsprechend durchgeführt. Die Template-DNA wurde durch Einstechen einer Okuliernadel in den Topagar der abgestorbenen PAC-Klone in die Ansätze eingebracht (siehe auch **2.2.1.1**). Diese wurden mit Proben aus den bereits vorhandenen PAC-Kolonien versetzt. Der Ansatz des Klons C031075Q2 zeigte als einziger die erwartete Bande mit 200Bp Länge, welche für eine Sequenzierung aufgereinigt wurde. Dazu wurden die Reaktionsansätze vollständig auf ein 3%iges Agarosegel aufgetragen. Die Durchführung

erfolgte nach Punkt **4.4.1.** Der Ansatz 3 (C031075Q2) wies danach mit dem Primerpaar A + B ein positives Ergebnis, denn die Amplifikation eines ca. 200Bp langen Fragmentes war als kontaminationsfreie Bande sichtbar. Die Extraktion der enthaltenen DNA wurde wie unter Punkt **4.1.7.** durchgeführt. Um sicherzugehen, dass der Klon C031075Q2 die gesuchte DNA enthielt, wurde das amplifizierte DNA-Fragment wie unter Punkt **4.4.2.** mit den Oligos A + B sequenziert. Es konnte über Computer-gestützte Analyse die generierte Sequenz eindeutig dem Tissue Factor zugeordnet werden, wie die **Abb. 2.2.1.2.II.** darstellt.

2. Ergebnisse

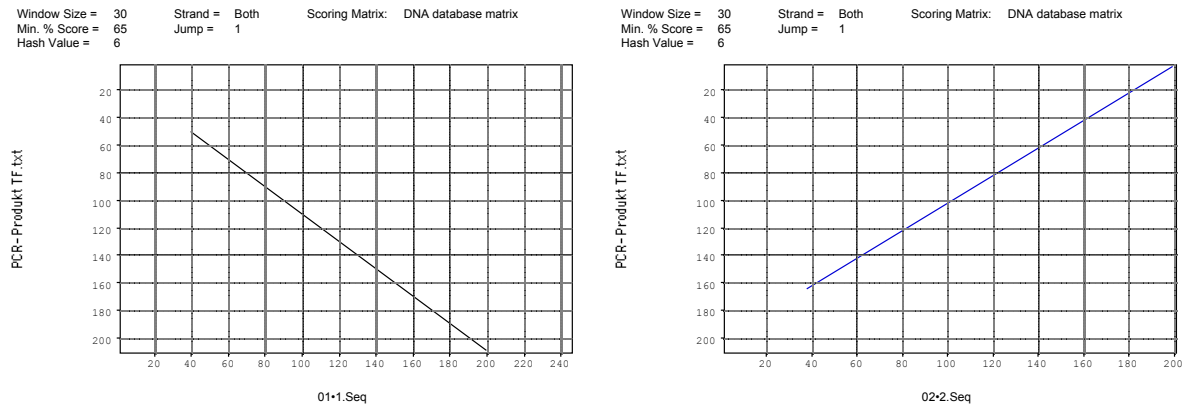


Abb. 2.2.1.2.II.: Dotplots, erstellt mit dem MacVector 6.5 Befehl *PustellDNA-Matrix*: Die Sequenz des TF-Promotor aus J02846 wurde mit den Sequenzen des PCR-Fragmentes verglichen. **Links:** J02846 verglichen mit der durch den Vorwärtsprimer A ermittelten Sequenz. **Rechts:** J02846 verglichen mit jener Sequenz, die mittels des Rückwärtsprimers B erhalten wurde. Die Übereinstimmung deutet in beiden Fällen darauf hin, dass der genomische Klon C031075Q2 tatsächlich den TF enthält.

2.2.1.3.1. VERIFIZIERUNG DES TF-PROMOTERS IM GENOMISCHEN PAC-KLON

Aufgrund der in der oben beschriebenen Datenbanksuche konnte der PAC-Klon vom Ressourcenzentrum des Max-Planck-Institutes bestellt werden:

PAC-Bank RPCI1,3-5 (human, masc., anonym), Klon-Nummer RPCIP704C031075.

Nach Lieferung des im Topagars angewachsenen Klons wurde das enthaltene Plasmid wie unter **4.3.5.** mit besonderer Berücksichtigung von **4.3.6.** in einer Midipräp isoliert. Die Sequenzierung der PAC-Klon-DNA wurde wie unter **4.4.2.** beschrieben durchgeführt. Sowohl die Sequenz der Hin- wie auch jene der Rückreaktion konnte dem TF-Promoter eindeutig zugeordnet werden. Der bestellte PAC-Klon RPCIP704C031075 galt somit als positiv für den TF-Promoter identifiziert.

2.2.2. Datenbanksuche nach Angiotensin II

Für Ang2 (Angpt-2) wurden zugehörige cDNA-Sequenzen, beschrieben durch ihre Genbank und EMBL-NEW Accession Number, für die Hybridisierungen mit genomischen Sequenzen herangezogen. Die in E.coli befindlichen cDNA-Klone wurden bei der Firma INCYTE aus der Klonbank No. CDNA-1401.1 bestellt:

Klon	Vector	Insertlänge in Bp	Restriktionsenzyme
AI491766	pCMV-SPORT6 (4,4kB)	2269	Sal-I, NotI
AI972163	pCMV-SPORT6 (4,4kB)	ca. 2200	Sal-I, NotI

Tabelle 2.2.2.1.: Beschreibung der EST-Klone von Ang-2

Gleich nach Zustellung der Klone wurden mit diesen Minipräparationen wie unter **4.3.3.** durchgeführt. Außerdem wurden wie üblich Stockkulturen in Glycerin (**4.3.2.1.**) hergestellt.

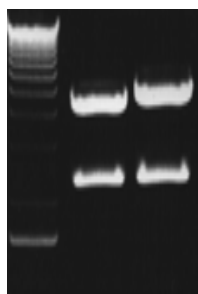


Abb. 2.2.2.1.: Von links nach rechts: 1kB-Ladder, AI491766, AI972163 mit Not-I u. Sal-I verdaut).

Durch Restriktionsendonukleaseverdau nach **4.1.2.** wurden die im Vektor enthaltenen Inserts (siehe **Tab. 2.2.2.1.**) positiv auf einem 1%igen Agarosegel identifiziert: AI491766-Klone ergaben Banden bei ~4,3kB (Plasmidanteil) und ~2,3kB (Insert), AI972163-Klone ergaben Banden bei ~4,3kB (Plasmidanteil) und ~2,2kB (Insert). Angesichts der Größe chromosomaler DNA ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, dass vereinzelte genomische Klone das gesuchte Gen enthalten, auch wenn diese zusammen mehrere 100 kBP umfassen. Es sollten daher in weiterer Folge alle dem Chromosom 8 oder wenigstens dessen p-Arm zugeordneten Klone gescreent werden.

2.2.2.1. Sequenzierung der ESTs von Angiotensin II

Um die geordneten Klone AI491766 und AI972163 anhand ihrer Sequenz zu verifizieren wurden mit dem Programm MacVector 6.5 Oligoprimer ermittelt. Die Primer liegen in einem Bereich, der beiden Sequenzen gemeinsam ist. Die Größe des entstehenden PCR-Produkts sollte unter 200Bp betragen, um auch genomische Klone mit eventuell zahlreichen Introns zu identifizieren zu können.

2. Ergebnisse

```
(11) 1 tttttttttt gggatag*ga tgg*gaattc aggacatatg ggtatttaca cagtgtataa
61 acagtgctca gaagaatgca gttccaagat ga*ctgtatt gtataacata agtgttctgt
121 tttccagtta tttactgata aacttgacaca taacattctt ggttgtgaca gcagcgtctg
181 taaactgtca gtctgattct cagcctcggg xttcatcttt gcataggtgt tctgtctaat
241 cacaattatg gatgtttagg gtcttggcttt ggtccggttaa gtgatgcaag ttttaagtgat
(310) 301 aaagtttaca ggctctaate tggagcatgt ggggcccgctc agcaccgagc acacgccct
```

Abb. 2.2.2.1.1.: Gemeinsamer Abschnitt der Sequenzen aus Genbank / EMBLnew **AI491766 (11-368)** und AI972163 (1-359). Vorwärts-Primer und Anti-Rückwärts-Primer sind *kursiv* gekennzeichnet, das entstehende **PCR-Produkt** ist **fett** ausgeführt. Die Sequenz **AI491766** enthält bei * ein **g**, AI972163 ein **t**. Bei **x** enthält die Sequenz AI972163 ein **zusätzliches g**.

Das ermittelte Primerpaar weist folgende Eigenschaften auf:

Vorwärts-Oligo : **(169)** 159 5'-TTGGTTGTGACAGCAGCGTC-3' 178 **(188)**

Oligoname : ANG2 159-189 HDM

Rückwärts-Oligo : **(280)** 271 5'-CAAAGCAAGACCCTAAACATCC-3' 250 **(259)**

Oligoname : ANG2 271-250 HDM

Zu erwartende Länge des PCR-Produktes: 112Bp

Optimale Annealingtemperatur des Primerpaares: MacVector: 51,1°C, nach MWG: 55°C

Die Sequenzierung wurde wie unter **4.4.2.** beschrieben durchgeführt. Die generierten Sequenzen waren ermöglichten die eindeutigen Zuordnung der Klone AI491766-1,2 und AI972136-1 zu Angiopoietin-2. Mittels einer unter MacVector 6.5 entwickelten Dot-Plot-Matrix konnten die Sequenzen als homolog zur Referenzsequenz AI491766 gewertet werden. Auch eine blast-Suche gegen die EMBL-Datenbanken mit den ermittelten Sequenzen unterstützte dieses Ergebnis zufriedenstellend. Deshalb sollten die verifizierten ESTs für Hybridisierungen an einer genomischen PAC-Klon-Bibliothek zur Detektierung der genomischen Sequenz von Angiopoietin-2 herangezogen werden.

2.2.2.2. Hybridisierung von PAC-Klon-Filtern

Zur Vorbereitung der Hybridisierung der genomischen Klon-Bibliothek wurden die Inserts von Ang2 in einem Verdauansatz mit den Enzymen Sal-I und NotI aus ihren Plasmiden freigesetzt und extrahiert (**4.1.7.**). Sechs PAC-Klon-Filter der Library RCPI 1,3-5 des Ressourcenzentrums wurden mit dem Ang2-cDNA-Fragment aus AI491766 des Klons 1 hybridisiert. Dazu wurde das 2,2kB lange Fragment wie unter **4.7.1.** markiert. Die Hybridisierung der Filter wurde wie unter **4.7.2.** durchgeführt. Der Filter Nummer 5 zeigte nach 4h Entwicklung ein sehr starkes Signal, der Filter 2 nach 24h, so dass dadurch die Koordinaten der Signale eindeutig ermittelt werden konnten. Mittels der Koordinaten konnten die Ang-2-positiven PAC-Klone vom Ressourcenzentrum des Max-Planck-Institutes bestellt werden.

- Filter 2 (204.11.149): 2 Signale bei:
 1. $x_a=1, y_a=33$
 $x_b=3, y_b=35$
Klon: RPCIP704J24124Q2
 2. $x_a=151, y_a=223$
 $x_b=153, y_b=225$
Klon: RPCIP704D18123Q2A
- Filter 5 (104.24.244) 1 Signal bei:
 $x_a=12, y_a=52$
 $x_b=15, y_b=53$
Klon: RPCIP704F22346Q2A

2.2.2.3. Überprüfung der gelieferten PAC-Klone

Nach Lieferung der im Topagar angewachsenen Klone wurde jeweils ein Glycerin-Stock angelegt und die Plasmide wie unter **4.3.5.** unter besonderer Berücksichtigung von **4.3.6.** mittels einer Midipräparation isoliert. Danach wurde die PAC-DNA einer Kontroll-PCR unterzogen (**4.4.1.**). Dabei konnten bei allen Proben ein Fragment von ca. 200Bp amplifiziert werden, was mit entsprechend großer Sicherheit als positives Merkmal für einen Ang2-positiven Klon betrachtet wurde. Die genomische DNA aus der Midipräparation der PAC-Klone wurde anschließend unter Berücksichtigung der Anmerkungen zur Verarbeitung von PAC-Klon-DNA für eine Sequenzierung vorbereitet (**4.4.2.**). Alle gelieferten Klone sind zumindest durch eine PCR bestätigt worden. Aufgrund der Ergebnisse aus der PCR und aus der Sequenzierung sind die PAC-Klone D18123Q2A und J24124Q2A zu 100% positiv für Angiopoietin 2.

2. Ergebnisse

2.3. Herstellung rekombinanter Adv

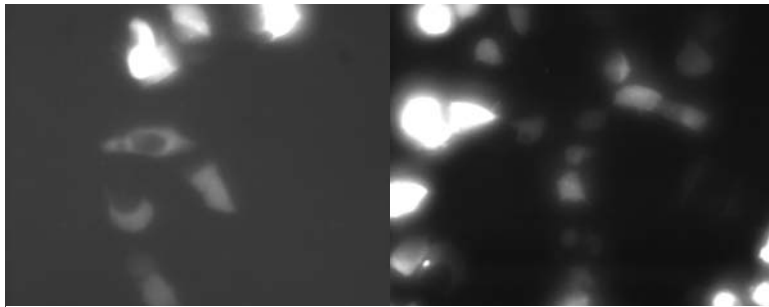


Abb. 2.3.1.: Transfektionsstudien mit den Transfervektorkonstrukten. **Links:** Flk-1-Konstrukt + EGFP-Reporter zeigt beinahe gleich starke Fluoreszenz wie **links** das Reportergerkonstrukt in Koftransfektion mit dem CMV-tTA-Kontrollvektor.

Die Rekombinierung der Transfervektoren (p Δ E1) mit dem im Plasmid pJM17⁵ enthaltenen Adv-Genom überträgt die Expressionskassette in einen hocheffizienten Vektor. Dieser ist nur in der humanen Helferzelllinie 293 fähig zu replizieren und Viruspartikel zu bilden. pJM17 allein ist ohne das Rekombinationsereignis nicht in der Lage in der 293-Helferzelllinie effizient zu replizieren. Die gebildeten Viruspartikel können viele Arten humaner Kulturzellen effizient infizieren und das vorhandene

Genmaterial in ausreichender Menge in die Zellen einführen. Bevor die Transfervektoren aus 2.1.1.5., 2.1.2.4. und 2.1.3.1. für die Virenproduktion eingesetzt wurden, mussten sie auf ihre Funktion hin überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden sie über eine Liposomentransfektion in 293-Zellen eingebracht (4.5.10.1.): 24h nach Transfektion konnte bei CMV-tTA + TRE-EGFP, sowie Flk-1-tTA-Enhancer + TRE-EGFP schon starke Fluoreszenz beobachtet werden. 48h nach Infektion bildete sich bei Flt-1-tTA + TRE-EGFP bzw. bei der TRE-EGFP-Kontrolle eine Hintergrundfluoreszenz aus, die optisch etwa 10% jener von CMV-tTA + TRE-EGFP entspricht. Die mit 1 μ g Dox / ml Medium versetzten Kontrolltransfektionen zeigten nach 2 Tagen nur Hintergrundfluoreszenz an, was die Regulierbarkeit des tTA-Elementes verdeutlicht. Ähnliche Transfektionsversuche mit HUVECs führten zu keinem Ergebnis, was den Schluss zulässt, dass in Endothelzellen eine größere Kopienzahl der einzelnen Konstrukte eingeführt werden muss, um sie wirksam werden zu lassen. Dies ist jedoch nur über Infektion mit Adenoviren möglich.

2.3.1. Kontrolle der präparierten Viren durch PCR ihrer Extrakte

Für eine Überprüfung des Inserts im fertiggestellten Adenovirus schien die Durchführung einer PCR am einfachsten realisierbar zu sein. Leider war es unmöglich eine PCR direkt mit unbehandelter Adenovirenpräparation durchzuführen. Das Kapsid schien auch bei langen Denaturierungsschritten die DNS vor der Polymerase abzuschirmen. Aus diesem Grund musste die im Virus enthaltene DNS durch eine Phenolextraktion von Proteinen gereinigt werden. Die Problematik bestand darin, dass eine ausreichende Freisetzung der viralen DNA erst ab der Maxipräparation durchgeführt werden konnte. Die Entscheidung, ob ein Virus über PCR positiv oder negativ zu bewerten war, stellte sich daher erst am Ende der Präparationen heraus. Zu diesem Zweck wurden unter Einhaltung aller Sicherheitsregeln 20 μ l einer Virusmaxipräparation mit 80 μ l TE aufgefüllt und wie unter 4.1.5. beschrieben extrahiert. Die Menge an extrahierter DNA war sehr klein und diente als Ausgangsmaterial für eine PCR (4.4.1. für einen 50 μ l Ansatz mit dem Biotherm-PCR-Kit). Siehe dazu auch 2.3.2.1., 2.3.3.1., 2.3.5.1. und 2.1.5.

2.3.2. Produktion von Adv-Flt-1-Promoter(1,4kb)-tTA(nls)

Die Bildung der Viruspartikel erfolgte über die Rekombination des Transfervektors p Δ E1sp1B-Flt-1-Promoter(1,4kb)-tTA(nls)-PolyA-O2 mit dem das restliche Virusgenom enthaltende pJM17. Die mit MEM α -Medium versorgten 293-Zellen sind in der Lage, eine große Anzahl Virionen freizusetzen. Diese müssen zur Bildung der Primärviren zunächst mit dem Transfervektor und dem Rekombinationsvektor nach der CaPO₃-Methode von Stratagene transfektiert werden (4.8.2.2.). Die Zellen, die mit mehr als insgesamt 2 μ g DNA transfektiert worden sind, erschienen einen Tag nach dem Mediumwechsel stark geschädigt, erholten sich jedoch soweit, dass am 5. Tag nach der Transfektion die Zellen resuspendiert und im Verhältnis 1:3 bzw. 2:3 umgesetzt werden mussten. Die ersten Plaques der Primärviren erschienen erst nach insgesamt 11 Tagen, so dass am Tag 12 nach der Transfektion die Zellen geerntet werden konnten. Die Zellen aus den Wells mit den deutlichsten Plaques wurden im Medium resuspendiert und in 2ml MCT überführt und wie unter 4.8.2.3. weiter verarbeitet. Das Lysat wurde zur Vereinzellung der Viren in 96-Well-Platten eingesetzt (4.8.3.1.). Einer der Singleclones wurde danach im 6-Well vermehrt, bevor das Lysat zur Infektion von 293-Zellen in einer Kulturflasche (4.8.4.) genutzt wurde. Am 4. Tag konnten die Zellen geerntet werden. 1ml des Flaschenlysates wurde zur Infektion von 293-Zellen für eine Maxipräparation des Virus herangezogen. Vier Tage nach der Infektion konnten die Zellen suspendiert und durch Freeze-Thawing lysiert werden. Die Viren wurden

⁵ pJM17 erlaubt die Klonierung von bis zu 5,2kb Insert in den Transfervektor p Δ E1.

2. Ergebnisse

durch Ultrazentrifugation im CsCl-Gradienten von Zellresten befreit, danach musste die Präparation (~1ml) vor seinem Einsatz durch Dialyse (4.8.6.) von störenden Salzen gereinigt werden. Die Titerbestimmung (4.8.7.) wies das Präparat mit 10^{11} PFU/ μ l aus.

2.3.2.1. PCR des Extraktes aus Adv-Flt-1-Promoter-tTA-PolyA

Wie aus vorigen Versuchen ersichtlich, waren PCRs mit diesem Konstrukt relativ schwierig durchzuführen (2.1.5.1.). Da der Promoter durch Verdaureaktionen, PCR und Sequenzierung schon mit großer Sicherheit im Transfervektor bestimmt worden war, sollte hier gezeigt werden, dass der Virus das gleiche Insert enthält, wie der Transfervektor. Dazu musste zumindest eine PCR sowohl im Virus-DNA-Extrakt als auch im Transfervektor ein korrektes Produkt liefern. Drei Reaktionen wurden mit verschiedenen Kombinationen der Oligoprimer 1 - 4 aus 2.1.5. angesetzt. Der Transfervektor wurde parallel als Positivkontrolle verarbeitet. Die Reaktionen 5 + 6 zeigten identische Produkte, was bewies, dass der Virus das Insert aus dem Transfervektor enthalten musste. Die positiven PCRs wurden zusätzlich mit BamHI verdaut. Die korrekten Produkte zerfielen in einen ~200Bp tTA-Rest und in das ~500Bp PolyA-Fragment.

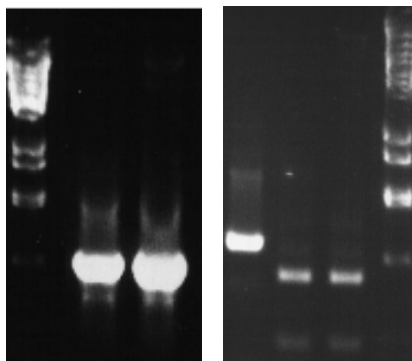


Abb. 2.3.2.1.I.: Links: PCRs mit den DNA-Extrakten aus Adv-Flt-1 und dem Transfervektor als Positivkontrolle. Nur die Reaktionen mit Oligo 2 + 3 zeigen ein korrektes Produkt von ~700Bp. **Rechts:** BamHI-Verdau der positiven PCRs. Gegenüber der Unverdauten reaktion sind die 500Bp- und 200Bp-Fragmente (PolyA und Endregion des tTA) deutlich zu erkennen. Die PCR aus dem phenolextrahierten Viruspräparat und jene aus dem Transfervektor sind identisch.

2.3.3. Produktion von Adv-Flk-1-Promoter-tTA(nls)-Enhancer

Im wesentlichen erfolgte die Bildung der Primärviren wie unter 2.3.2. dargestellt. Dazu wurden 293-Zellen aufgetaut und für eine rasche Aufzucht direkt in 16 Kulturflaschen (175cm² Grundfläche) mit NCS-enthaltendem MEM α -Medium herangezogen. Die dichtgewachsenen Zellen wurden nach vier Tagen auf 40 Petrischalen ausgesät. Die abgesetzten Zellen wurden mit 700 μ l Flaschenlysat in 20ml Medium infiziert (500 μ l / Petrischale). Wiederum vier Tage später konnten die Zellen geerntet und lysiert werden. Die Lysate wurden durch Ultrazentrifugation im CsCl-Gradienten gereinigt und das abgesaugte Viruspräparat (1,5ml) dialysiert (4.8.f.). Sein Titer war mit ca. 10^8 PFU/ μ l für die Durchführung aussagekräftiger Experimente ungeeignet. Auch die wie unter 2.1.5.1. PCR zeigte nur beim Transfervektor positive Ergebnisse, so dass eine fehlerhafte Rekombination der Kassette in die virale DNA als wahrscheinlich angesehen werden musste. Eine PCR war mit dem DNA-Extrakt des Präparates nicht möglich.

2.3.4. Vermehrung des Kontrollvirus Adv-CMV-tTA

Ein von Dr. H. Holzmüller zur Verügung gestelltes Viruspräparat wurde in 293-Zellen expandiert. Dazu wurden 293-Zellen zunächst in 6-Wells infiziert. Nach 6 Tagen konnten die Zellen geerntet und die Virusextrakte erstellt werden. 200 μ l eines Lysates aus einem der 6-Wells wurde zur Infektion einer Kulturflasche mit 175cm² Grundfläche in dessen Medium eingebracht. Nach drei Tagen waren zahlreiche Plaques zu beobachten, so dass am vierten Tag nach der Infektion die Zellen geerntet werden konnten, um das Lysat zu erstellen (4.8.4.). 1ml dieses Lysates wurde in 20ml Medium verdünnt, welches zu 0,5ml auf 293-Zellen in 40 Petrischalen mit 15cm Durchmesser appliziert wurde. Nach vier Tagen konnten die Zellen geerntet werden. Das daraus generierte Lysat wurde vor Gebrauch durch zweimaliges zentrifugieren im CsCl-Gradienten verdichtet, aufgereinigt (4.8.5.) und dialysiert (4.8.6.). Der Titer des Präparates wurde wie unter 4.8.7. mit 10^{11} PFU/ μ l bestimmt.

2.3.5. Produktion des Reporters Adv-TRE-CMVmini-EGFP-SV40-PolyA

Im wesentlichen folgte die Bildung der Primärviren der unter 2.3.2. dargestellten Vorgangsweise. Nach sieben Tagen waren lytische Plaques deutlich sichtbar, so dass die Zellen geerntet werden konnten. Daraus wurde ein Lysat erstellt, welches zur Vereinzellung der Viruspartikeln genutzt wurde (4.8.3.). Ein Singleclone wurde danach im 6-Well vermehrt, bevor 100 μ l des daraus gebildeten Lysates zur Infektion von 293-Zellen in einer Kulturflasche mit 175cm² Grundfläche eingesetzt wurden (4.8.4.). Nach vier Tagen konnten die Zellen lysiert werden. Vor der Maxipräparation des Virus, sollte an den Flaschenlysaten geprüft werden, ob Adv-CMV-tTA und Adv-TRE-CMVmini-EGFP funktionell sind. Dazu wurden dem Medium der 293-Zellen im 6-Well das Viruslysat folgendermaßen zugefügt:

Well 1: Adv-TRE-EGFP, **Well 2:** Adv-CMV-tTA, **Well 3:** Adv-CMV-tTA + Adv-TRE-EGFP

2. Ergebnisse

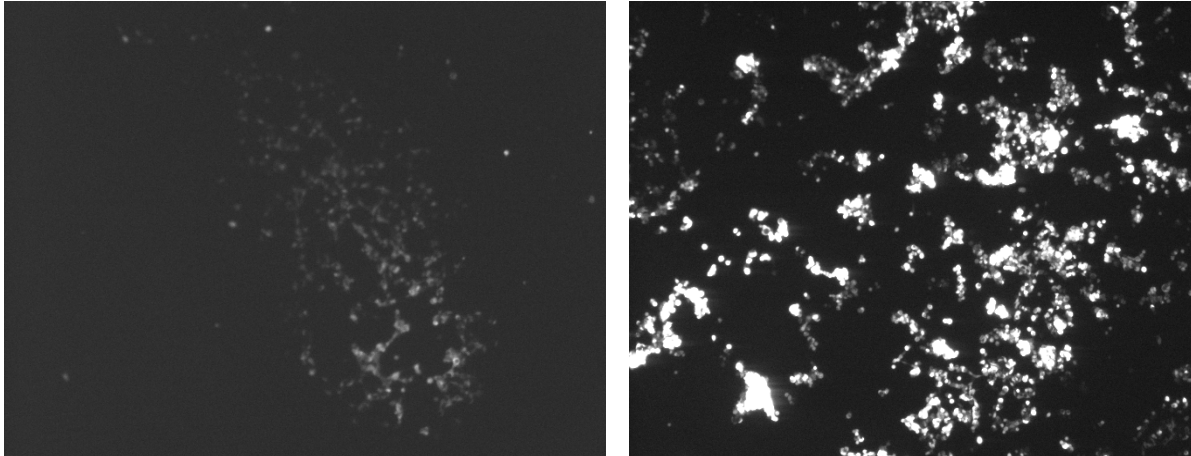


Abb. 2.3.5.I.: Infektionsstudien an 293-Zellen mit Adv-[...]-EGFP und Adv-CMV-[...]. **Links:** Infektion mit dem EGFP-Reportervirus zeigt schwache Fluoreszenz im Bereich eines lytischen Plaques. **Rechts:** Infektion mit dem Reporter- und dem Kontrollvirus zeigt deutlich höhere Fluoreszenz.

Nach einem Tag Inkubation im Brutschrank zeigten sich bei der Doppelinfektion mit dem Reportervirus und dem CMV-Kontrollvirus an den lytischen Plaques starke Fluoreszenz, bei der Einfachinfektion mit dem Reportervirus nur eine etwa 10%ige Hintergrundaktivität. Damit abgeschätzt werden konnte, wie groß der Unterschied zwischen der Hintergrundfluoreszenz und der vom Kontrollvirus gesteuerten Fluoreszenz war, wurden die infizierten Zellen unter Berücksichtigung der für Virusarbeiten benötigten

Sicherheitsmaßnahmen resuspendiert, im Kaliumhydrogenphosphat-Puffer durch Freeze-Thawing lysiert und für eine Messung im Fluoreszenzspektrometer vorbereitet (4.6.1. und 4.6.4.). Die Ergebnisse sind in der **Grafik 2.3.5.I.** zusammengefasst. Da die Funktion des EGFP-Reportervirus hinreichend bewiesen werden konnte, wurde das Flaschenlysat für eine Maxipräparation des Virus herangezogen (4.8.4.). Nach vier Tagen konnten die Zellen geerntet werden. Der Virus wurde aus dem generierten Lysat durch zweimalige Ultrazentrifugation im CsCl-Gradienten von Zellresten gereinigt und die präparierte Virusbande durch Dialyse entsalzt. Der Titer des Präparates konnte mit $\sim 10^{10}$ PFU/ μ l bestimmt werden (4.8.7.).

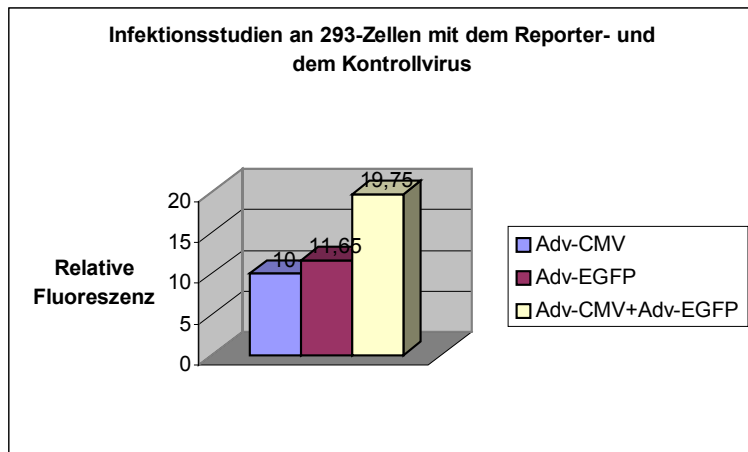


Abb. 2.3.5.II.: Das hier gezeigte Diagramm ist willkürlich auf den Wert 10 für schwächste Fluoreszenz skaliert worden. Die Werte sind nicht normiert, so dass unersichtlich ist, wie stark die Hintergrundaktivität vom Reportervirus tatsächlich von der durch den Kontrollvirus aktivierten Fluoreszenz abweicht.

2.3.5.1. PCR mit DNA-Extrakt aus Adv-CMVmini-EGFP-TRE-PolyA

Für diese Reaktion fanden die Oligos 1+2 als Hin- und Rück-Primer Verwendung. Die Reaktion war eindeutig positiv zu bewerten, zumal der Verdau von 1 μ l der PCR-Reaktion aus Virus-Extrakt mit BamHI in Puffer B das erwartete Bandenmuster zeigte (siehe auch 2.1.3. und 2.1.5.3.).

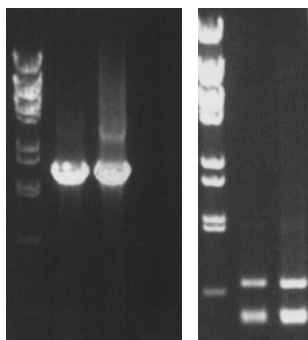


Abb. 2.3.5.1.I.: Von links: λ -BstEII-Marker, PCR aus dem Virusextrakt ($\sim 1,7$ kB), Positivkontrolle, Negativkontrolle, λ -BstEII-Marker, BamHI-Verdau mit Material aus den PCRs: Sowohl das Virusextrakt, als auch die Positivkontrolle zeigen das erwartete Bandenmuster (~ 750 kB, $\sim 500+400$ BP).

2. Ergebnisse

2.4. Evaluierung der rekombinanten Viren

Im Verlauf der hier beschriebenen Infektionsstudien sollte geklärt werden, inwieweit die Rekombinanten Viren ihre Wirkung auf Kulturzellen entfalten können. Zu den entsprechenden Studien in HUVECs wurden 293-Zellen als Kontrolle verwendet, da an diesem Zelltyp sehr leicht festgestellt werden kann, ob es zu einer Infektion kommt oder nicht. Die Versuchsreihen sollten Hinweise liefern, ob die murinen Flk-1- und Flt-1-Promoterfragmente Aktivität zeigen, und wenn ja, in welchem Zelltyp stärkere oder schwächere ermittelt werden kann. Zusätzlich sollte gezeigt werden, dass Dox die Aktivität des Tetracycline-Transaktivator-Elementes (tTA) vom TEToff-Typ deaktivieren und somit die EGFP-Fluoreszenz auf Backgroundniveau zurücksetzen kann. Schließlich wurden die Promotoren unter VEGF-Stimulation ausgetestet. Ferner wurden für diese Studien die Viren in Koinfektionen mit wechselnden Kombinationen und Mengen eingesetzt, um die Effizienz der Infektion in Endothelzellen einschätzen zu können, was für weiterführende Experimente wichtig sein wird. Die Zellen wurden aus Gründen der Ressourceneinsparung und der leichten Handhabbarkeit in 12-Well-Platten verarbeitet (siehe auch 4.5.8.). Die Rekombinanten Viren liegen in folgenden Partikeldichten vor:

- 10^{11} PFU/ μ l für Adv-Flt-1-tTA
- 10^8 PFU/ μ l für Adv-Flk-1-tTA
- 10^{11} PFU/ μ l für Adv-CMV-tTA
- 10^{10} PFU/ μ l für Adv-TRE-EGFP

2.4.1. Erste Infektionsstudie an HUVECs

Hier sollte veranschaulicht werden, dass das Reporterkonstrukt Adv-TRE-EGFP in Kombination mit einem tTA-Virus unter Kontrolle des konstitutiven Promoters hCMV in HUVECs seine Funktion entfalten kann. Außerdem wurde die Funktionalität der Promotoren von Flt-1 und Flk-1 in den tTA-Viren ermittelt. Dazu wurden PBS-Infektionen (siehe 4.8.8.) durchgeführt, wobei in der 1ml umfassenden Infektionslösung je 1 μ l der verschiedenen Viruspräparate eingesetzt wurden. Es stellte sich heraus, dass unter einer Partikeldichte von 10^{10} Adv die Expression stark abnimmt. Da die PFU-Zahl der Adv-Flk-1-Präparation bei max. 10^8 / μ l lag, konnte keine eindeutige Aussage zur Funktionalität des enthaltenen Promoters getroffen werden. Transfektionsstudien in 293-Zellen zeigten jedoch deutliche Aktivität mit dem Transfervektorkonstrukt von Flk-1-Kassette, wie unter 2.3. festgestellt werden konnte. Neben der Infektion von HUVECs wurde zu Kontrollzwecken eine Parallelinfektion von 293-Zellen durchgeführt:

12-Well-Platte	1	2	3	4
A	CMV-tTA / EGFP-TRE	Flk-1-tTA / EGFP-TRE	Flt-1-tTA / EGFP-TRE	EGFP-TRE
B	CMV / EGFP je 10^{-1} Verdünnung	Flk-1 / EGFP 10^{-1} Verdünnung	Flt-1 / EGFP je 10^{-1} Verdünnung	EGFP 10^{-1} Verdünnung
C	CMV / EGFP je 10^{-2} Verdünnung	Flk-1 / EGFP 10^{-2} Verdünnung	Flt-1 / EGFP 10^{-2} Verdünnung	EGFP 10^{-2} Verdünnung

Tabelle 2.4.1.I.: Infektionsschema einer HUVEC-Kulturplatte und einer 293-Zellkulturplatte. Die Viren wurden jeweils im Verhältnis 1:1 zueinander eingesetzt.

24 Stunden nach Infektion war unter dem UV-Mikroskop deutlich Fluoreszenz zu erkennen. Bei der Infektion der HUVECs war dies nur im Well A1 der Fall. Daher wurde in das Medium jeweils 1ng VEGF zur Stimulation zugefügt. 24h nach Stimulation blieb das Ergebnis unverändert. Die Hintergrundfluoreszenz erhöhte sich aufgrund längerer Expressionszeiten. Bei der 293-Zelleninfektion war nach 24h Lyse oder zumindest Schädigung der Zellen zu erkennen. Nachfolgend eine visuelle Schätzung der Fluoreszenz der 293-Zelleninfektion:

12-Well-Platte-293	1	2	3	4
A	Starke Fluoreszenz (10x Hintergrund), Zellen lysiert	Starke Hintergrund-Fluoreszenz, Zellen lysiert	Starke Hintergrund-Fluoreszenz, Zellen lysiert	Starke Hintergrund-Fluoreszenz, Zellen lysiert
B	Fluoreszenz, Zellen stark geschädigt	Hintergrund-Fluoreszenz, Zellen geschädigt	Hintergrund-Fluoreszenz, Zellen geschädigt	Hintergrund-Fluoreszenz, Zellen geschädigt
C	Schwache Fluoreszenz, Zellen normal	Hintergrundfluoreszenz, Zellen normal	Hintergrundfluoreszenz, Zellen normal	Keine Fluoreszenz, Zellen normal

Tabelle 2.4.1.II.: Ergebnisse der Infektion der 293-Zellkulturen

2. Ergebnisse

2.4.2. Zweite Infektionsstudie an HUVECs

Diese Studie diente dazu, mehrere Aspekte zu beleuchten:

1. Ist PBS als Infektionsmedium besser geeignet als die Applikation des Virus direkt ins Medium der Kulturzellen?
2. Die Koinfektionen werden mit Viren durchgeführt, die zum einen das tTA-Element (unter Kontrolle des hCMV-, Flk-1- oder Flt-1-Promoters), zum anderen das Reportergen exprimieren (unter Kontrolle der durch tTA angesteuerten TRE-CMVmini-Sequenz). Wie beeinflusst das Verhältnis tTA-Virus zu TRE-Virus die Expression des Reportergenes?
3. Wie hoch ist der Unterschied der tTA-gesteuerten Fluoreszenz zur Hintergrundfluoreszenz durch Einzelinfektion mit dem TRE-EGFP-Reportervirus?
4. Zeigen die vor das tTA-Element klonierten Promotoren von Flk-1 und Flt-1 in HUVECs eine messbare Aktivität?
5. Brauchen die Promotoren von Flk-1 und Flt-1 eine exogene Stimulation durch VEGF oder EGR-1 um ihre Wirkung zu entfalten?
6. Wie effizient kann Doxycyclin als Inhibitor die TEToff-Funktion des tTA-Elementes bedienen und welche Mengen werden benötigt um die Reportergenfunktion bis zu ihrer Hintergrundaktivität herunterzuregulieren?

Vorbereitung: Die Viren mussten zuerst auf eine geeignete Konzentration gebracht werden, damit die Ermittlung des Verhältnisses TRE-Virus : tTA-Virus durchgeführt werden konnte. Die Verdünnung der Viruspräparate von TRE-EGFP und CMV-tTA auf 1:100 schien praktikabel. Das Verhältnis 100:100 entspricht effektiv einer Menge von 1µl TRE- : 1µl tTA-Viruspräparation. Bei einer eingesetzten Menge von 1µl unverdünntem Flt-1-tTA-Virus zu 100µl verdünntem TRE-EGFP-Virus ist dies gleich dem Verhältnis von 100:100. Die Mengen werden entweder in 1ml PBS oder 1ml Medium pro Well zugesetzt.

Platte 1	1 PBS	2 Medium	3 Medium	4 Medium
A	100:100 CMV-tTA / EGFP-TRE	100:100 CMV-tTA / EGFP-TRE	Leervwert	100 EGFP-TRE
B	10:100 CMV / EGFP	10:100 CMV / EGFP	100:10 CMV / EGFP	10 EGFP
C	1:100 CMV / EGFP	1:100 CMV / EGFP	100:1 CMV / EGFP	1 EGFP

Tabelle 2.4.2.I.: Infektionen zum Studium der Infektionsmedien (Virus in PBS mit halbstündiger Inkubationszeit oder Virus direkt im Medium belassen) und der benötigten Verhältnisse der in den Koinfektionen eingesetzten Viruspräparate.

Platte 2	1	2	3 100ng VEGF	4 100ng VEGF
A	100:100 Flk-1-tTA / TRE-EGFP	100:100 Flt-1-tTA / TRE-EGFP	100:100 Flk-1-tTA / TRE-EGFP	100:100 Flt-1-tTA / TRE-EGFP
B	500:100 Flk-1 / EGFP	100:10 Flt-1 / EGFP	500:100 Flk-1 / EGFP	100:10 Flt-1 / EGFP
C	4000: 100 Flk-1 / EGFP	100:1 Flt-1 / EGFP	4000:100 Flk-1 / EGFP	100:1 Flt-1 / EGFP

Tabelle 2.4.2.II.: Flk-1- und Flt-1-promotergesteuerte tTA-Viren in verschiedenen Verhältnissen zum Reportervirus mit oder ohne Stimulation durch VEGF.

Platte 3	1	2	3	4
A	100:100 CMV-tTA / EGFP-TRE + 1ng Dox	10 ⁻³ ng Dox	10 ⁻⁶ ng Dox	10 ⁻⁹ ng Dox
B	10 ⁻¹ ng Dox	10 ⁻⁴ ng Dox	10 ⁻⁷ ng Dox	10 ⁻¹⁰ ng Dox
C	10 ⁻² ng Dox	10 ⁻⁵ ng Dox	10 ⁻⁸ ng Dox	10 ⁻¹¹ ng Dox

Tabelle 2.4.2.III.: Studie zur Wirkung der von Doxycyclin hervorgerufenen Inhibierung der Reportergenaktivität in verschiedenen Verdünnungsstufen.

2. Ergebnisse

Platte 4	1	2 100ng VEGF	3	4
A	100:100:100 Flk-1-tTA / TRE-EGFP / Adv-EGR-I	100:100:100 Flk-1-tTA / TRE-EGFP / Adv-EGR-I	100:100 TRE-EGFP / Adv EGR-I	Leerwert
B	500:100:100 Flk-1 / EGFP / EGR-I	500:100:100 Flk-1 / EGFP / EGR-I	100:100 EGFP / EGR-I + 100ng VEGF	Leerwert
C	100:100:100 Flt-1-tTA / EGFP / EGR-I	100:100:100 Flt-1-tTA / EGFP-TRE / EGR-I	Leerwert	Leerwert

Tabelle 2.4.2.IV.: Test der durch Flt-1- und Flk-1-promotergesteuerten tTA-Viren zusammen mit einem EGR-1-Expressionsvirus und VEGF in verschiedenen Kombinationen.

Die im 12-Well infizierten Zellen wurden anschließend einem Reporterassay (**4.6.4.**) unterzogen. Dazu wurden sie in 1ml PBS resuspendiert, pelletiert und in Kaliumhydrogenphosphatpuffer aufgenommen. Die Zellen wurden durch Frieren und Tauen lysiert und die Membranfragmente und Ribosomen durch Zentrifugieren von den Lysaten getrennt (**4.6.1.**). Die Überstände wurden in eine 96-Well-Platte übertragen und mit jeweils 80µl Puffer aufgefüllt. Die Platte wurde aufgrund der Viruskontamination mit selbstklebender Folie versiegelt und die EGFP-Aktivität im Fluoreszenzspektrometer gemessen.

Die Ergebnisse lagen als Relative-Light-Units (RLUs) vor und mussten durch einen Bradfordassay (**4.6.5.**) normiert werden. Die Ergebnisse der Aufnahmen vom UV-Mikroskop korrelieren mit den gemessenen Daten und veranschaulichen, dass die aus einer CCD-Kamera entwickelten visuellen Werte, sofern sie computergestützt umgerechnet werden können, durchaus zufriedenstellend die Ergebnisse auf eine einfachere Weise messbar machen könnten.

Zusammenfassend:

- Es konnte über die Versuche gezeigt werden, dass eine Expression des Reportergenese EGFP nur bei Infektionen mit einer MOI von mindestens 2×10^5 je Virus zu deutlichen Signalen führte. Wurde mit einer MOI über 2×10^5 infiziert, konnte die Expression im Verhältnis dazu nur noch relativ wenig gesteigert werden.
- Die tTA-Viren mussten in gleicher Partikeldichte und Menge eingesetzt werden wie der Reportervirus, da jedes andere Verhältnis die Expression von EGFP erheblich senkte. Dies legt nahe, dass bei ungleichen Verhältnissen eine Besetzung des CAR hauptsächlich mit dem Virus erfolgt, der in der Überzahl vorhanden ist.
- Die persistierende Infektion mit Adv durch direkte Zugabe der Präparationen ins Medium war der temporären Infektion in PBS weit überlegen. Das in vielen Protokollen befürchtete Abfangen des Virus durch Serumproteine erwies sich in diesem Zusammenhang als völlig haltlos.
- Die Expression konnte durch den Inhibitor Doxycyclin ab 1pg/ml deutlich gesenkt werden und erreichte nach Einsatz von 0,1ng / ml Medium das Niveau der Hintergrundfluoreszenz. Dies zeigte, dass eine Regulierung der Expression im TEToff-System durch Zugabe von Doxycyclin zwischen 1pg/ml und 0,1ng/ml möglich ist. Dies ist besonders interessant, wenn die Expression von Genen kontrolliert werden sollen, die einen starken Einfluss auf den Gesamtorganismus nehmen können (z.B. Tissue Factor).
- Die Expression des Reportergenese kann durch den Einsatz eines starken Promoters auf mindestens den 20fachen Wert der Hintergrundfluoreszenz gesteigert werden.

Siehe dazu auch **Abb. 2.4.2.I. + II.**

2. Ergebnisse

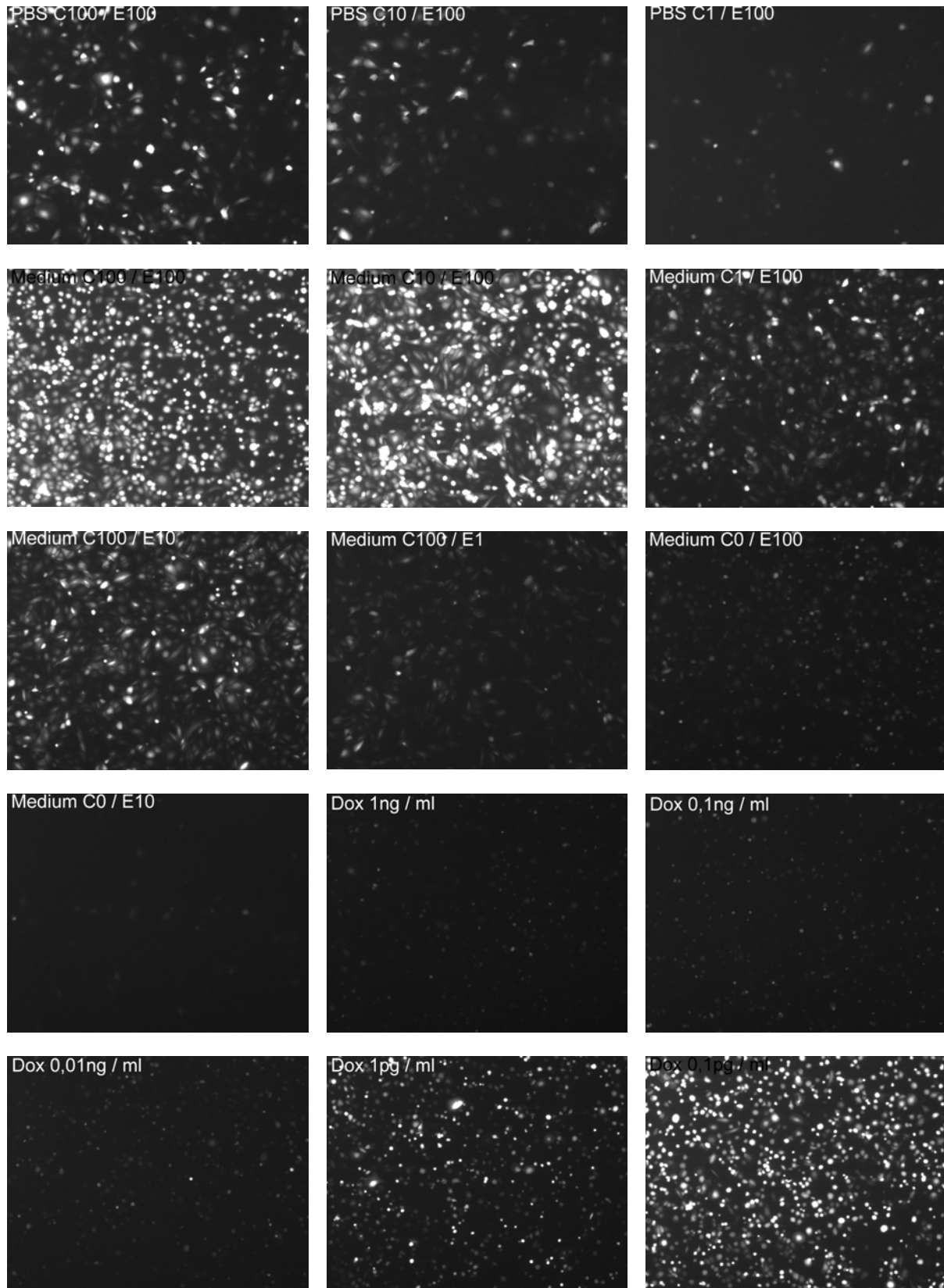


Abb. 2.4.2.1.: Bilderserie der Koinfektionen mit tTA- und TRE-Viren. **1.** Das Eintropfen von Viruspräparaten (hCMV-tTA-Kontrollvirus und TRE-EGFP-Reportervirus) ins **Medium** ist der Infektion von HUVECs in **PBS**c überlegen. Der Titer sowohl des tTA-Virus, als auch des TRE-Virus sollte jeweils bei mindestens 10^{10} PFU / ml Medium liegen. Diese Voraussetzung war z.B. bei **Medium C10 / E100** erfüllt. **2.** Doxycyclin inhibiert tTA ab 1pg/ml um 50%, ab 1ng / ml Medium ist nur noch Hintergrundaktivität messbar. **3.** Koinfektionen von TRE-EGFP und Flk-1-tTA bzw Flt-1-tTA konnten die Expression von EGFP unter keinen Testbedingungen verstärken. Die Fluoreszenz des in HUVECs exprimierten EGFP mit $\lambda=507\text{nm}$ (488nm Anregungsfrequenz) ist nicht nur ein Maß für eine erfolgreiche Koinfektion, sondern zeigt gleichzeitig die Aktivität des vor dem tTA-Element klonierten Promoters an.

2. Ergebnisse

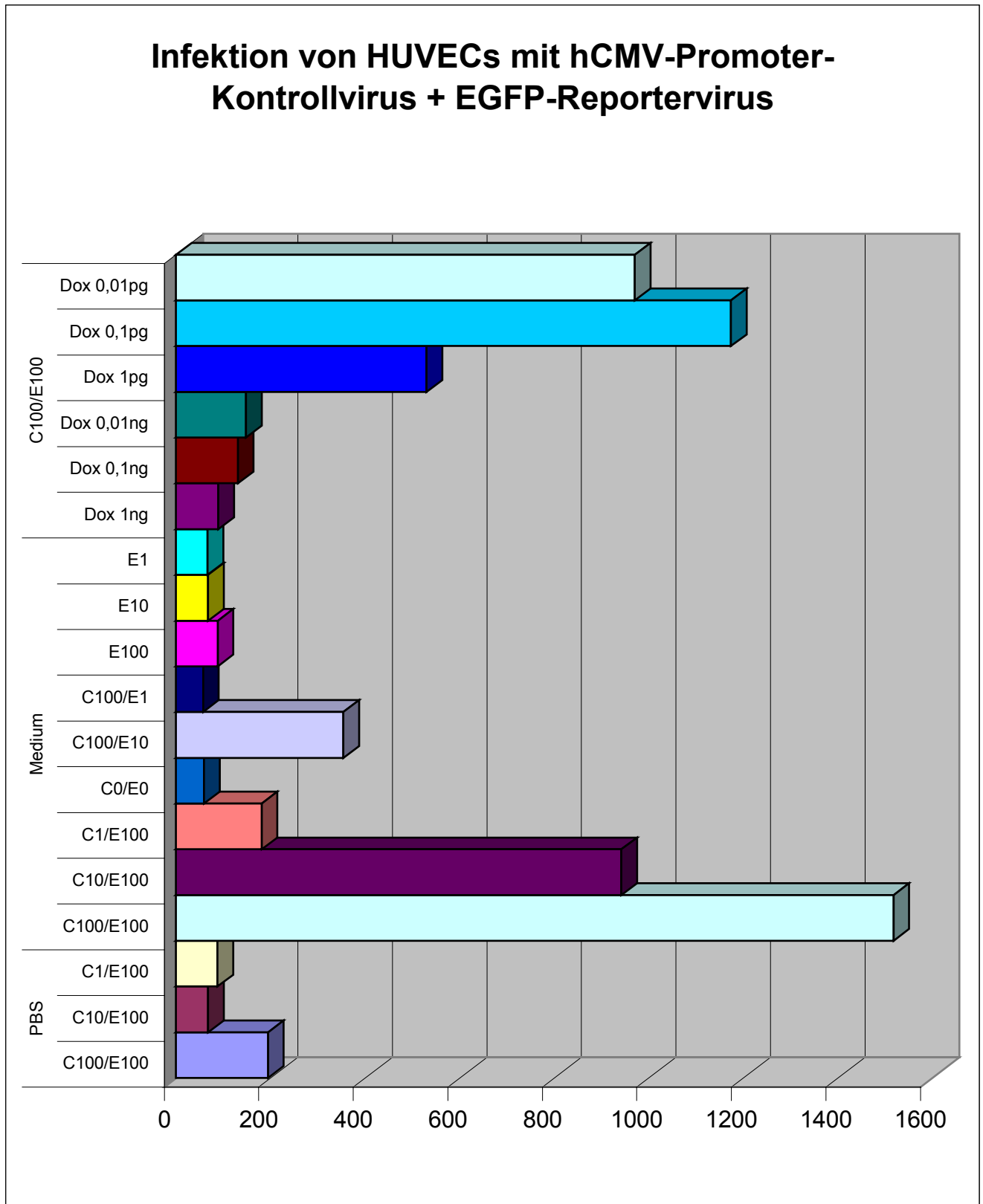


Abb. 2.4.2.II.: Werte der Fluoreszenzspektrometrie, die aus den infizierten 12-Wellen entwickelt wurden. Die RLUs wurden gegen die zugehörigen Werte aus einem Bradfordassay (Proteinkonzentration) genormt. Die Überlegenheit der persistierenden Infektion im Medium wird gegenüber der zeitlich begrenzten PBS-Methode besonders deutlich. Siehe auch **Abb. 2.4.2.I.**

3. Diskussion der Ergebnisse

3.1. Gentherapeutische Versuche mit Endothelien

Abnormale Angiogenese und unerwünschte Beeinflussung des Gefäßsystems kennzeichnet den Verlauf der meisten inflammatorischen und allergischen Prozesse, sowie maligner, invasiver Zellwachstumsprozesse: Abweichend von der Notwendigkeit der Neubildung von Adern bei Wundheilungsvorgängen werden die Signale des oxidativen oder metabolischen Gewebstress nicht in einem ausbalancierten Verhältnis abgegeben oder interpretiert, sondern die Angiogenesefaktoren werden zeitlich, örtlich und/oder mengenmäßig dereguliert abgegeben. Chronische Inflammationen zeichnen sich durch einen Anstieg an VEGF, $TNF\alpha$ und TF im Gewebe aus, was zur Hämorrhagie und Gewebläsionen sowie verstärkter Angiogenese in beschädigte Areale führt. Ähnlich verhalten sich spontane oder anhaltende Allergien, bei welchen die durch IgE gebundenen Antigene zu einer erhöhten Histaminsekreterung der aktivierten Mastzellen führt. Hypoxischer Stress bei Neugeborenen und metabolischer Stress durch Hypoglykämie bei Diabetikern sind für Supervaskulierung der Retina und der damit hervorgerufenen Erblindung der Patienten verantwortlich. Missverhältnisse von Angiogenesefaktoren in der embryonalen Vaskulogenese führt zu starken Gefäßdefekten und meist zum Abort. Gefäßbildungsdefizienzen in der Plazenta sind der Grund für Komplikationen, die mit der Unterversorgung des Fötus in Verbindung stehen. Die von Tumoren hervorgerufene, aberrante Gefäßbildung ist die Grundlage für das Wachstum und die Metastasierung von Krebszellverbänden. Es liegt also auf der Hand, dass ein regulierendes Eingreifen in krankhafte Angiogenesereaktionen mehr als wünschenswert ist. Schon seit Bekanntwerden des Einflusses der Angiogenese auf krankhafte Gewebsveränderungen [74] sind zahlreiche Versuche unternommen worden, die verantwortlichen Wachstumsfaktoren zu isolieren und besondere Missverhältnisse festzustellen. Sehr früh musste man erkennen, dass die Verabreichung hoher Dosen bestimmter Faktoren die Probleme nicht langfristig lösen konnte, da das angiogene Signalnetzwerk zu fein gesponnen ist, um Therapien zum Erfolg führen zu können, die ohne die Möglichkeit einer geregelten Verabreichung in örtlicher und zeitlicher Hinsicht eingesetzt werden [8]. Es entwickelten sich mit aufkommen gentechnischer Methoden in den 1970er Jahren bald Strategien, solche Probleme mit gentherapeutischen Methoden einer Lösung zuzuführen. Die Erfolge, die damit erzielt werden konnten sind zwar noch immer bescheiden, zeigen jedoch auf, dass hier eine richtige Orientierung eingeschlagen wurde. Die vielversprechendsten Ergebnisse konnten über die Manipulation von Endothelzellen erzielt werden. Diese wurden entweder *in vitro* manipuliert und anschließend in den Organismus refundiert [16], oder die therapeutischen Genpakete wurden direkt intramuskulär oder intravenös verabreicht. Mehrere Methoden sind dabei zum Einsatz gekommen, wobei mittels Liposomen oder ligandengekoppelte Polylysinkonjugate gute Erfolge verbucht werden konnten, jedoch ist die Zytotoxizität relativ hoch und die Verweildauer im Kreislaufsystem gering [127, 153]. Einer der vielversprechendsten Ansätze liegt in der Verwendung viraler Vektoren. Diese erhöhen durch ihre aggressiven Invasionsmechanismen die Wahrscheinlichkeit des Eindringens in die Zielzelle und ermöglichen so die Infektion einer Großzahl von Zellen im betreffenden Organ. Über retrovirale Vektoren ist es möglich, Zellen dauerhaft zu manipulieren. Adenovirale Vektoren transduzieren das genetische Material zwar nur transient, da es nicht zu Rekombinationsereignissen mit dem Wirtszellengenom kommt, sind die Risiken einer Onkogenaktivierung geringer als bei retroviralen Systemen. Die immunologische Wirkung ist aufgrund der großen Anzahl an Epitopen gegenüber Liposomen oder Polyaminkonjugaten enorm, so dass bei wiederholten Behandlungsversuchen das Abwehrsystem des Körpers supprimiert werden muss, sollen die Viren Gelegenheit zur Invasion der Zielzellen haben [154].

3.2. Entwicklung eines EC-spezifischen Adv-Vektorsystems

Expressionssysteme, die EC-spezifisch wirken sollen, müssen durch Promotoren gesteuert werden, deren Aktivität hauptsächlich in Endothelien beobachtet werden konnte. Dies ist in hohem Maße gültig für die Promotoren der VEGF-Rezeptoren, insbesondere VEGFR-1+2 (Flt-1, Flk-1) [50]. Ihre Sequenz ist bekannt (siehe Anhang) und die genomischen Klone sind verfügbar, weshalb in dieser Arbeit die Konstruktion eines adenoviralen Expressionssystem auf Basis dieser Promotoren durchgeführt werden sollte. Der Adv garantiert hohe Transduktionseffizienzen, jedoch sind die Signale der Promotoren möglicherweise schwach. Dies musste durch einen Amplifikationsmechanismus ausgeglichen werden: Das in geringen Mengen produzierte tTA bewirkt als starker Regulator eine entsprechend erhöhte Expression des Reportergens. Außerdem sollte im Sinne einer dosierten Expression das System über einen Inhibitor kontrollierbar und auch abschaltbar sein. Dies ist besonders wichtig, falls zytotoxische Genprodukte im Organismus kurzzeitig exprimiert werden sollen. Die Voraussetzungen werden durch das von Gossen und Bujard entwickelte TEToff-System erfüllt [155, 156].

3. Diskussion der Ergebnisse

3.3. Herstellung und Eigenschaften der Vektoren

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Komponenten entwickelt:

1. **Der tTA-Vektor:** Trägt den EC-spezifischen Promoter und ein Transaktivatorgen. Der Transaktivator kann durch Doxycyclin deaktiviert werden.
2. **Der TRE-Vektor:** Trägt einen durch den Transaktivator induzierbaren Promoter und ein nachgeschaltetes Gen, z.B. das Reporterogen EGFP für Versuchszwecke oder ein einzusetzendes Therapie-Gen.

Die Trennung des EC-spezifischen Promoters von dem zu exprimierenden Gen durch einen zwischengeschalteten, kontrollierbaren Transkriptionsfaktor sollte es ermöglichen, auch schwache Promotorsignale des tTA Vektors zu verstärken: Der Transaktivator muss deshalb in geringer Kopienzahl genügend starke Aktivität am Transaktivator Responsive Element des TRE Vektors induzieren, damit das nachgeschaltete Gen mit deutlich höherer Effizienz exprimiert werden kann. Zusätzlich ist es möglich, über den Transaktivator die Expression durch Einsatz von Doxycyclin zu stoppen.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit drei verschiedenen Ad-Vektoren neu konstruiert, daraus Viren hergestellt und vermehrt, sowie der Kontrollvirus Adv-hCMV-tTA expandiert. Die durchgeführten Studien an HUVECs haben gezeigt, dass für eine qualitativ hochwertige und aussagekräftige Koinfektion von ~200 000 HUVECs sowohl der Adv-tTA als auch der Adv-TRE-Vektor mit mindestens $2 - 3 \times 10^5$ MOI pro Ansatz eingesetzt werden muss. Die Aktivität des Kontrollvirus zeigt eine um Faktor 20 höhere Expression als der Reportervirus allein.

1. **Adv-Flt-1-tTA:** Das 1,4kb umfassende Fragment des murinen VEGFR-1 wurde vor das tTA-Element mit TEToff-Eigenschaften kloniert. Transfektionsstudien an HUVECs und 293-Zellen mit dem Transfervektorkonstrukt p Δ E1-Flt-1-tTA zeigten wie die Infektionsstudien mit dem daraus entwickelten rekombinanten Virus eine kaum über den basalen Level hinausgehende Aktivität des Reporterkonstruktes an. Sequenzreaktionen mit dem Transfervektorkonstrukt bestätigten, dass alle benötigten Fragmente der Expressionskassette in richtiger Orientierung zueinander vorliegen, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass das HindIII-BamHI-Fragment (vergleiche Sequenz mit der Acc.No. AJ224863) im vorliegenden System keine nennenswerten Promoterfunktionen aufweist. Aus Virus-DNA-Extrakten konnte durch PCR-Analysen ein deutlicher Hinweis auf die Existenz der Expressionskassette im rekombinanten Virus festgestellt werden. Der Titer der Viruspräparation liegt bei $\sim 10^{11}$ PFU/ μ l
2. **Adv-Flk-1-tTA:** Das 0,9kb umfassende Fragment des murinen VEGFR-2 wurde vor das tTA-Element mit TEToff-Eigenschaften kloniert zusammen mit einem 2,3kb großem Enhancerfragment, dass der Expressionskassette direkt nachgeschaltet wurde. Von einem analogen Konstrukt mit neurospezifischem Promoter war entsprechende Expression in Neuronen transgener Mäuse gezeigt worden [152]. Transfektionsstudien an 293-Zellen zeigten eine beinahe ebenbürtige Aktivität wie die Positivkontrolle mit hCMV-Promoter. Diese Aktivität konnte durch Doxycyclin inhibiert werden und weist auf eine korrekte Konstruktion des Transfervektors und die Funktionalität des Flk-1-Promoters hin, was durch PCR und Sequenzanalysen bestätigt werden konnte. Infektionsstudien mit den präparierten Viren an HUVECs und 293-Zellen zeigten eine kaum über den basalen Level hinausgehende Aktivität der TRE-EGFP-Kassette an, weil entweder der Titer des Präparates für eine ausreichende Expression des tTA-Proteins zu gering oder die Expressionskassette in der vorliegenden viralen Konfiguration seine Funktion nicht wahrnehmen kann. Die Möglichkeit einer illegalen Rekombination des Transfervektors mit dem Rekombinationsvektor kann nicht ausgeschlossen werden, da die Präparation unterschiedlicher Einzelklone verschiedener Rekombinationsereignisse in mehrfacher Hinsicht problematisch waren: Sie zeigten Titer von maximal 10^8 PFU. Sie lagen damit um Faktor 100 unter dem Titer der parallel durchgeführten Präparationen anderer Viruskonstrukte und gleichzeitig unter der benötigten Mindestkonzentration, die für eine aussagekräftige Infektion der Zellen benötigt worden wäre. Die Größe der Expressionskassette liegt knapp an der für pJM17 angegeben Aufnahmekapazität, was illegale Rekombinationsereignisse wahrscheinlich macht. Dieses Verhalten war aufgrund der Angaben von Microbix und entsprechenden Publikationen [155, 156] nicht absehbar. Auch die Möglichkeit, dass die Flk-1-Enhancer-Konfiguration im Virusgenom seine Aktivität nicht entfalten kann muss in Betracht gezogen werden.

3. Diskussion der Ergebnisse

3. **Adv-CMV-tTA:** Dieser Virus enthält die Expressionskassette hCMV-tTA. Der CMV-Promoter zeichnet sich durch besonders hohe Aktivität in allen Zelltypen aus und ist daher für die Ermittlung eines Standardwertes für Expressionen gut geeignet. Der Virus konnte in einer Konzentration von mindestens 10^{11} PFU/ μ l präpariert werden und zeigte an, dass das tTA-Element durch Doxycyclin im Bereich von 100-0,1ng Dox / ml Wachstumsmedium für die Kontrolle der Expression des Reporter genes eingesetzt werden kann. Dies zeigte eine gute Funktion des Systems in adenoviralen Vektoren.
4. **Adv-TRE-EGFP:** Der Transfervektor p Δ E1-TRE-EGFP und der daraus rekombinierte, adenovirale Vektor waren sowohl bei Studien in HUVECs als auch in 293-Zellen in zufriedenstellendem Maße funktionell. Die Hintergrundaktivität des Reportervirus ist ohne tTA-Stimulation bzw in Gegenwart von tTA und Dox nach 48h deutlich sichtbar. Die Fluoreszenz konnte durch den Einsatz der CMV-Kontrolle auf das zwanzigfache der Hintergrundaktivität gesteigert werden. PCRs aus dem Transfervektorkonstrukt und Adenovirusextrakt konnten das Vorhandensein der Expressionskassette zweifelsfrei bestätigen. Aufgrund der einwandfreien Funktion des Reporterkonstruktes kann davon ausgegangen werden, dass der Adv-TRE-EGFP funktionell und für weitere Studien einsatzbereit ist.

3.3. Perspektiven

Der Hinweis auf Funktionalität des Transfervektors p Δ E1-Flk-1-tTA ist Anlass genug, weitere Anstrengungen im Hinblick auf die Konstruktion eines rekombinanten Adv-Flk-1-tTA zu unternehmen. Eine Möglichkeit wäre die Verkürzung der Flk-1-Kassette auf ein Maß, das eine problemlose Rekombination in das Virusgenom zulassen und damit die Generierung eines Viruspräparates mit hohem Titer ermöglichen würde. Ein anderer Ansatz wäre die Verwendung eines adenoviralen Rekombinationsvektors mit größeren Deletionen, der die funktionelle Integration der unverkürzten Expressionskassette ins Genom möglich machen würde. Ein funktioneller Adv-Flk-1-tTA kann, wenn er selektiv in EC aktivierbar ist, für Studien zur Unterdrückung der Angiogenese in Mäusen herangezogen werden und wäre somit wichtig für die Inhibierung aberranter Angiogenese in pathologisch veränderten Geweben.

4. Methoden

4.1. Klonierungen in Vektoren

Um genetisches Material in einen Organismus einbringen zu können, muss dieses zuerst in ein geeignetes Plasmid eingefügt werden. Ein Plasmid enthält 1) einen bakteriellen origin of replication, um den Vektor nach Trafo eines kompetenten Bakteriums im Organismus zu vermehren bzw. stabil zu halten, 2) einen oder mehrere Selektionsmarker, die Resistenz gegenüber Zellgiften oder Antibiotika verleihen, sowie 3) eine polycloning site, also eine Sequenz mit mehreren Restriktionsschnittstellen, in die ein entsprechend behandeltes Fragment eingebunden und ligiert werden kann. Die vermehrten Plasmide können dann mittels Mini- oder Midipräparation isoliert und zur Transfektion in eukaryontischen Zellen genutzt werden, wo das Genfragment einen ± starken Einfluss auf den Phänotyp der transfektierten Zellen ausübt.

4.1.1. Konzentrationsmessung gereinigter Plasmide

2µl einer DNA-Lösung werden in 500µl H₂O in einem MCT unter kurzem Vortexen gelöst und die optischen Dichten OD₂₆₀/OD₂₈₀ im Spektrophotometer ermittelt. Vor der eigentlichen Messung muss eine Leerprobe (500µl Aquabidest) gemessen werden, um das Spektrophotometer zu kalibrieren. Das gesamte Volumen der Verdünnung wird zur Messung in Quarz-Kuvetten gefüllt. Zwischen jeder Messung muss die Kuvette mit Aquabidest gespült werden. Die OD bei 260nm lässt auf die Konzentration der Probe schließen. Das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280nm sollte zwischen 1,8 und 2 liegen, was für eine proteinfreie DNA spricht. Bei Messungen von Lösungen, in denen voraussichtlich geringe Mengen DNA gelöst vorliegen, z.B. bei Fragment-Eluaten aus partiellen Verdauen, eignet sich die Verwendung von Baby-Kuvetten. In diesen Kuvetten werden 60µl Lösung bestehend aus 5µl Probe und 55µl H₂O gemessen. Die Berechnung der DNA-Konzentration der Probe in µg/µl erfolgt immer mittels der Formel:

$$\frac{OD_{260} \times H \times F}{D} = K$$

OD₂₆₀: Absorption des Lichtes durch DNA bei 260nm als optische Dichte
H: Eingesetzte µl H₂O
F: DNA spezifischer Faktor, angegeben mit 0,05
D: Eingesetzte µl DNA-Lösung
K: Konzentration der DNA-Lösung in µg/µl

4.1.2. Restriktionsverdau von Plasmiden

Um einen Vektor zu linearisieren oder um festzustellen, ob ein Plasmid tatsächlich ein Insert aufgenommen hat, wird die gewonnene DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten und später mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die Behandlung eines Vektors nach Linearisierung mit nur einem Enzym siehe 4.1.6. Die Proben müssen zunächst auf eine Konzentration von 1µg DNA / µl gebracht werden. Die Verdünnungen werden durch Vortexen im MCT gemischt. Nach jedem Vortexen sollte der Inhalt durch kurzes Zentrifugieren mit der Tischzentrifuge wieder am Boden des Gefäßes gesammelt werden. Der Verdauansatz wird folgendermaßen durchgeführt:

- Mengen:
 - Verdünnte DNA: Meist 1µl bzw. ein Lösungs-Volumen ≤ 9µl, das 1µg DNA enthält; jedenfalls sollte nach dem Auffüllen mit allen Komponenten die Endkonzentration bei 0,1µg DNA / µl des wässrigen Ansatzes liegen.
 - Verdaupuffer: 1µl 10fach konzentrierten Verdaupuffer
 - Aquadest: Auf 10µl Gesamtvolumen ohne Enzym auffüllen
 - Enzym: mind. 1U / µl oder maximal 1µl Enzymlösung in 20% Glycerin

Zur Vereinfachung der Pipettierung und Erhöhung der Genauigkeit sollte für mehrere Verdauansätze eine **Masterlösung** erstellt werden: Angenommen es sollen 10 Verdauungen mit BamHI angesetzt werden, so ist es zweckmäßig, 10µl Puffer-B in 80µl Aquadest zu verdünnen und dieser Masterlösung 5-10µl Enzym zuzusetzen. Diese Masterlösung kann dann zu 9µl Aliquots aufgeteilt und mit je 1µl DNA-Lösung versetzt werden. Zum Schluss werden die Verdauungen etwa 1h bei entsprechender Temperatur (meist 37°C) inkubiert. Für die verwendeten Restriktionsenzyme werden die entsprechenden Puffer nach einer Tabelle des Herstellers ermittelt, welche die Verdauquote in % angibt.

4. Methoden

Bei einem Verdau mit zwei Enzymen wählt man jenen Puffer aus, der für beide eine gute Effizienz gewährleistet. Schneidet ein Enzym nach Erfahrung besser als ein zweites, so wählt man bei mehreren Entscheidungsmöglichkeiten jenen Puffer aus, der für das schwächere Enzym günstiger ist. Wenn eine größere Menge des DNA-Fragmentes erhalten werden soll, so können die Angaben mit dem benötigten Faktor einfach multipliziert werden.

4.1.3. Gelelektrophorese von verdauten Plasmiden und Nukleinsäurefragmenten

Prinzip: DNA ist ein negativ geladenes Makromolekül und wandert bei angelegtem Strom von der Kathode zur Anode. Wird dem Molekül ein engmaschiges Hindernis in den Weg gelegt, so wird seine Wanderungsgeschwindigkeit je nach Größe und Konfiguration der DNA \pm stark behindert. Ein solches Hindernis stellt ein Gel aus Agarose dar, dessen quervernetzte Moleküluntereinheiten die Wanderung der DNA entlang der angelegten Spannung behindern. Je größer die DNA ist, desto langsamer wird sie durch das Gel wandern, je kleiner sie ist, desto schneller. Auf diese Art ist es möglich, DNA-Fragmente verschiedener Größen voneinander zu trennen.

4.1.3.1. Bereitung des Gels

1. In einen 100ml Erlenmeyerkolben werden 10mg Agarose / ml 1xTAE-Puffer, multipliziert mit der gewünschten Prozentzahl⁶, eingewogen (für ein 1%iges 20ml, umfassendes Gel also 200mg Agarose).
2. Die Suspension wird in der Mikrowelle auf 100°C erhitzt, wobei sich die Agarose löst.
3. Die Lösung einige Zeit stehen lassen, bis sie etwa 60°C abgekühlt ist.
4. 1/20 μ l des relativ thermolabilen Ethidiumbromids (kanzerogen!) zufügen und das Gel in die entsprechende Apparatur gießen.
5. Nach etwa ½ Stunde ist das Gel erstarrt und die Dichtungen können aus der Apparatur entfernt werden. Das Gel mit 1xTAE-Puffer blasenfrei bedeckt und der Kamm wird vom Gel entfernt, die Slots liegen nun frei. Sie fassen bei einem üblichen 20ml Gel und einem 8x-Slotkamm etwa 10-15 μ l DNA-Lösung. Soll eine größere Menge aufgetragen werden, kann es Hilfreich sein, einfach das Volumen des Gels zu erhöhen.
6. Trenngele werden üblicherweise mit 0,8% hochreiner low-melt-Agarose angesetzt und muss 1h erstarren

4.1.3.2. Durchführung

In die Verdaue aus 4.1.2. werden 2 μ l 6xLoadingbuffer pipettiert. Das Gel kann mit 5-13 μ l Probe / Slot beladen werden. Es wird bei ca. 75V 30-50min lang gefahren. Als Marker wird 1 μ l fragmentierter DNA mit einer Konzentration von 50ng/ μ l eingesetzt. Anmerkung: Die DNA-Probe wird in TE-Puffer soweit verdünnt, dass sie in einer Konzentration von 0,1 μ g/ μ l vorliegt. Das Gesamtvolumen dieser Verdünnung sollte bei 10 μ l liegen. Zu dieser Verdünnung können 2 μ l 6xLoadingbuffer zugefügt werden, um damit einen Slot zu laden.

4.1.4. Ausschneiden von Banden gereinigter Nukleinsäurefragmente

Der Verdauansatz wird nach Inkubation vollständig auf 0,8% low-melt-Agarose⁷ (4.1.3.1.) aufgetragen und läuft 90min bei 40-50V und 50-60mA. Auf diese Art werden störende zirkuläre Plasmide von den linearisierten getrennt. Wird dieser Schritt nicht durchgeführt, würden die Transformanten zu einem Großteil Vektoren aufnehmen, in die kein Insert kloniert werden konnte. Die Bande mit dem linearisierten Vektor wird mit dem Skalpell ausgeschnitten und phenolextrahiert. **Hierbei ist strikt darauf zu achten, dass die UV-Exponierung der DNA möglichst gering gehalten wird!** Dies ist von besonderer Bedeutung, da ansonsten Mutationen in die DNA-Sequenz eingeführt werden können. Manche durch UV-Licht hervorgerufenen DNA-Modifikationen (Thymin-Thymin-Dimere, Cross-Linkages) können so ernst sein, dass E.coli Zellen mit geschwächten Reparaturenzymen (XL1-blue, SURE) diese nicht mehr beheben können. Die Zellen können dann mit aus solchen Fragmenten konstruierten Plasmiden nicht erfolgreich transformiert werden. Die Wahrscheinlichkeit inhibitorischer Modifikationen steigt sowohl mit der Länge der einzelnen Fragmente als auch mit der Dauer der UV-Bestrahlung exponentiell an. Die Gele sollten daher immer auf Alufolie gelegt und nur jene Teile zur Sichtbarmachung der Banden exponiert werden, die auch wirklich gerade zum Ausschneiden der Banden benötigt werden. Jede einzelne Bande, die für Konstruktionen verwendet werden soll, darf insgesamt maximal 5-10sec. UV-Licht ausgesetzt sein und nur so weit, dass die Banden keine direkte Bestrahlung

⁶ Die Prozentzahl des Geles richtet sich nach der Art der Anwendung: Für größere DNA-Fragmente im kB-Bereich werden meist 1%ige Gele verwendet, für DNA-Fragmente, die nicht viel größer als ca. 500Bp sind, finden 2-3%ige Gele Verwendung.

⁷ Die Seaplaque-low-melt-Agarose eignet sich besonders für die Isolierung von Fragmenten, die für Hybridisierungsansätze genutzt werden sollen.

4. Methoden

aufnehmen können: Oft reicht es aus, die fraglichen Gelabschnitte einfach in die Nähe des UV-Lichtes zu rücken, bis sie ausreichend sichtbar werden. Nicht benötigte Gelabschnitte können auch abgetrennt und später verarbeitet werden. Zur Kontrolle, ob die richtige Bande ausgeschnitten wurde, können die Reste des Gels mittels UV auf das Fehlen der fraglichen Bande untersucht werden.

4.1.5. Phenolextraktion von DNA aus Agarose

Durch Phenolextraktion kann DNA von den meisten Substanzen gereinigt werden. Dazu gehören Polysaccharide genauso wie Proteine. Obwohl hier die Extraktion der DNS aus Agarose beschrieben wird, ist diese Anleitung auch für die Reinigung von Nukleinsäuren von Proteinen gültig:

1. Die ausgeschnittene Bande wird in ein 1ml Mikrozentrifugenröhrchen (MCT) überführt und kurz zentrifugiert. Dadurch setzt sich die Agarose ab und das Volumen kann geschätzt werden (z.B. 100µl). Nun werden dem Ansatz das gleiche Volumen TE zugefügt und die entstehende Lösung wird für etwa 5min im Thermoblock auf 68°C erhitzt, wodurch sich die Agarose verflüssigt. Danach stellt man das MCT zum Abkühlen auf 37°C und zentrifugiert kurz ab.
2. Nun wird jenes Volumen Phenol⁸ (TE gesättigt, auf pH7,5 äquilibriert) zugefügt, das dem der wässrigen Phase gleicht (z.B. 200µl). Durch das Phenol werden störende Proteine aus der wässrigen Phase entfernt. Dazu wird das Gemenge 60sek durch Vortexen gemischt (die Flüssigkeit erscheint nun milchig).
3. Damit die Phasen sich trennen können, wird der Ansatz für 5min auf Eis gestellt und anschließend 5min bei 14,5kupm und 4°C zentrifugiert.
4. Die leichtere, wässrige Phase kann mittels einer Gilson-Pipette in ein neues MCT abgehoben werden. Obwohl gesättigtes Phenol nicht in Lösung gehen sollte, können trotzdem Spuren davon in die wässrige Phase übertreten. Um diese zu entfernen wird der Ansatz mit dem stark apolaren Chloroform 1min durch Vortexen extrahiert (das einzusetzende Volumen entspricht dem der wässrigen Phase).
5. Um die wässrige Phase von der organischen zu trennen, wird der Ansatz eine Minute bei 4°C und 14,5kupm zentrifugiert und die leichtere wässrige Phase in ein neues MCT abgehoben.

DNA-Fällung:

1. Fällungen werden prinzipiell in original Eppendorf MCT durchgeführt, da bei diesem Material auch kleine Pellets noch sichtbar bleiben, während bei Röhrchen anderer Hersteller kleine Pellets oft unsichtbar sind und ein ordnungsgemäßes Arbeiten dadurch erschwert wird.
2. Dem Ansatz wird nun 1/10 seines Volumens an 3M Na-Acetat (pH5,2) zugefügt. Das Salz bindet in Konkurrenz zur DNA die Wassermoleküle an sich.
3. Nun werden das 2,5fache des Volumens der wässrigen Phase an Et-OH-absolute (auf -20°C gekühlt) zugefügt. Ethanol ist stark wasserlöslich und entreißt der DNA seine Hydrathülle, wodurch sie ausfällt. Die Fällung erfolgt ÜN bei -20°C. Alternativ kann auch bei -80°C für 20min gefällt werden.
4. Die Fällung wird anschließend für 30min bei 4°C und 14,5kupm zentrifugiert. Der Überstand muss vorsichtig mittels einer zur Kapillare geformten Pasteurpipette und Gummibällchen vom Pellet abgesaugt werden.
5. Um die Salze vom Pellet zu entfernen wird dieses mit 100µl 70%igen Ethanol gewaschen (Das Pellet kann sich dabei ohne weiteres vom Boden lösen, muss aber 5min bei 4°C und 14,5kupm verdichtet werden, bevor der Waschkohol vorsichtig mit der Kapillare abgesaugt werden kann).
6. Nun kann das Pellet entweder 10min mit geöffnetem Deckel bei RT getrocknet werden, oder die Restflüssigkeit wird nach kurzem Zentrifugieren am Boden gesammelt und mit einer Kapillare vorsichtig abgesaugt (besser).
7. Die DNA wird in 10-50µl TE-Puffer⁹ oder H₂O aufgenommen und für 5min bei 68°C im Thermoblock inkubiert oder schonend 1h bei RT gehalten und in 15min-Abständen sanft Durchmischt, wodurch die DNA sich vollständig im Puffer löst.
8. Für die Berechnung: Ein Verlust von bis zu 50% ist einzukalkulieren.

⁸ Sollen nur Proteine aus einer agarosefreien Lösung durch Phenolextraktion entfernt werden, so ist eine vorbereitete Mischung aus Phenol:Chloroform:Äthanol in einem Verhältnis von 25:24:1 besser geeignet. Eine solche Mischung kann schon TE-gesättigt unter einer wässrigen Schutzphase von entsprechenden Zulieferern (z.B.: Sigma) bezogen werden.

⁹ Da der TE-Puffer den Magnesiumfänger EDTA enthält, können Mg²⁺-abhängige Reaktionen durch entstehenden Mg²⁺-Mangel inhibiert werden. EDTA enthält 4 funktionelle Gruppen und kann daher pro Molekül 2 Magnesium-Ionen binden.

4. Methoden

4.1.6. Phosphatase vermindert Religation

Wenn ein Vektor mit nur einem Enzym linearisiert worden ist, so besitzt er auf beiden Enden kompatible Überhänge, die eine Religation des Vektors bevorzugt stattfinden lassen. Um dies zu vermindern, werden die 5'-Phosphatgruppen an den kompatiblen Enden durch den Verdau mit alkalischer Phosphatase entfernt (Dephosphorylierung), was es der Ligase erschwert, ein Phosphatrückgrad zwischen kompatiblen Enden auszubilden. Zu diesem Zweck werden einem Verdauansatz entsprechend der Anzahl freier Enden die benötigte Menge Phosphatase zugefügt:

1. Einem 1µg DNA mit ~1kb Länge entsprechen ~1.52pmol DNA-Moleküle, also ~3pmol freier Enden. Pro pmol freier Enden müssen 0,01U Phosphatase zugesetzt werden.

$$Pu = \frac{M \times 0,0152}{L}$$

Pu: Anzahl benötigter **Units** alkalischer **Phosphatase**
M: **Masse** der gelösten DNA in µg
L: **Länge** des gelösten, linearisierten Plasmids in kb

2. Dazu wird 1µl Phosphataselösung (1U) in 99µl 1:10 verdünnten Phosphatasepuffer gelöst (0,01U/µl) und in entsprechender Menge in einen 10µl-Verdauansatz zugefügt. Der fehlende Phosphatasepuffer wird auf insgesamt 10µl ergänzt, d.h. durch Zugabe von 3µl des in 1xPuffer verdünnten Enzyms werden noch zusätzlich 9,7µl Puffer benötigt. Der Ansatz wird auf 100µl Gesamtvolumen mit Aquadest aufgefüllt.
3. Für 5'-Überhänge gilt: 30min Inkubation bei 37°C.
4. Für 5'-Einzüge oder Stumpfe Enden gilt: 15min Inkubation bei 37°C, weitere 15min bei 56°C.
5. Danach werden 0,01U Enzym pro pmol Enden zugefügt und der Ansatz wird wiederum 30min bei 37°C inkubiert.
6. Um die Reaktion zu stoppen, wird die Phosphatase durch 20min Hitzeinaktivierung bei 65°C denaturiert.
7. Anschließend kann der Vektor wie unter **4.1.3.ff.** beschrieben über Gelelektrophorese gereinigt und weiter verarbeitet werden.

4.1.7. Eluieren von Plasmid-DNA mittels QIAGEN-Gel-Extraction-Kit (QGEK)

Eine zeitlich effiziente Art der Eluation macht es möglich, dass die DNA nicht mittels eines low-melt-Agarosegels gereinigt werden muss, sondern auch normal schmelzende Agarose verwendet werden kann.

1. Die ausgeschnittene Bande wird im MCT auf sein Volumen geschätzt, ein Dreifaches dieses Volumens des Puffers QG zugegeben und bei 50°C im Wasserbad inkubiert, bis die Agarose vollständig gelöst ist (kann durch Vortexen unterstützt werden). Die Pufferfarbe sollte dabei gelb bleiben. Ist dies nicht der Fall, müssen etwa 10µl Na-Acetat, pH5,2 zugefügt werden, um den pH-Wert wieder auf 7,5 einzustellen. Dies ist nötig, da die Eluations-Säule die DNA nur bei diesem pH bindet.
2. Dem Ansatz wird nun das einfache Volumen der eingefüllten Agarose an Isopropanolalkohol zugefügt und auf die Eluierungs-Säule appliziert. Diese wird auf ein mitgeliefertes 1,5ml Auffanggefäß gesteckt und bei 14kupm, RT, 1min zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Auffanggefäß wird weiterverwendet.
3. Auf die Säule werden 500µl Puffer QG appliziert und der Ansatz wird nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Bei diesem Schritt werden alle Reste der Agarose entfernt. Der Durchfluss wird verworfen und das Auffanggefäß nochmals verwendet.
4. Die Säule kann nun mit 0,75ml Puffer PE (muss unbedingt Et-OH enthalten!) gewaschen werden. Auch hier wird der Durchfluss nach dem Zentrifugieren verworfen. Die Säule wird auf das entleerte Auffanggefäß aufgesetzt und nochmals für 1min zentrifugiert, um die Reste des Et-OH aus dem Puffer PE zu entfernen.
5. Nun wird die Säule auf ein neues Auffanggefäß gesteckt und die DNA mit 30µl Puffer EB durch Zentrifugieren bei 14kupm, RT, 1min eluiert.

4. Methoden

Die Menge der erhaltenen DNA ist so zu berechnen:

- 1µg der Plasmid-DNA ist für die Linearisierung eingesetzt worden.
- Die Eluierung hat 70% Effizienz, 60% bei anschließender Ethanol-fällung.
- Die erhaltenen 700ng sind in etwa 30µl Puffer gelöst (oder in 10-20µl nach Ethanol-fällung).
- Die Konzentration liegt also bei etwa 25-60ng DNA / µl Lösung.
- Für einen Ligationsansatz sind somit 1-2µl DNA-Lösung ausreichend.

4.1.8. Ligieren des Vektors mit einem Genfragment

Grundsätzliches: Eine Ligation ist eine ATP-abhängige Enzymreaktion, die bei neutralem pH zwei getrennte DNA-Stränge zu einem zusammenführen kann. Das Phosphatrückgrad wird dabei völlig wiederhergestellt. Um illegale Religationen eines linearisierten Vektors zu vermindern, muss das zu inserierende Fragment in einem zahlenmäßig (molekularen) 2-10fachen Überschuss der Reaktion zugefügt werden. Dies muss bei der Kalkulation der Masse des eingesetzten Fragmentes berücksichtigt werden:

$$\frac{Mp \times Bf \times f}{Bp} = Mf$$

<i>Mp</i> :	Eingesetzte Masse der Plasmid-DNA in ng
<i>Bf</i> :	Länge des Fragmentes in Basenpaaren
<i>Bp</i> :	Länge des Plasmides in Basenpaaren
<i>Mf</i> :	Einzusetzende Masse der Fragment-DNA in ng
<i>f</i> :	Faktor des benötigten Überschusses

Damit eine erfolgreiche Ligation von einer nicht erfolgreichen unterschieden werden kann, werden immer zwei Ligationsansätze durchgeführt: Der eine enthält unter anderem das zu klonierende Insert, der andere (Negativkontrolle) statt dessen nur Wasser. Bei der Trafo müssen auf der Agarplatte mehr Kolonien der positiven Ligation als solche der Negativkontrolle anwachsen. Ansonsten kann davon ausgegangen werden, dass die Kolonien des positiven Ansatzes hauptsächlich religierten Vektor enthalten und die Ligierung sowie die Trafo wiederholt werden müssen. Der Ansatz wird auf Eis gehalten und enthält:

- 10-50ng Vektor-DNA
- 10facher Molekül-Überschuss Insert-DNA (nicht bei Negativkontrolle)
- 1µl Puffer (enthält bereits ATP)
- Der Ansatz wird auf 10µl mit H₂O aufgefüllt
- Zum Schluss wird 1µl Enzym zugefügt

Eine Standardreaktion:

- 6µl H₂O auf den Boden des 1ml Eppis (7µl bei der Negativkontrolle)
- 1µl Puffer an den Rand des MCTs
- 50ng Insert an den Rand (nicht bei der Negativkontrolle)
- 50ng Vektor an den Rand, dann kurz zentrifugieren
- 1µl T4-DNA-Ligase

Nach Zugabe der T4-Ligase muss der im Kühlraum durch Vortexen vermischt und kurz zentrifugiert werden. Die T4-Ligase wird sofort nach Verwendung auf -20°C gelagert. Die Inkubationszeit richtet sich nach der Temperatur:

Temperatur in °C	Benötigte Inkubationszeit	Effizienz
4	2-3 Tage	Sehr hoch
16	ÜN	Hoch
RT	4h	Mittel
37	1h	Niedrig

Tabelle 4.1.8.I.

Die Ligationslösungen können auch selbst hergestellt werden:

- 5x Ligasepuffer
3,5ml 1M Tris-HCl pH7,5
350µl 1M MgCl₂
6,16ml Aquadest

4. Methoden

- 100mM DTT-Lösung
154mg Dithiothreitol werden in 1ml eisgekühltem Aquadest gelöst.
Von dieser Lösung werden jeweils 100µl in 900µl eiskaltem Aquadest verdünnt. Die entstehenden Aliquots werden bei -20°C gelagert. DTT dient als O_2 - und Radikalfänger, damit die Klenow-Polymerase nicht geschädigt werden kann.
- 20mM ATP
ATP in 4°C kaltem H_2O lösen und mit NaOH auf neutralen pH einstellen. Der pH wird mit pH-Indikatorpapier überprüft. Die Lösung wird dann auf 1ml aufgefüllt.

Die Lösungen werden jeweils auf 10 Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

Der Ligationsansatz wird dann folgendermaßen zusammengestellt:

- 10-50ng Vektor-DNA
- 10facher Molekül-Überschuss Insert-DNA (nicht bei Negativkontrolle) (6)
- 2µl 5x Ligase-Puffer
- 1µl 100mM DTT
- 1µl 20mM ATP
- Der Ansatz wird auf 10µl mit H_2O aufgefüllt

4.1.8.1. Durchführung problematischer Ligationen

Sollten Ligationen nicht, wie unter Punkt **4.1.8.** beschrieben, durchführbar sein, so kann man dies auf mehrere Probleme zurückführen:

- Blunt end Ligationen oder Überhänge mit nur einem Nukleotid Länge (z.B. ClaI-Verdau)
 - Insert-Menge ist sehr gering
 - Störende Salz- oder Lösungsmittelrückstände
1. Zunächst sollten alle durch Phenolextraktion oder Säulenreinigung (**4.3.5.**) isolierten Nukleinsäuren mittels Ethanolfällung und Lösung in reinem H_2O von allen Rückständen gereinigt werden.
 2. Das Insert sollte so eingesetzt werden, dass es die Molekularzahl des Vektors, der in einem 10µl-Ligationsansatz mit 50-100ng vorliegt, um das 10fache übersteigt (siehe oben). Sollte dies nicht in vernünftigen Volumina realisierbar sein (aufgrund der Größe des Inserts oder weil die Konzentration eines Inserts aus einem partiellen Verdau nicht genügend hoch liegt) so kann das durch Ethanolfällung gereinigtes Präzipitat des Inserts in der benötigten Menge der Vektorlösung aufgenommen werden.
 3. Diese Lösung wird vor weiterer Verwendung 5min auf 45°C im Thermoblock unter Schütteln erwärmt, damit die Komponenten optimal gelöst vorliegen. Danach wird die Vektor-Insert-Lösung auf Eis gestellt.
 4. Um die Genauigkeit der Salzkonzentration des Puffers pro Ansatz zu erhöhen, die durch Pipettierfehler vermindert werden könnte, wird nun eine Masterlösung für die Ligation angefertigt. Außerdem wird zusätzlich neutralisiertes ATP eingesetzt. Die Mengen der jeweiligen Komponenten werden mit der Anzahl der Ansätze + 1 multipliziert, also für 2 Ansätze (Ligation + Kontrolle) würde dies 3 ergeben:

z.B. je 3x

- 1µl ATP (10mmolar)
- 1µl 10xLigasepuffer
- 1µl T4-DNA-Ligase (Enzymlösung wird hier in die Gesamtlösung miteinbezogen!)

5. Zu 7µl Vektor-Insert-Lösung werden daher 3µl der Masterlösung zugefügt. Dieser Ligationsansatz wird drei Tage bei 4°C inkubiert. Nun wird eine weitere Masterlösung erstellt:

z.B. je 3x

- 4,0µl H_2O
- 0,5µl 10xLigasepuffer
- 0,5µl T4-DNA-Ligase

4. Methoden

6. Von dieser Stocklösung werden 5µl dem Ligationsansatz zugefügt und dieser wird ÜN bei 12-16°C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz noch 3h bei RT gelagert, bevor er durch Ethanolpräzipitation von Salzen gereinigt wird.
7. Alternativ kann eine schonendere Methode der Reinigung mit der Clean-Resin-Suspension von Stratagene durchgeführt werden. Die Partikel der Clean-Resin-Suspension sind in der Lage, Salze und Proteine aus der DNA-Lösung weitgehend zu entfernen. Zu einem 10-15µl umfassenden Ligationsansatz werden 5µl einer gut durchmischten Clean-Resin-Suspension zugefügt. Der Ansatz wird 15sec. durch Vortexen durchmischt und bei 6kupm 2min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und in einem frischen MCT abermals mit Clean-Resin gereinigt. Dieser Überstand ist nun für eine Trafo von E.coli-Zellen geeignet.

4.2. Transformation von E.coli

Kompetent gemachte E.coli Kulturen können mit schon Plasmiden transformiert werden. Die kompetenten Zellen sind aufgrund ihrer Labilität in Glycerin bei -80°C eingelagert. Vor Nutzung müssen sie langsam auf Eis getaut werden, so wie alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt werden.

4.2.1. Hitzeschock-Trafo

Diese Methode des Gentransfers ermöglicht es, unbehandelte DNA durch destabilisierte Membranen einzuschleusen.

4.2.1.1. Herstellung chemisch kompetenter Hitzeschock-Zellen aus E.coli

Damit Zellen DNA aufnehmen können, müssen ihre Membranen instabil, d.h. durchlässig für Makromoleküle gemacht werden. Die Zellen befinden sich, nachdem sie durch graduelle Verminderung der Salzkonzentration kompetent gemacht worden sind, in einem Zustand höchster osmotischer Spannung. Dies führt dazu, dass immer wieder kleine Löcher in der Membrane entstehen, durch welche die DNA-Moleküle eindringen können. Daher müssen diese sehr sensiblen Zellen entsprechend schonend behandelt werden (tauen und arbeiten auf Eis!). Nachdem die DNA eingedrungen ist, können die Zellen durch einen Erholungsschritt in warmem LB-Medium wieder ihre osmotische Stabilität zurückerlangen.

Materialien:

- ÜN-Kultur bei 37°C im Kulturschüttler, 250upm, einer einzelnen Kolonie von E.coli Zellen in 10ml LB oder SOB-Medium (sehr geeignet sind XL1-blue-Stämme).
- SOB-Medium:

Bacto-Trypton:	20g
Bacto-Hefe-Extrakt:	5g
NaCl:	5g
250mM KCl:	10ml
Aquadest:	950ml

pH7mit 2N NaOH (~500µl) einstellen, Volumen auf 1L mit Aquadest auffüllen. Die Lösung wird autoklaviert und vor Gebrauch mit 5ml steriler 2M MgCl₂-Lösung versetzt.
- SOC-Medium für den Erholungsschritt nach dem Temperaturschock:
1l SOB-Medium + 20ml steriler 1M-Glukose
- TB:

Pipes:	1,50g
CaCl ₂ :	0,83g
KCl:	9,32g

Auffüllen mit 400ml Aquadest, pH-Wert auf 6,7 mit 1M KOH-Lösung einstellen, daraufhin lösen sich die vorher zugefügten Komponenten. 5,44g wasserfreies MnCl₂ oder 8,54 MnCl₂ x 4H₂O der Lösung zufügen und das Volumen auf exakt 500ml einstellen und sterilfiltrieren, bei 4°C Lagern.

4. Methoden

Vorgangsweise:

1. 2-5ml einer monoklonalen LB-ÜN-Kultur oder einem Glycerin-Stock aus einer vereinzelt E.coli Kolonie werden in 500ml SOB-Medium (in 2l Erlenmeyerkolben) geimpft. Diese Kultur soll bis zu einer OD₆₀₀ von mind. 0,5, maximal 0,8, optimal 0,6 anwachsen. Der Kolben wird dabei mit 200upm bei 37°C (ca. 3h) oder bei RT (ca. 7h, oft werden dabei bessere Ergebnisse erzielt) geschüttelt. Für eine 500ml-ÜN Kultur werden nur 200µl aus primären Kultur inokuliert und ca. 15h bei RT mit 200upm inkubiert. Die OD₆₀₀ sollte gegen Ende der angegebenen Wachstumszeiten in 30min-Abständen überprüft werden. Die folgenden Arbeiten werden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.
2. Die Kultur wird 10min auf Eis gestellt und der Inhalt dann auf 45ml-Falcon-Bluecaps aufgeteilt. Diese werden anschließend bei 4kupm, 4°C, 10min zentrifugiert.
3. Die Überstände werden komplett dekantiert und die Pellets in jeweils 10ml auf Eis gekühlter TB-Lösung resuspendiert. Die Suspensionen werden 10min auf Eis belassen, in 2 Falcon-Bluecaps gleichmäßig verteilt und bei 4kupm, 4°C, 10min zentrifugiert.
4. Die Überstände werden jeweils wieder vollständig abgegossen und die Pellets durch vorsichtiges Schütteln in je 5ml (insgesamt 10ml) eisgekühlter TB-Lösung resuspendiert. Die Suspensionen werden vereinigt und 750µl DMSO (~7%iges DMSO) zugefügt und rasch durchmischt.
5. Die nun kompetenten Zellen können entweder sofort verwendet oder rasch als 100µl Aliquots in 1ml- oder 0.5ml-MCT übertragen, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

Die Effizienz der DNA-Aufnahme wird in CFU (colony forming units) angegeben und bezieht sich auf µg eingesetzter DNA. Dazu wird eine Trafo mit einem Standardplasmid angesetzt, dass in einer Verdünnungsreihe mit 10ng, 1ng und 0,1ng in die Ansätze eingebracht wird (siehe auch **4.2.1.3.**). Die Menge der eingesetzten E.coli-Suspension fließt nicht in die Berechnung ein, da es kaum einen Unterschied macht, ob 50 oder 100µl der Schockzellensuspension eingesetzt werden:

$$\frac{K \times 100}{D \times A} = E$$

<i>K</i> :	Angewachsene Kolonien pro Ansatz
<i>A</i> :	Entnommener Anteil des Gesamtansatzes in %
<i>D</i> :	Menge der eingesetzten DNA in µg
<i>E</i> :	Effizienz in CFU/µg DNA

4.2.1.2. Hitzeschock-Trafo von E.coli-Zellen mit Ligationsansätzen

Da in einem Ligationsansatz erfahrungsgemäß wenig verwertbarer Vektor mit Insert vorhanden ist, muss ein Transformationsansatz durchgeführt werden, der effiziente Aufnahme der DNA in die E.coli Zellen garantiert:

1. Je Trafo werden 100µl auf Eis getaute, chemisch kompetente E.coli Zellen in eine vorgekühlte 14ml Falcon-Tube mit Steckverschluss überführt. Dazu kommen max. 5µl Ligationsansatz. Das Gemisch wird für 20min auf Eis gehalten.
2. Der Ansatz wird nun für 40-45sec im Wasserbad auf 42°C schockerwärmt und mit 1ml SOC- oder LB-Medium versetzt. Die Trafos werden danach für 1h im Inkubator bei 37°C geschüttelt.
3. Die Suspension wird bei 3kupm, RT, 10min abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet kann danach vorsichtig in LB-Medium (50µl für 10cm-Platten und 200µl für 15cm-Agarplatten) oder LB-Selektionsmarker¹⁰-Medium aufgenommen und auf einer LB-Selektions-Platte ausgestrichen werden.
4. Es werden 2 Ansätze erhalten: Zum einen die Trafo mit dem Vektor mit Insert (+), zum anderen die Trafo ohne das Insert als Negativkontrolle (-). Die Agarplatten werden ÜN bei 37°C inkubiert.

Sollte die Anzahl der anwachsenden Kolonien der Negativkontrolle gleich groß sein, wie jene des Ligationsansatzes, so wurde der Vektor vermehrt religiert. Eine Überprüfung der Kolonien durch Midipräparation und Kontrollverdau ist nur dann sinnvoll, wenn die Anzahl der Kolonien des Ligationsansatzes um mindestens Faktor 3 höher liegt, als die der Negativkontrolle. Siehe auch **4.2.1.2.**: Anmerkung für besonders sensible Transformationen.

¹⁰ Z.B. Ampizillin, Kanamycin

4. Methoden

4.2.1.3. *Retrafo von E.coli mit präparierten Plasmiden*

Jeweils 50µl einer kompetenten Kultursuspension werden für einen Transformationsansatz benötigt. Retrafos werden in vorgekühlten 14ml Falcon-Tubes mit Rundboden und Steckverschluss durchgeführt. Ihnen wird zwischen 1-10ng Plasmid-DNA zugefügt, die Inkubationszeit auf Eis beträgt dabei 20min. Danach werden die Zellen im Wasserbad bei 42°C für 40 sek. schockerwärmt, kurz auf Eis gestellt und anschließend können die gesamten 50µl Ansatz bei unproblematischen Trafos sofort auf eine Agarplatte mit Selektivmedium (z.B.: 100µg Ampizillin / ml LB-Medium) ausgestrichen werden. Bei sensiblen Trafos (große Plasmide über 3kB oder wenig DNA) müssen die Ansätze mit 1ml Flüssig-LB aufgefüllt und 30-60min im Kulturschüttler bei 200upm und 37°C inkubiert werden. Dann erst werden 100µl entnommen und auf Selektivmedium ausplattiert. Der Rest des Ansatzes kann zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden. Die Platten bleiben nun ein paar Minuten bei RT und werden dann auf 37°C ÜN inkubiert.

Anmerkung: Schwierige Trafos können mit 100µl E.coli-Suspension durchgeführt werden. In dieses Volumen kann man entsprechend mehr DNA-Lösung einsetzen, vor allem dann, wenn die DNA-Lösung nur wenig konzentriert vorliegt. In solchen Fällen muss der Erholungsschritt (Schütteln der geschockten Zellen in 1ml warmem LB) *jedenfalls* durchgeführt werden. Danach werden die Zellen bei 5kupm zentrifugiert, der Überstand abgehoben und das Pellet in 400µl LB aufgenommen. Ein Ansatz kann so auf zwei in der Sterilbank 20min vorgetrocknete Agarplatten aufgetragen werden.

Grundsätzlich: Üblicherweise liegen die Transformationseffizienzen von kompetenten E.coli Zellen bei 10^7 Kolonien pro µg eingesetzter DNA. Bei guten Stämmen kann die Effizienz 10^8 CFUs erreichen, was geeignet für Trafos mit Ligationen ist. Sollte die Effizienz unter 10^6 sinken, so ist der Stamm unbrauchbar. Die Menge der eingesetzten DNA sollte nicht unter 1ng liegen (bilden 10^4 CFUs pro Ansatz und 10^3 CFUs beim Ausstreichen von 1/10 Ansatz mit normal effizienten Stämmen). Andererseits darf die eingesetzte DNA nicht über 100ng liegen, da sonst die Trafo inhibiert wird. Oft ist aus Gründen der Unverfügbarkeit genetischen Materials nur wenig Probe vorhanden. Um diese nicht durch Konzentrationsmessungen zu verschwenden, werden bei einer Trafo mit solchem Material zunächst 0,5µl eingesetzt. Sollte das Ergebnis nicht zufriedenstellend sein, kann die Menge gesteigert werden. Elektrokompente Zellen (siehe 4.2.2.) sind oftmals rec^+ und neigen dazu, große Plasmide durch Rekombinationsereignisse zu verstümmeln. Auch sollten nur Stämme verwendet werden, welche die DNA nicht methylieren können. Geeignet sind die Varianten XL1-blue und SURE von Stratagene. Sie zeigen zwar langsames Wachstum, garantieren aber gute Ergebnisse mit großen Plasmiden (über 10kB).

4.2.2. Elektrotrafo von E.coli

Soll ein Ligationsansatz zur Trafo von Bakterien eingesetzt werden, so reicht die Konzentration an ligierten Vektoren oft nicht aus, in den weniger effizienten Hitzeschockzellen wirksam zu werden. Zu diesem Zweck stellen die elektrokompenten Zellen eine gute, oftmals die einzig mögliche Alternative dar, da ihre Transformationseffizienzen oft um den Faktor 10-100 höher liegen als bei Hitzeschockzellen. Die Membranen der eingesetzten Bakterien werden mittels eines Stromstoßes depolarisiert und für kurze Zeit für größere Moleküle durchlässig. Die Möglichkeit von Punktmutationen im Plasmid, hervorgerufen durch die hohen Spannungen, ist ein nennenswerter Nachteil dieser Methode.

4.2.2.1. *Herstellung elektrokompenter E.coli-Zellen*

Materialien:

- 10ml einer E.coli ÜN-Kultur aus einer vereinzelter Kolonie
- 1l LB-Medium
- 1,53l steriles Aquadest
- 25ml 10%ige Glycerinlösung (2,9ml 87%iges Glycerin in 22,1ml H₂O, steril filtriert)

Vorgangsweise:

1. Zunächst wird 1l flüssiges LB-Medium und 1ml der ÜN-Kultur vermischt und in geeignete Erlenmeyerkolben überführt (steril arbeiten!). Die verschlossenen Kolben werden im Kulturschüttler bei RT, ÜN, 200upm inkubiert (Kulturen möglichst spät am Abend ansetzen, z.B. um 18°, wenn um 9° am nächsten Morgen die OD überprüft wird).
2. Alternativ können auch 5ml ÜN-Kultur in 1l LB-Medium eingebracht werden und die Zellen bei 37°C im Kulturschüttler 2,5h inkubiert und dann auf die OD₆₀₀ überprüft werden. Die geernteten Zellen könnten aber nicht die höchstmögliche Effizienz aufweisen.
3. Wenn die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht haben, wird die Kultur in gründlich mit Aquadest gespülten Sorvall-Zentrifugenbecher aliquotiert. Diese Aliquote werden dann mind. 30min auf Eis gestellt, bevor sie in der auf 4°C vorgekühlten Sorvall-Zentrifuge im GSA-Rotor bei 3,5kupm für

4. Methoden

15min zentrifugiert werden. Damit die Zellen durch die drastische Erniedrigung des osmotischen Außendrucks nicht absterben, muss immer auf Eis und im Kühlraum gearbeitet werden.

4. Die Überstände werden abgegossen und die Pellets nun in je 100ml eisgekühltem, sterilem Aquadest sanft, trotzdem rasch resuspendiert.
5. Danach werden die in den Sorvallbechern enthaltenen Zellsuspensionen auf insgesamt 1l mit eisgekühltem Aquadest gleichmäßig aufgefüllt. Die Sorvallbecher werden dicht verschlossen und mehrmals geschwenkt.
6. Die Suspensionen werden wiederum wie oben zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und die Pellets wie oben in nun insgesamt 0,5l Aquadest resuspendiert und in möglichst wenige Sorvallbecher aliquotiert.
7. Die Suspensionen werden abermals wie oben Zentrifugiert und die Überstände abgegossen. Nun müssen die Pellets in insgesamt 20ml 10%igem, eisgekühltem Glycerin resuspendiert werden.
8. Die entstehende Suspension wird in zwei Falcon-Bluecaps aliquotiert und bei 4kupm, 4°C im Schwenkarmrotor 20min zentrifugiert.
9. Die Pellets werden in 2x1ml 10% Glycerin aufgenommen und vereinigt.
10. Die Zellsuspension wird rasch in 0,5ml MCT auf 50µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem N₂ schockgefroren.
11. Die Aliquots werden bei -80°C gelagert. Vor der Nutzung müssen sie auf Eis getaut werden. Zur Bestimmung der Effizienz siehe 4.2.1.1.

4.2.2.2. Durchführung der Elektrotrafo

Alle Arbeiten müssen unbedingt auf Eis durchgeführt werden.

1. Zunächst wird der Ligationsansatz 1:10 verdünnt.
2. 50µl elektrokompetenter Zellen werden mit je 1µl Ansatz (positiver Ansatz bzw. Negativkontrolle) vermengt.
3. Dieser wird in die Elektroporationskuvetten eingefüllt, deren Außenseiten unbedingt ganz trocken gewischt sein müssen (verhindert das Durchschlagen eines elektrischen Funkens).
4. Nun wird die Kuvette in den Schlitten des Biorad GenPulser eingepasst (nur eine Orientierung möglich) und zwischen die Kontakte geschoben.
5. Die beiden Druckknöpfe für den Schock müssen gleichzeitig gedrückt werden und nach ein paar Sekunden wird der Stromstoß ausgelöst.
6. Einstellung der Spannung zwischen 1,2 – max. 4kV (2kV empfohlen), Kapazität bei 25µF, Widerstand bei 200Ω. In Salzfreen Ansätzen liegt die Impulsdauer bei 4-5ms.
7. Sollte es zum Durchschlagen kommen (lauter Knall und Stoßzeit weniger als 1msek), so muss der Ansatz wiederholt und die Voltzahl gegebenenfalls erniedrigt oder die Ligation von Salzen gereinigt werden.
8. Die geschockten Zellen werden sofort mit 1-2ml 37°C warmen SOC-Medium versetzt, mehrmals durch Auf- und Abziehen der Pipette suspendiert und in eine 14ml Falcon-Bluecap mit Steckverschluss überführt. Nun kann der Ansatz 1h im Kulturschüttler bei 37°C inkubiert werden.
9. Danach werden je Ansatz zwei 10cm Selektions-Platten präpariert: Auf einer Platte werden 100µl Suspension, auf der anderen Platte der abzentrifugierten Rest, der nochmals in 100µl SOC resuspendiert wurde ausgestrichen.
10. Alternativ kann der Rest von 900µl einfach auf der Platte verteilt werden, eine solche Menge wird aber meist schlecht vom Agar adsorbiert.
11. Die Platten werden ÜN inkubiert. Aus einzelnen angewachsenen Kolonien können in Falcon-Bluecaps ÜN-Kulturen in max. 10ml flüssigem Selektivmedium bei 37°C im Kulturschüttler und 200upm angesetzt werden, um so die eingebrachten Plasmide für eine Minipräparation zu vermehren. Die Deckel der Bluecaps dürfen dabei fest verschlossen bleiben.

4.3. Klonale Selektionstechniken und Präparation von Plasmiden

4.3.1. Herstellung einer IPTG-Xgal-Platte zur Selektion von Plasmiden der pSK-Familie

Viele Vektoren auf Basis des pSK kodieren für das Enzym β-Galaktosidase. Wird ein solches Plasmid in einen E.coli-Stamm eingeführt, der kein funktionierendes β-Gal-Gen aufweist, so übernimmt diese Funktion das Plasmid. Dem Selektionsmedium werden zwei Komponenten zugefügt:

- IPTG, der Induktor von β-Gal¹¹,
- Xgal, eine Verbindung, die von der durch das Plasmid kodierten β-Galaktosidase in einen Farbstoff umgesetzt wird, der die Kolonien blau erscheinen lässt¹².

¹¹ Isopropyl-β-D-thiogalactosid

4. Methoden

Innerhalb des Enzyms befindet sich eine Polycloning-Site. Wann immer ein Fragment erfolgreich in den Vektor inserieren konnte, wird die β -Galaktosidase außer Funktion gesetzt. So bleibt eine Kolonie, die einen pSK-Vektor mit Insert enthält nach Stimulation mit IPTG weiß, eine Kolonie mit pSK-Vektor ohne Insert verfärbt sich blau. Es kann in einem Schritt ermittelt werden, ob

1. ein Plasmid erfolgreich aufgenommen (Ampizillinresistenz) und
2. ein Insert in das Plasmid kloniert wurde (keine Blauverfärbung).

Zu diesem Zweck muss eine Selektivmediumplatte mit einer IPTG-Xgal-Lösung bestrichen werden, bevor eine E.coli-Suspension darauf ausgestrichen oder eine Kolonie aufgetupft wird. Nach 12-16h Inkubation bei 37°C wird die Platte für 2-3h auf 4°C gelagert, damit sich die blaue Farbe besser entwickeln kann und die weißen Kolonien leichter identifizierbar werden.

Die Stammlösungen:

- 20mg Xgal wird in 0,8 Dimethylformamid gelöst und das Volumen auf 1ml aufgefüllt.
- 200mg IPTG werden in 800 μ l H₂O gelöst und das Volumen auf 1ml aufgefüllt.

Für eine LB-Amp-Platte mit 10cm Durchmesser werden 40 μ l Xgal-Lösung mit 4 μ l IPTG-Lösung vermischt (für 15cm-Platten gelten die 3fachen Mengen) und auf der Oberfläche mit einer zu einem L geformten Pasteurpipette, deren Spitze zuvor verschmolzen wurde, verteilt. Die Platte sollte dafür nicht zu stark getrocknet sein.

4.3.2. Ansetzen einer Übernachtskultur von E.coli-Klonen

Um eine Midipräparation durchführen zu können, wird mindestens ein Klon des entsprechenden Transformationsansatzes in ein mit Antibiotika versetztes LB-Flüssigmedium suspendiert. Von den Agarplatten wird je eine einzelne Kolonie eines Transformationsansatzes mit einer sterilen Okuliernadel entnommen. Aus einer schon vorhandenen, monoklonalen Flüssigkultur können 1ml Kultursuspension entnommen und in das Selektionsmedium eingepflegt werden. Die Klone werden so in jeweils 100ml Flüssig-LB-Medium in 500ml oder 800ml Erlenmeyerkolben suspendiert. Das Medium wird mit 1‰ Antibiotikallösung versetzt (d.h. 10 μ l Ampizillinlösung in 100ml Medium, wobei die Konzentration der Ampizillinlösung 50mg/ml beträgt). Steriles Arbeiten ist hier vorauszusetzen. Die Erlenmeyerkolben werden nach Befüllung verschlossen und in den Kulturschüttler bei ca. 200upm und 37°C ÜN eingestellt. Die Kulturplatten oder Suspensionen werden für weitere Verwendung auf 4°C gelagert. ÜN-Kulturen sollten frühestens am Nachmittag angesetzt werden, da sie sonst überaltern und an Effizienz verlieren.

Wird eine ÜN-Kultur einer Ligationstrafo angesetzt, so wird diese in 10ml Medium in 45ml-Bluecaps durchgeführt, da im Anschluss nur eine Minipräparation benötigt wird, um die Plasmide auf den richtigen Einbau des Inserts kontrollieren zu können.

4.3.2.1. Herstellung eines Glycerinstocks von E.coli-Kulturen

Um E.coli-Kulturen über längere Zeit haltbar zu machen, müssen diese in Glycerin auf -70°C eingefroren werden. Dazu entnimmt man einer ÜN-Kultur 100 μ l Suspension und füllt sie in ein MCT. Dazu gibt man 100 μ l einer mit einem 0,2 μ m Filterset sterilfiltrierten, 40%igen Glycerinlösung. Die entstehende Suspension enthält dadurch 20% Glycerin, was die Zellen vor Frostschäden schützt.

4.3.3. Minipräparation von Plasmiden mit dem QIAGEN-Vacuum-Miniprep-Kit

Für die Isolierung einer großen Anzahl verschiedener Plasmide eignet sich die Methode der Vakuum-Präparation von Plasmiden sehr gut, da sehr viele Proben auf einmal verarbeitet werden können:

1. 10ml-Übernacht-Kulturen werden je 5ml Bakteriensuspension entnommen und in neue Falcon-Bluecaps gefüllt.
2. Diese werden 10min bei RT, 3kupm zentrifugiert. Die restlichen 5ml Kultur können bei 4°C für weitere Verwendung gelagert werden (siehe auch **4.3.2.1.**).
3. Die Pellets werden jeweils in 250 μ l RNase enthaltenen Puffer P1 resuspendiert und in ein MCT überführt. Der Puffer P1 sollte über die Zeit seiner Nutzung auf Eis gehalten und nach Nutzung bei 4°C gelagert werden, um seine frühzeitige Überalterung zu verhindern. Prinzipiell zeigen alle Arbeiten der DNA-Isolierung die besten Ergebnisse, wenn sie auf Eis durchgeführt werden.

¹² 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid wird durch β -Galactosidase in das tiefblaue 5-Brom-4-chlor-3-indigo und den Galactosidanteil gespalten.

4. Methoden

4. Dem Ansatz werden 250µl Lysis-Puffer P2 zugefügt und die Mischung sanft geschwenkt.
5. Nach Neutralisierung mit 500µl Puffer N3 muss der Ansatz durch mehrmaliges Umdrehen des MCTs gemischt und das ausfallende Aggregat schließlich bei 14kupm, RT oder 4°C, 10min abzentrifugiert werden.
6. Währenddessen werden die Vakuumsäulen in die Vakuumapparatur eingesetzt. Der Überstand wird auf die Säulen appliziert und mittels eines angelegten Vakuums durchgesaugt, wobei die DNA am Säulenmaterial adsorbiert wird.
7. Anschließend wird 1ml Waschpuffer PE appliziert und auch dieser durch die Säule gesaugt. Dieser Schritt wird ein weiteres Mal wiederholt.
8. Um den Waschpuffer zu entfernen werden die Säulen 5min trocken gesaugt. Anschließend müssen deren Spitzen abgetupft und gegebenenfalls abgesaugt werden, um das im Waschpuffer enthaltene Ethanol zu entfernen, welches den nachfolgenden Restriktionsverdau stören würde.
9. Nun kann die DNA mit 100µl Eluationspuffer EB aus den Säulen gelöst werden. Dazu wird die Auffangwanne für die Abfallösungen aus der Apparatur entfernt und die Halterung für die Auffangröhrchen eingesetzt. Die Auffangröhrchen müssen direkt unterhalb der Säulen eingesteckt werden. Diese rasten beim Schließen des Apparaturdeckels leicht ein. Das Eluat spritzt beim Anlegen des Vakuums an die Röhrchenwände und muss durch kurzes Zentrifugieren am Boden gesammelt werden. Zur Überprüfung der DNA siehe **4.1.1. – 4.1.3.2.**

4.3.4. Minipräparation von Plasmiden mit dem QIAGEN-Spincolumns-Miniprep-Kit

Die Methode eignet sich am besten für die Verarbeitung von bis zu 18 Proben (jene Anzahl, die leicht mit einer üblichen Tischzentrifuge verarbeitet werden kann). Die Durchführung entspricht jener aus **4.3.3.**, unterscheidet sich jedoch dadurch, dass anstelle der Vakuum-Säulen Spincolumns zur Anwendung kommen. Dementsprechend muss das Protokoll auch angepasst werden:

1. Der erste Teil der Durchführung entspricht jener bis §4 aus Punkt **4.3.3.**
2. Nach der Lysierung der Zellen mit Puffer P2 werden 350µl Puffer N3 zugefügt und durch mehrmaliges Invertieren des MCTs neutralisiert. Das ausfallende Aggregat wird bei 14kupm, RT oder 4°C, 10min abzentrifugiert.
3. Die Zentrifugensäulen werden auf die mitgelieferten Auffangbecher gesteckt und der jeweilige Überstand aus §2 wird vollständig auf eine eigene Säule aufgetragen.
4. Die Säulen werden 1min bei 14kupm zentrifugiert. Da diese keinen Deckel besitzen, sollte die Zentrifuge vor Gebrauch gründlich mit Aquadest und 70%igem Ethanol gereinigt werden (insbesondere der Rotordeckel und die leicht zugänglichen Rotoroberflächen). Der Durchfluss wird verworfen, der Auffangbecher jedoch weiter verwendet.
5. Der erste Waschschrift entfernt Salze und Proteine aus den Säulen und wird mit 500µl Puffer PB durchgeführt, Zentrifugieren wie oben, der Durchfluss wird verworfen.
6. Der zweite Waschschrift entfernt die restlichen Salze und inaktiviert noch vorhandene Proteine. Dieser wird mit 750µl Waschpuffer PE ausgeführt, Zentrifugieren wie oben, der Durchfluss wird verworfen.
7. Zur Entfernung von störendem Rest-Ethanol werden die Säulen nochmals 1min mit **leerem** Auffangbecher wie oben zentrifugiert.
8. Nun können die Säulen auf 1,5ml MCT gesteckt werden. Da die Deckel der MCT nicht geschlossen werden können, sollten diese in der Zentrifuge nach innen gerichtet werden, denn es ist wichtig, dass die Teile, mit denen die Deckel in Berührung kommen könnten, gründlich gereinigt worden sind!
9. Die adsorbierte DNA wird mittels 30µl Puffer EB aus den Säulen bei 14kupm, RT, 1min eluiert.
10. Zur Überprüfung der DNA, muss diese mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt werden (siehe Punkt **4.1.1. – 4.1.3.2.**)

4.3.5. Plasmid-Midipräparation

1. 100ml ÜN-Kulturen werden in Sorvallbechern oder aliquotiert in 50ml-Falcon-Blue-Caps bei 4°C, 6kupm, 10min zentrifugiert. Der durch Zentrifugieren entstandene Überstand wird restlos in ein Becherglas abgeschüttet, autoklaviert und verworfen. Um Ressourcen zu sparen können alternativ alle Reagenzien der weiteren Schritte auch um 50% vermindert zugesetzt werden.
2. Die Pellets werden in 10ml RNase-haltigem P1-Puffer (Tabelle 2) resuspendiert. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen noch intakt.
3. Nun werden zu jeder Probe 10ml alkalischer Lysispuffer-P2 zugefügt. Die entstehende Lösung darf hierbei nur sanft geschwenkt werden, da sonst die genomische DNA der aufgebrochenen Zellen durch Scheerwirkung fragmentiert und die später gewonnene Plasmid-DNA dadurch verunreinigt würde. Die Inkubationszeit beträgt 5min.

4. Methoden

4. Die Lysate werden nun mit 10ml auf 4°C gekühltem P3-Puffer unter sanftem Schwenken neutralisiert, wobei nun die Proteine mit der genomischen DNA ausfallen.
5. Die getrübe Lösung wird in die Filtercartridge überführt, die zuvor am Auslass verschlossen und entsprechend an einer Halterung fixiert worden ist. Dort verbleibt sie für 10min.
6. Nun wird der Kolben der Filtereinheit eingesetzt und die Lösung nicht ganz bis zum Anschlag durch den zylindrischen Filter in eine frische Falcon-Bluecap gepresst. *Anmerkung: Schritt 5 und 6 können auch alternativ durchgeführt werden, indem die getrübe Lösung für 10min im Behältnis verbleibt (§5) und anschließend durch ein trichterförmiges, mit 2-3ml Neutralisierungspuffer befeuchtetes Filterpapier in eine Falcon-Bluecap filtriert wird. Dies führt zwar zu einem gewissen Verlust an DNA-Lösung, ist aber kostengünstiger. Befindet sich der Ansatz in Falcon-Bluecaps, kann das Präzipitat auch durch 5min Zentrifugieren bei 6kupm pelletiert und der Überstand weiter verwendet werden.*
7. Optional wird dem Filtrat oder Überstand 2,5ml des Endotoxinentfernungspuffers (Puffer-ER) zugefügt, der das bei Transfektionen von Gewebezellen schädliche LPS (inflammatorisch!) entfernt. Danach werden die verschlossenen Tubes 10x invertiert. Die Inkubationszeit beträgt 30min auf Eis.
8. Jetzt kann die Säule vorbereitet werden, die als Anionenaustauscher (DEAE = Diethylaminoethanol) die negativ geladene Plasmid-DNA zurückhalten soll. Die Säule muss zunächst mit 10ml des QBT-Puffers äquilibriert werden.
9. Die so präparierte Säule kann nun mit der Probenlösung (etwa 15-20ml) beladen werden, wobei die langsam durchrinnende Flüssigkeit verworfen wird.
10. Verschiedene salzartige Rückstände werden mit dem Puffer QC gewaschen (je 2x30ml).
11. Die zurückgehaltene Plasmid-DNA kann jetzt mittels 15ml QF-Puffer oder bei endotoxinfreier Präparation mit QN-Puffer eluiert werden (Es ist empfehlenswert jetzt die Mengen des 50%igen Ansatzes jenen des normalen Ansatzes anzugleichen, sonst erst ab §12). Das Eluat wird dabei in einem gläsernen, lösungsmittelbeständigen Corex-Tube aufgefangen, welches für Präzipitationen gut geeignet ist. Da Corex-Tubes hoch erhitzenbar sind, können sie auch für RNA-Analysen verwendet werden (RNase wird durch Erhitzen inaktiviert).
12. Zu den 15ml Eluat werden 70vol% (10,5ml) Isopropanolalkohol zugegeben. Das Corex-Tube wird nun mit Parafilm unter Vermeidung von Kontamination verschlossen und der Inhalt vorsichtig vermischt. Die Plasmid-DNA fällt nun aus (Opaleszenz wird sichtbar). Die Corex-Tubes werden mittels gewogener Gegengewichte in der Sorvall-Zentrifuge (Schwenkarmrotor empfohlen) bei 4°C, 9,5kupm, 20-30min zentrifugiert. Wichtig ist, die Tubes in Gummiadaptoren einzusetzen, um das Zerbersten der Gläser zu vermeiden. Danach wird der Überstand abgeschüttet und Reste gegebenenfalls sehr vorsichtig abgesaugt. Bei den folgenden Schritten müssen nach jeder Pipettierung die Spitzen gewechselt werden! Außerdem sind die Mengen der Reagenzien spätestens jetzt sowohl für den normalen als auch den 50%igen alternativen Ansatz gleich.
13. Die DNA-Pellets werden einer Reinigung unterzogen, wobei sie jeweils in 0,2ml endotoxinfreiem TE (Tris-EDTA) aufgenommen und in ein MCT überführt werden. Die weitere Vorgangsweise entspricht **4.1.5. ab DNA-Fällung**.

Preparation of buffers

Buffer	Composition	Storage
Buffer P1 (Resuspension Buffer)	50 mM Tris-Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A	4°C, after addition of RNase A
Buffer P2 (Lysis Buffer)	200 mM NaOH, 1% SDS	room temp.
Buffer P3 (Neutralization Buffer)	3.0 M potassium acetate, pH 5.5	room temp. or 4°C
Buffer QBT (Equilibration Buffer)	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol; 0.15% Triton® X-100	room temp.
Buffer QC (Wash Buffer)	1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol	room temp.
Buffer QF (Elution Buffer)	1.25 M NaCl; 50 mM Tris, Tris-Cl, pH 8.5; 15% isopropanol	room temp.
Buffer QN (Elution Buffer)	1.6 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol	room temp.
STE	100 mM NaCl; 10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA	room temp.
TE	10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA	room temp.

Tabelle 4.3.5.1.

4.3.6. Midipräparation von genomischen PAC- oder BAC-Klonen

Plasmide von genomische Klonen enthalten oft ein Fragment, das mehrere hundert kB umfassen kann. Es wird daher in E.coli kaum vermehrt und bleibt meist als Einzelkopie im Zytoplasma. 3 Richtlinien müssen deshalb bei der Präparation beachtet werden:

1. Die im Zuge der Präparation entstehenden Lysate dürfen keinerlei Scheerwirkung ausgesetzt werden, damit die fragilen Plasmide nicht zerbrechen und somit verloren gehen.
2. Die Plasmide müssen wenigstens einmal repliziert werden. Dazu muss eine Flüssigkultur eines E.coli-BAC/PAC-Klones auf eine OD von 0,6 angewachsen werden. Bei Verwendung einer 100ml ÜN-Kultur muss sie im Anschluss mit etwa 200ml LB-Medium verdünnt werden. Um die Plasmide

4. Methoden

zu replizieren wird ihr interner origin of replication (ori) durch Zugabe von IPTG aktiviert, so dass mehrer Kopien des Plasmides in der Zelle entstehen. Die Endkonzentration von IPTG muss bei 250mg / Liter Kultursuspension liegen. Das bedeutet, einer 100ml-Kultur werden 25mg, einer 300ml-Kultur 75mg IPTG zugefügt. Anschließend wird die induzierte Kultur für 4h bei 37°C und 200upm im Kulturschüttler inkubiert. Die weitere Verarbeitung wird unter Punkt 4.3.5. beschrieben.

3. Die DNA ist aufgrund der Größe von PAC-Klon-Plasmiden sehr schlecht löslich. Daher muss die DNA-Lösung am Ende der Prozedur mit einer Gilsonpipette mild durchmischt werden und vor einer Konzentrationsmessung oder anderer Verwendung bei RT für mehrere Stunden oder bei 4°C ÜN gelagert werden.

4.4. PCR-Techniken

Die PCR ist eine durch zweiwertige Magnesiumionen beeinflusste Polykondensationsreaktion von Triphosphatdesoxynukleotiden zu langkettigen Nukleinsäuren. Die Kondensation wird durch ein Enzym, der DNA-abhängigen DNA-Polymerase, in einem bei ~pH8 gepufferten, wässrigen Milieu durchgeführt. Die eingesetzten Polymerasen müssen aufgrund des Reaktionsverlaufes hitzestabil sein.

4.4.1. Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR)

1. Eine PCR kann nur an einzelsträngiger DNA durchgeführt werden.
2. Das Enzym braucht trotzdem eine Strecke doppelsträngiger DNA, um daran ansetzend den zweiten Strang der DNA zu synthetisieren.
3. Das für die Reaktion benötigte, kurze dsDNA-Stück wird durch computergenerierte Oligoprimer erzeugt, die genau an der Region binden müssen, von wo die Reaktion gestartet werden soll.
4. Da die antiparallele DNA-Wendel als Hin- und Rückstrang vorliegt, muss für jeden Strang ein gesonderter Primer vorliegen. Diese beiden Primer rahmen eine gewisse Strecke der Nukleotidsequenz ein, die durch wiederholten Start der Polymerasereaktion entsprechend amplifiziert wird.
5. Zunächst muss die DNA durch Erhitzung auf Temperaturen nahe 95°C vollständig denaturiert, d.h. in seine Einzelstränge aufgeschmolzen werden.
6. Durch langsames Abkühlen auf die von der Sequenz der Primer bestimmte Annealingtemperatur¹³ können die Oligos über geregelte H-Brückenbindung an ihre antiparallele Zielsequenz binden.
7. Im Bedarfsfall wird durch leichtes Erhöhen der Temperatur eine Bindung an unspezifische Sequenzen vermieden, und die Polymerase kann an den Primern ansetzend die in einer Polykondensation den zweiten Strang nach der Mustersequenz von 5' nach 3' synthetisieren.
8. Erhitzen, Abkühlung und Synthesephase können sinnvollerweise 30-50 Mal wiederholt werden und werden durch eine programmierbare, computergesteuerte Apparatur kontrolliert.
9. Am Ende der Amplifikationszyklen wird das Reaktionsgemisch auf 4°C abgekühlt und ist dann bereit zur weiteren Verwendung.

Die folgende Mengenbeschreibung der verwendeten Reagenzien halten sich an die im jeweiligen Kit empfohlenen Angaben. Darin enthalten sind die fertig abgemischten Puffer und dNTPs, sowie die Taq-Polymerase.

Reagenz	Konzentrationen der einzusetzenden Lösungen	Volumen in µl pro Ansatz
H ₂ O		8,52µl (maximal)
MgCl ₂	25mM/µl	1,80µl
Puffer	500mM/µl KCl, 100mM Tris-HCl, pH8,3	1,50µl
Vorw.-Primer	10pM/µl	0,60µl
Rückw.-Primer	10pM/µl	0,60µl
dNTPs	2mM ATP, TTP, GTP, CTP in einer Lsng.	3,00µl
Template-DNA	ca. 50-500ng ¹⁴	meist vernachlässigbar
Taq-Polymrs.	4U/µl	0,18µl
Mineralöl	Optional, nur wenn Cycler ohne Oberhitze	1-2 Tropfen
Total		15,00µl wässrige Lösung

Tabelle 4.4.1.I.: PCR-Mengenbeschreibung für das PCR-Kit von MWG. Reagenzien in der Reihenfolge des Pipettierens.

¹³ Die Annealingtemperatur ist jene obere Temperaturgrenze, bei welcher der Primer vollständig an seiner Zielsequenz gebunden vorliegt. In den meisten Fällen befindet sie sich etwa 3°C unter der Schmelztemperatur. Um die Spezifität einer Reaktion zu erhöhen, kann dieser Parameter schrittweise Erhöhung oder Senkung auf einen optimalen Wert gebracht werden. Die niedrigere Annealingtemperatur der beiden eingesetzten Primer sollte bei der Programmierung der Zyklen berücksichtigt werden.

¹⁴ Konzentration und Volumen spielen insofern eine kleine Rolle, als die Reaktion nur wenig Template-DNA benötigt. Oft kann unabhängig von der Konzentration der Ausgangslösung einfach ein Volumen von ca. 0,2-0,3µl DNA-Lösung eingesetzt werden.

4. Methoden

Reagenz	Konzentrationen der einzusetzenden Lösungen	Volumen in µl pro Ansatz
H ₂ O		32,50µl (anzupassen)
Puffer	15mM MgCl ₂ , 160mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 500mM/µl KCl, 670mM Tris-HCl, pH8,8	5,00µl
Vorw.-Primer	10pM/µl	5,00µl
Rückw.-Primer	10pM/µl	5,00µl
dNTPs	10mM ATP, TTP, GTP, CTP in einer Lsg.	1,00µl
Template-DNA	ca. 50-500ng ⁸	1,00µl (anzupassen)
Taq-Polymrs.	5U/µl	0,5µl
Mineralöl	Optional, nur wenn Cycler ohne Oberhitze	1-2 Tropfen
Total		50,00µl wässrige Lösung

Tabelle 4.4.1.II.: PCR-Mengenbeschreibung für das PCR-Kit von Biotherm in der empfohlenen Reihenfolge des Pipettierens.

Anmerkung: Die dNTPs sind sehr vorsichtig zu handhaben. Das heißt, dass sie möglichst selten aufgetaut werden sollten. Das Tauen darf grundsätzlich nur auf Eis geschehen. Außerdem müssen von der Stocklösung mehrere Aliquots in der benötigten Verdünnung angelegt werden. Die Aliquots sollten nur für einen 5maligem Gebrauch angelegt werden. Dadurch wird erstens eine mögliche Kontamination vermieden und zweitens eine gleichbleibende Qualität der dNTPs gewährleistet. Im ungünstigsten Fall muss die DNA aus einer abgestorbenen Kolonie oder aus Geweben gewonnen werden, indem mit einer Okuliernadel in die Probe gestochen und die Nadel im Reaktionsansatz gespült wird. Durch die Denaturierungsschritte Platzen die Zellstrukturen und geben i.d.R. die DNA frei.

4.4.1.1. Rechnerische Ermittlung der Annealingtemperatur von Oligoprimer-Paaren

Vor Programmierung des Cyclers muss die Annealingtemperatur der Oligo-Primer bestimmt werden. Dazu zählt man alle G+Cs zusammen und multipliziert diese mit 4. Dies entspricht der höheren Schmelztemperatur von GC-Paaren, die aufgrund ihrer 3 H-Brückenbindungen die Schmelztemperatur von Oligos beträchtlich erhöhen. Als nächstes werden die A+Ts zusammengezählt, die aufgrund ihrer 2 H-Brückenbindungen in AT-Paaren nur mit 2 multipliziert werden. Die so ermittelten Werte werden addiert und spiegeln die maximale Annealingtemperatur des Oligos wieder. Dasselbe wird für den zweiten Primer des Paares ermittelt. Die niedrigere Annealingtemperatur des Primerpaares wird für die PCR herangezogen. Ist diese sehr hoch (ab 66°C und darüber) so werden 4°C abgezogen. Ist sie im normalen Temperaturbereich (64-62°C), so werden nur 2°C von diesem Wert subtrahiert. Liegt die Temperatur unter dem Normalbereich (ab 61°C und darunter), dann bleibt der Wert unverändert.

4.4.1.2. Programmierung der PCR-Zyklen

Die Programmierung des PCR-Cyclers (z.B. GeneAmp2400 von Perkin & Elmer) wird nach folgendem Muster für eine Standard-Reaktion durchgeführt:

1. 2min bei 94°C erster Denaturierungsschritt
2. 30 – 60sec 94°C Denaturierung (Doppelstränge liegen hier als Einzelstränge vor)
3. 30 – 60sec 50-70°C Primerannealing (abhängig von den eingesetzten Oligos!)
4. 1-5min 68-72°C Taq-Polymerase-Reaktion (abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments, i.d.R. wird für 1kB einer zu amplifizierenden Sequenz 1min veranschlagt.)
5. Punkt 2-4 werden 35-50 Mal wiederholt (in Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Templates. Je weniger Template für die Reaktion zur Verfügung steht, desto mehr Schleifen werden benötigt. Im Normalfall reichen 35 aus.)
6. 5-10min 68-72°C Endreaktion (nicht fertiggestellte Reaktionen werden abgeschlossen.)
7. 4°C Abkühl-Temperatur ohne Zeitlimit

4.4.1.3. Behandlung von Oligoprimern

Nach Lieferung von synthetischen Oligoprimern liegen sie meist lyophilisiert vor, was sie nahezu unbegrenzt haltbar macht (dunkel und trocken bei RT lagern). Um sie gebrauchsfähig zu machen, müssen die Primer in sterilem Aquadest gelöst werden (20min bei RT unter Schütteln). Dabei werden den Behältern, auf deren Boden sich das Lyophilisat abgesetzt hat, mit der vom Zulieferer im Synthesereport angegebenen Menge H₂O zugefügt. Auf die Art erhält man eine Stocklösung von 100pmol Primer / µl Wasser¹⁵. Um diese einsatzfähig für die PCR zu machen, wird eine 1:10 Verdünnung angesetzt (10µl Primerstock in 90µl H₂O). Der Stock und die Verdünnung werden bei -20°C gelagert.

¹⁵ Aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte der Oligoprimer ist eine Verdünnung bezüglich µg/µl wenig sinnvoll, da eine bestimmte Zahl von Primern eingesetzt werden muss und nicht eine bestimmte Masse.

4. Methoden

4.4.1.4. Überprüfung der PCR auf einem Agarosegel

Für eine eindeutige Identifizierung der amplifizierten Banden reichen i.a. 1-5µl mit 1µl 6xLoadingbuffer aus. Da bei der PCR oft kleine Fragmente amplifiziert werden, wird dafür ein 3%iges Agarosegel Verwendung finden. Vorgangsweise siehe **4.2.2.2.**

4.4.2. Sequenzieren von DNA mit PE-Systemen

Das Sequenziersystem von Perkin & Elmer vereinfacht die Arbeit der Sequenzierung entscheidend, da im BigDye-Reaction-Mix die für eine PCR benötigten Reagenzien (siehe Punkt **4.4.1.**) enthalten sind:

- Alle vier dNTPs und ddNTPs, die für eine DNA-Polymerisation gebraucht werden,
- Mg²⁺-Ionen, Pufferbestandteile und
- thermostabile Polymerase.

Die entscheidenden Komponenten sind die Didesoxyribonukleotide ddATP, ddTTP, ddCTP und ddGTP, welche an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Sobald die Polymerase die im geringen Verhältnis vorhandenen ddNTPs statistisch verteilt in die wachsende DNA-Kette einbaut, kommt es zum Kettenabbruch. Dies führt dazu, dass die Kette mit genau einem fluoreszierenden Nukleotid am Kettenende ausgestattet ist. Auf diese Weise entstehen Ketten, die 2 – n Nukleotide lang sein können, je nachdem wann das ddNTP eingebaut worden ist. Die Fragmente werden auf einem PAA-Gel nach ihrer Länge aufgetrennt. Da jedes der vier verschiedenen ddNTPs einen unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff trägt, kann bei Laserstimulation mittels eines Scanners die Sequenz auf dem Gel Bande für Bande abgetastet und als Bild sichtbar gemacht werden, welches computergestützt interpretiert und in Sequenzen umgewandelt wird. Diese werden mit den gängigen Programmen weiterverarbeitet und analysiert. Die PCR wird in 0,2ml-MicroAmp-PCR-Zentrifugenröhrchen durchgeführt.

Mengenangaben für Sequenzierungen von Plasmiden und Fragmenten bis max. 10kB

- 3-4µl Big Dye (reaction mix) (2)
- Zu sequenzierende DNA: 300-500ng bei Plasmiden, 25-50ng bei PCR-Produkten (3)
- Entsprechender Primer: 3 – 10pm (meist 1µl einer Standardverdünnung) (jeweils ein Ansatz für die 5´- und ein anderer für die 3´-Richtung) (4)
- auf 20µl Gesamtvolumen mit Aquadest auffüllen. (1)

Mengenangaben für Sequenzierungen von BAC-PAC-Klonen und Plasmiden weit über 10kB

- 16µl Big Dye (reaction mix) (2)
- 1-1,5µg zu sequenzierende DNA¹⁶ (3)
- 1µl entsprechender Primer einer 10pM Standardverdünnung (jeweils ein Ansatz für die 5´-Richtung und die 3´-Richtung) (4)
- auf 40µl Gesamtvolumen mit Aquadest auffüllen. (1)

Der Ansatz wird mit 2 Tropfen Parafinöl versiegelt. Dies ist bei PCR-Cyclern von P&E, Model GeneAmp 2400 nicht unbedingt nötig, da die Hitze auch am Deckel anliegt und ein Kondensieren von Wasser am Deckel des Gefäßes nicht erfolgt. Die Röhrchen werden in den PCR-Cycler in die entsprechenden Vorrichtungen des Heiz- / Kühlaggregates gestellt, die Heizklappe über die Vorrichtung gezogen und mit dem Schließhebel verriegelt. Der Cycler wird auf folgende Parameter programmiert:

Programmierung für eine Standard-Sequenzierung mit Fragmenten und Plasmiden bis max. 10kB

- 94°C 2min Aufheizen (vorbereitende Denaturierung der DNA)
30 – 40 Zyklen
- 95°C 10sec (Denaturierung der DNA)
- 50°C 10sec (Annealing-Temperatur nötigenfalls an Primer anpassen)
- 60°C 4min (Polymerase-Reaktion)
Zyklusende
- (60°C 7min resting temperature)
- 4°C Endtemperatur

¹⁶ Im Verhältnis zu kleineren Plasmiden enthalten Klone genomischer, eukaryontischer DNA einen enormen Anteil von Sequenzen, die nicht von Interesse sind (meist werden nur wenige hundert Bp zu Verifizierungszwecken sequenziert). Damit die Oligoprimer jedoch eine Primingsituation für die Polymerase an den richtigen Sequenzen durchführen können, muss annähernd die gleiche Anzahl von Molekülen eingesetzt werden, wie bei Standardplasmiden. Da BAC-PAC-Plasmide jedoch einige hundert kB umfassen können, ist die Masse der einzelnen Moleküle auch um den Faktor 100 Größer.

4. Methoden

Programmierung für eine Sequenzierung mit Plasmiden und BAC-PAC-Klonen weit über 10kB

- 95°C 5min Aufheizen (vorbereitende Denaturierung der DNA)
30 – 40 Zyklen
- 95°C 30sec (Denaturierung der DNA)
- 54°C 5sec (Annealing-Temperatur nötigenfalls an Primer anpassen)
- 60°C 4min (Polymerase-Reaktion)
Zyklusende
- (60°C 7min resting temperature)
- 4°C Endtemperatur

Nach der PCR wird der wässrige Ansatz mit TE-Puffer auf 100µl aufgefüllt und die Salze aus der Reaktion durch Ethanolfällung entfernt:

1. 10Vol% des Ansatzes 3mol Na-Acetat und 250Vol% –20°C kaltes Et-OH absolut werden nacheinander zugefügt.
2. Die Fällung wird 5min bei –20°C oder für sauberere Ergebnisse 30min bei RT gefällt und dann 30min bei 4°C mit 14kupm abzentrifugiert.
3. Der Überstand wird vorsichtig abgehoben und das Pellet optional mit 100µl 70%igen –20°kaltem Et-OH gewaschen.
4. Das 10min bei RT getrocknete Pellet kann nun entweder bei –20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert oder sofort in 2-4µl Loading-Buffer (1Teil Formamid, 4Teile 50mM EDTA und einige Körnchen Dextranblau) aufgenommen und resuspendiert werden.
5. Der Ansatz muss 5min bei RT inkubieren, bevor er für 2min auf 95°C erhitzt wird. Danach wird er auf Eis gekühlt und verbleibt dort, bis zum Laden des Sequenzgels. Dies führt dazu, dass die denaturierten DNA-Stränge keine Partner zur Sequenzpaarung finden können.
6. Auf das PAA-Gel werden pro Slot nur 1,5µl –2µl des Ansatzes aufgetragen, der Rest wird für weitere Studien bei –20°C aufbewahrt. Vor jedem neuen Auftragen muss die Probe nochmals auf 95°C erhitzt und dann auf Eis gekühlt werden.

4.5. Techniken der Zellkultur

Prinzip: Primäre HUVECs, Endothelzellen aus Venen menschlicher Nabelschnüre und die unregelmäßig geformten immortalen 293-Zellen werden in Kulturflaschen angesetzt und aufgezogen. Die HUVECs haben unter dem Lichtmikroskop eine regelmäßige, ganzrandige Form. Der Boden der horizontal gelagerten Flaschen wird für HUVECs vorher mit Gelatine ausgekleidet. Ist der Bewuchs der Bodenplatte vollständig (konfluent), d.h. ohne Zwischenräume zwischen den sich horizontal teilenden Zellen, können diese mittels Trypsin voneinander getrennt und ausgewaschen werden. Dazu muss das Medium abgesaugt werden, damit das Trypsin nicht vom proteinreichen Wachstumsserum abgepuffert wird. Die Kultur wird suspendiert und in die nächst größere Kulturflasche überführt (maximal 8 Passagen für HUVECs, 15 Passagen für 293-Zellen möglich). Die verwendeten Kulturflaschen werden horizontal gelagert und sind mit einem Verschluss versehen, der im Inkubationsraum leicht geöffnet werden muss, damit der Gasaustausch mit der definierten O₂-CO₂-Atmosphäre bei 37°C gewährleistet bleibt. Im Abstand von 2-3 Tagen muss das Nährmedium werden. Schlussendlich werden die Zellen geerntet und auf Kultur-Platten übertragen, wo sie für die Transfektion zur Verfügung stehen. Beim Hantieren mit Kulturzellen muss streng auf steriles Arbeiten geachtet werden. So ist es prinzipiell nötig, vor der Manipulation von Gerät und Medienbehältern sowohl Hände als auch Kontaktflächen mit 70% Et-OH zu desinfizieren. Es werden kein wiederverwendbaren Glaspipetten sondern serologische Einmalpipetten benutzt.

4.5.1. Bereitung, Aufbewahrung und Verwendungsdauer von Nährmedien

Die hier vorgestellten Nährmedien enthalten aus Kälbern oder Rinderfoeten gewonnenes Wachstumsserum sowie das sehr leicht oxidierbare Glutamin. Aus diesem Grund ist ein fertig abgemischtes Medium nur begrenzte Zeit haltbar. Glutamin muss wöchentlich zugesetzt werden (max. 3x). Das Wachstumsserum verliert seine Wirkung in wenigen Wochen. Nährmedien sind maximal einen Monat verwendbar, danach müssen sie verworfen werden. Alle Lösungen werden vor der Erstellung der Wachstumsmedien im Wasserbad auf 37°C erwärmt, damit die Zellkulturen keinen physiologischen Schock erleiden und das Glutamin vollständig gelöst werden kann. Das Wasser im Bad muss deionisiert sein, um Algenwachstum zu vermeiden. Nach dem Abmischen des Mediums wird es durch ein 0,2µm-Filterset sterilfiltriert.

4. Methoden

Mediengrundlagen:

M199, MEMα, DMEM:	Mediumbasis, 4°C Lagerung
SCS:	Supplemented Fetal Calf Serum, mit Fe(III) angereichert, -20°C Lagerung
FCS:	Fetal Calf Serum, -20°C Lagerung
NCS:	Newborn Calf Serum, -20°C Lagerung
Heparin:	Mucopolysaccharid zur Inhibierung des Fibroblastenwachstums, 4°C Lagerung
Glutamin:	200mMol, -20°C Lagerung
PenStrep:	Penicillin, 10.000 U/ml + Streptomycin, 10mg/ml:
ECGS:	Wachstumsfaktor für Endothelzellen, -20°C Lagerung
PSFG:	Penicillin (10.000 U/ml), Streptomycin (10mg/ml), Fungizon + 200mmol Glutamin, -20°C Lagerung

4.5.1.1. Wachstumsmedium für HUVECs

- M199: 500ml
- SCS: 80-100ml für 20%
- ECGS: 1-2ml
- Heparin: 130 μ l
- Antibiotika-Glutaminlsg: 10ml

4.5.1.2. Wachstumsmedium für Kulturzellen der Linie 293

Die Zellen der Linie 293 sind durch Adenovirus-5-Infektion immortalisierte Epithelzellen aus fötalen Nieren. Sie werden gerne als Modellorganismen anstelle von HUVECs genommen, da sie in vieler Hinsicht vergleichbare Experimente erlauben, jedoch einfacher zu handhaben und billiger zu halten sind. Zellen der 293-Linie haben im Gegensatz zu HUVECs einen Astrozytenaspekt, d.h. sie sind sehr unregelmäßig geformt und weisen verästelte Fortsätze auf. Zur Verwendung der Zelllinie 293 muss das folgende Wachstumsmedium vorbereitet werden:

- DMEM : 500ml
- FCS (Fetal Calf Serum): 50ml
- PenStrep: 5ml
- Glutaminlösung: 5ml

4.5.1.2.1. WACHSTUMSMEDIUM FÜR DIE PRODUKTION VON ADENOVIREN

Die im Laboralltag in Verwendung befindlichen adenoviralen Konstrukte sind aufgrund einer eingeführten Deletion der E1-Region replikationsinaktiv und benötigen zur Vermehrung eine Helferzelllinie, welche die E1-Region stabil ins Genom integriert hat. Die Produktion von Viren bedarf einer großen Menge an Ressourcen, weshalb das normale Medium für 293-Zellen nicht ausreicht. Es wird ein reichhaltigeres Nährmittel auf Basis des MEM α -Mediums von Gibco, das mit Ribonukleosiden angereichert ist, benötigt.

- MEM α ⁺ : 500ml
- NCS (Newborn Calf Serum): 50ml
- Penicillin, 10.000 U/ml + Streptomycin, 10mg/ml: 5ml
- Glutaminlösung (200mMolar): 5ml

4.5.1.3. Wachstumsmedium für Fibroblasten und humane glatte Muskelzellen (HUSMC)

- M199 500ml
- SCS 80-100ml für 20%
- Antibiotika-Glutaminlsg 10ml

4.5.2. Isolierung von HUVECs aus Nabelschnüren

Folgende Materialien sind für diese Arbeit pro Nabelschnur vorzubereiten:

- 1x PBS komplett zu 1L
- Fibronectinlösung (100 μ g/ml)
- 5 ml SCS
- Kollagenase Typ I (mit PBS komplett auf 0,1% verdünnt und steril filtriert)
- 2 Spritzen 50ml (vollständig mit PBS gefüllt)

4. Methoden

- 1 Spritze 20ml (mit 20ml Kollagenasenlösung gefüllt)
 - 2 Rundkopfkannülen
 - 2 Dreiweg-Kanülenventile von Discifix
 - 2 Bandklemmen (Kabelbinder)
 - 1 mit steriler Alufolie abgedecktes Metalltablett
 - 1 Anatomieschere
 - Mehrere Mullkompressen
 - Mehrere Bechergläser zum Auffangen von Flüssigkeiten
 - 1 Sterilbecken, mit Desinfektionsmittel zum Einstellen gebrauchten Materials
1. Frisch präparierte, humane Nabelstränge mit einer Minimumlänge von 10cm sind für die Isolierung von EC am besten geeignet. Die Arbeiten werden in der Sterilbank durchgeführt, und es ist darauf zu achten, zwei Paar Handschuhe zu tragen, um einer möglichen Infektion vorzubeugen (Schutz der eigenen Person!).
 2. Zunächst muss pro Nabelschnur eine kleine Kulturflasche mit 1 bis 1,5ml Fibronectin beschichtet werden. Die Flasche wird für etwa 30min bei 37°C waagrecht gelagert.
 3. Die Nabelschnüre werden mit 70% Alkohol äußerlich desinfiziert und mit Mullbinden abgetupft. Ungefähr ½cm von beiden Enden der Nabelschnur wird mit einer Anatomieschere abgetrennt, um die Venen besser zugänglich zu machen. Die größte der Adern ist die gesuchte Vene, die Arterien sind nur schwer zu finden und für die Präparation uninteressant.
 4. Eine Kanüle wird an einem beliebigen Ende der Nabelschnur in die Vene eingeschoben und mit einer Bandklemme dichtend fixiert.
 5. An diese Kanüle wird nun eine mit PBS gefüllte 50ml-Spritze montiert. Das lose Ende der Nabelschnur bleibt in einem Becherglas.
 6. Nabelschnur und Spritze werden möglichst senkrecht nach oben gehalten und die Vene mit PBS langsam durchgespült. Die Restflüssigkeit wird mit den Fingern langsam aus der Vene gepresst.
 7. Jetzt kann die 2. Kanüle in das andere Ende der Vene eingeführt, mit einer Bandklemme fixiert und ein Kanülenventil montiert werden. Das Ventil bleiben zunächst geöffnet.
 8. Eine 20ml-Spritze wird an die obere Kanüle montiert, um in die Vene Kollagenase einzuleiten, bis die Flüssigkeit aus dem freien Kanülenventil austritt.
 9. Am freien Ende kann nun das Ventil geschlossen und die Vene mit Kollagenase aufgefüllt werden (nicht zu prall, da die Schnüre platzen könnten).
 10. Die Nabelschnur wird entlang ihrer Ausdehnung mit den Fingern leicht gedrückt und für 7min auf 37°C inkubiert.
 11. Währenddessen wird ein Falcon-Bluecap mit 5ml SCS (stoppt die Kollagenasereaktion) vorbereitet.
 12. Bei diesem Arbeitsschritt dürfen keinerlei Verzögerungen eintreten: Die inkubierte Nabelschnur wird mit einem Kanülenventil über das Bluecap gehalten und das Ventil geöffnet. Daraufhin wird die Nabelschnur senkrecht gehalten und das andere Ventil geöffnet. Die Zellsuspension aus der Vene läuft nun aus.
 13. Um alle HUVECs auszuwaschen, wird die zweite Spritze mit 50ml PBS an das obere Ventil montiert. Durch leichten Druck wird nun die Vene gespült, bis die Falcon-Tube gefüllt ist. Dabei ist eine Schaumbildung möglichst zu vermeiden.
 14. Die Zellsuspension wird mit 1,5kupm bei RT für 8min zentrifugiert. Während dieser Zeit kann das überschüssige Fibronectin aus der kleinen Kulturflasche abgesaugt werden.
 15. Der Überstand des zentrifugierten Isolates wird vorsichtig abgegossen, das Zellpellet in 10ml HUVEC-Wachstumsmedium durch zweimaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette resuspendiert und sofort in die Kulturfläche überführt.
 16. Das Medium muss frühestens nach 4h, spätestens nach 24h gewechselt werden. Eine dicht gewachsene Kulturflasche kann weiter expandiert oder für spätere Verwendung auf flüssigem N₂ eingefroren werden. Zum Expandieren dieser Zellkultur siehe Punkt **4.5.4.ff**.

4.5.3. Auftauen eingefrorener Zellkulturen

1. 10ml Wachstumsmedium werden in einem Falcon-Bluecap auf 4°C abgekühlt. Die auf flüssigem N₂ präparierten Zellen werden im Wasserbad bei 37°C getaut. Dabei ist zu beachten, dass sie nicht völlig auftauen, da sonst das während des Friervorganges zur Stabilisierung der Zellmembranen verwendete Dimethylsulfoxid (DMSO) toxisch auf die Zellen wirkt.
2. Beim Öffnen der kleinen Aufbewahrungsbehälter müssen die Ränder des Schraubverschlusses vorher mit Et-OH sterilisiert werden. Der im Behälter herrschende Unterdruck saugt beim Öffnen die Umgebungsluft in das Innere, daher darf dies auch in einer Sterilbank erfolgen.
3. Die ca. 1ml Zellsuspension wird mittels Pipette in 10ml Wachstumsserum überführt und vermischt.

4. Methoden

4. Die Zellen werden anschließend durch Zentrifugation für 5min bei 1500upm, RT vom Medium und damit auch vom toxischen DMSO getrennt.
5. Das Pellet wird in 5ml Wachstumsmedium resuspendiert und entweder in eine Kulturflasche mit 80cm² Grundfläche (meist HUVECS) - wobei der Boden der Kulturflaschen für einen HUVEC-Ansatz mit 1%iger Gelatine ausgekleidet werden muss – oder in eine 172cm² Kulturflasche (293-Zellen) überführt und durch Schwenken gleichmäßig am Boden der Flasche verteilt. Die 175cm² Kulturflaschen müssen zuvor mit 20ml Wachstumsmedium befüllt werden.
6. Die Kulturen werden bei 37°C im Brutschrank für Zellkulturen mit leicht geöffnetem Deckel (Gasaustausch!) bebrütet. Dicht gewachsene Zellen können in die nächstgrößere Kulturflasche überführt werden (siehe dazu **4.5.9.**: Einfrieren von Kulturzellen)

4.5.4. Ausschwemmen von Zellen aus Kulturflaschen

Das Wachstumsmedium wird mittels einer an Vakuum gelegten Pasteurpipette an der Behälterkante ansetzend abgesaugt. Hierauf wird die Kultur 1x mit 10ml 1xPBS komplett¹⁷ (Phosphate-Buffer-Saline + Kalzium- und Kaliumsalzen) gewaschen, wobei auch hier darauf geachtet wird, dass das PBS eine Temperatur von 37°C aufweist und die Kultur nicht mit den Instrumenten in Berührung kommt.

Nach Absaugen von PBS wird 0,25% Trypsin in 10mmol HEPES auf die Kultur appliziert. Trypsin ist eine Protease, löst die interzellulären Verbindungen auf und erzeugt auf diese Weise aus dem Monolayer eine Zellsuspension. Folgende Mengen sind dabei relevant:

- Kulturflaschen mit 25cm² Grundfläche für 5ml Mediuminhalt: 1ml Trypsinlösung
- Kulturflaschen mit 80cm² Grundfläche für 15-25ml Mediuminhalt: 2ml Trypsinlösung
- Kulturflaschen mit 175cm² Grundfläche für 30-50ml Mediuminhalt: 3ml Trypsinlösung

Unter dem Lichtmikroskop kann beobachtet werden, wie die Zellen stark lichtbrechend werden, sich abkugeln und schließlich den Kontakt zu den anderen Zellen und dem Boden verlieren. Durch mehrmaliges, kräftiges Klopfen an der Seitenwand der Kulturflasche kann der Loslösungsprozess beschleunigt werden, damit das Trypsin nicht zu lange auf die Zellen einwirken und diese so schädigen kann.

SMCs sind sehr rigide und lassen sich nur durch langes Einwirken von Trypsin bei 37°C von der Grundfläche lösen. Oft müssen die schon abgelösten Zellen in Medium aufgenommen und entfernt werden, bevor auf die noch haftenden Zellen nochmals Trypsin appliziert wird. Verluste von bis zu 10% der Zellen sind dabei unvermeidbar.

Die Protease wird schließlich durch Zugabe des proteinreichen Wachstumsmediums abgestoppt (5ml bei kleinen, 10ml bei mittleren und großen Kulturflaschen). Um das Trypsin weitgehend von der Kultur zu entfernen wird die Suspension in ein Falcon-Bluecap überführt und bei RT bei 1,2kupm für 5min zentrifugiert. Das im Überstand enthaltene Trypsin kann nun abgesaugt werden.

4.5.4.1. Schnelles Ausschwemmen von 293-Zellen

Bei komplett dicht gewachsenen Zellen ist es nicht nötig, sie mit Trypsin zu vereinzeln. Jedoch muss darauf geachtet werden, dass die 293-Zellen tatsächlich konfluent sind, da diese Methode nur dann erfolgreich angewendet werden kann. Das alte Wachstumsmedium wird vor Ablösung der Zellen mit 3-6ml neuem ersetzt. Die Zellen werden nun mit mehreren kräftigen Schlägen an die Seitewände der Kulturflasche gelöst. Da 293-Zellen üblicherweise nicht in eine Gelatinematrix eingebunden sind, werden sie bei dieser Behandlung auch nicht zerstört. Um eine gleichmäßige Suspension zu erlangen, wird das Medium mind. 10x mit einer 10ml-Pipette auf- und abgesaugt. Die so suspendierten Zellen sind mehr für das Weiterziehen in 3-4 mit entsprechender Menge Medium vorgefüllten Kulturflaschen zu verwenden. Für das Aussähen in Kulturplatten müssen die Zellen auf konventionelle Art vereinzelt werden (siehe oben).

4.5.5. Überführen von Kulturzellen in andere Kulturflaschen

Das Pellet aus **4.5.4.** wird in 3-4ml Wachstumsmedium mittels eine 5ml Pipette durch mehrmaliges Auf- und Absaugen resuspendiert. Die Suspension kann nun in die nächste Kulturflasche überführt werden, in die zuvor die entsprechende Menge, 37°C warmes Wachstumsmedium gefüllt worden ist. Nach sanftem Mischen wird die Kulturflasche mit leicht geöffnetem Deckel (Gasaustausch!) im Brut-

¹⁷ PBS komplett wird für lebende, PBS defizient für nicht lebende Zellen verwendet. PBS defizient ist für manche Waschvorgänge fixierter Zellen günstiger. PBS komplett enthält 2-wertige Ionen, welche die Erhaltung der Membranproteine garantieren.

4. Methoden

raum bei 37°C gelagert. Der Boden der Kulturflasche muss vorher 1h mit 1%iger Gelatine bedeckt worden sein, die vor Verwendung der Kulturflasche abgesaugt wird; 293-Zellen brauchen für eine Besiedelung des Bodens keine Gelatinematrix. Soll die Kultur in einer Kulturflasche gleicher Größe nur erhalten werden, so entnimmt man 1ml Suspension und überführt sie in eine gleich große Kulturflasche.

4.5.6. Zählen von Zellen in der Neubauer'schen Kammer

Um zu verhindern, dass die Zellen im Kultur-Well übereinandergeschichtet anwachsen, müssen die Zellen vor ihrer Überführung gezählt werden. Pro cm² dürfen nicht mehr als 50.000 Zellen eingebracht werden (für ein 6-Well ca. 400.000 Zellen). Zu diesem Zweck werden 20µl der Zellsuspension (kann wahlweise vorher auf das doppelte Volumen verdünnt werden) in eine Zählkammer pipettiert. Diese wird unter dem Lichtmikroskop ausgezählt, wobei das 4x4 Raster die zu zählenden Zellen enthält. Der erhaltene Wert wird mit 10⁴ multipliziert und gibt die Anzahl der Zellen pro ml an. Nach Gebrauch wird die Zählkammer mit Ethanol gespült. Als grober Richtwert gilt für HUVEC-Zellen, dass bei einer dicht gewachsenen, 175cm² Kulturflasche vier 6-Well-Platten befüllt werden können (ca. 9,6 Mio. Zellen), für 293-Zellen liegt der Wert bei etwa sechzehn 6-Well-Platten (ca. 38,4 Mio. Zellen) bereit werden können. Die Suspension wird auf das Volumen verdünnt, das für die Anzahl an 6-Wellen errechnet wurde, die mit der ausgezählten Menge der Zellen befüllt werden können: In der Zählkammer wurden 100 Zellen gezählt. 100x10⁴ ergibt 1x10⁶ Zellen/ml. Das Gesamtvolumen der Zellsuspension beträgt z.B. 20ml, also ist die Gesamtanzahl der Zellen 1x10⁶ x 20 = 2x10⁷. Jedes 6-Well wird mit 2ml Zellsuspension, die 4x10⁵ Zellen enthalten, beladen. Um den Verdünnungsfaktor für die jeweilige Zellsuspension zu berechnen, bedient man sich der folgenden Formeln:

$$Fv = \frac{Zn \times 10^4}{Zw} \quad \text{Standardverdünnung:}$$

$$Va = Fv \cdot I \cdot Vs$$

- Fv*: Faktor der Verdünnung
Zn: Aus der Neubauer'schen Zählkammer ermittelte Zellzahl
Zw: Benötigte Zellen pro Well
Va: Volumen, mit dem die Zellsuspension aufgefüllt werden muss.
Vs: Entnommenes Volumen an Zellsuspension.
Diese sollte so gewählt werden, dass das benötigte Endvolumen für die Befüllung der geforderten Anzahl der Wells ausreicht.

Alternativ: Bei einer dicht gewachsenen Kulturflasche mit 175cm² Grundfläche kann diese komplizierte Methode des Zählens auch unterbleiben: Es genügt, die in 5ml Medium resuspendierten Zellen auf 100ml Medium aufzufüllen. In 1 ml einer solchen Suspension befinden sich dann ungefähr 4x10⁵ Zellen.

4.5.7. Auftragen der Zellen auf 6-Well-Platten

Kulturplatten mit 6 Nöpfen (Wells) zu je ca. 20cm² Grundfläche sind für die meisten Studien an Kulturzellen geeignet. Jedes Well bietet Platz für bis zu 10⁶ Kulturzellen. Die daraus geernteten Zellen ergeben genügend Material für aussagekräftige Assays (4.6.)

4.5.7.1. Bereitung der 6-Well-Platten

Der Boden der jeweiligen Kammern wird mit ungefähr 0,5ml 1%iger Gelatine (steht im 4°C-Kühlraum) bedeckt, die zuvor auf 37°C erwärmt und steril filtriert wurde. Diese verweilt in den Kammern für max. 30min und wird schließlich abgesaugt, so dass nur ein dünner Film aus Gelatine auf dem Boden zurückbleibt. Dieser Vorgang darf bei Verwendung von 293-Zellen unterbleiben. Zunächst muss das Pellet, das aus einer Kulturflasche wie unter 4.5.4. – 4.5.6. gewonnen und verarbeitet wurde, in einer Falcon-Bluecap resuspendiert werden wodurch möglicherweise vorhandene Zell-Cluster vereinzeln. Diese Zellsuspension wird entsprechend mit Wachstumsmedium aufgefüllt und durch vorsichtiges Schwenken des Flasche durchmischt.

Die vorbereitete 6-Well-Plate wird pro Kammer mit jeweils 2ml Suspension befüllt. Die Zellen der Suspension werden über Nacht auf den Boden der Wells absinken und Monolayer bilden. Diese Monolayer sind dann bereit für die Durchführung der Studien.

4. Methoden

4.5.8. Benutzen von 12-Well-Platten

Die Handhabung dieser Platten gestattet es, mit begrenzten Ressourcen sparsam umgehen zu können und trotzdem genügend Zellen zur Verfügung zu haben, um sie für Proteinassays oder ähnliche Verfahren, in denen eine nennenswerte Menge von Zellen eingesetzt werden muss, zu nutzen. Das Aussähen der Zellen wird wie ab **4.5.7.** beschrieben durchgeführt, jedoch werden hier immer nur die Hälfte aller verwendeten Zellzahlen und Volumina eingesetzt.

4.5.9. Einfrieren von Zellen zur Lagerung in flüssigem Stickstoff

Oft ist es nicht möglich oder nötig konfluent gewachsene Kulturzellen sofort zu verwenden. Zu diesem Zweck werden sie auf flüssigem N₂ gelagert. Dazu wird eine große Kulturflasche ausgeschwemmt (**4.5.4.**). Das entstandene Zellpellet wird in 4ml auf 4°C gekühlte Medienbasis, die mit 10% DMSO versetzt worden ist, aufgenommen. Diese Suspension muss nun rasch in 1,5ml Schraubbehälter überführt werden, welche zuvor auf Eis vorgekühlt worden sind. Die Behälter sind zuvor mit reichlich 70%igen Ethanol an den Außenseiten zu spülen, um eine Kontamination des Innenraumes beim Öffnen und Befüllen des Röhrchens zu verhindern. Die befüllten Behälter müssen in eine 4°C kalte, Isopropanol enthaltende Frierbox eingestellt werden. Diese Box wird bei -80°C ÜN gelagert. Dies führt dazu, dass die Zellen in einer definierten Zeit unter den Gefrierpunkt gekühlt werden, was ein Zerbersten der Zellen verhindert. Am nächsten Tag können die Behälter in flüssigen N₂ eingelagert werden. Zum Auftauen siehe **4.5.3.**

4.5.10. Transiente Transfektion nach der Lipofectamine-Methode

Transfektionen bringen Fremd-DNA über Liposomen in die Zellen ein, wobei die fragliche DNA transient vorliegt und langsam abgebaut wird, was dazu führt, dass sie nach einer gewissen Zeit dem Expressionsapparat nicht mehr zur Verfügung steht. Als Kontrolle zur Effizienz der Transfektion wird oft ein β -Galaktosidase-Reporterplasmid (kodiert für Lac-Z) unter der Kontrolle eines hCMV-Promoters eingesetzt. Ob es überhaupt zu einer Transfektion gekommen ist, kann mittels eines anderen Plasmides festgestellt werden: Beispielsweise erzeugt ein EGFP-Plasmid (enhanced green fluorescent protein) eine grüne Fluoreszenz, wenn die Zellen die Plasmide aufgenommen haben (statistisch sollten dann alle verwendeten Plasmide in die Zellen eingedrungen sein). Alle Arbeiten müssen in der Sterilbank durchgeführt werden.

1. Die Masterlösung wird pro Ansatz in Polystyren-Röhrchen aliquotiert und kann mit den entsprechenden Plasmiden beschickt werden.
2. Zunächst muss die für genutzte Plasmid-DNA mit in der Medienbasis (ohne Zusätze) verdünntem Plus-Reagenz 15min kompaktiert werden. Für die verschiedenen eingesetzten Mengen siehe **Tabelle 5.10.1.I.** Als Behälter für die Lösungen A+B werden 3ml Polystyrene-Falcon-Tubes mit Pressverschluss benutzt. Die Masterlösung kann in einem 2ml MCT angesetzt werden.
3. Die Transfektionslösung wird mit der Liposomensuspension vorsichtig vermischt und weitere 15min inkubiert. Grundsätzlich sollten alle applizierten Medien auf 37°C erwärmt sein, damit die Zellen nicht durch die Temperaturschwankungen beeinflusst werden können.
4. Nach der Inkubationszeit werden die Ansätze mit 800 μ l serumfreiem M199 aufgefüllt.
5. Die Ansätze werden auf die vorher mit je 1ml M199 (oder DMEM) gewaschenen 6-Well-Kultuplatten zu jeweils 1ml appliziert.
6. Nach Applikation der Transfektionsansätze, werden die Kulturen für 2h (4h bei 293-Zellen) im Brutschrank bei 37°C inkubiert.
7. Die transfektierten Kulturen müssen danach mit 1ml entsprechendem Wachstumsmedium gewaschen, mit 2ml des selben Mediums bedeckt und bei 37°C ÜN inkubiert werden.
8. 293-Zellen werden nicht gewaschen, sie werden nach dem Absaugen der Transfektionslösung lediglich mit 2ml Wachstumsmedium bedeckt, da ansonsten die Gefahr der Ablösung der Zellen besteht.

Die anschließenden Assays sind sowohl bei HUVECs als auch bei 293-Zellen nach 24-48h durchführbar. Reportergenaktivitäten gelten dann als Hinweis für eine erfolgreiche Aufnahme wahrscheinlich aller verwendeten Plasmide. Abgestorbene Zellen sind als kugelige, abgehobene und stark leuchtende Körper erkennbar.

4.5.10.1. Bereitung der Transfektionsansätze für 6-Well

Pro Transfektionsansatz, d.h. pro Kultur-Well werden folgende Mengen für die verschiedenen Lösungen benötigt:

4. Methoden

Masterlösung für HUVECs pro Well	
• Serumfreies M199:	92 μ l
• Plusreagenz:	8 μ l
• optional β -Galaktosidase-Vektor unter hCMV-Promoterkontrolle z.B.:	0,4 μ g
Masterlösung für 293-Zellen pro Well	
• Serumfreies DMEM:	96 μ l
• Plus Reagenz:	4 μ l
• optional β -Galaktosidase-Vektor unter hCMV-Promoterkontrolle:	0,4 μ g
<i>Ansatzlösungen = Lösung A:</i>	
Aliquot aus Masterlösung + Plasmid-DNA:	
	0,4 μ g bis 1,2 μ g
<i>Lösung B:</i>	
• Lipofectamine:	4 μ l
• <u>Serumfreies M199 oder DMEM (293):</u>	96 μ l

Tabelle 4.5.10.1.I.: Vorschlag für Transfektionslsg.

4.5.11. Induzierung von Kulturzellen in 6-Well mit Signalproteinen

Es sind eine große Anzahl von Proteinen bekannt, die wichtige Aufgaben in der Reizweiterleitung oder Reizverarbeitung der menschlichen Zelle wahrnehmen. $TNF\alpha$ ist z.B. ein wichtiger Mediator der Apoptose, während VEGF das Wachstum von Endothelzellen stimuliert. Sowohl HUVECs als auch SMCs oder Fibroblasten sind in der Lage solche Signale zu verarbeiten. Signalproteine werden üblicherweise bei -80°C gelagert und müssen auf Eis aufgetaut werden. Die verwendete Stocklösung muss vor Gebrauch auf etwa 10-20 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt werden. Für ein 6-Well bedeutet dies, dass die entsprechende Menge einer Protein-Stocklösung in 1,5ml Wachstumsmedium gelöst werden (50-100ng / 6-Well). Die Verdünnungen müssen rasch eingesetzt werden, um einem möglichen Absinken der Signalproteinaktivität entgegenzuwirken. Vor der Applikation müssen die Zellen mit Wachstumsmedium gewaschen werden, um die möglicherweise in Lösung befindlichen Signalprotein-Rezeptoren zu entfernen, die das eingesetzte Protein abfangen würden. Soll eine Stimulation von HUVECs durch den Mediumwechsel verhindert werden, muss die Induktion im 24h altem Medium durchgeführt werden. Die Reizverarbeitung wird nach frühestens 4h - 6h über entsprechende Assays sichtbar.

4.6. Assays von Kulturzellen und Ermittlung von Reportergenaktivitäten

Die Aktivität von Promotoren, die in Plasmide kloniert und in Kulturzellen transferiert worden sind, können durch die Koppelung an ein Reporter gen, z.B. an das Luciferasegen, Auskunft über die Stärke eines Expressionssystems geben. Das bedeutet, dass ein Maß der Expressivität des gefragten Promotors proportional zur Aktivität eines damit gekoppelten Proteins ist, welches entweder eine messbare Farbreaktion (β -Galaktosidase + Xgal) oder Fluoreszenz (Luciferin, YFP, etc.) verursacht. Zur Normierung der Werte werden meist Plasmide eingesetzt, die in definierter, konstitutiver Weise ein Reporterprotein exprimieren (z.B. unter hCMV-Promoterkontrolle). Die daraus ermittelten Werte werden dann in Relation zu jenen Werten gesetzt, die aus dem für die Studien konstruierten Expressionssystem generiert werden konnten.

4.6.1. Freeze-Thaw von Transfektionsansätzen

1. Das Medium wird aus den Wells abgesaugt, mit 1xPBS gewaschen, mit 1ml PBS bedeckt und mit einem Gummispatel vorsichtig abgeschabt (zwischen den einzelnen Wells den Spatel gut abspülen und abtrocknen).
2. Die Zellen werden suspendiert und aus den Wells jeweils in ein analog den Transfektionsansätzen beschriftetes 1ml MCT überführt. Diese werden bei 4°C , 9kump, 2min zentrifugiert und 2min auf Eis gestellt.
3. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt. Die Pellets werden mit 50 μ l 0,1molarer Kaliumdihydrogenphosphatlösung auf Eis (Proteasenhemmung) suspendiert und dann durch dreimaliges Frieren in flüssigem N_2 (1min) und anschließendem raschen Auftauen im 37°C Wasserbad (30sek.) lysiert.
4. Die Organellen und Membranfragmente werden durch Zentrifugieren bei 4°C , 14kump für 10min entfernt. Der Überstand wird in ein neues MCT überführt.

4. Methoden

4.6.2. Normierung von Assays

Die Herstellung von Zellextrakten hat oft die Messung von Enzymaktivitäten zum Ziel. Dadurch kann z.B. die Menge oder Aktivität eines Enzyms ermittelt werden und gilt so in weiterer Folge als Maß für die Aktivität von Promotern ihrer vorgeschalteten Gene. Solche Daten sind jedoch nur dann wirklich aussagekräftig, wenn sie gegeneinander mittels Referenzwerten normiert werden. Dies minimiert die Fehler die sich aus dem Assaysystem, Zell- und Extraktmengen, Wartezeiten zwischen Messungen usw. ergeben können. Zu diesem Zweck sind die Zellen vorher auch mit einem Referenzplasmid kotransfiziert worden. Dieses Referenzplasmid exprimiert unter einem inerten, d.h. in diesem System in seiner Aktivität unbeeinflussbaren Promoter ein Protein oder Enzym, dass einen durch den Assay stabilen Referenzwert in Abhängigkeit der Zahl an transfizierten Zellen liefert. Dieser Referenzwert wird aus dem selben Zellextrakt ermittelt, mit dem auch der eigentlich angestrebte Assay durchgeführt wird. Die Werte aus dem Assay werden durch Division mit dem jeweils zugehörigen Referenzwerten aufeinander abgestimmt und so quantitativ vergleichbar: Ein Plasmid mit einem Promoter unbekannter Stärke, dass einem Luciferasegen vorgeschaltet ist, kann durch Kotransfektion mit einem Referenzplasmid normiert werden, welches durch den hCMV-Promoter für eine gleichbleibende, konstitutive Expression von Lac-Z sorgt. Der Wert aus dem Luciferaseassay wird durch den Wert des β -Gal-Assays dividiert und so vergleichbar zu allen jenen Transfektionen gemacht, die mit derselben Masterlösung behandelt worden sind (die Masterlösung enthält i.d.R. das Referenzplasmid).

4.6.3. Messung der Fluoreszenz von GFP

Da GFP und ähnliche Reporterproteine direkt durch UV zur Fluoreszenz angeregt werden können, müssen keine besonderen Vorbereitungen getroffen werden, um ihre Aktivität zu messen. Das Extrakt aus **4.6.1.** sollte zu diesem Zweck mit Kaliumhydrogenphosphatpuffer auf 100-200 μ l aufgefüllt und mind. 100 μ l davon in einen Napf einer 96-Well Mikrotiter-Platte eingefüllt werden. Die Platte mit den Proben wird dann von einem Fluoreszenzspektrometer ausgelesen (Excitationsfilter bei \sim 488nm Wellenlänge, Emissionsfilter bei \sim 507nm). Für eine Normierung eignet sich z.B. die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mit dem Rest der Probe durchzuführen.

4.6.4. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration über einen Bradfordassay

Zur Normierung von Reportergenaktivitäten kann auch, obwohl mit größerer Ungenauigkeit, die Gesamtproteinkonzentration aus Zell-Lysaten mittels eines Bradfordassays herangezogen werden. Dazu werden aus BSA und dem eingesetzten Lysatpuffer eine Standardlösung hergestellt, an der die weiteren Messungen geeicht werden.

Bradfordlösung: Eine Mischung aus Biorad-Bradfordreagenz zu H₂O im Verhältnis von 2:8

Standartlösung: 50mg BSA in 10ml Lysatpuffer = 5 μ g BSA / μ l Puffer. Aus dieser Lösung wird zunächst 1 μ l in ml Bradfordlösung pipettiert. Es kann nach Vortexen rasch eine Blauverfärbung der Lösung wahrgenommen werden.

1. Die Proben werden mit einem Volumen zwischen 1-20 μ l in 1ml Bradfordlösung pipettiert.
2. Ist im Vergleich zur Standartlösung die Blauverfärbung sehr schwach, so muss zunächst die Standartlösung um Faktor 10 verdünnt werden und nochmals mit 1 μ l in eine Bradfordlösung pipettiert werden. Die Blauverfärbung der Standartlösung sollte in etwa gleich stark sein, wie jene der Probenlösung.
3. Aus der Verdünnung der Standartlösung wird eine Verdünnungsreihe angesetzt, die unterschiedliche Mengen an Proteinen definieren z.B.: 0,1 μ g, 0,5 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 5 μ g. Die Verdünnungen werden in den gleichen Volumina eingesetzt wie die Proben. Die Standartverdünnungen dienen der Messung als definierte Eichgerade.
4. Um den Hintergrund von allen Messungen abzuziehen, wird eine Leerprobe angesetzt, in welche das entsprechende Volumen Lysatpuffer zugesetzt wird.
5. Die Bradfordansätze (je 1ml+Probenvolumen) werden in Plastik-Kuvetten im Spektrophotometer bei 595nm gemessen.
6. Mittels der Standartlösungen lassen sich aus den Absorptionswerten die Proteinkonzentrationen in μ g/ μ l errechnen.

4.7. Screening von Klon-Bibliotheken

Die DNA genomischer PAC- oder BAC-Klone wird für Analysezwecke an Filter immobilisiert. Diese DNA-Klone sind punktförmig anhand eines Rasters ausgerichtet, d.h. jeder Klon befindet sich an einer definierten Koordinate auf seinem Filter. Die Klone einer Library bestehen aus einer Anzahl von Frag-

4. Methoden

menten, die aus Verdauen genomischer DNA gewonnen wurden und in bakterielle Plasmide eingeführt worden sind. Sie decken dabei das gesamte menschliche Genom ca. 10-12 Mal ab. Werden nun Sonden aus einer bestimmten cDNA mit den Filtern hybridisiert, so werden genau jene Klone markiert, die das entsprechende Gen enthalten. So ist man in der Lage, mittels der identifizierten cDNA den genomischen Klon ausfindig zu machen. Anhand der Koordinaten auf dem Filter, lassen sich die Klone dann bestellen und weiter analysieren. Hybridisierte Filter dürfen nicht zu lange dem Licht ausgesetzt werden, da die UV-Anteile v.a. der Entladungsröhrenlampen die Nukleinsäuren quervernetzt und die Hybride nicht mehr abgewaschen werden können. Die verpackten Filter werden auf der Innenseite der Entwicklerkassetten mittels Klebefilm mit der Markierung nach oben fixiert. An den Rändern des Filters, z.B. an der linken oberen und rechten unteren Ecke werden Markierungstreifen angebracht, die vorher durch Belichten aktiviert worden sind: Sie phosphoreszieren wenige Minuten, weshalb die Schritte bis zur Entwicklung rasch durchgeführt werden müssen, soll eine ausreichende Orientierungshilfe auf dem Film sichtbar werden. In der Dunkelkammer werden auf die Filter sensitive Röntgenfilme aufgelegt und die Exponierkassetten sogleich derart verschlossen, dass der Film dabei nicht verrutscht. Damit auch schwache Signale durch zu starke Molekularbewegung nicht vermindert werden, müssen die Kassetten bei -70°C ÜN gelagert werden. Anhand des Signal-Rauschabstandes kann nach Entwicklung des Films entschieden werden, ob eine Exponierung wiederholt werden soll, ob stark- oder mittelsensitiver Film verwendet werden soll oder die Dauer der Exponierung des Filters auf den Film erhöht oder vermindert werden soll, damit eine einwandfreie Zuordnung des Signals zu seinem Klon anhand der Filterkoordinaten getroffen werden kann

4.7.1. Markierung der Sonden mit radioaktivem ATP

Um die Sonden zu generieren und zu markieren werden die benötigten DNA-Fragmente durch Verdau aus ihrem Plasmid freigesetzt. Damit eine ausreichende Menge dieser Fragmente zur Verfügung steht, werden die Plasmide mit einem doppelten Verdauansatz wie unter 4.1.2. umgesetzt. Zu beachten ist, dass für alle Hybridisierungsvorgänge die Fragment-DNA immer aus einer low-melt-Sea-Plaque-Agarose isoliert wird, damit die Hybridisierung nicht durch störende Zusätze aus normaler Agarose gestört werden kann. Die Konzentration der Gesamtausbeute berechnet man nach folgender Formel:

$$\frac{D \times A \times F}{P \times E} = []$$

<i>D</i> :	Menge der eingesetzten DNA in μg
<i>A</i> :	Prozentwert der zu erwartenden Ausbeute aus der Methodik, zumeist 50
<i>F</i> :	Länge des Fragmentes in Bp
<i>P</i> :	Länge des Gesamtplasmides in Bp
<i>E</i> :	Volumen des erhaltenen Eluats in μl

Der Ansatz wird in einem 1ml MCT durchgeführt und gilt für das Hybridisieren eines Filters normaler Größe (ca. 50cm^2). Je nach Größe des Filters, können diese Mengen mit einem entsprechenden Faktor multipliziert werden:

- 25ng Sonden-DNA
- auf $22\mu\text{l}$ mit H_2O Auffüllen
- $10\mu\text{l}$ Random Oligonucleotide Primers aus dem Prime-it-Kit von Stratagene

Dies wird 5min bei 95°C im Thermomixer (rechtzeitig auf Temperatur bringen) geschüttelt, kurz abzentrifugieren und auf RT abgekühlt. Alle weiteren Schritte werden in einem für radioaktive Arbeiten vorgesehenen Labor unter Beachtung der entsprechenden Sicherheitsrichtlinien durchgeführt.

- $10\mu\text{l}$ 5x primer buffer aus dem Prime-it-Kit
- $5\mu\text{l}$ radioaktives $\alpha\text{-P}^{32}\text{-ATP}$ (370mBq/ml)
- $1\mu\text{l}$ Klenow-Fragment-Polymerase aus dem Prime-it-Kit
 $48\mu\text{l}$ Gesamtvolumen

Diese Lösung wird für 5-10min bei 37°C im Thermomixer gemischt, wonach es nun zur Ausbildung radioaktiver Sequenzen kommt. Um die Reaktion zu stoppen, werden dem Ansatz $2\mu\text{l}$ Stopmix aus dem Prime-it-Kit zugefügt und mit $100\mu\text{l}$ 1xTE pH8 aufgegossen.

4. Methoden

4.7.1.1. Fraktionierung der markierten DNA

1. Um die freien Nukleotide von den Sonden abzusondern, wird der Ansatz mit einer Sephadex-G50 (G25) -Säule aufgetrennt. Die Säule ist versiegelt, wird bei 4°C gelagert und enthält eine Pufferlösung, die vor Gebrauch abgegossen wird.
2. Um sie zu äquilibrieren (noch außerhalb des Sicherheitslabors), wird der untere Verschluss geöffnet, die Säule in einer Halterung aufrecht fixiert und zweimal mit 1xTE pH8 bis zum Rand aufgegossen.
3. Die Säule wird nun vorsichtig auf eines von 9 vorbereiteten 1ml-MCT gesetzt. Jetzt kann der gesamte Labelansatz auf die Säule aufgetragen werden.
4. Da die Sequenzen erst nach 400µl in größeren Mengen eluieren, werden noch weitere 200µl zugefügt, bevor die Säule auf das 2. MCT gesetzt wird. Ab nun wird die Säule nach dem Durchfluss von 100µl auf einen neuen Behälter gesetzt.
5. Danach stehen 9 Fraktionen zur Verfügung, deren Strahlungsintensität mit einem wenig sensitiven Geigerzähler gemessen wird. Die Röhrchen werden immer im gleichen Abstand zum Messrohr gehalten. Die Fraktionen mit dem höchsten Strahlungsanteil (meistens Fraktion 3-5) werden aufbewahrt und zu einer zusammengefasst, alle anderen verworfen.
6. Die späten Fraktionen enthalten fast nur noch freie Nukleotide und sollten auch dann verworfen werden, wenn die Strahlungsaktivität hoch erscheint.

4.7.1.2. Bestimmung der Strahlungsdichte markierter DNA

Die Strahlungsdichte wird durch den Liquid-Scintillation-Analyzer von Packard gemessen. Zu diesem Zweck wird der markierten DNA 1µl Lösung entnommen und diese zusammen mit der Pipette in einen verschließbaren Messbehälter überführt. Der Behälter wird in den dafür geeigneten Schlitten eingestellt. Dieser Schlitten enthält an seiner linken Seite eine Vorrichtung zum Einsetzen eines Programmmoduls. Dieses Modul sorgt für die Abarbeitung einer bestimmten Messmethode, z.B. Modul 1 für die hier benötigte Messung nach Cerenkov. Das Modul muss durch Ausziehen seiner Messfahne aktiviert werden. Nun kann der Messvorgang nach Schließen der Apparatur durch drücken der Starttaste durchgeführt werden. Der erhaltene Wert wird mit der Anzahl der zusammengefassten Fraktionen x 100 multipliziert, z.B. 200.000cpm x 3 Fraktionen x 100 = 6×10^7 cpm (counts per minute).

4.7.2. Durchführung der Hybridisierung

1. Der Basispuffer wird im Wasserbad auf 65°C erwärmt. Ein gut gereinigter Hartplastikbottich wird kontaminationsfrei und rutschsicher im Wasserbad eingestellt und mit 100-300ml Pufferlösung (variiert mit der Anzahl der zu hybridisierenden Filter) befüllt.

Basispuffer:

- 1590ml Aquadest
 - 400ml 20xSCSC (NaCl-, Na-Citrat-Lösung)
 - 10ml 20% SDS
2. Für die Vorhybridisierung werden in diese Lösung 300mg pulverförmige mRNA aus der Torula-Hefe eingestreut.
 3. Der Trog wird mit einem Deckel verschlossen und kann nach 5min aus dem Wasserbad entnommen werden.
 4. Die Filter werden nacheinander mit der Markierung nach oben blasenfrei eingelegt. Jeder Filter wird vom anderen durch einen netzförmigen Spacer getrennt.
 5. Der mit dem Deckel verschlossenen Trog wird wieder ins Wasserbad gestellt und die Filter bei 65°C für 2h unter Schwenken prähybridisiert.
 6. Für einen Labelansatz mit 8ml Puffer müssen 8×10^6 cpm dem Labelmix entnommen, bei 200.000cpm/µl des Sondenansatzes also 40µl Sonden-DNA-Lösung und in einem MCT 5min bei 95°C im Thermomixer denaturiert werden. **VORSICHT: Der Deckel des Röhrchens muss perforiert werden, damit sich nicht durch entstehenden Überdruck das MCT öffnet und dabei Radioaktivität in die Umgebungsluft entweichen kann!**
 7. Der Trog mit den Filtern kann nun wieder aus dem Wasserbad entnommen werden. Der Deckel wird so abgelegt, dass die Filter darauf gelagert werden können. Diese werden mit einer sauberen Pinzette an einer Ecke festgehalten und aus dem Puffer gehoben. Sie werden leicht abgetropft und auf der Innenseite des Deckels gelagert.
 8. In den Puffer wird nun die gesamte denaturierte Sonden-DNA mit einer Gilsonpipette eingebracht. Dabei ist äußerste Vorsicht geboten, da hier die Radioaktivität leicht verteilt werden kann. Es ist nicht möglich, den Trog hinter Plexiglas zu behandeln, daher sollte entsprechende Schutzkleidung angelegt bzw. rasch gearbeitet werden.

4. Methoden

- Die Filter werden nun in die Hybridisierungslösung eingelegt und mit einer Pinzette oder einem anderen, sauberen Gegenstand die Luft zwischen den Filtern ausgepresst.
- Der Trog wird wieder verschlossen und in das Wasserbad gestellt und ÜN bei 65°C unter Schwenken inkubiert.
- Am nächsten Tag können die Filter in drei Schritten mit dem Basispuffer gewaschen werden. Dazu wird als erstes die Hybridisierungslösung entsorgt, indem sie an über die Ecke des geschlossenen Troges in den für radioaktive Lösungen vorgesehenen Abfluss gegossen wird (der Deckel darf nicht dicht schließen).
- Nun werden die Filter 1x für 5min bei 65°C im Wasserbad unter Schwenken gewaschen, anschließend noch 2x unter den selben Bedingungen für 15min. Die Waschflüssigkeiten werden als radioaktiver Abfall entsprechend entsorgt.
- Die gewaschenen Filter werden in Plastikfolie möglichst dicht, blasen- und faltenfrei verpackt.
- Nach den Arbeiten muss der Filter von den Sonden durch Kochen in Wasch-Off-Puffer befreit werden (Stripping):

Wash-Off-Puffer:

- 1,25ml 20% SDS
- 248,75ml Aquadest

4.7.3. Exponieren der hybridisierten Filter auf Röntgenfilm

- Um die Signale der positiv markierten Kolonien auswerten zu können, muss das Signal zunächst sichtbar gemacht werden.
- Die verpackten Filter werden zusammen mit einem phosphoreszierenden Orientierungsmarker auf die Deckelinnenseite einer Exponierkassette mit Klebestreifen rutschfest fixiert.
- Auf den Filter werden danach in der Dunkelkammer Röntgenfilme mit mittlerer Sensitivität aufgelegt und die Kassetten werden fest und lichtdicht verschlossen. Der Film darf dabei nicht verrutschen.
- Da die belichteten Orientierungsmarker die aufgenommene Lichtenergie nur ein Paar Minuten abstrahlen können, darf die Zeit vom anbringen des Markers bis zum Schließen der Kassette nur sehr kurz sein.
- Die Exponierkassetten werden nun bei -70°C ÜN gelagert. Die Abkühlung führt dazu, dass auch schwache Signale nicht von starken Molekularbewegungen vermindert werden.
- Nach der Belichtung durch die Filter, werden die Kassetten 1,5h bei Raumtemperatur gelagert: Sofortiges Entwickeln der kalten Filme könnte zu Signalverlust durch den Entwickler behinderndes Kondenswasser führen.
- Es wird erwartet, dass bei einer PAC-Library eines menschlichen Genoms 1/3 der Filter 1 bis 2 positive Signale enthalten. Anhand der entwickelten Filme lässt sich der Signal-Rauschabstand abschätzen. Ist das Hintergrundrauschen zu hoch oder das Signal so stark, so dass eine Zuordnung zum Signalmuster (auf dem Koordinatenblatt abgedruckt) nicht möglich ist, muss kürzer exponiert oder ein Film mit geringer Sensitivität verwendet werden. Ist das Signal zu schwach, sollte länger exponiert oder ein Film mit höherer Sensitivität verwendet werden.
- Die Zuordnung, welche Schwärzung ein Signal und welche nur ein Rauschen ist, ist oft nicht einfach. Vielfach helfen Vergleiche mit früheren Filmen desselben Filters.
- Die entwickelten Filme sollten einige Minuten trocknen, da sie durch die Aufnahme von Entwicklerflüssigkeiten in ihrer Größe variieren können, ebenso wie die Filter selbst. Daher sollten die Punkte in unmittelbarer Nähe eines Signals mit Filzschreiber markiert werden, um eine eindeutige Zuordnung des Signals in seinem Koordinatenbereich auch nach Trocknung des Films zu ermöglichen.
- Das Signal selbst tritt hierbei doppelt auf, da die DNA eines Klons auf zwei Punkte verteilt innerhalb eines Koordinatenfeldes in einem bestimmten Winkel aufgetropft wird. Anhand dieses Winkels können mittels der Signalkarte die Koordinaten des Klones genau bestimmt und nicht so leicht verwechselt werden. Dazu bedient man sich der folgenden Formel:

$$x_{ab} = f(x_1 - I) + x_2$$
$$y_{ab} = f(y_1 - I) + y_2$$

x_{ab} :	x-Koordinate von Signal a bzw. Signal b
y_{ab} :	y-Koordinate von Signal a bzw. Signal b
f :	Filter-Faktor (5 für ein 5x-Raster und 4 für ein 4x-Raster)
x_1 :	x-Koordinate des Klons im großen Raster
y_1 :	y-Koordinate des Klons im großen Raster
x_2 :	x-Koordinate des Klons im Signalmuster
y_2 :	y-Koordinate des Klons im Signalmuster

4. Methoden

4.8. Adenoviren als Transfizierungssystem

Adenoviren eignen sich zur Etablierung von transienten Expressionssystemen. Da diese Partikel auch im menschlichen Organismus wirksam werden können, müssen bei der Arbeit mit solchen Vektoren die Sicherheitsregeln für L2-Labors ausnahmslos und genau eingehalten werden.

4.8.1. Vorbereitung der zur Produktion von Adenoviren bestimmten 293-Zellen

Da 293-Zellen nach Infektion bzw. Transfektion mit entsprechenden Plasmide eine große Anzahl von viralen Proteinen und Nukleinsäuren produzieren, werden die Kulturzellen entsprechend stark gefordert. Die Qualität und Quantität der Partikel hängt insbesondere vom Zustand der Zellen ab. Diese dürfen nicht zu alt sein (max. 8. Passage) und dürfen keine Mangelsituationen erleiden. Um dies zu vermeiden werden die Zellen ausschließlich mit besonders reichhaltigen Medien versorgt (**4.5.1.2.1.**): Die weitere Handhabung entspricht im wesentlichen der unter **4.5.** beschriebenen.

4.8.2. Herstellung von Primärviren

Der verwendete Transfervektor pΔE1 ist allein nicht in der Lage, nach Einführen in eine Kulturzelle Viruspartikel zu generieren. Dafür sind noch zwei weitere Voraussetzungen zu erfüllen:

1. Kotransfektion mit einem Rekombinationsvektor (pJM17) und
2. Transfektion in 293-Zellen. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine stabile Integration der E1-Region des Adenovirusgenoms aus, welches dem mit pJM17 rekombinierten pΔE1 ermöglicht, die Replikation des Virusgenoms und die Translation der benötigten viralen Proteine voranzutreiben und funktionstüchtige Viren zu bilden. Diese können deshalb nur in 293-Zellen nicht aber in anderen Zelltypen vermehrt werden.

4.8.2.1. Vorbereitung der Zellen

1. 293-Zellen werden in Kulturflaschen mit 175cm² Grundfläche konfluent herangezogen. Dazu wird das Wachstumsmedium (25ml) wenigstens alle 3 Tage gewechselt, am besten nach einem Wochenschema, z.B. Montag, Mittwoch und Freitag.
2. Die Herstellung der 6-Well-Platten wird nach dem oben beschriebenen Schema zu Wochenbeginn gestartet: Dabei werden die Zellen, wie unter **4.5.4.ff** beschrieben, ausgeschwemmt und Pelletiert.
3. 4x10⁵ Zellen sollen pro Well ausgesät werden, diese können entweder korrekt ausgezählt oder nach einer vereinfachten Methode verarbeitet werden: Hierzu wird das Pellet zunächst in 4ml Wachstumsmedium resuspendiert und auf 2 Falcon-Bluecaps aufgeteilt und auf je 50ml mit Medium aufgefüllt.
4. In 1ml dieser Suspension befinden sich nun ca. 4x10⁵ Zellen, vorausgesetzt, die Suspension wird häufig durchmischt, da sich die Zellen rasch absetzen. Somit können pro Well je 1ml des Mediums mit 1ml der Zellsuspension vermischt werden, um die richtige Zelldichte zu erreichen. Insgesamt ist es möglich pro Kulturflasche etwa acht 6-Wells vorzubereiten.

4.8.2.2. Durchführen der Transfektion

Für die Transfektion von 293-Zellen mit dem Transfervektor pΔE1 (üblicherweise 6,9kB + Insert) und dem replikationsdefizienten Rekombinationsvektor, der den größten Anteil des Viralen Genoms enthält (ca. 36kB) wird die Methode der CaPO₃-Präzipitation von Stratagene angewendet. Dafür werden 3 Lösungen benötigt:

1. **90µl-DNA-Mix in H₂O**: Dieser enthält die DNA in einem Verhältnis von pΔE1 : pJM17 = 2 : 5. Für jeden Ansatz werden 6 Verdünnungsstufen vorbereitet mit 0, 1, 2, 3, 4 und 6µg Gesamt-DNA-Menge:

Komponenten	Ansatz 0	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5
pΔE1	0	0,3µg	0,6µg	0,9µg	1,2µg	1,8µg
pJM17	0	0,7µg	1,4µg	2,1µg	2,8µg	4,2µg
H ₂ O	90µl	ad 90µl	ad 90µl	ad 90µl	ad 90µl	ad 90µl

Tabelle 4.8.2.2.I.

2. Jeder DNA-Mix wird jeweils in ein Polystyren-Röhrchen überführt und unter leichtem Schütteln mit 10µl der **Transfektionslösung 1** von Stratagene ergänzt.

4. Methoden

3. Dazu kommen noch 100µl **Transfektionslösung 2** von Stratagene, die tropfenweise zugefügt wird, wobei zwischen jedem Tropfen die Lösung durch leichtes Schütteln des Röhrchens vermischt wird. Diese Lösung wird 15min bei RT inkubiert.

Das nun ausfallende DNA-Salz-Präzipitat legt sich während der Transfektion auf die Membranen der Zellen, wo es durch Endozytose aufgenommen wird. Dazu werden die 200µl der Transfektionslösung einfach in das Medium je eines Wells eingetropt, wobei auch hier die 6-Well-Platte vorsichtig hin und her bewegt wird, um die Lösung im Medium gleichmäßig zu verteilen. Der Transfektionsansatz verbleibt 20h auf den Zellen bevor das Medium gewechselt werden muss. Dies ist bei der Planung zu berücksichtigen, da das Medium am nächsten Tag zur Uhrzeit der Transfektion weniger 4h gewechselt werden muss. Die Zeitplanung kann folgendermaßen eingehalten werden:

Montag: 6-Well aussähen, *Dienstag:* Transfektion (15:00 Uhr), *Mittwoch:* Mediumwechsel (11:00 Uhr), *Freitag:* Mediumwechsel, weitere Mediumwechsel am Montag, Mittwoch, Freitag, usw. Sollten sich die Zellen durch den Wechsel des Mediums vom Untergrund lösen, müssen sie mittels einer 1ml Gilson-Pipette durch 10-20maliges Auf- und Abziehen des Mediums resuspendiert werden. Sollten die Zellen zu dicht anwachsen, müssen sie ebenfalls resuspendiert und 1:3 auf drei 6-Well-Platten aufgeteilt werden. Nach 9 – spätestens 15 Tagen sollten die ersten Virusplaques erscheinen. Diese sind erkennbar an den kreisrunden Löchern in der ansonsten dichten Zellschicht. In der Mitte der Plaques ist oft ein kugeliges Haufen abgestorbener Zellen erkennbar. An den Rändern der Plaques sind noch stark lichtbrechende, lysierte Zellen assoziiert mit Tendenz zur Loslösung. Die Zellen nehmen nach außen hin in der Stärke der Lichtbrechung ab.

4.8.2.3. Isolierung der Primärviren

1. 24h nach Erscheinen der ersten Plaques müssen die Zellen geerntet werden. Das Medium wird davor nicht gewechselt.
2. Die Zellen werden mit einer 1ml Gilson-Pipette durch 10maliges Auf- und Abziehen des Mediums suspendiert und in ein 2ml MCT übertragen.
3. Die Suspensionen werden 5min bei 1,2kupm zentrifugiert.
4. Der Überstand wird in 2%igem Incidin oder Lysetol entsorgt, während die Zellen in 500µl HE-Puffer (10mM HEPES, 1mM EDTA) resuspendiert werden.
5. Die Zellen können ein zweites Mal zentrifugiert und wiederum in HE-Puffer aufgenommen werden. *Alternativ kann das Pellet auch in 1ml Puffer resuspendiert und nach Pelletieren vom Überstand 500µl entfernt werden. Dies hält Materialverluste geringer.*
6. Um die Viren aus und von den Zellen zu befreien wird die Suspension 3x in flüssigem N₂ je 1min schockgefroren (zu diesem Zeitpunkt ist es möglich die Suspension bei -80°C zu lagern) und dann im 37°C Wasserbad aufgetaut¹⁸.
7. Danach wird das entstandene Lysat 10min bei 14kupm zentrifugiert und der Überstand in ein neues MCT überführt. Das Pellet wird zusammen mit seinem Behälter in Lysetol entsorgt.

4.8.3. Herstellung monoklonaler Viren

Die Primärviren aus dem Zell-Lysat enthalten eine Mischung von Viren, die sich aus verschiedenen Rekombinationsereignissen entwickelt haben. Teilweise können solche Partikel unterschiedliche Eigenschaften aufweisen, wenn das Insert des Transfervektors bei einem solchen Ereignis Schaden genommen hat. Deshalb müssen die Viren aus dem Extrakt in Verdünnungsstufen vereinzelt und durch die Bildung singulärer Plaques als Monoklon isoliert werden.

4.8.3.1. Vorbereitung der Zellen

Die Vereinzellung der Viruspartikel findet in einer Mikrotiterplatte mit 96 Näpfen statt. Zunächst werden 2×10^4 293-Zellen pro Well eingesät. Diese können mit der Neubauer'schen Zählkammer genau abgezählt werden. Einfacher ist es, die Wells mit je 70µl Zellsuspension eines in 100ml Wachstumsmedium (MEM α^+ -Basis) resuspendierten Zell-Pellets aus einer dichtgewachsenen, 175cm² Kulturfläche zu befüllen und diese dann mit 30µl Medium aufzufüllen.

¹⁸ Während der Lysaterstellung ist es möglich, zu Beginn, innerhalb oder am Ende des Frierzyklus die in N₂ schockgefrorene Probe bei -80°C einzulagern, wenn das Lysat nicht sofort verarbeitet werden kann. Das Virenlysate enthaltende Gefäß muss immer in einem fest verschraubbaren und gekennzeichneten Überbehälter aufbewahrt werden. Jeder Verschluss ist mit Parafilm zu versiegeln.

4. Methoden

4.8.3.2. Erstellung der Verdünnungsreihe

1. Eine Mikrotiterplatte besteht aus 8 Zeilen (A-H) zu je 12 Reihen (1-12). Auf einer separaten Platte wird in die Wells A1-G1 zwischen 140-150µl MEM α -Medium ohne Wachstumsfaktoren - welche die Affinität der Viruspartikel deutlich senken - eingebracht. Dazu werden zwischen 0-10µl Zell-Lysat zugegeben:

A1+B1 : 140µl Medium + 10µl Lysat
C1+D1 : 145µl Medium + 5µl Lysat
E1+F1 : 148µl Medium + 2µl Lysat
G1+H1 : 150µl Medium

Die restlichen Wells sind mit je 100µl Medium ohne Wachstumsfaktoren zu befüllen.

2. Mit einer 8-Kanalpipette wird aus der Reihe A1-H1 50µl Medium entnommen und diese in die Reihe A2-H2 überführt.
3. Diese 1:3-Verdünnung wird zweimal durchmischt und 50µl daraus wiederum in die Reihe A3-H3 überführt, usw.
4. Aus den so entstandenen Verdünnungen werden von der höchsten Verdünnungsstufe beginnend 100µl / Well entnommen und in die entsprechenden Wells der Kulturplatte mit den 293-Zellen eingebracht. Jedes Well der Zellkulturplatte enthält somit 100µl Medium + 100µl Infektionsmedium. Die Zellen werden bei 37°C im Inkubator gelagert.
5. In der niedrigsten Verdünnungsstufe können die Zellen aufgrund der Menge an infektiösen Partikeln schon innerhalb von 24h Anzeichen für Lyse zeigen. Meist lassen sich einzelne Plaques in höheren Verdünnungen erst nach 3 Tagen ermitteln.
6. Es ist wichtig, mit dem Lichtmikroskop jene Wells zu ermitteln, die nur einen einzigen Plaque bilden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich hier um eine Einzelinfektion und somit um einen singulären Virenklon handelt.
7. Bei Verdacht auf einen passenden Kandidaten, ist es nötig, das fragliche Well zu markieren und einen weiteren Tag abzuwarten, bevor der Plaque als monoklonal gedeutet werden kann.
8. Nach ca. 5-7 Tagen kann ein Well, das einen einzelnen Plaque aufweist, mit größter Wahrscheinlichkeit positiv für einen singulären Klon eingestuft werden. Falls sich ein weiterer Plaque bildet, so muss der Kandidat ausgeschlossen werden.
9. Zellschichten mit nur einem Plaque werden für die Viruspräparation herangezogen.

4.8.3.3. Isolierung der monoklonalen Adenoviren

1. Die Zellen der Wells mit singulärem Plaque werden im Medium mit einer 200ml Gilsonpipette resuspendiert und jeweils in ein MCT übertragen.
2. Sie werden bei 1,5kupm pelletiert und der Überstand wird vorsichtig abgehoben.
3. Das Pellet wird in 200ml HE-Puffer resuspendiert, eventuell nochmals pelletiert und wieder in 200ml HE-Puffer resuspendiert. *Alternativ kann das Pellet auch 1x in 500µl Puffer resuspendiert und nach dem Pelletieren 300µl des Überstandes abgesaugt werden. Dies verhindert, dass zuviel Material verloren wird.*
4. Anschließend werden durch dreimaliges Frieren in flüssigem N₂ (die Suspension kann hier bei -80°C gelagert werden) und Auftauen im 37°C Wasserbad die Viruspartikel befreit, die sich nach 10min zentrifugieren bei 14kupm im Überstand sammeln, während die Zellreste pelletieren.
5. Der Überstand wird in ein neues MCT überführt und kann für die Expansion des Klonen im 6-Well genutzt werden.

4.8.4. Expansion von monoklonalen Adenoviren

4.8.4.1. Expansion in 6-Wells

1. Am Vortag der Infektion werden 4x10⁵ 293-Zellen pro Well in eine 6-Well Platte ausgesät.
2. Vor der Infektion werden die in Punkt **4.8.3.** erstellten Virusextrakte mit 100µl in 1ml PBS-komplett verdünnt.
3. Aus dieser 1:10-Lösung werden eine 1:50 (200µl 1:10-Lösung 1ml PBSc) und eine 1:100 Verdünnung (200µl 1:10-Lösung 1ml PBSc) erstellt.
4. Für eine einwandfreie Adhäsion der Viren an die Zielzellen zu gewährleisten, werden die Zellen 2x mit je 2ml PBSc gewaschen, bevor die Infektionsmedien aufgetragen werden und für 25min bei 37°C auf die Zellschicht einwirken.
5. Es ergeben sich 3 Wells mit Infektionen in den 3 Verdünnungsstufen und 3 Wells mit Kontrollzellen, die nur mit PBSc behandelt werden.

4. Methoden

6. Nach der Inkubation werden die Infektionsmedien bzw. das reine PBSc durch je 2ml Wachstumsmedium ersetzt.
7. Zur Vereinfachung können 100µl, 20µl und 10µl des Lysates auch direkt ins Medium der 6-WellS eingetropft werden. Versuche haben gezeigt, dass damit die gleichen Erfolge erzielt werden.
8. Nach Bildung der Plaques werden die Zellen bei ca. 50%iger Lyse im Medium resuspendiert und wie unter **4.8.3.3.** isoliert.

4.8.4.2. Expansion in Kulturflaschen

1. 100-200µl der aus den 6-WellS erstellten Virusextrakte werden einer Kulturflasche (175cm² Grundfläche) mit frischem Medium zugesetzt.
2. Nach ca. 3-5 Tagen sollten die ersten Plaques sichtbar werden. Bei 50%iger Lyse werden die Zellen durch Abklopfen von der Grundfläche gelöst und mittels einer serologischen Pipette (10ml) resuspendiert.
3. Die Suspension wird auf 2 Falcon-Bluecaps verteilt und bei 1,2kupm zentrifugiert.
4. Die Pellets werden in je 6µl HE-Puffer resuspendiert und wiederum zentrifugiert.
5. Je 5µl der Überstände werden abgehoben und die Pellets im verbleibenden Puffer resuspendiert.
6. Die Suspensionen werden zu 500µl in vier 2ml MCT aliquotiert und können bei -80°C gelagert werden.
7. Um den Virusextrakt herzustellen muss im **L2-Labor** gearbeitet werden, da die Partikeldichte einen für L1-Labors unvereinbaren Wert erreicht.
8. Die Zellsuspension wird in einem 15ml Falcon-Zentrifugenröhrchen gesammelt und dort in viermaligen Frier- und Tauzyklen in flüssigem N₂ und 37°C-Wasserbad vollständig lysiert.
9. Das Lysat wird in ein neues Falconröhrchen überführt, da das Material durch die Temperaturbelastung brüchig sein und die Zentrifugation bei 5kupm nicht überstehen könnte.
10. Der Überstand wird in verschraubbare Röhrchen aliquotiert, welche in einem Falcon-Bluecap mit fest verschraubten und mit Parafilm versiegelten Verschluss bei -80°C gelagert werden.

4.8.4.3. Expansion in Petrischalen

1. In dieser Expansionsstufe soll die Partikeldichte im gereinigten Lysat auf mind. 10¹² PFU/ml gehoben werden. Dazu werden auf 40 Petrischalen (müssen für Zellkultur ausgewiesen sein!) mit 15cm Durchmesser und ca. 175cm² Grundfläche 28ml Wachstumsmedium aufgetragen.
2. Die Zellen aus 16 völlig dichtgewachsenen Kulturflaschen werden in je 5ml Medium / Flasche resuspendiert und zusammengefasst.
3. Von dieser 80ml umfassenden Suspension werden mit einer 10ml Pipette 2ml auf jede einzelne Petrischale aufgetragen (10ml in einer serologischen Pipette aufziehen und auf 5 Schalen nacheinander applizieren) und die Zellen durch leichtes Rütteln gleichmäßig verteilt.
4. Die abgesetzten Zellen werden am Tag darauf mit je 500µl einer 1:2000 Verdünnung des aus der infizierten Kulturflasche gewonnenen Lysates behandelt (1ml Lysat in 19ml PBSc oder serumfreiem Medium).
5. Damit sich die Viren für eine gleichmäßige Lyse der Zellen verteilen können, müssen die Petrischalen vorsichtig morgens und abends horizontal kreuzweise hin- und hergeschoben werden. Die Plaquebildung wird täglich kontrolliert.
6. Die Zellen werden geerntet, wenn die Lyse zu etwa 70% fortgeschritten ist¹⁹.
7. Zuerst werden 20ml Medium / Schale abgehoben und in ein 250ml Falcon-Tube überführt.
8. Mit den verbleibenden 10ml werden die Zellen von der Grundfläche gewaschen und in den selben Behälter überführt, bis dieser mit 150ml (max. 180ml) gefüllt ist.
9. Ein zweiter Behälter wird ebenso befüllt und beide werden bei 1,5kupm und RT zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen.
10. Die Behälter werden wiederum jeweils mit den nächsten 150ml Suspension befüllt und zentrifugiert, bis alle Zellen in 2 Pellets vorliegen.
11. Diese Pellets werden mit 10-20ml PBSc gewaschen und zentrifugiert. Die Überstände werden abgesaugt und die Zellen in insgesamt 15ml HE-Puffer resuspendiert.
12. Die Suspension wird viermal in flüssigem N₂ gefroren und im 37°C Wasserbad aufgetaut (im gefrorenen Zustand können die Zellen bei -80°C gelagert und später weiterverarbeitet werden).
13. Danach wird das Lysat in ein neues Bluecap überführt und 10min bei ~4kupm, RT zentrifugiert.
14. Der Überstand wird entweder in ein neues Bluecap pipettiert und gelagert oder kann sofort aufgereinigt werden.

¹⁹ 100% der Zellen sind infiziert, wenn Plaques mit freiem Auge deutlich sichtbar werden und die Zellen generell Anzeichen für Schädigungen durch Infektionen zeigen (v.a. höhere Lichtbrechung).

4. Methoden

4.8.5. Aufreinigung von Adenoviren

1. Das 293-Zelllysate aus **4.8.4.** umfasst ca. 15ml und wird mittels einer 20ml Spritze und einer ca. 20cm langen und 2mm dicken Nadel in ein oben Schmal geschlossenes 40ml-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman-Quickseal für VTi50-Rotor) eingebracht.
2. Dieses Lysat wird mit 15ml CsCl-Lösung mit der Dichte 1,33 (22,278mg in 50 ml HE-Puffer) und diese wieder mit 10ml einer CsCl-Lösung mit der Dichte von 1,45 (30,45g in 50ml HE-Puffer) unterschichtet, und zwar möglichst luftblasenfrei, da Luftblasen nach dem Zentrifugieren den Gradienten stören würden.
3. Der Luftraum wird durch Unterschichten mit 1,45 CsCl₂ aufgefüllt. Durch das Herausziehen der Nadel entsteht eine Blase, die durch einen Tropfen Salzlösung ausgetrieben wird. Der verengte Einfüllstutzen muss frei von Flüssigkeit bleiben.
4. Das aus Polyallomer bestehende Röhrchen wird am Einfüllstutzen mit der entsprechenden Vorrichtung verschweißt: Ein mit Teflon beschichtetes Aluminiumhütchen wird auf den Stutzen gesetzt und der Heizzylinder des Schweißapparates aufgedrückt. Der Hals schmilzt dabei und nimmt die vom Hütchen vorgegebene Form an.
5. Auf das Aluminiumhütchen wird danach der Wärmeableiter gedrückt und anschließend wird es durch Drehen gelockert und entfernt.
6. Das verschweißte Zentrifugenröhrchen wird in seinen Rotor eingesetzt und mit einer Aluminiumkappe bedeckt.
7. Über diese Kappe wird der Deckel aufgeschraubt. Das Gewinde des Deckels muss nötigenfalls mit Silikonfett geschmiert werden. Dies ist nötig, weil in der Ultrazentrifuge ein starkes Vakuum aufgebaut wird, um Reibungswärme bei hohen Umdrehungen zu vermeiden. Schließt der Deckel die Kammer nicht völlig dicht ab, entsteht auch in der Rotorkammer ein Unterdruck, der das Zentrifugenröhrchen zum Platzen bringen würde. Die Deckel werden mit einem Nm-Schlüssel festgezogen.
8. Die Zentrifugation dauert 1h bei 20°C und 48kupm. Sollte der Stufengradient durchmischt worden sein, so muss mindestens 4h zentrifugiert werden, damit sich der kontinuierliche Gradient ausbilden kann.
9. Nach Zentrifugation entwickelt sich eine Virusbande, die meist unterhalb aller anderen Banden liegt. Diese opaleszierende Schicht ist am besten gegen einen dunklen Hintergrund sichtbar und umfasst etwa 5ml. Sollte sich der Gradient durch ruckartige Bewegungen wieder durchmischt haben, wird einfach nochmal zentrifugiert.
10. Danach wird das verschweißte Röhrchen gut zugänglich fixiert und oben mit einer dünnen Injektionsnadel angestochen. Die Nadel verbleibt so in der Einstichstelle, dass sie ihrem stumpfen Ende nach oben zeigt.
11. Danach wird eine Nadel vom Typ 18G 1 1/2 auf eine 10ml-Spritze gesetzt. Die Nadel wird etwa 5mm unterhalb der Höhe der Virusbande in das Röhrchen eingestochen (sanfter Druck, hin und her drehen, Finger nicht auf der gegenüberliegenden Seite halten, Verletzungsgefahr!).
12. Die eingeführte Nadel wird mit der Öffnung (Schrägfläche) nach oben unter die Virusbande geführt. Die Bande muss mit aller gebotenen Sorgfalt sehr langsam abgesaugt werden.
13. Das Virus-Präparat wird in ein 5ml-Ultrazentrifugenröhrchen für Beckman-VTi65-Rotoren luftblasenfrei eingebracht.
14. Dieses Röhrchen wird verschweißt und mit 63kupm bei 20°C für mind. 4h oder ÜN zentrifugiert. Auch hier bildet sich eine Virusbande, die jedoch eine besonders hohe Partikeldichte und Reinheit aufweist.
15. Die Virusbande wird wie oben abgesaugt und in ein verschraubbares 1ml MCT gefüllt. Das MCT wird bei -80°C in einem 50ml Falcon-Bluecap gelagert.

4.8.6. Dialyse des gewonnenen Viruspräparates

Das Viruspräparat ist mit Cäsiumchlorid verunreinigt, dass durch Dialyse möglichst weitgehend entfernt werden soll:

1. Ein Kollodiumhütchen von Sartorius/Göttingen muss 1h in Aquadest gequollen werden.
2. Danach wird es völlig entleert und in eine entsprechende Halterung in einer Wanne mit Rührfisch eingesetzt²⁰. In die Wanne sind ca. 500ml auf Eis gekühlter Dialysepuffer²¹ eingefüllt worden.
3. Das Viruspräparat wird in das Kollodiumhütchen einpipettiert (max. zu 2/3 befüllen).
4. Der Deckel des Behältnisses wird geschlossen und in ein 5L-Becherglas eingestellt. Das Becherglas befindet sich auf einem Magnetrührer, der mit max. 30upm läuft.

²⁰ Gut geeignet ist z.B. ein Behälter für 1ml Pipettierspitzen. Die Spitzenhalterung kann zum Befüllen des Behälters entfernt werden, welcher ca. 500ml Puffer aufnehmen kann. Außerdem kann der Behälter mit einem Deckel verschlossen werden.

²¹ 460ml 87% Glycerin, 20ml 1M Hepes, 10ml 5M NaCl, 510ml Aquadest

4. Methoden

5. Diese Apparatur steht unter einem Abzug oder auf einem geeigneten Abfluss (Ableitung in einen gesonderten Tank) und wird mit Alufolie abgedeckt. Entsprechende Warnhinweise sind anzubringen.
6. Die erste Dialyse wird für 4h bei 4°C durchgeführt. Danach wird der Puffer gewechselt (der Spitzeneinsatz wird mit dem Kollodiumhütchen in einen neuen, mit Puffer gefüllten Behälter eingesetzt) und die zweite Dialyse erfolgt bei 4°C ÜN.
7. Sollte beim Wechsel des Puffers Flüssigkeit in das Kollodiumhütchen schwappen, muss das Viruspräparat wieder in eine Ultrazentrifugenröhre für VTi-65-Rotoren überführt, mit CsCl₂-Lösungen von 1,33 und 1,45 optischer dichte unterschichtet, mind. 4h zentrifugiert und anschließend wieder dialysiert werden.
8. Das dialysierte Präparat weist ein um bis zu 40% geringeres Volumen auf, da wahrscheinlich nicht nur die Salze entfernt werden, sondern auch die H₂O-Moleküle schneller ausströmen, als Glycerin in das Hütchen einströmen kann.
9. Das Präparat wird auf 4 verschraubbare 1ml MCT Aliquotiert und bei -80°C in 50ml Falcon-Bluecaps gelagert.

4.8.7. Bestimmung des Titers von Adenoviren

1. Zur Messung der PFUs eines Viruspräparates wird eine 96-Well-Platte mit 293-Zellen wie unter **4.8.3.1.** vorbereitet.
2. Auf einer anderen 96-Well-Platte werden 1:10 Verdünnungsreihen in PBSc angesetzt²². Zunächst werden alle Wells mit einer Multipipette zu 45µl PBSc befüllt.
3. Begonnen wird die Verdünnungsreihe mit einer 1:10 Verdünnung des Präparates z.B. in Well A1, d.h. 5µl Präparat zu 45µl PBSc.
4. Aus dem Well A1 werden nun 5µl Viruslösung entnommen und z.B. auf Well A2 übertragen, usw. Am Ende steht eine Verdünnungsstufe von 10⁻¹² im Well A12 zur Verfügung.
5. Je 1-10µl werden aus den Wells mit einer Multipipette auf die entsprechenden Wells auf der 293-Zellen-Kulturplatte übertragen. Wenn jeweils 10µl entnommen werden entspricht die Infektion des Wells A1 praktisch der Verdünnungsstufe 1, jene in A12 entspricht einer Verdünnungsstufe von 10⁻¹¹: Nicht die Konzentration von infektiösen Partikeln ist ausschlaggebend, sondern die tatsächliche Anzahl der PFUs.
6. Das Well der höchsten Verdünnungsstufe, in denen sich Plaques bilden, wird für die Bestimmung des Titers herangezogen. Um mit Bestimmtheit die Bildung der letzten Plaques abzuwarten, müssen mind. 5 Tage bis zur Auswertung abgewartet werden. Für die Berechnung gilt die Formel:

$$\frac{n \times m \times p \times 10^w}{b} = T$$

- n*: **n** Anteile des Viruspräparates zu
b: **b** Anteilen des Verdünnungspuffers: z.B. **n:b** = 1:10
m: Menge der von der erstellten Verdünnung eingesetzten Infektionslösung in **Mikroliter**
p: Anzahl der letzten **Plaques** im Well mit der höchsten Verdünnungsstufe
w: Die Zahl des **Wells** einer Verdünnungsreihe, in dem die letzten Plaques gezählt werden konnten
T: Wert des **Titers** in PFU/µl

4.8.8. Kontrollierte Infektion von 293-Zellen oder HUVECs mit Adenoviren

Infektionsarbeiten mit Adenoviren werden prinzipiell unter Berücksichtigung der erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen durchgeführt. Kulturzellen werden i.d.R. mit 100-200MOI (Multiplicity of Infection) durchgeführt. Das heißt, dass jede einzelne Zelle einer Kultur mit ca. 100-200 Partikel infiziert werden kann. Wird angenommen, dass in einem 6-Well etwa 10⁶ Zellen vorliegen, so müsste dieses Well mit 1 bis 2x10⁸ PFU (Plaque-Forming-Units = infektiöse Partikel) infiziert werden. Meist liegt ein Virusisolat jedoch in viel höherer Konzentration vor, so dass es erst auf 100MOI/µl normiert werden muss. 1µl einer so normierten Virus-Lösung wird dann in der benötigten Menge PBS-komplett-Lösung verdünnt, welche dann 30min auf eine PBS-gewaschene die Kultur oder direkt ins medium appliziert wird. Für die Menge der benötigten Viruslösung gilt:

²² Maximal 8 verschiedenen Präparate in 12 Schritten oder 12 verschiedene Präparate in 8 Schritten.

4. Methoden

$$V_p = \frac{A \times Z \times MOI}{PFU}$$

<i>V_p</i> :	zu entnehmendes Probenvolumen in μ l
<i>A</i> :	Anzahl der zu infizierenden Kulturen (bzw. Wells)
<i>Z</i> :	Zellzahl pro Kultur oder Well
<i>MOI</i> :	Anzahl der benötigten MOI (meist 100)
<i>PFU</i> :	Titer der Viruslösung in PFU

Es kann mittels dieser Formel auch ausgerechnet werden, wie viele Ansätze beispielsweise mit 1 μ l Viruslösung eines bestimmten Titers durchgeführt werden können. Dies ist wichtig für die Auflösung der nächsten Formel. Sie ermittelt die zur Normierung benötigte Menge PBSc, mit der die entnommene Virus-Lösung aufgefüllt werden muss, um eine Stock-Lösung von 100MOI/ μ l zu erhalten:

$$V_a = A - V_p$$

<i>V_a</i> :	Auffüllvolumen in μ l
<i>A</i> :	Anzahl der infizierbaren Kulturen (bzw. Wells)

Bei Viruslösungen mit hohem Titer ist es oft unmöglich, die benötigte Menge an Lösung exakt zu pipettieren, weshalb oft einfach 1 μ l des Konzentrats eingesetzt wird. Mit der aus dem Titer errechenbaren Anzahl *A* an theoretisch durchzuführenden Infektionsansätzen, kann das benötigte Auffüllvolumen leicht ermittelt und so eine geeignete Stocklösung generiert werden. Da die MOI eine direkt proportional zur Zellzahl ist, werden im Folgenden verschiedene gültige Schätzwerte für die Anzahl an 293-Zellen bzw. HUVECs in gängigen Kulturbehältern angeführt.

Für die Zellzahlen gilt:

6-Well:	0,5 - 1*10 ⁸
12-Well:	2 - 5*10 ⁷
24-Well:	2,5*10 ⁷
10cm-Platte:	5*10 ⁸
15cm-Platte:	1*10 ⁹ Zellen

Durchführung:

1. Die Zellschicht wird jeweils 2x mit PBS-komplett gewaschen (6-24 Wells mit je 1ml, 10cm-Platten mit 5ml, 15cm-Platten mit 10ml). Das PBS aus dem letzten Waschschrift wird erst kurz vor Applizierung der Viruslösung abgesaugt.
2. Die Normierte Viruslösung wird nun entsprechend in die benötigte Menge PBS-Komplett pipettiert. Dabei gilt: Pro 6-Well werden je 1 μ l normierter Viruslösung in je 1ml PBSc eingebracht, für 12-Wells $\frac{1}{2}$, für 24-Wells $\frac{1}{4}$ der Menge an PBS. **Beachte: Die normierte Viruslösung gilt für die jeweilige Anzahl der Zellen pro Kultur und wird daher immer mit 1 μ l eingesetzt.** 10cm-Platten werden mit 5facher Menge an PBS (je 1 μ l der dafür normierter Viruslösung in je 5ml), 15cm-Platten mit 10facher Menge verdünnt.
3. Die vorbereiteten Verdünnungen enthalten nun je 100 MOI pro Ansatz. Das PBS kann jetzt von den Kulturen abgesaugt und die entsprechenden Mengen Infektionslösung appliziert werden.
4. Die Kulturen werden bei 37°C im Inkubator 25min infiziert. Anschließend werden die Infektionslösungen entsprechend der Sicherheitsrichtlinien (siehe oben) abgesaugt und die Zellen mit Wachstumsmedium bedeckt (0,5ml für 24-Wells, 1ml für 12-Wells, 2ml für 6-Wells, 10ml für 10cm-Platten und 20ml für 15cm-Platten).
5. Die Zellen werden mind. 24h bei 37°C im Inkubator eingestellt und sind dann bereit für die Durchführung verschiedener Assays.

Referenzen

1. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-257.
2. Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*. de Gruyter, 1994(257).
3. Moll, T., et al., *Regulation of the tissue factor promoter in endothelial cells. Binding of NF kappa B-, AP-1-, and Sp1-like transcription factors*. J Biol Chem, 1995. **270**(8): p. 3849-3857.
4. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **237**: p. 1-30.
5. Eriksson, U. and K. Alitalo, *Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **237**: p. 41-57.
6. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-674.
7. Gale, N.W. and G.D. Yancopoulos, *Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development*. Genes Dev, 1999. **13**(9): p. 1055-66.
8. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-395.
9. Carmeliet, P., *Developmental biology. Controlling the cellular brakes*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 657-8.
10. Shalaby, F., et al., *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 62-6.
11. Yancopoulos, G.D., et al., *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 242-8.
12. Fong, G.H., et al., *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 66-70.
13. Gullino, P.M., *Angiogenesis and oncogenesis*. J. Natl Cancer Inst. USA, 1978. **61**: p. 639-643.
14. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
15. Bouck, N., V. Stellmach, and S.C. Hsu, *How tumors become angiogenic*. Adv Cancer Res, 1996. **69**: p. 135-74.
16. Asahara, T., C. Kalka, and J.M. Isner, *Stem cell therapy and gene transfer for regeneration*. Gene Ther, 2000. **7**(6): p. 451-7.
17. Rafii, S., *Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise*. J Clin Invest, 2000. **105**(1): p. 17-9.
18. Kerbel, R.S., *Tumor angiogenesis: past, present and the near future*. Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 505-15.
19. Boulton, A.J. and R.A. Malik, *Diabetic neuropathy*. Med Clin North Am, 1998. **82**(4): p. 909-29.
20. Alon, T., et al., *Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity*. Nat Med, 1995. **1**(10): p. 1024-8.
21. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(5): p. 588-94.
22. Patan, S., L.L. Munn, and R.K. Jain, *Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis*. Microvasc Res, 1996. **51**(2): p. 260-72.
23. Rabinovitch, M., *Pulmonary hypertension: pathophysiology as a basis for clinical decision making*. J Heart Lung Transplant, 1999. **18**(11): p. 1041-53.
24. Pinedo, H.M., et al., *Involvement of platelets in tumour angiogenesis?* Lancet, 1998. **352**(9142): p. 1775-7.
25. Seljelid, R., S. Jozefowski, and B. Sveinbjornsson, *Tumor stroma*. Anticancer Res, 1999. **19**(6A): p. 4809-22.
26. Coussens, L.M., et al., *Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis*. Genes Dev, 1999. **13**(11): p. 1382-97.
27. O'Reilly, M.S., et al., *Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma*. Cell, 1994. **79**(2): p. 315-28.
28. O'Reilly, M.S., et al., *Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth*. Cell, 1997. **88**(2): p. 277-85.
29. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **237**: p. 97-132.
30. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 4-25.
31. Carmeliet, P., et al., *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 435-9.
32. Ferrara, N., et al., *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 439-42.
33. Stone, J., et al., *Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia*. J Neurosci, 1995. **15**(7 Pt 1): p. 4738-47.
34. Meyer, M., et al., *A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases*. Embo J, 1999. **18**(2): p. 363-374.
35. Carmeliet, P., et al., *Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188*. Nat Med, 1999. **5**(5): p. 495-502.
36. Miquerol, L., B.L. Langille, and A. Nagy, *Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression*. Development, 2000. **127**(18): p. 3941-6.
37. Gerber, H.P., et al., *VEGF is required for growth and survival in neonatal mice*. Development, 1999. **126**(6): p. 1149-59.
38. Gerber, H.P., et al., *VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation*. Nat Med, 1999. **5**(6): p. 623-8.
39. Ferrara, N., et al., *Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis*. Nat Med, 1998. **4**(3): p. 336-40.
40. Benjamin, L.E., et al., *Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal*. J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 159-65.
41. Aiello, L.P., et al., *Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders*. N Engl J Med, 1994. **331**(22): p. 1480-7.
42. Adamis, A.P., et al., *Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy*. Am J Ophthalmol, 1994. **118**(4): p. 445-50.
43. Pierce, E.A., E.D. Foley, and L.E. Smith, *Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity*. Arch Ophthalmol, 1996. **114**(10): p. 1219-28.
44. Hiratsuka, S., et al., *Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9349-54.
45. Bellomo, D., et al., *Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia*. Circ Res, 2000. **86**(2): p. E29-35.
46. Dougher-Vermazen, M., et al., *Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor*. Biochem Biophys Res Comm, 1994. **205**(1): p. 728-738.

Referenzen

47. Petrova, T.V., T. Makinen, and K. Alitalo, *Signaling via vascular endothelial growth factor receptors*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 117-130.
48. Carmeliet, P., et al., *Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis*. Cell, 1999. **in press**.
49. Mechtcheriakova, D., et al., *Specificity, diversity and convergence in VEGF and TNF- α signaling events leading to tissue factor upregulation via EGR-1 in endothelial cells*. FASEB J., 2001. **15**: p. in press.
50. Whitaker, G.B., B.J. Limberg, and J.S. Rosenbaum, *Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121)*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 25520-31.
51. Taipale, J., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-3*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **237**: p. 85-96.
52. Olofsson, B., et al., *Current biology of VEGF-B and VEGF-C*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(6): p. 528-35.
53. Korhonen, J., et al., *Enhanced expression of the tie receptor tyrosine kinase in endothelial cells during neovascularization*. Blood, 1992. **80**(10): p. 2548-55.
54. Maisonpierre, P.C., et al., *Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family*. Oncogene, 1993. **8**(6): p. 1631-7.
55. Sato, T.N., et al., *Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(20): p. 9355-8.
56. Dumont, D.J., et al., *The endothelial-specific receptor tyrosine kinase, tek, is a member of a new subfamily of receptors*. Oncogene, 1993. **8**(5): p. 1293-301.
57. Iwama, A., et al., *Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **195**(1): p. 301-9.
58. Maisonpierre, P.C., et al., *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis*. Science, 1997. **277**(5322): p. 55-60.
59. Valenzuela, D.M., et al., *Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 1904-9.
60. Suri, C., et al., *Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1171-80.
61. Dumont, D.J., et al., *Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo*. Genes Dev, 1994. **8**(16): p. 1897-909.
62. Sato, T.N., et al., *Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 70-74.
63. Thurston, G., et al., *Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 460-3.
64. Detmar, M., et al., *Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice*. J Invest Dermatol, 1998. **111**(1): p. 1-6.
65. Holash, J., S.J. Wiegand, and G.D. Yancopoulos, *New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF*. Oncogene, 1999. **18**(38): p. 5356-62.
66. Holash, J., et al., *Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF*. Science, 1999. **284**(5422): p. 1994-8.
67. Goede, V., et al., *Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis*. Lab Invest, 1998. **78**(11): p. 1385-94.
68. Stratmann, A., W. Risau, and K.H. Plate, *Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis*. Am J Pathol, 1998. **153**(5): p. 1459-66.
69. Zagzag, D., et al., *In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis*. Exp Neurol, 1999. **159**(2): p. 391-400.
70. Flanagan, J.G. and P. Vanderhaeghen, *The ephrins and Eph receptors in neural development*. Annu Rev Neurosci, 1998. **21**: p. 309-45.
71. Davis, S., et al., *Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity*. Science, 1994. **266**(5186): p. 816-9.
72. Wang, H.U., Z.F. Chen, and D.J. Anderson, *Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4*. Cell, 1998. **93**(5): p. 741-53.
73. Gerety, S.S., et al., *Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development*. Mol Cell, 1999. **4**(3): p. 403-14.
74. Goldman, E., *The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system*. Lancet, 1907. **2**: p. 1236-1240.
75. Ide, A.G., Baker, N. H. & Warren, S. L., *Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber*. Am. J. Radiol, 1939. **42**: p. 891-899.
76. Algire, G.H.C., H. W., *Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants*. J. Natl Cancer Inst. USA, 1945. **6**: p. 73-85.
77. Greenblatt, M.S., P., *Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique*. J. Natl Cancer Inst. USA, 1968. **41**: p. 111-124.
78. Ehrmann, R.L.K., M., *Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique*. J. Natl Cancer Inst. USA, 1968. **41**: p. 1329-1341.
79. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
80. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
81. Wesseling, P., et al., *Quantitative immunohistological analysis of the microvasculature in untreated human glioblastoma multiforme. Computer-assisted image analysis of whole-tumor sections*. J Neurosurg, 1994. **81**(6): p. 902-9.
82. Pezzella, F., et al., *Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis*. Am J Pathol, 1997. **151**(5): p. 1417-23.
83. Jain, R.K., *Determinants of tumor blood flow: a review*. Cancer Res, 1988. **48**(10): p. 2641-58.
84. Baish, J.W. and R.K. Jain, *Fractals and cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(14): p. 3683-8.
85. Helminger, G., et al., *Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 177-82.
86. Eberhard, A., et al., *Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies*. Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1388-93.
87. Hobbs, S.K., et al., *Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4607-12.

Referenzen

88. Hashizume, H., et al., *Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness*. Am J Pathol, 2000. **156**(4): p. 1363-80.
89. Fukumura, D., et al., *Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma*. Am J Pathol, 1997. **151**(3): p. 679-88.
90. Giaccia, A.J., *Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest*. Semin Radiat Oncol, 1996. **6**(1): p. 46-58.
91. Jain, R.K., et al., *Leukocyte-endothelial adhesion and angiogenesis in tumors*. Cancer Metastasis Rev, 1996. **15**(2): p. 195-204.
92. Eliceiri, B.P. and D.A. Cheresh, *The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1227-30.
93. Huang, X., et al., *Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature*. Science, 1997. **275**(5299): p. 547-50.
94. Ferrara, N. and K. Alitalo, *Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors*. Nat Med, 1999. **5**(12): p. 1359-1364.
95. Leu, A.J., et al., *Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation*. Cancer Res, 2000. **60**(16): p. 4324-7.
96. Helmlinger, G., et al., *Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(8): p. 778-83.
97. Jeltsch, M., et al., *Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice*. Science, 1997. **276**(5317): p. 1423-5.
98. Jain, R.K., *Barriers to drug delivery in solid tumors*. Sci Am, 1994. **271**(1): p. 58-65.
99. Fidler, I.J., *Modulation of the organ microenvironment for treatment of cancer metastasis*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(21): p. 1588-92.
100. Gohongi, T., et al., *Tumor-host interactions in the gallbladder suppress distal angiogenesis and tumor growth: involvement of transforming growth factor beta1*. Nat Med, 1999. **5**(10): p. 1203-8.
101. Jackson, J.R., et al., *The codependence of angiogenesis and chronic inflammation*. FASEB J., 1997. **11**: p. 457-465.
102. Mantovani, A., F. Bussolino, and E. Dejana, *Cytokine regulation of endothelial cell function*. FASEB J, 1992. **6**(8): p. 2591-2599.
103. Mantovani, A., S. Sozzani, and M. Introna, *Endothelial activation by cytokines*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **832**: p. 93-116.
104. Carmeliet, P., et al., *Insights in vessel development and vascular disorders using targeted inactivation and transfer of vascular endothelial growth factor, the tissue factor receptor, and the plasminogen system*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **811**: p. 191-206.
105. Ruf, W. and T.S. Edgington, *Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo*. FASEB J, 1994. **8**(6): p. 385-390.
106. Ott, I., et al., *A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280*. J. Cell. Biol., 1998. **140**(5): p. 1241-1253.
107. Folkman, J., *Tumor angiogenesis and tissue factor [comment]*. Nat Med, 1996. **2**(2): p. 167-168.
108. Cockerill, G.W., et al., *Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and E-selectin expression in endothelial cells by cyclosporin A and the T-cell transcription factor NFAT*. Blood, 1995. **86**(7): p. 2689-2698.
109. Boss, V., et al., *Histamine induces nuclear factor of activated T cell-mediated transcription and cyclosporin A-sensitive interleukin-8 mRNA expression in human umbilical vein endothelial cells*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(2): p. 264-272.
110. Armesilla, A.L., et al., *Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor of activated T cells in human endothelial cells: a role for tissue factor gene expression*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 2032-2043.
111. Lim, C.P., N. Jain, and X. Cao, *Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK1*. Oncogene, 1998. **16**(22): p. 2915-2926.
112. Wu, L.W., et al., *VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6059-6062.
113. Abedi, H. and I. Zachary, *Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(24): p. 15442-15451.
114. Kandel, E.S. and N. Hay, *The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 210-229.
115. Qu, Z., et al., *The transcriptional corepressor NAB2 inhibits NGF-induced differentiation of PC12 cells*. J Cell Biol, 1998. **142**(4): p. 1075-1082.
116. Sakamoto, K.M., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 signaling pathways converge on the CREB-binding site in the human egr-1 promoter*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 5975-5985.
117. Khachigian, L.M. and T. Collins, *Inducible expression of Egr-1-dependent genes: A paradigm of transcriptional activation in vascular endothelium*. Circ Res, 1997. **81**(4): p. 457-461.
118. Yan, S.F., et al., *Egr-1: is it always immediate and early?* J. Clin. Invest., 2000. **105**: p. 553-554.
119. McCaffrey, T.A., et al., *High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis*. J. Clin. Invest., 2000. **105**: p. 653-662.
120. Khachigian, L.M., et al., *Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury*. Science, 1996. **271**(5254): p. 1427-1431.
121. Yan, S.F., et al., *Tissue factor transcription driven by Egr-1 is a critical mechanism of murine pulmonary fibrin deposition in hypoxia*. Proc Natl Acad Sci USA, 1998. **95**(14): p. 8298-8303.
122. Yan, S.F., et al., *Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 15030-15040.
123. Svaren, J., et al., *NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli*. Mol Cell Biol, 1996. **16**: p. 3545-3553.
124. Mechtcheriakova, D., et al., *Vascular endothelial cell growth factor-induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1*. Blood, 1999. **93**(3811-3823).
125. Colman, A., *Antisense strategies in cell and developmental biology*. J Cell Sci, 1990. **97**(Pt 3): p. 399-409.
126. Zaug, A.J., M.D. Been, and T.R. Cech, *The Tetrahymena ribozyme acts like an RNA restriction endonuclease*. Nature, 1986. **324**(6096): p. 429-33.
127. Ehsan, A., M.J. Mann, and V.J. Dzau, *Gene therapy for cardiovascular Disease and vascular grafts*. 2000: p. 421-438.
128. Scheule, R.K. and S.H. Cheng, *Liposome delivery Systems*. 1996.
129. Felgner, P.L., et al., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7413-7.
130. Ameri, K. and E. Wagner, *Receptor mediated gene transfer*. 2000.

Referenzen

131. Muzyczka, N., *Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **158**: p. 97-129.
132. Svensson, E.C., et al., *Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors*. Circulation, 1999. **99**(2): p. 201-5.
133. Nabel, E.G., G. Plautz, and G.J. Nabel, *Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall*. Science, 1990. **249**(4974): p. 1285-8.
134. Mathias, P., et al., *Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection*. J Virol, 1994. **68**(10): p. 6811-4.
135. Wickham, T.J., et al., *Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization*. J Cell Biol, 1994. **127**(1): p. 257-64.
136. Hackett, N.R. and R.G. Crystal, *Adenovirus vectors for gene therapy*. 2000.
137. Athappilly, F.K., et al., *The refined crystal structure of hexon, the major coat protein of adenovirus type 2, at 2.9 A resolution*. J Mol Biol, 1994. **242**(4): p. 430-55.
138. Crawford-Miksza, L. and D.P. Schnurr, *Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues*. J Virol, 1996. **70**(3): p. 1836-44.
139. Wang, K., et al., *Adenovirus internalization and infection require dynamin*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3455-8.
140. Leopold, P.L., et al., *Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(3): p. 367-78.
141. Greber, U.F., et al., *The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry*. Embo J, 1997. **16**(19): p. 5998-6007.
142. Miyazawa, N., et al., *Fiber swap between adenovirus subgroups B and C alters intracellular trafficking of adenovirus gene transfer vectors*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 6056-65.
143. Alemany, R., et al., *Complementation of helper-dependent adenoviral vectors: size effects and titer fluctuations*. J Virol Methods, 1997. **68**(2): p. 147-59.
144. Wold, W.S., A.E. Tollefson, and T.W. Hermiston, *E3 transcription unit of adenovirus*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **199**(Pt 1): p. 237-74.
145. Shisler, J., et al., *The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8299-306.
146. Puvion-Dutilleul, F. and E. Puvion, *Sites of transcription of adenovirus type 5 genomes in relation to early viral DNA replication in infected HeLa cells. A high resolution in situ hybridization and autoradiographical study*. Biol Cell, 1991. **71**(1-2): p. 135-47.
147. Louis, N., C. Eveleigh, and F.L. Graham, *Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line*. Virology, 1997. **233**(2): p. 423-9.
148. Graham, F.L. and L. Prevec, *Methods for construction of adenovirus vectors*. Mol Biotechnol, 1995. **3**(3): p. 207-20.
149. Bett, A.J., et al., *An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 8802-6.
150. Hehir, K.M., et al., *Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 8459-67.
151. Mittereder, N., K.L. March, and B.C. Trapnell, *Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 7498-509.
152. Smith-Arica, J.R., et al., *Cell-type-specific and regulatable transgenesis in the adult brain: adenovirus-encoded combined transcriptional targeting and inducible transgene expression*. Mol Ther, 2000. **2**(6): p. 579-87.
153. Dzau, V.J., et al., *Fusigenic viral liposome for gene therapy in cardiovascular diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11421-5.
154. Ali, M., N.R. Lemoine, and C.J. Ring, *The use of DNA viruses as vectors for gene therapy*. Gene Ther, 1994. **1**(6): p. 367-84.
155. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5547-51.
156. Gossen, M., et al., *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1766-9.

A. Appendix

A.1. Abkürzungen

AAV	Adenovirus assoziierter Virus
Adv	Adenovirus
Amp	Ampicillin
Ang (Angpt)	Angiopietin
Aquadest	destilliertes Wasser
BSA	bovines Serum Albuminum
CAG	hCMV- β -Aktin-Promoter
CAR	Corsackie-Adenovirus-Rezeptor
CFU	koloniebildende Einheit
COX	Zyklooxygenase
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEAE	Diäthylaminoäthanol
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithioerythol
E.coli	Escherichia coli
EC	Endothelzelle
ECGS	Endothelzellenwachstumsfaktor
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGF	Epithelzellenwachstumsfaktor
EGFP	enhanced green fluorescence protein
Eph	Ephrin
EST	expressed sequence tag
Et-OH	Äthanol
FCS	fötales Kälberserum
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
Flk-1 (VEGFR-1)	VEGF-Rezeptor-1
Flt-1 (VEGFR-2)	VEGF-Rezeptor-2
GFP	green fluorescence protein
GM-CSF	Granulozyten- und Makrophagenkolinie stimulierender Faktor
h	hora = Stunde
hCMV	humaner Cytomegalie-Virus
HE	HEPES-EDTA
HEPES	N-2-Hydroxyähtylpiperazin-N'-2-äthansulfonat
HGF	Hepatozytenwachstumsfaktor
HIF	hypoxie-induzierter Faktor
HIV	humanes Immunschwächevirus
HRE	HIF-responsives Element
HUMEC	humane mikrovaskuläre EC
HUVEC	humane Umbelicalvenen-EC
ICAM	intercelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
IP3	Inositriphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani-Medium
Lsng	Lösung
MCP	Monozyten-Chemotaxisprotein
MCT	Mikrozentrifugenröhrchen
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
min.	mindestens
NCS	Neugeborenen-Kälberserum
MOI	multiplicity of infection
NFAT	Nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen

A. Appendix

NFκB	Nuklearer Faktor von κ B-Zellen
NO	Nitratoxid
NOS	Nitratoxidsynthetase
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleosid
ori	origin of replication
PBSc	Phosphatpuffer-Saline komplett
PBSd	Phosphatpuffer-Saline defizient
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PECAM	platelet endothelial growth factor
PFU	plaquebildende Einheiten
Pipes	Piperazine-N,N'-bis-[2-äthansulphonat]
PKC	Phosphokinase C
PIGF	plazentaler Wachstumsfaktor
PSFG	Penizillin-Streptomycin-Fungizon-Glutaminlösung
QGEK	QIAGEN Gel Extraction Kit
QSCK	QIAGEN Spincolumn Kit
rec	Rekombination
RLU	relative Lichteinheiten
RT	Raumtemperatur
SCS	angereichertes Kälberserum
SCSC	NaCl-Na-Zitrat-Puffer
sek	Sekunde
TE	TRIS-EDTA
TF	Gewebefaktor
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
Tie	endotheliale Rezeptortyrosinkinase
TNF	Tumornekrose-Faktor
Trafo	Transformation
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSP	Thrombospondin
ÜN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
VE-Cadherin	vaskulär-endotheliales Cadherin
VEGF	vaskulärer EC-Wachstumsfaktor

A. Appendix

A.2. Geräteliste

Elektrophoreseapparatur	Life Technologies: Horizon 58, Cat.No. 1060BD Horizon 11*14, Cat.No. 1068BD
Elektroporator	BioRad: Gene Pulser + Pulse Controler + Capacitance Extender
Fluoreszenzspektrometer	Titertek Fluoroskan II (ROM Version 3.11) an Citizen 120D über Parallelswitch Olympia Memory I/F
Geigerzähler	Berthold LB 1210B Mini-mg Series 900 Mini Monitor
Inkubator für Bakterienkulturen	Heraeus
Inkubator für Zellkultur	Biocenter 2001
Kühltruhe / -schrank -80°C	Revco
PCR	Biometra Trio-Thermoblock Perkin Elmer (Applied Biosystems) GeneAmp 2400
Phasenkontrastmikroskop	Nicon TMS + Auflichthalterung mit Phasenkontrastfilter 1-3, 0,2A <i>Objektive:</i> Plan 4 / 0,13 DL - L E 10 / 0,25 DL - 1 E 20 / 0,4 DL - 2 E 40 / 0,55 DL - 3
Power Supply	Gibco BRL ST504, 500V / 400mA
Scintillator	Packard (A Canberra Company) Tricarb 2500 TR Liquid Scintillation Analyzer
Sequenzier	Perkin Elmer (Applied Biosystems) ABI Prism 377 DNA-Sequencer an PowerMacintosh G3, OS8.0 + ABI-Prism Softwaresuite V2.6
Sterilbank	Clan LAF VFB 1806
Superzentrifuge	Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge <i>Rotoren:</i> GSA SA600 HB-4 1300 rev/min MAX
Thermomixer	Eppendorf: Thermomixer 5436 Thermomixer compact
Tischkulturschüttler	Lab-Therm Labshaker
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415C
Ultrazentrifuge	Beckman XL-70 Ultracentrifuge <i>Rotoren:</i> VTi50 für Quick-Seal, Reorder 342414 VTi65 für Quick-Seal, Reorder 342412
UV-Mikroskop	Nikon Diaphot + Kappa CCD + ACC Imaging System + Nikon UV-Lamp-Power-Supply HB-10101AF + Win98-PC mit Kappa Image-Base
UV-Tisch	Sigma Chemical Company T2202 + CCD-Kamera an Mitsubishi PO-Printer und BioRad Integration Control Unit
UV-Vis-Spektrometer	Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 + Printer DPr-414 Hitachi U-3000, seriell an Win98-PC mit UV-Solutions V1.2
Vakuumpumpe	SkanAG Vakuskan
Vortexer	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, VF2
Wasserbad	GFL 1083 MsLauda

A. Appendix

A.3. Materialien und Reagenzien

American National Can	Parafilm „M“
Becton Dickinson	Falcon: 2350, Cell Strainer, 70µm, Nylon 35 2058, Rundbodenröhrchen, Polystyrol, 5ml 35 2059, Rundbodenröhrchen, Polypropylen, 14ml 35 2063, Rundbodenröhrchen, Polypropylen, 5ml 35 2070, Blue Max (Blue Cap), konisches Röhrchen, 50ml 35 2075, konisches Röhrchen, graduiert, 225ml 35 6525, Advantage serological pipettes, 25ml 35 6543, Advantage serological pipettes, 5ml 35 6551, Advantage serological pipettes, 10ml Sterile Einmalspritzen
Bio-Rad	Bradford Protein-Assay 8xFarb-Reagenz-Konzentrat Gen-Pulser Cuvette. 10x4x45, Cat. No. 165-2088
Biotherm	Gene Xpress, PCR-Kit mit Puffer und Taq-Polymerase (5U/µl)
Boeringer Mannheim / Roche	Sure Cut Restriktionsendonukleasen (10U/µl) mit Puffer A, B, L, M, H
Corning Incorporated	Costar 50ml Reagent Reservoir 4870
Gibco BRL	Neutralisiertes ATP, 10mmol, 18330-019
Gibco / Life Technologies	MEMa-Medium mit Ribonukleosiden, 22571-038 NCS 26010-041
Greiner	Serologische Pipetten, 1ml, 2ml
Hyclone	FCS age6557 Cat. No. sh30072-03
ICM	AURORA Xgal-Kit
IWAKI	150mm Tissue Culture Dish 3020-150
Microlane	Sterile Einmalinjektionsnadeln
MWG	Express PCR-Kit mit Puffer und Taq-Polymerase (4U/µl)
Nalge Nunc International	Inoculation needle, 253988
Nalgene	CN Filterunit, 0,20µm pore size, 450-0020 0,45µm pore size, 450-0045
NEB	T4 DNA-Ligase 40U/µl + 10xPuffer, M0202S
Nunclon	TC 6-Wells, 150229 TC Microwells 96 FSI, 168055 Microwell Lid 264122
Perkin Elmer	BigDye Sequenzreaction-Mix
Promega	dNTP 100mol für jedes Nukleotid, U1240
QIAGEN	QIAprep Spin, Miniprep Kit No. 27106 QIAprep Vacuum, Miniprep Kit No. 27144 Plasmid Midi Kit No. 12143
Roche	Agarose MP1388 991
Sarstedt	Luminaröhrchen, 5ml, No. 55.476 10x4x45mm Plastik Kuvetten No. 67.742
Sigma	Agarose Type XI: Low gelling temperature, EC No 232-731-8 Mineralöl M5904, EC No 232-4558

A. Appendix

A.4. Verwendete Sequenzen

A.4.1. Promoter und mRNA von VEGFR-2

LOCUS AF153057 939 bp DNA ROD 22-MAY-2000
DEFINITION Mus musculus tyrosine kinase FLK-1 gene, promotor and mRNA,
partial sequence. ACCESSION AF153057 VERSION AF153057.1
GI:7963622

KEYWORDS .SOURCE house mouse. ORGANISM Mus musculus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 939) AUTHORS Kappel,A., Risau,W. and
Breier,G.
TITLE Prerequisite role of SCL/tal-1, GATA and Ets transcription
factor binding sites for the in vivo function of Flk-1 gene
regulatory elements JOURNAL Unpublished REFERENCE 2
(bases 1 to 939)

AUTHORS Kappel,A., Risau,W. and Breier,G. TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (21-MAY-1999) Molecular Cell Biology, Max-Planck,
Institut fuer Physiologische und Klinische Forschung,
Parkstrasse 1, Bad Nauheim 61231, Germany

FEATURES Location/Qualifiers source 1..939
/organism="Mus musculus"
/strain="129Sv"
/db_xref="taxon:10090"
/tissue_type="liver"
/dev_stage="fetus"
promoter 1..640 mRNA 641..>939
/product="tyrosine kinase FLK-1"

BASE COUNT 188 a 271 c 286 g 194 t ORIGIN

```
1 taccgaccga gccaggaagt tcacaaccga aatgtcttct agggctaatac aggtaacttc
61 ggacgattta aagttgccag atggacgaga aaacagtaga ggcgttgcca acctggataa
121 ggcgctatct tctaattaaa acattcagac ggggcggggg atgcggtggc caaagcacca
181 taaaacaaaa cttccaagta ctgaccaact cactgcaagt ttgtgccccg agtacatcta
241 ggttcagggg ttcttgtctt catgctccca actgcgggcg gatttttggg cccttgggac
301 tttcagtgca gcggcgaaga gagttctgca cttgcaggct cctaatagagg gcgcagtggy
361 cctcgtgttt ctggtgatgc ttcccagggt gctgggggca gcaagtgtct cagagcccat
421 tactggctac attttacttc caccagaaac cgagctgcgt ccagatttgc tctcagatgc
481 gacttgccgc ccggcacagt tccgggtag taggggagtg ggcgtgggaa accgggaaac
541 ccaaacctgg tatccagtgg ggggcgtggc cggacgcagg gaggccccac ccctcccggg
601 aatgaccccc cccccattcg ctagtgtgta gccggcgctc tctttctgcc ctgagtcctc
661 aggaccccaa gagagtaagc tgtgtttcct tagatcgcgc ggaccgctac ccggcaggac
721 tgaagccca gactgtgtcc cgcagccggg ataacctggc tgacccgatt ccgcgacac
781 cgctgcagcc gcggtggag ccagggcgcc ggtgccccgc gctctccccg gtcttgcgct
841 gcgggggccc ataccgctc tgtgacttct ttgcggggcca gggacggaga aggagtctgt
901 gcctgagaac tgggctctgt gccagcgcgc aggtgcagg//
```


A. Appendix

A.4.2. Enhancer des VEGFR-2

LOCUS AF153058 430 bp DNA ROD 22-MAY-2000
DEFINITION Mus musculus tyrosine kinase FLK-1 minimal enhancer sequence.
ACCESSION AF153058VERSION AF153058.1 GI:7963625KEYWORDS .
SOURCE house mouse. ORGANISM Mus musculus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 430) AUTHORS Kappel,A., Risau,W. and
Breier,G.
TITLE Prerequisite role of SCL/tal-1, GATA and Ets transcription
factor
binding sites for the in vivo function of Flk-1 gene regulatory
elements JOURNAL UnpublishedREFERENCE 2 (bases 1 to 430)
AUTHORS Kappel,A., Risau,W. and Breier,G. TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (21-MAY-1999) Molecular Cell Biology, Max-Planck,
Institut fuer Physiologische und Klinische Forschung,
Parkstrasse 1, Bad Nauheim 61231, Germany
FEATURES Location/Qualifiers source 1..430
/organism="Mus musculus"
/strain="129Sv"
/db_xref="taxon:10090"
/tissue_type="liver"
/dev_stage="fetus" enhancer 1..430
/note="tyrosine kinase FLK-1 minimal enhancer"
BASE COUNT 108 a 94 c 112 g 116 tORIGIN
1 aaatgtgctg tctttagaag cactgcctc agcttctgca gctcagatac caaaggaagt
61 ctggtacaca gcatgataaa agacaatggg acgggggtcac agtggctccc gtccctttca
121 ggggtatgga gacgagctgt agagagatgt ctccaggag ttttcattaa tcagcaattt
181 agtcagatct gtgcataccta tgctttaca gaaatgtcag tgggcctgag atcatcagat
241 ggaggttcat cgggtttcaa tgtcccgtat cttttgtaa gacctgaag ttggcaacgc
301 aggaaaacag gaactccacc ctggtgccgt gaattgcaga gctgttgtgt tggtttgtga
361 ccactgccc attcttctg ttatgacaga gcttgtgaac ttaactggg actggggcaa
421 agtcaatccc //

A. Appendix

A.4.3. Untranslatierter 5'-Bereich von VEGFR-1

LOCUS MMU224863 2648 bp DNA ROD 10-MAR-1998
DEFINITION Mus musculus FLT-1 gene, 5'-flanking region.
ACCESSION AJ224863
VERSION AJ224863.1 GI:2950391
KEYWORDS FLT-1 gene; promoter.
SOURCE house mouse.
ORGANISM Mus musculus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria;
Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 2648)
AUTHORS He,Y.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (03-MAR-1998) He Y., Obstetrics and Gynaecology,
University of Cambridge, The Rosie Maternity Hospital, Robinson
Way, Cambridge CB2 2SW, UK
REFERENCE 2 (bases 1 to 2648)
AUTHORS He,Y. and Charnock-Jones,D.
TITLE Functional analysis of the promoter for FLT-1
JOURNAL Unpublished
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..2648
/organism="Mus musculus"
/strain="129Sv/ev"
/db_xref="taxon:10090"
promoter <1..2371
/gene="FLT-1"
gene 1..2371
/gene="FLT-1"
TATA_signal 2340..2347
/gene="FLT-1"
BASE COUNT 580 a 676 c 762 g 630 t ORIGIN
1 gatctttccc atcaatggta tctagaaaac ctctttcatg actgatttgg ttcgaagagt
61 cctactgtag cccattattc aactctgtta ccacttctgg ggaaagggtc ttagcccttt
121 attgtccata tcaaagtgaa gttgaaatgt ccaatgaaac agtttgtatc attttaaaaat
181 tcttaataac aataataaca ataacaacca atgcaaccta caaaagaaat attggtgtgg
241 aagttgttgg ctgtaaatta aaagtctggg gcttttcaa agagttggag aaacgtatcg
301 aaggccacag catataaacc ttagctactt caattacgag gccattaatc ttagataatt
361 gagcगतatt ttagcattgt taatgcacag cttaagttat agatggtttt ggctgtcggg
421 caaatacctg tctggcttca tgatcccata aagtcattgt gggatcattt ctggcaacaa
481 actcataagg atctccttga gtatttaaag acatcaaaat gccatttgaa aacaacgcat
541 taaactaac ctttggggac tgtacatgca acacttcccc caagttggta gttcccctcg
601 ctggtcttcc cctacaataa gccatgcccg tgtttctgtg ctcatgggtg gcttcatacc
661 cctctagaat cgtacacctc ctccacgttg tgtgtcttgg tttctgtcgg cctgctcagc
721 gcagcacctc cagcctcagt ggcgatgggt ttccaattgg caagctctcc ccagcccaaa
781 cacctgccat tgcttaaagg ggctgagcag acctcttaga agatgcgtgg gcgttaggat
841 agctcttagg ggagacaggg acagtttgac cgtgtgggtg tgtcaagacc atctgaggcc
901 ggagattcag ctgggagaat tataactacc tagtgcgggc catcctgcat gattcctgat
961 tggagagcaa tttgaggcgc cggaggcaga gggcaggaat actgacccta gtggaagctt
1021 gtagagaaat cagaattggc tggggaagtc cgcaggtgag cttaggctca cagcggctct
1081 tcccttctgc tagaccatga aggagaaaag gaatctcact tgccctggct cagaggctcc
1141 cgggtgcccta gtagagctgc ggggtgtggt ggcccagact ctcttaggaa tgaggcaact
1201 caggttgcgc aaccttccct accggagggt tagtctagtc cttcaggaaa agcctctggt
1261 cccatttagg agccatttta tcacgggtat ctggcagggt ctattgaggc tatttttcaa
1321 acctgcagta tttacagggg caagactggg ctgctccggg gaggccggga cgacttcagc
1381 cttccagtta atggatgcat aattgaggaa caacgtggaa ttagtgtcat cgtaaagtat
1441 ctagtgtctc aagttaattt caccctgttt ttgttccaag aacattcgag tcagtcatct
1501 tggctagccg gcttccacca aaaagatttg ttttccatcc agcgtttcag acctagagtt
1561 caagttcttg gcccttaca gttgcaggag cgtgtctcac gccttggtt ttttttttt
1621 tttttttttt ttttttttaa ggtaacatgt tattccttgt tttgcttcta ggaagcagag
1681 ggttgaggaa atggcttggg cgggtgcatt aatgcagccg aaaaagacac agactccctc

A. Appendix

```
1741 ccttgggacc cgcgcggccc cgcgctcttt ccgaaggtgc ctggcaaggc gtccggttcc
1801 ctcgacgct ccgggtccaa gtgccttaag cggaggtct ctggcgcctt ccttcgctgt
1861 ctggcaacag tctggcgggg tcagggaccg gcgggaccgc tcgggagagg gctcgactgc
1921 gcctcgttcc tcggtgccag ggacaccgtc gcgggagggc cggccagctt ccctaggata
1981 agacttcccg ccccgggggc agggcgggtgc acttagacgg tcccctcctc agtttcgggc
2041 ggtcaccaga gctgagtaag ctcggtggag ggagctgggt aaggatttcc tgagagcgat
2101 gggcaggagg ggctggggca gcagagcaca gagcaaggac cctgaacctg cgaacctgct
2161 cggcgacccg cgcgcctagc gccaccgcac gcgcgctctg gccccgggc taccgcctc
2221 cgccggcccc cgcccctcg ggaggaagaa gaggtaggt ggggagggc atgaggggtg
2281 ggggaccct tgacgtcact ggaaggaggt gcggggtag gaagtgggtc ggggaaaggt
2341 tataaatcgc ccccgccctc ggctgcactt cagcgaggtc cttgagaggc tcggagcgcg
2401 gtggcggaca ctccgggag gtagtgctag tgggtggggc tgctgctcgg agcgggctcc
2461 gggactcaag cgcagcggct agcggacgcg ggacggcgag gatcccccca caccacccc
2521 ctcgctgca ggcgcggaga agggctctcg cggcgccaag cagaagcagg aggggaccgg
2581 ctgagcggc tgcgcgctc gcctcggaga gcgcgggcac cgggccaaca ggccgcgtct
2641 tgctcacc
```

//

A. Appendix

A.4.4. EST des Tissue Factor

LOCUS AI085165 546 bp mRNA EST 24-SEP-1998
DEFINITION ox95d08.s1 Soares_senescent_fibroblasts_NbHSF Homo sapiens cDNA
clone IMAGE:1664079 3' similar to gb:J02931
TISSUE FACTOR PRECURSOR
(HUMAN);, mRNA sequence.ACCESSION AI085165
VERSION AI085165.1 GI:3423588KEYWORDS EST.SOURCE human.
ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 546)
AUTHORS NCI-CGAP <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap>.
TITLE National Cancer Institute, Cancer Genome Anatomy Project
(CGAP), Tumor Gene Index JOURNAL Unpublished
COMMENT Contact: Robert Strausberg, Ph.D. Tel: (301) 496-1550
Email: Robert_Strausberg@nih.gov
This clone is available royalty-free through LLNL ; contact the
IMAGE Consortium (info@image.llnl.gov) for further information.
Insert Length: 1891 Std Error: 0.00
Seq primer: -40m13 fwd. ET from Amersham
High quality sequence stop: 400.
FEATURES Location/Qualifiers source 1..546
/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
/clone="IMAGE:1664079"
/tissue_type="senescent fibroblast"
/clone_lib="Soares_senescent_fibroblasts_NbHSF"
/lab_host="DH10B (ampicillin resistant)"
/note="Vector: pT7T3D (Pharmacia) with a modified
polylinker V_TYPE: phagemid; Site_1: Not I;
Site_2: EcoRI; 1st strand cDNA was primed with a
Not I - oligo(dT)
primer [5'TGTTACCAATCTGAAGTGGGAGCGGCCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'],
double-stranded cDNA was size selected, ligated to Eco RI
adapters (Pharmacia), digested with Not I and cloned into
the Not I and Eco RI sites of a modified pT7T3 vector
(Pharmacia). Library went through one round of
normalization to a Cot = 5. Library constructed by Bento
Soares and M.Fatima Bonaldo."
BASE COUNT 196 a 99 c 82 g 169 tORIGIN
1 tttttaacaa ttcccagtca cctttattta aagtatatta aataaattat ctcaatatat
61 acaaatagaa caatattacc tacataaata gaaaatcccc atatagaaaa cctttttaaa
121 aaattatata tacaatgtca accatagaag ctttaagtac cttaaatacat aaactctgta
181 gtttgtatag tagtcttata aaaatatagt tagctctcaa atgtttaatg ccacttaagt
241 cagttaaagt gcagattgta aagcatatta ggaagggtgcc cagaatacca atgtctcctg
301 cacttaacac attaatacaa agtttgcaa ttgttttgaa tttccaaatg tattcctgaa
361 aaaaaaaaga acctaaacac tatattatag acatatgtta gaaaagtcct agaaatgcac
421 ccaatttcgt tccatthttac tttcgtacat gggatggagt cagcccctca aagctthttcg
481 gctgggcatg gtggttcacg ccccatatac tagcacttgg ggaggccagg gtggggtgat
541 cactga//

A. Appendix

```

LOCUS       R21396             494 bp     mRNA             EST             18-APR-1995
DEFINITION  yg51g03.r1 Soares infant brain 1NIB Homo sapiens cDNA clone
IMAGE:36200 5' similar to gb:J02931 TISSUE FACTOR PRECURSOR
(HUMAN);, mRNA sequence.ACCESSION R21396
VERSION    R21396.1  GI:776177KEYWORDS EST.SOURCE human.
ORGANISM   Homo sapiens
           Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
           Euteleostomi;
           Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE  1 (bases 1 to 494)
AUTHORS   Hillier,L., Clark,N., Dubuque,T., Elliston,K., Hawkins,M.,
           Holman,M., Hultman,M., Kucaba,T., Le,M., Lennon,G., Marra,M.,
           Parsons,J., Rifkin,L., Rohlfing,T., Soares,M., Tan,F.,
           Trevaskis,E., Waterston,R., Williamson,A., Wohldmann,P. and
           Wilson,R. TITLE The WashU-Merck EST Project
JOURNAL   UnpublishedCOMMENT Contact: Wilson RK
           Washington University School of Medicine
           4444 Forest Park Parkway, Box 8501, St. Louis, MO 63108
           Tel: 314 286 1800 Fax: 314 286 1810
           Email: est@watson.wustl.edu Insert Size: 1816
           High quality sequence stops: 259 Source: IMAGE Consortium, LLNL
           This clone is available royalty-free through LLNL ; contact the
           IMAGE Consortium (info@image.llnl.gov) for further information.
           Insert Length: 1816 Std Error: 0.00 Seq primer:

M13RP1
           High quality sequence stop: 259.
FEATURES   Location/Qualifiers source 1..494
           /organism="Homo sapiens"
           /db_xref="GDB:408701"
           /db_xref="taxon:9606"
           /clone="IMAGE:36200" /sex="female"
           /clone_lib="Soares infant brain 1NIB"
           /dev_stage="73 days post natal"
           /lab_host="DH10B (ampicillin resistant)"
           /note="Organ: whole brain; Vector: Lafmid BA; Site_1:
           NotI; Site_2: Hind III; 1st strand cDNA was primed
           with a NotI - oligo(dT)
           primer [5'AACTGGAAGAATTTCGCGCCGCAGGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'];
           double-stranded cDNA was ligated to Hind III adaptors
           (Pharmacia), digested with Not I and directionally cloned
           into the Not I and Hind III sites of the Lafmid BA vector.
           Library went through one round of normalization. Library
           constructed by Bento Soares and M.Fatima Bonaldo."
BASE COUNT 138 a 102 c 130 g 118 t 6 others
ORIGIN
1 gatccttggc cgggtgtcctg ggattacaag gcactacaaa tactgtggca gcatataatt
61 taacttggaa atcaactaat ttcaagacaa ttttggagtg ggaacccaaa cccgtcaatc
121 aagtctacac tgttcaaata agcactaagt caggagattg gaaaagcaaa tgcttttaca
181 caacagacac agagtgtgna cctcaccgac gagattgtga aggatgtgaa gcagacgtac
241 ttgggcacgg gtcttctcct accggcagg anattgtggg aggagcaccg gtttcttgct
301 ggggggagcc ttcttgttat ggaggaactc cccaggagtt tcacacctt acctgggggag
361 gacaaacctt cgggacaggc ccaacathtt cagagttttt tggaacaggt nggggaacca
421 aaagtggaat gttggaccct taggaagggt ggaacgggan ttttagttcc ggaaggggaa
481 caacantttt ncct//

```

A. Appendix

A.4.5. EST von Angiopoietin 2

LOCUS AI491766 368 bp mRNA EST 14-APR-1999
DEFINITION tn94g04.x1 NCI_CGAP_Ut2 Homo sapiens cDNA clone
IMAGE:2177238 3', mRNA sequence.ACCESSION AI491766VERSION
AI491766.1 GI:4392769

KEYWORDS EST.SOURCE human. ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 368)
AUTHORS NCI-CGAP <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap>.
TITLE National Cancer Institute, Cancer Genome Anatomy Project (CGAP),
Tumor Gene Index JOURNAL Unpublished

COMMENT Contact: Robert Strausberg, Ph.D. Tel: (301) 496-1550
Email: Robert_Strausberg@nih.gov
Tissue Procurement: Christopher Moskaluk, M.D., Ph.D., Michael R.
Emmert-Buck, M.D., Ph.D.
cDNA Library Preparation: Life Technologies, Inc.
cDNA Library Arrayed by: Greg Lennon, Ph.D.
DNA Sequencing by: Washington University Genome Sequencing Center
Clone distribution: NCI-CGAP clone distribution information can be
found through the I.M.A.G.E. Consortium/LLNL at:
www-bio.llnl.gov/bbrp/image/image.html
Insert Length: 2269 Std Error: 0.00
Seq primer: -40UP from Gibco
High quality sequence stop: 351.

FEATURES Location/Qualifiers source 1..368
/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
/clone="IMAGE:2177238"
/tissue_type="moderately-differentiated endometrial
adenocarcinoma, 3 pooled tumors"
/clone_lib="NCI_CGAP_Ut2"
/lab_host="DH10B"
/note="Organ: uterus; Vector: pCMV-SPORT6; Site_1: SalI;
Site_2: NotI; Cloned unidirectionally. Primer: Oligo dT.
Average insert size 1.85 kb. Life Technologies catalog #:
11539-012"BASE COUNT 89 a 63 c 85 g 131 t

ORIGIN
1 tttttttttt tttttttttt gggatagggg tggggaattc aggacatatg ggtatttaca
61 cagtgtataa acagtgtctca gaagaatgca gttccaagat gatctgtatt ggataacata
121 agtgttctgt tttccagtta tttactgata aacttgacaca taacattctt ggttgtgaca
181 gcagcgtctg taaactgtca gtctgattct cagcctcggg ttcattctttg cataggtgtt
241 ctgtctaata acaattatgg atgttttaggg tcttgctttg gtccgtaag tgatgcaagt
301 ttaagtgata aagtttacag gctctaattc ggagcatgtg ggtcccgtca gcaccgagca
361 cacgccct//

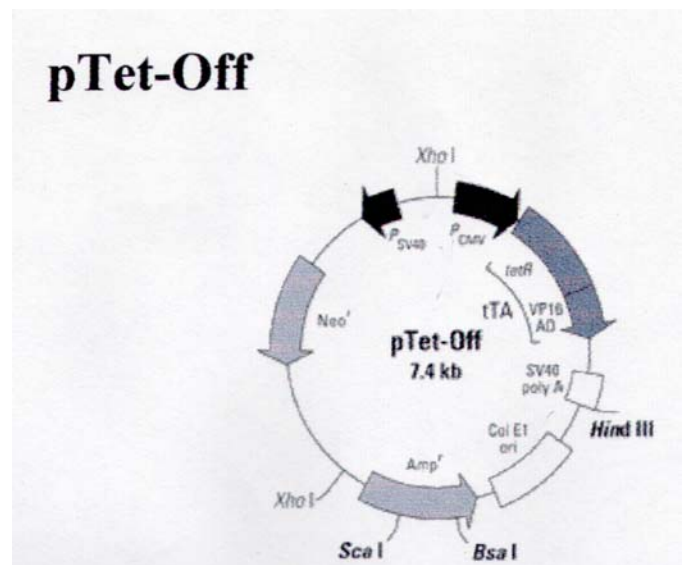
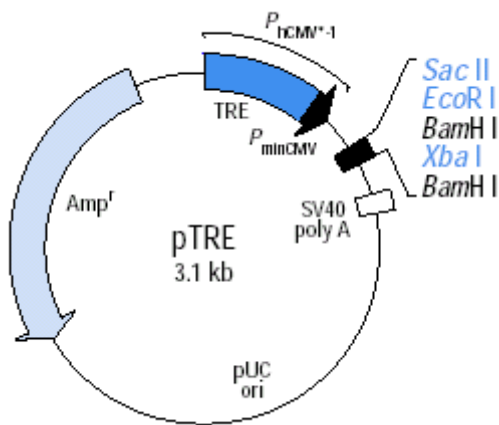
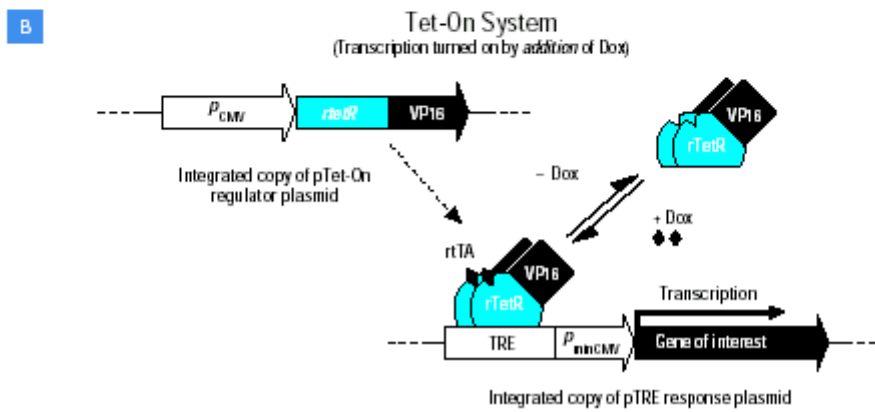
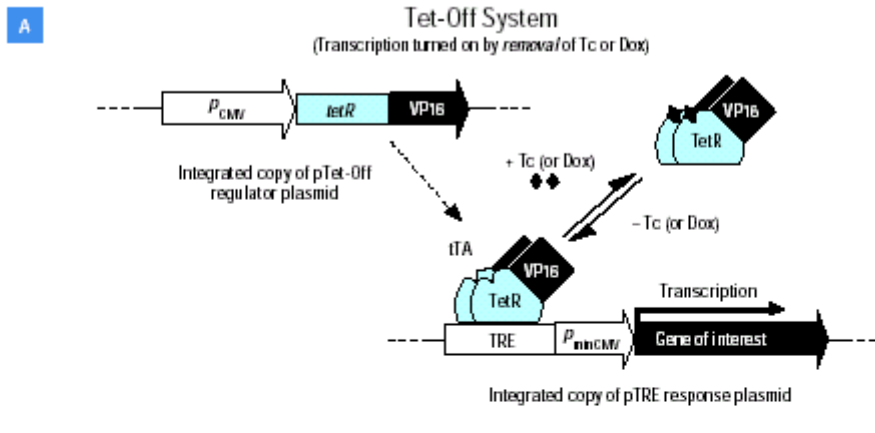
A. Appendix

LOCUS AI972163 756 bp mRNA EST 08-MAR-2000
DEFINITION wr63d01.x1 NCI_CGAP_Ut1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2492353 3'
similar to TR:O15123 O15123 ANGIOPOIETIN-2. ;, mRNA sequence.
ACCESSION AI972163
VERSION AI972163.1 GI:5768989
KEYWORDS EST.
SOURCE human.
ORGANISM Homo sapiens Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata;
Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 756)
AUTHORS NCI-CGAP <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap>.
TITLE National Cancer Institute, Cancer Genome Anatomy Project
(CGAP), Tumor Gene Index
JOURNAL Unpublished
COMMENT Contact: Robert Strausberg, Ph.D.
Tel: (301) 496-1550
Email: Robert_Strausberg@nih.gov
Tissue Procurement: Christopher Moskaluk, M.D., Ph.D., Michael R.
Emmert-Buck, M.D., Ph.D.
cDNA Library Preparation: Life Technologies, Inc.
cDNA Library Arrayed by: Greg Lennon, Ph.D.
DNA Sequencing by: Washington University Genome Sequencing Center
Clone distribution: NCI-CGAP clone distribution information can be
found through the I.M.A.G.E. Consortium/LLNL at:
www-bio.llnl.gov/bbrp/image/image.html

Insert Length: 2200 Std Error: 0.00
Seq primer: -40UP from Gibco
High quality sequence stop: 412.
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..756
/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
/clone="IMAGE:2492353"
/tissue_type="well-differentiated endometrial
adenocarcinoma, 7 pooled tumors"
/clone_lib="NCI_CGAP_Ut1"
/lab_host="DH10B"
/note="Organ: uterus; Vector: pCMV-SPORT6; Site_1:
SalI; Site_2: NotI; Cloned unidirectionally. Primer:
Oligo dT.
Average insert size 1.75 kb.
Life Technologies catalog #: 11538-014"
BASE COUNT 186 a 147 c 179 g 240 t 4 others
ORIGIN
1 tttttttttt gggatagtga tggatgaattc aggacatatg ggtatttaca cagtgtataa
61 acagtgtctc gaagaatgca gttccaagat gatctgtatt gtataacata agtgttctgt
121 tttccagtta tttactgata aacttgaca taacattctt ggttggtgaca gcagcgtctg
181 taaactgtca gtctgattct cagcctcggg gttcatcttt gcataggtgt tctgtctaat
241 cacaattatg gatgttttagg gtcttgcttt ggtccgtaa gtgatgcaag ttttaagtgt
301 aaagtttaca ggctctaate tggagcatgt ggggccgctc agcaccgagc acacgccctc
361 tgtgggtggaa gaggacacag tgcgcagccg tgactttcag tgcactgggc ttaagtcttt
421 gaaaatagtt cgagacagtt cctcaggtgg actgggatgt ttagaaatct gctggtcggg
481 tcaatcatgt tgtggccttg agcgaatagc ctgagccttt ccagtagtac catttaatgc
541 cgntgaactt tatttgtgtc tggctctgtg gatagtagat tccgggtcaag ttggaaggac
601 cacatgcate anaccaccag gctattaatg agttctcact tgagagatta gaatgttcat
661 acaatgagta agcctcattc ccttaccagn ctnttaggtg atttttagcac atagcgtttg
721 tgatttagtc ttgcaacca actcatttcc cagcca
//

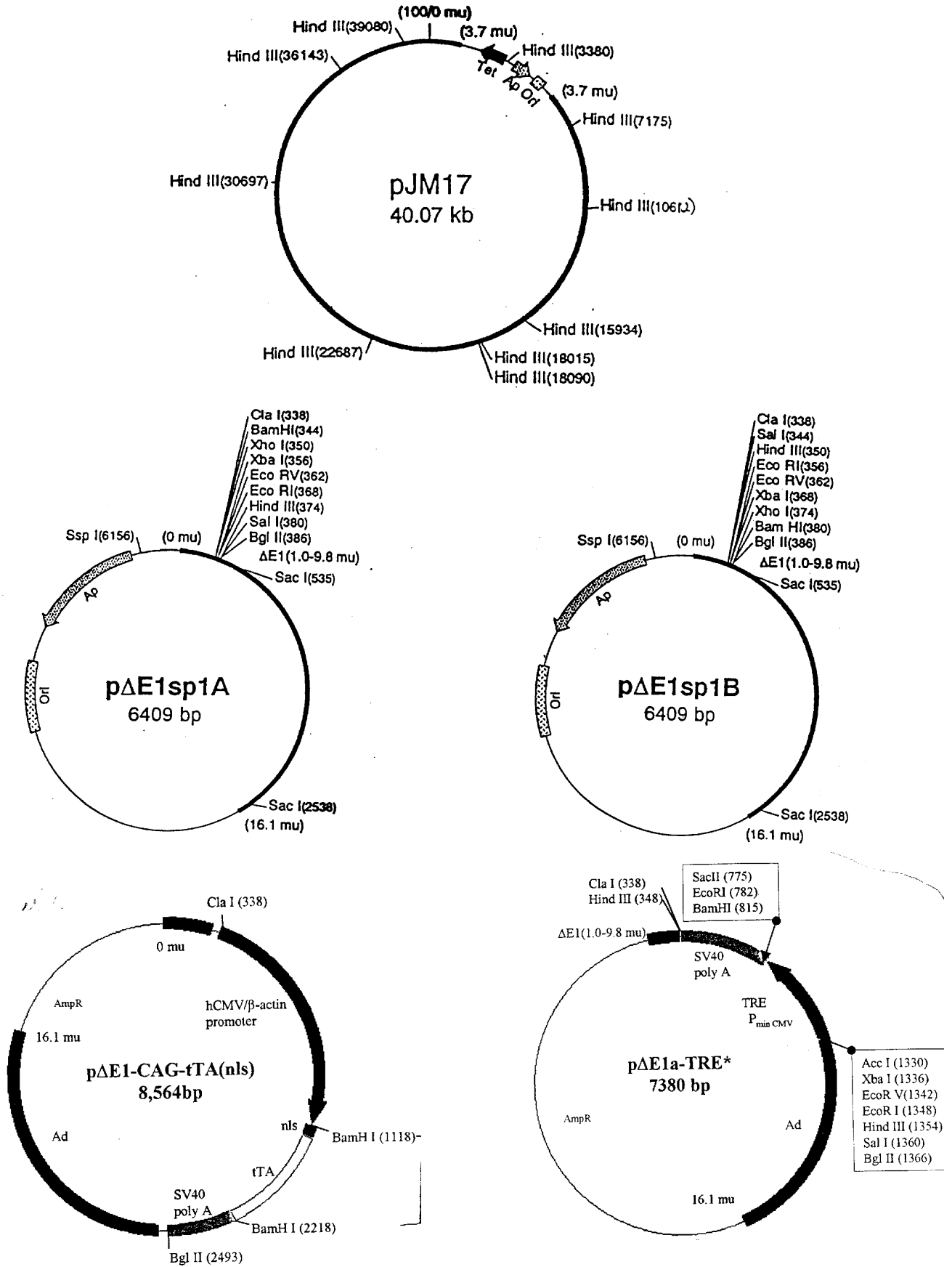
A. Appendix

A.5. Das Tet-System

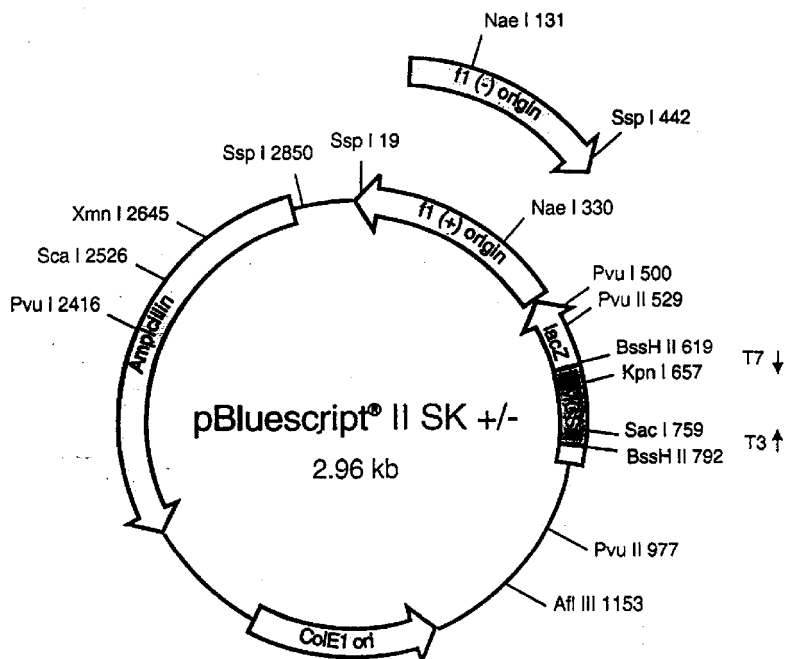
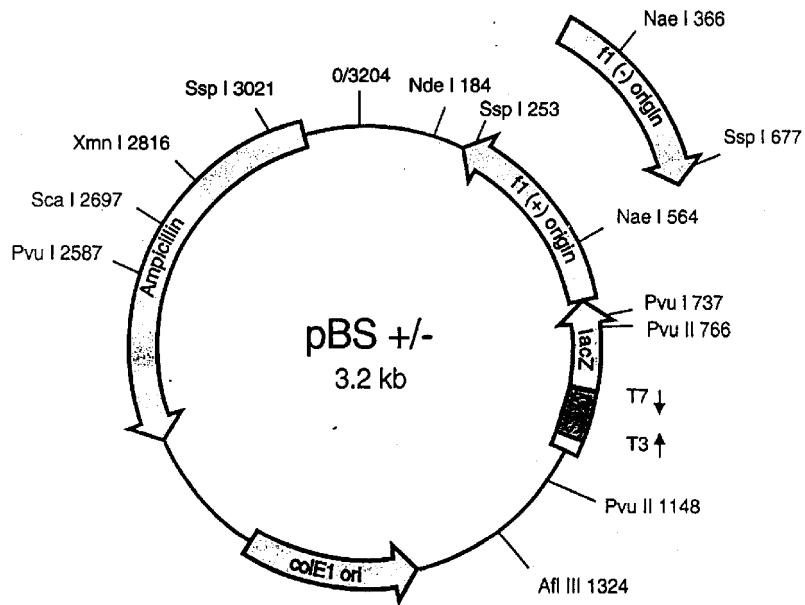
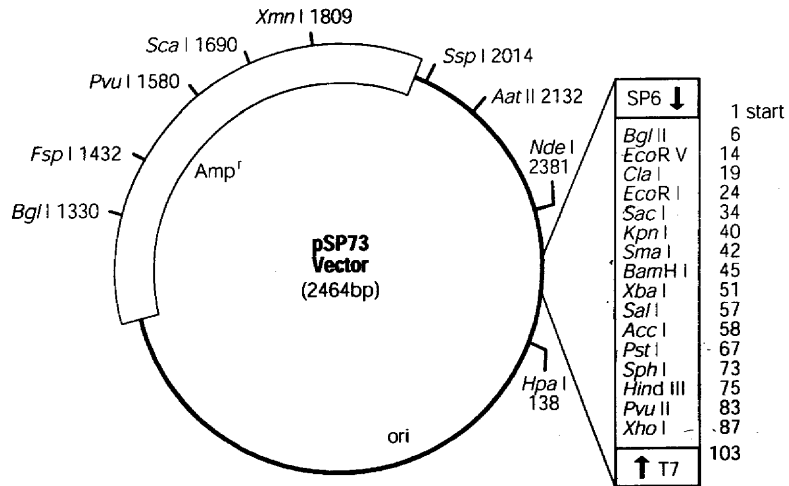


A. Appendix

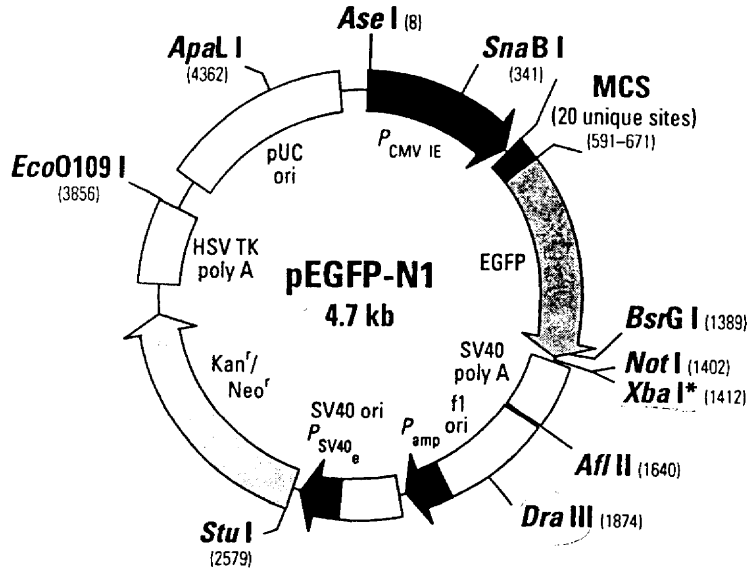
A.6. Verwendete Plasmide



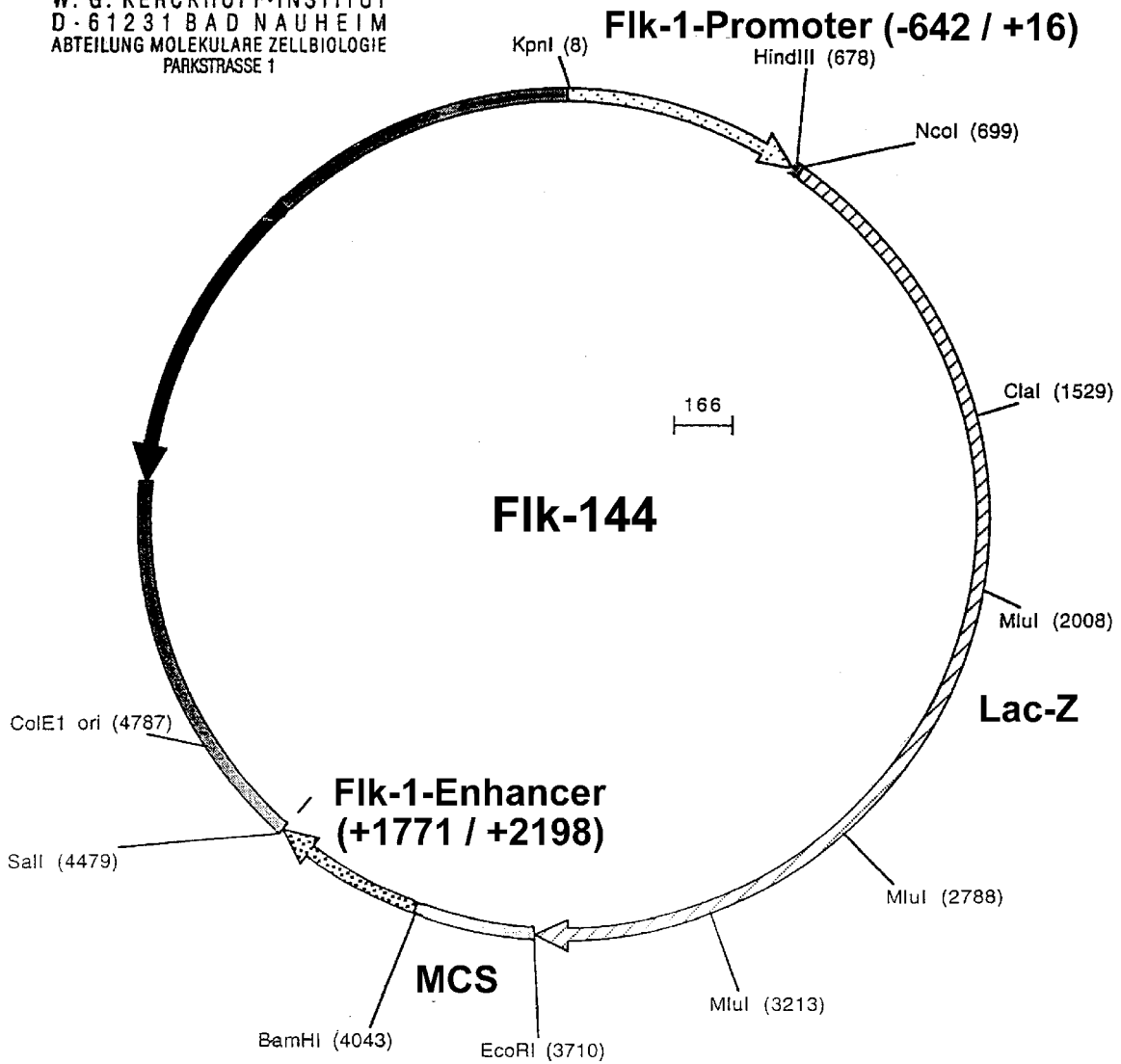
A. Appendix



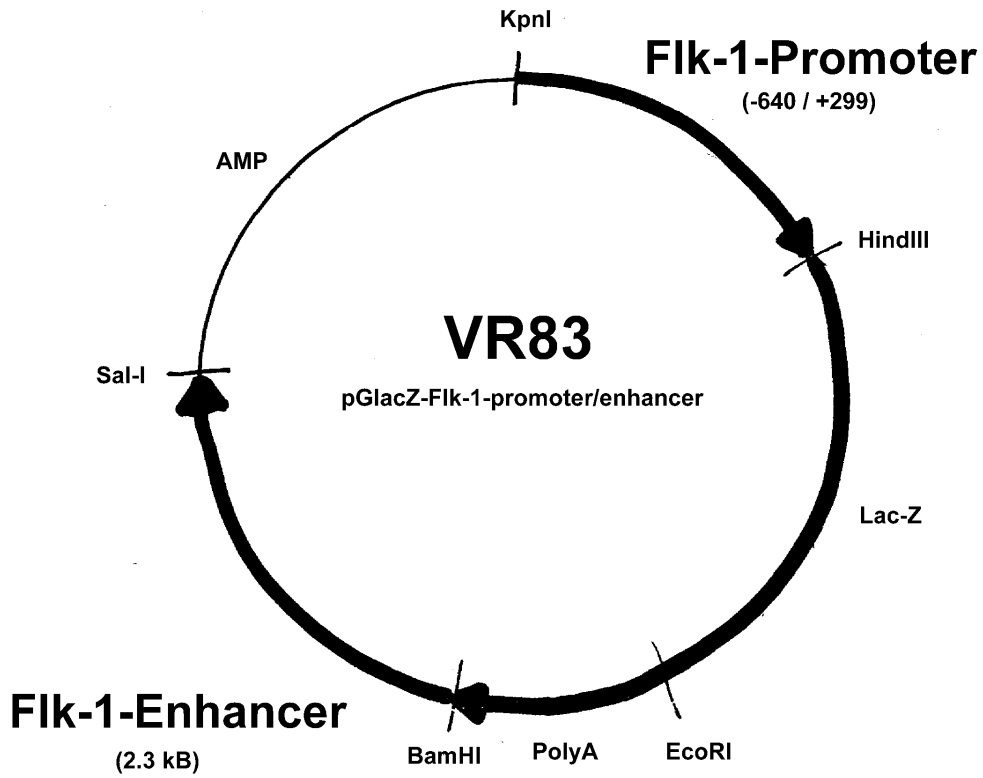
A. Appendix



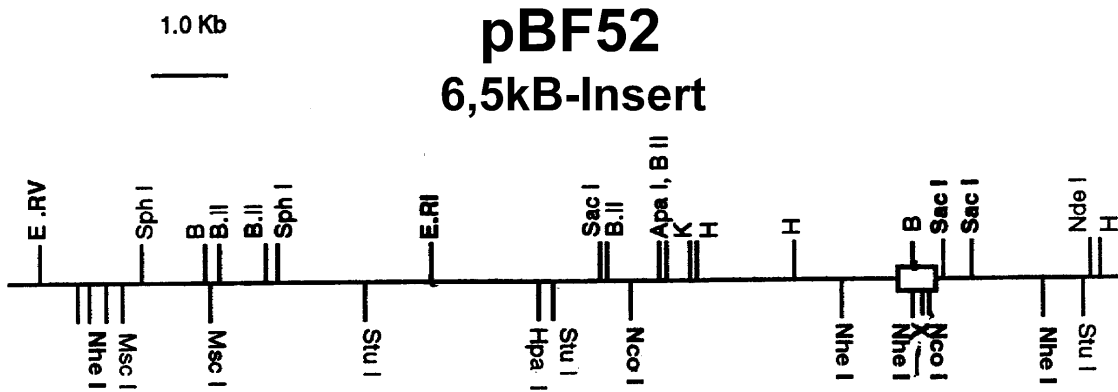
MAX-PLANCK-INSTITUT
für PHYSIOLOGISCHE u. KLINISCHE FORSCHUNG
W. G. KERCKHOFF-INSTITUT
D - 61231 BAD NAUHEIM
ABTEILUNG MOLEKULARE ZELLBIOLOGIE
PARKSTRASSE 1



A. Appendix



Kappel et al., Blood 93, 4284-4292, 1999

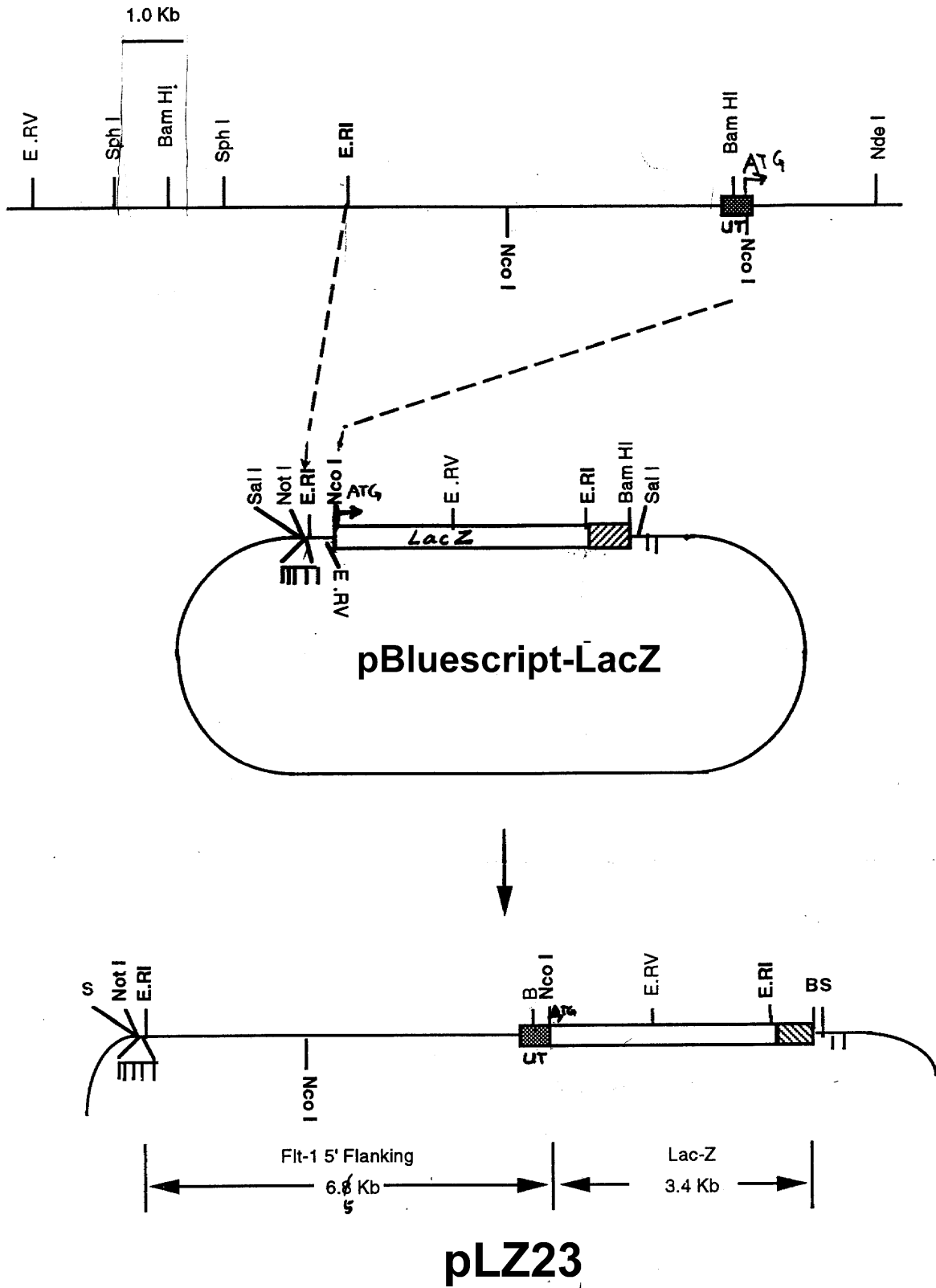


Flt-1 Promoterfragment, kloniert nach NotI von pBSK II (-)

A. Appendix

Construction of Flt-1-Lac-Z Fusion for 5'-arm of Flt-1

Targeting Vector



A. Appendix

A.7. DNA-Marker

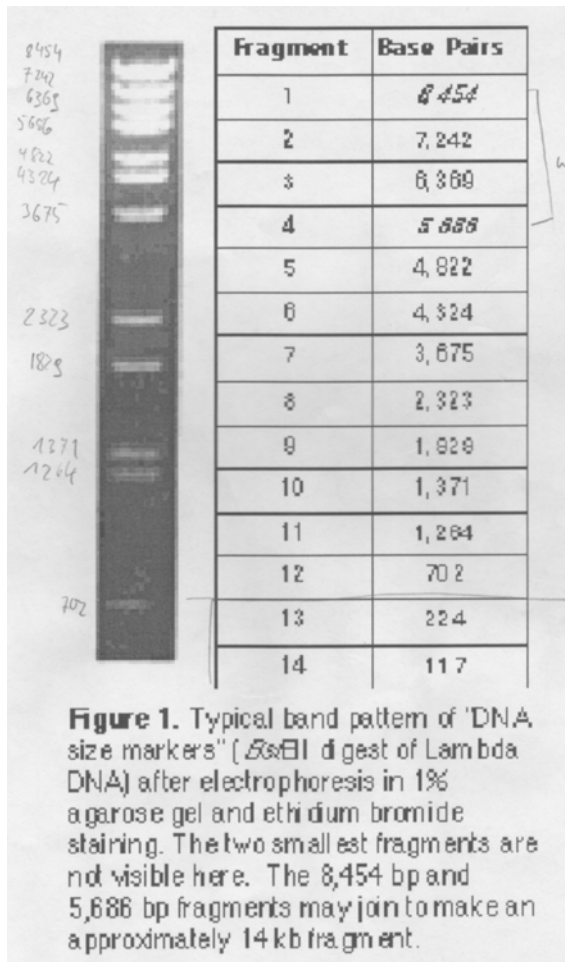
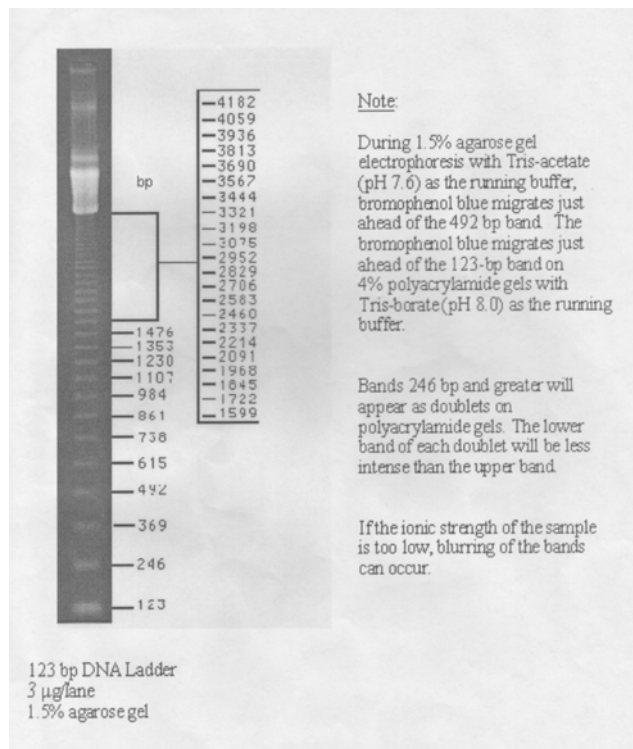


Figure 1. Typical band pattern of "DNA size markers" (*Sma*I digest of Lambda DNA) after electrophoresis in 1% agarose gel and ethidium bromide staining. The two smallest fragments are not visible here. The 8,454 bp and 5,688 bp fragments may join to make an approximately 14 kb fragment.



A. Appendix

A.8. Curriculum Vitae

Horst-Dietmar Müller

Geboren am 6. Juli 1970

in Wildeshausen bei Bremen / Niedersachsen / Deutschland

Familienstand: Ledig

Nationalität: Deutsch

Bildungsweg

1977/78: Eintritt in die kath. Grundschule Wildeshausen, Besuch bis Semester I der 4. Schulstufe

1980/81: Umzug nach Österreich, Besuch der Volksschule Wien X, Ada-Christen-Gasse 9

1981/82: Eintritt in die integrierte Gesamtschule Groß-Enzersdorf / NÖ

1982/83: Eintritt in das Bundes-Realgymnasium Gänserndorf / NÖ

1984/85: Eintritt in das Bundes-Realgymnasium Radetzkystraße 2, Wien III

1987/88: Eintritt in das Bundes-Oberstufenrealgymnasium Hegelgasse 12, Wien I

Matura: 7. Juni 1991

1991/92: Immatrikulation an der Universität Wien, inskribiertes Fach: Biologie

Mai 1995: Ende des 1. Studienabschnittes

1995/96: Inskribierte Studienrichtung Genetik

April 2000: Beginn vorliegender Diplomarbeit
Institut für Gefäßbiologie und Thromboseforschung

Zwischen 1991 und 2001 zahlreiche Beschäftigungen zur Finanzierung des Studiums, u.a.:

- 1991-93, 95-96 diverse Nebenbeschäftigungen, z.B. als Unterrichtender in verschiedenen Nachhilfeinstituten.
- 1994 Leitung des Wasser- und Kühlturmlabors bei Petro Chemie Donau / OMV, Schwechat
- 1996 Durchführung von Werbekampagnen bei Firma Wissmann & Friesacher GbR / D83022 Rosenheim
- 1997 Durchführung von Werbekampagnen bei Wissmann & Friesacher als Teamleiter
- 1997 Tätigkeit bei der Finanzberatungsgesellschaft A&M, Wien V
- 1998 – 2000 Tätigkeit bei der Finanzberatungsgesellschaft EKRON, Wien VII
- Seit 1997 Lehrender an der Volkshochschule Polykollege, Wien V