

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Abteilung für Molekulare Zellbiologie

Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Arbeitsgruppe Genterapie

Open Reading Frame 2 des LINE 1 Retrotransposons Funktionelle Analyse in Mammaliazellen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kristin Dammann

aus Buchholz i.d.N.

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 18.03.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuß, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuß, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Transposons - mobile genetische Einheiten	1
1.2	Geschichte der Transposons	2
1.3	Einteilung der Transposons	4
1.4	Transposons in Prokaryonten	4
1.5	Transposons in Eukaryonten	5
1.5.1	Retrotransposons	6
1.5.2	LINE 1 Retrotransposons	7
1.5.3	Struktur von LINE 1	7
1.5.4	Mechanismus der LINE 1 Retrotransposition	8
1.6	LINE 1 Retrotransposons in Eukaryonten	13
1.7	Gentherapie	16
1.8	Lokalisation von LINE 1	17
1.9	Bedeutung der Angiogenese	19
1.10	Vaskulogenese	20
1.11	Angiogenese	22
1.12	Angiogeneseaktivatoren	23
1.12.1	VEGF	23
1.12.2	Weitere Aktivatoren	28
1.13	Angiogeneseinhibitoren	31
1.14	Angiogeneseinhibition durch Gefäßstabilisierung?	35
1.15	Antiangiogene Tumorthherapie	36

2. Zielsetzung **38**

3. Material und Methoden **39**

3.1	Geräte und Materialien	39
3.2	Methoden	44
3.2.1	DNA-molekularbiologische Methoden	44
3.2.1.1	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-chain-reaction	44
3.2.1.2	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	46
3.2.1.3	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	48
3.2.1.4	Klonierungen	48

3.2.1.5 Restriktionsenzymverdau	49
3.2.1.6 Dephosphorylierung von DNA-Enden	50
3.2.1.7 Ligation	50
3.2.1.8 Transformation	51
3.2.1.9 Plasmidpräparationen	53
3.3 Zellkultur	56
3.3.1 Transfektionen von Zellen	57
3.3.2 Virusinfektion von Zellen	58
3.3.3 Immunhistochemische Färbung	59
3.3.4 Immunfluoreszenzfärbung	61
3.3.5 Konfokale Mikroskopie	61
3.4 Proteinanalytik	63
3.4.1 BCA-Proteinbestimmung	63
3.4.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	63
3.4.3 Western-Blot-Analysen	64
3.5 Real-Time PCR	65
3.5.1 RNA-Isolierung	65
3.5.2 reverse Transkription	66
3.5.3 Real-Time PCR mittels Light-Cycler	67
4. Ergebnisse	69
4.1 Infizierbarkeit primärer Endothelzellen mit adenoviralen Vektoren	69
4.2 Herstellung eines Expressionsplasmides für LINE 1 ORF2	70
4.3 Immunfluoreszenzfärbungen in Zellkultur	80
4.3.1 Immunfluoreszenzfärbung von Huh7 Zellen	80
4.3.2 Immunhistochemische Färbung in transfizierten 293 Zellen	81
4.3.3 Optimierung der ORF2 Überexpression	81
4.3.3.1 Transfektion in verschiedenen Zelllinien	81
4.3.3.2 Transfektion mit unterschiedlichen Reagenzien	83
4.3.3.3 Time-course der GFP-Expression	84
4.3.4 Transfektionen von pJM101RP in PAE-Zellen	85
4.3.5 Konfokale Lokalisation des ORF2	87
4.3.6 ORF2 Expression nach Wachstumsfaktorstimulation	89

4.4	Western-Blot-Analysen	91
4.5	Real-Time-PCR	92
5.	Diskussion	94
5.1	Identifikation des Untersuchungssystems	94
5.2	Subzelluläre Lokalisation des ORF2	96
5.3	Weitere Expressionsanalysen	99
5.4	Ausblick	101
6.	Zusammenfassung	104
7.	Literaturverzeichnis	105
8.	Abkürzungsverzeichnis	123
9.	Danksagung	125
10.	Lebenslauf	126
11.	Erklärung	127

1. Einleitung

Transposons - mobile genetische Elemente - nehmen 45 % und damit beinahe die Hälfte des menschlichen Genoms ein. Trotz dieses großen Anteils am menschlichen Genom ist das Wissen über diese Elemente noch sehr begrenzt. Das Ausmaß der genetischen Beeinflussung durch Transposons scheint enorm und ihre Bedeutung entgegen vieler Annahmen keinesfalls unerheblich zu sein.

Nach der Darstellung der Einteilung der Transposons, ihrer Geschichte und dem Mechanismus der Transposition, wird ein kurzer Einblick in den derzeitigen Stand der Forschung gegeben. Anschließend wird die für diese Arbeit erforderliche Verbindung zur Angiogenese hergestellt.

1.1 Transposons - mobile genetische Elemente

Transposons sind mobile genetische Elemente, die in der Lage sind, sich bzw. eine Kopie von sich in einen anderen Abschnitt des Genoms zu integrieren. Sie ermöglichen so das „Springen“ von Genen zwischen nicht homologen Orten der DNS, weshalb sie in der Literatur auch als „*jumping genes*“ (109) bezeichnet werden.

Transposition ist somit die Bewegung eines Gens von einem Chromosom zu einem anderen oder von einem Abschnitt zu einem anderen auf demselben Chromosom. Im Gegensatz zur homologen Rekombination erfordert eine Transposition keine ausgeprägte Homologie der Nukleotidsequenzen (136).

Transposons konnten in allen Genomen derzeit untersuchter Organismen nachgewiesen werden, wenn auch in stark variierender qualitativer und quantitativer Ausprägung. So schwankt der Anteil von Transposons im Genom zwischen 15% bei *Drosophila melanogaster* und 90% bei *Vicia faba*. Beim Menschen machen Transposons ca. 45% des gesamten Genoms aus (89).

Bis heute ist die Rolle dieser Elemente Gegenstand zahlreicher und widersprüchlicher Diskussionen, es besteht weiterhin die Frage, ob sie lediglich sich selbst replizierende überflüssige DNS-Elemente sind und vor allem zu „*junk DNA*“ (15) führen, oder ob erst sie die Evolution höherentwickelter Lebewesen ermöglicht haben. Ohne Zweifel besitzen

sie die Fähigkeit, durch Transposition das Genom zu verändern, und haben die Evolution, die Struktur und die Funktion der Säugetiergenome entscheidend beeinflusst (37).

Dabei sind folgende Mechanismen von Bedeutung:

- die Transposition kann zahlreiche DNS - Veränderungen wie Inversionen, Deletionen, Translokationen und die Entstehung von a- und dizentrischen Chromosomen verursachen
- dies kann positive und negative Folgen haben, Gene aktivieren oder inaktivieren
- die Insertion kann z.B. durch Chromosomenbrüche zu genomischer Instabilität führen
- die Transposition ist ein Phänomen, das eine Ab- oder Zunahme der genomischen DNS-Menge sowie die Entstehung neuer Gene verursachen kann (70)

Diese Einflüsse auf das Genom haben weitreichende Auswirkungen, auf die später genauer eingegangen wird, zuerst einmal soll die Frage geklärt werden, wie es zur Entdeckung der beweglichen genetischen Elemente kam.

1.2 Geschichte der Entdeckung der Transposons

Vor über 50 Jahren konnte Barbara McClintock Transposons für die veränderte Pigmentierung bestimmter Bereiche in Körnern der Maispflanze verantwortlich machen. Für diese Entdeckung und die darauf folgende Charakterisierung der genetischen Eigenschaften der Transposons erhielt sie 1983 den Nobelpreis. Zu dieser Zeit waren Transposons auch in den Genomen von *Drosophila melanogaster*, Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), *Escherichia coli*, *Caenorhabditis elegans* und Menschen nachgewiesen (33).

Im Gegensatz zu dem in den heutigen Industrieländern erhältlichen, kultivierten und gelbfarbenen Mais, kann man in seinen Ursprungsgebieten, Zentral- und Südamerika, auch heute noch die ursprünglichen Formen mit blauen, braunen oder roten Körnern finden. Was jedoch bis zu der Entdeckung McClintocks auch anhand der Mendel'schen Gesetze nicht erklärt werden konnte, war die Tatsache, dass manche Maiskörner von ihrer Grundfarbe abweichende Flecken und Punkte aufwiesen. McClintock analysierte dieses

Phänomen, indem sie chromosomale Veränderungen und die Resultate von Kreuzungsexperimenten in Maispflanzen mit verschiedenen Pigmentationvarianten beobachtete (115). Dabei gelang ihr nicht nur, eine Reihe von für die Pigmentierung verantwortlichen Genen auf dem Chromosom Nr. 9 zu identifizieren, sondern sie konnte auch zeigen, dass die Integration eines Transposons in ein Pigment codierendes Gen die Expression dieses Gens unterdrücken kann. „Spring“ das Transposon aus dem Gen wieder heraus, kommt es zur im Genom festgelegten Pigmentierung.

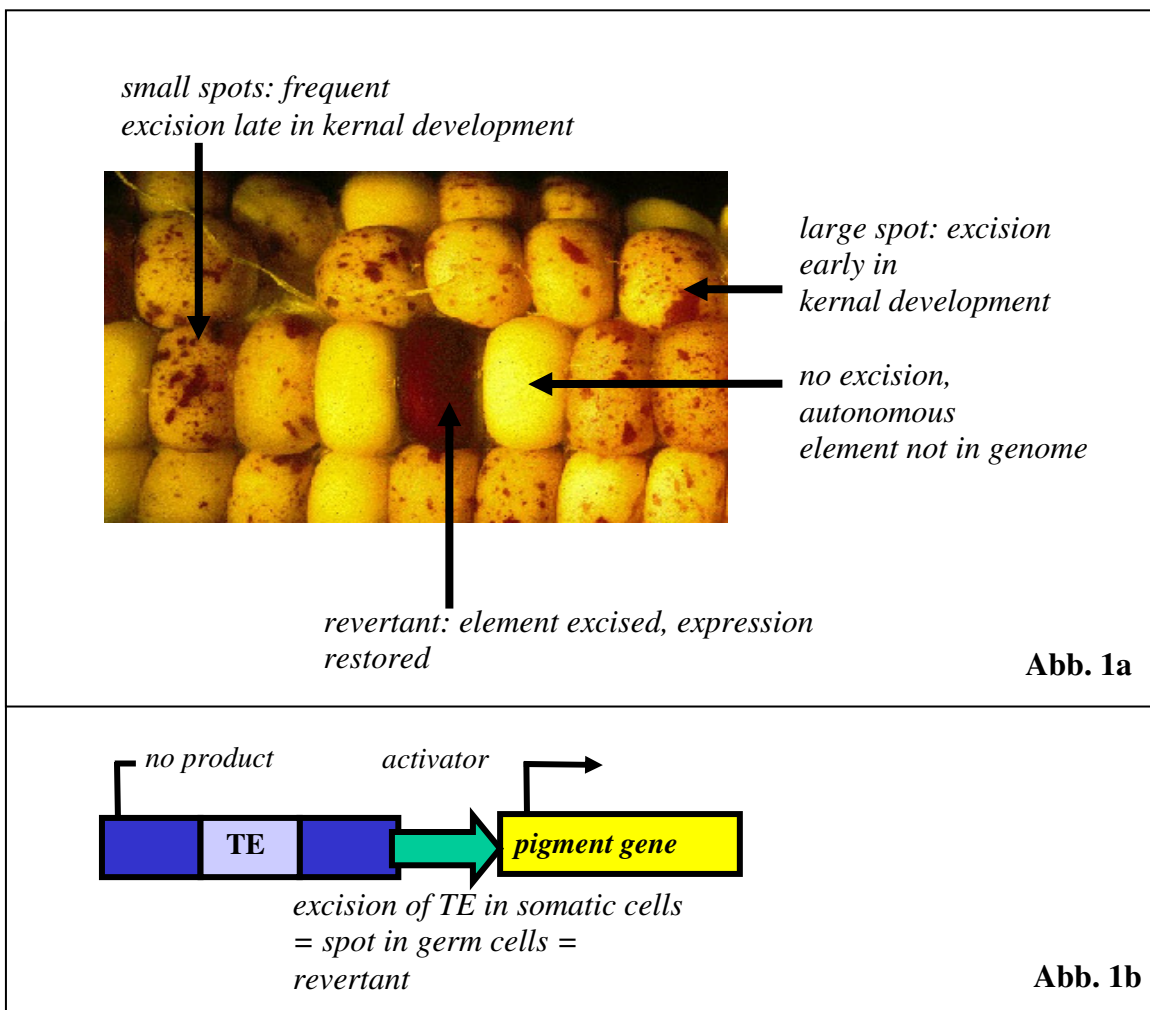


Abbildung 1a/b: Anhand von Kernphänotypen wird die Transposition beschrieben (115)

Anhand verschiedener Kernphänotypen hat McClintock das Verhalten der Transposons studiert (1a). Die Interaktion zwischen einem transponierbaren Element und einem Gen, das ein Enzym in der Biosynthese des Pigments darstellt, ist verantwortlich für die verschiedene Pigmentierung der Körner (1b). Bereiche pigmentierten Gewebes resultieren aus der Exzision des TE's und von der Größe dieser Bereiche läßt sich auf den Zeitpunkt der Exzision in der Kernentwicklung schließen (115).

1.3 Einteilung der Transposons

Die sehr große Anzahl an transponierbaren Elementen kann je nach ihrem Transpositionsmechanismus in zwei Klassen unterteilt werden.

1. Die erste Klasse codiert Proteine, die die DNS direkt in eine neue Position integrieren können oder durch Replikation ein neues Element produzieren, das dann an einen Ort des Genoms integrieren kann („*cut and paste*“ (105)). Diese Transposons werden als DNS vermittelte Elemente bezeichnet und kommen sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten vor.
2. Transposons der zweiten Klasse sind mit Retroviren verwandt und codieren eine reverse Transkriptase, die die RNS Transkripte in DNS Kopien umschreibt. Diese integrieren anschließend ins Genom („*copy and paste*“). Transposons dieser Klasse werden auch RNS vermittelte Elemente (Retrotransposons) genannt und kommen im Gegensatz zu den DNS vermittelten nur in Eukaryonten vor (105).

1.4 Transposons in Prokaryonten

Die mobilen genetischen Elemente der Prokaryonten können in Insertionssequenzen, Composite Transposons und Noncomposite Transposons unterteilt werden (143).

Insertionssequenzen (IS) sind die einfachsten, relativ kleinen (760 – 2500 bps) und in meist nur geringer Anzahl (z.B. 6-10 IS1 Kopien in E.coli) (116) in Prokaryonten gefundenen transponierbaren Elemente. Sie codieren ausschließlich Gene, die für Mobilisation und Insertion erforderlich sind und enthalten als Randsequenzen (136) *inverted terminal repeats* von 9 bis 41 Basenpaaren (143). IS sind an einer Vielzahl von DNS Neuordnungen beteiligt, so konnte z.B. eine Beteiligung der IS Sequenzen an der Integration von F-(Fertilitäts) und R-(Resistenz) Plasmiden (136) in fremde Genome gezeigt werden (116).

Composite Transposons sind im Gegensatz zu den Insertionssequenzen komplexe Transposons mit einer zentralen Region, die zusätzlich und unabhängig von den Insertionsfunktionen weitere Gene (z.B. Antibiotikaresistenz) codiert. Auf beiden Seiten wird diese Region von IS Elementen, deren beide *inverted repeats* Transposaseaktivität codieren können, flankiert. Composite Transposons können tausende von Basenpaaren lang sein (143).

Noncomposite Transposons enthalten keine IS Elemente. Sie codieren aber an ihren Enden repetitive Sequenzen, die für eine Transposition unerlässlich sind. Die für die Transposition erforderlichen Enzyme werden von in der zentralen Region liegenden Genen codiert (143).

1.5 Transposons in Eukaryonten

Zusätzlich zu den DNS vermittelten Elementen, wie sie in Prokaryonten vorkommen, findet man in Eukaryonten die RNS vermittelten Elemente = Retrotransposons. Transposons in ihren verschiedenen Formen sind in vielen eukaryontischen Organismen gefunden worden.

Besonders gut erforscht sind Transposons in Hefen, Drosophila, Getreide und dem Mensch. Im allgemeinen sind Struktur und Funktion der eukaryotischen Transposons sehr ähnlich zu denen der prokaryotischen Transposons. So enthalten auch sie u.a. die Gene, die die für die Transposition erforderlichen Enzyme codieren, und die Integration entspricht ebenfalls einer nichthomologen Rekombination (105).

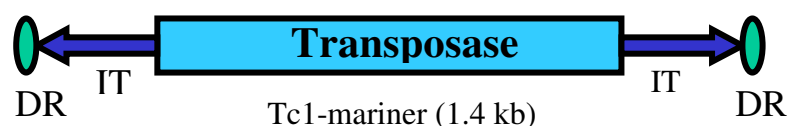


Abb.2 DNS-Transposon (105)

DNS Transposons werden im Gegensatz zu der Bedeutung im prokaryotischem Genom im humanen Genom lediglich als Überreste ehemaliger Elemente angesehen, und obwohl sie 3 % des Genoms ausmachen, scheint es unwahrscheinlich, dass sie noch aktiv sind (56).

Bedeutender im eukaryotischem Genom sind die Retrotransposons, die mit 42% einen sehr viel größeren Anteil des Genoms ausmachen. Und obwohl auch hier die meisten Elemente inaktiv sind, haben manche die Fähigkeit zur Retrotransposition beibehalten (105).

1.5.1 Retrotransposons

Retrotransponierbare Elemente können in autonome oder nicht autonome Elemente klassifiziert werden. Codieren Elemente die für ihre Mobilität erforderlichen Aktivitäten, sind sie selber zur Retrotransposition fähig und werden als autonom bezeichnet. Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass diese Autonomie absolut ist, denn sie sind trotzdem auf gewisse Zellproteine wie DNS Reparaturenzyme angewiesen.

Autonome Retrotransposons werden unterteilt in LTR (*long terminal repeat*) und nicht-LTR Retrotransposons (28).

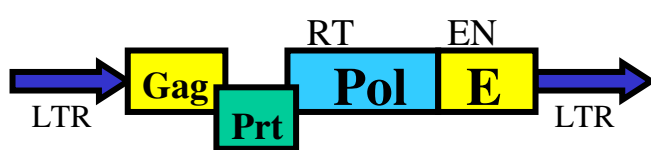


Abb. 3a

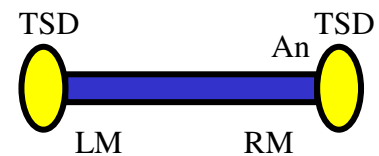


Abb. 3b

Abb. 3a Retrotransposon, autonom, LTR, HERV (9.2 kb) (105)

Abb. 3b Retrotransposon, nicht-autonom, Alu-Element (3 kb) (105)

LTR Retrotransposons von Säugetieren weisen eine strukturelle Ähnlichkeit zu Retroviren auf, allerdings fehlt ihnen ein funktionell wichtiges *env* Gen (105). Sie enthalten mindestens zwei Gene, ein Kapsid ähnliches Protein codierendes *gag* Gen und ein Polyprotein codierendes *pol* Gen. Diese Polyprotein ist für die Aktivität der Protease, Reversen Transkriptase, RNase H und Integrase verantwortlich (33).

Nicht-LTR Retrotransposons werden noch einmal eingeteilt in LINE`s (*long interspersed nuclear elements*) und SINE`s (*short interspersed nuclear elements*). Das humane Genom enthält mehr als 500 000 LINE`s, die als lange DNSsequenzen (ca 5000 bps) revers transkribierte RNSmoleküle (RNS Polymerase II) darstellen. SINE`s sind dagegen nur 100-500 Basenpaare lang und sie werden transkribiert von der RNS Polymerase III (103).

Daneben gibt es noch zahlreiche nicht autonome Retrotransposons, deren Hauptvertreter *Alu* Elemente (Abb.3b) sind (27). Da sie im Säugetiergenom keine Proteine codieren, sind sie angewiesen auf autonome Retrotransposons, die die benötigten Aktivitäten codieren (105). Die Bedeutung der Cotransposition besteht besonders in der Entstehung von Mutationen.

1.5.2 LINE 1 (L1) Retrotransposons

Die Hauptvertreter der Retrotransposons im Säugetiergenom sind die LINE 1 Elemente, die 17 % des menschlichen Genoms umfassen (47). Allerdings hat der größte Anteil seine Aktivität verloren, so daß von ca. 516 000 L1 Kopien im menschlichen Genom lediglich eine kleine Anzahl, nämlich 60-100 Elemente (151), als aktiv eingeschätzt werden. Bis heute konnten zehn retrotranspositions-kompetente L1 Elemente von voller Länge isoliert und charakterisiert werden (151).

L1 Elemente haben eine sehr lange Evolutionsgeschichte, die mit den Anfängen eukaryotischer Existenz einhergeht (105) und sie spielten eine sehr große Rolle in der Gestaltung des Säugetiergenoms (68). So haben sie nicht nur durch ihre eigene Vermehrung, sondern auch durch die Mobilisation anderer nicht autonomer Elemente (z.B. *Alus* (151)), das Genom expandiert (106,107). Durch ihre Fähigkeit zur Transduktion haben sie nicht-L1 Sequenzen überall in das Genom integriert und so die Expression von Genen mit sowohl positiven als auch negativen Folgen beeinflußt.

L1 Elemente haben sich nützlich als phylogenetische Marker (129) erwiesen. Und auch wenn man heutzutage noch nicht in der Lage ist, sich ihre Fähigkeiten, das Genom zu variieren, zu Nutzen zu machen, so könnten sie in der Zukunft u.a. in der Gentherapie praktische Anwendungen finden. Dazu müssen jedoch noch viele Aspekte der Retrotransposons genauer geklärt werden.

1.5.3 Struktur von L1



Abb.4 L1 Element (6 kb) (105)

Ein vollständiges und somit zur Retrotransposition fähiges L1 Element besteht aus ca. 6000 bp und enthält eine untranslatierte 5` Region mit interner Promoteraktivität (CpG-reicher Promoter, an den die Polymerase bindet). L1 codiert zwei für die Retrotransposition notwendige *open reading frames* (ORF), den 1 kb großen ORF1, der ein 40 kD großes, RNS bindendes Protein codiert, und anschließend den 4 kb großen ORF2. Getrennt werden die beiden ORFs durch eine 63 bp lange, nicht codierende *spacer region* (105).

Der ORF2 codiert ein ungefähr 150 kD schweres Protein mit drei Domänen, einer aminoterminalen Endonucleasedomäne (EN), einer zentralen Reversen Transkriptasedomäne (RT) und einer COOH-terminalen Zinkfingerdomäne (151).

Die L1 EN schneidet die Doppelstrang-DNS bevorzugt an AA/ TTTT Sequenzen, was möglicherweise auf die lokale Chromatinstruktur dieser Sequenzen zurückzuführen ist (105). Sie weist Ähnlichkeiten zu einer Reihe von Nicht LTR Retrotransposon EN sowie zu der Exonuclease III als einer bakteriellen (E.coli) Endonuklease auf.

Die RT ist in allen Nicht-LTR Retrotransposons verwandt und ihre Struktur ist der RT von Retroviren ähnlich. Die reverse Transkription findet hier als ein relativ einfacher Prozeß, *target primed reverse transcription* genannt, statt (105).

Die Zinkfingerdomäne läßt auf eine Protein-Nucleinsäure-Interaktion schließen, insbesondere die Interaktion des ORF2 mit L1 RNS bei der Bildung von Zwischenprodukten der Retrotransposition.

Das 3`Ende von L1 stellt eine kurze untranslatierte 3` Region dar, die in einem *polyA tail* endet. (105)

1.5.4 Mechanismus der L1 Retrotransposition

Obwohl nach wie vor viele Aspekte des genauen Mechanismus der Retrotransposition unbekannt sind (39), scheinen die allgemeinen Schritte der Retrotransposition die folgenden zu sein (105):

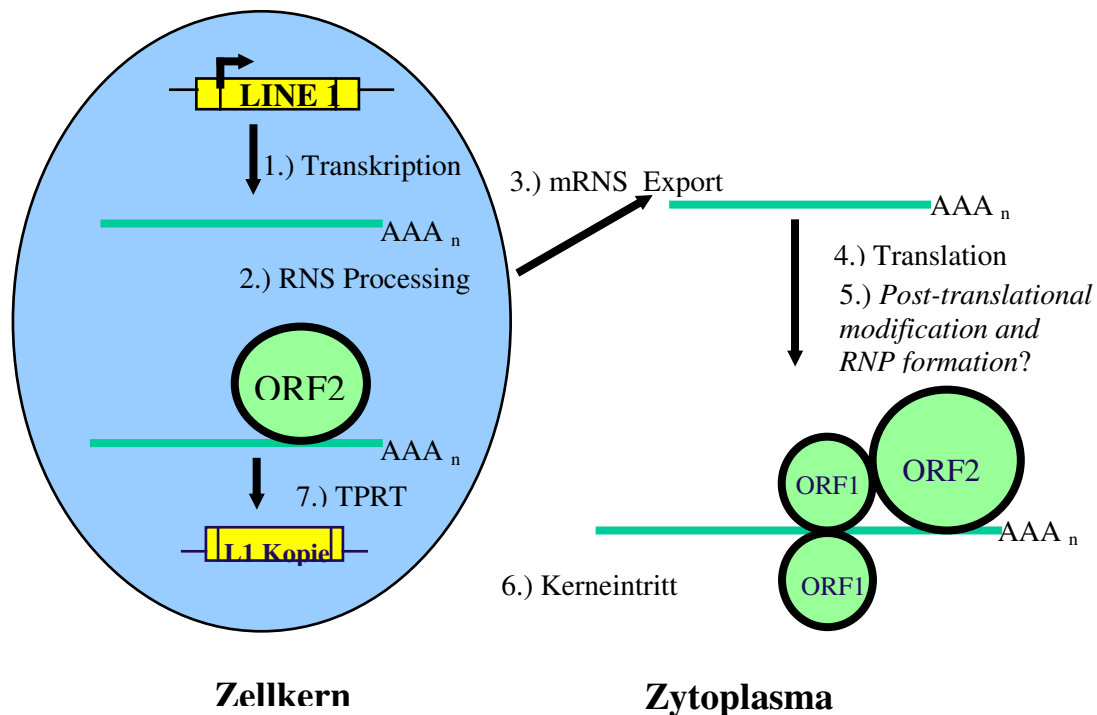


Abb.5 L1 Retrotransposition, schematisch nach E. M. Ostertag and H. Kazazian

1. Transkription

Der Transkriptionsmechanismus von L1 ist nicht endgültig geklärt.

Für die Polymerase II als transkribierendes Enzym spricht, dass L1 das für die Termination der Pol II erforderliche Polyadenylierungssignal aufweisen (105). Auch der Ersatz der 5' UTR gegen einen heterologen Pol II Promoter in Maus und menschlicher Zellkultur hatte keinen Einfluß auf ihre Retrotranspositionsfähigkeit (102,105).

Die 5' UTR von L1 dient als interner Promoter (83) für die Transkriptionsinitiation.

2. RNA Processing und 3. Export aus dem Kern

Normalerweise erfahren die von der Polymerase II transkribierten RNS eine Reihe von Veränderungen, bevor sie den Kern verlassen, um dann die im Zytoplasma stattfindene Translation zu initiieren. Dazu wird dem 5' Ende ein 7-Methylguanosincap und dem 3' Ende ein *poly-A-tail* angefügt. Caps tragen zur Stabilität der mRNA bei, da sie deren 5' Ende vor Phosphatasen und Nukleasen schützen. Zusätzlich verstärken Caps die Translation der mRNA durch eukaryotische Proteinsynthesysteme (136). Die Funktion

des Polyadenylatschwanzes beginnt sich abzuzeichnen: mRNA ohne *poly-A-tail* kann zwar aus dem Zellkern heraustransportiert werden, jedoch ist die Effektivität der Translation deutlich geringer. Außerdem schützt auch der poly-A-tail die mRNA vor dem enzymatischen Abbau. Die Reifung der prä-mRNA zur fertigen, voll funktionsfähigen mRNA schließt außerdem noch das Herausschneiden nicht codierender Sequenzen (Introns) und die anschließende Ligation der codierenden Bereiche (Exons) ein, einen als Splicing bezeichneten Prozess.

L1 Elemente enthalten ein Polyadenylierungssignal, weitere Modifikationen der terminalen Bereiche von L1 mRNA sind jedoch nicht bekannt. Splicen ist nicht erforderlich, da L1 Transkripte keine Introns enthalten (105). Dadurch besteht keine Abhängigkeit von Wirtsfaktoren.

Der Export von L1 Elementen wirft aufgrund dieser Erkenntnisse zahlreiche Fragen auf, denn Zellen haben einen Mechanismus entwickelt, der den Export ungespleißter RNA verhindert, da diese zu fehlerhaften und somit zellschädigenden Proteinen führen kann. L1 mRNA muß also einen Weg gefunden haben, diesen Schutzmechanismus der Zelle zu umgehen (105). Eine mögliche Erklärung ist die Tatsache, dass ein Element in der untranslatierten 3' Region von menschlichen L1 Retrotransposon-mRNAs NXF1 (Nuclear Export Factor 1, auch Tip associated protein (TAP) genannt) bindet und somit als exportierendes Element fungieren kann (87). NXF1 ist ein Transportprotein, das im Ruhezustand der Zelle im Kern lokalisiert ist. Die Assoziation seines C-terminalen Endes mit Kernporenproteinen (Nucleoporinen) konnte als wichtiger Schritt für den Transport zwischen Kern und Zytoplasma gezeigt werden (43). Die Fähigkeit eines 86-nt Elementes (L1-NXF binding element (NBE)), NXF1 zu binden, könnte somit seine Funktion als konstitutives Transportelement für den Export der L1 mRNA aus dem Kern begründen. Es konnte gezeigt werden, daß dieses L1-NBE unabhängig davon, ob ein Splicen stattgefunden hat oder nicht, die RNA ins Zytoplasma transportiert (105).

4. Translation

Die Details des Translationsmechanismus von L1 konnten bisher nicht geklärt werden, es zeichnen sich jedoch Unterschiede zur sonstigen Translation im Säugetiergenom, beginnend mit einer bicistronischen mRNA ab. Die den ORF1 und ORF2 trennende „Spacer region“ enthält drei Stopcodons, die die Translation nach dem Ablesen des ORF1 beenden. Während die Translation des ORF1 Protein mit der Ribosomenbindung am

5'UTR initiiert und durch ribosomales Scanning fortgesetzt wird, ist es unwahrscheinlich, dass nach einer Translationstermination in der Spacer Region anschließend an den ORF1 der ORF2 translatiert wird (105). Da für Retrotransposition jedoch sowohl das ORF1-, als auch das ORF2 Protein notwendig sind, stellt sich die Frage, wie die Expression beider Leserahmen in gleichem Maße gesichert wird. Eine Möglichkeit, dies zu garantieren ließe sich dadurch erklären, dass ORF1 und ORF2 als ein Fusionsprotein vorliegen, was aber weder in der Ratte noch im Menschen gezeigt werden konnte. Die Translation des ORF2 könnte auch durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) initiiert werden (105).

Genauere Untersuchungen scheiterten, da es bisher mangels eines geeigneten Antikörpers nicht gelang den ORF2 darzustellen.

5. Posttranslationale Modifikation und Ribonucleoproteinbildung

Posttranslationale Modifikationen wie die Markierung der Proteine durch Signalsequenzen zur Translokation durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums (136) und Proteinprocessing des ORF1 und ORF2 Proteins sind nicht bekannt (105).

Es wird jedoch angenommen, dass sich als Zwischenstufen in der Retrotransposition sogenannte Ribonucleoprotein (RNP) Partikel bilden (81), die eine Assoziation der beiden Proteine (ORF1 und ORF2) und der L1 RNS darstellen. Dabei folgen die Elemente einer „cis-preference“, d.h. die Proteine binden an die Bereiche der RNS, die sie codieren.

Auch wenn bis jetzt lediglich die Assoziation von ORF1 mit der RNS gezeigt werden konnte (105), geht man davon aus, dass die RNP Formierung für den Wiedereintritt in den Zellkern notwendig ist.

6. Eintritt in den Zellkern

Es konnte noch nicht eindeutig geklärt, auf welche Art und Weise der RNP Komplex wieder in den Kern gelangt, um dann dort die L1 RNS in die genomische DNS zu integrieren. Da die Möglichkeit des passiven Eintritts in den Kern durch ein Molekulargewicht ab 60 kDa verhindert wird und da alleine das ORF2 Protein ein Molekulargewicht von 150 kDa aufweist, muß der Komplex also entweder durch energieabhängigen, aktiven Transport oder während des Zellmembranzerfalls in der Mitose oder Meiose in den Kern eintreten. Ein aktiver Transport wird meist durch sogenannte Importine vermittelt, die eine spezifische Aminosäuresequenz der Proteine, die man Kernlokalisierungssignale nennt, erkennen und binden (41,105). Jedoch konnte weder

ORF1 noch ORF2 im Kern lokalisiert werden, noch gibt es einen Hinweis dafür, dass das ORF1 Protein ein solches Signal enthält.

Ob der ORF2 den Kernimport vermittelt, kann aufgrund der fehlenden Detektierbarkeit von vollständigen ORF2 Proteinen derzeit nicht geklärt werden.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die ORF1 und ORF2 Proteine an ein zusätzliches Protein mit einem Kernlokalisierungssignal binden und dann importiert werden können.

Um diese Frage endgültig klären zu können, muß eine Möglichkeit gefunden werden, den ORF2 darzustellen, um anschließend die Lokalisierungssuche der Proteine zu vertiefen (105).

7. Target Primed Reverse Transcription (TPRT)

Wie wird L1 in das Genom der Zelle integriert?

Es gibt mehrere Gründe für die Annahme, dass ein Prozeß, *target primed reverse transcription* (TPRT) (96) genannt, die reverse Transkription und die Integration der L1 RNS bewirkt (25). Dafür spricht, dass erstens Experimente mit von Baculovirus produziertem ORF2 ein TPRT Reaktion zeigen (105), dass zweitens L1 Elemente im Genom häufig von 7 bis 20 Basenpaar großen *target site duplications* flankiert werden und dass drittens die Nucleotide an den Schnittstellen oft T-reich und somit komplementär zu den *poly-A-tails* sind.

Die TPRT beginnt, wenn die von L1 codierte Endonuklease einen Strang der genomischen DNS (dieser Abschnitt wird *target site* genannt) schneidet und damit eine freie 3` Hydroxylgruppe produziert. Die Retrotransposon RNS tritt an die Schnittstelle und die reverse Transkriptase nutzt diese RNS als *template* und die freie 3` Hydroxylgruppe als Primer für die reverse Transkription. So schreitet die reverse Transkription voran und produziert eine cDNS der Retrotransposon RNS. Die Endonuklease schneidet dann den zweiten Strang der DNS an der *target site*, woraufhin ein unbekannter Mechanismus die cDNS in die Lücke integriert. Die Entfernung der RNS und die DNS-Duplikation vervollständigen die Insertion der DNS, die von der Verdopplung der *target sites* flankiert wird (105).

1.6 L1 Retrotransposons in Eukaryonten

Grundsätzlich haben transponierbare Elemente die gleiche Wirkung auf das Genom von Eukaryonten wie auf das der Prokaryonten.

Wie bereits erwähnt beeinflussen transponierbare Elemente das Genom und den Organismus in verschiedener Hinsicht. Positiv konnten sich Transposons besonders dann auswirken, wenn unter einem hohen Selektionsdruck die durch sie erhöhte genetische Variabilität von Vorteil war. Dies kann der Grund sein, dass sich Transposons trotz der auch schädlichen Einflüsse auf den Organismus in der Evolution stets durchgesetzt haben. Darüber hinaus gibt es die Meinung, dass Transposons nicht nur zur langsamen, kontinuierlichen Formierung und Modifikation der Spezies, sondern auch entscheidend zur plötzlichen Entstehung neuer Organismen beigetragen haben (89). Doch die Auswertungen der Fähigkeiten und der Grenzen des TE vermittelten Beitrages zu dem Ursprung von höherentwickelten Organismen befindet sich erst in den Anfangstadien.

Es kann jedoch mit Gewissheit gesagt werden, dass durch Translokation verursachte Duplikationen, Deletionen, Inversionen und Translokationen (136) einzelner Nukleotide der Zelle schaden können, so konnte eine Vielzahl von Krankheiten auf die Integration eines Transposons in ein Gen erklärt werden. Grundsätzlich scheint die Beziehung zwischen Transposons, ihre Wirkung und die Größe des Genoms in keinem linearen Zusammenhang zu stehen. (89)

Da wie oben beschrieben in Eukaryonten zusätzlich noch Retrotransposons vorkommen, sollen sie, bzw. L1 als ihr wichtigster Vertreter, in diesem Abschnitt Priorität haben.

Wie bereits beschrieben haben L1 Elemente das menschliche Genom nicht nur durch ihre eigenen Retrotransposition ausgedehnt, sondern auch dadurch, dass sie nicht autonome Elemente, die wie *Alu* Elemente ebenfalls von großer Bedeutung sein können, zur Retrotransposition befähigen. L1 Retrotransposons rücken nun immer mehr in das Interesse der Forschung, um in der Zukunft folgende Frage beantworten zu können:

Was bewirkt die Retrotransposition von L1 im humanen Genom?

Ein Einblick in den Stand der Forschung

L1 Retrotransposons können im Menschen durch nichthomologe Rekombination, durch ihre eigene oder die Insertion anderer Retrotransposons in Gene das menschliche Genom

verändern (105). Folglich kann es zur Entstehung von primären oder auch sekundären (45) Krankheiten kommen.

In einer Zeit, in der 500 pro 100 000 Menschen an einem malignen Tumor erkranken, und die malignen Tumore die zweithäufigste Todesursache darstellen (10), erweckt die Vermutung, dass Onkogene durch transponierbare Elemente aktiviert werden (40), großes Interesse. Sollten also die so lange unbeachteten Transposons für die Entstehung von Tumoren verantwortlich, zumindestens aber beteiligt sein? Und würden sich daraus sogar präventionelle und therapeutische Ansatzmöglichkeiten ergeben?

In einer großen Anzahl maligner Tumore, z.B. in Hodentumoren (12), Mammacarcinomen (6), Lebercarcinomen (jedoch nicht in der den Tumor umgebenden Leberzirrhose (138)), Prostatacarcinomen (121) und kindlichen Keimzelltumoren (13) konnte eine Expression von L1 Retrotransposons gezeigt werden. Für die Hypothese, dass L1 Retrotransposons als Onkogene fungieren (12) und die Progression von Tumoren bewirken (146), spricht die Beobachtung, dass bei der adenomatösen Polyposis coli eine L1-Insertion in das APC-Gen nach dem Übergang zum Kolonkarzinom nachgewiesen werden kann (99). Hier wird zum ersten Mal von einer durch eine Insertion von mobilen genetischen Elementen verursachten Disruption eines Tumorsuppressorgens berichtet (99).

Ein weites Spektrum an unterschiedlichen Erkrankungen wie u.a. die angeborene Fukuyama Muskeldystrophie (FCMD) (75), die chronische Granulomatose, die β -Thalassämie (105), die Retinitis pigmentosa (125) und die zystische Fibrose (21) könnten durch L1-Insertionen - zumindestens mit - bedingt werden. Ebenso wurde bei einigen Fällen der Hämophilie A (21), Chorea Huntington (105), Stoffwechselerkrankungen (35, 100), Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (2), einigen Leukämien (105) und anderer Erberkrankungen wie dem Triple-A-Syndrom (113) der Verdacht auf eine Beteiligung von Retrotransposons geäußert.

Auch Zellen des spezifischen Immunsystems stehen unter dem Einfluß retrotransponierbarer Elemente, so ist z.B. eine Insertion in das *fas* Gen, *lpr* Mutation genannt, verantwortlich für einen Defekt in der Apoptose aktivierter T-Lymphozyten, der zu einer massiven Lymphadenopathie mit einem Lupusähnlichem Syndrom führt (7).

Außerdem wird durch ihre Insertion in das Genom eine verstärkte Aktivität des Apolipoprotein Lp(a)gens (105), eine altersregulierende Aktivität für das Gen des Faktors IX (105) und die Aktivität einer Lokalisationskontrollregion von Wachstumsfaktoren angenommen (130,105)

L1 Retrotransposons und die Regulation des menschlichen Genoms

Außer der Manipulation einzelner Gene oder Genabschnitte vermutet man durch die Retrotransposition der L1 Retrotransposons noch weiterreichende regulatorische Einflüsse auf das menschliche Genom.

So schuf Lyon in der „Lyon-Hypothese“ eine Verbindung zwischen der Anreicherung von L1 Retrotransposons und der Inaktivierung eines X-Chromosoms (49, 60). Er beschreibt bereits 1998 seine Beobachtung, dass die Inaktivierung eines X-Chromosoms durch eine das inaktive Chromosom bedeckende XistmRNS herbeigeführt wird. L1 Retrotransposons, die im Vergleich zu den Autosomen und dem aktiven X-Chromosom in doppelt so hoher Anzahl auf dem inaktiven X-Chromosom vorhanden sind, fungieren als Booster-Elemente der XistmRNS. So tragen sie wesentlich zu der Heterochromasierung des Barr-Körperchens bei (90).

Auch das Phänomen der Monoallelität wird auf das Vorhandensein von L1 Retrotransposons zurückgeführt. Bei dieser Theorie stützt man sich auf die Beobachtung, dass monoallelische Gene von Regionen mit wesentlich höheren L1 Dichten umgeben sind als biallelische Gene (3).

Es wird vermutet, dass eine Reihe von regulatorischen Sequenzen im menschlichen Genom ihren Ursprung in den transponierbaren Elementen hat, so dass Transposons wahrscheinlich wesentlich zu der Evolution spezifischer und globaler Genregulation beigetragen haben (11).

Zu den regulatorischen Elementen gehört die 5`Promoterregion, die die Polymerase bindet und so die Transkription initiiert. In Zusammenarbeit mit „Human Promoter Database“ wurden mehr als 2000 Promoterregionen auf eine mögliche Herkunft von transponierbaren Elementen hin untersucht. Von den 2004 untersuchten Sequenzen enthielten 475 (24%) auf Transposon, vor allem SINEs Elementen, zurückführbare Sequenzen. Diese Präsenz in einem Viertel aller menschlichen Promotersequenzen lässt das Potential von Transposons, die Regulation menschlicher Gene wesentlich zu beeinflussen, erkennen (63).

Um diese Vermutung zu bestätigen, untersuchte man auch 846 cis-regulatorische Elemente von 288 Genen, die Kern-Transkriptionsfaktoren binden, auf ihre Herkunft. 4.5% der Gene enthielte cis-Elemente, die von Transposons abgeleitet werden konnten. Geht man von

einer Anzahl von 30 000 menschlichen Genen aus, können also 1000 von ihnen durch von Transposons generierten cis Elementen reguliert werden (63).

Eine andere Möglichkeit der Transkriptionsregulation in Eukaryonten schließt die Ausbildung verschiedener „Chromatinloops“ ein, die durch eine Verbindung spezifischer DNS-Regionen mit dem Kerngerüst oder der Matrix vermittelt werden. Diese DNS-Sequenzen wurden auf Ähnlichkeiten zu Transposons untersucht und es konnte gezeigt werden, dass sie in einer sehr hohen Anzahl von transposonsabstammende Sequenzen, besonders L1 Elemente enthalten. Die Häufigkeit der transponierbaren Elemente in S/MARs (*scaffold/matrix attachment regions*) steht im Einklang mit der Beobachtung, dass Transposons in Hefen, Drosophila und Pflanzen (63) matrixbindende Bereiche enthalten. Transponierbare Elemente können also in der Evolution von Vorteil gewesen sein, indem sie die Zelle mit regulatorischen Sequenzen ausstatteten.

Um die gesamten Zusammenhänge der Beeinflussung des humanen Genoms durch die Retrotransposons zu verstehen, bedarf es jedoch noch einer Vielzahl weiterer Studien. Hilfreich dabei könnten neue Forschungsansätze sein, wie zum Beispiel synthetisch hergestellte Retrotransposons, die eine wesentlich höhere Aktivität und bis zu 200-fache Transpositionslevel zeigen. (46)

1.7 Gentherapie- eine praktische Anwendung von L1 und anderen Transposons

Mit der Anwendung transponierbarer Elemente in der Gentherapie (20), die derzeit auf der Verwendung viraler Vektoren basiert, könnten die derzeit bestehenden Grenzen wie die virale Pathogenität, sehr hohe Produktionskosten und eine systemische Instabilität überschritten werden (58, 64).

Das Modell der Integration ist bei Retroviren, Transposons und Retroviren-ähnlichen Retrotransposons sehr ähnlich, die katalytische Domäne ist beibehalten als Integrase und Transposase, die beiden einzigen für die Integration notwendigen Enzyme, und auch die *terminal repeats* sind in allen drei Typen enthalten. Integrase und viele der Transposasen in Bakterien und Eukaryonten binden spezifische an eine *att site* an den Enden *der terminal repeats* (64).

Wie diese spezifische Bindung zustande kommt, konnte für das bakterielle Transposon Tn7 gezeigt werden (133). Die Bildung eines Nukleoproteinkomplexes, der unter anderem

das Transposon und die Ziel-DNS enthält, reguliert hier die Transpositionsinitiation. Als erstes bindet TnsD (*Tn7 target selection protein*) an die Zielposition der DNS und rekrutiert dann TnsC, ein ATP-abhängiges DNS-Bindungsprotein. Durch die Bindung wird TnsC fähig, die Transposase, einen aus TnsA und TnsB zusammengesetzten heterodimeren Komplex, zu aktivieren. Anhand der Transposition von Tn7 konnte also gezeigt werden, dass Transposition durchaus ein selektiver Prozeß sein kann, in diesem Fall kontrolliert die Ziel-DNS selber die Initiation der Transposition (133).

Findet keine ortsspezifische Integration des nicht-viralen Vektors statt, würde die Effizienz der Integration rapide abnehmen. Ein wichtiger Aspekt für die Gentherapie mit Transposon ist demzufolge, dass man eine ortsgerichtete Integration erreicht. Dies wird auf zwei Wegen versucht, zum einen durch die Synthese von chimerischen Transposasen, d.h. Transposasen mit einer speziellen DNS bindenden Domäne, und zum anderen durch ein ebenfalls von dem Plasmid codiertes Protein, das durch die Bindung an ein endogenes Protein das Transposon in die Nachbarschaft der DNS transportiert. Ein transponierbares Konstrukt, das die für die Integration notwendigen Enzyme, *terminal repeats* und eine DNS bindende Domäne enthält, ist also ein idealer nicht-viraler Vektor für die Gentherapie (64).

1.8 Lokalisation von L1

Das ORF1 Protein konnte bis jetzt im Zytoplasma zahlreicher Keimzellen, beim Lungencarcinom, beim Medulloblastom und in vielen transformierten, menschlichen Zelllinien nachgewiesen werden (151).

Der Nachweis des ORF2 Proteins scheiterte bis jetzt an dem Mangel eines im menschlichen Gewebe selektiven Antikörpers. Es gelang jedoch im Vorfeld dieser Arbeit mithilfe eines neuen polyklonalen Antikörpers gegen zwei Polypeptide des ORF2, das Protein im Gewebe und in Zellen darzustellen.

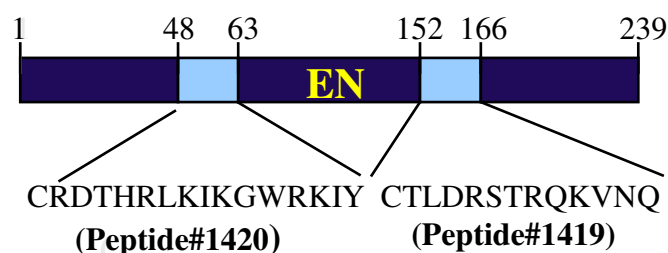


Abb. 6 L1 Enig γ , Antikörper gegen den ORF2 des L1 Retrotransposon (151)

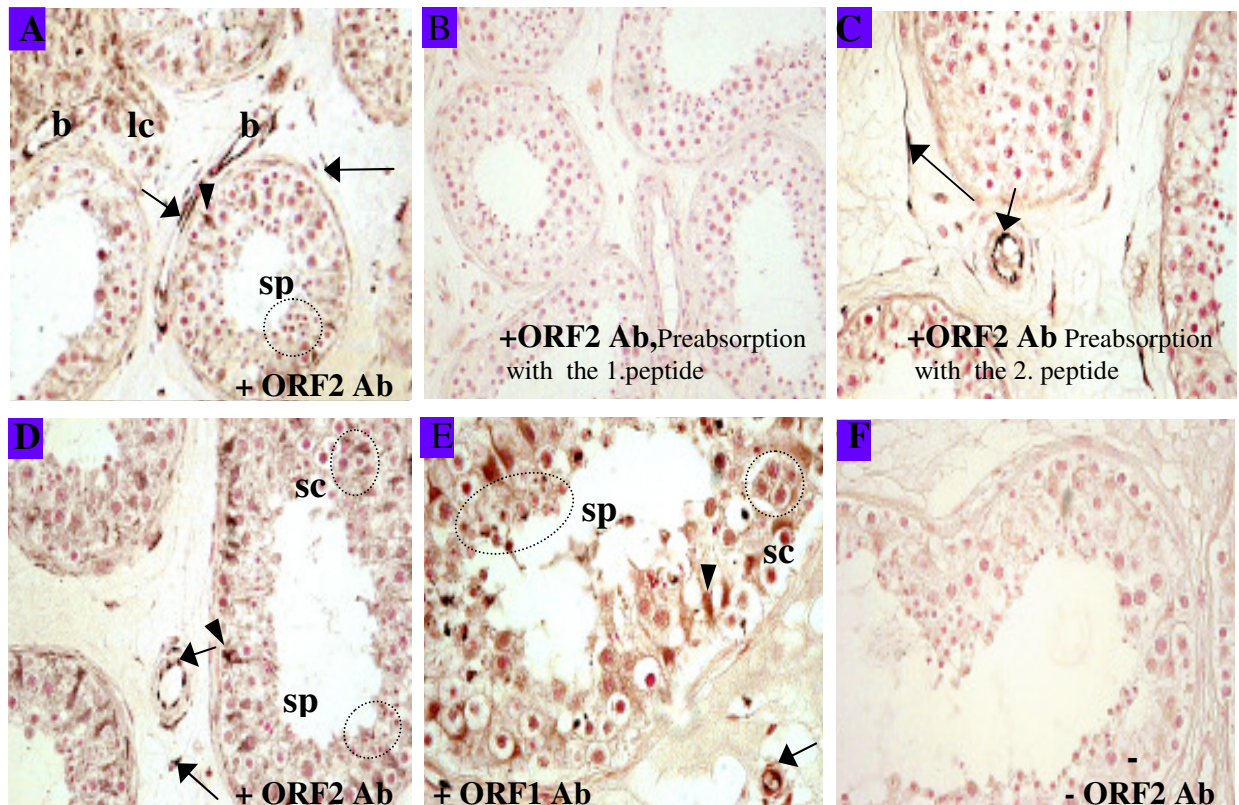


Abb. 7 Immunhistochemische Analyse des ORF1 und ORF2 im humanem Testisgewebe (151)
 b: Blutgefäße; lc: Leydigzellen; sp: unreife Spermatiden; sc: sekundäre Spermatocyten;
 Pfeilspitzen: Sertolizellen; kurze Pfeile: Endothelzellen; lange Pfeile: covering cells
 Man erkennt eine deutliche Färbung des ORF1 und des ORF2s in den verschiedenen Zelltypen.

In dieser Färbung konnte das Vorkommen der Retrotransposons in Keimzellen bestätigt werden. L1 Expression schien lange ein für Keimzellen spezifisches Phänomen zu sein, denn vollständige L1 Transkripte konnten bis jetzt in männlichen und weiblichen Keimzellen nachgewiesen werden, während ihre Expression in somatischen Zellen sehr selten zu finden ist. Jedoch konnten keine Transkriptionsfaktoren, die eine Keimzellspezifität begründen würden, gefunden werden (105).

Hier konnte L1 auch in somatischen Zellen (Leydig-, Sertoli- und Synzytiotrophoblastzellen, sowie Endothelzellen) gezeigt werden. Es stellt sich somit die Frage, welchen Einfluß die Retrotransposons in den postmitotischen Zellen, in denen ansonsten keine Rekombinationsphänomene mehr auftreten, haben und ob sie auch hier an der Regulation der Genexpression unmittelbar beteiligt sind.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass das ORF2 Protein in großen, stabilen, sich nicht mehr teilenden Blutgefäßen besonders stark exprimiert wurde, während

seine Expression in kleinen und unreifen Blutgefäßen sehr gering bis nicht nachweisbar war.

Diese Tatsache lässt einen Einfluß der L1 Retrotransposon auf die angiogenetische Aktivität von Endothelzellen vermuten.

Um zu zeigen, welche Bedeutung den Retrotransposons durch einen Einfluß auf die Angiogenese zukommen würde, soll zunächst einmal die Angiogenese an sich dargestellt werden.

1.9 Bedeutung der Angiogenese

Angiogenese als das Aussprossen neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden spielt eine fundamentale Rolle in einer Vielfalt von physiologischen und pathologischen Prozessen.

Ohne Angiogenese wäre die Entstehung neuer Lebewesen unmöglich, denn sowohl in dem monatlichen Zyklus der Frau und der Ovulation als auch in dem Aufbau der Plazenta zur Versorgung des Embryos und schließlich der embryonalen Entwicklung selber ist die Entstehung neuer Blutgefäße von zentraler Bedeutung (48). Auch die Erhaltung des Lebens erfordert in bestimmten Situationen eine Gefäßneubildung, z.B. bei reparativen Vorgängen wie der Wundheilung.

Eine unkontrolliert auftretende Angiogenese schadet jedoch dem Organismus. So kann es durch eine pathologische Gefäßbildung zu Erkrankungen wie der diabetischen Retinopathie, rheumatoider Arthritis, multipler Sklerose, Psoriasis, dem Hämangiom, der Endometriose und dem Kaposisarkom sowie der Entstehung arteriöser Plaques bei der Artherosklerose kommen. Auch das Wachstum eines Tumors erfordert eine Versorgung durch Blutgefäße und Metastasierung findet erst nach Anschluß des Tumors an das Gefäßsystem statt (18).

Ein großes Interesse besteht seit langer Zeit darin, die physiologischen Abläufe der Angiogenese zu verstehen und die aktivierenden und inhibitorischen Faktoren zu bestimmen. Daraus erhofft man sich die Möglichkeit, zum einen eine pathologische Angiogenese und damit Tumorwachstum, Metastasierung und bestimmte Krankheiten zu verhindern, zum anderen diese Erkenntnisse für die Wiederherstellung der Blutversorgung in ischämischen Gebieten nutzen zu können.

1.10 Vaskulogenese

Im Gegensatz zu der Angiogenese, die das Entstehen neuer Blutgefäße durch das Aussprossen von bestehenden Gefäßen beschreibt, gibt es auch eine als Vaskulogenese bezeichnete „*de novo*“ Blutgefäßentstehung im Embryo, deren Vorkommen jetzt auch im adulten Knochenmark und in der peripheren Blutbahn nachgewiesen werden konnte (18).

Die Entwicklung des Kreislaufs beginnt extraembryonal Anfang der 3. Woche aus Anhäufungen von Mesenchymzellen im Chorion-, Dottersack- und Haftstielmesenchym. Aus diesen zunächst massiven Inseln angiogenetischen Materials, Blutinseln oder entsprechend ihrer Vorläuferfunktionen Hämangioblasten genannt, differenzieren sich außen Gefäßbildungszellen, Angioblasten, und innen Blutbildungszellen, Hämozytoblasten. Angioblasten benachbarter Inseln schließen sich zu ersten Gefäßen zusammen. Weitere Gefäßabschnitte entstehen durch Migration von Angioblasten ins umgebende Mesenchym. Schließlich kommt durch Ausbildung von Anastomosen zwischen den Gefäßanlagen ein extraembryonales Gefäßnetz zustande (123), gefolgt von der intraembryonalen Gefäßentstehung. Diese Migration der Angioblasten wird durch einen spezifischen Gefäßwachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) vermittelt, und auch die weitere Differenzierung der Angioblasten beeinflussen die Wachstumsfaktoren VEGF, der VEGF Rezeptor 2 und bFGF (*basic fibroblast growth factor*).

Im adulten Organismus werden die Differenzierung und die Mobilisierung der im Knochenmark und in der peripheren Blutbahn vorhandenen Vorläuferzellen durch VEGF, *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor* (GM-CSF), bFGF und dem *insulin like growth factor* (IGF)-1 stimuliert. Auch diese Zellen hofft man sich in der Zukunft zu Therapie Zwecken zunutze machen zu können (18).

Die gemeinsamen Vorläuferzellen entwickeln sich unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren zu Angioblasten, die dann zu Endothelzellen differenzieren. VEGF und der VEGF-Rezeptor 1 bewirken anschließend die Formation der Zellen mit der Ausbildung eines Lumens. Die Integration von periendothelialen Zellen in die Gefäßwand und damit die Reifung der Blutgefäße wird von Angiopoetin 1, TGF- β 1, PDGF-BB und ihren Rezeptoren vermittelt, so wirkt PDGF-BB „*chemoattractant*“ auf Muskelzellen (18) und Angiopoetin1 und Tie2 beeinflussen das Wachstum und die Erhaltung der Gefäße, indem sie die Interaktion der Wandzellen mit den Endothelzellen stabilisieren (18).

Eine Reihe von Faktoren ist somit dafür zuständig, dass aus mesenchymalen Vorläuferzellen die reifen, funktionsfähigen Blutgefäße mit dem typischen Wandbau aus Intima, Media und Adventitia hervorgehen. Die Blutgefäße, Prototyp eines funktionellen Systems, besitzen einen charakteristischen Wandbau, der durch ihre funktionelle Beanspruchung und durch Eigenschaften des umgebenden Gewebes geprägt wird (8). Dieser Wandbau ermöglicht eine morphologische Einteilung in Arterien, Venen und Gefäße der terminalen Strombahn. Die Arterien als Blutgefäße des Hochdrucksystems (8) zeigen eine Unterscheidung in Arterien vom elastischen und vom muskulären Typ. Während den ersten durch den hohen Anteil an elastischen Fasern in der Media die Windkesselfunktion zukommt, vermag der zweite Typ mit einem hohen Anteil an glatten Muskelzellen an der Regulation des Blutflusses teil zu haben. (8)

Gefäße der terminalen Strombahn, die durch das Fehlen einer Muskelschicht und Endothelfenestrierungen auffallen, bieten durch die sehr geringe Wandstärke optimale Voraussetzungen für die verschiedenartigen Austauschvorgänge für Blutgase, Wasser, Salze und andere Stoffe (8).

Der Wandbau der Venen zeichnet sich durch große morphologische Mannigfaltigkeit aus. Grundsätzlich kann man feststellen, dass die Venenwand im Vergleich zum Lumen dünner ist als die Wand der entsprechenden Arterien. Der Schichtenbau ist in der Vene weniger stark ausgeprägt und die Wand enthält neben glatter Muskulatur und elastischem Material größere Mengen kollagener Fibrillenbündel (8).

1.11 Angiogenese

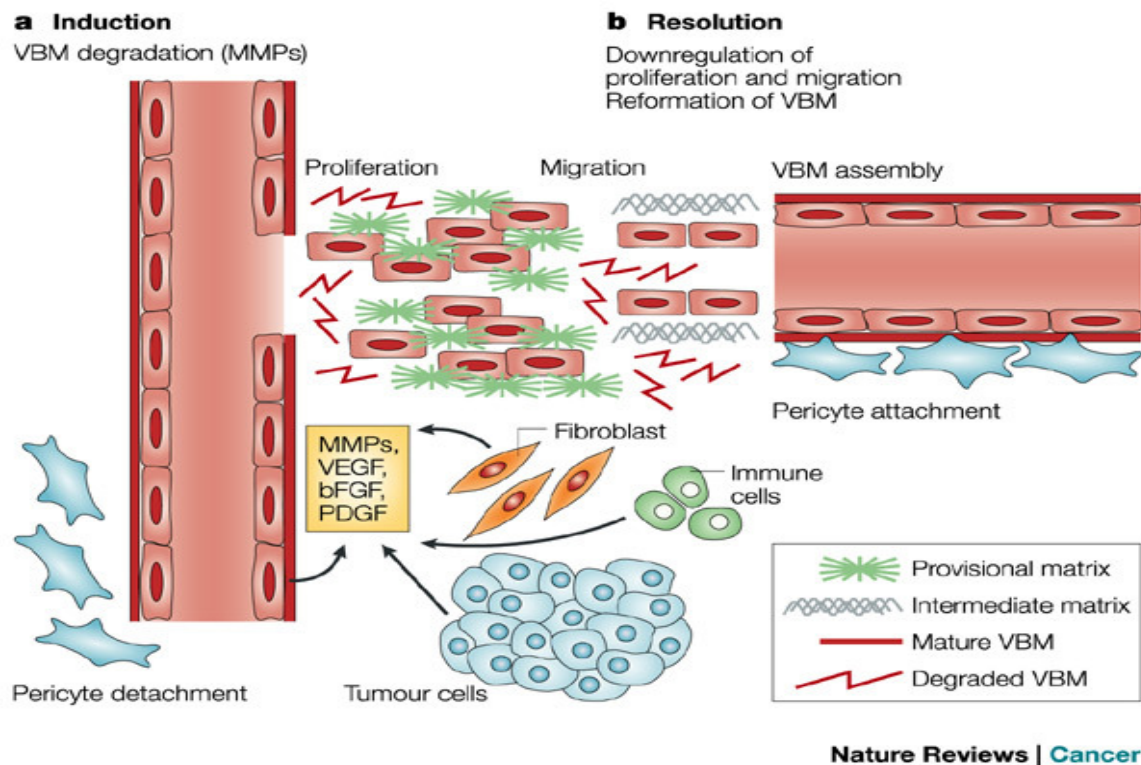


Abb. 8 Angiogenese (66)

Zahlreiche Faktoren bewirken die Destabilisierung der Gefäßwand (*vascular basement membrane* (VBM)), gefolgt von Migration und Proliferation der Endothelzellen sowie dem Aussprossen neuer Gefäße.

Im adulten Organismus erfolgt die Neubildung der Gefäße häufiger durch das Aussprossen neuer aus bereits bestehenden Gefäßen als durch die „*de novo*“ Synthese. Man bezeichnet dieses Phänomen als Angiogenese und grenzt es somit gegen die Vaskulogenese ab.

Angiogenese beginnt mit einer durch Stickstoffmonoxid vermittelten Vasodilatation des Gefäßes, die durch VEGF verstärkt wird. Fenestrierungen, vesikulo-vakuoläre Organellen und eine Umverteilung der Adhäsionsmoleküle PECAM-1 und VE-Cadherin stellen die molekularen Vorgänge dar, die eine erhöhte Permeabilität (18) und damit einen Ausstrom von Plasmaproteinen ermöglichen. Diese Proteine bilden extravaskulär ein provisorisches Gerüst für die migrierenden Endothelzellen und regulieren so die Neubildung der Gefäße.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Emigration der Endothelzellen ist eine Destabilisierung der Gefäßwand, zum einen müssen dazu die Kontakte unter den Endothelzellen zum anderen die Verbindungen zwischen Endothelzellen und Perizyten gelöst werden. U.a. Angiopoetin 2 scheint dabei das Ablösen der Muskelzellen und ein

Auflösen der extrazellulären Matrix zu bewirken (18). Weitere wichtige Komponenten bei der Destabilisierung der Zellwand sind Proteinase wie die Matrix Metalloproteinase (MMP), Chymasen und Heparanase, die Matrixmoleküle degradieren und Wachstumsfaktoren (bFGF, VEGF und IGF-1) freisetzen oder aktivieren. VEGF trennt die Endothelzellen voneinander (18).

Nach der Destabilisierung der Gefäßwand und der Degradierung der umliegenden Matrix kommt es zu einer ungerichteten Migration der Endothelzellen in das umliegende Gewebe, anschließend proliferieren die Zellen und das Aussprossen neuer Gefäße beginnt. Auch für diese Entwicklungen sind die Wachstumsfaktoren VEGF und FGF-2 mitverantwortlich. Zu Beginn liegen die Endothelzellen häufig als geschlossene Stränge vor, die dann ein Lumen ausbilden. Durch das Verlängern und Strecken der einzelnen Endothelzelle oder durch den Zusammenschluß kommt es zu einer Zunahme des Durchmessers und der Länge der Gefäße. Zuletzt fusionieren neugebildete Gefäße untereinander, anastomosieren und bilden so einen Kreislauf, der das Blut in und aus dem neu durchbluteten Bereich transportiert. Angiopoetin-1 stabilisiert das entstandene Gefäßnetzwerk (18).

Sind Endothelzellen in neuen Gefäßen zusammengesetzt, verharren sie dort oft jahrelang ohne sich zu teilen. Außerhalb des Zentralnervensystems gehören sie somit zu den langlebigen Zellen, denn in einem normalen adulten Gefäß teilt sich zur Zeit lediglich eine von 10000 (0.01%) (48). Diese Persistenz der Blutgefäße wird durch ein physiologisches Gleichgewicht aus Angiogeneseaktivatoren und -inhibitoren aufrechterhalten.

1.12 Angiogeneseaktivatoren

1.12.1 *Vascular endothelial growth factor* (VEGF)

Der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), auch als *vascular endothelial permeability factor* (VPF) und Vaskulotropin bezeichnet (120), hat einen großen Einfluß auf die Angiogenese in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen, z.B. der Wundheilung und der Embryonalentwicklung, spielt aber auch eine große Rolle bei der Pathogenese von Krankheiten und dem Tumorwachstum. Es konnte gezeigt werden, dass die bei Tumorkranken vorkommenden hohen VEGF-Serumspiegel mit einer schlechten Prognose korrelieren, so dass dem VEGF-Level auch eine diagnostische Bedeutung (ebenso bei KHK (52)) zukommt (120).

VEGF ist ein durch eine Disulfidbrücke verbundenes Homodimer von 34-42 kDa, das zusammen mit *platelet-derived growth factor A und B* (PDGF-A und B) der großen Familie der „*cystein knot*“ Proteinen angehört (22). Heute weiß man, dass VEGF nur der Prototyp einer ganzen VEGF-Familie bestehend aus VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und dem *placenta growth factor* (PlGF) ist, weshalb er in der Literatur auch als VEGF-A bezeichnet wird.

Das VEGF-A codierende Gen besteht aus acht Exons, die die fünf verschiedenen Splice-Varianten von 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren codieren. Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Endothelzellen werden wesentlich von VEGF-A reguliert, was besonders deutlich wird durch die Lethalität von heterozygoten Embryonen, denen ein VEGF- Allel fehlt (22). Zusätzlich wirkt es chemotaktisch auf Monozyten, Mastzellen und Perizyten und ist in der Lage, die Gefäßpermeabilität zu erhöhen. Seine gefäßpermeabilisierende Wirkung übersteigt dabei die des Histamins (120). Produziert und sezerniert wird VEGF-A zum einen von Stroma- und Endothelzellen und zum anderen von zirkulierenden Blutzellen. Thrombozyten werden als Hauptproduktionsquelle des Serum-VEGF-A diskutiert (120)

VEGF-B wurde in zwei verschiedenen Splicevarianten von 167 und 186 Aminosäuren in Skelettmuskelgewebe, im Myokard und in der Plazenta gefunden, wo es die Zellteilung der Endothelzellen induziert (22). Schwach mitogen wirkt dagegen VEGF-C, das stark die Migration der Endothelzellen fördert und die Proliferation von Muskelzellen hemmt. Das erst kürzlich isolierte VEGF-D weist eine große funktionale Ähnlichkeit zu VEGF-C auf, beide sind an der Formation des lymphatischen Endothels beteiligt (54), unterscheiden sich aber in ihrer Lokalisation. Während VEGF-C bis jetzt nur in der Plazenta dargestellt wurde, konnte das Vorkommen von VEGF-D in vielen Geweben außer der Plazenta gezeigt werden. VEGF-E wurde als ein viraler, den humanen VEGF-Formen homologer Faktor im *poxvirus orf virus* gefunden (54).

VEGF-Rezeptoren

Alle VEGF-Moleküle vermitteln ihre Wirkung über die Tyrosinkinaserzeptoren VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/flk-1) und VEGFR-3 (Flt-4), die die charakteristischen Merkmale der Typ III Tyrosinkinaserzeptoren (sieben Ligandenbindungsdomänen im extrazellulären Anteil, eine einzelne Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Tyrosinkinasedomäne) aufweisen. VEGFR-1 ist der Rezeptor für VEGF-A, PlGF und

VEGF-B. Liganden des VEGFR-2 sind VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E, wogegen VEGFR-3 nur die C- und D-Formen bindet. Neben den transmembranären Rezeptoren kommen auch lösliche Formen der Rezeptoren vor. **Transmembranäre Formen** sind verantwortlich für die Wirkung von VEGF auf die Zellen. Knockout-Experimente haben gezeigt, dass sowohl VEGFR-1 als auch VEGFR-2 für eine normale Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems notwendig sind. VEGFR-1 homozygote (-/-) Mäuse starben spätestens nach 9.5 Tage mit einem fast vollständig ausgebildetem kardiovaskulärem System, dessen Endothelzellen und Gefäßwände jedoch strukturell verändert waren. Homozygote VEGFR-2 Knockout Mäuse zeigten dagegen einen anderen Phänotyp, gekennzeichnet durch das Fehlen differenzierter Endothelzellen und einer stark beeinträchtigten hämatopoetischen Entwicklung. Sogar der VEGFR-3, der normalerweise für die Lymphangiogenese verantwortlich ist, spielt unabhängig davon eine große Rolle bei der Differenzierung des kardiovaskulärem Systems. Anhand dieser Versuche lässt sich erkennen, dass die Rezeptoren unterschiedliche Wirkungen haben. So findet sich der VEGFR-2 in sehr frühen Entwicklungsstadien und scheint die Differenzierung der Vorläuferzellen sowie die Migration und Proliferation der Endothelzellen zu vermitteln, während der VEGFR-1 in späteren Stadien für die Differenzierung und Erhaltung der Endothelzellen verantwortlich ist (54). Als physiologisch vorkommende **lösliche VEGF-Rezeptoren** konnten bis jetzt nur Splicevarianten des VEGFR-1 Rezeptors gefunden werden, lösliche Formen des VEGFR-2 und des VEGFR-3 sind nicht bekannt. Der lösliche VEGFR1-Rezeptor ist ein Heparinbindendes Protein, das als Inhibitor der VEGF vermittelten Endothelzellproliferation fungiert, dessen physiologische Rolle aber noch nicht genau geklärt werden konnte (54).

Eine Bedeutung könnte in dem Schutz des an den Rezeptor gebundenen Wachstumsfaktors vor Proteasen und der damit einhergehenden Verlängerung seiner Halbwertszeit liegen. Durch vier verschiedene Interaktionen ist der lösliche Rezeptor in der Lage, im Signaltransduktionsweg eines VEGF Molekuls zu intervenieren (54). (1) kann VEGFR-1 durch Bindung und Freisetzung von VEGF dessen Bioverfügbarkeit variieren. Durch die verringerte Bioverfügbarkeit kann z.B. ein Weiterwachsen der Endothelzellen in das Gefäßlumen verhindert werden. (2) kommt es durch die Bindung des löslichen Rezeptors an die membrangebundenen Formen zu Heterodimeren, die keine Signale weiterleiten können und (3) kann auch zellassoziertes VEGF durch die Bindung des sVEGFR-1 inaktiviert werden. Schließlich kann (4) die Diffusion von sVEGFR-1 über längere

Strecken als retrokrine Wachstumskontrolle für die Konzentration von freiem VEGF in der Zirkulation verantwortlich sein (54).

Diese löslichen Rezeptoren stellen einen Ansatzpunkt einer antiangiogenen Therapie dar. Als ein Beispiel dafür konnte gezeigt werden, dass eine pathologische subretinale Neovaskulierung durch eine adenovirale Überexpression des löslichen VEGF/flt-1 Rezeptors verhindert werden konnte (53). VEGF ist wesentlich an der Entstehung dieser SRN beteiligt, macht man sich den oben beschriebenen Mechanismus zunutze und bindet durch eine Überexpression des sVEGF-Rezeptors das überschüssige VEGF und neutralisiert so seine Aktivität, gelingt es das Krankheitssymptom entscheidend zu verbessern.

Regulation der VEGF-Freisetzung

Eine große Anzahl von Faktoren ist in der Lage, VEGF zu bilden oder freizusetzen und damit Angiogenese zu initiieren. Hier soll nur eine kleine Auswahl von ihnen gezeigt werden.

Hypoxische Regulation: Die Hypoxie, als ein erniedrigter Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut und eine damit einhergehende verminderte bis ungenügende Sauerstoffversorgung im Gesamtorganismus oder in bestimmten Regionen, löst unmittelbar eine Reaktion des Organismus aus, um die Versorgung wiederherzustellen und damit seine Integrität zu wahren. Neben den direkt an der Gefäßmuskulatur angreifenden kurzfristigen Mechanismen kommt es langfristig unter anderem zu einer durch VEGF induzierten vermehrten Angiogeneseaktivität.

Die Transkription von VEGF und seinem Rezeptor Flt-1 wird unter Hypoxie stark vermehrt. Beteiligt an dieser Hochregulation ist der unter hypoxischen Bedingungen freigesetzte *hypoxia-inducible factor 1a* (HIF1a), der als Transkriptionsfaktor an *hypoxia response elements* (HRE) in der Promoterregion des VEGF- und Flt-1-Gens bindet und so die Transkriptionsrate steigert (22). Das vermehrt gebildete VEGF wirkt der verminderten Sauerstoffversorgung durch die Bildung neuer Blutgefäße entgegen.

Hormonelle Regulation: Von großer Relevanz ist die Angiogenese im weiblichen Zyklus. Sowie der Ablauf des Reproduktionszyklus durch Hormone koordiniert wird, so vermutet man auch eine hormonelle Regulation des VEGF-Spiegels in den weiblichen

Geschlechtsorganen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Östrogen als auch Progesteron, sowie beide Hormone zusammen, in bestimmten Zellen VEGF induzieren (22). In der späten sekretorischen Phase des Zyklus weisen Drüsen des Endometriums eine erhöhte Expression an VEGF codierender mRNA auf. Auch der während einer Schwangerschaft kontinuierlich erhöhte Progesteronspiegel bewirkt in Drüsen eine hohe Produktion an VEGF-mRNA. So scheint im Uterus die Angiogenese weitgehend hormonreguliert zu sein.

P53/ras-Mutationen: Mutationen der Antionkogene p53 und ras führen zu einer Hochregulation der VEGF-Expression (119).

Weitere Faktoren: Verschiedene Zytokine (EGF, TGF- β , IL-1a, IL-6), sowie EGF, PDGF-BB und die *insulin-like growth factors* (119) verstärken die Expression von VEGF codierender mRNS (22). Dabei scheint Interleukin6 (IL-6) eine Rolle bei der VEGF-Regulation in Megakaryozyten und Thrombozyten, die wie bereit erwähnt wesentlich den VEGF-Serumspiegel bestimmen, zu spielen, indem es die VEGF-Synthese verstärkt (120). Als weitere thrombopoetische Zytokine erhöhen IL-3 und Thrombopoetin die VEGF-Sekretion aus den Megakaryozyten. Der Beladung der Thrombozyten mit VEGF kommt eine Bedeutung in der Tumordiagnostik zu, denn es konnte gezeigt werden, dass die Thrombozyten von Tumorpatienten höhere Spiegel an VEGF aufweisen als die Plättchen gesunder Patienten (120).

CEACAM 1 als Effektor von VEGF

CEACAM1, ein Membranglykoprotein mit Lex und SiLex Oligosacchariden, konnte in Mikrogefäßen von proliferierenden Geweben wie Plazenta und Endometrium nachgewiesen werden. Untersuchungen stellten CEACAM1 als einen potenten Angiogeneseaktivator und einen wichtigen Effektor von VEGF dar (31).

Ein Einfluß von CEACAM1 auf die Angiogenese wurde erstmals vermutet, als ein spezifischer CEACAM1 Antikörper einen inhibitorischen Effekt auf die Angiogenese zeigte. Die Vermutung konnte bestätigt werden, denn (1) wird CEACAM1 während der Wundheilung, der Tumorneovaskulisierung und der physiologischen Angiogenese von kleinen Blutgefäßen, nicht jedoch in großen, ruhenden Blutgefäßen exprimiert. (2) stimuliert CEACAM1 eine Proliferation, Migration und *tube-formation* von Endothelzellen

und (3) induziert CEACAM1 die Bildung von Blutgefäßen in CAM assays. Über seine Bedeutung als Angiogeneseaktivator hinaus wird eine VEGF-Effektorfunktion angenommen, da der CEACAM1 Antikörper auch nach VEGF-Induktion eine Angiogenese vollständig hemmt (31) und VEGF CEACAM1 hochreguliert. Die wesentlichen Effekte einer Angiogeneseinduktion durch VEGF scheinen also von CEACAM1 vermittelt zu werden. Daher stellt auch CEACAM1 einen Ansatzpunkt in der antiangiogenen Therapie dar.

1.12.2 weitere Angiogeneseaktivatoren

Neben den oben bereits beschriebenen Faktoren gibt es noch sehr viele Aktivatoren, die auf ganz unterschiedliche Art und Weise die Angiogenese stimulieren. Zusätzlich zu den Wachstumsfaktoren haben auch verschiedenen Zelltypen, Adhäsionsmoleküle und andere in der Zelle vorkommende Moleküle wie z.B Cytochrom P450 Epoxygenaseprodukte einen Einfluß auf die Angiogenese (98).

Fibroblast growth factor-2

Der Fibroblast growth factor (FGF-2) ist ein sehr potentes angiogenes Molekül, das in Endothelzellen eine verstärkte Expression von Proteasen bewirkt, Migration, Proliferation und tube formation initiiert und lange Zeit als der wichtigste Angiogeneseaktivator galt.

FGF-2 ist der Prototyp einer Familie, die derzeit 19 Faktoren aufweist (61) und die sich durch neu entdeckte Faktoren stetig vergrößert, die vier FGF-2 Rezeptoren gehören der Familie der Tyrosinkinaserzeptoren an (9).

FGF-2 reguliert die Expression einer Reihe von an der Angiogenese beteiligten Moleküle wie Kollagenasen, uPA, uPA-Rezeptor, PAI und Integrine (9). Die Regulation dieser Moleküle ermöglicht es FGF-2 Einfluß auf die Proliferation, Migration und tube-formation der Endothelzellen zu nehmen. Neben der physiologischen Regulation der Angiogenese scheint der FGF-FGF-Rezeptor-komplex eine Rolle bei der Karzinogenese und der Tumoriangiogenese zu spielen (9).

Zahlreiche Faktoren hemmen die Angiogenese durch Beeinträchtigung der FGF-2 Aktivität.

Transforming growth factor (TGF- β 1)

Das Polypeptid TGF- β 1 gehört zu einer großen Familie von strukturell ähnlichen Wachstumsfaktoren, der TGF- β Superfamilie (4), die an einer Vielzahl von wichtigen Zellfunktionen wie dem Zellwachstum, der Zelldifferenzierung, Adhäsion, Migration, der Formation der extrazellulären Matrix und der Immunabwehr beteiligt ist (119). Die Rolle des TGF- β 1 hinsichtlich der Angiogenese konnte noch nicht eindeutig geklärt werden (32, 117, 118). Wie auch andere Aktivatoren der Angiogenese scheint TGF- β 1 die Tumorangio-genese zu beeinflussen und eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression zu spielen. Die Korrelation des TGF- β 1 Levels mit der Schwere der Tumorerkrankung lässt TGF- β 1 als Prediktor dienen (51).

Platelet-derived growth factor (PDGF)

Der Platelet derived growth factor war einer der zuerst entdeckten Polypeptidwachstumsfaktoren mit Tyrosinkinase-rezeptor (38). Die Funktion des PDGF ist ebenso wie die des TGF- β 1 umstritten (1). Die gegensätzlichen Effekte, die PDGF sowohl als proangiogenes Molekül (v.a. auf Herzgefäße) als auch als endogenen Inhibitor der Angiogenese auftreten lassen, werden durch Unterschiede in den Expressionsmustern von Zelloberflächen und bei Rezeptordimerisierungsphänomenen hervorgerufen (93).

Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)

HIF-1 α ist ein Transkriptionsfaktor (siehe oben), der als ein sehr wichtiger Regulator der Sauerstoffhämostasie fungiert (126), indem er die Expression von verschiedenen Genen induziert, deren Produkte eine adaptive Rolle für hypoxische Zellen und Gewebe spielen (112),

Es konnte gezeigt werden, dass HIF-1 unter hypoxischen Bedingungen die Expression von Angiogenese-stimulierenden Faktoren wie VEGF und IGF-2 stimuliert und die Konzentration von Genprodukten wie Glukosetransporter, glykolytischen Enzymen, Erythropoetin, Tranferrin und der induzierbaren NO-Synthetase, die eine metabolische Anpassung an eine hypoxische Stoffwechsellage ermöglichen, erhöht (50). Um die Transkription der Zielgene zu aktivieren, dimerisiert HIF-1 α mit ARNT und bindet an bestimmte Sequenzen (hypoxia responsive elements; HRE) in der Promoter oder Enhancerregion dieser Gene (112). Außerdem beeinflusst er die Apoptose und wurde in unterschiedlichen Malignomen gefunden (124, 77).

Als weitere Angiogeneseaktivatoren zählen die Matrix Metalloproteinases (MMPs), die eine sehr große Anzahl von extrazellulär vorkommenden Proteine degradieren können, wodurch sie die für die Angiogenese erforderliche Beweglichkeit der Endothelzellen ermöglichen (16). Ähnlich wirkt ein weiterer Aktivator Angiopoetin 2, der an der Lösung der Muskelzellen und der extrazellulären Matrix beteiligt ist (18). Eine Stabilisierung der Netzwerke erfolgt später durch Angiopoetin 1(18).

Aktivierte Makrophagen sezernieren als weiterer Angiogeneseaktivator den *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), der mehrere zelluläre Prozesse einschließlich Adhäsion, Migration, Angiogenese und Apoptose beeinflussen kann. Das angiogene Potential von TNF- α wird letztendlich durch sekundäre Mediatoren wie VEGF und FGF-2 vermittelt. Die neuesten Erkenntnisse zeigen jedoch für sVCAM-1, das an den α 4-Integrinrezeptor bindet, eine Schlüsselrolle in der TNF- α induzierten Angiogenese (142). VCAM-1 vermittelt eine Adhäsion zwischen den Endothelzelle, aktiviert α 4 β 1 Integrin produzierende Leukozyten und ist so mit Entzündungsentstehung und Angiogenese assoziiert (36). In atherosklerotischen Plaques der Koronarien findet man VCAM-1 vor allem in Gebieten mit Neovaskularisierung und für lösliches VCAM-1 konnte eine chemotaktische Wirkung auf Endothelzellen und ein angiogener Effekt gezeigt werden. Auch andere Zelladhäsionsmoleküle wie *vascular endothelial-cadherin* (VE-Cadherin) und *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM.1), die in den interzellulären Junctions angereichert sind (17) und Zell-Zell Adhäsion vermitteln, beeinflussen Angiogenese und Gefäßformation. Auch wenn der genaue molekulare Mechanismus der Adhäsionsmoleküle auf die Angiogenese noch nicht geklärt werden konnte, lassen zahlreiche Experimente, in denen mit Antikörpern gegen diese Moleküle eine Angiogenese inhibiert werden konnte, keinen Zweifel an ihrer Beteiligung. (17, 24, 147).

Fibroblasten sind sehr wichtig bei der Wundheilung, indem sie chemotaktisch in das verletzte Gebiet einwandern und dort Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen zur Wundheilung produzieren. Darüberhinaus erzeugen sie eine Vielfalt an Zytokinen, Interleukinen, Wachstumsfaktoren und Angiogenesefaktoren, v.a. VEGF und hepatocyte growth factor/scatter factor HGF/SF (94). HGF/SF spielt eine Rolle in einer Vielzahl von physiologischen Vorgängen wie Migration, Proliferation, Zellinvasion und *tube-formation*.

Es konnte gezeigt werden, dass matrixgebundene Fibroblasten u.a. dank dieser Faktoren in der Lage sind, Angiogenese zu verstärken.

Es konnte weiterhin auch für Faktoren mit primär anderen Funktionen ein Einfluß auf die Angiogenese gezeigt werden. So fördern u.a. der Insulin-Like Growth Factor (IGF-I und IGF-II) oder auch die Interleukine IL3 und IL8 die Angiogenese (114). Überraschend ist auch, dass Thrombin als elementares Enzym der Blutgerinnung Proliferation, die Migration der Endothelzellen, die Expression von Adhäsionsmolekülen und Thrombomodulin, sowie die Freisetzung und Expression von PDGF und FGF-2 beeinflusst. Eine kurze Thrombin-Exposition von Endothelzellen senkt ihre Adhäsionsfähigkeit an die Basalmembran. Dieser Effekt, der durch die proteolytische Aktivierung des Thrombinrezeptors hervorgerufen und vermutlich durch die cAMP-Kaskade vermittelt wird, könnte eine wichtige Rolle bei der Initiation der angiogenen Kaskade spielen (141), da das Lösen der Endothelzellen von der Basalmembran ein elementares Ereignis der Angiogenese darstellen.

Kürzlich konnten auch Produkte des Fettstoffwechsels als Effektoren der Angiogenese dargestellt werden, zwei Beispiele dafür sind β -Sitosterol, ein pflanzliches strukturell dem Cholesterin ähnliches Sterin, und Epoxyeicosatriensäuren (EET) als Cytochrom P450 Epoxygenaseprodukte. β -Sitosterol erwies sich als kompetenter Angiogeneseaktivator im CAM assay und man vermutet, daß β -Sitosterol die Produktion von Endothelzellspezifischen Zellmitogenen wie z.B. FGF-2 steigert und so die Angiogenese induziert (101), während der stimulierende Effekt der EET auf die Endothelzellproliferation durch die Aktivierung des EGF-Rezeptors erklärt wird (34).

Von den zahlreichen Angiogeneseaktivatoren stellen VEGF und FGF-2 die bedeutendsten dar. In neueren Untersuchungen wurden die Wechselwirkungen zwischen den beiden Molekülen untersucht. Danach scheinen VEGF und FGF-2 über zwei „reinforcement loops“ (9) miteinander verbunden zu sein, denn einerseits könnte endogenes FGF-2 den VEGF-Spiegel kontrollieren und andererseits könnte VEGF FGF-2 freisetzen, indem es um die Bindungsstellen der Matrix konkurriert. Eine Koregulation der beiden Faktoren kann derzeit nicht ausgeschlossen werden und die Klärung dieser Fragestellung bedarf weiterer Forschung

1.13 Angiogeneseinhibitoren

Der großen Anzahl der Aktivatoren steht eine ebensogroße Vielfalt von Inhibitoren gegenüber, die der angiogenen Wirkung entgegenstehen und so ein Gleichgewicht ermöglichen. Überwiegen die Aktivatoren, kommt es zum sogenannten „angiogenic

switch“, d.h. die angiogenese Kaskade wird angeschaltet. Hier nun die wichtigsten Angiogeneseinhibitoren.

Angiostatin und Endostatin

Angiostatin und Endostatin sind potente Inhibitoren der Angiogenese (132). Beide Proteine werden durch Proteolyse endogen produziert. Angiostatin ist ein Plasminogenfragment von 200 Aminosäuren, das an eine Untereinheit der ATP-Synthase bindet, und Endostatin ist das c-terminale, 20 kDa Fragment des Kollagen XVIII (132). Der genaue molekulare Wirkmechanismus konnte für beide Proteine noch nicht geklärt werden.

Eine systemische Anreicherung von **Angiostatin** erwies sich *in vivo* hemmend auf die Neovaskularisierung und das Wachstum von Metastasen (132). Ein möglicher Ansatzpunkt von Angiostatin zur Verhinderung der Angiogenese wird in der NO-vermittelten Vasodilatation vermutet. Es konnte gezeigt werden, dass Angiostatin die Assoziation zwischen dem *heat-shock protein* 90 (hsp90) und der endothelialen NO-Synthase (eNOS) hemmt, so die Regulation der eNOS durch hsp90 verhindert und damit die NO-vermittelte Vasodilatation inhibiert (76).

Endostatin hemmt insbesondere die Endothelzellproliferation und dadurch Angiogenese und Tumorwachstum. Eine Hypothese für den antiangiogenen Mechanismus von Endostatin zeigt, dass während der Gefäßreifung und -stabilisierung die Endostatinimmunfärbung von einer diffusen Verteilung um die Endothelzellen in unreifen Gefäßen zu einer stärkeren Färbung in den interendothelialen Junctions und in den Kontaktzonen zwischen den Zellen und der Basalmembran in reifen Gefäßen wechselt. Dies weist auf eine Beteiligung des Endostatins bei der Stabilisierung der Gefäße hin, einem Prozeß, der die angiogenen Gefäße in den ruhenden Phänotyp überführt, ihr angiogenes Potential verringert und Tumorneuvaskularisierung inhibiert. Endostatin scheint somit neben seiner antiproliferativen und antimigrativen Funktion antiangiogen zu wirken, indem es durch Stabilisierung der Gefäßwand die für den „angiogenen switch“ erforderliche Destabilisierung der Gefäßwand hemmt (30). Dabei stärkt es die Wand nicht wie Angiopoetin1 durch die Integration von periendothelialen Zellen, sondern durch die Stabilisierung der Gefäße und die Verankerung der Endothelzellen in die Basalmembran (30).

Angiostatin und Endostatin werden heute als wichtige Ansatzpunkte in der Tumorthherapie gesehen, da sie viele Vorteile gegenüber den bisherigen Chemotherapeutika aufweisen.

Zum einen erwiesen sie sich als nichttoxisch und zum anderen konnte auch bei mehrfacher Anwendung keine Resistenzentwicklung beobachtet werden (14).

Platelat factor 4

Der platelat factor 4 (PF-4) gehört zu der CXC-Familie der Chemokine und bildet ein aus vier Monomeren von je 70 Aminosäuren zusammengesetztes Tetramer mit mehreren Domänen, das durch zwei Disulfidbrücken verbunden ist (9).

PF-4 hemmt die Endothelzellproliferation, die Migration und die Angiogenese *in vitro* und *in vivo*, indem es sowohl die Progression der Endothelzellen durch die S-Phase als auch die FGF-2 Aktivität blockiert (9). In Abwesenheit von Heparin inhibiert PF-4 zu 50% die Bindung von FGF-2 und Heparin-induziertes FGF-2 wird durch PF-4 vollständig gehemmt. Die Wirkung von FGF-2 wird aufgehoben, indem PF-4 einen Komplex mit FGF-2 bildet und so dessen Dimerisierung und Rezeptorbindung verhindert.

Thrombospondin-1

Thrombospondin (TSP) ist ein 450 kDa großes, trimeres Adhäsionsglykoprotein, das mit der Basalmembran assoziiert ist, von Thrombozyten während ihrer Aktivierung freigesetzt und von Stroma-, Tumor- und Endothelzellen sezerniert wird. Die Regulation der Angiogenese durch TSP-1 ist sehr komplex und beinhaltet direkte und indirekte Effekte auf Endothelzellen (82). Die indirekten Effekte werden durch TSP-1 aktivierte inflammatorische Zellen und Myofibroblasten vermittelt.

Die direkten auto- und parakrinen Effekte von TSP-1 beinhalten die Hemmung der Migration und die Induktion der Apoptose. Zusammengefasst werden Metastasierung und Angiogenese durch anti-adhäsive und anti-proteolytische Eigenschaften hervorgerufen, indem TSP-1 u.a. die Aktivität der Metalloproteinasen, besonders der MMP-9, beeinflusst und so die angiogene Proteolyse und das physiologische Gleichgewicht regulieren kann (14). Darüberhinaus hemmt TSP-1 FGF-2 induzierte Phänomene wie Endothelzellproliferation und Angiogenese *in vivo* und *in vitro* (9). Es wird auch angenommen, dass TSP die mitogenen Effekte von VEGF₁₆₅ auf menschliche Endothelzellen durch mindestens zwei verschiedene Mechanismen neutralisieren kann. (1) Die Bindung von VEGF an die Glycosaminoglycane der Endothelzelloberfläche wird durch Heparin erleichtert. TSP ist ebenfalls ein heparinbindendes Protein und konkurriert mit VEGF um die Heparinbindung. Da es jedoch eine höhere Affinität zu Heparin hat,

sinkt die Bindungsfähigkeit von VEGF an die Zelloberfläche, da weniger VEGF in heparingebundener Form vorliegt. (2) wird eine direkte Interaktion von TSP mit VEGF diskutiert, da auch in Abwesenheit von Heparin eine verringerte VEGF Wirkung durch TSP zu erkennen ist (44).

Weitere Faktoren Ein 16 kDa großes Fragment des intakten 23 kDa Prolaktinmoleküls erwies sich als potenter Inhibitor der Endothelzellproliferation und der Angiogenese. Der genaue Mechanismus konnte noch nicht geklärt werden, es wird jedoch ein spezifischer 16 kDa hPRL-Rezeptor in den Endothelzellen von Kapillaren vermutet (9).

Es gibt noch eine Reihe von Zytokinen, die in der Lage sind die Angiogenese zu inhibieren. So wurde berichtet, dass u.a. Interleukin (IL)-1 und Interferon-(IFN)- γ eine FGF-2 induzierte Endothelzellproliferation hemmen, indem sie wahrscheinlich die Expression der FGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche reduzieren. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt (9).

Bestimmte, so genannte „*angiostatic*“ Steroide scheinen ebenfalls einen restriktiven Einfluß auf die Angiogenese zu haben. Einige Medroxyprogesteronderivate, besonders 6,6'-Dehydro-MPA und Megesterol, hemmen die FGF-2 induzierte Neovaskularisierung im Tierversuch (9). Möglicherweise regulieren angiostatische Steroide das proteolytische Gleichgewicht und sind so für die Migration und die Morphogenese der Kapillaren mitverantwortlich. Damit würden sie die Funktion der Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen (TIMP)-2 ergänzen.

Neben der Vielfalt der physiologischen Inhibitoren, gibt es mittlerweile auch eine Reihe von pharmakologischen Produkten, die zum einen in der Hoffnung entwickelt wurden, die Angiogenese unter bestimmten Bedingungen ausschalten zu können, zum anderen zeigte sich dieser angiogene Effekt oft erstmals als unerwünschte Nebenwirkung und wurde dann therapeutisch genutzt.

Das Schlafmittel Thalidomide, das unter dem Handelsnamen Contergan in den 60er Jahren durch Extremitätenanomalien von Embryonen, deren Mütter das Medikament eingenommen hatten, Schlagzeilen machte, erwies sich als Inhibitor des TNF- α und als Angiogeneseinhibitor (14). Phase-I Studien mit Thalidomide sind in einem weiten Spektrum von Krebserkrankungen des Menschen geplant.

In Untersuchungen mit Streptokokken der Gruppe B fand man ein Exotoxin, das ausschließlich an Rezeptoren in proliferierenden Kapillaren bindet. Dieses Polysaccharid verbindet die Rezeptoren von dedifferenzierten Endothelzellen -wie sie in Tumoren

vorkommen- und aktiviert so das Komplementsystem und weitere selektiv den Tumor angreifende Immunmechanismen. Im weiteren kommt es zur Inhibition des Tumorwachstums, zur Reduktion der VEGF und VEGF-R2 mRNA und zur Inhibition der Gefäßdichte. Dieses Polysaccharid, CM101 genannt, hat bereits mehrere erfolgsversprechende Phase-I Studien durchlaufen und startet jetzt in Phase-II Studien (14).

Zunehmendes Interesse in der antiangiogenen Therapie finden die Antagonisten der physiologischen Angiogenesefaktoren.

Marimastat ist ein löslicher Inhibitor der Matrix Metalloproteinasen-2 und 9, der in Tierversuchen, Phase-I und-II Studien sehr gute Ergebnisse brachte und derzeit in Phase-III Studien an Glioblastom- und Mamma-Ca-Patienten eingesetzt wird (14).

Ebenso werden monoklonale Antikörper gegen VEGF und VEGF-Rezeptoren, z.B. SU5416 als Flk-1 Inhibitor getestet (14).

Daneben gibt es noch weitere pharmakologischen Anti-Angiogenese Produkte (u.a. das Fumagillinderivat TNP-470(14), 2-Methoxyestradiol und Integrinantagonisten (14), die derzeit in klinischen Studien erprobt werden und auf die hier nicht genauer eingegangen werden soll.

Ein Problem ist jedoch, dass obwohl präklinische Studien sehr erfolgreich verlaufen, in klinischen Studien bislang nur in einigen Fällen bedeutsame Ansprechraten des Organismus auf die Angiogeneseinhibitoren gezeigt werden konnten. Dieses könnte auf das Vorliegen von verschiedenen angiogenen Phänotypen beim Menschen hindeuten (29). Eine Lösung liegt möglicherweise in der Kombination mehrerer, selektiv auf den Organismus abgestimmter Antiangiogenesefaktoren (111).

1.14 Angiogeneseinhibition durch Stabilisierung der Gefäße?

Der Mechanismus der Angiogeneseinhibition von Endostatin zeigte einen völlig neuen Aspekt der Angiogeneseinhibition. Galt es bisher das Aussprossen neuer Gefäße durch die entsprechende Regulation der Faktoren zu verhindern, konnte jetzt eine Stabilisierung der Gefäße als antiangiogen dargestellt werden. Eine Stabilisierung von Tumorgefäßen scheint das weitere Wachstum des Tumors zu erschweren. Auch wenn dies auf den ersten Blick widersprüchlich klingt, wird durch den oben beschriebenen Mechanismus der Angiogenese deutlich, dass eine Stabilisierung der Gefäße die weiteren nötigen Schritte der Gefäßneubildung erheblich erschwert.

1.15 Antiangiogene Tumorthherapie

Was macht nun den sehr großen Reiz der in die Angiogenese eingreifenden Moleküle für die Tumorthherapie aus?

Wie bereits beschrieben ermöglicht erst der Anschluß des Tumors an die Gefäßversorgung und die Entwicklung eines eigenen Gefäßsystems ein unkontrolliertes Wachstum und die Metastasierung. Das Gleichgewicht zwischen Angiogeneseaktivatoren und -inhibitoren, das im intakten Organismus die Endothelzellen ruhen lässt, wird hier aufgehoben, es kommt zum so genannten „*angiogenic switch*“ und zur erneuten Migration, Proliferation und Gefäßformierung der Endothelzellen. Es konnte gezeigt werden, dass dieser „*angiogenic switch*“ die Tumorentwicklung initiiert (48), Neovaskularisierung tritt in einem Stadium zwischen präangiogenen Carcinoma in situ Formen und invasivem Tumoren erstmals auf. Es liegt also die Vermutung nahe, dass eine Inhibition der Angiogenese die Entstehung eines invasiven Tumors, sowie das Wachstum des Tumors und die Metastasierung verhindern kann. Dieser Gedanke liegt der antiangiogenen Tumorthherapie zugrunde. Dazu kommen noch zwei Punkte, in denen eine solche Therapie Vorteile gegenüber der herkömmlichen Chemotherapie zeigen könnte.

Erstens sind die Endothelzellen des adulten, intakten Organismus genetisch stabile, teilungsinaktive Zellen, auf die mittels antiangiogener Therapie selektiv zugegriffen werden kann. Mit der Inhibition der Angiogenese greift man weniger in intaktes Gewebe ein, sondern schadet insbesondere der proliferativen Gefäßentwicklung.

Die Idee der antiangiogenen Tumorthherapie basiert demzufolge darauf, die Gefäßversorgung des Tumors zu unterbinden und ihm so durch den Mangel an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren die Grundlage zum Wachsen und zur Metastasierung zu entziehen, während der restliche Organismus in geringerem Maße betroffen ist. Alle derzeit eingesetzten Chemotherapien schaden neben dem Tumorgewebe erheblich dem Gesamtorganismus. Dies hofft man mit einer antiangiogenen Therapie reduzieren zu können.

Der zweite entscheidende Vorteil gegenüber herkömmlichen Therapien liegt in der geringeren Resistenzentwicklung gegenüber den Pharmaka dank der genetischen Stabilität der Endothelzellen gegenüber den schnellmutierenden, genetisch instabilen Tumorzellen.

Wie bei den einzelnen Faktoren bereits erwähnt, können Angiogenesefaktoren häufig als prognostische Indikatoren für den Verlauf des Tumors genutzt werden. Eine große Gefäßdichte und hohe Level an Angiogeneseaktivatoren gehen häufig mit einem stark

invasiven und metastasierendem Wachstum und damit einer schlechten Prognose einher. Auch wenn noch viele Fragen geklärt werden müssen, besteht kein Zweifel mehr, dass die Entstehung neuer Blutgefäße von elementarer Bedeutung für das Tumorwachstum und die Metastasierung sind. Die weitere Aufgabe besteht darin, die momentan limitierenden Probleme zu überwinden, um die Vorteile der antiangiogenen Pharmaka für den Patienten nutzen zu können. Auch wenn aufgrund der hohen Anzahl an Tumorpatienten eine solche Therapie besonders in der Tumorbehandlung von Nutzen wäre, könnte sie ebenfalls an anderen Krankheitsbildern leidenden Patienten nutzen - etwa Neuropathien (74), Arthritis (108) oder Augenkrankheiten (5).

Vor den malignen führen die Herz-Kreislaufkrankungen die Statistik der Todesursachen in Deutschland an. Auch hier gibt es gentherapeutische Ansätze (137), wobei in diesem Fachbereich - im Gegensatz zu den Tumorerkrankungen - eine gerichtete angiogene Therapie von großem Nutzen sein könnte.

Gezielt steuerbare angiogene/antiangiogene Therapien - möglicherweise mithilfe von LINE1 Retrotransposons (sollte sich ihr Einfluß auf die Angiogenese bestätigen) - sind somit ein hoffnungsvolles Therapeutikum der zukünftigen Medizin.

2 Zielsetzung

Ausgangspunkt für diese Arbeit stellen L1 Retrotransposons dar, die mit 17 % einen großen Anteil des menschlichen Genoms umfassen, an zahlreichen regulatorischen Prozessen im Säugetiergenom beteiligt und dennoch in ihrer Funktion wenig verstanden sind.

Im Vorfeld dieser Arbeit gelang mit der Entwicklung des spezifischen L1EnIgY Antikörpers, erstmalig die immunhistochemische Darstellung des ORF2. Hierbei zeigte sich eine Korrelation des endogenen Expressionslevels mit dem Differenzierungsgrad von Endothelzellen. Ob L1 Elemente einen Einfluß auf die Angiogenese haben, kann anhand der vorliegenden Daten nicht verifiziert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein geeignetes Expressionssystem zu identifizieren, um die Auswirkungen einer L1/ ORF2 Überexpression auf Endothelzellen untersuchen zu können. Zu Beginn gilt es, eine geeignete endotheliale Zelllinie sowie ein für die definierte Zelle optimiertes Transfektionssystem zu etablieren. Grundsätzlich stehen virale sowie unterschiedliche nichtvirale Vektoren zur Verfügung. Wählt man als Targetzelle eine primäre Endothelzelle, ist ein adenoviraler Vektor aufgrund der hohen Transfektionseffizienz wünschenswert. In nicht primären Zelllinien können auch nichtvirale Methoden effizient sein.

Nachdem ein geeignetes Gentransfersystem gefunden ist, soll die bisher nicht erfolgreiche subzelluläre Lokalisation des ORF2 nach Immunfluoreszenzfärbung mittels konfokaler Mikroskopie erfolgen, um aus der zellulären Verteilung der Proteine weitere funktionelle Schlüsse zu ziehen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen desweiteren auf Protein und RNA-Ebene erste Aspekte einer gegenseitigen Beeinflussung der Angiogenese und ORF2-Expression gewonnen werden.

Einflüsse des ORF2 auf die Angiogenese würden zusammen mit einer möglichen Nutzung der Retrotransposons in der Gentherapie einen sehr interessanten und erstmalig untersuchten Aspekt in der Angiogeneseregulation darstellen.

3. Material und Methoden

Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma Chemie (Steinheim), Merck (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) bezogen.

3.1 Geräte und Materialien

Antikörper

<u>Primärantikörper</u>	L1 Enigy 128	
<u>Sekundärantikörper</u>	donkey, anti-chicken Cy 3, 1:500	Dianova GmbH
	Donkey, anti-rabbit IgG-Cy3 1: 500	Dianova GmbH

Geräte

Agarosegelelektrophoresekammer	Biorad
T3 Thermocycler	Biometra
Brutschrank	Binder
Elektroporator, Gene Pulser II	Biorad
Konfokales Mikroskop LSM 510	Zeiss
Kühlschrank (4°C, -20°C)	Liebherr glassline
Mikroskop	Olympus, 26832
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Axio Vert100
Mikrowellenherd	Bosch
Labofuge 400 R	Heraeus Instruments
pH Meter MP 220	Mettler Toledo
Photometer, Biophotometer	Eppendorf
RT-PCR, LightCycler System	Roche Diagnostics
Tischzentrifuge	Sigma 1-15 K
Tischzentrifuge	Biofuge a
UV-Detektor	Biorad GelDoc1000
Wasserbad	julabo sw-20c
Zellkultur Cleanbench	Heraeus
Zentrifuge, Laboratory Centrifuges 6 K15	Sigma

Centrifuge 5414 R

Eppendorf

Kits

- Maxipräparation Kit, Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit
- Nucleo Spin Extract, Machery-Nagel GmbH & Co
- Nucleo Spin Plasmid Kit, Machery-Nagel GmbH & Co
- BCA Protein Assay - Kit
- You-Prime First-Strand cDNA synthesis kit

Enzyme

- PCR

Pfu-Turbo Polymerase

Taq-Polymerase, Roche, 1 Unit/ μ l

T4-Polynucleotidkinase

- Ligation

CIP (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal mucosa), NEB 10 000 Units/ml

T4-DNS Ligase, NEB, 400 000 Units/ml

- Restriktionsendonukleasen

- Age I, NEB, 2000 Units/ml
- Avr II, NEB, 4000 Units/ml
- BspD I, NEB, 5000 Units/ml
- Cla I, NEB, 5000 Units/ml
- EcoR I, NEB, 20 000 Units/ml
- EcoR V, NEB, 20 000 Units/ml
- Hind III, NEB 10 000 Units/ml
- Nde I, NEB, 20 000 Units/ml
- NgoM IV, NEB, 10 000 Units/ml
- Not I, NEB, 10 000 Units/ml
- Xba I, NEB, 10 000 Units/ml
- Xho I, NEB, 20 000 Units/ml
- XmaI, NEB, 10 000 Units/ml

Lösungen und Puffer

- BSA
Von NEB, auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml

- NEB 1
10 mM Bis Tris Propane-HCl, 10 mM MgCl₂ , 1 mM Dithiothreitol, pH 7,0

- NEB 2
50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,9

- NEB 3
100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,9

- NEB 4
50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,9

- NT1, NT2, NT3, NE (Nucleo Spin Extract)

- 0,1 M PB
0,018 M KH₂PO₄, 0,082 M Na₂HPO₄, pH 7,14

- PBS
17,8 g Na₂ HPO₄ und 16 g NaCl auf 2 l Aqua dest.
zu sterilen Arbeiten wurde PBS Dulbecco's, Gibco Invitrogen, 500 ml verwendet

- Pfu – Turbo – Polymerasepuffer

- Stripping Puffer
62,5 mM Tris-HCl, pH= 6,7, 2% SDS, 100 mM 2-Mercaptoethanol

- TBS (10x)

200 mM Tris, 1,37 M NaCl, mit HCl Einstellung des pH-Wertes auf 7,6

- TAE-Puffer
- TBE-Puffer
445 mM Tris, 445 mM Borsäure, 5 mM EDTA,
in Aqua dest, pH auf 8,0 einstellen
- TBS-T
Verdünnung von 10 x TBS auf 1 x TBS und Zugabe von 1 ml Tween
- TGS (5x)
15,14 g Tris, 93,8 g Glycin, 5 ml 20% SDS auf 1 l Aqua dest.
- Transfer-Puffer
100 mM Tris, 193 mM Glycin
- Tris-HCl pH 7,6
3,02 g Tris, 4,5 g NaCl, lösen in 450 ml Aqua dest., pH-Einstellung mit HCl auf 7,6
und Auffüllen auf 500 ml
- Tris- NaCl pH 8,2-8,4
6,35 g Tris, 9,0 g NaCl, 25 ml 1N HCL, 1025 ml Aqua bidest. und 1g Tween 20

Medien

Luria-Broth (LB)-Medium

10 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Yeast-Extract auf 1 l Aqua dest. Der pH mußte 7,5 sein, ansonsten erfolgte die Einstellung mit NaOH oder HCL.

Luria-Broth (LB)-Agarplatten

Hierzu wurden meist Tabletten der Firma Sigma verwendet. Es wurde nach Protokoll eine Tablette auf 50 ml Wasser eingesetzt, diese Lösung anschließend autoklaviert. Nach

Abkühlung auf ca. 50°C wurde Ampicillin bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml hinzugefügt und gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden je 25 ml der Lösung in 6 cm dishes gegossen.

Alternativ erfolgte die Herstellung mit 10 g Bacto-Trypton, 10g NaCl, 5g Bacto-Yeast-Extract und 15 g Agar-Agar. Anschließend wurde wie oben beschrieben vorgegangen.

SOB-Medium

20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Yeast-Extract, 0,5 g NaCl, 0,19 g KCL auf 1l Aqua dest. und pH-Werteinstellung auf 7,0. Danach wurde die Lösung autoklaviert. Kurz vor Gebrauch erfolgte dann noch die Zugabe von 5 ml 2M Magnesiumchlorid.

Materialien und Chemikalien für Zellkultur

Materialien

- Zellkulturflaschen, T 25, T 50, T 175, T 300 (Nunc, Falcon)
- 6-well, 12-well und 24-well Multidishplatte (Biochrom)
- Neubauerzählkammer (Optik Labor)

Medien

- DMEM Glutamax (high glucose, Na Pyruvat), Gibco Invitrogen, 500 ml
- F12 Nutrient Mixture (Ham, Glu), Gibco Invitrogen, 500 ml
- Endothelial Cell Growth Medium MV, PromoCell bioscience alive
- SupplementMix, Endothelial Cell Growth Medium, Promo Cell bioscience alive

Lösungen

- FCS, Gibco Invitrogen
- Penicillin-Streptomycin, Gibco Invitrogen
- Trypsin, Gibco Invitrogen

Chemikalien und Sonstiges

- Adhäsionsobjektträger Marienfeld
- Agarose Ultra Pure Gibco Invitrogen

- Ampicillin Invitrogen
- Deckgläser Ø 13 mm Karl Hecht KG
- Deckgläser 24 x 46 mm Marienfeld
- DAPI Sigma
- dNTPs, 100mM Invitrogen
- Ethidiumbromid Sigma
- Hepes 1M, 100 ml Gibco Invitrogen
- Mowiol Calbiochem.

12 g Mowiol wurden in 30 ml Aqua dest. und 100 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5) gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 8,5 eingestellt. Die Lösung stand über Nacht, anschließend wurde sie auf 90°C erwärmt. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden 30 ml Glycerol hinzugefügt. Die Aufbewahrung erfolgte in Aliquots bei -20°C.

- Horse serum GibcoInvitrogen
- Donkey serum Dianova GmbH
- 1,5 ml Safe-Lock Tubes Eppendorf
- 2,0 ml Safe-Lock-Tubes Eppendorf
- Saponin Sigma

3.2 Methoden

3.2.1 DNA - molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion

Außerdem wurde die PCR im Rahmen dieser Arbeit auch zur Kolonien-PCR als Screeningverfahren von transformierten Bakterienkulturen eingesetzt.

Die 1984 von Kary Mullis (127) veröffentlichte PCR ist heute eine der am meisten benutzten Standardmethoden der Molekularbiologie. Sie dient der exponentiellen in-vitro Amplifizierung von Nukleinsäuren-Fragmenten (88).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgender PCR-Reaktionsansatz verwendet:

10x PCR-Puffer	5µl
Primer 1	2µl
Primer 2	2µl
dNTPs (20mmolar)	0,5µl
Pfu-Turbo-Enzym (2,5 Units/ml)	1µl
Template-DNA (ca 20 ng)	
Aqua bidest.	ad 50µl

Es wurde ein bis auf die template-DNA und das Enzym alle Komponenten enthaltender Mastermix auf Eis in bestimmte PCR-Tubes pipettiert. Nach Zugabe von Mastermix zu der template-DNA und anschließender Enzymbeimengung wurde der Reaktionsansatz in den vorgeheizten Thermocycler überführt. Da dieser mit einem beheizbaren Deckel verschlossen werden kann, war die Bedeckung der Proben mit einem Tropfen Mineralöl nicht nötig.

Folgendes PCR-Profil wurde verwendet:	5 min	95°C		
	3 Zyklen a	1 min	95°C	
		1 min	57°C	
		5 min	72°C	
	32 Zyklen a	1 min	95°C	
		1 min	68°C	
		5 min	72°C	
		10 min	72°C	
	dann bei	10°C	oder bei	
	Kühlschranktemperatur		bis zur	
	Weiterbearbeitung			

Die Annealing-Temperaturen, d.h. die Primer Hybridisierung auf die Ziel DNA (template), werden primerabhängig gewählt und anhand der CG und AT-Basenpaaren berechnet.

Folgende Primer wurden zur PCR verwendet, im Rahmen der Arbeit gebrauchte Schnittstellen sind unterstrichen.

- GS 169: 5'- AAA AAT CGA TTC TCG AGA TGA CAG GAT CAA CTT CAC
ACA T - 3' (40 bp)
- GS 179 : 5'- AAA AGG AAA AGC GGC CGC TCA ATT CCC ACC TAT GAG
TGA G- 3' (40 bp)
- KD 1: 5'- CTG TGA ATT CTA GTT GCC AGC CAT CTG- 3' (27 bp)
- KD 2: 5'- CCC ACC CGT TCT TTC CGC CTC AGA AG-3' (26 bp)
- KD 3: 5'- CTG TGA ATT CCC GGG TAG TTG CCA GCC ATC TG-3' (32bp)
- VEGF-A: 5` - CCT CCG AAA CCA TGA ACT TT-3`
- VEGF-A: 5` - TTC TTT GGT CTG CAT TCA CTT-3`

Phosphorilierung der Primer

Zur Phosphorilierung der Primer wurde folgender Ansatz verwendet:

10 x Kinasepuffer	2 µl
Primer	1 µg entsprechendes Volumen
T4 Polynucleotidkinase (10 Units/ µl)	1 µl

Im Heizblock bei 37 °C erfolgte eine einstündige Inkubation. Anschließend wurde die Kinase 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert, so daß dieser Reaktionsansatz direkt zur PCR verwendet werden konnte.

3.2.1.2 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Produkte

Zur Trennung der mittels PCR gewonnenen DNA-Produkte wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hier macht man sich zunutze, daß die DNA-

Fragmente ihrer Größe entsprechend durch ein Netz von pflanzlichen Polysacchariden wandern und so separiert werden können.

In Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden Fragmente wurden 0,5-2% Agarosegele verwendet. Dazu wurde das Agarosepulver in 1 x TAE oder 1 x TBE (zur Trennung von kleiner als 5 kb großen Fragmenten) gelöst und in einem Mikrowellenherd langsam zum Kochen gebracht. Nach Abkühlung der Agarose auf ca. 50°C wurde als Standard auf 60 ml Agaroselösung 5 µl Ethidiumbromid zugefügt und vorsichtig möglichst gleichmäßig verteilt. Dann wurde die Lösung unter dem Abzug in die Gelhalterung mit vorher eingesetztem Kamm gegossen. Nach ca. 25 min war das Gel durch Polymerisation vollständig verfestigt und konnte in die Gelkammer eingesetzt werden. Die Kammer wurde entsprechend der Gelbeschaffenheit mit 1 x TAE oder 1 x TBE bis zur vollständigen Beschichtung des Gels gefüllt. Nach Entfernung des Kammes wurden die DNA-Proben in die Geltasche pipettiert. Dazu wurden die DNA-Proben mit einem 6 x DNA-Ladepuffer auf ein Gesamtvolumen von 12 µl verdünnt (10 µl Probe und 2 µl DNA-Loadingbuffer).

Nach Anlegen einer elektrischen Spannung (Voltzahl und Zeitdauer wurden abhängig von der Anzahl der Basenpaare der zu trennenden DNA gewählt, meist jedoch 100 V für 50 min) wanderten die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld und konnten so separiert werden.

Zur Beurteilung der Fragmentgrößen wurde stets ein DNA-Marker mitaufgetragen. So konnte die durch den Einfluß des Ethidiumbromids unter UV-Licht (Wellenlänge von 360 nm) sichtbare DNA hinsichtlich ihrer Größe exakt beurteilt werden.

Als Marker wurden verwendet:

- Gene Ruler, DNA-Ladder Mix, Fermentas
- Lambda DNA/ EcoRI Marker, Fermentas
- 1kb Ladder

Außerdem kam eine größere Gelkammer mit 120 ml Volumen sowie unterschiedlich große Käme zum Einsatz. Das Verhältnis der eingesetzten Materialien wurde stets beibehalten.

3.2.1.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nachdem mittels DNA-Marker und Ausgangsprodukt die Bande als erzieltes DNA-Produkt identifiziert worden ist, wurde diese unter UV-Licht möglichst exakt ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel sowie die anschließende Aufreinigung wurde mit einem Kit der Firma Machery-Nagel (Nucleo Spin Extract) durchgeführt. Dies erfolgte nach Angaben des Herstellers. Um eine möglichst große Menge an DNA zu erhalten wurde, wie empfohlen, mit vorgewärmten Puffer eluiert.

3.2.1.4 Klonierungen der PCR-Produkte

Die eluierten und aufgereinigten DNA-Produkte wurden dann in entsprechend geschnittene Vektoren hineinligiert.

Hier u.a. verwendete Plasmide:

- pJM101RP: Das backbone des pJM101RP Plasmids bildet der 10 410 bps große Vektor pCEP4 der Firma Invitrogen, der u.a. eine Ampicillinresistenz und einen CMV-Promoter trägt. In diesen Vektor wurde das L1RP Element hineinkloniert.
- pmAdcos 4
- pmAd5
- pIRES-EGFP: Dieser Vektor weist zwischen der die Multiple cloning site und das EFGP codierenden Region eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) auf. Dies ermöglicht die Translation des in die MCS codierten Gens und des EGFP von einer einzigen mRNA. Die Expression des EGFP selektioniert somit die erfolgreich mit dem Gen transfizierten Zellen. Bei der IRES-Bindungsstelle handelt es sich um eine abgeschwächte Bindungsstelle, so daß die Translationinitiation des EGFP-Startcodons um ein Vielfaches gegenüber der Translation des klonierten Gens reduziert ist. Somit können sehr hohe Level des gewünschten Produktes erhalten werden.
- pAd Track x Sb x Theo
- pShuttle CMV-X-mSB10

3.2.1.5 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und DNA-Inserts wurde nach allgemein üblichen Standardvorschriften durchgeführt. Es wurden die von den Herstellern für die jeweiligen Enzyme empfohlenen Puffer eingesetzt.

Ein typischer 100 µl Ansatz zu Klonierungszwecken sah folgendermaßen aus:

DNA (100- 200 ng/µl)	10 µl
10 x Puffer (zum Enzym passend)	10 µl
10 x BSA (falls empfohlen)	10 µl
Aqua dest.	60 µl
Restriktionsendonuklease (max. 10%)	10 µl

Bei kongruenten Enzympuffern konnte ggf. ein Doppelverdau durchgeführt werden. Auch hier durfte die beigefügte Enzymmenge höchstens 10 % des Gesamvolumens entsprechen.

Ein typischer 20 µl Ansatz eines Doppelverdaus sah folgendermaßen aus:

DNA	ca.1 µg
10 x BSA	2 µl
10 x Puffer (empfohlen für beide Enzyme)	2 µl
Enzym 1	1 µl
Enzym 2	1 µl
Aqua dest.	Ad 20 µl

Der Ansatz wurde für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Produkte des Verdaus wurden anhand einer Gelelektrophorese kontrolliert.

Restriktionsendonukleasen:	- Age I	-Hind III	- Nde I
	- Avr II	- NgoM IV	
	- BspD I	- Not I	

- Cla I
- EcoR I
- EcoR V
- Xba I
- Xho I
- Xma I

- Puffer:
- Neb 1,2,3,4
 - EcoR I-Puffer
 - BSA

3.2.1.6 Dephosphorilierung von DNA-Enden

Die Dephosphorilierung der 5'-DNA-Enden wurde im Anschluß eines Restriktionsverdau durchgeföhrt, um eine Religation des linearisierten Vektors mit sich selbst zu unterbinden. Das die Dephosphorilierung katalysierende Enzym ist eine alkalische Phosphatase (CIP), dieses Enzym ist in allen NEB-Puffern aktiv, so daß nicht umgepuffert werden mußte. CIP konnte dem Restriktionsverdauansatz einfach hinzugefügt werden. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz 15 min lang zur Hitzeinaktivierung der alkalischen Phosphatase auf 70°C erhitzt.

Die Rate des selbstlinearisierten Vektors konnte so reduziert werden.

3.2.1.7 Ligation

Die Ligation wurde mit der T4 DNA-Ligase entsprechend der Herstellerempfehlungen durchgeföhrt. Nach Abschätzen der Konzentrationen anhand der Bandenstärken im Agarosegel oder nach exakter Konzentrationsbestimmung mittels UV-Photometer wurden die PCR-Produkte als Inserts in einem Verhältnis von 1:1 bis zu 1:5 zum Vektor eingesetzt. Entscheidend dabei war das Größenverhältnis von Vektor zu Insert. Im Rahmen der Arbeit wurden auch sehr große Inserts kloniert, wobei sich ein Insertüberschuß gegenüber dem Vektor als Vorteil erwies.

Ein 10 µl Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

T4 10 x DNA Ligase Buffer	1 µl
Insert	Hier wurden unterschiedliche
Vektor	Verhältnisse gewählt.
T4 DNA-Ligase	1 µl

Im Vergleich zu der bei Raumtemperatur empfohlenen Inkubation zeigte sich eine höhere Ligationsrate bei Inkubation im Ligationsprogramm mittels PCR-Maschine (s.b. 3.2.1).

3.2.1.8 Transformation

Zur Transformation verwendete Bakterien:

- E.coli DH 5α, chem. kompetente Zellen
- JM 109
- XL-1-Blue MRF supercompetent cells

Chemische Transformation von E.coli DH 5α

Für die Transformation wurden 50 µl eines bei -80°C eingefrorenen E.coli DH 5α Bakterienstocks in einem 2 ml Eppendorftube auf Eis vorgelegt. Nach langsamen Auftauen der Bakterien wurde vorsichtig ca. 1 ng der Plasmid-DNA zugefügt und der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. In einem auf 42° C vorgeheiztem Thermoblock erfolgten anschließend für eine Minute der Hitzeschock und damit die Aufnahme der DNA in die Bakterien. Dann wurde der Transformationsansatz erneut 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl antibiotikafreiem LB-Medium wurde der Ansatz 1 Stunde lang bei 37°C unter leichtem Schütteln zur Einleitung des Zellwachstums inkubiert. Im Anschluß wurde der Ansatz 1 min bei 14 000 rpm an zentrifugiert, der Überstand bis auf die letzten 100 µl abpipettiert und verworfen. Das Zellpellet wurde in den verbleibenden 100 µl aufgenommen, so auf eine Ampicillinhaltige LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Erst durch die Aufnahme des die Antibiotikaresistenz vermittelnden Vektors werden die Bakterien fähig, auf diesen Platten zu wachsen. Somit erfolgt eine Selektion der transformierten Bakterien. Nicht transformierte Bakterien können hier nicht wachsen.

Chemische Transformation von XL1-Blue MRF⁺ supercompetent cells

Auch die supercompetenten XL1- Blue MRF Zellen werden von -80°C langsam auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit der Hand geschüttelt und anschließend mit β -Mercaptoethanol versetzt. Wichtig für eine erfolgreiche Transformation ist eine Konzentration von 25 mM. Während der anschließenden 10-minütigen Inkubation auf Eis werden die Tubes vorsichtig alle 2 Minuten geschwenkt. Dann erfolgte nach Protokoll die Zugabe von 0,1-50 ng DNA und 30 Minuten Inkubation auf Eis. Wie auch bei der Transformation von E.coli DH 5 α erfolgte die Aufnahme des Plasmids durch Hitzeschock, hier für 45 sec bei 42°C im Wasserbad. Der restliche Vorgang entspricht der oben beschriebenen Transformation. Statt LB-Medium wird hier jedoch SOC- Medium verwendet.

Elektroporation von E.coli DH 5 α

Eine andere Möglichkeit der Transformation, die eine hohe Effizienz aufweist, ist die Elektroporation. Hier versucht man nicht durch Hitzeschock, sondern durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, d.h. durch kurze Hochspannungsimpulse, die Zellwände für die exogene Vektor-DNA permeabel zu machen. Verwendet wurden elektrokompetente E.coli DH 5 α Zellen.

50 μl der bei -80°C eingefrorenen Zellen wurden für 15-20 Minuten auf Eis aufgetaut. Auf 15 μl Bakterien wurde 1 μl Vektor-DNA zugefügt. Hierbei war besonders wichtig, eine möglichst ionenarme Lösung zu verwenden, um elektrische Kurzschlüsse zu vermeiden.

Die mit DNS versehenen Bakterienlösungen wurden auf Eis in die speziell für die Elektroporation vorgesehenen Küvetten überführt und vorsichtig durchmischt.

Dann erfolgte die Elektroporation bei 1,8 kV, 200 Ohm und 25 μF . Anschließend wurde 200 μl zimmerwarmes LB-Medium hinzugefügt, um den Ansatz für 20-30 Minuten zu inkubieren. Nach dieser Inkubation wurden die Ansätze auf ampicillinhaltige Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert.

DNS-Fällung

Um eine möglichst ionenarme DNS-Lösung zu erhalten, wurde die DNS vor der Elektroporation ethanolgefällt. Außerdem wurde die DNS-Fällung im Rahmen dieser Arbeit noch zur Konzentrierung von DNS-Lösungen sowie zur Aufreinigung von DNS aus Reaktionsgemischen verwendet. Hierbei wurde vor der Fällung noch 3M Na-Acetat pH 5,2 zugefügt.

10 µl des Ligationsansatzes wurden mit 90 µl Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt und mit dem 2 ½ fachen Probenvolumen (hier 250 µl) 100 % Ethanol versetzt. Dieser Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert und nach dieser Präzipitation 15 min bei 4°C und 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das sedimentierte Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Inkubation von 15 min auf Eis und erneuter Zentrifugation mit 13 000 rpm für 15 min bei 4°C wurde der Überstand abgenommen, das pellet für 30 min bis 2 Std an der Luft getrocknet und anschließend in 10 µl aqua dest. aufgenommen.

3.2.1.9 Plasmidpräparation zur DNS-Isolierung

Das Ausgangsmaterial zur Präparation der Plasmid-DNS stellten die Übernachtskulturen verschiedener nach der Transformation auf der antibiotikaselektierten Platte gewachsenen Bakterienkolonien dar. Für diese Übernachtskultur wurden die einzeln aufgenommenen Kolonien in je 2 ml LB-Medium + 4 µl Ampicillin gesetzt und bei 37°C und 225 U/min über Nacht inkubiert.

Bei der Präparation der Plasmid-DNS kamen zwei verschiedene Protokolle zum Einsatz, denen jedoch beiden das Prinzip der alkalischen Lyse zugrunde liegt.

DNS-Minipräparation der Plasmide

Lösung I

Auf 100 ml A. dest. 5 ml 50 mM Glucose, 2,5 ml 25 mM Tris-HCl (pH= 8,0), 1ml 10 mM EDTA. Dies wurde autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Vor der Präparation Zugabe von RNase auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml .

Lösung II

0,2 N NaOH, 1 % SDS

Lösung II wurde vor jeder Präparation neu angesetzt.

Lösung III

Auf 100 ml 60 ml 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessigsäure, 28,5 ml H₂O

1,5 ml der Übernachtskulturen der Bakterienkolonien wurden zunächst in 2 ml Eppendorfgefäßen für 2 min bei 13 000 rpm und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das resultierende pellet in 200 µl der Lösung 1 vollständig resuspendiert. Hierzu wurden 200 µl der Lösung 2 gegeben, vorsichtig durch Schwenken des Gefäßes gemischt und zur kompletten Zellyse maximal 5 min inkubiert. Dann erfolgte zur Proteinausfällung die Zugabe von 200 µl der Lösung 3. Nach vorsichtigem Mischen und folgender 15 minütiger Inkubation auf Eis wurden die weißlich ausgeflockten Proteine 15 min bei 4 °C und 13 000 rpm abzentrifugiert. Die Überstände wurden dann vorsichtig abgenommen und in neue 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Um die Qualität der extrahierten DNS später zusätzlich zu erhöhen, wurde an dieser Stelle alternativ ein unten beschriebener Waschschrift eingefügt. Zur Präzipitation der DNS wurde der Ansatz mit 2 ½ fachem Volumen 100 % Ethanol oder 0,7 fachem Volumen Isopropanol versetzt, gemischt und 15 min bei 4 °C und 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Der überständige Ethanol wurde möglichst vollständig abgenommen und das pellet nach Lufttrocknung bei Raumtemperatur in 50 µl TE aufgenommen.

Wie bereits erwähnt wurde je nach Verwendungszweck und gewünschtem Reinheitsgrad der DNS ein zusätzlicher Waschschrift durch eine Phenolchloroform/ Chloroformextraktion eingefügt. 500 µl des Überstandes wurden dazu unter dem Abzug mit einfachem Volumen Phenolchloroform gefällt. Nach kurzem Vortexen wurde der

Ansatz 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde oberhalb der Interphase abgenommen und mit 500 µl Chloroform versetzt. Es folgte erneutes Vortexen und 10 minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur. Die wässrige Phase wurde vorsichtig mit der Pipette aufgenommen und mit dieser Lösung wurde nach Protokoll weiterverfahren.

Alternativ erfolgte die Plasmidpräparation mit dem Nucleo-Spin-Plasmid-Kit der Firma Machery-Nagel. Hierbei wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Eluiert wurde mit 50 µl des im Kit enthaltenen Elutionspuffers.

Maxipräparationen von Plasmid-DNS

Präparationen größerer Plasmidmengen wurden mit dem Endofree Plasmid Maxi Kit Maxipräparationen zur Isolation des klonierten Plasmides durchgeführt. Dazu wurden 2 µl einer 2 ml-Übernachtskultur eines Klons in 100 ml LB-Medium + 200 µl Ampicillin gegeben. Dieser Ansatz wurde in einem 500 ml Kolben bei 37°C unter Schütteln ca. 16 Std inkubiert. Die Präparation wurde nach Herstellerempfehlungen durchgeführt.

Das Ergebnis von Mini- und Maxipräparationen wurde qualitativ anhand einer Gelelektrophorese und quantitativ photometrisch überprüft. Für photometrische Konzentrationsbestimmungen wurden die Proben in einer Mikro-Quarzküvette bei 260 und 280 nm gemessen. Die Messung bei 260 nm ergab die DNS Konzentration. Durch die zusätzliche Messung bei 280 nm konnte der Quotient der Extinktion bei 260 nm und der Extinktion bei 280 nm als Maß für den Reinheitsgrad der DNS bestimmt werden.

Bakterien-Glycerol-Stock

Ausgangsprodukt für das Anlegen eines Bakterien-Glycerol-Stock zur Aufbewahrung transformierter Bakterien war wiederum die Übernachtskultur. Von dieser wurden 5 ml für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 2 ml eines Gemisches aus 80 % LB-Medium und 20 % Glycerol aufgenommen und nach 1 ml-Aliquotierung in Cryoröhrchen bei -80°C eingefroren.

3.3 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden Zelllinien gearbeitet:

- 293-Zellen	Humane embryonale Nierenzelllinie
- Huh7-Zellen	humane hepatozelluläre Carzinomzelllinie
- PAE-Zellen	pig aorta endothelial cells
- HELA –Zellen	humane Adenocarcinomzelllinie

primäre Endothelzellen

- HDMEC	human dermal microvascular endothelial cells
- HBMEC	human brain microvascular endothelial cells

Die Zellen wurden bei konstanten 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturflaschen im Brutschrank kultiviert. Als Nährmedium wurde außer bei den Endothelzellen Dulbecco's MEM Medium mit 10% foetalem Rinderserum und 1 % Penicillin/ Streptomycin verwendet. Die PAE-Zellen wurden in F-12 (HAM) - Medium mit 5% FCS kultiviert, die primären Endothelzellen benötigten als Nährmedium Endothelial Cell Growth Medium MV mit Zusatz von Supplement Mix.

Um ein optimales Zellwachstum gewährleisten zu können, wurde je nach Zelllinie alle 2-4 Tage das Nährmedium gewechselt. Dazu wurde das alte Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugefügt. Wenn der Boden der Zellkulturflasche mit einem konfluenten Zellrasen bedeckt war, wurden die Zellen passagiert. Als erstes wurde das Medium mit einer Pipette abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Dann wurde zum Lösen der Zellen Trypsin hinzugegeben, die folgende 3-minütige Inkubation bei 37°C führte zu einer unter dem Mikroskop deutlich sichtbaren Lösung der Zellen vom Boden. Nach Neutralisierung des Trypsins mit mindestens dem doppelten Volumen an Nährmedium folgte eine 5minütige Zentrifugation bei 1560 rpm. Nach Absaugen des Überstandes folgte die Resuspension des Zellpellets in frischem Nährmedium und die Verteilung auf neue Kulturflaschen.

3.3.1 Transfektionen der Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, eine möglichst hohe Transfektionseffizienz für pJM101RP zu erreichen. Um die Transfektion zu optimieren, wurden unterschiedliche Transfektionsreagenzien in verschiedenen Zelllinien auf ihre Transfektionsrate hin untersucht. Hierbei wurden verwendet:

- Fugene, Roche
- Polyfect, Qiagen
- PEI, Qbiogene, molecular biology
- CaCl_2 und HEPES

Transfektion mit Fugene

Die Transfektion wurde in 6-well-Platten durchgeführt, so daß nach Herstellerangaben 2×10^5 Zellen pro well ausgesät und mit $1 \mu\text{g}$ DNS transfiziert wurden. Es wurde ein Verhältnis von $1 \mu\text{g}$ und $3 \mu\text{l}$ Fugene-Reagenz gewählt. Es wurden $97 \mu\text{l}$ serumfreies Medium vorgelegt, erst wurde das Fugene-Reagenz und dann die DNS hinzugefügt, das Ganze wurde vorsichtig gemischt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die komplette Mischung zu den Zellen gegeben und vorsichtig gleichmäßig verteilt. Ohne Wechsel des Mediums erfolgte die 24-48 stündige Inkubation der Zellen im Brutschrank.

Transfektion mit Polyfect

Es wurde nach Herstellerprotokoll für die Transfektion von 293 Zellen vorgegangen. Am Vortag wurden 1.2×10^6 Zellen in einer 6 cm Petrischale und dem für die Zellen geeignetem Medium ausgesät, um die Transfektion mit 70-80% konfluenten Zellen durchführen zu können. Bei den primären Endothelzellen wurden diese Angaben variiert und mehr Zellen als empfohlen ausgesät, um so deren langsamen Wachstum zu kompensieren.

$4 \mu\text{g}$ der zu transfizierenden DNS wurden mit zusatzfreiem Medium auf ein Gesamtvolumen von $150 \mu\text{l}$ verdünnt. Nach der Zugabe von $40 \mu\text{l}$ Polyfect, gründlicher Durchmischung und 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde nun 1ml antibiotikahaltiges Medium hinzugefügt und der Ansatz vollständig gemischt. Dies wurde

dann auf die Zellen, deren Medium kurz vorher gewechselt wurde, pipettiert. Weitere Versuche folgten nach 24-72 h Inkubation.

Transfektion mit PEI

Auch hier wurden die Herstellerempfehlungen befolgt. In der Regel wurden 2×10^4 Zellen in 24-well-Platten ausgesät. Für die Transfektion von 1 µg DNS, die in 100 µl 150 mM NaCl verdünnt wurde, wurden 3,3 µl ExGen 500 Reagenz benötigt. Diese wurden zu der DNS- Lösung hinzugefügt und sofort 10 sec gevortext. Nach einer 10 min Inkubation wurden 100 µl des ExGen/DNS-Ansatzes pro well auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden dann für 24-48 h im Brutschrank inkubiert.

Tranfektion mit CaCl₂ und HEPES

Am Vortag wurden in einer T25- Flasche 5×10^5 Zellen ausgesät. Für die Transfektion wurden 10 und 20 µg DNS mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 225 µl gebracht. Mit 25 µl 2,5 molarer CaCl₂-Lösung wurde die DNS-Lösung unter ständigem Vortexen tropfenweise auf 250 µl aufgefüllt. Diesem Ansatz wurde ebenfalls unter Vortexen sehr langsam tropfenweise 250 µl HEPES hinzugefügt. Der gesamte Ansatz wurde vorsichtig auf die Zellen pipettiert und 4 Std lang inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium gewechselt und die Zellen im Brutschrank inkubiert.

3.3.2 Virusinfektionen der Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Adenoviren Typ 5 gearbeitet. Diese Viren sind in der Umwelt weit verbreitet, so daß die meisten Kleinkinder nach dem 1. Lebensjahr bereits Antikörper gegen mindestens einen der ca 50 unterschiedlichen Serotypen aufweisen (Allgemeine Stellungnahme des ZKBS AZ:6790-10.28). Sie sind Verursacher von in den meisten Fällen harmlosen Infektionen des oberen Respirationstraktes.

Den verwendeten Adenoviren fehlte zwar die vollständige Replikationskompetenz, da aber dennoch eine potentielle Humanpathogenität bestand, waren Maßnahmen der Sicherheitsstufe 2 erforderlich. So wurde stets unter einer S2-Sicherheitsbank gearbeitet und alle mit den Viren kontaminierten Materialien und Flüssigkeiten wurden nach Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert.

Für die Virusinfektion wurden die zu infizierenden Zellen mit einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Nur so konnte die optimale Virusmenge, in der Regel ein 100 (moi 100)- und 200 (moi 200)- facher Virusüberschuß gegenüber den Zellen, für die Infektion bestimmt werden. Anhand des bekannten Virustiters wurde das benötigte Volumen des Virusstocks berechnet, in 1/3 des normalen Mediumvolumens pipettiert (1,2 ml in T 25 Flasche) und zu den Zellen gegeben. Nach 4 stündiger Inkubation bei 37°C und abgeschlossener Virusadsorption wurde der Infektionsansatz auf normales Mediumvolumen aufgefüllt. Die nun infizierten Zellen wurden bei 37°C im Brutsschrank kultiviert. Bis zur Durchführung der weiteren Versuche mußte besonders auf cytopathische Effekte geachtet werden.

3.3.3 Immunhistochemische Färbung der transfizierten Zellen

Protokoll für polyklonale rabbit-Antikörper

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Zellen auf Deckgläschen oder Chamber Slights ausgesät und entsprechend Protokoll transfiziert. 3 Tage nach der Transfektion bei einer Konfluenz von ca. 70–80% wurden die Zellen 3 x für einige Minuten mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, gefolgt von 5 x 5 minütigem Waschen mit eiskaltem PBS, konnte mit der immunhistochemischen Färbung begonnen werden.

Folgende Vorbehandlung ermöglichte erst die Inkubation mit den Antikörpern. Außerdem wurde im letzten Schritt durch die Inkubation mit NRS eine Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen erreicht.

- | | | |
|---|---|----------|
| - | Histoclear | 3 x 5min |
| - | 100% Ethanol | 5 min |
| - | 1,5% H ₂ O ₂ / Methanol
(2,5 ml H ₂ O ₂ in 50 ml Methanol) | 30 min |
| - | Aqua dest. | 5 min |
| - | PBS | 15 min |
| - | 2% NRS/PBS | 30 min |

Die bei Paraffinschnitten notwendige Hydrierung in einer Reihe von Ethanolen absteigender Konzentrationen entfiel bei Färbungen von Zellen.

Die direkt an die Vorbehandlung anschließende Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Der Antikörper wurde dazu mit einem Puffer aus PBS + 0,2 % BSA + 0,1% NaN₃ + 5 %NHS auf 1:10 verdünnt.

Am folgenden Tag wurde wie folgt weiterverfahren:

- PBS 3 x 10 min
- 2.AK, rabbit, anti-chicken, IgG biotin 60 min
1:250, 10 µl in 2,5 ml PBS
- PBS 2 x 10 min
- goat-PAP, 1:250 30 min
10 µl in 2 ml PBS
- PBS 2 x 10 min
- ABC-Komplex, 1:250 30 min

Der ABC-Komplex mußte mindestens 30 min vor Gebrauch angesetzt werden. Dazu wurden 10 µl der Lösung A in 2,5 ml PBS gemischt und dann mit 10 µl der Lösung A versetzt.

- PBS 10 min
- PB 0,1 M, pH 7,4 10 min
- Entwicklung der Peroxidase-Aktivität 10-30 min

Ansatz für eine Küvette:

45 ml PB 0,1 M pH 7,4; 22,5 mg DAB; 18 mg Ammoniumchlorid; 900 µl 0,05 M Nickelsulfat; 900µl 10% β-D-Glucose, zum Schluß 150 µl (= 0,18 mg) Glucoseoxidase (1,2 mg/1ml Aqua dest.)

Um eine deutliche, die natürlichen Verhältnisse darstellende und nicht zu überdeckende Färbung zu erhalten, wurde die Peroxidase-Entwicklung unter dem Mikroskop beobachtet. So konnte die optimale Entwicklungsdauer bestimmt werden.

Nach 3 x 5 minütig Spülen in PBS erfolgten das Eindecken und damit die Konservierung in Mowiol.

3.3.4 Immunfluoreszenz der transfizierten Zellen

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden fünf 12 mm cover slips auf den Boden von 6-well-Platten ausgelegt. Anschließend wurden $1,1 \times 10^5$ Zellen pro well ausgesät und am nächsten Tag wie beschrieben transfiziert. Die Immunfärbung wurde an 70-80 % konfluenten Zellen durchgeführt. Die Deckgläschen wurden dazu aus der 6-well-Platte herausgenommen und in einem Deckgläschenständer in ein Bad mit eiskaltem PBS gesetzt und 3 x mit eiskaltem PBS für einige Minuten gewaschen. Für die Fixierung der Zellen wurden alle cover slips in je ein well einer 12-well-Platte überführt und 30 min mit 1 ml 4 % Paraformaldehyd in PBS pro well bei Raumtemperatur inkubiert. Zur vollständigen Entfernung des Paraformaldehyds wurden die Zellen 5 x 5 min mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend zur Permealisation 5 min mit PGS (PBS, 0,5 % Glycin und 0,05 % Saponin) inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurde 20 min bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus PGS mit 10 % Eselserum, 5 % Pferdeserum und 1% BSA geblockt. Daran schloss sich die einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper (L1 Enigy, 1:50 in der Blockierlösung) an. Nach dreimaligem Waschen mit PGS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (donkey, anti-chicken Cy 3, 1:500 in Block) ebenfalls für eine Stunde. Mit zimmerwarmen PBS wurde 4 x gewaschen, bevor die Zellkernfärbung mit 3 µl Dapi (4',6-Diamidino-2-phenylindol) in 100 ml PBS für 3 min stattfinden konnte. Um das Dapi vollständig zu entfernen schloss sich abschließend ein letzter Waschschrift 3 x 3 min mit PBS an. Die Deckgläschen wurden dann Mowiol/0,5 % TTP eingedeckelt.

Betrachtet wurden die Zellen zum einen mit einem Fluoreszenzmikroskop, für einige Fragestellungen wurden die Zellen mit einem konfokalen Mikroskop untersucht.

3.3.5 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie ist eine neuere Methode, die in den 70iger Jahren von Petrau vollendet wurde. Sie ermöglicht im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie eine

erheblich bessere optische Auflösung sowie die dreidimensionale Darstellung von Präparaten.

Im Gegensatz zu herkömmlichen Mikroskopen, bei denen das gesamte Feld ausgeleuchtet wird, wird bei konfokalen Mikroskopen nur ein sehr kleiner Punkt beleuchtet. Nur das Licht aus diesem Fokuspunkt kann das Pinhole passieren. Dies erhöht die Schärfe und den Kontrast durch Reduktion des Streulichtes aus angrenzenden Präparatbereichen. Zusätzlich wird ober- und unterhalb der Focusebene entstandenes Licht durch die Blende unterdrückt (Zeiss Mikroskope, Laser Scanning Mikroskope). Erst durch Abrastern des Präparates entsteht das Gesamtbild einer Fokusebene und desweiteren durch elektrische Konstruktion die dreidimensionale Struktur in einem Stapel von optischen Schnitten jeweils einer Ebene.

Kolokalisationsversuche

Zur Überprüfung der Kolokalisation von ORF1 und ORF2 wurden die Zellen wie oben beschrieben mit pJM101RP transfiziert. Nach 48 Std wurde dann eine Immunfluoreszenz zur Detektion der ORFs durchgeführt. Hierbei wurden zwei primäre Antikörper (ORF1-AK und ORF2-AK) im Block gelöst verwendet. Die restliche Immunfluoreszenz schloss sich unverändert an. Die Auswertung erfolgte mit normalem und konfokalem Mikroskop.

Stimulationsversuche

Um zu untersuchen, ob der Zeitpunkt der Angiogenese eine Phase einen Einfluß auf die Expression der ORF1 + 2 Proteine hat, wurden Stimulationsversuche mit den Wachstumsfaktoren VEGF und FGF durchgeführt. Hierzu wurden HDMEC-Zellen auf Chamber Slights ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, die Zellen erhielten nun ein sogenanntes Hungermedium, das außer 5% FCS keine weiteren Zusätze enthielt. Nach der Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen dann mit unterschiedlichen Konzentrationen an VEGF (10 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml) und FGF (5 ng/ml, 12,5 ng/ml und 25 ng/ml) stimuliert. Es schloss sich nach der Inkubation die Fixierung mit 4% PFA und eine Immunfluoreszenzfärbung an.

3.4 Proteinanalytik

3.4.1 BCA-Proteinbestimmung

Hier wird die klassische Biuret-Reaktion mit einer sehr sensiblen und spezifischen kolorimetrischen Detektion von Cu-Ionen durch das BCA-Reagens kombiniert. Die sich bildenden Komplexe aus einem Cu-Ion und zwei BCA-Molekülen sind wasserlöslich und können durch Extinktion bei 562 nm nachgewiesen werden. Diese Extinktionsmessung erfolgt bei 562 nm gegen einen BSA (bovine serum albumin)-Kalibrationsstandard aus einer Reihe von Verdünnungen bekannter Konzentrationen.

Zuerst wurden die BSA-Standards von 1,5/ 1/ 0,75/ 0,5/ 0,25 und 0,125 mg/ml hergestellt. 0,1 ml der Standards sowie der zu bestimmenden Proben wurden jeweils mit 2 ml des Working Reagent (Reagent A+B) versetzt und sorgfältig gemischt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Tubes auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde bei 562 nm die Extinktion der einzelnen Proben gemessen und anhand der Standardkurve die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt.

3.4.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteingemischen anhand der Molekulargewichte. Um die Proteine zu erhalten, wurden erst einmal die Zellen mit lysis buffer versehen und mit dem Dispergierer (Ultra Turrax) lysiert. Nach der eben beschriebenen Methode wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt. Die verschiedenen Proben, die alle gleiche Proteinmengen enthielten wurden mit Laemmlipuffer versetzt und durch seine Bestandteile reduziert, denaturiert, entfaltet und beschwert. Kurz vor dem Auftragen erfolgte eine 5 minütige zusätzliche Hitzeinaktivierung bei 95°C.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem inhomogenen Gelsystem aus Trenn- und Sammelgel. Das Sammelgel diente dazu, die Proteine in eine Lauffront zu bringen, im Trenngel mit höherer Maschendichte erfolgte dann die elektrophoretische Auftrennung.

Die Gele wurden nacheinander angesetzt, das Sammelgel wurde auf das Trenngel aufgetragen. Nach Entfernung der Kämme wurden je 24 µl der Proben und ein Proteingrößenmarker der Firma Gibco in die Taschen geladen. Die Laufkammer wurde mit TGS gefüllt. Der Gel-Lauf und damit die elektrophoretische Auftrennung fand bei 120 V für 70 min statt.

Pipettierschema für Acrylamidgele

Sammelgel, 5%	6 ml	
Aqua dest.	4,1 ml	
30% Acrylamid	1,0 ml	
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,75 ml	
10 % SDS	0,06 ml	
10% Ammoniumpersulfat	0,06 ml	
TEMED	0,006 ml	
Trenngel, 10 ml	8%	15 %
Aqua dest.	4,6 ml	2,3 ml
30% Acrylamid	2,7 ml	5,0 ml
0,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,006 ml	0,004 ml

3.4.3 Western-Blot-Analyse

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die im Acrylamidgel separierten Proteine durch ein senkrecht zum Gel angelegten Strom auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Bindung an diese erfolgte durch hydrophobe Wechselwirkungen ohne

Änderung der Proteinanordnung. Verwendet wurde dazu eine entsprechende Blottingkammer gefüllt mit Transferpuffer. Der Transfer fand unter ständiger Kühlung für 60 min bei 350 mA statt. Der Erfolg des Transfers und die Kontrolle der Proteine wurden anschließend mittels einer Ponceau-Färbung dargestellt. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran für eine Minute in Ponceau-Lösung geschwenkt. Leichte Entfärbung mit Aqua dest. führte zur Darstellung der Banden. Eine gründliche Säuberung mit Aqua dest. entfärbte die Membran vollständig.

Die nun wieder gereinigte Membran wurde zur Absättigung freier Bindungsstellen und Minimierung unspezifischer Antikörperbindungen bei 4°C über Nacht geblockt. Die Blockierlösung setzte sich aus 5 g Milchpulver und 100 ml TBS-T zusammen.

Am nächsten Morgen wurde die Membran 10 min 2 x gründlich mit TBS-T gewaschen und anschließend für mindestens 60 min bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach 3 x 10 minütigem Waschen der Membran mit TBS-T fand die 60 minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper statt, gefolgt von 2 x 5 minütigem und 2 x 10 minütigem Waschen mit TBS-T.

Zur Detektion des sekundären Antikörpers und damit der Darstellung der Proteine wurde eine ECL-Chemilumineszenz-Reaktion durchgeführt.

Regenerieren der Nitrocellulosemembran (Stripping)

Das Regenerieren, das sogenannte Strippen der Membran ermöglicht eine zweite Immunodetektion ohne Verlust der geblotteten Proteine. Nach 1 stündigem Waschen des Blots bei 50°C im Strippingpuffer wurde die Membran 2 x 10 min mit TBS-T gespült und 1 Std bei Raumtemperatur in Milchpulver geblockt. Der zweite Tag konnte normal angeschlossen werden.

3.5 RT-PCR

3.5.1 RNA-Isolierung

Bei der Isolierung von RNA ist stets sehr sauberes Arbeiten erforderlich, da ubiquitär vorhandene RNAsen die gegenüber Hydrolyse sehr empfindliche RNA leicht denaturieren können. Daher wurde immer mit Handschuhen und sterilen Materialien sowie Chemikalien möglichst auf Eis gearbeitet.

Die RNA-Isolierung wurde mit dem Trizol-Reagenz der Firma Biozym nach Protokoll durchgeführt. Als erstes mußten die transfizierten Zellen lysiert werden, um die RNS freizusetzen. Dazu wurde 1 ml Trizol-Reagenz auf 10 cm² Kulturfläche direkt in die Zellkulturflasche gegeben und das Zellysate mehrfach auf- und abpipettiert. Zur vollständigen Dissoziation der Nucleoproteinkomplexe wurden die homogenisierten Proben für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zur Reinigung der RNA 0,2 ml Chloroform/ 1 ml Trizol hinzugefügt, die tubes mit der Hand für 15 sec geschüttelt und dann bei Raumtemperatur 2-3 min inkubiert. Nach Zentrifugation bei weniger als 12 000 rpm und 4-8°C für 15 min befand sich die RNA in der oberen wässrigen Phase, die für das weitere Vorgehen vorsichtig in ein neues Gefäß überführt wurde. Nach Präzipitation mit Isopropanol, wobei die Fällung wie bei DNS-Proben beschrieben durchgeführt wurde, wurde das RNS-pellet mit 75% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet, um dann möglichst frei von Verunreinigungen in RNase-freies Wasser aufgenommen zu werden. Die Kontrolle der isolierten RNS erfolgte qualitativ mittels 1% iger Agarosegelelektrophorese, ihre Konzentrationsbestimmung mittels photometrischer Analyse.

3.5.2 Reverse Transkription

Für die anschließende quantitative PCR oder Real-Time-PCR mußte die aus den Zellen isolierte RNS in DNS umgeschrieben werden. Dazu wurden 100 ng bis 5 µg RNS benötigt, die mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 32,5 µl gebracht wurden. Nach 10 minütiger Inkubation bei 65°C wurden die Proben 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Kontrolle von zwei - die Reaktion katalysierende Reverse Transkriptase sowie RNaseinhibitoren und Nucleotide enthaltenden - beads auf dem Boden des First-Strand-Beads-Tube (Amersham Pharmacia Biotech) wurde die RNS-Lösung in diese überführt. 0,2 µg Hexamer Primer pd(N)6 wurden hinzugefügt und mit DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 33,2 µl gebracht, gefolgt von einer 1-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Bis zum vollständigen Verschwinden der Schlieren wurde der Ansatz durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und im letzten Schritt nochmals 60 min bei 37°C inkubiert. Wurde die nun gebrauchsfertige cDNS nicht unmittelbar verwendet, wurde sie bei -20°C gelagert.

3.5.3 Real - time PCR und Light Cycler

Die Real-Time PCR ist eine Weiterentwicklung der zur DNS-Amplifikation dienenden konventionellen PCR (Mullis). Sie ermöglichte erstmalig die Quantifizierung der Ausgangs-DNS-Menge und damit die Darstellung von Expressionsmustern auf RNS-Ebene. Mittlerweile spielt sie in Forschung, Diagnostik und Therapie eine entscheidende Rolle.

Es wurde das LightCycler System der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, und der Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen I verwendet. Dieser Farbstoff fluoresziert nicht in Lösung sondern nur, wenn er an doppelsträngige DNS gebunden vorliegt. Somit steigt die Fluoreszenzintensität während der exponentiellen Phase der PCR, nicht jedoch in der Plateauphase, proportional zur Menge der amplifizierten DNS. Eine Detektionsoptik ermöglicht das online-Monitoring der PCR. Da die Bindung des Farbstoffes unspezifisch an alle ds DNS erfolgt, muß zur Identifizierung des spezifischen Amplifikats am Ende der PCR eine Schmelzkurve aufgenommen werden. Dazu wird während der kontinuierlichen Aufheizung des Reaktionsansatzes bis auf 99°C die Fluoreszenzintensität gemessen. Bei der für das PCR-Amplifikat spezifischen Schmelztemperatur schmilzt die DNS, der Farbstoff löst sich von der DNS und fluoresziert nicht länger. Diese Analyse der Schmelztemperatur ermöglicht ohne anschließende Gel-Elektrophorese die Produktspezifizierung.

Die Quantifizierung der unbekanntes Ausgangs-DNS-Menge erfolgt anhand einer externen Standarddeichkurve, die aus den Threshold-Werten bekannter template-DNS-Konzentrationen erstellt wird. Der Thresholdpoint wird als Fluoreszenz-Schwellenwert festgesetzt und ist definiert als der PCR-Cyclus, bei dem die emittierte Reporterfluoreszenz das Hintergrundsignal deutlich übersteigt. Als unregulierte Bezugs-RNS wurde hier GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), das Schlüsselenzym der Glykolyse verwendet. Die Standardkurve ist die lineare Regression (gebildet mittels der Fit Points-Methode), in der die Threshold-Cycle-Daten gegen den Logarithmus der Standardkonzentrationen aufgetragen wird. Nach Bestimmung des Threshold-Punktes der unbekanntes DNS-Probe kann anhand dieser Kurve die Konzentration bestimmt werden. Wichtig dabei ist eine identische Effizienz von Standard und Target-PCR-Reaktionen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 3 µg RNS zur cDNS-Synthese eingesetzt und eine 1:5 Verdünnung der DNS zur RT-PCR-Analyse verwendet. Der in der Regel benutzte 20 µl PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Template-DNS	4 µl
VEGF Primer 5'	2 µl
VEGF Primer 3'	2 µl
LCMix	2 µl
MgCl ₂	2,4 µl
H ₂ O	7,6 µl

Es wurde zunächst ein Master-Mix erstellt, erst kurz vor Reaktionsbeginn wurde die DNS hinzugefügt. Das Arbeiten mit dem Light-Cycler System ermöglichte eine sehr schnelle PCR mit online-Monitoring.

4 Ergebnisse

Nachdem im Vorfeld dieser Arbeit ein spezifischer Antikörper, der das ORF2 Protein der L1 Retrotransposons erkennt, hergestellt werden konnte, zeigten bisherige Untersuchungen eine Expression des ORF2 in Keimzellen, Leydig-, Sertoli- sowie Endothelzellen des adulten Testisgewebes. Die Tatsache, dass die Expression des ORF2 in reifen, stabilen Gefäßen sehr stark ist, während eine Expression in unreifen, proliferierenden Gefäßen sehr schwach bis nicht nachweisbar ist, läßt eine Beteiligung des ORF2 an der Angiogeneseregulation vermuten.

Da aufgrund der bisher fehlenden Darstellbarkeit mangels eines geeigneten Antikörpers keine Expressionsanalysen für den ORF2 durchgeführt werden konnten, galt es nun, ein geeignetes Expressionssystem zu identifizieren. Ein effizientes Transfektionssystem ist die Basis weiterer struktureller und funktioneller Analysen.

4.1 Infizierbarkeit primärer Endothelzellen mit adenoviralen Vektoren

Da die Effekte einer Überexpression des ORF 2 auf Endothelzellen - insbesondere primäre humane Endothelzellen - untersucht werden sollen, wurde als erstes eine Transfektionsmethode mit einer möglichst hohen Transfektionseffizienz gesucht. Um menschliche primäre Endothelzellen zu transfizieren, wurden als Targetzelle HDMEC (*human dermal microvascular endothelial cells*) gewählt, die adenovirale Transfektion erwies sich als die Methode mit der höchsten Effizienz.

Nach den oben aufgeführten Protokollen wurden HDMEC in den Infektionsexperimenten mit einem GFP-kodierenden Adenovirus transfiziert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Transfektionseffizienz äußert sich in der Expressionsrate des GFPs.

Die GFP-Produktion in den adenoviral transfizierten Zellen stieg nicht proportional zur eingesetzten Virusmenge, ein 100-facher Virusüberschuss zeigte gegenüber einem 200-fachen Überschuss an Adenoviren eine höhere Infektionseffizienz.

Nicht-virale Transfektionsmethoden primärer Endothelzellen waren im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich.

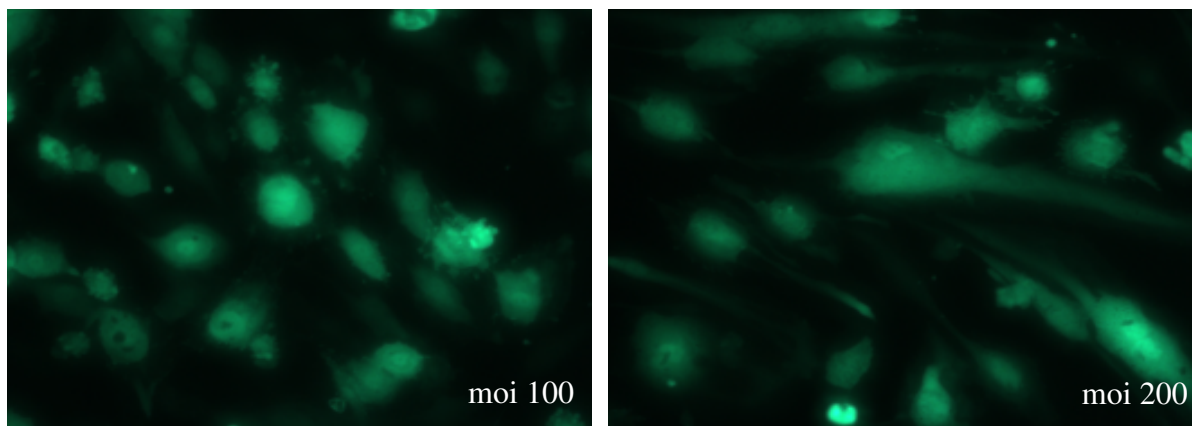


Abb. 9 GFP Adenovirus-Infektion von HDMEC-Zellen

Die Infektion der primären Endothelzellen (HDMEC) mit dem GFP-Adenovirus zeigt eine gute Effizienz, ein 100-facher Virusüberschuss (moi 100) zeigt gegenüber dem 200-fachen Virusüberschuss (moi 200) eine höhere Effizienz.

4.2 Herstellung eines Expressionsplasmides für L1 ORF2

Ein grundlegendes Problem besteht darin, die Virusexpression später in der Zelle nachzuweisen. Daher wurde als erster Klonierungsschritt das ORF2 Konstrukt in die multiple-cloning-site des pIRES-EGFP Plasmid inkloniert. Das Plasmid besitzt eine interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*), gefolgt von einem grünfluoreszierendem Protein (*enhanced green fluorescent protein, EGFP*). Dadurch kann man später die Zellen mit einer Expression des klonierten Gens durch eine Grünfärbung selektionieren.

Das Insert für den 1. Klonierungsschritt ist der *Open Reading Frame 2*, das Gen, dessen Überexpression letztendlich untersucht werden soll.

Als Ursprungsplasmid wurde das Plasmid pJM101RP verwendet.

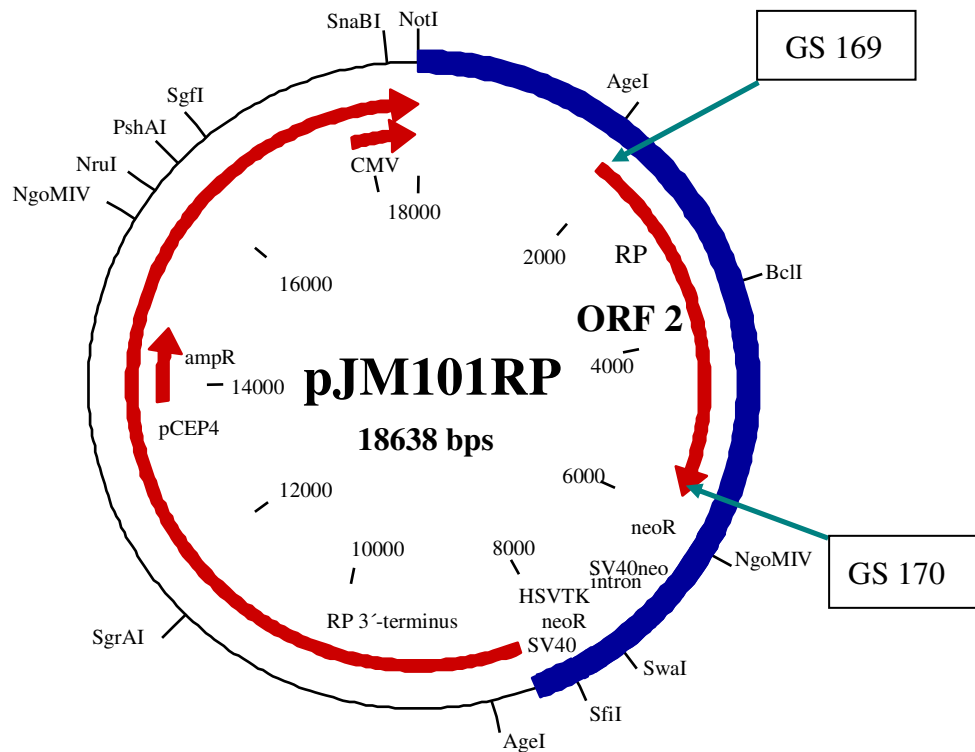


Abb. 10 Plasmid pJM101RP .

Das Plasmid pJM101RP enthält den ORF2 des L-1 Retrotransposon. Das *backbone* bildet das pCEP4 Plasmid mit einer Ampicillinresistenz.

Um den ORF2 zu erhalten wird eine PCR mit für die Amplifikation des ORF2 synthetisierten Primern GS 169 und GS 170 durchgeführt. Die Primerbindungsstellen sind in der Genkarte blau eingezeichnet.

Der ORF2 wurde mittels PCR amplifiziert, wobei das vorne aufgeführte Pipettierschema genutzt wurde. Die PCR erfolgte bei einer auf die Primer abgestimmte Maximaltemperatur von 68°C.

Die Kontrolle der PCR erfolgte anhand einer 0,8%-gen Agarose-Gelelektrophorese. Um die Proben besser aus dem Agarosegel isolieren zu können, wurden die Einzel-PCR-Proben gepoolt.

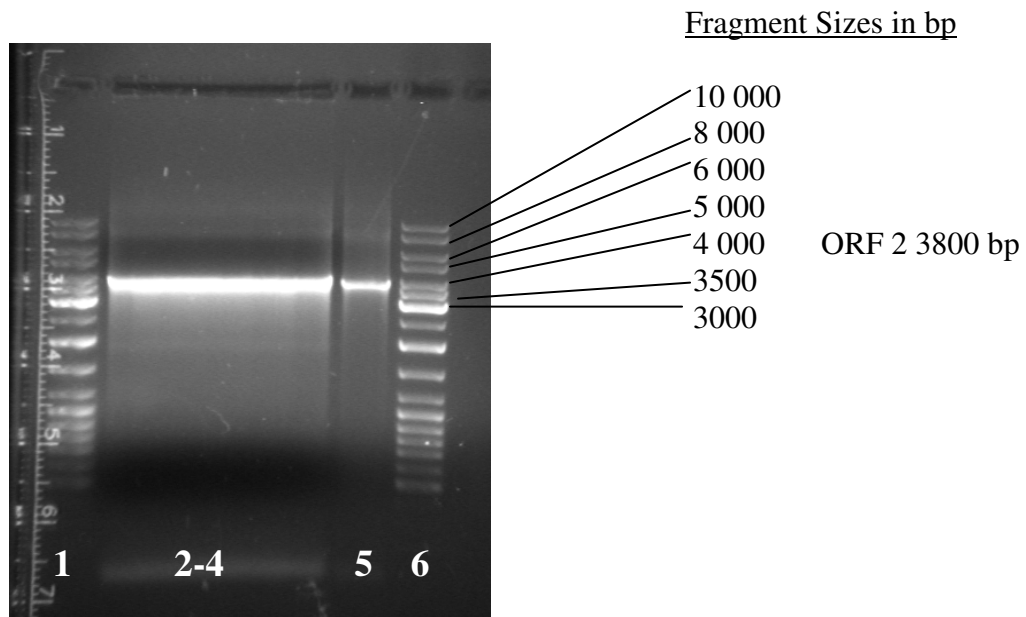


Abb. 11 Analytische Agarosegelelektrophorese zur PCR-Kontrolle

Man erkennt eine deutliche Bande und anhand des Vergleiches mit dem ORF2-Fragment (6) und im Verhältnis zu dem Marker kann diese als der ca 3800 bps große ORF2 identifiziert werden. Spur 1: 5 µl Marker, Gene Ruler DNS Ladder Mix, 2-4: gepoolte PCR-Proben, 5: Open Reading Frame 2, 6: nochmal DNS Ladder Mix

Das durch die PCR gewonnene und durch die Elektrophorese kontrollierte ORF2-Fragment wurde wie beschrieben isoliert und gereinigt und dann in den Vektor pIRES-EGFP hineinligiert.

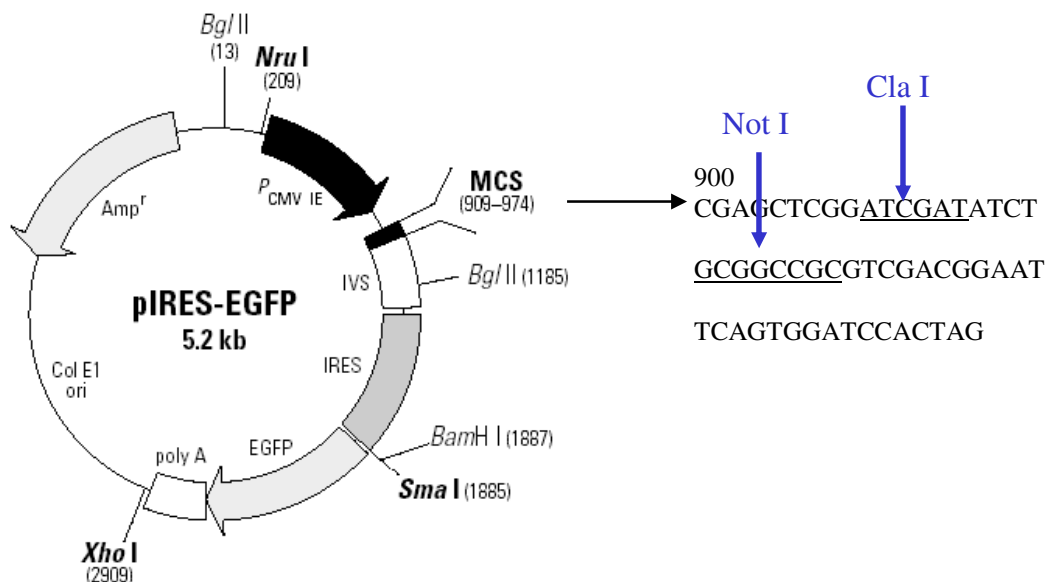


Abb. 12a pIRES-EGFP wird mit den Restriktionsenzymen Not I und Cla I geschnitten. In diesen Vektor wird der Open Reading Frame 2 hineinligiert. Das entstehende Produkt ist der Vektor pORF2 IRES-EGFP.

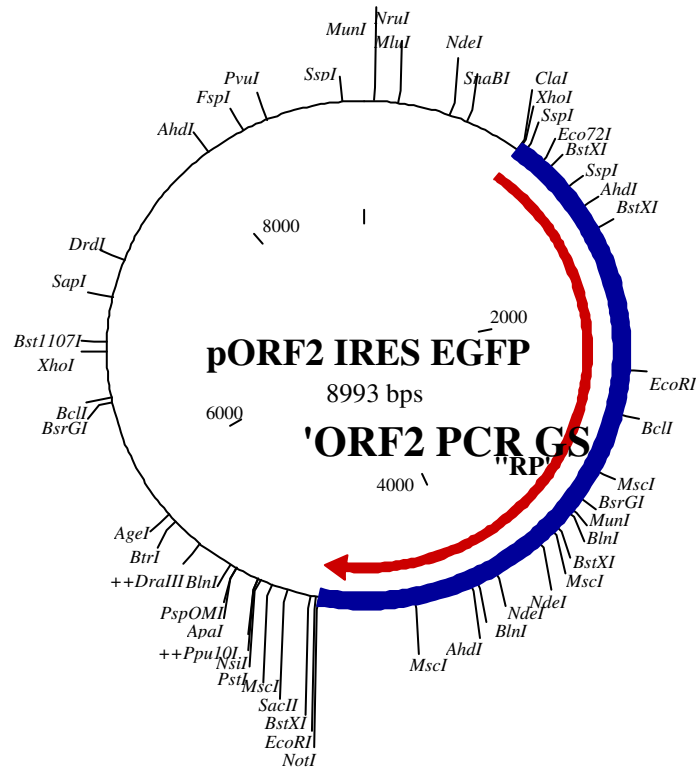


Abb. 12b 1. Klonierungsschritt, Insert: ORF2, Vektor: pIRES-EGFP

Das Plasmid pIRES-EGFP wurde mit Not I und Cla I geschnitten. Der mittels PCR gewonnene ORF2 wurde ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten. Die Fragmente wurden anschließend ligiert. Das Resultat ist der 8993 bps große Vektor pORF2 IRES-EGF.

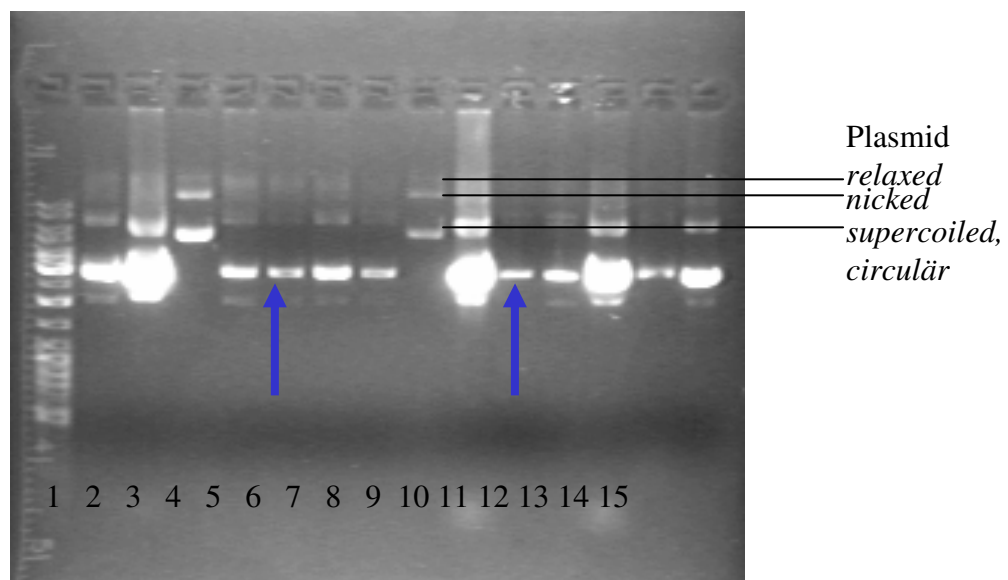
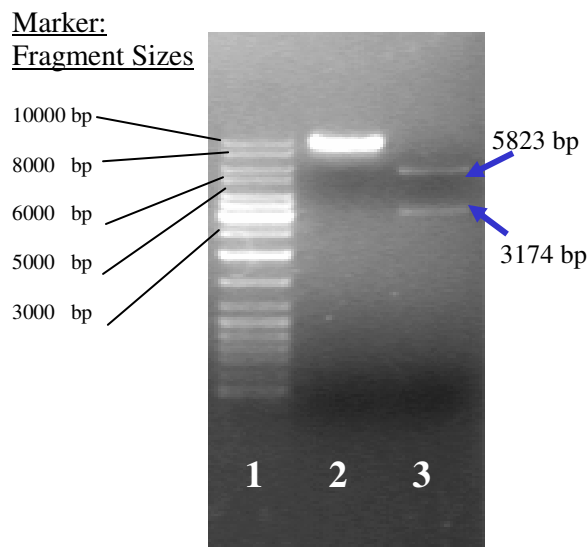


Abb. 13 Analytische Agaraosegelelektrophorese zur Ligationskontrolle

In der 4. und 9. Spur sieht man eine deutliche Bande ca auf Höhe der 6000 bps Bande des Markers. Außerdem fällt in diesen beiden Bahnen das Fehlen der ursprünglichen Plasmidbande auf.

Spur 1: Marker, Spur 2-14: Minipräparationen von Bakterienkolonien nach Transformation des Ligationsproduktes (Insert: ORF2, Vektor: pIRES EGFP), Spur 15: Vektor pIRES –EGFP.

Es erfolgte eine Kontrolle des Ligationsproduktes in Hinblick auf die Insertorientierung. Dies erfolgt wiederum mit einem Restriktionsenzymverdau. Anhand der Genkarte erkennt man, daß bei einer richtigen Orientierung des Inserts ein Verdau mit Xho I zwei Fragmente von 3174 und 5823 bp ergibt.



**Abb. 14 Analytische
Agarosegelelektrophorese zur Suche
positiver Klone**

Das Gel zeigt bei der ersten Probe eine Bande, die der Größe des linearisierten Vektors entspricht. Der Verdau des zweiten Produktes zeigt die gewünschten Banden von ca. 3000 und 6000 Basenpaaren.

Spur 1: 5 µl Marker, Spur 2: 1. positives Ligationsprodukt nach Xho I-Verdau, 2. positives Ligationsprodukt, Xho I geschnitten

Im weiteren Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, daß sowohl Vektor als auch Insert nicht mit dem Enzym Cla I geschnitten wurden, daher erfolgte eine Sequenzierung des Ligationsproduktes pORF2 IRES-EGFP. Es zeigten sich hier leichte Variationen, die jedoch für die weiteren Schritte keine Relevanz hatten.

Mit diesem Konstrukt ist es also möglich, später eine Virusexpression unter dem Mikroskop zu erkennen

Als nächster Klonierungsschritt wurde das pORF2IRES-EGFP Konstrukt in den shuttle Vektor p mAdcos 4 einkloniert. In diesen Vektor musste davor jedoch noch ein CMV-Promoter einkloniert werden.

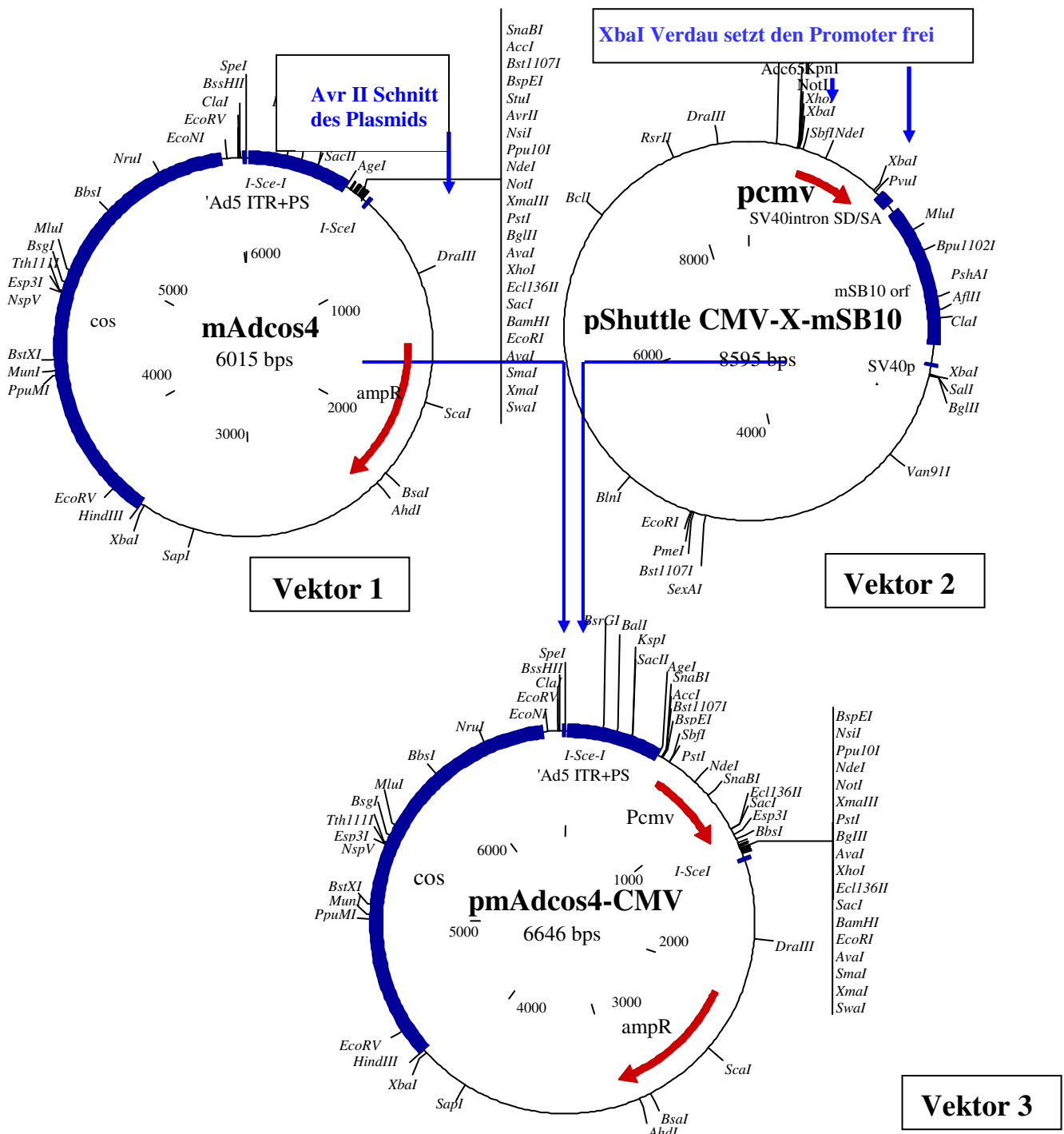
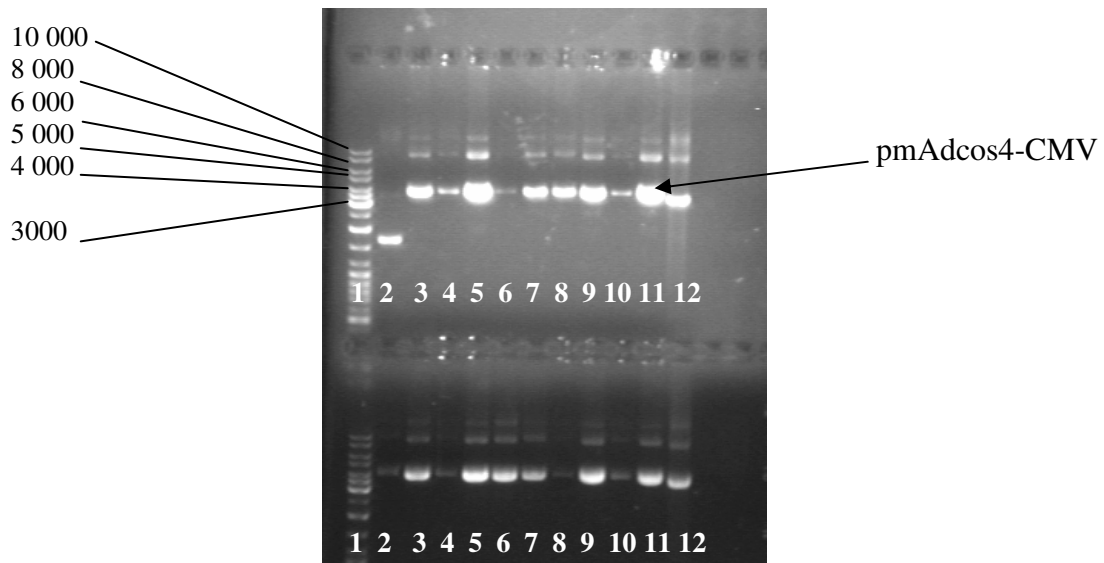


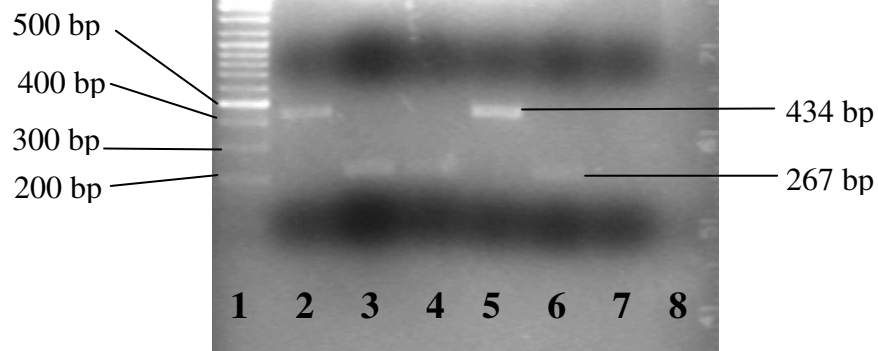
Abb. 15 2. Klonierungsschritt

Vektor 1: pmAdcos 4, wurde mit Avr II linearisiert und in Agarosegel kontrolliert. Vektor 2: pShuttle CMV-X-mSB10, nach Verdau mit XbaI erhielt man drei Fragmente, nach Auftrennung der Fragmente im Agarosegel wurde der 635 bp große CMV-Promoter ausgeschnitten und gereinigt. Anschließend wurden die Fragmente wie beschrieben ligiert.

Fragment Sizes in bp**Abb. 16 Analytische Agarosegelelektrophorese zur Ligationskontrolle**

Man sieht, daß die Banden der Spuren 2-11 bis auf Spur 2 der oberen Reihe und die Bande 12 unterschiedlich weit gelaufen sind. Im Vergleich mit dem Marker entspricht dieser Unterschied etwa 600 bp, dem CMV-Promoter. Oben und unten Spur 1: Marker, Spur 2-11: Minipräparationen der Kolonien nach Transformation des Ligationsproduktes, Spur 12: backbone pmAdcos 4

Anhand des Agarosegels wurden die saubersten und am höchsten konzentrierten Proben zur Weiterbearbeitung ausgesucht. Auch hier wurde die Orientierung des Inserts kontrolliert. Bei richtiger Orientierung muss bei einem Nde I-Verdau die kleinere der zwei entstehenden Banden 434 bp und nicht 267 bp aufweisen.

Fragment Sizes**Abb. 17 2,0% Analytisches Agarosegel zum Testrestriktionsverdau**

In Spur 2 und 5 sieht man eine 434 bp große Bande, es handelt sich hier also um die gewünschten Produkte, die anderen Klone weisen eine falsche Insertorientierung auf.

Spur 1: Marker, Spur 2-7 pCMVmAdcos4-Klonierungsprodukte, Nde I geschnitten, Spur 8: backbone pmAdcos 4

Das ORF2 IRES-EGFP Fragment wurde als Insert in den pCMV-mAdcos4 Vektor inkloniert. Dazu wurden sowohl der Vektor als auch das Insert mit dem Enzym Xho I geschnitten. Das Plasmid pORF2-IRES-EGFP wies zwei Schnittstellen auf und wurde durch das Enzym in zwei Fragmente unterteilt, von denen das gewünschte ca. 6000 bp große Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung ausgeschnitten und gereinigt wurde.

Die für die Ligation notwendige Linearisierung des pCMV-mAdcos 4 Plasmid wurde durch einen Schnitt des Enzyms Xho I, für das das Plasmid nur eine Schnittstelle aufwies, erreicht. Die erfolgreiche Linearisierung wurde ebenfalls anhand einer Gelelektrophorese kontrolliert. Um eine Religation des Vektors zu vermeiden, wurde in Anschluß des Verdau eine Dephosphorylierung durch die Alkalische Phosphatase CIP durchgeführt. Die Ligation erfolgte wie beschrieben. Die Transformation des knapp 13 000 bp großen Ligationprodukt erwies sich als schwierig. Die Kolonienanzahl auf den Agarplatten war stets gering. Nach erfolgreicher Ligation und Transformation mußte die korrekte Orientierung des Inserts mittels Testverdau kontrolliert werden.

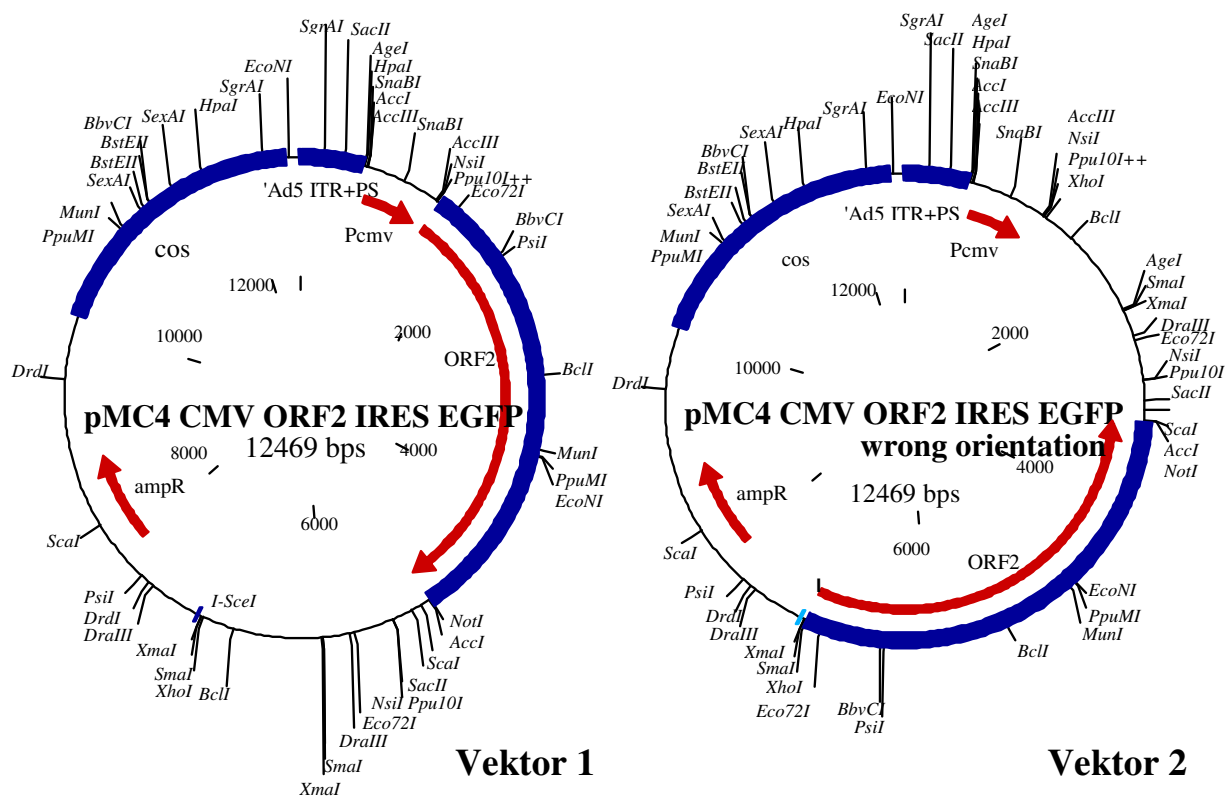


Abb. 18 Genkarten der Klonierungsprodukte

Vektor 1 zeigt die gewünschte, Vektor 2 hingegen die falsche Orientierung des Inserts. Zur Kontrolle der Orientierung konnte nach erfolgreicher Transformation und Präparation des Ligationproduktes ein Kontrollverdau durchgeführt werden. Dazu wurde hier mit dem Enzym Not I inkubiert, das in dem Vektor zwei Schnittstellen hatte. Bei der richtigen Orientierung ergeben sich dann zwei Fragmente von 3850 und 8619 Basenpaaren. Das Plasmid mit falschorientiertem Insert

wird durch einen Not I -Verdau in zwei Fragmente a 2003 und 10466 Basenpaaren geschnitten werden. Die Beurteilung der Fragmente erfolgte nach Auftrennung in einem Agarosegel.

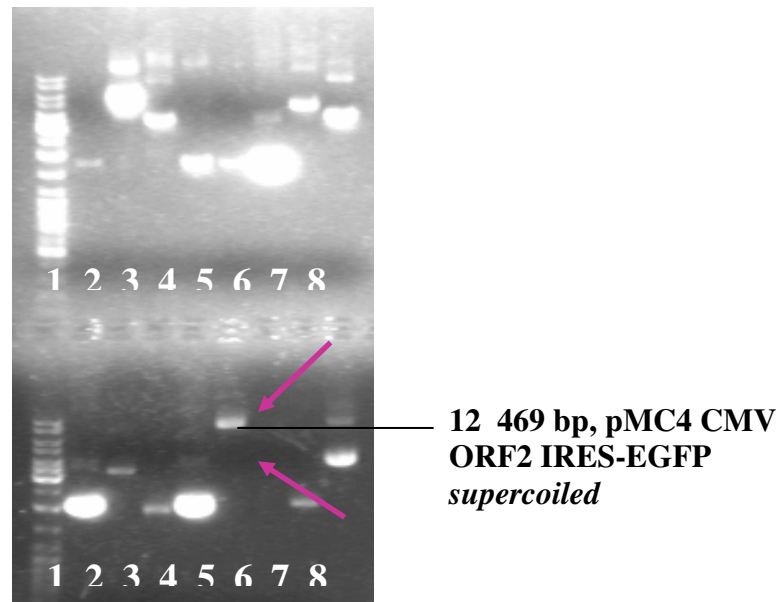


Abb. 19 Analytische Agarosegelelektrophorese zur Ligationskontrolle

In Spur 6 der unteren Reihe erscheint eine in den übrigen Bahnen nicht vorhandene Bande. Gleichzeitig verschwindet hier die Bande des backbones. Hier liegt somit das erwünschte Ligationsprodukt von 12 469 bp vor. Die übrigen Proben sind keine erfolgreichen Klone.

Für die obere und untere Gelhälfte gilt: Spur 1: 5 µl Marker, Spur 2-7: pMC4 CMV ORF2 IRES-EGFP-Ligationsprodukte, Spur 8: backbone pCMVmAdcos 4, ungeschnitten

Um die Orientierung des Inserts bei dieser erfolgreichen Klonierung zu überprüfen, schloss sich ein Not I-Testverdau an. Die Kontrolle der Fragmentgrößen erfolgte mittels Gelelektrophorese. Bei der richtigen Orientierung ergeben sich dann zwei Fragmente von 3850 und 8619 Basenpaaren. Das Plasmid mit falschorientiertem Insert würde durch einen Not I -Verdau in zwei Fragmente von 2003 und 10466 Basenpaaren geschnitten werden.

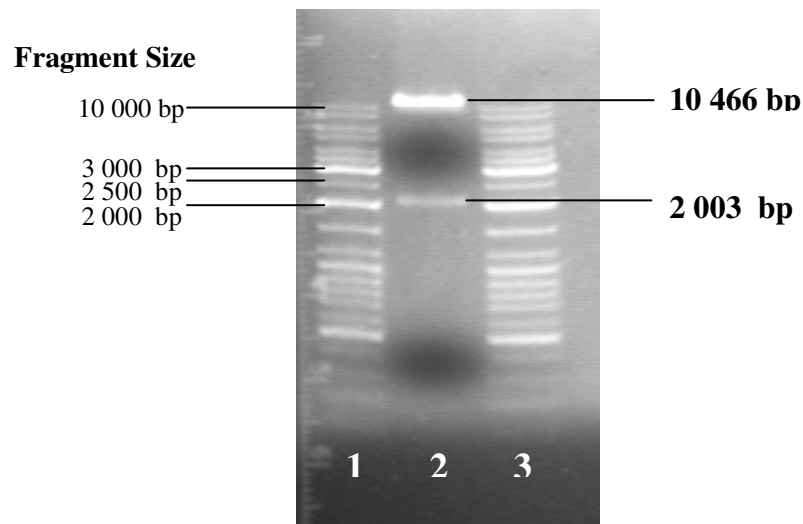


Abb. 20 Analytische Agarosegelelektrophorese zur Fragmentkontrolle

Man erkennt zwei Banden von 2003 und 10 466 Basenpaaren. Es handelt sich damit um die falsche Orientierung des Inserts.

Spur 1: 5 µl Marker, Spur 2: 20 µl Not I-Verdau des positiven Klons, Spur 3: 5 µl Marker

Da sich die Klonierung des ORF2 IRES-EGFP-Konstruktes als sehr schwierig herausstellte, wurden zur Kontrolle des Vektors mehrere Testverdau mit 4- und 6-*cuttern* durchgeführt. Hier ergaben sich jedoch keine von den anhand der Vektorkarten berechneten Erwartungen abweichende Auffälligkeiten. Weiterhin wurde zur Kontrolle der Intaktheit des Zwischenklonierungsprodukt pORF2 IRES-EGFP eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, um einerseits die Überexpression des ORF2 nachzuweisen und andererseits die Eigenfluoreszenz des IRES-EGFP-Konstruktes zu überprüfen, denn die Expression dieses grünfluoreszierenden Proteins erleichtert später das Erkennen einer erfolgreichen Virusexpression.

Mit dieser Immunfluoreszenz sollte die Funktionsfähigkeit des Vektors überprüft werden. Die Färbung wurde in Huh7-Zellen 48 Std nach Transfektion mit dem Fugene-Reagenz durchgeführt.

4.3 Immunfluoreszenzfärbungen in Zellkultur

4.3.1 Immunfluoreszenzfärbung von Huh7-Zellen

48 Stunden nach Transfektion von pORF2 IRES-EGFP

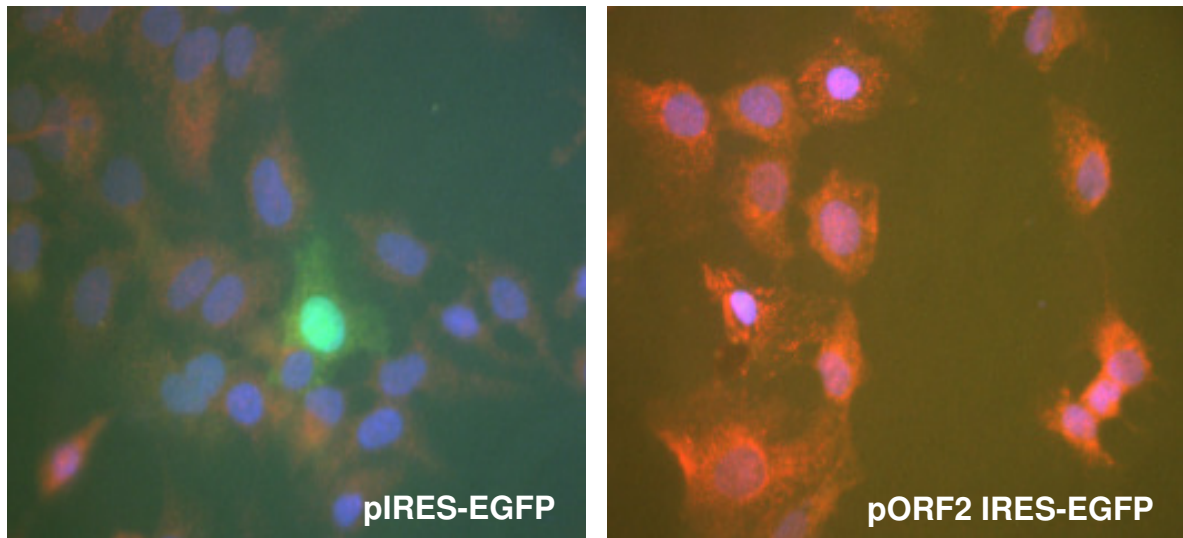


Abb. 21 Immunfluoreszenzfärbung transfizierter Huh7-Zellen

In der linken Abbildung erkennt man die EGFP-Expression. Rechts sieht man die ORF2-Überexpression bei gleicher Belichtungszeit der Aufnahmen. Hier fehlt allerdings eine Expression des IRES-EGFP. Auch in dieser Immunfluoreszenz stellt sich ein intaktes Konstrukt dar, es gibt kein Anhalt für einen Fehler, der die schwere Klonierbarkeit erklären könnte.

Bis hierhin wurden mit dem oben aufgeführten Konstrukten die Grundlagen eines adenoviralen Vektors geschaffen. Um die aufwendigen Produktionsbedingungen zu optimieren, wurde ab diesem Zeitpunkt der Schwerpunkt der Arbeit auf den Versuch, eine Methode der nichtviralen Überexpression mit hoher Effizienz und eine optimale Darstellungsmethode des ORF2 zu etablieren, gelegt.

Überexpression des ORF 2 mit dem Plasmid pORF2 IRES EGFP

Um eine möglichst effiziente Überexpression des ORF2 zu erreichen, wurden verschiedene Transfektionsreagenzien sowie unterschiedliche Zelllinien getestet. Anfangs wurde eine immunhistochemische Färbung in Fugene-transfizierten 293-Zellen durchgeführt. Die Färbung erfolgte nach dem vorne beschriebenen Protokoll.

4.3.2 Immunhistochemische Färbung in transfizierten 293 Zellen

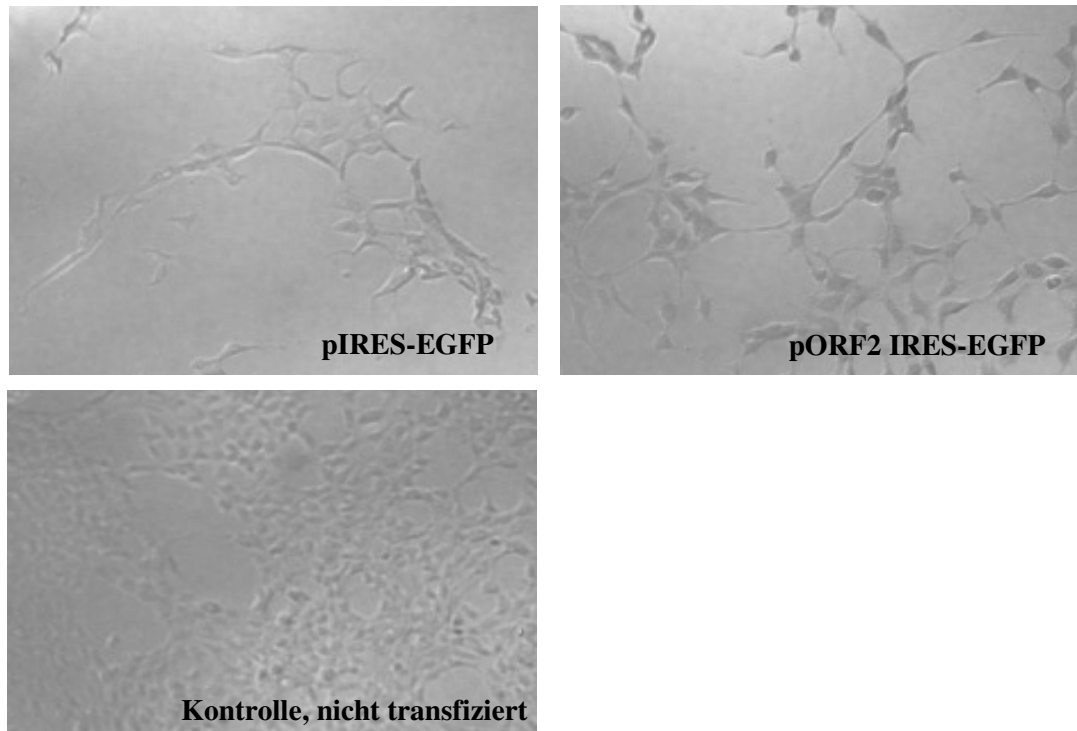


Abb. 22 Immunhistochemische Färbung von pJM101RP transfizierten 293-Zellen

Bei den mit dem Plasmid pORF2IRES-EGFP transfizierten Zellen erkennt man im Vergleich mit den Kontrollen eine Überexpression des ORF2.

Die immunhistochemische Färbung zeigte eine gegenüber den Kontrollen erhöhte ORF2-Expression in den pJM101RP transfizierten Zellen.

Durch Optimierung des Protokolls der in Abb.10 gezeigten Immunfluoreszenzfärbung des ORF2 gelang die präzisere Darstellung, so dass zur Beurteilung der ORF2-Expression im folgendem die Immunfluoreszenzfärbung erfolgt.

4.3.3 Optimierung der ORF2 Überexpression

4.3.3.1 Transfektion verschiedener Zelllinien

Zur Etablierung einer effizienten Überexpression des ORF2, um die Effekte des ORF2 auf die Angiogeneseaktivität zu untersuchen, mußte eine Zelllinie ausgewählt werden, die sich mit nicht-viralen Transfektionreagenzien gut transfizieren ließ. Dazu wurden verschiedene Zelllinien mit einem GFP-Plasmid transfiziert. Verwendet wurde das Fugene-

Transfektionsreagenz, 48 Stunden nach Transfektion wurde die Expressionsrate im Mikroskop kontrolliert.

GFP-Transfektion verschiedener Zelltypen

Jeweils 48 Stunden nach Transfektion

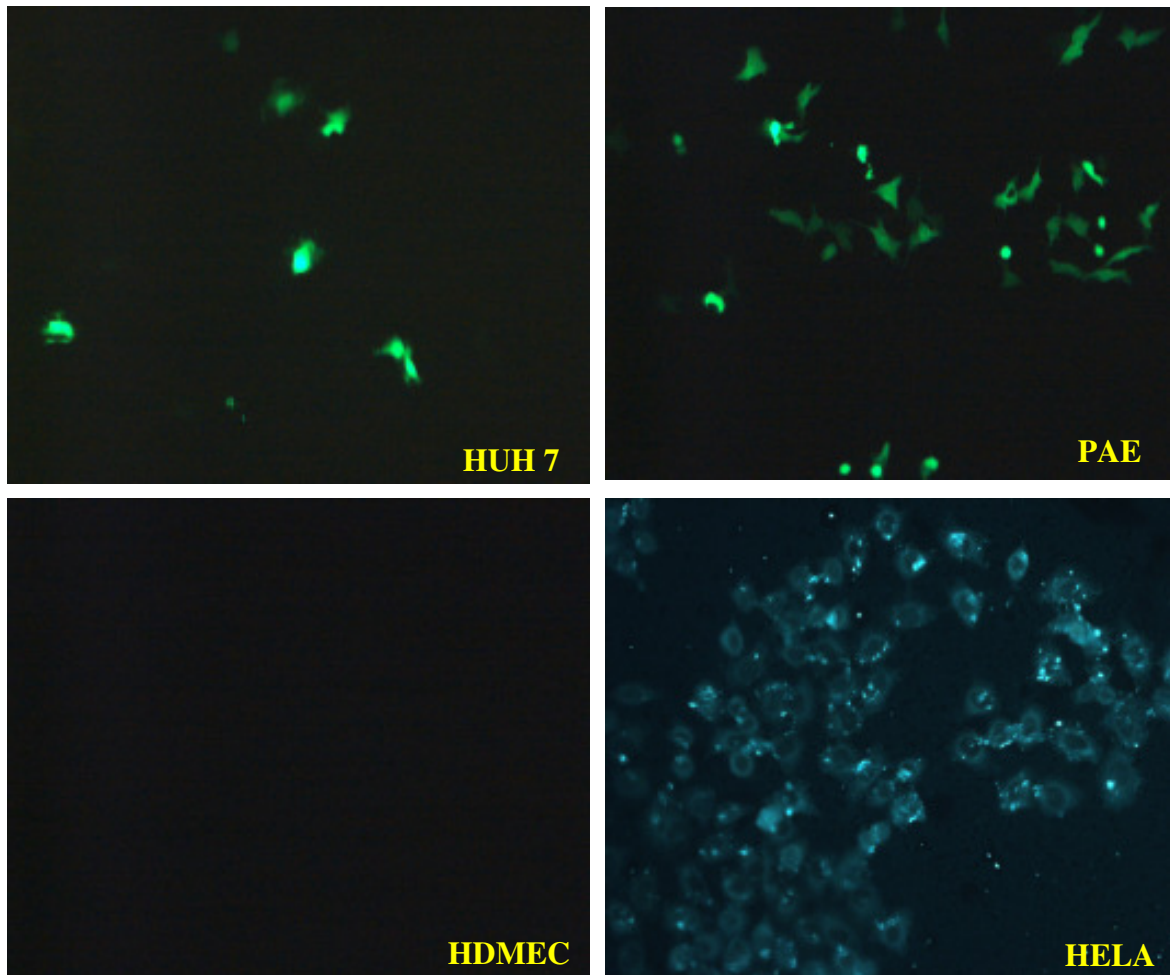


Abb. 23 GFP-Expression unterschiedlicher Zelltypen 48 Std nach Fugene-Transfektion

Man sieht einen sehr guten Erfolg der Transfektion bei den Hela-Zellen. Geringer fällt die GFP-Expressionsrate bei den PAE- und Huh7-Zellen aus. Wie im Vorfeld der Arbeit schon beobachtet, lassen sich die primären Endothelzellen HDMEC nicht mit diesem Transfektionsreagenz transfizieren.

Um den Einfluß der LINE1-Retrotransposons auf die Angiogenese und damit auf die Endothelzellen zu untersuchen, wurden die PAE-Zellen als arterielle Schweineendothelzellen für die weiteren Versuche ausgewählt. Von den zur Verfügung stehenden Zellen repräsentieren diese am ehesten die Verhältnisse im menschlichen

Organismus, da man davon ausgehen muß, daß Endothelzellen sich in ihrem Verhalten von anderen Zelltypen deutlich unterscheiden.

Zunächst wurde die Transfektion optimiert. Aus dem Vergleich unterschiedlicher Bedingungen ging die unten aufgeführte Methode hervor.

4.3.3.2 GFP-Expression mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien

48 h nach Transfektion

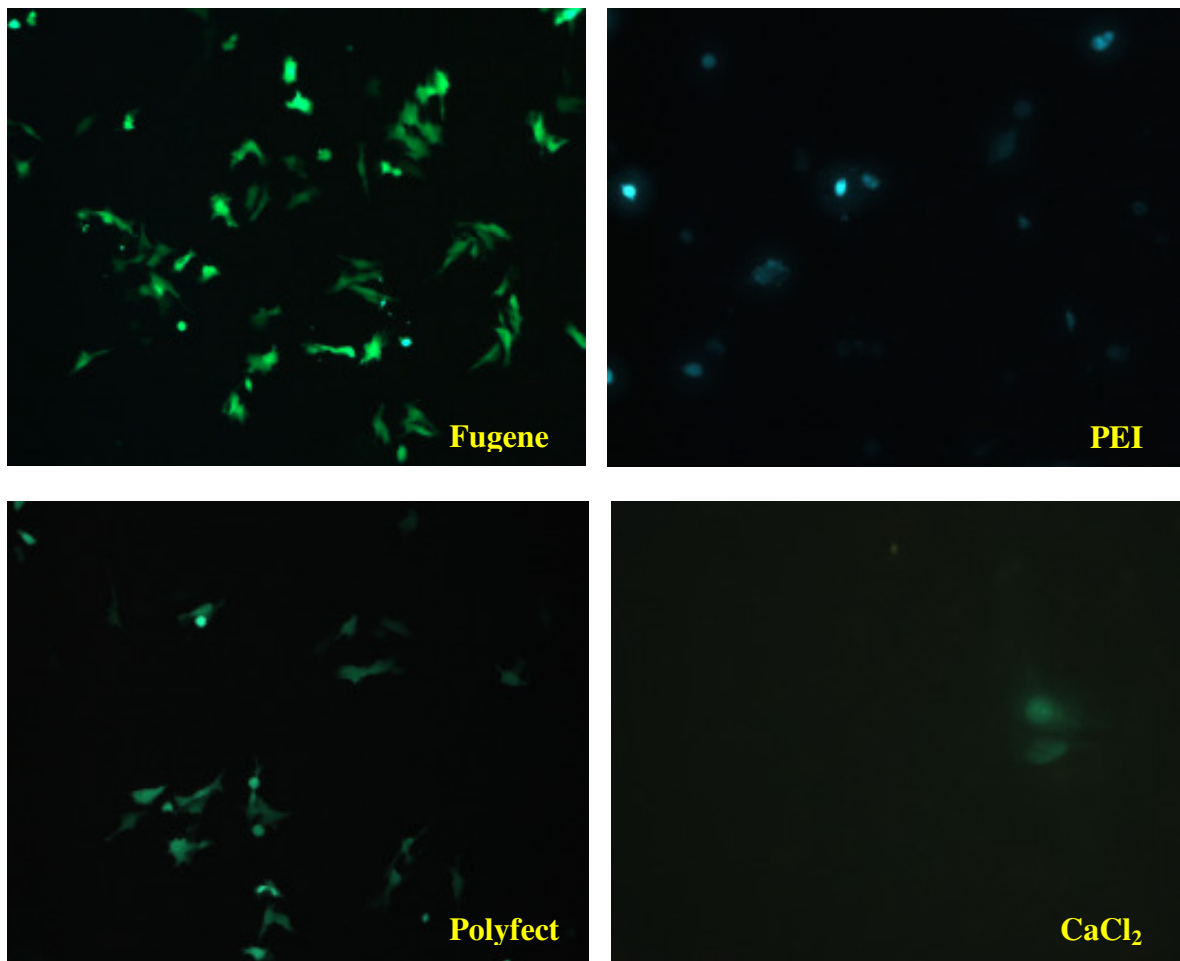


Abb. 24 Transfektion von PAE-Zellen mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien

Man erkennt, daß die beste Transfektionseffizienz in PAE-Zellen nach Transfektion mit dem Fugene-Reagenz erreicht wird. Für die weiteren Versuche wird für die Transfektion von PAE-Zellen daher Fugene verwendet.

Nachdem nun für die weiteren ORF2-Überexpressionsversuche mit PAE-Zellen die Zelllinie und mit dem Fugene-Reagenz das Transfektionsreagenz feststand, mußte nun noch der beste Zeitpunkt der Expression nach der Transfektion gewählt werden. Dabei sollte das Maximum der Expression abgewartet werden, ohne daß die eintretenden

Degenerationserscheinungen in Form von Artefakten die Ergebnisse verfälschten. Um die zeitliche Entwicklung der ORF2 Expression nach Transfektion besser abschätzen zu können, wurde ein *time-course* erstellt. Dazu wurden Zellen wie beschrieben transfiziert und der GFP-Expressionsverlauf wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Die Entwicklung von zytopathischen Effekten durch die Transfektionsreagenzien wurde zusätzlich lichtmikroskopisch kontrolliert.

4.3.3.3 GFP-Transfektion von PAE-Zellen mit Fugene, *time course*

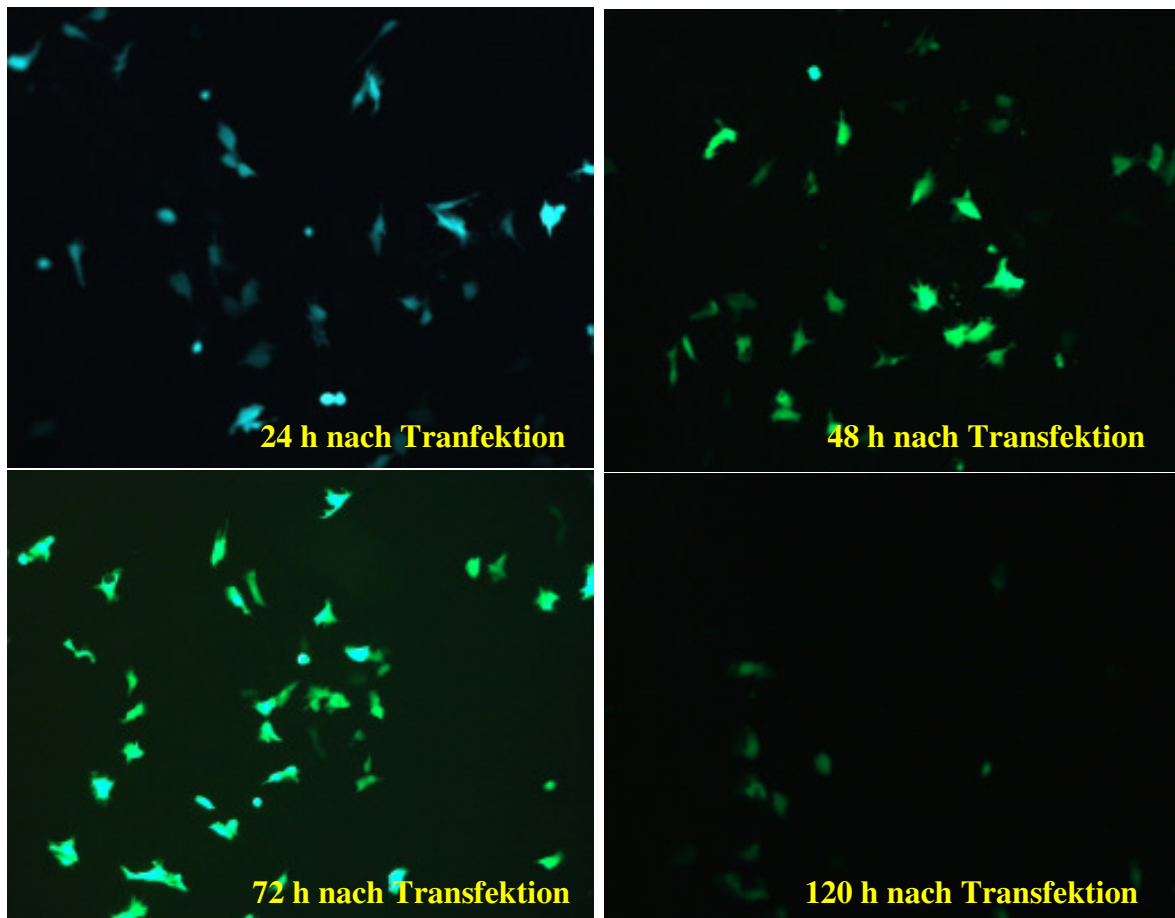


Abb. 25 Zeitverlauf der GFP-Expression in PAE-Zellen nach Fugene-Transfektion

Der Zeitverlauf zeigt eine schwache GFP-Expression 24 Stunden nach der Transfektion, die nach 48 Stunden schon sehr viel deutlicher ist. Auch das GFP-Konzentrationslevel der einzelnen Zelle steigt während dieser Zeit weiter an. Zwar steigt nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden die Rate der transfizierten Zellen weiter an, die degenerativen Prozesse und Artefakte nehmen jedoch ebenfalls stark zu. Nach 120 Stunden kommt es vermehrt zum Absterben der Zellen sowie zur Degeneration des Farbstoffes. Somit wird eine Inkubationszeit von 48 Stunden für weitere Versuche als Optimum gewählt.

Nach der Optimierung der Transfektionsbedingungen wurden die nachfolgenden Versuche zur Überexprimierung und Darstellung des ORF2 mit Fugene-Reagenz in PAE-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden dazu mit pJM101RP transfiziert. Als Kontrollen dienten zum einen nichttransfizierte Zellen, zum anderen pCEP4 transfizierte Zellen. PCEP4 stellt das *backbone* des pJM101RP Vektors dar und dient als Negativkontrolle.

4.3.4 Transfektion von pJM101RP in PAE-Zellen

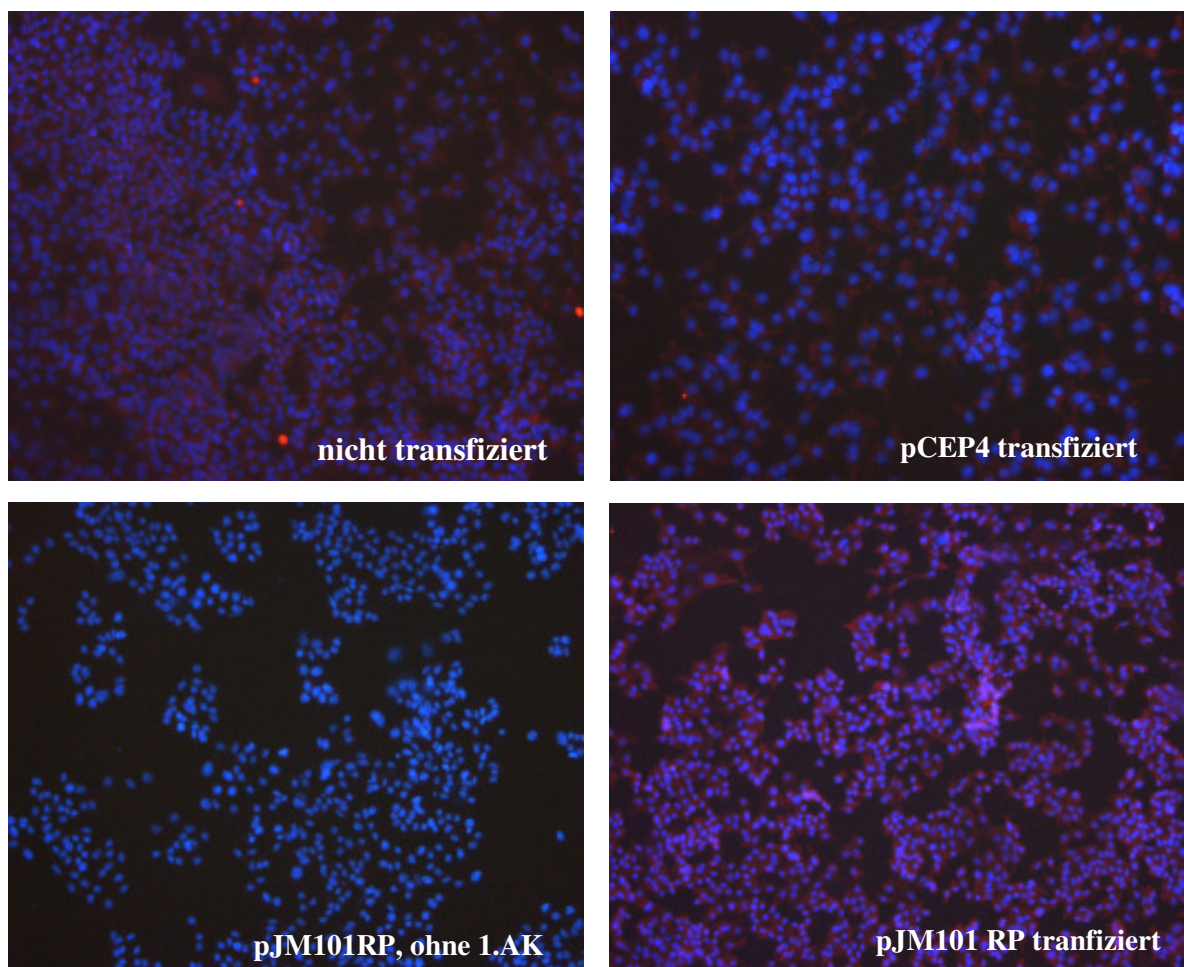


Abb. 26 Immunfluoreszenzfärbung nach pJM101RP-Transfektion, 100-fache Vergrößerung
Oben links: 1. Kontrolle, nicht transfizierte PAE-Zellen; oben rechts: 2. Kontrolle PAE-Zellen, mit dem Plasmid pCEP4 transfiziert; unten links 3. Kontrolle: PAE-Zellen mit pJM101RP transfiziert, Immunfluoreszenzfärbung erfolgte hier ohne 1. Antikörper; unten rechts: PAE-Zellen, normale Immunfluoreszenzfärbung. Alle Kontrollen unterlagen in der Vorbereitung der Zellen, während der Transfektion und der Immunfärbung der gleichen Behandlung wie die Positivkontrolle. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden bei gleicher Belichtungsdauer aufgenommen. Man erkennt hier gegenüber den Negativkontrollen eine sehr deutlich Überexpression von ORF2 in den pJM101Rp transfizierten Zellen

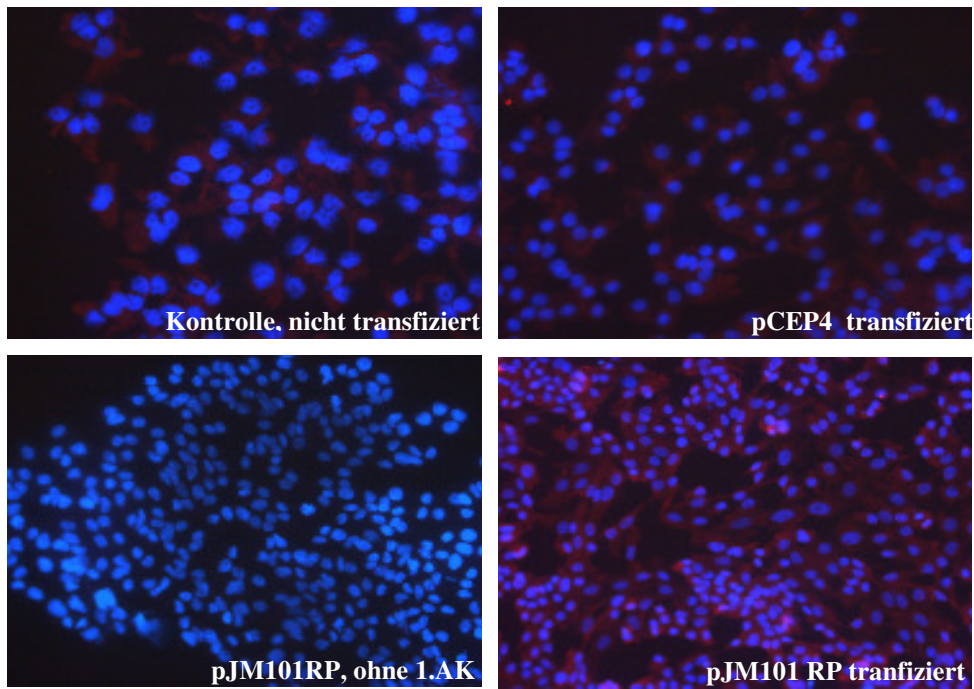
Transfektion von pJM101RP in PAE-Zellen

Abb. 27 Immunfluoreszenzfärbung nach pJM101RP-Transfektion
Wie Abbildung 26, Aufnahmen mit 630-facher Vergrößerung

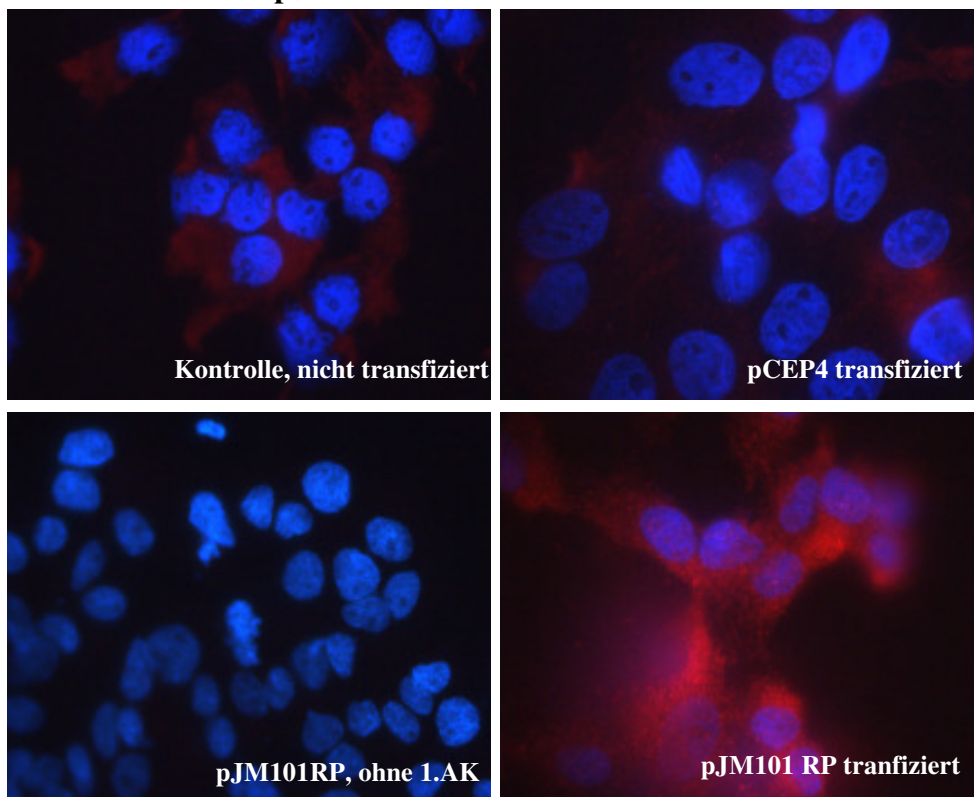
Transfektion von pJM101RP in PAE-Zellen

Abb. 28 Immunfluoreszenzfärbung nach pJM101RP-Transfektion, 1000-fache Vergröß.

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden 48 Stunden nach der Transfektion durchgeführt, Alle Kontrollen unterlagen in der Vorbereitung der Zellen, während der Transfektion und der Immunfärbung der gleichen Behandlung wie die Positivkontrolle. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden bei gleicher Belichtungsdauer aufgenommen

Nach der Optimierung der Transfektionsbedingungen zeigte sich in diesen Immunfluoreszenzfärbungen der pJM101RP transfizierten PAE-Zellen ein deutlich höheres Expressionslevel des ORF2 gegenüber sämtlich durchgeführten Kontrollen. Die Spezifität der Färbung für den ORF2 konnte so gezeigt werden.

Die Hintergrundfärbung der nichttransfizierten und pCEP4 transfizierten Zellen zeigt die endogene physiologische ORF2 Expression.

Somit konnte erstmalig der ORF2 durch Immunfluoreszenz dargestellt und nach Aufstellung eines effizienten Transfektionsprotokolls überexprimiert werden.

4.3.5 Konfokale Lokalisation des ORF 2

Die konfokale Mikroskopie ermöglicht es, sehr präzise Schichtaufnahmen eines Präperates anzufertigen, in dem das Präparat Punkt für Punkt und Schicht für Schicht abgerastert wird. Damit wird es möglich, die Expression eines Proteins sehr exakt zu lokalisieren.

Wie bereits beschrieben bestehen schon seit einiger Zeit an der vielfältigen Beeinflussung des menschlichen Genoms durch die L1 Retrotransposons keine Zweifel. Jedoch konnte noch nicht geklärt werden, wie und wo dieser Eingriff in das Genom genau stattfindet. Zur exakteren intrazellulären Lokalisation des ORF2 erfolgte die konfokale Mikroskopie pJM101RP transfizierter PAE-Zellen.

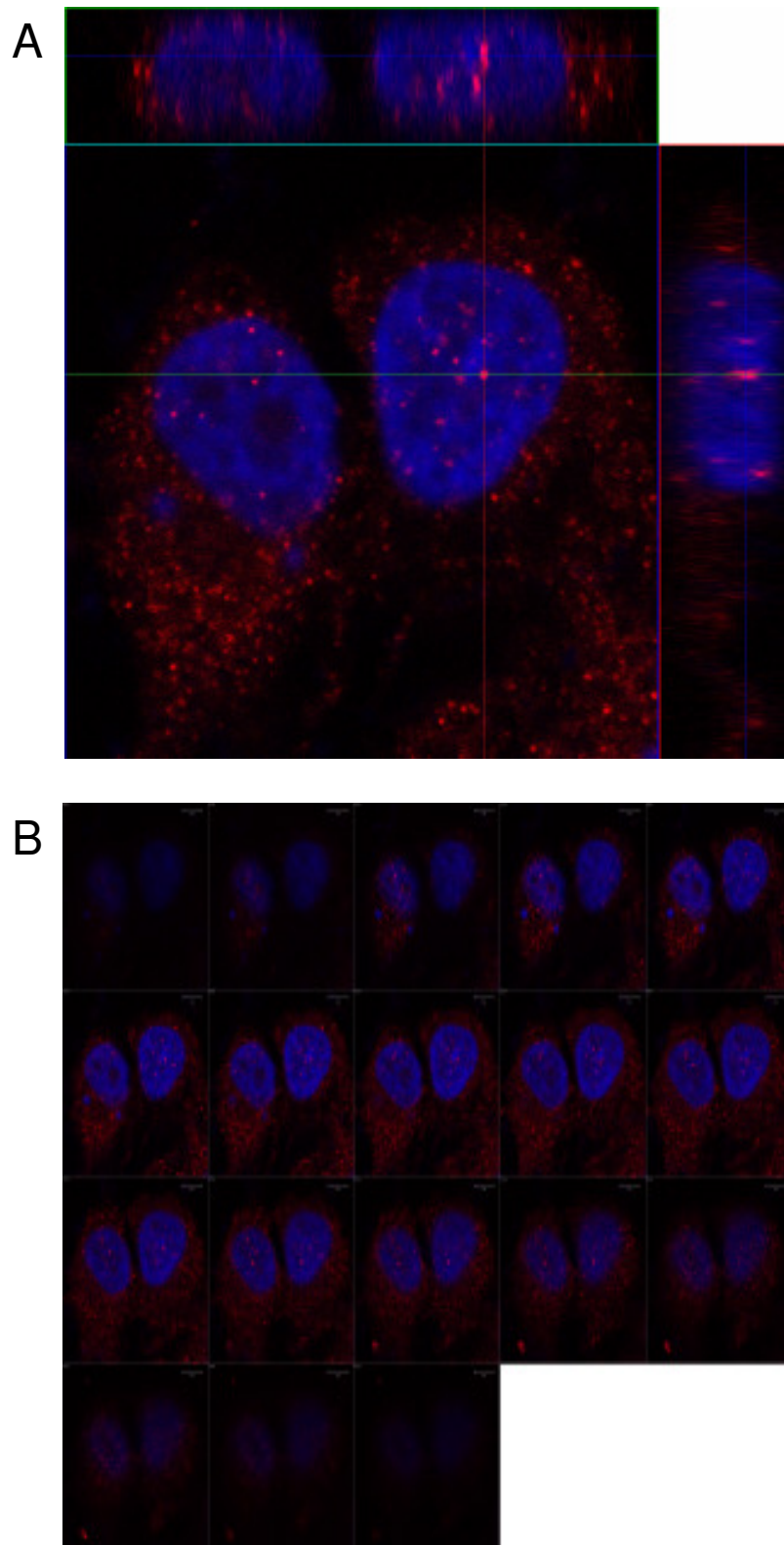


Abb. 29 A+B Konfokale Lokalisation des ORF2 in transfizierten PAE-Zellen
A Ausschnitt B Übersicht

Für die konfokale Mikroskopie wurden die Zellen mit pJM101RP und Fugene-Reagenz transfiziert und nach 48 Stunden immunfluoreszenzgefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem konfokalem Mikroskop betrachtet. Man erkennt sowohl im Dapigefärbten Kern als auch im Zytoplasma eine Expression des ORF 2.

Die konfokale Mikroskopie pJM101RP transfizierter Zellen zeigt die fokale Darstellung des ORF2 sowohl zytoplasmatisch als auch im Nukleus der Zellen.

4.3.6 ORF2 Expression in primären Endothelzellen (HDMEC) unter Wachstumsfaktorstimulation

Der Ausgangspunkt für die Vermutung, daß L1 Retrotransposons einen Einfluß auf die Angiogeneseaktivität haben könnten, war die Beobachtung, daß in reifen inaktiven Zellen das ORF-2 Expressionslevel sehr hoch ist. Dahingegen geht die ORF2-Expression während der angiogenen Aktivität stark zurück. Durch Stimulation mit unterschiedlich hoch konzentrierten Wachstumsfaktoren (VEGF, FGF) sollte nun eine solche Angiogeneseaktivität der Endothelzellen imitiert werden und gleichzeitig die Auswirkung auf die ORF2 Expression beobachtet werden.

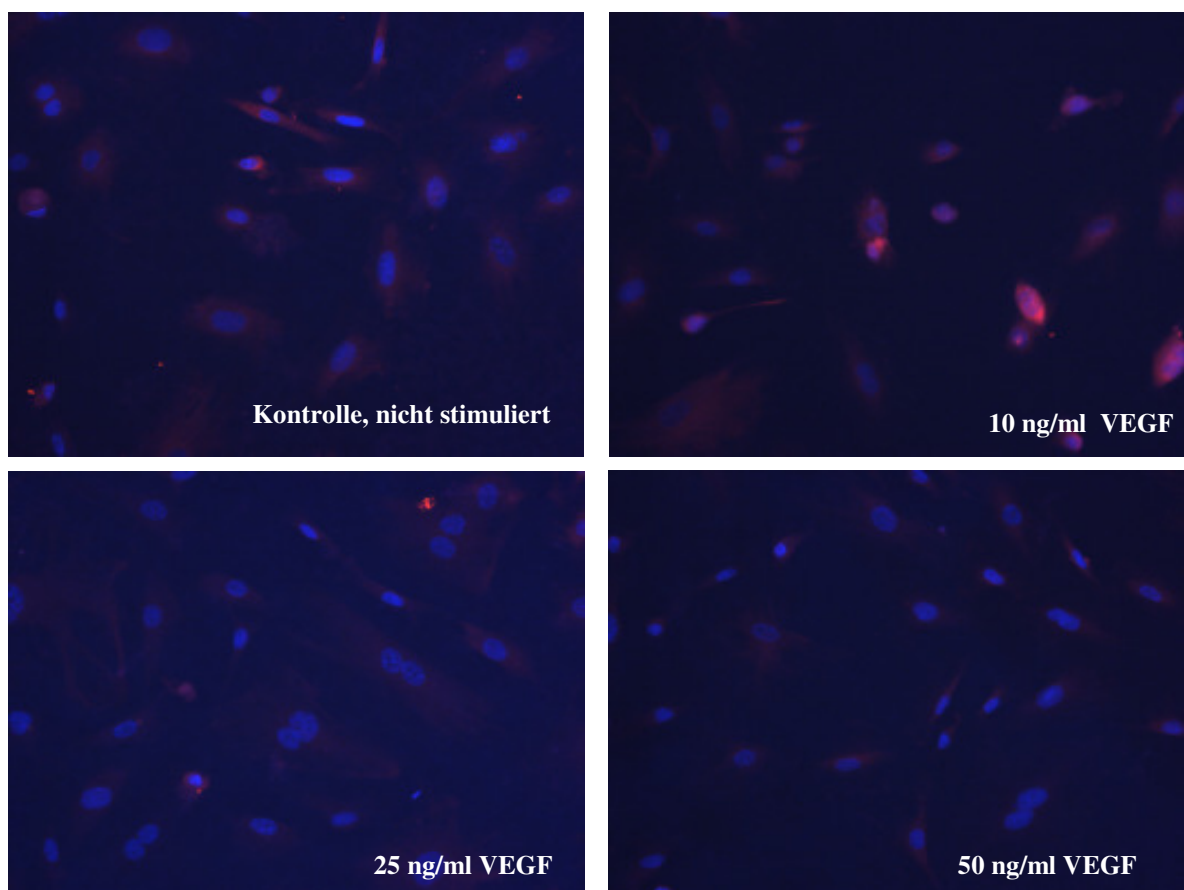


Abb. 30 ORF2 Expression in primären Endothelzellen (HDMEC) unter VEGF-Stimulation

Für diesen Stimulationsversuch wurden ausgesäte HDMEC-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an VEGF inkubiert und im Anschluß immunfluoreszenzgefärbt (primärer Antikörper: L1Enig γ). So wurde der Einfluß der Wachstumsfaktoren auf die ORF2-Expression untersucht. Man erkennt in der nicht stimulierten Kontrolle die niedrige physiologische Basis-

ORF2-Expression. Bei Stimulation mit einer sehr geringen VEGF-Konzentration bleibt diese bestehen, ist jedoch bei Stimulation mit höheren Konzentrationen rückläufig.

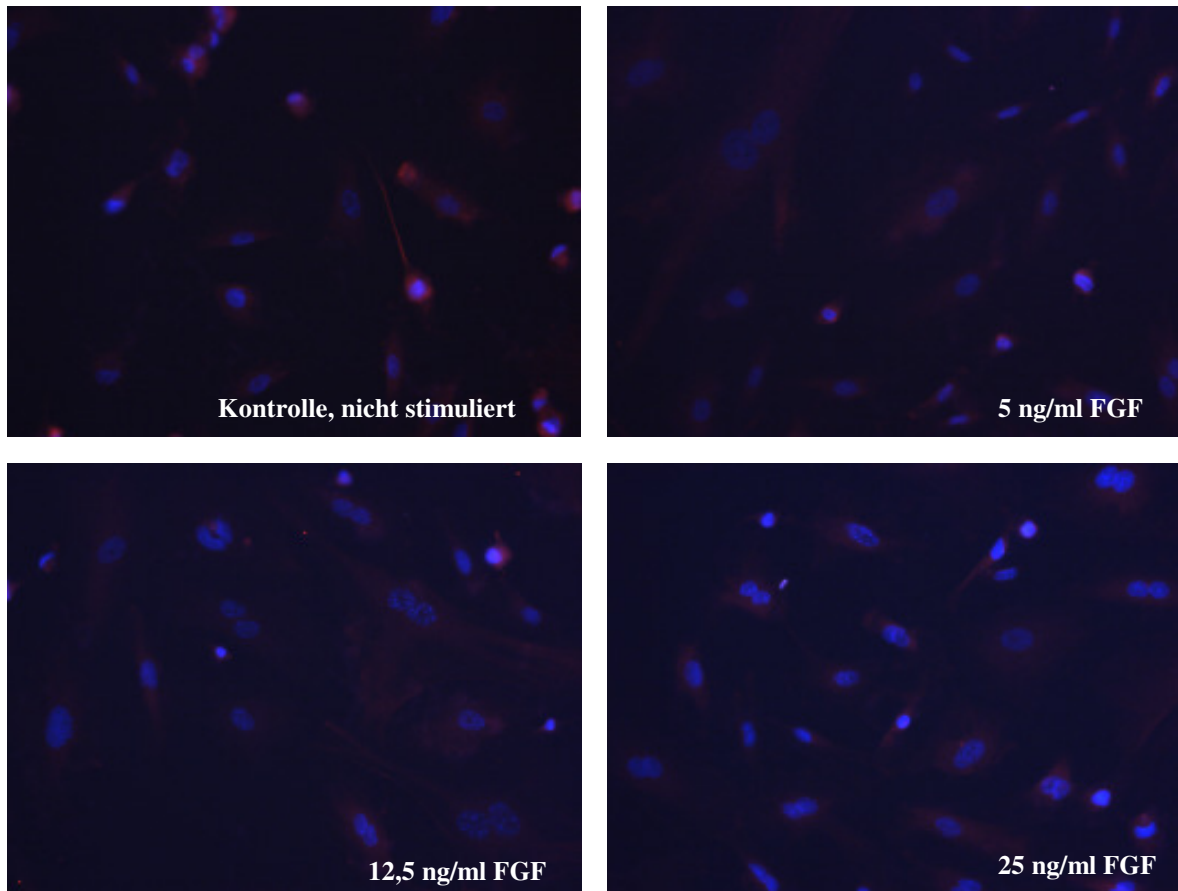


Abb. 31 ORF2 Expression in primären Endothelzellen (HDMEC) unter FGF-Stimulation s.b. auch Abbildung 17. Hier erkennt man die physiologische ORF 2-Expression in der nicht stimulierten Kontrolle, in den stimulierten Zellen ist eine schwächere ORF2-Färbung zu erkennen.

In den nicht stimulierten Zellen zeigt sich die endogene ORF2 Expression, unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren ist eine rückläufiges ORF2 Level zu beobachten. Niedrige Konzentrationen an VEGF/FGF haben keine Auswirkung auf die ORF2 Expression, mit ansteigender Konzentration der Wachstumsfaktoren sinkt die ORF2 Färbung.

4.4 Western Blot-Analysen

Um die ORF2 Expression zu untersuchen, wurden zusätzlich Western Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden Zellen mit den Plasmiden pORF2 IRES-EGFP sowie zur Kontrolle mit pIRES-EGFP transfiziert. Zum Einsatz kam hier das Fugene-Transfektionsreagenz. Um den Verlauf der Expression zu betrachten, wurden Zellen 1, 2, 3 und 4 Tage nach der Transfektion lysiert und eingefroren. Für die Analyse wurden die Zellen dann nach dem Auftauen homogenisiert und ihre Proteinkonzentration wurde definiert. Für den Western Blot wurden stets identische Proteinkonzentrationen von jeder Probe eingesetzt. Zum Nachweis des ORF2 wurden hier als primärer Antikörper L₁ Enig γ (1:250 Verdünnung in TBS-T) eingesetzt.

Trotz umfassender Versuche und Optimierung der Versuchsbedingungen konnten im Rahmen dieser Arbeit keine weitergehenden Informationen auf der Basis von Western-Blot-Analysen gewonnen werden.

4.5 RNS-Isolierung und RT-PCR

Für die RNS-Isolierung aus den transfizierten Zellen wurde das Trizol-Reagenz verwendet. Hier wurde wie beschrieben vorgegangen. Die isolierte RNS wurde dann vor der Verwendung zur reversen Transkription mittels Gelelektrophorese kontrolliert.

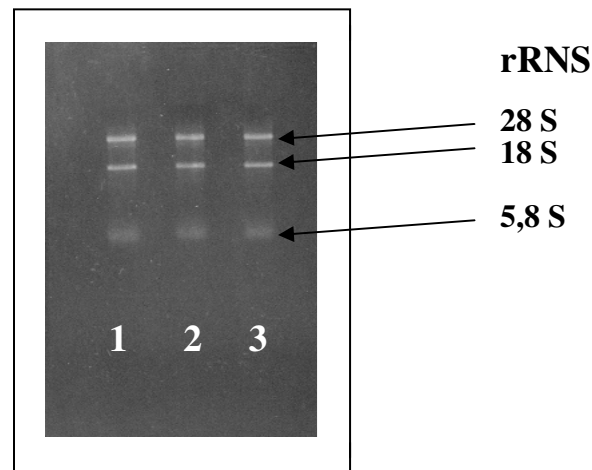


Abb. 32 Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle der RNS-Isolierung

Spur 1: wild type, RNS aus untransfizierten PAE Zellen, Spur 2: RNS aus pCEP4 transfizierten Zellen, Spur 3: RNS aus pJM101RP transfizierten Zellen, die RNS Isolierung war erfolgreich

Nach Kontrolle der RNS in der Gelelektrophorese erfolgt noch eine Quantifizierung und Reinheitskontrolle im Photometer. Die Konzentrationsbestimmung war wichtig für die anschließende reverse Transkription, die Reinheitskontrolle erfolgte durch Bildung des Quotienten der Extinktion bei 260 nm und der Extinktion bei 280 nm. Mit der kontrollierten RNS wurden die weiteren Schritte begonnen.

Für die RT-PCR schloss sich dann die reverse Transkription an, die mit dem You-Prime First-Strand cDNA synthesis Kit durchgeführt wurde.

Anschließend wurden die Proben für die reverse Transkription mit dem LightCycler System vorbereitet. Es sollte für den Wachstumsfaktor VEGF das Expressionsniveau auf RNS-Ebene ermittelt werden. Mit dieser Methode besteht also die Möglichkeit, sehr früh das Ansprechen der Wachstumsfaktoren auf eine ORF 2 Überexpression zu untersuchen.

Tab. 1 RT-PCR der transfizierten PAE-Zellen

	GAPDH	VEGF	VEGF/GAPDH
	$\times 10^{-8}$	$\times 10^{-8}$	$\times 10^{-2}$
PAE Wt	225	284	1,26
PAE pCEP4	193	300	1,55
PAE L1	74,7	119	1,59

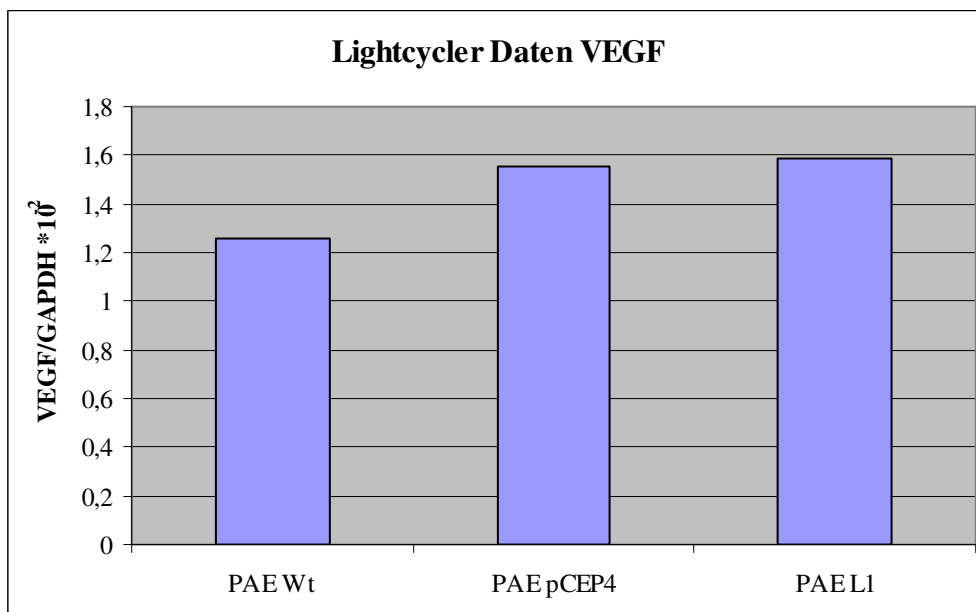


Abb. 33 Diagramm der RT-PCR Ergebnisse

Bei den mit pCEP4 und L1 transfizierten Zellen zeigt sich ein höheres VEGF RNS Level als bei den nicht-transfizierten Zellen. Die L1-transfizierten Zellen weisen gegenüber den pCEP4 transfizierten Zellen ein geringfügig erhöhtes VEGF Level auf.

Die RT-PCR zeigt ein erhöhtes VEGF-Level der transfizierten Zellen gegenüber den nicht transfizierten Zellen auf. Die L1 transfizierten Zellen zeigen eine leichte Erhöhung des VEGF gegenüber der pCEP4 transfizierten Zellen. In diesem Experiment ist die Tendenz ablesbar, dass L1 ORF2 die VEGF Transkription induziert.

5. Diskussion

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit bilden die L1 Retrotransposons, die mit den für ihre Mobilität erforderlichen Proteinen ORF1 und 2 als die größte Familie aktiver autonomer Retroelemente mindestens 17 % des menschlichen Genoms darstellen (80, 134). Durch genetische Variation haben sie eine wichtige Voraussetzung der Evolution geschaffen, scheinen jedoch auch schwerwiegende Konsequenzen in Form genetischer Erkrankungen sowie maligner Transformation zu haben und sind trotz des enormen Umfangs in ihrer Funktion bis zu dem heutigen Zeitpunkt wenig verstanden.

5.1 Identifikation des Untersuchungssystems

Ziel dieser Arbeit war es, erste Aspekte zur funktionellen Charakterisierung des ORF2 zu gewinnen. Die angestrebte Überexpression des ORF2 erforderte als ersten Schritt die Entwicklung eines geeigneten Gentransfersystems. Hier stehen grundsätzlich virale sowie nichtvirale Vektoren zur Verfügung, deren unterschiedliche Eigenschaften wie die Insertionskapazität, Transfektionseffizienz, Transgenstabilität, Zytotoxizität in transfizierten Zellen, Pathogenität/Immunogenität, Selektivität sowie eine kostengünstige Produzierbarkeit und Durchführbarkeit gegeneinander abzuwägen sind. Virale, insbesondere die adenoviralen (42, 55) Vektoren haben sich in der heutigen Gentherapie etabliert (84). Für unsere Fragestellung waren replikationsdefizite Adenovirus-5 Vektoren wünschenswert, mit denen in der Literatur Transfektionsraten von primären humanen Endothelzellen mit über 90 % (97) gegenüber den bisher niedrigen Raten nichtviraler Ansätze (95) gezeigt wurden.

Als Ausgangspunkt zur Identifikation des Untersuchungssystems wählten wir HDMEC (*human dermal microvascular endothelial cells*) als kultivierbare endotheliale Targetzellen und konnten mit diesen die in der Literatur beschriebenen guten adenoviralen Transfektionsraten bestätigen. Vielfältige Faktoren beeinflussen dabei die Virusinfektion einer Zelle, neben der Anzahl der Viruspartikel pro Zelle wurde z.B. für HUVEC- Zellen eine von der Zellkulturkonfluenz abhängige Expression des für die Adenovirusbindung verantwortlichen CAR- Rezeptors (23) beschrieben (19).

Als Quelle des ORF2 wurde das Plasmid pJM101 RP verwendet, dessen L1 Element dem 1999 von Kimberland ML u.a. klonierten L1 RP entspricht. Die Nucleotidsequenz entspricht zu 99,9 % der Sequenz der aktiven humanen LINE-Elemente und besitzt die Fähigkeit zu hochfrequenten Retrotranspositionsvorgängen in Helazellkultur (72). Da das L1-RP das aktivste und die natürlichen Verhältnissen am besten widerspiegelnde der bisher klonierten L1 Elemente ist (72), wurde es hier verwendet.

Die Vorbereitung des adenoviralen Vektors erfolgte bis zu dem vorne aufgeführten Konstrukt.

Parallel hierzu wurden nichtvirale Transfektionen mit Calciumphosphatpräzipitation (73), liposomalen, lipid- (92, Fugene(59)) und polymervermittelten (PEI, Polyfect) Verfahren als chemische sowie physikalische Methoden (Elektroporation (150)) durchgeführt. Die Effektivität nichtviraler Vektorsysteme wird durch vielfältige Faktoren, u.a. Eigenschaften des Transfektionsreagenz, insbesondere des DNS/Reagenzkomplexes sowie der Transfektionszeit (69, 148) und Interaktionen mit weiteren Komponenten (69) beeinflusst. Auch in der Literatur zeigen die unterschiedlichen Reagenzien in verschiedenen Protokollen eine erheblich variierende Transfektionseffizienz, so dass die Optimierung der Transfektionsbedingungen individuell erfolgen muß.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte Fugene die höchste Transfektionseffizienz, von den hiermit transfizierten Zellen zeigten HELA Zellen die höchste Transfektionsrate, gefolgt von PAE-Zellen und Huh7-Zellen (110). Da im Vordergrund der Arbeit die Auswirkung des ORF2s auf die Angiogenese und damit der Endothelzellen steht, wurden für die weiteren Versuche die PAE-Zellen ausgewählt. Diese Zelllinie ist als Modell für *in-vitro* Studien der Endothelzellfunktion geeignet (91), die Übertragung der Aussagen aus tierischen Zellen auf humane Verhältnisse muß jedoch kritisch überdacht werden. Als optimaler Zeitpunkt, um ein hohes Expressionslevel bei möglichst geringer Zelltoxizität zu erzielen, wurde für die weiteren Versuche 48 h nach der Transfektion festgelegt. Für PAE Zellen konnte somit ein gutes nichtvirales Transfektionssystem als Ausgangspunkt weiterer Versuche etabliert werden.

Wie in der Literatur beschrieben und in den Versuchen der Arbeit bestätigt, ließen sich primäre humane Endothelzellen (HDMEC) mit dieser Methode nicht effizient transfizieren

(140, 65, 71). Auch HBMEC (*human brain microvascular endothelial cells*) als eine andere primäre Zelllinie zeigten hier nach nichtviralem Gentransfer sehr niedrige Transfektionsraten sowie unter den Transfektionsreagenzien (PEI, Fugene) degenerative Zellveränderungen.

Für Versuche in diesen Zellen stehen weiterhin die Strategien des viralen Infektionsmodus auf der Basis des hier vorbereiteten Konstruktes im Vordergrund.

5.2 Subzelluläre Lokalisation des ORF2

Während ein zytoplasmatischer Nachweis des ORF1 Proteins in verschiedenen Zelltypen (151) gelang, konnte mangels eines geeigneten Antikörpers bisher weder *in vivo* noch *in vitro* das ORF2 Protein dargestellt und somit eine *in vivo* Translation als Grundlage biologischer Aktivität nicht bewiesen werden. Mit der Entwicklung des spezifischen L1EnIgy Antikörpers, der die Endonukleasendomäne des ORF2 erkennt, gelang im Vorfeld dieser Arbeit erstmalig die immunhistochemische Darstellung des ORF2 sowie die für die Retrotransposition erforderliche Koexpression beider Proteine (151).

Durch die hier optimierte Immunfluoreszenzfärbung, die eine sehr spezifische Färbung durch eine exakt auf die Antikörper abgestimmte Blockierlösung ermöglicht, konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die immunhistochemischen Aussagen ergänzt werden (Cell Type-specific Expression of LINE-1 Open Reading Frames 1 and 2 in Fetal and Adult Human Tissues, The Journal of Biological Chemistry, March 31, 2004, S Ergün, Ch Buschmann, J Heukeshoven, K Dammann, F Schnieders, H Lauke, F Chalajour, N Kilic, W H. Strätling and G G. Schumann).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen der Zellen nach ORF2 Transfektion (Abb 15) zeigen gegenüber der schwachen Hintergrundfärbung der nichttransfizierten und pCEP4 transfizierten Zellen eine deutlich höhere Intensität. Die Durchführung der erforderlichen Kontrollen zeigte die Spezifität der Färbung für den ORF2. Zellen, die mit einem inaktiven L1 transfiziert wurden, zeigten eine vergleichbare Anfärbung wie pCEP4 transfizierte Kontrollzellen. Toxische Phänomene, bedingt durch überexprimiertes ORF2 Protein oder eine aktivierte Retrotransposition, konnten so als Ursache der stärkeren Färbung ausgeschlossen und die Signale als spezifische Interaktion des ORF2 mit dem Antikörper bestätigt werden (151). Ob das erhöhte ORF2

Expressionslevel alleine durch das Expressionsplasmid bedingt war und inwieweit endogene Aktivierungen oder andere Epiphänome eine Rolle spielen, bleibt zu untersuchen. Die Hintergrundfärbung der nichttransfizierten und pCEP4 transfizierten Zellen ist auf die endogene physiologische ORF2 Expression zurückzuführen. Der direkte Vergleich basaler ORF2 Expressionslevel in unterschiedlichen Zelltypen sowie verschiedenen Differenzierungs – und Proliferationsstadien einzelner Zellen kann wichtige funktionelle Hinweise liefern.

Interessante Aspekte hierzu finden sich bei der Färbung des adulten humanen Testisgewebes, in der die frühen unreifen Stadien der Spermatogenese keine ORF2 Expression zeigen, während ab dem Differenzierungsgrad der Spermatozyten II so wie in fetalen Prä-spermatogonien der ORF2 Nachweis gelang. Ob L1 Proteine eine Bedingung für die Keimzellbildung und somit die Evolution darstellen (151), oder lediglich als Ausdruck der zunehmenden Zelldifferenzierung oder gar als unbedeutende Nebenprodukte zu verstehen sind, wird Aspekt zukünftiger Forschung sein.

Es konnte weiter gezeigt werden, dass der ORF2 auch in einigen somatischen Zellen, insbesondere Endothelzellen reifer, weniger in unreifen Blutgefäßen exprimiert wird. Um dies zu untersuchen, wurden hier HDMEC-Zellen mit Wachstumsfaktoren (VEGF und FGF) stimuliert und so die Verhältnisse proliferierender Endothelzellen simuliert, um anschließend die ORF2 Expression in ruhenden und aktiven Zellen zu vergleichen. Die Stimulation mit Wachstumsfaktoren ist eine etablierte Methode, um eine angiogene Reaktion von Zellen bis hin zur Vaskularisierung von Implantaten im Tierversuch (131) zu provozieren (79). Gemäß den vorausgegangenen Ergebnissen ist nach Wachstumsfaktorstimulation eine niedrigere Expression des ORF2 zu erwarten, dies wurde bestätigt (4.3.6 +7). Das Expressionslevel des ORF2 sank proportional zur Menge der stimulierenden Wachstumsfaktoren. Unter der maximalen Stimulation mit 50 ng/ml VEGF und 25 ng/ml FGF konnte ORF2 schließlich nur sehr schwach dargestellt werden, es kam zu einer bemerkenswerten Absenkung des kompletten Hintergrundes, also des endogenen ORF2 Levels. Die Abhängigkeit des ORF2 vom Proliferationsgrad endothelialer Zellen wurde somit gezeigt, für differenzierte Aussagen ist eine Optimierung des Versuchsaufbaus erforderlich.

Als Ausblick für weitere Versuche ist dieser Aspekt sehr interessant, denn so ist es möglich, endogenes ORF2 zu supprimieren und Transfektionsversuche ohne endogene Beeinflussung und ohne die basale Hintergrundfärbung durchzuführen.

Ob und inwieweit L1-Elemente einen Einfluß auf die Regulation der Vaskulogenese/Angiogenese haben, ob eine vermehrte Expression mit einer Reifung von Endothelzellen, bzw. einer erhöhten Stabilität der Gefäße einhergeht oder zum „*angiogenic switch*“, und so zu einer erneuten Angiogeneseaktivität beiträgt, wird in der Zukunft gezeigt werden. Klinische Ansatzpunkte hierfür sind in der antiangiogenen Tumorthherapie zu finden (151). Essentiell hierzu sind weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Rolle der L1 Retrotransposons in malignen Prozessen. In zahlreichen Tumoren sowie vielen Tumorzelllinien konnten aktive L1 Elemente dargestellt werden. Ob die genomische Instabilität durch Retrotransposition - z.B. in Form der Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen - einen frühen Schritt der Karzinogenese darstellt, Malignität bedingt oder begleitet, und inwieweit hier eine selektiver Prozeß vorliegt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

Zu vergleichen bleibt darüber hinaus das Verhalten der L1 Retrotransposons in Keimzellen und somatischen Zellen.

Nachdem in dieser Arbeit durch Immunfluoreszenzfärbungen erstmalig der ORF2 gezeigt und zytoplasmatisch lokalisiert wurde, gelang darüber hinaus mittels konfokaler Mikroskopie als Methode der nichtinvasiven dreidimensionalen Strukturauflösung mikroskopischer Objekte eine fokale Darstellung des ORF2 sowohl zytoplasmatisch als auch erstmals im Nukleus der Zellen. Hieraus lassen sich neue funktionelle Aspekte des ORF2 erahnen. Nach der Identifikation der Proteinstruktur ist die subzelluläre Lokalisation ein wichtiger Hinweis auf die physiologische Bedeutung und Funktion eines Proteins. Durch weitere Quantifizierung und Analyse von Wechselwirkungen sowie des biologischen Netzwerkes wird die Funktion des ORF2 zukünftig weiter definiert werden.

Der Nachweis des ORF2s mit den drei Domänen einer aminoterminalen Endonucleasedomäne (EN), einer zentralen Reversen Transkriptasedomäne (RT) und einer COOH-terminalen Zinkfingerdomäne im Zellkern lässt weitere Schlüsse auf eine aktive, direkte genregulatorische Komponente zu. Auch kann diese nukleäre Darstellung des ORF2

zur Klärung der von Ostertag gestellten Fragen, u.a. des - aufgrund der bisher nicht erfolgten Kernlokalisierung - fraglichen Kernimportes sowie der vermuteten Formation eines Ribonukleoproteinkomplexes, beitragen (105).

Auch hier wäre ein Vergleich der qualitativen und quantitativen nukleären Lokalisation in verschiedenen Zelltypen und ihren Differenzierungsstadien von Interesse.

5.3 Weitere Expressionsanalysen

Darstellung der Proteinexpression im Western Blot

Während die Darstellung des ORF2 im Zellverband gut möglich ist, konnten weitergehende Informationen auf der Basis von Western Blot-Analysen im Rahmen dieser Arbeit nicht gewonnen werden. Unter optimierten Bedingungen konnte in sämtlichen Versuchen allenfalls ein sehr schwaches Signal gewonnen werden.

Außer der zu analysierenden systematischen Fehler sind weitere Ursachen für den unzureichenden Nachweis des ORF2 Proteins denkbar. Durch die physikalischen und chemischen Einwirkungen im Rahmen des Versuchablaufes kommt es zu Proteinmodifikationen/ Denaturierung der Antigene. Diese sowie Konformationsänderungen bei der Immobilisierung der Proteine auf der Membran beeinflussen die spezifische Antigen – Antikörper – Interaktion, als Folge verhindert die Reduktion oder sogar der komplette Verlust der Bindungsfähigkeit des Antikörpers die Darstellung des ORF2 Proteins.

Untersuchung der RNS-Expression

Desweiteren wurden Experimente auf RNS-Basis durchgeführt. Hier wurde versucht, die Auswirkung der L1 Retrotransposons auf die Angiogenese aus einem anderen Blickwinkel darzustellen. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Stimulation mit den Wachstumsfaktoren VEGF und FGF zu einer Abnahme der ORF2 Expression führt, nun soll die Folge einer Überexpression von L1 in PAE- Zellen auf das Verhalten der Wachstumsfaktoren, zunächst VEGF, untersucht werden.

In diesem Experiment ist die Tendenz ablesbar, dass L1 die VEGF Transkription induziert. L1 transfizierte Zellen zeigen gegenüber nichttransfizierten Zellen ein deutlich, im

Vergleich mit *backbone* transfizierten Zellen ein leicht erhöhtes VEGF Level. Da VEGF ein wichtiger Angiogeneseaktivator ist, könnte z.B. in der Induktion dieses Faktors ein Einfluß des L1 auf die Angiogenese begründet sein.

Um weitere qualitative und quantitative Aussagen zur Induktion der Wachstumsfaktoren zu gewinnen sowie als Diskriminierung zur endogenen Produktion, wäre ein niedrigeres VEGF-Basislevel wünschenswert. Das zeigt, dass PAE-Zellen aufgrund ihrer hohen VEGF-Expression nicht optimal für die Untersuchung von VEGF-Effekten geeignet sind.

Zu diskutieren bleibt, ob die VEGF-Induktion ein L1 spezifischer Effekt ist, oder ob z.B. alleine die Transfektion zu einer Veränderung des Wachstumsfaktormusters führt. Bestätigt sich der Einfluß von L1 auf die Angiogenese über die Modulation der Aktivatoren, muss die Rolle der einzelnen Proteine (ORF1 und ORF2) weiter differenziert werden. Hierzu kann auf den im Rahmen dieser Arbeit vorbereiteten adenoviralen Vektor zurückgegriffen werden.

Ob sich die Aussagen der Expressionsversuche mit dem L1 Plasmid auf die physiologischen Verhältnisse im Organismus übertragen lassen, bleibt zu diesem Zeitpunkt offen. Durch hier etablierte Transfektionsprotokolle ist eine hohe L1 Aktivität produzierbar, mit der zukünftig weitere funktionelle Aspekte untersucht werden können.

Als Promotor wurde hier der starke humane Cytomegalievirus (CMV)-Promotor eingesetzt, durch den ein hohes ORF2 Level exprimiert wird. Die endogene Expression des ORF2 wird durch die basale Aktivität des zell/endothelspezifischen Promotors bestimmt. L1 Elemente besitzen eine 5'UTR mit einem ungewöhnlichen internen, CpG reichen Promotor, der bisher noch nicht vollständig charakterisiert werden konnte (135).

Vermittelt der L1 spezifische Promotor eine geringe Transkriptionsinitiation, wird *in vivo* kein hohes Expressionsniveau des ORF2 und somit keine funktionelle Relevanz erreicht. Es liegt jedoch nahe, dass auch hier vor- sowie nachgeschaltete Enhancer, bzw. Silencer, weitere spezifische, aber auch unspezifische Transkriptionsfaktoren, insbesondere durch die Bindung an eine identifizierte Region im 5'UTR (104), und genomische Lokalisationsphänomene von Bedeutung sind. Die Lokalisation der Integration (83) kann unterschiedliche Aktivitätsgrade der L1 Elemente zufolge haben und so die

unterschiedlichen Basislevel in verschiedenen Zelltypen erklären. Inwieweit es sich hierbei um selektive Prozesse handelt, bleibt zu klären.

Über eine Beeinflussung der zu identifizierenden Transkriptionsaktivatoren ließe sich die L1 Expression *in vivo* erhöhen. Dies wäre vorteilhaft gegenüber der exogenen Genaktivierung, um unerwünschte Effekte wie etwa ein *transcriptional silencing* des CMV Promoters zu umgehen.

5.4. Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein effektives nichtvirales Transfektionssystem für L1 etabliert sowie ein adenoviraler ORF2 - Vektor vorbereitet werden.

Zur Optimierung der experimentellen Systeme

Mittlerweile stehen weitere nicht-virale Gentransfermethoden für primäre menschliche Endothelzellen zur Verfügung.

Als Alternative zur herkömmlichen Klonierungsstrategie des adenoviralen Vektors bietet sich zur Überwindung von Klonierungsschwierigkeiten die Verwendung des AdenoQuick™ Cloning Systems an. Dieses System stellt ohne weitere Zwischenklonierungsschritte eine schnelle und zu 99% effiziente Möglichkeit der Herstellung von großen Adenovirusgenomen dar (26).

Die Entwicklung nicht-viraler, aber trotzdem sehr effizienter Gentransfermethoden von primären menschlichen Endothelzellen schreitet voran.

Ein vielversprechender Ansatz ist die Anwendung eines elektrischen Feldes in Form eines Elektroporationschips (86). Die Elektroporation (85, 62) wird zur Transformation von Bakterien schon länger und auch im Rahmen dieser Arbeit mit sehr guten Ergebnissen angewendet. Eine Kombination aus speziellen elektrischen Parametern und spezifischen Lösungen stellt die Nukleofektion dar, die unter schonenden Bedingungen die DNS direkt in den Nukleus freisetzt (122, 57, 67).

Auch die Weiterentwicklung von kationischen Polymeren lässt auf eine Transfizierbarkeit von primären Zellen hoffen. Eine effiziente Transfektion von primären Endothelzellen wurde mit Polyethylenimine (PEI) berichtet (149). Dies konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht erzielt werden. Aber auch hier gibt es neue Erfolge, die Transfektionseffizienz dieses Reagens durch die Kombination mit der neuen Technik der Magnetofektion von 1.3 auf 38.7% zu erhöhen (78).

Die Kombination von Mittel- und Langketten kationischen Lipiden führte zu einer 30-fachen Transfektionsrate von menschlichen HUVEC-Zellen (145).

Aber auch vollkommen neue Konzepte wie z.B. ein durch Antikörper gerichteter Gentransfer in die Endothelzellen verspricht verbesserte Transfektionsraten von primären Zellen *in vitro* (139). Der begrenzten Passagefähigkeit primärer Zellkulturen versuchen Shao et al 2004 durch eine Immortalisierung der Zellen mittels des humanen Telomerase katalytischen Proteins (hTERT) zu begegnen und somit ein geeignetes *in vitro* Modell zu entwickeln (128). Dieses Enzym Telomerase verhilft auch Tumorzellen zu ihrer unbegrenzten Replikationsfähigkeit (128), indem sie der Verkürzung von Telomeren entgegenwirkt.

Dieses stellen neue Ansätze gentherapeutischer Strategien dar, um zukünftig die limitierenden Bedingungen der nichtviralen Transfektionseffizienz zu überwinden. Eine Verwendung von Alternativstrategien war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Nach der Bereitstellung eines geeigneten Transfektionssystems gelang hier erstmalig die subzelluläre Lokalisation mittels eines neuen, spezifischen Antikörpers in einer Immunfluoreszenzfärbung, die die fokale zytoplasmatische sowie nukleäre Lokalisation des ORF2 durch konfokale Mikroskopie zeigt. Auf der Basis dieser Informationen wurden erste Versuche einer funktionellen Charakterisierung des ORF2 durchgeführt, in denen sich über die Beeinflussung der endothelialen Wachstumsfaktoren ein enger Bezug zur Angiogenese vermuten sowie eine Abhängigkeit der Expressionslevel vom Differenzierungs- und Proliferationsstadium der Zelle darstellen lässt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen, dass der Wahl der zellulären Testsysteme eine wesentliche Bedeutung zukommt. Dabei nehmen die Parameter endogene Expression, Wachstumsfaktor Expressionsprofile (VEGF, FGF, etc.), Zellmorphologie und –interaktion (2D Kultur, 3D-Kultur) eine wichtige Rolle ein. Hier stehen mittlerweile spezialisierte Arraysysteme für RNA und Protein Expressionsprofiling zur Verfügung. Weitere Möglichkeiten bieten sich in *ex vivo* Systemen perfundierter primärer Gefäßabschnitte (144).

Diese Daten können zukünftig als Grundlage weiterer Studien zum Verständnis der funktionellen Bedeutung sowie des Spektrums der Genregulation durch L1 Elemente beitragen. Viele Aspekte, u.a. die Bedeutung der einzelnen Proteine ORF1 und ORF2 sowie ihre gegenseitigen Wechselwirkungen, bleiben zu analysieren. Sollte sich die Vermutung der genregulatorischen Komponente bestätigen, steht hiermit ggf. zukünftig ein neuer vielversprechender Ansatz der antiangiogenen Tumorthherapie zur Verfügung. Schon aufgrund der quantitativen Bedeutung mit einem Anteil von ca. einem Fünftel des menschlichen Genoms wird die Analyse der L1 Elemente auch in der Zukunft von großem Interesse sein.

6. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das ORF2-Protein der L1 Retrotransposons, das bisher mangels eines geeigneten Antikörpers weder in vitro noch in vivo dargestellt und folglich in seiner funktionellen Bedeutung nicht geklärt werden konnte.

Nachdem im Vorfeld der Arbeit mit der Entwicklung des spezifischen L1-ORF2 Antikörpers erstmalig die immunhistochemische Darstellung des ORF2 gelang (9), wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit ein effizientes nichtvirales Transfektionssystem für das L1-ORF2 Protein in Endothelzellen (PAE) etabliert sowie ein adenoviraler Vektor zur Infektion primärer humaner Endothelzellen vorbereitet. Nach Optimierung einer Immunfluoreszenzfärbung gelang die sehr spezifische und präzise Darstellung des ORF2.

Desweiteren konnte mittels konfokaler Mikroskopie die fokale Darstellung des ORF2 sowohl im Zytoplasma als auch erstmalig im Zellkern gezeigt werden. Hieraus lassen sich wichtige funktionelle Aspekte zur weiteren Charakterisierung der genregulatorischen Komponente ableiten.

Auf der Basis des geeigneten Gentransfersystems sowie der spezifischen Darstellung des ORF2 durch Immunfluoreszenz konnten erste Analysen, eine mögliche Interaktion des ORF2 und angiogenetischer Aktivität nachzuweisen, durchgeführt werden.

Human primäre Endothelzellen zeigten hier eine endogene ORF2 Expression. Unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren (FGF/VEGF) konnte ein deutlicher Rückgang des ORF2 Levels beobachtet werden.

Desweiteren wurden erste Analysen auf Protein und RNA - Ebene begonnen, in denen die Tendenz ablesbar ist, dass L1 die VEGF Transkription induziert.

Es konnte ein erster Zusammenhang zwischen dem ORF2 und der Angiogenese auf Ebene der Wachstumsfaktoren gezeigt werden. Weitere experimentelle Studien werden zukünftig zeigen, ob die quantitative Bedeutung der L1 Retrotransposons ein qualitatives Korrelat aufweist.

7. Literaturverzeichnis

1. Affleck DG, Bull DA, Bailey SH, Albanil A, Connors R, Stringham JC and Karwande SV: PDGF_{BB} increases Myocardial Production of VEGF: Shift in VEGF mRNA Splice Variants after Direct Injection of bFGF, PDGF_{BB} and PDGF_{AB}. Journal of Surgical Research 2002;107: 203-209
2. Ali M, Veale DJ, Reece RJ, Quinn M, Henshaw K, Zanders ED, Markham AF, Emery P, Isaacs JD: Overexpression of transcripts containing LINE-1 in the synovial of patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2003 Jul;62(7): 663-6
3. Allen E, Horvath S, Tong F, Kraft P, Spiteri E, Riggs AD, Marahrens Y: High concentrations of long interspersed nuclear element sequence distinguish monoallelically expressed genes. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Aug.19;100(17): 9940-50
4. Ananth S, Knebelmann B, Grüning W, Dhanabal M, Walz G, Stillman IE, Sukhatme VP: Transforming Growth Factor β 1 is a Target for the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor and a Critical Growth Factor for Clear Cell Renal Carcinoma. Cancer Research 1999 May 1;59(9): 2210-2216
5. Anthony P. Adamis, Lloyd P. Aiello & Robert A. D'Amato: Angiogenesis and ophthalmic disease. Angiogenesis 1999;3: 9-14
6. Asch HL, Eliacin E, Fanning TG, Connolly JL, Bratthauer G, Asch BB: Comparative expression of the LINE-1 p40 protein in human breast carcinomas and normal breast tissues. Oncol Res. 1996;8(6): 239-47
7. Benihoud K, Bonardelle D, Soual-Hoebeke E, Durand-Gasselini I, Emilie D, Kiger N and Bobe P: Unusual expression of LINE-1 transposable element in the MRL autoimmune lymphoproliferative syndrome-prone strain. Oncogene 2002;21: 5593-5600

8. Benninghoff: Anatomie, Band 1, 15. Auflage. Urban & Schwarzenberg 1994, ISBN 3-541-00245-X, 652-673
9. Bikfalvi A, Savona C, Perollet C and Javerzat S: New insights in the biology of fibroblast growth factor-2. *Angiogenesis* 1997;1; 155-173
10. Böcker, Denk, Heitz: Pathologie, Urban & Fischer, 2001 ISBN 3-437-42380-0, S.163
11. Bowen NJ, Jordan IK: Transposabe elements and the evolution of eukaryotic complexity. *Curr Issues Mol Biol.* 2002 Jul;4(3): 65-76
12. Bratthauer GL, Fanning TG: Active LINE-1 retrotransposons in human in testicular cancer. *Oncogene.* 1992 Mar;7(3): 507-10
13. Bratthauer GL, Fanning TG.: LINE-1 retrotranposon expression in pediatric germ cell tumors. *Cancer.*1993 Apr 1;71(7): 2383-6
14. Brem S: Angiogenesis antagonists: current clinical trials. *Angiogenesis* 1998;2: 9-20
15. Brosius J: How significant is 98.5% ‘junk’ in mammalian genomes? *Bioinformatics.* 2003 Oct;19 Suppl 2: II35.
16. Brown PD: Matrix metalloproteinase inhibitors. *Angiogenesis* 1997;1(2): 142-154
17. Cao G, O’Brien Ch D, Zhou Z, Sanders SM, Greenbaum JN, Makrigiannakis A and DeLisser HM: Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282: 1181-1190
18. Carmeliet P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 2000 Mar; 6, No. 3

19. Carson SD, Hobbs JT, Tracy SM, Chapman NM: Expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in cultured human umbilical vein endothelial cells: regulation in response to cell density. *J Virol.* 1999 Aug ;73(8): 7077-9
20. Chakraborty AK, Zink MA, Boman BM, Hodgson CP: Synthetic retrotransposon vectors for gene therapy. *FASEB J.* 1993 Jul;7(10): 971-7
21. Chen JM, Masson E, Macek M Jr, Raguénès O, Piskackova T, Fercot B, Fila L, Cooper DN, Audrézet MP, Férec C: Detection of two Alu insertions in the CFTR gene. *J Cyst Fibros.* 2008 Jan;7(1): 37-43
22. Clark DE and Charnock-Jones DS: Placental angiogenesis: the role of the VEGF family of proteins. *Angiogenesis* 1998/1999;2; 309-318
23. Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT, Bergelson JM: The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Dec 18;98(26): 15191-6
24. Corada M, Zanetta L, Orsenigo F, Breviario F, Lampugnani MG, Bernasconi S, Liao F, Hicklin DJ, Bohlen P and Dejana E: A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood.* 1 August 2002;100(3): 905-11
25. Cost GJ, Feng Q, Jacquier A, Boeke JD: Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *EMBO J.* 2002 Nov 1;21(21): 5899-910
26. Danthinne X: Simultaneous insertion of two expression cassettes into adenovirus vectors. *Biotechniques* 2001 Mar;30(3): 612-6, 618-9
27. Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T: LINE- mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet.* 2003 Sep;35(1): 41-8
28. Dewannieux M., Heidmann T: LINEs, SINEs and processed pseudogenes: parasitic strategies for genome modelling. *Cytogenet Genome Res.* 2005;110(1-4): 35-48

29. Drevs J, Laus C, Medinger M, Schmidt-Gersbach C, Unger C: Antiangiogenesis: Current Clinical Data and Future Perspectives. *Onkologie* 2002; 25: 520-527
30. Ergün S, Kilic N, Wurmbach JH, Ebrahimnejad A, Fernando M, Sevinc S, Kilic E, Chalajour F, Fiedler W, Lauke H, Lamszus K, Hammerer P, Weil J, Herbst H, Folkman J: Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubs. *Angiogenesis* 2001; 4: 193-206
31. Ergün S, Kilic N, Zeigeler G, Hansen A, Nollau P, Gotze J, Wurmbach JH, Horst A, Weil J, Fernando M, Wagener C: CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell*. 2000 Feb; 5(2): 311-320
32. Fajardo LF, Prionas SD, Kwan HH, Kowalski J and Allison AC: Transforming Growth factor beta1 induces angiogenesis in vivo with a threshold pattern. *Laboratory Investigation* 1996;74(3): 600-608
33. Feschotte C, Jiang N and Wessler SR: Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nature Reviews, Genetics* May 2002;3: 329-341
34. Fleming I: Epoxyeicosatrienoic acids, cell signalling and angiogenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2007 Jan;82(1-4): 60-7
35. Fukao T, Zhang G, Aoki Y, Arai T, Teramoto T, Kaneko H, Sugie H, Kondo N: Identification of Alu-mediated, large deletion-spanning introns 19-26 in PHKA2 in a patient with X-linked liver glycogenesis (hepatic phosphorylase kinase deficiency). *Mol Genet Metab*. 2007 Sept-Oct;92(1-2): 179-82
36. Fukushi J, Ono M, Morikawa W, Iwamoto Y and Kuwano M: The activity of Soluble VCAM-1 in Angiogenesis Stimulated by IL-4 and IL-3. *The American Association of Immunologists*, 2000
37. Furano AV: The biological properties and evolutionary dynamics of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2000;64: 255-94

38. George D: Platelet-derived growth factor receptors: A therapeutic target in solid tumors. *Seminars in Oncology* 2001 Oct; Supplement 17, Vol. 28, No.5
39. Gilbert N, Lutz-Prigge S, Moran JV: Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*. 2002 Aug 9;110(3): 315-25
40. Givol D: Activation of oncogenes by transposable elements. *Biochem Soc Symp*. 1986;51: 183-96
41. Görlich D, Kutay U: Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Bio.*1999;15: 607-60
42. Graham FL, van der Erb AJ: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973 Apr;52(2): 456 – 67
43. Grant RP, Hurt E, Neuhaus D, Stewart M: Structure of the C-terminal FG-nucleoporin binding domain of TAP/NXF 1. *Nat Struct Biol*. 2002 Apr;9(4): 247-51
44. Gupta K, Gupta P, Wild R, Ramakrishnan S & Hebbel RP: Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: Effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Angiogenesis* 1999;3: 147-158
45. Hagan CR, Rudin CM: Mobile genetic element activation and genotoxic cancer therapy: potential clinical implications. *Am J Pharmacogenomics* 2002;2(1): 25-35
46. Han JS, Boeke JD: A highly active synthetic mammalian retrotransposon. *Nature*. 2004 May 20;429(6989): 314-8
47. Han JS, Szak ST, Boeke JD: Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature*. 2004 May 20;429(6989): 268-74

48. Hanahan D and Folkman J: Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 1996 Aug; Vol.86: 353-364
49. Hansen RS: X inactivation-specific methylation of Line-1 elements by DNMT3B: implications for the Lyon repeat hypothesis. *Hum Mol Genet.* 2003 Oct 1;12(19): 2559-67
50. Hansson LO, Friedler A, Freund S, Rüdiger S and Fersht AR: Two sequence motifs from HIF-1 α bind to the DNA-binding site of p53. *PNAS.* August 6,2002; Vol.99, No. 16: 10305-10309
51. Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y, Tsushima T, Imai T, Okumura K: Transforming Growth Factor- β 1 Level Correlates with Angiogenesis, Tumor Progression, and Prognosis in Patients with Non Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer* March 1, 2001;91 (5): 964-71
52. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Boersma E, Zeiher A, Simoons ML: Prognostic Significance of Angiogenic Growth Factor Serum Levels in Patients With Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2003 Feb;107 (4): 524-530
53. Honda M, Sakamoto T, Ishibashi T, Inomata H and Ueno H: Experimental subretinal neovascularization is inhibited by adenovirus-mediated soluble VEGF/flt-1 receptor gene transfection: a role of VEGF and possible treatment for SRN in age-related macular degeneration. *Gene Therapy* June 2000; 7, 11: 978-985
54. Hornig C & Weich HA: Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis* 1999;3: 33-39
55. Huebner RJ, Rowe WP, Ward TG, Parrott RH, Bell JA: Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents: a newly recognized group of common viruses of the respiratory system. *N Engl J Med.* 1954 Dec 30;251(27): 1077 -86
56. International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001 Feb 15;409: 861-921

57. Iversen N, Birkenes B, Torsdalen K, Djurovics S: Electroporation by nucleofector is the best nonviral transfection technique in human endothelial and smooth muscle cells. *Genet Vaccines Ther.* 2005 Apr 18;3(1): 2
58. Ivics Z, Izsvák Z: Transposons for gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2006 Oct;6(5): 593-607
59. Jacobsen LB, Calvin SA, Colvin KE, Wright M: FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods* 2004 Jun;33(2): 104-12
60. Jeffrey A. Bailey, Laura Carrel, Aravinda Chakravarti, and Evan E. Eichler: Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: The Lyon repeat hypothesis. *PNAS* 2000 Jun 6;97(12): 6634-6639
61. Jih Y, Lien W, Tsai W, Yang G, Li C & Wu L: Distinct regulation of genes by bFGF and VEGF-A in endothelial cells. *Angiogenesis* 2001;4: 313-321
62. Jordan ET, Collins M, Terefe J, Ugozzolo L, Rubio T: Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells. *J Biomol Tech.* 2008 Dec;19(5): 328-34
63. Jordan K, Rogozin IB, Glazko GV and Koonin EV: Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. *Trends in Genetics* 2003 Feb;Vol.19 No.2: 68-72
64. Joseph M. Kaminski, Mark R. Huber, James B. Summers and Matthew B. Ward: Design of a nonviral vector for site-selective, efficient integration into the human genome. *The FASEB Journal.* 2002;16: 1242-1247.
65. Kaiser S, Toborek M: Liposome-mediated high-efficiency transfection of human endothelial cells. *J Vasc Res.* 2001 Mar-Apr;38(2): 133-43

66. Kalluri R: Basement membranes: structure, assembly and role in tumor angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* 2003 Jun;3: 422-433
67. Kang J, Ramu S, Lee S, Aguilar B, Ganesan SK, Yoo J, Kalra VK, Koh CJ, Hong YK: Phosphate-buffered saline-based nucleofection of primary endothelial cells. *Anal Biochem.* 2009 Mar 15;286(2): 251-5
68. Kazazian HH Jr, Goodier JL: LINE drive. Retrotransposition and genome instability. *Cell.* 2002 Aug 9;110(3): 277-80.
69. Kichler A, Zanner W, Ogris M, Wagner E: Influence of the DNA complexation medium on the transfection of lipospermine/DNA complex. *Gene Ther.* 1998 Jun;5(6): 855-60
70. Kidwell MG: Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 2002;115: 49-63
71. Kiefer K, Clement J, Garidel P, Peschka-Suss R: Transfection efficiency and cytotoxicity of nonviral gene transfer reagents in human smooth muscle and endothelial cells. *Pharm res* 2004 Jun;21(6): 1009-17
72. Kimberland ML, Divoky V, Prchal J, Schwahn U, Berger W, Kazazian HH Jr: Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. *Hum Mol Genet.* 1999 Aug;8(8): 1557-60
73. Kingston RE, Chen CA, Rose JK: Calcium phosphate transfection. *Curr Protoc Mol Biol.* 2003 Aug;Chapter 9: Unit 9.1.
74. Koike H, Morishita R, Iguchi S, Aoki M, Matsumoto K, Nakamura T, Yokoyama C, Tanabe T, Ogihara T, and Kaneda Y: Enhanced angiogenesis and improvement of neuropathy by cotransfection of human hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase gene. *The FASEB Journal express article* 10, Feb. 2003

75. Kondo-Iida E, Kobayashi K, Watanabe M, Sasaki J, Kumagai T, Koide H, Saito K, Osawa M, Nakamura Y and Toda T: Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type Congenital muscular dystrophy (FCMD). *Human Molecular Genetics*, 1999, Vol.8, No.12: 2303-2309
76. Koshida, Ryoji MD; Ou, Jingsong MD, PhD; Matsunaga, Toshiro MD; Chilian, William M. PhD; Oldham, Keith T.MD; Ackerman, Allan W. MS; Pritchard, Kirkwood A. Jr PhD: Angiostatin: A Negative Regulator of Endothelial-Dependant Vasodilatation. *Circulation* 2003 Feb 18;107 (6): 803-806
77. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch K, Pak B, Taghavi P and Semenza GL: Regulation of Colon Carcinoma Cell Invasion by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cancer Research* 2003 Mar; 63: 1138-1143
78. Krotz F, Sohn HY, Gloe T, Plank C, Pohl U: Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells. *J Vasc Res.* 2003 Sep-Oct;40(5): 425-34
79. Kulkarni SS, Orth R, Ferrari M, Moldovan NL: Micropatterning of endothelial cells by guided stimulation with angiogenic factors. *Biosens Bioelectron.* 2004 Jun 15;19(11):1401-7
80. Kulpa DA, Moran JV: Cis-preferential LINE-1 reverse transcriptase activity in ribonucleoprotein particles. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Jul;13(7): 655-60
81. Kulpa DA, Moran JV: Ribonucleoprotein particle formation is necessary but not sufficient for Line-1 retrotransposition. *Hum Mol Genet.* 2005 Nov1;14(21): 3237-48
82. Lawler J: Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med.* 2002 Jan-Mai;6(1): 1-12

83. Lavie L, Maldener E, Brouha B, Meese EU, Mayer J: The human L1 promoter: variable transcription initiation sites and a major impact of upstream flanking sequence on promoter activity. *Genome Res.* 2004 Nov;14(11): 2253-60
84. Leopold PL, Ferris B, Grinberg I, Worgall S, Hackett NR, Crystal RG: Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Hum Gene Ther.* 1998 Feb 10;9(3): 367-78
85. Li LH, Shivakumar R, Feller S, Allen C, Weiss JM, Dzekunov S, Singh V, Holaday J, Fratantoni J, Liu LN: Highly efficient, large volume flow electroporation. *Technol Cancer Res Treat.* 2002 Oct;1(5): 341-50
86. Lin YC, Li M, Wu CC: Simulation and experimental demonstration of the electric field assisted electroporation microchip for in vitro gene delivery enhancement. *Lab Chip.* 2004 Apr;4(2): 104-8
87. Lindtner S, Felber BK, Kjems J: An element in the 3' untranslated region of human LINE-1 retrotransposon mRNA binds NXF1 (TAP) and can function as a nuclear export element. *RNA* 2002;8: 345-356. Cambridge University Press.
88. Löffler G, Petrides PE: *Basiswissen Biochemie- mit Pathobiochemie*, 6.Auflage. Springerverlag 1998; ISBN 3-13-130881-8
89. Lönnig WE and Sadler H: Chromosome Rearrangements and transposable elements. *Annu. Rev.Genet.* 2002;36: 389-410
90. Lyon MF: X- chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet. Cell Genet.* 1998;80: 1-4
91. Malassagne B, Taboit F, Conti F, Batteux F, Atia N, Chereau C, Conjeaud H, Theron MC, Attal J, Braet F, Houdebine LM, Calmus Y, Houssin D, Weill B: A newly established porcine aortic endothelial cell line: characterization and

- application to the study of human-to-swine graft rejection. *Exp Cell Res.* 1998 Jan 10;238(1): 90-100
92. Mannino RJ, Gould-Fogerite S: Liposome mediated gene transfer. *Biotechniques* 1988 Jul-Aug;6(7): 682-90
93. De Marchis F, Ribatti D, Giampietri C, Lentini A, Faraone D, Scoccianti M, Capogrossi MC and Facchiano A: Platelet-derived growth factor inhibits basic fibroblast growth factor angiogenic properties in vitro and in vivo through its α receptor. *Blood* 2002 March 15;99(6): 2045-53
94. Martin TA, Harding KG, Jiang WG: Regulation of angiogenesis and endothelial cell motility by matrix-bound fibroblasts. *Angiogenesis* 1999;3: 69-76
95. Martin SG, Murray JC: Gene-transfer systems for human endothelial cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000 Mar 30;41(2): 223-33
96. Martin SL, Li WL, Furano AV, Boissinot S: The structure of mouse and human L1 elements reflect their insertion mechanism. *Cytogenet Genome Res.* 2005;110(1-4): 223-8
97. Merrick AF, Shewring LD, Sawyer GJ, Gustafsson KT, Fabre JW: Comparison of adenovirus gene transfer to vascular endothelial cells in cell culture, organ culture, and in vivo. *Transplantation.* 1996 Oct 27;62(8): 1085-9
98. Michaelis UR, Fisslthaler B, Medhora M, Harder D, Fleming I and Busse R: Cytochrome P450 2C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce angiogenesis via cross-talk with the epidermal growth factor receptor. *The FASEB Journal* express article 10. Febr 5, 2003
99. Miki Y, Nishisho I, Horii A, Miyoshi Y, Utsunomiya J, Kinzler KW, Vogelstein B, Nakamura Y: Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Research* 1992 Feb 1;52(3): 643-645

100. Mizunuma M, Fujimori S, Ogino H, Ueno T, Inoue H, Kamatani N: A recurrent large Alu-mediated deletion in the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT1) gene associated with Lesch-Nyhan syndrome. *Hum Mutat.* 2001 Nov;18(5): 435-43
101. Moon EJ, Lee YM, Lee OH, Lee MJ, Lee SK, Chung MH, Park YI, Sung CK, Choi CK & Kim KW: A novel angiogenic factor derived from Aloe vera gel: β -sitosterol, a plant sterol. *Angiogenesis* 1999;3: 117-123
102. Naas TP, deBerardinis RJ, Moran JV, Ostertag EM, Kingsmore SF, Seldin MF, Hayashizaki Y, Martin SL and Kazazian HH, Jr: An actively retrotransposing, novel subfamily of mouse L1 elements. *The EMBO Journal* 1998;Vol.17 No.2: 590-597
103. Okada N: SINEs. *Curr. Opin Genet Dev.* 1991 Dec;1(4): 498-504
104. Olovnikov IA, Ad'ianova ZV, Galimov EP, Andreev DE, Terenin IM, Ivanov DS, Prasolov VS, Dmitriev SE: A key role of the internal region of the 5'-untranslated region in the human L1 retrotransposon transcription activity. *Mol Biol (Mosk)* 2007 May-Jun;41(3): 508-14
105. Ostertag EM and Kazazian HH Jr: Biology of Mammalian L1 Retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* 2001;35: 501-38
106. Ovchinnikov I, Troxel AB, Swergold GD: Genomic characterization of recent human LINE-1 insertions: evidence supporting random insertion. *Genome Res.* 2001 Dec;11(12): 2050-8
107. Ovchinnikov I, Rubin A, Swergold GD: Tracing the LINEs of human evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 6;99(16): 10522-7

108. Paleolog EM and Miotla JM: Angiogenesis in arthritis: a role in disease pathogenesis and as a potential therapeutic target. *Angiogenesis* 1998/1999; 2; 295-307
109. Parisi V, De Fonzo V, Aluffi-Pentini F: A survey of dynamical genetics. *Riv Biol.* 2004 May-Aug;97(2): 223-53
110. Parkes R, Meng QH, Siapati KE, McEwan JR, Hart SL: High efficiency transfection of porcine vascular cells in vitro with a synthetic vector system. *J Gene Med.* 2002 May-Jun;4(3): 292-9
111. Pavlakovic H, Havers W, Schweigerer L: Multiple angiogenesis stimulators in a single malignancy: Implications for antiangiogenic tumour therapy. *Angiogenesis* 2001;4: 259-262
112. Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C: Is HIF-1 α a pro-or an anti-apoptotic protein? *Biochemical Pharmacology* 2002;64: 889-892
113. Qin K, Du X, Rich BH: An Alu-mediated rearrangement causing a 3.2kb deletion and a novel two base pair deletion in AAAS gene as the cause of triple A syndrome. *Mol Genet Metab.* 2007 Dec;92(4): 359-63
114. Reinmuth N, Fan F, Liu W, Parikh AA, Stoeltzing O, Jung YD, Bucana CD, Radinsky R, Gallick GE and Ellis LM: Impact of Insulin-like Growth Factor Receptor-I Function on Angiogenesis, Growth, and Metastasis of Colon Cancer. *Laboratory Investigation* 2002;Vol.82, No.10: 1377
115. Ringertz N: Press Release, Presentation speech. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1983
116. Roberts G, Paustian T: Insertion sequences. University of Wisconsin-Madison 2000

117. van Royen N, Hoefler I, Buschmann I, Heil M, Kostin S, Deindl R, Vogel S, Korff T, Augustin H, Bode C, Piek JJ and Schaper W: Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *The FASEB Journal* 2002 Mar;Vol.16(3): 432-4
118. Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Dudziak ME, Greenwald JA, Luchs JS, Spector JA, Ueno H, Gittes GK and Longaker MT: Transforming growth factor- β 1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts (114). *Am J Physiol.* 1999 Oct;277(4Pt1): C628-37
119. Saito H, Tsujitani S, Oka S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N: The expression of Transforming Growth Factor- β 1 Is Significantly Correlated with the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Poor Prognosis of Patients with Advanced Gastric Carcinoma. *Cancer* 1999 Oct 15;86(8): 1455-62
120. Salgado R, Benoy I, Bogers J, Weytjens R, Vermeulen P, Dirix L & Van Marck E: Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): A morphological and functional study. *Angiogenesis* 2001;4: 37-43
121. Santourlidis S, Florl A, Ackermann R, Wirtz HC, Schulz WA: High frequency of alterations in DNA methylation in adenocarcinoma of prostate. *Prostate* 1999 May 15;39(3): 166-74
122. Schakowski F, Buttgereit P, Mazur M, Marten A, Schottker B, Gorschluter M, Schmidt-Wolf IG: Novel non-viral method for transfection of primary leukemia cells and cell lines. *Genet Vaccines Ther.* 2004 Jan 12;2(1):1.
123. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K: *Anatomie*, 8. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 3-540-65824-6,
124. Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M, Jakesz R, Kubista E, Birner P, Oberhuber G u.a: Overexpression of Hypoxia-

- inducible Factor 1 α Is Associated with an Unfavorable Prognosis in Lymph Node-positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2002 Jun;Vol. 8: 1831-1837
125. Schwahn U, Lenzner S, Dong J, Feil S, Hinzmann B, v. Duijnhoven G, Kirschner R, Hemberger M, Bergen AA, Rosenberg T, Pinckers AJ, Fundele R, Rosenthal A, Cremers FP, Ropers HH & Berger W: Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. *Nature Genet.* 1998 Aug;19(4): 327-32
126. Semeza GL: Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology* 2002;64: 993-998
127. Shampo MA, Kyle RA: Kary B. Mullis - Nobel Laureate for procedure to replicate DNA. *Mayo Clin Proc.* 2002 Jul;77(7): 606
128. Shao R, Guo X: Human microvascular endothelial cells immortalized with human telomerase catalytic protein: a model for the study of in vitro angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Sep 3;321(4): 788-94
129. Sheen FM, Sherry ST, Risch GM, Robichaux M, Nasidze I, Stoneking M, Batzer MA, Swergold GD: Reading between the LINEs: human genomic variation induced by LINE-1 retrotransposition. *Genome Res.* 2000 Oct;10(10): 1496-508
130. Shewchuk BM, Cooke NE and Liebhaber A: The human growth hormone locus control region mediates long-distance transcriptional activation independent of nuclear matrix attachment regions. *Nucleic Acids Research* 2001;29(16): 3356-61
131. Sigrist S, Mechine-Neuville A., Mandes K, Calenda V, Legeay G, Bellocq JP, Pinget M, Kessler L: Induction of angiogenesis in omentum with vascular endothelial growth factor: influence on the viability of encapsulated rat pancreatic islets during transplantation. *J Vasc Res.* 2003 Jul-Aug;40(4): 359-67

132. Sim B, Kim Lee: AngiostatinTM and EndostatinTM: endothelial cell-specific endogenous inhibitors of angiogenesis and tumor growth: *Angiogenesis* 1998;2: 37-48
133. Skelding Z, Sarnovsky R and Craig NL: Formation of a nucleoprotein complex containing Tn7 and its target DNA regulates transposition initiation. *The EMBO Journal* 2002;21(13): 3494-3504
134. Song M, Boissinot S: Selection against LINE-1 retrotransposons results principally from their ability to mediate ectopic recombination. *Gene*. 2007 Apr 1;390(1-2): 206-13
135. Steinhoff C, Schulz WA: Transcriptional regulation of the human LINE-1 retrotransposon L1.2B. *Mol Genet Genomics* 2003 Dec;270(5): 394-402
136. Lubert Stryer: *Biochemie*, 4. Auflage, 1999, S.871-873. Spektrum-Akademischer Verlag
137. Sylven C: Angiogenic tumor therapy. *Drugs Today (Barc)*. 2002 Dec;38(12): 819-27
138. Takai D, Yagi Y, Habib N, Sugimura T, Ushijima T: Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. *Jpn J Clin Oncol*. 2000 Jul;30(7): 306-9
139. Tan PH, Manunta M, Ardjomand N, Xue SA, Larkin DF, Haskard DO, Taylor KM, George AJ: Antibody targeted gene transfer to endothelium. *J Gene Med*. 2003 Apr;5(4): 311-23
140. Teifel M, Heine LT, Milbredt S, Friedl P: Optimization of transfection of human endothelial cells. *Endothelium* 1997;5(1): 21-35

141. Tsopanoglou NE and Maragoudakis ME: On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis: inhibition of attachment of endothelial cells on basement membrane components. *Angiogenesis* 1997;1: 192-200
142. Vanderslice P, Munsch CL, Rachal E, Erichsen D, Sughrue KM, Truong AN, Wygant JN, McIntyre B, Eskin SG, Tilton RG, and Polverini PJ: Angiogenesis induced by tumor necrosis factor- α is mediated by $\alpha 4$ integrins. *Angiogenesis* 1998;2: 265-275
143. Wackett, Lawrence P: Transposons and insertion sequences in microorganisms: An annotated selection of World Wide Web sites relevant to the topics in Environmental Microbiology. *Environmental Microbiology* 2003 Aug;5(8): 717
144. Wang HS, Hwang LL, Sue HF, Lee KM, Chen CT: A simple quantitative method for evaluation of angiogenesis activity. *Assay Drug Dev Technol.* 2004 Feb;2(1): 31-8
145. Wang L, MacDonald RC: New strategy for transfection: mixtures of medium-chain and long-chain cationic lipids synergistically enhance transfection. *Gene Ther.* 2004 Sep;11(17):1358-62
146. Xu TH, Deng KJ: Transposable elements and tumor progression. *Med Hypotheses* 2002 Apr;58(4): 293-6
147. Yang S, Graham J, Kahn JW, Schwartz EA and Gerritsen ME: Functional Roles for PECAM-1 (CD31) and VE-Cadherin (CD144) in Tube Assembly and Lumen Formation in Three-Dimensional Collagen Gels. *American Journal of Pathology* 1999 Sept;155(3): 887-895
148. Yang JP, Huang L: Time dependent maturation of cationic liposome-DNA-complex for serum resistance. *Gene Ther* 1998 Mar;5(3): 380-7

149. Zaric V, Weltin D, Erbacher P, Remy JS, Behr JP, Stephan D: Effective polyethylenimine-mediated gene transfer into human endothelial cells. *J Gene Med.* 2004 Feb;6(2): 176-84
150. Zimmermann U: Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim. Biophys. Acta.* 1982 Nov 30;694(3): 227-77

Eigene Publikation

151. Ergün S, Buschmann Ch, Heukeshoven J, Dammann K, Schnieders F, Lauke H, Chalajour F, Kilic N, Strätling WH and Schumann GG: Cell Type-specific Expression of LINE-1 Open Reading Frames 1 and 2 in Fetal and Adult Human Tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 2004 June;279(26): 27753-27763

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
ANG	Angiopoetin
AK	Antikörper
APC	Adenomatöse Polyposis coli
Bp	DNS Basenpaar
C	<i>cysteine rich motif</i>
CAR	<i>coxsackie- and adenovirus receptor</i>
CEACAM 1	<i>carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1</i>
CIP	<i>calf intestinal mucosa alkaline phosphatase</i>
CMV	Cytomegalievirus
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DNA (DNS)	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Deoxyribonukleinsäure)
cDNS	komplementäre DNS
dNTPs	Deoxyribonukleotide
DR	<i>direct repeat</i>
EN	Endonuklease
FCMD	Fukuyama Muskeldystrophie
FCS	<i>fetal calf serum, fötales Kälberserum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
GFP (EGFP)	<i>green fluorescent protein (enhanced GFP)</i>
HBMEC	<i>human brain microvascular endothelial cells</i>
HDMEC	<i>human dermal microvascular endothelial cells</i>
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor 1α</i>
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
IS	Insertionssequenzen
L1 (LINE 1)	<i>long interspersed nuclear elements 1</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>
ml	Milliliter
mg	Milligramm

MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Viruspartikel pro Zelle
MMP	<i>matrix metallo proteinases</i>
ORF1, 2	<i>open reading frame 1,2</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelat derived growth factor</i>
μ	Mikro
RNA (RNS)	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
Rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	<i>reverse transcriptase</i>
SINE	<i>short interspersed nuclear elements</i>
TE	<i>transposable elements</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TPRT	<i>target primed reverse transcription</i>
TSD	<i>target site duplication</i>
U	Unit (s)
UTR	<i>untranslated region</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

9. Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. S. Ergün und Dr. G. Schumann für die freundliche Bereitstellung des Themas und die Vorarbeiten hierzu.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Beisiegel für die Möglichkeit, in ihrem Institut zu arbeiten, die freundliche Aufnahme und die sehr gute Betreuung.

Mein persönlicher Dank gilt Frank Schnieders, dem Leiter der AG Gentherapie, als hervorragendem Betreuer, der mir während jeder Phase der Arbeit hilfsbereit, unermüdlich und geduldig zur Seite stand, der mich wissenschaftliches Arbeiten lehrte und mir eine intensive fachliche und persönliche Stütze war. Seine wissenschaftlichen Studien haben meinen medizinischen Horizont erweitert und werden mir im klinischen Alltag immer helfen, nicht aufzugeben und hoffnungsvoll die therapeutischen Möglichkeiten der Zukunft zu erwarten.

Ich möchte Ch. Runge sowie allen Mitarbeitern der Institute der Molekularen Zellbiologie, der Anatomie und des Heinrich-Pette-Institutes für die Unterstützung, Motivation, fachlichen Ratschläge und gute Zusammenarbeit danken.

Abschließend gebührt meiner Familie Dank, insbesondere meinen Eltern, Sascha und Frank R., die mich auf meinem Weg bedingungslos unterstützen.

10. Lebenslauf

Name Kristin Dammann
Geboren am 02.04.1980 in Buchholz i.d.N.

Schulbildung

1986 - 1992 Grundschole und Orientierungsstufe Jesteburg
1992 - 1999 Albert Einstein Gymnasium Buchholz i.d.N.
Sommer 1998 Deutsche Schülerakademie, Bildung und Begabung ev.
1999 Abitur

Studium

10/1999 Immatrikulation an der Universität Hamburg,
Fachbereich Humanmedizin
09/2001 ärztliche Vorprüfung
Okt. 2001 - Febr 2002 Vorpräperandin, Anatomisches Institut der Univ. Hamburg
2002 Stipendium der Thesdorp-Stiftung
08/2003 1. Staatsexamen
08/2005 2. Staatsexamen
11/2006 3. Staatsexamen und Approbation als Ärztin

Publikation

Juni 2004 Ergün S, Buschmann Ch, Heukeshoven J, Dammann K, Schnieders F, Lauke H, Chalajour F, Kilic N, Strätling WH and Schumann GG: Cell Type-specific Expression of LINE-1 Open Reading Frames 1 and 2 in Fetal and Adult Human Tissues. The Journal of Biological Chemistry 2004 June;279(26): 27753-27763

Berufstätigkeit

Ab 02/2007 Assistenzärztin, I. Med. Abteilung der Asklepios Klinik Wandsbek, Hamburg

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ich erkläre, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Seevetal, den 12.12.2010

Kristin Dammann