

Aus der Klinik für Gefäßchirurgie und Nierentransplantation
des Universitätsklinikum Düsseldorf

DISSERTATION

**Die Rolle des neuentwickelten pYD-Vectors bei der Entwicklung eines
Selektionssystems zum Screening von cDNA Bibliotheken auf sezernierte
Proteine und Membranproteine**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Mansur Duran

aus Samandag, Türkei

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. D. C. Gulba
2. Prof. Dr. med. H.-P. Schultheiß
3. Prof. Dr. med. H. Haller

Datum der Promotion: 01.06.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V - X
Einführung	1
I. Einleitung	2-16
1. Vaskulogenese / Angiogenese.....	3
1.1 Wachstumsfaktoren.....	4
Wachstumsfaktoren und Rezeptoren der VEGF – Familie (Graphik).....	8
2. Proteintransport.....	8
2.1 Transportwege.....	8
2.2 Signalpeptide.....	11
3. Selektionsmethoden für extrazelluläre Proteine und Membranproteine.....	13
3.1 Alternative Selektion.....	13
3.2 Hefe – Invertase Selektion.....	14
• Prinzip der Selektion (Graphik).....	15
4. Ziel der Arbeit und Fragestellung.....	15
II. Materialien	17-33
1.1 Chemikalien, Enzyme und Nährmedien mit Zusätzen.....	17
1.1.1 Chemikalien.....	17
1.1.2 Enzyme.....	17
1.1.3 Restriktionsenzyme.....	17
1.1.4 Nährmedien.....	18
1.1.5 Zusätze zu den Nährmedien.....	20
1.2 Puffer und Lösungen.....	21
1.2.1 Puffer zur Herstellung von kompetenten Zellen.....	21
1.2.2 Enzym-Puffer	22
1.2.3 Puffer und Lösungen für die Isolierung von DNA und RNA.....	24
1.2.4 Elektrophoresepuffer und Lösungen.....	26
1.2.5 Puffer und Lösungen für Northern Blot.....	28
1.2.6 Sonstige Puffer.....	29
2. Bakterienstämme, Hefestämme und DNA – Moleküle.....	30

2.1	E. coli (Bakterienstamm).....	30
2.2	S. cerevisiae (Hefestamm).....	30
2.3	DNA – Moleküle.....	31
2.3.1	Plasmide.....	31
2.3.1.1	Das pYEUra3-Plasmid.....	31
2.3.2	Phagen.....	32
2.3.2.1	λZapII-Phage.....	32
2.3.2.2	Ex Assist™M13 Helferphage.....	32
2.3.3	Oligonukleotide.....	33
	○ DNA Marker.....	33
III.	Methoden.....	34-64
	• Versuchsablauf.....	34
1.	RNA Isolierung.....	36
1.1	Gesamt – RNA Isolierung aus Zellkulturen.....	36
	• Rothi®Quick Kit von Roth®.....	36
	• Trizol®Reagent von GibcoBRL.....	37
1.2	mRNA Isolierung.....	38
2.	cDNA Bibliothek Konstruktion.....	40
2.1	cDNA Synthese modifiziert nach Gubler und Hoffmann (1983).....	40
2.2	in vivo Exzision.....	44
3.	PCR.....	45
4.	Mikrobiologische Techniken.....	46
4.1	Sterilisation.....	46
4.2	Konservierung.....	46
4.3	Bakterientiterbestimmung.....	46
4.4	Ausplattierung von Phagen.....	47
4.5	Optische Dichte Messung.....	47
4.6	Reinigung von Einzelkolonien.....	47
4.7	Stempeltest zur Charakterisierung von Hefen.....	48
5.	DNA-Isolierung.....	48
5.1	Plasmid Isolierung mit Qiagen Plasmid Kit.....	48
5.2	Plasmid Isolierung mit Qiaprep-Spin Plasmid Kit.....	49
5.3	λPhagen-DNA Isolierung.....	50

5.4	E. coli Plasmid Minipräparation.....	51
5.5	Hefe Plasmid Minipräparation.....	52
6.	Reinigung von Nukleinsäuren.....	52
6.1	DNA Extraktion aus Agrarosegelen QIAEX II Kit von Qiagen.....	52
6.2	Aufreinigung über eine Sephadex Quant G 50 Säule.....	53
6.3	Phenol / Chloroform Extraktion.....	54
6.4	DNA und RNA Fällung.....	54
7.	Analyse von Nukleinsäuren.....	55
7.1	Bestimmung von DNA und RNA Konzentrationen.....	55
7.2	Agarosegelelektrophorese.....	55
7.3	Nothern Blot Hybridisierung.....	56
7.4	Radioaktive Markierung von DNA.....	57
7.5	DNA Sequenzierung.....	57
8.	Klonierungsversuche.....	59
8.1	Restriktionsenzyme.....	59
8.2	Dephosphorylierung von DNA.....	59
8.3	DNA - Fragment Ligation.....	60
8.4	E. coli Transformation.....	60
8.5	Transformation von Hefezellen.....	61
9.	Computeranalyse.....	62
9.1	Datenbank.....	62
9.2	Vorhersage von Signalpeptidsequenz.....	63
IV.	Ergebnisse.....	65-94
IV.1	pYD Plasmid Vektor.....	65
IV.2	Einführung mit Zielsetzung der Arbeit.....	65
	Ablauf des Screens (Graphik).....	66
1.	cDNA – Bibliothek Konstruktion.....	67
1.1	Isolierung von RNA.....	67
1.2	Isolierung von mRNA (poly-A+ - RNA).....	67
1.3	cDNA Synthese.....	70
1.4	Klonierung der cDNA.....	71
1.5	in vivo Exzision der λ pYD-cDNA Bibliothek.....	74
2.	Selektion.....	74

2.1	Uracil Selektion.....	74
2.2	Saccharose Selektionssystem.....	75
2.2.1	Saccharose Selektion.....	75
2.2.2	Einzel Selektion.....	77
3.	Sequenzen von hmEC Bibliothek.....	77
3.1	Unbekannte Klone.....	78
3.2	Bekannte Klone.....	78
4.	Sequenzen von Mäuse-Embryonen.....	80
4.1	Sequenzen von e12,5 Bibliothek.....	80
	a. bekannte Klone.....	80
	b. falsch positive Klone.....	81
	c. unbekannte Klone.....	83
4.2	Sequenzen der I.e14,5 und II.e14,5 Bibliothek.....	85
	a. bekannte Klone.....	85
	b. falsch positive Klone.....	88
	c. unbekannte Klone.....	90
5.	Vergleich der hmEC Bibliothek mit den Mäuse Embryonen Bibliotheken...	92
5.1	Uracil Selektion.....	92
5.1	Saccharose Selektion.....	93
5.3	Sequenzen der einzelnen Bibliotheken.....	94
V. Diskussion		95-105
1.	Funktionsfähigkeit des pYD-Vektors.....	95
1.1	hmEC Bibliothek.....	96
1.2	Mäuse Embryonen Bibliothek.....	97
2.	Vor und Nachteile des Selektionssystems.....	100
3.	Verwendung des pYD-Vektors zur Erforschung von angiogenetisch wirksamen Molekülen.....	103
4.	Schlussfolgerung.....	105
VI. Zusammenfassung		106
VII. Literatur		108

Abkürzungsverzeichnis:

Aminosäuren (Ein- und Drei-Buchstaben Code):

A (Ala) Alanin, I (Ile) Isoleucin, R (Arg) Arginin, C (Cys) Cystein, K(Lys) Lysin, S (Ser) Serin, D (Asp) Asparaginsäure, L (Leu) Leucin, T (Thr) Threonin, E (Glu) Glutaminsäure, M (Met) Methionin, V (Val) Valin, F (Phe) Phenylalanin, N (Asn) Asparagin, W (Trp) Tryptophan, G (Gly) Glycin, P (Pro) Prolin, Y (Tyr) Tyrosin, H (His) Histidin, Q (Gln) Glutamin

A Adenin

Abb Abbildung

Abs Absorption

A 260/280 Absorptionsquotient

aFGF acidic Fibroblast Growth Factor

AIDS Acquired Immune Deficiency Syndrom

Ap Ampicillin

Apr Ampicillinresistent

APS Ammoniumperoxidsulfat

As Aminosäure

AS Antisense

ATP Adenosintriphosphat

bp Basenpaare

bFGF basic Fibroblast Growth Factor

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

BSA Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)

bzw beziehungsweise

C Cytosin

°C Grad Celcius

c Konzentration

C Cytoplasma

ca circa

cDNA complementary DNA (komplementäre DNS)

cDNS(M) cDNA mit Startkodon

cDNA(MSp)	cDNA mit Startkodon und Signalpeptid
cfu	colony forming units
Ci	Curie
cm	Zentimeter
COS	CV1 Origin SV40 Zelllinie
C-Terminal	Carboxyl Ende
d	desoxy
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat (N = A, T, G, C)
DTT	Dithiothreitol
e	Stadium der embryonalen Entwicklung
E260	Extinktion bei 260nm
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (acid)
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Endoplasmatische Retikulum
Est	Expressed Sequence Tags (kleine Sequenze Fragmente)
et al.	et alteri
Etbr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
f	femto
flk 1	fetal liver kinase
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunde (hour)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
hmEC	humane endotheliale Zellbibliothek
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
kdr	kinase insert domain containing receptor
Km	Kanamycin
Konz.	Konzentration
KS	Kaposi Sarkm
l	Liter
λ	Lambda
LB	Luria Bertani
Lsg	Lösung
M	Molar
M	Mitochondrium
mM	Millimolar
maxi	Maximum
mg	Milligramm
MEN	MOPS EDTA Natrium
μ g	Mikrogramm
min	Minute
mind	mindestens
ml	Milliliter
MOPS	3-[N-morpholino] propane-sulfonic acid
mRNA	messenger RNA(Boten Ribonukleinsäure)
NaAc	Natriumacetat
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
Nr	Nummer
N-Terminal	Amino Ende
NZ, NZY, NZCY	Hefemedium
O.D.	Optische Dichte
o/n	über Nacht (over night)
PBS	Phosphatpuffer
PCR	polymerase chain reaction (Poymerase Ketten Reaktion)
PDGF	Platelet - derived Growth Factor
PGE2	Prostaglandin 2
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfon-säure)
PLAP	plazenta alkalische Phosphatase Gen
PIGF	Placenta Growth Factor
pfu	plaque forming units
pYD	Selektionsvektor
pYDc	Selektionsvektor mit cDNA
λ pYDc	Lamdaphage mit Selektionsvektor und cDNA
pYEUra3	Hefe E. coli Shuttle Vektor (poly yeast Ura3)
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s	siehe
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Streptomyces cerevisiae</i>
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SA-PMP	Streptavidin Para Magnet Partikel
SD	Natriumdodecyl
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Sema	Semaphorine

SM	NaCl/Mg Puffer
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (Membranfusionsproteine)
SOB	super optimal broth
SOC	SOB plus Glucose
SRP	Signal Recognition Partikel
SSC	NaCl / NaCitrat Puffer
suc	sucrose
T	Thymin
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris EDTA Puffer
TB	Tris Puffer
TBE	Tris Borsäure EDTA
Tc	Tetracyclin
TE	Tris EDTA
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrose Factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Triton x-100	(4-(1,1,3,3 Tetramethylbutyl)phenol)ethoxylat
tRNA	transfer RNA
U	Uracil
U	Units
UDP	Uridin-Diphosphat
Ura	Uracil
Ura3-52	Oritidin – 5'phosphat Decarboxylase Gen
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
Vol	Volumen

www worl wide web
w/v Gewicht/Volumen

x-gal 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid

YT 455 Hefestamm
YPD Hefe Pepton Glucose
YPS Hefe Pepton Saccharose
YPR Hefe Pepton Raffinose

z.B. zum Beispiel
% Prozent

Symbole für chemische Elemente wurden entsprechend des Periodensystems der Elemente verwendet.

Symbole für SI-Einheiten und SI-Präfixe werden entsprechend den internationalen Konventionen verwendet.

Einführung:

Betreuender Hochschullehrer: **Prof. Dr. med. D. Gulba**

Betreuender wissenschaftlicher Mitarbeiter: **Dr. med. W. Lankes**

Ort der Experimente: **Laboratorium am Max-Delbrück-Centrum in Berlin Buch**

Abstracts / Publikationen: bisher nicht erfolgt und nicht geplant

Herleitung der Fragestellung:

Dr. med. Lankes entwickelte einen neuen Plasmidvektor mit dem Namen pYD mit dessen Hilfe ein Screen zur Identifikation neuer Signalpeptide entwickelt werden sollte. Meine Aufgabe in diesem Projekt war es, über die Konstruktion einer humanen Endothelzell Bibliothek mit Sequenzierung von wenigen Einzelkolonien den Nachweis zu erbringen, dass dieser Vektor tatsächlich in der Lage ist, Signalpeptide und gegebenenfalls neue Moleküle zu identifizieren. Das Ergebnis der Signalpeptidsuche mit dem pYD-Vektor sollte mit einer Mäuse-Embryonen Bibliotheken verglichen werden. Das Gesamtziel des Projektes war es einen Screen zu etablieren, um neue Moleküle mit Signalpeptidsequenz zu finden, um sie dann eventuell therapeutisch einzusetzen wie z.B. in der antiangiogenetischen Therapie.

Um die Funktionsfähigkeit des Plasmids nachzuweisen, wurde eine cDNA-Bibliothek aus Endothelzellen in die NotI Schnittstelle des pYD Plasmids kloniert und eine Plasmidbibliothek hergestellt. Nach der Hefetransformation und Isolierung des Plasmids wurden die cDNA Fragmente isoliert und sequenziert. Mit diesem Verfahren wurden drei Mäuse Embryonen Bibliotheken konstruiert, analysiert und mit der hmEC Bibliothek verglichen:

Das Hefe-Selektionsverfahren hat sich zur systematischen Suche nach sezernierten Proteinen die eine Signalpeptidsequenz aufweisen als grundsätzlich effizient erwiesen. Im Vergleich zu den etablierten Methoden bietet das Hefe Invertase System keine überragenden Vorteile.

Das Verfahren wurde in Zusammenarbeit von anderen wissenschaftlichen Mitarbeiter am MDC parallel mit Mäuse Plazenta, Mäuse Embryonen und an Tumorgewebe durchgeführt. Es konnte der Nachweis, der Eignung des pYD-Vektors zur Suche nach Molekülen mit Signalpeptidsequenz, erbracht werden.

I. Einleitung

Aus Durchblutungsstörungen der großen Gefäße oder der Mikrozirkulation resultieren Krankheiten wie z. B. die koronare Herzerkrankung, Herzinfarkt, Schlaganfall oder die periphere arterielle Verschlusskrankheit der Extremitäten. Im Verständnis der Pathophysiologie dieser Erkrankungen wurden in den letzten zwei Jahrzehnten wesentliche Fortschritte gemacht, was zum Einsatz von neuen wirkungsvollen Therapieansätzen führte. Diese neuen therapeutischen Strategien verfolgen drei Ziele: (1) Veränderung der Biologie von kardiovaskulären Erkrankungen; (2) Interventionen während der ischämischen Phase und (3) die Modifikation der Gewebesituation in der post-ischämischen Phase (Dzau et al., 1997).

Blutgefäße bestehen aus Endothelzellen - die einen direkten Kontakt zum Blut haben - glatten Muskelzellen, Fibroblasten, der Basalmembran und extrazellulärer Matrix (Griffioen et al., 2000). Endothelzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der homöostatischen Balance der Gefäße, indem sie Faktoren produzieren, die den Gefäßtonus, die Blutgerinnung, das Zellwachstum, den Zelltod und die Chemotaxis beeinflussen. In der Mikrovaskulatur sind zudem Perizyten an diesen Regulationsprozessen beteiligt.

Die Zelle erhält durch ihre Nachbarzellen (parakrin), aus dem Organismus (endokrin) oder auch durch einen zelleigenen Rückkopplungsmechanismus (autokrin) Informationen, die einerseits den Zelltod, andererseits die Proliferation, Differenzierung und die Migration dieser Zelle regulieren und die Beteiligung dieser Zelle am Aufbau eines Organs oder ihre Rolle im Gesamtorganismus steuern. Diese Information wird über sezernierte Polypeptide wie z. B. mitogene Faktoren, Überlebensfaktoren, zytotoxische Faktoren, Neuropeptide, Hormone und über deren Rezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt (Klein et al., 1996). Diese Signalmoleküle müssen somit aus der Zelle durch die Zellmembran herausgeschleust werden, um an ihrem Wirkort gelangen zu können. Dieser Sekretionsweg wird für die meisten bekannten Proteine über eine aminoternale Sequenz, bekannt als Signalpeptid, vermittelt (von Heijne et al., 1985). Das Signalpeptid ist somit charakteristisch für sezernierte Proteine, Transmembranproteine und Rezeptoren.

Da solche Signalübertragungsmoleküle nicht nur für den Bereich der Angiogenese (siehe nächstes Kapitel) sondern auch in vielen anderen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen bedeutsam sind, ist es seit langem ein Bestreben der molekularbiologischen

Forschung, ein System zu entwickeln, welches eine effiziente Selektion für sezernierte Proteine oder Rezeptorproteine erlaubt.

In einer Vorarbeit von Herrn Dr. med. Lankes, mein wissenschaftlicher Betreuer, wurde das Selektionsplasmid pYD entwickelt. Als Ausgangspunkt für die Vektorkonstruktion wurde der E.coli/-Hefe Shuttlevektor pYEUra3 benutzt. In diesem Plasmid wurde das Hefegen *suc2* (Invertase-Gen) kloniert. Im Invertase-Gen wurden zuvor Startcodon und Signalpeptid deletiert und eine neue, einmalige Restriktionsstelle NotI an Stelle des Startcodons geschaffen. Danach wurde dieses Konstrukt in den Bakteriophagen Lamda Zap II kloniert, der eine *in vivo* Exzision des Plasmids ermöglicht.

Mit Hilfe dieses Vektors war es möglich, Genbanken aus beliebigen Geweben oder Zellen auf sezernierte Proteine zu untersuchen. Hierzu wurde eine gröbenselektionierte (400 - 1000 bp) random-primed cDNA Bibliothek in die NotI Schnittstelle kloniert und mittels *in vivo* Exzision des Bakteriophagen eine Plasmidbibliothek hergestellt. Diese Plasmide wurden in einen Hefestamm transfiziert, dessen Invertase-Gen durch Mutation inaktiviert worden war. Plattiert man die so transformierte Hefe auf einem Selektionsmedium aus, das als einzige Kohlenhydratquelle Saccharose enthält, so ist die für die Metabolisierung notwendige Spaltung des Zuckers nur solchen Hefeklonen möglich, die in der Lage sind, das Enzym Invertase zu sezernieren. Eine Sekretion erfolgt aber nur dann, wenn das Enzym sich auf das Plasmid im Leserahmen mit einem hydrophoben Signalpeptid aus der inklonierten cDNA befindet.

1. Vaskulogenese / Angiogenese

Die Entwicklung des kardiovaskulären Systems erfolgt in einer frühen Phase der embryonalen Entwicklung und ist essentiell für ein normales Wachstum. Eine wichtige Komponente der vaskulären Ontogenese ist die Differenzierung und Entwicklung der Endothelzell und Endokardzellpopulationen, welche sich dann zum komplexen System der Arterien, Kapillaren und Venen formieren. Zwei unterschiedliche Prozesse sind an der embryonalen Gefäßbildung beteiligt: die Vaskulogenese, die Neubildung von Gefäßen aus *in situ* differenzierten Endothelzellen und die Angiogenese, die Neubildung größerer Gefäße aus bereits bestehenden Blutkapillaren (Noden et al., 1989; Poole et al., 1989; Risau, 1991 und 1995). Die Angiogenese führt typischerweise zu einer Vaskularisation von Organen wie zum Beispiel des Gehirns und der Nieren, während die Vaskulogenese zu der Entwicklung des größeren Gefäßnetzwerkes führt. Dazu gehört die Ausbildung der dorsalen Aorta, der Blutinseln, des Endokards, der Leber

und der Nabelschnurgefäße (Baldwin, 1996). Während die Angiogenese sich sowohl im Embryo als auch im erwachsenen Organismus wie z. B. in der Wundheilung und Tumorwachstum abspielt (Folkman et al., 1995), findet die Vaskulogenese nur im embryonalen Stadium statt.

Die Endothelzellen sind die Zellen, die das angiogenetische Programm initiieren, aber nicht alleine vervollständigen können. Dafür bedarf es der Mithilfe der Perizyten und glatter Muskelzellen. Während der vaskulären Myogenese stabilisieren diese Zellen die entstehenden Gefäße, indem sie die Endothelzellproliferation und Migration inhibieren und die Bildung der extrazellulären Matrix stimulieren (Carmeliet et al., 2000). Eine weitere wichtige Funktion der muralen Zellen ist der Schutz der neuen Gefäße vor traumatischer Ruptur und Regression (Benjamin et al., 1998). Diese Zell-Zell-Interaktion zwischen den Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Perizyten ist maßgebend für den Erhalt der Gefäße.

1.1 Wachstumsfaktoren

In den letzten Jahren wurden einige Wachstumsfaktoren identifiziert, die an der Angiogenese beteiligt sind: acidic- und basic Fibroblast Growth Factor (aFGF und bFGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor α und β (TGF- α und TGF- β), Prostaglandin E2 (PGE2), Tumor Necrosis Factor (TNF- α), Angiogenin und Interleukin-8 (Folkman et al., 1987 und 1992; Klagsbrun et al., 1991). Sie sind entweder parakrin oder autokrin aktiv und vermitteln ihre Effekte über Membran Rezeptoren. Viele dieser Rezeptoren gehören der Tyrosinkinase Rezeptorfamilie an, wobei einige von ihnen spezifisch von Endothelzellen exprimiert werden (Mustonen et al., 1995).

Die Regulation der Angiogenese wird wesentlich von folgenden Faktoren bestimmt: Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), TGF- β 1, bFGF, die Tie-1 und Tie-2 Rezeptoren, Angiopoetin 1 und Angiopoetin 2, $\alpha_v\beta_3$ Integrin und bestimmte Gerinnungsfaktoren. Unter diesen Faktoren ist der wichtigste Wachstumsfaktor in der Regulation der Vaskulogenese und Angiogenese das VEGF mit seinen Rezeptoren (Beck et al., 1997).

VEGF wurde 1983 von Dvorak und Kollegen entdeckt (Senger et al., 1983). Die VEGF Ligandenfamilie besteht mittlerweile aus sieben Proteinen: VEGF-A, PlGF (Placenta Growth

Factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F (Ferrera, 1999; Ogawa et al., 1998; Eriksson et al., 1999; Persico et al., 1999; Meyer et al., 1999, Roy et al., 2006). VEGF-A, PlGF, VEGF-B und VEGF-E üben ihre Effekte vornehmlich auf vaskuläre Endothelzellen aus. VEGF-C und D binden an lymphatische Zellen (Kaipainen et al., 1995).

VEGF-E wurde aus dem Genom des Parapoxvirus und das VEGF-F aus Schlangengift entdeckt. Das Parapoxvirus infiziert Tiere wie z.B. Schafe, Ziegenböcke und nur gelegentlich Menschen. VEGF-E verursacht bei den infizierten Tieren Hautläsionen mit extremer Gefäßproliferation und bindet an VEGFR-2 und an Neuropilin-1 Rezeptor. Das neue VEGF-F wurde als siebtes Protein aus Schlangengift entdeckt und bindet selektiv an VEGFR-2. 50 % der Struktur ist mit dem VEGF-A 165 identisch. (Roy et al., 2006).

Während der embryonalen Entwicklung wird VEGF-A in der Nähe von Endothelzellen überexprimiert und induziert parakrine Effekte (Dumont et al., 1995). Die meisten Zelltypen im adulten Organismus können ebenfalls unter bestimmten Umständen VEGF-A produzieren, um die Angiogenese zu fördern. Hypoxie wie z. B. in Myokardischämie, Arteriosklerose und Tumorwachstum vermag, die VEGF-A-Expression zu induzieren (Folkman, 1995). Als Mediator dient das „Hypoxia-Inducible Factor-1 α “, indem es unter Hypoxie an die VEGF-A Promotor Region bindet und so zu einer erhöhten VEGF-A Transkription führt (Tammela et al., 2005). Die Transkription von VEGF mRNA wird zudem von einer Anzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie z. B. Platelet-Derived Growth Factor-BB, Epidermal Growth Factor, TNF alpha, Transforming growth Factor-beta1 (TGF- β 1) und Interleukin1- β induziert (Veikkola et al., 1999). Als Resultat des alternativen Splicings eines Gens auf Chromosom 6 (Mattei et al., 1996) existiert das originale humane VEGF (VEGF-A) in mehreren Isoformen mit Polypeptiduntereinheit von jeweils 121, 145, 165, 183 189 und 206 Aminosäuren. Das VEGF-A 165 spielt die größte Rolle bei den VEGF-A Reaktionen. Die VEGF-A Expression ist essentiell für die Embryogenese, da VEGF-A Knockout-Mäuse in frühen Embryonalstadien starben. Weitere Studien zeigen, dass VEGF-A 165 die größte Rolle unter den Isoformen spielt (Ferrera et al., 2003).

Das PlGF besteht aus vier Isoformen (PlGF-1, PlGF-2, PlGF-3, PlGF-4) und bindet an VEGFR-1. PlGF-2 und PlGF-4 binden an Heparan-Sulfat-Proteoglycan und das PlGF-2 bindet zusätzlich an Neuropilin-1 und 2 (Tjwa et al., 2003). Die Effekte auf das Gefäßsystem werden direkt über eine komplexe Signalbindungskaskade vermittelt. Zusätzlich führt die Aktivierung des VEGFR-1 zu einer VEGF-A vermittelten Angiogenese (Auterio et al., 2003).

Das humane VEGF-B besteht aus zwei Isoformen (VEGF-B167 und VEGF-B186) und bindet an VEGFR-1 und Neuropilin-1. Zusätzlich bindet noch das VEGF-B167 an Proteoglycan Heparan-Sulfat. Die exakte biologische Wirkung in vivo ist bisher nicht endgültig erforscht worden (Roy et al., 2006). Es gibt jedoch Hinweise, dass VEGF-B eine Rolle in der Myokardentwicklung und in der Angiogenese spielt (Bellomo et al., 2000, Mould et al., 2003).

VEGF-C und D sind sowohl an der Angiogenese als auch an der Lymphangiogenese maßgeblich beteiligt und üben ihre Effekte primär über VEGFR-2 und 3 (Karkkainen et al., 2004, Baldwin et al., 2005)

Die VEGF Rezeptoren 1 - 3 gehören zu den Tyrosin Kinase Rezeptoren der PDGF Rezeptor Familie, die aus sieben immunoglobulinähnlichen Einheiten im Extrazellulärraum, einem Liganden-Bindungs-Abschnitt und einer Tyrosin Kinase Bindungsstelle im Intrazellulärraum besteht: VEGFR-1 /Flt 1 (fms-like tyrosine kinase 1) besitzt eine hohe Bindungsaffinität für VEGF-A, VEGF-B und PlGF. VEGFR-2 / Flk1 / Kdr (fetal liver kinase 1 / kinase insert domain containing receptor) hat eine hohe Affinität für VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D. VEGFR-3 (Flt 4) bindet VEGF-C und VEGF-D (Neufeld et al., 1999) (s. Abb. I.1). Die Semaphorin Rezeptoren Neuropilin-1 und Neuropilin-2 sind weitere Rezeptoren, die mit einer niedrigen Affinität selektiv VEGF₁₆₅, VEGF-B, PlGF-2 und VEGF-C binden. Neuropilin-1 erscheint als Co-Rezeptor für VEGFR-2, der bei der Bindung von VEGF₁₆₅ hilft und deren biologische Aktivität potenziert (Soker et al., 1998, Klagsbrun et al., 2002). Es ist noch unklar, ob Neuropilin-1 als Co-Rezeptor für VEGFR-1 agiert. Das Proteoglykan-Heparansulfat hat eine Bindungsaffinität zu VEGF₁₄₅, _{165,189}, PlGF-2 und VEGF-B₁₆₇ und reguliert damit die Interaktion mit deren Rezeptoren und darüber auch deren biologische Aktivität (Neufeld et al., 1999).

VEGFR-1 und -2 werden bevorzugt auf vaskuläre Endothelzellen exprimiert (Shibuya et al., 1999). Während der Embryogenese wird VEGFR-3 sowohl auf vaskulärem als auch auf lymphatischem Endothel exprimiert. Später findet die Expression nur noch auf lymphatischem Endothel statt (Korpelainen et al., 1998).

Unter Hypoxie wird die Anzahl des VEGFR-1 direkt über das „Hypoxia-Inducible-Factor“ erhöht. Eine Zunahme des VEGFR-2 wird ebenso unter Hypoxiebedingungen beobachtet. Der genaue Mechanismus ist jedoch unklar. Die hypoxieabhängige Regulation des VEGFR-3 konnte jedoch nur unter in vitro Bedingungen nachgewiesen werden. Die VEGFR-1,-2,-3 sind für die Entstehung des kardiovaskulären Systems essentiell, da die Embryonen früh an mangelnder Bildung eines Gefäßnetzes versterben. Das Lymphsystem, das vom Vorhandensein des VEGFR-3 abhängig ist, ist in diesem frühen Stadiums des Todes der VEGFR-3 defizienten

Embryonen noch nicht voll entwickelt. Neuropilin-Rezeptor-Defizienz führt ebenso zum Tod der Embryonen, da hier auch ein defektes Gefäßnetz gebildet wird (Olsson et al., 2006).

Tie-1 und Tie-2 (Tek) sind zwei weitere endothelspezifische Rezeptortyrosinkinasen, die während der Vaskulogenese exprimiert werden (Sato et al., 1993). Studien mit Tie-1 defizienten Tieren führten zu der Auffassung, dass Tie-1 wichtig für die Endothelzeldifferenzierung und Gefäßintegrität sei (Sato et al., 1995). Tie-1 defiziente Embryonen starben perinatal an inneren Blutungen und Ödemen. Studien mit Tie-2 defizienten Mäusen führten ebenfalls zum Tod der Embryonen, wobei die dorsale Aorta rupturiert war, das Herz sich ohne Trabekeln entwickelte und die Endothelzellen eine generelle Defizienz zeigten (Dumont et al., 1994). Angiopoetin-1 ist der aktivierende Ligand für Tie-2, Angiopoetin-2 übt inhibierende Effekte aus (Davis et al., 1996).

Neben den beschriebenen Proteinen ist jedoch als sicher anzunehmen, dass noch viele weitere unbekannte Rezeptoren und sezernierte Moleküle existieren, welche die Angiogenese beeinflussen (Folkman et al., 1995). Darüber hinaus gibt es verschiedene Hinweise für die Existenz anderer Moleküle, die ebenfalls auf Endothelzellen wirken und an der Angiogenese beteiligt sind (Hanahan et al., 1997).

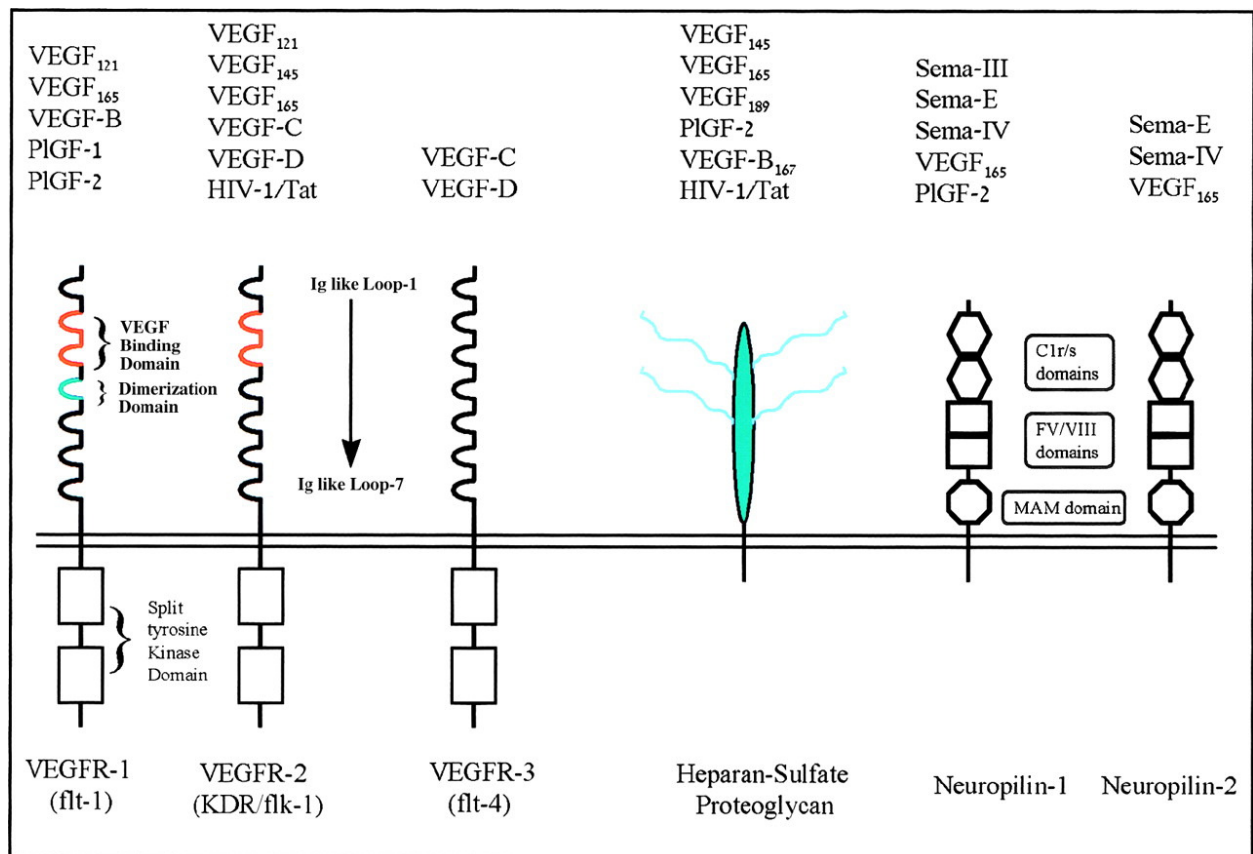


Abb. I.1 (Neufeld, 1999)

Wachstumsfaktoren und Rezeptoren der VEGF Familie

Dargestellt sind die drei Tyrosin-Kinase Rezeptoren der VEGF Familie (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3), Neuropilin-1 und Neuropilin-2 und das VEGF bindende Proteoglycan Heparan-Sulfat. Das Proteoglycan Heparan-Sulfat und die Neuropiline haben in Abwesenheit der Tyrosin Kinase Rezeptoren keine biologische Aktivität. Weiterhin werden noch die verschiedenen Isoformen der VEGF Familie und die Semaphorine (sema), die an Neuropiline binden, dargestellt. Das VEGF-B wird in zwei Isoformen produziert, aber nur das VEGF-B₁₆₇ bindet an Heparan-Sulfat.

2. Proteintransport

2.1 Transportwege

Die eukaryote Zelle ist in verschiedenen, membranbegrenzte Kompartimente wie den Nukleus, das endoplasmatische Retikulum (ER), Peroxisomen, Mitochondrien und Chloroplasten unterteilt. Die Proteine werden bis auf einige Ausnahmen, die in Mitochondrien oder

Chloroplasten gebildet werden, im Zytosol synthetisiert. Damit Proteine in den Kompartimenten, deren Membranen und im Außenraum der Zelle ihre Funktion ausüben können, müssen sie durch Lipidmembranen an diese Orte gelangen.

Ausgehend vom Beginn der Synthese im Zytoplasma lassen sich zwei Hauptwege der Proteinverteilung unterscheiden. Ein Weg führt über die vollständige Translation der mRNA im Zytoplasma und eine weitere Sortierung, die sich anschließt. Die Bestimmungsorte dieses Weges sind die Mitochondrien und Chloroplasten einschließlich ihrer Subkompartimente, der Nukleus, und das Zytoplasma. Die Mehrzahl der extrazellulären Proteine gelangt über den zweiten Weg der Proteinverteilung an ihren Zielort. Die zentrale Station dieses Weges ist das ER (Rapoport et al., 1992, Walter et al., 1994). Auch hier beginnt die Translation im Zytoplasma.

Während der Translation bindet zunächst das SRP, Signal-Erkennungs-Partikel, an das Signalpeptid der wachsenden Peptidkette und delegiert das Ribosomen-Peptidketten-SRP-Komplex an die Membran des ER. Hier bindet das SRP an den SRP Rezeptor, der am Translokationsprotein „Translokon“ lokalisiert ist und führt anschließend über eine GTP abhängige Reaktion zum Lösen des Komplexes. Das SRP löst sich vom Komplex und kann so wieder andere Peptidketten zur ER-Membran delegieren. Am Translokon findet gleichzeitig die Translation und Translokation der Peptidkette in das Lumen des ER oder der Einbau in die Membran des ER statt (Cotranslationale Translokation). Damit aus einer Peptidkette ein funktionsfähiges Protein entsteht, bedarf es einer spezifischen Modifikation und einer anschließenden Qualitätskontrolle. Der Hauptort der Proteinentstehung und Modifikation ist das ER: Die ER-Membran besitzt ein großes Protein, das Translokon, das für den Transport der Peptidkette in das Lumen des ER dient. Das Translokon besteht aus einer α -Untereinheit, die zehnfach die Membran durchspannt, einer β - und einer γ -Untereinheit. Die Modifikation beginnt schon bei der Translokation der Peptidkette und ist abhängig vom Signalpeptid und Stop-Transfer-Peptid, die schließlich entweder zu einem löslichen Protein oder Membranprotein führen. Wird z.B. das Signalpeptid früh durch die Peptidase abgespalten, wird die Peptidkette komplett in das Lumen des ER eingefädelt und führt schließlich zu einem löslichen Protein nach Abschluß der weiteren Modifikation. Die Membranproteine werden über das abspaltbare Signalpeptid und Stop-Transfer-Peptid modifiziert. Dabei bindet zunächst das Signalpeptid an den Translokon und abhängig von der Anzahl der Signal-Transfer-Peptide entstehen die unterschiedlichen Membranproteine. Es gibt fünf Gruppen an Membranproteine die jeweils einen Membrananker besitzen: Typ I, Typ II, Typ III, Proteine mit einem GPI Anker und tail-anchored-Proteine. Die tail-anchored-Proteine z.B. haben jeweils ihren Membrananker innerhalb

der letzten 50 Aminosäuren und der N-Terminus ist zytosolisch lokalisiert. Die anderen unterscheiden sich jeweils an der Lokalisation des N-Terminus und an der Länge der Ektodomäne. Eine weitere große Gruppe an Proteinen sind die Membranproteine mit multiplen Ankern, die jeweils in drei Gruppen eingeteilt werden. Die weitere Modifikation der Proteine wird jeweils über Bildung von Disulfidbrücken, Bindung von Zuckerresten am N-Terminus, Interaktion mit den Enzymen des ER und Kalzium erreicht. Dieser Prozess wird „Protein Folding“ genannt: Disulfidbrücken werden durch die Protein Disulfid Isomerase und das Protein ERp57 katalysiert und führen zu einer Stabilisierung des Proteins. N-Linked Glycolisation (Hinzufügen von Zuckerresten am N-Terminus) wird durch die Oligosaccharyltransferase katalysiert. Durch Glucosidase I und II, UDP-Glycosyltransferase und α -Mannosidase wird der Zuckerrest weiter modifiziert. N-Glycolisation dient als Signalmediator für den Transport des Proteins nach Abschluß des Protein-Foldings aus dem ER zum Golgi Apparat. Im Golgi Apparat kann zusätzlich eine O-Glycolisation stattfinden. Für den Protein-Folding Prozess spielt Kalzium, der durch die Kalzium ATPase aktiv ins ER-Lumen transportiert wird, eine bedeutende Rolle, denn ohne Kalzium sind einige ER-Enzyme nicht funktionsfähig. Eine Niedrigkonzentration an Kalzium führt zur Retention, Aggregation und schließlich zum Abbau des Proteins. Im Protein-Folding-Prozess nehmen die Chaperon Proteine wie z. B. das BIP Protein, Calnexin und Calretikulin eine sehr bedeutende Rolle ein, denn sie sind für die Qualitätskontrolle der Proteine zuständig und führen bei missgebildeten Proteinen zu deren Retranslokation und schließlich zu deren Abbau. Der genaue Mechanismus dieser Retranslokation ist jedoch noch nicht endgültig geklärt worden. Als Qualitätsmerkmal dienen z.B. die Disulfidbrücken, die N-Linked Glycolisation und die Struktur des Proteins. Zwischen dem Folding-Prozess und Abbau der Proteine existiert eine Balance unter normalen physiologischen Bedingungen und wird über drei Transmembranproteine (Ire1, PERK und ATF6) reguliert. Die Proteine können dann im Lumen des ER verbleiben oder, je nach Bestimmungsort, über den Golgi-Apparat weiter zu den Endosomen oder zur Zelloberfläche transportiert werden. Der Export aus dem ER zum Golgi Apparat wird signalvermittelt teilweise in Vesikeln verpackt durchgeführt (van Anken et al., 2005, Shimizu et al., 2007).

Der Proteintransport ist ein dynamischer Prozess, der durch mehrere Faktoren ermöglicht wird. Blobel et al. entdeckten ein ortsbestimmendes Prinzip (Signalhypothese) des Transportes von Proteinen durch Membranen: Sie fanden erstmals ein Strukturmerkmal, das in den zu transportierenden Proteinen vorhanden ist (Blobel et al., 1971). Heute sind eine Reihe dieser „Targeting-Sequenzen“ bekannt. Kurze, hydrophobe Aminosäuresequenzen am N-Terminus,

sogenannte Signalpeptide, bewirken den Transport der Peptidketten in das Lumen des ER. Amphiphatische Sequenzen steuern mitochondriale und chloroplastische Proteine zu den Organellen und bedingen die Lokalisation in den Subkompartimenten (Neupert et al., 1997). Der Proteintransport wird über das ER, Golgi Apparat und Trans Golgi Netzwerk zur apikalen Membran der Zelle befördert. Der apikale Proteintransport ist kein zufälliger Prozess, sondern wird signalvermittelt aktiv durchgeführt (Scheiffele et al., 2000): Als Signalmediatoren für den apikalen Proteintransport dienen z.B. N-Glykolisation, O-Glykolisation, Transmembrandomäne des Proteins und deren Länge, die Proteinstruktur, die Lipidzusammensetzung der apikalen Membran „lipid-rafts“ und Rezeptoren in der Membran. Im Proteintransport zur apikalen Membran spielen die Vesikel und das Zytoskelett als Actin-Motor eine wichtige Rolle. Als Proteine des Actin-Motors sind einige Proteine wie z.B. das Myosin, Polypeptide der Annexin-Familie, Kinesin und Dynein stark beteiligt. Am Andocken und Fusion der Transportvesikel mit der apikalen Membran nehmen die SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) eine besondere Rolle ein. Die Einteilung erfolgt jeweils in vesicle-SNARE und target-SNARE. Angesiedelt auf der Vesikeloberfläche (vesicle-SNARE) sowie dem Zielorganell (target-SNARE) sorgen sie für die korrekte Zuordnung der Verbindung. Die oben beschriebenen Prozesse sind nur Ansätze, um den Proteintransport zu erklären, denn die Mechanismen sind noch nicht endgültig geklärt und bedürfen daher weiterer intensiver Forschung (Delacour et al., 2006).

2.2 Signalpeptide

Das typische Sortiersignal eines Proteins besteht aus einer kontinuierlichen Aminosäuresequenz, die man auch als Signalpeptid bezeichnet. Dessen Funktion ist es, das fertige Protein zu bestimmten Organellen zu befördern. Physikalische Eigenschaften, wie Hydrophobizität oder Plazierung einer geladenen Aminosäure, können jedoch häufig für die Funktion wichtiger sein als die exakte Aminosäuresequenz.

Die Signalpeptide spielen eine zentrale Rolle im Transport von zytosolischen Proteinen zu den Organellen. Ein im Zytosol synthetisiertes Kernprotein bindet mit seinem Signalpeptid an Kernimportrezeptoren, welche das Protein zur Kernpore weiterleiten. Auch beim Transport des Proteins zum ER spielen Signalpeptide eine sehr wichtige Rolle, wobei es sich um hydrophobe Aminosäuren handelt, die auch so an der Translokation beteiligt sind. Das Signalpeptid steuert

das Ribosom zum ER, wo sich dann andere Ribosomen anheften und so Polyribosomen bilden (Neupert et al., 1997). Ein "signal recognition particle" (SRP) aus dem Zytosol bindet an das Signalpeptid und verursacht so eine Verlangsamung der ribosomalen Synthese bis das SRP an seinen Rezeptor in der ER-Membran angedockt hat. Anschließend wird das SRP über eine GTP abhängige Reaktion abgespalten und die Polypeptidkette in das Lumen des ER eingefädelt. Die Proteine können dann im Lumen des ER verbleiben oder, je nach Bestimmungsort, über den Golgi-Apparat weiter zu Endosomen oder zur Zelloberfläche transportiert werden. Das SRP ist eine Ribonukleinprotease und besteht aus 6 Polypeptiduntereinheiten (benannt nach ihren Molekulargrößen-SRP 9, 14, 19, 54, 68, 72) und eine RNA. SRP 54 Untereinheit erkennt die Signalpeptide an der Polypeptidkette und ist zugleich eine GTPase. (Keenan et al, 2001; Doudna et al, 2004).

Nielsen und Mitarbeiter publizierten 1997 eine Arbeit über die Konservierung der Aminosäurezusammensetzung und Struktur von Signalpeptiden anhand einer Untersuchung einer Anzahl verschiedener Signalpeptide verschiedener Organismengruppen.

Dabei zeigte sich, dass ein Signalpeptid typischerweise aus drei Regionen aufgebaut ist. Die Sequenz beginnt mit einem Startcodon und wird dann mit einer kurzen, positiv geladenen n-Region und einer hydrophoben h-Region (7-15 Aminosäuren) fortgeführt. Das Ende bis zur Spaltstelle bildet die ungeladene, polare c-Region. Sie besteht meist aus 6 Aminosäuren bei Eukaryonten und aus 7 Aminosäuren bei Prokaryonten. Im Vergleich zum Rest des Signalpeptides müssen die Aminosäuren der Position -1 und -3 der c-Region (in Beziehung zur Spaltungsstelle) mit kleinen und ungeladenen Resten besetzt sein (-3,-1 Regel nach von Heijne, 1985), damit die Spaltungsstelle richtig identifizierbar wird.

3. Selektionsmethoden für extrazelluläre Proteine und Membranproteine

3.1 Alternative Selektion

Die Zellproliferation wird über komplexe Interaktionen zwischen den einzelnen Zellen reguliert, wobei an den Regulationsmechanismen eine hohe Anzahl verschiedener Proteine beteiligt sind. Diese Proteine werden durch ihre cDNA codiert. Jede cDNA ist lediglich für ein Protein spezifisch. Zur Identifizierung dieser Proteine werden immunologische Methoden eingesetzt, bei denen Antikörper gegen das entsprechende Protein angewendet werden.

Da das Signalpeptid ein gemeinsames Merkmal von extrazellulären Proteinen und Membranproteinen darstellt, wurden auch die Signalpeptide benutzt, um nach solchen Proteinen zu suchen. Die Signalpeptidmethode ist in der Lage, Proteine ohne Kenntnis der Funktion zu identifizieren und ist nicht nur spezifisch auf ein Molekül anwendbar. Damit eignet sich diese Methode ideal, um bisher unbekannte sezernierte – oder Membranproteine in Zellextrakten zu finden.

Gemeinsam ist den verschiedenen Selektionssystemen die Fusion von cDNA-Fragmenten mit einem Reportergen und die Ausnutzung der ortsbestimmenden Wirkung des Signalpeptids auf die Lokalisation des chimären Proteins. Eine Methode basiert darauf, einen exportdefekten Membranrezeptor (Fusion des IL-2 Rezeptor Protein mit Signalpeptid und einklonierter cDNA) in COS-Zellen an die Zelloberfläche zu dirigieren. Der Nachweis des Rezeptors erfolgt dann immunologisch mit dem entsprechenden Antikörper gegen den IL-2 Rezeptor (Tashiro et al., 1993; Shirozu et al., 1996). Ein ähnlicher Ansatz wurde verwendet, um Pflanzen auf sezernierte Proteine zu untersuchen (Kristoffersen et al., 1996) oder statt IL-2 Rezeptor wurde der CD4-Rezeptor benutzt (Imai et al., 1996). In einer anderen Veröffentlichung wird die Verwendung einer Protease als Reportergen in COS-Zellen vorgeschlagen. Als Indikator für Proteaseaktivität im Medium dient ein Fibrin-Platten-Test (Yokohama-Kobayashi et al., 1995).

1996 wurde durch Klein et al. ein alternatives Hefesystem, basierend auf dem Invertasegen, publiziert. Das System erlaubt eine einfache, positive Selektion einer großen Anzahl von cDNA-Klonen. Es erkennt ebenfalls die Signalpeptide in der Hefe.

3.2 Hefe Invertase Selektion

Viele Proteine werden über eine amino - terminale Sequenz, die auch Signalpeptid genannt wird, durch die Membran geschleust. Da die meisten Proteine eine terminale Signalpeptid - Sequenz besitzen, wurde diese Eigenschaft ausgenutzt, um nach neuen Genen zu suchen, die für solche Signalpeptide codieren. Um eine spezifische Selektion durchführen zu können, war es von großer Bedeutung ein Protein zu finden, dass für das Überleben der Zelle essentiell ist. Ein solches Enzym ist die Invertase, die durch den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* sezerniert wird. Dieses Enzym ist für diesen Hefestamm lebensnotwendig, weil es extrazellulär Saccharose in Glukose und Fruktose spaltet, die dann der Zelle als Energie- und Kohlenstoffquelle dienen und so ein Wachstum der Hefe fördern.

Das jeweilige Gen, das für das Enzym Invertase codiert, heißt *suc2* Gen. Der in dem Selektionsverfahren benutzte Hefestamm YT 455 besitzt ein deletiertes *suc2* Gen und ist somit nicht in der Lage auf saccharosehaltigem Selektionsagar zu wachsen. Diese Auxotrophie kann durch ein Expressionsplasmid mit intaktem *suc2* Gen komplementiert werden.

Zur Selektion für Signalpeptide wird ein Plasmid pYD mit einem defekten *suc2* Gen ohne Signalpeptidsequenz und Startcodon verwendet. An dessen Stelle werden 400 – 1000 bp große cDNA-Stücke aus der humanen Endothelzellbibliothek in das Plasmid kloniert. Diese Plasmide können die Auxotrophie des verwendeten Hefestamms komplementieren, da sie dann ein funktionelles Protein mit Signalpeptid codieren, das aus der Zelle als funktionstüchtiges Invertaseprotein transportiert wird und so der Hefe das Wachsen ermöglicht. Die so isolierten cDNAs werden anschließend sequenziert und analysiert.

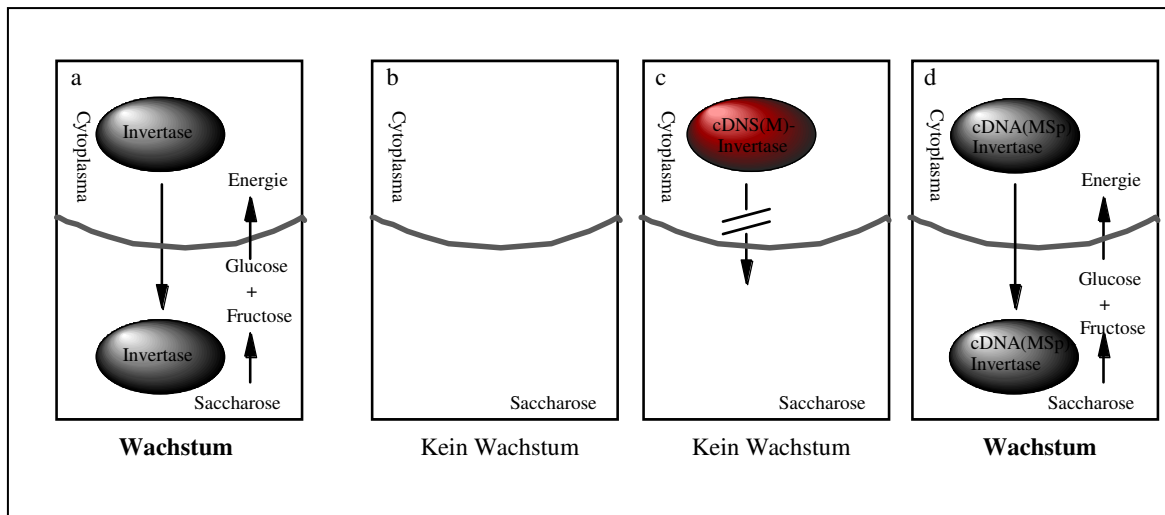


Abbildung I.2 : Prinzip der Selektion nach Klein *et al.* (1996)

- In Wildtyp Hefezellen wird Invertase sezerniert und spaltet extrazellulär Saccharose in Fructose und Glucose; diese können als Kohlenstoff- und Energiequelle aufgenommen werden.
- Transformation von YT 455 mit pYD ohne inklonierte cDNA. Aufgrund des fehlenden Startcodons wird kein Protein translatiert.
- Transformation von YT 455 mit pYD mit inklonierter cDNA (=pYDc), die kein Signalpeptid codiert. Abhängig davon, ob die cDNA ein Startcodon mit folgendem offenen Leserahmen besitzt wird ein cytoplasmatisches Fusionsprotein oder kein Protein gebildet. In beiden Fällen findet kein Wachstum statt.
- Transformation von YT 455 mit pYD mit inklonierter cDNA (=pYDc), die für ein Signalpeptid codiert. Befinden sich Signalpeptid und Invertase im gleichen Leserahmen so wird ein Fusionsprotein sezerniert. Saccharose wird hydrolysiert und Wachstum kann erfolgen

4. Ziel der Arbeit und Fragestellung

Eine einzelne Zelle bezieht Informationen aus ihrer Umgebung, die bestimmt ob sie z.B. differenzieren, proliferieren, wandern oder absterben sollen. Es sind eine Reihe von Faktoren bekannt (siehe auch Kapitel 1), die im Signalprozess zwischen verschiedenen Zellen wichtige Aufgaben übernehmen. Viele der sezernierten Polypeptide, sind z.B. Wachstumsfaktoren, Hormone, Neuropeptide und die zugehörigen Membranrezeptoren. Neben den Signaleigenschaften kommt sezernierten Proteinen auch im Aufbau der extrazellulären Matrix eine wichtige Bedeutung zu. Die sezernierten Proteine müssen dabei durch die Zellmembran transportiert werden, um an ihrem Wirkort gelangen zu können. Dieser Sekretionsweg wird für

die meisten Proteine über ein Signalpeptid vermittelt. Auf dieser Erkenntnis basierend sollte nun ein einfaches, praktikables und universelles Screeningverfahren zum Auffinden neuer sezernierter Proteine mit Signalpeptidsequenz entwickelt werden. Das Screeningverfahren beruht auf dem Enzym Invertase, welches in einer sezernierten Form für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* notwendig ist, um Saccharose als Energiequelle metabolisieren zu können. Der benutzte Hefestamm YT 455 besitzt ein deletiertes *suc2* Gen, das für das Enzym Invertase codiert und ist somit nicht in der Lage auf saccharosehaltigem Selektionsagar zu wachsen. Daraufhin wurde der Selektionsplasmid pYD mit einem defekten *suc2* Gen ohne Signalpeptid und Startcodon entwickelt. Dieser Plasmid mit inklonierter cDNA, der dann ein Signalpeptid und Startcodon enthält, kann so die Auxothrophie des Hefestamms komplementieren, indem ein funktionstüchtiges Invertaseprotein gebildet wird, das dann Wachstum auf saccharosehaltigem Selektionsagar ermöglicht (s. Abb. I.2). Die so gewonnenen Klone können dann sequenziert und analysiert werden.

Ziel dieser Arbeit ist die Rolle des neuentwickelten pYD-Vektors bei der Entwicklung eines Selektionssystems zum Screening von cDNA Bibliotheken auf sezernierte Proteine und Membranproteine darzustellen. Die Überprüfung der Sensitivität und Spezifität des Systems sollte mit einer humanen Endothelzellbibliothek im Vergleich zu Mäuseembryonen Bibliotheken durchgeführt werden. Gleichzeitig sollten neue Moleküle, welche eventuell Kontrollfunktion in der Angiogenese ausüben, gefunden, identifiziert und charakterisiert werden.

II. Materialien

1.1 Chemikalien, Enzyme und Nährmedien mit Zusätzen

1.1.1 Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien werden in den Versuchsprotokollen ausführlich erwähnt. Soweit nicht anderes beschrieben ist, wurden die Chemikalien von Sigma oder Merck (Darmstadt) bezogen.

1.1.2 Enzyme

Enzyme	Herkunft
DNase	Boehringer
T4 Polymerase	NEB
M-MLV Reverse Transkriptase	BRL
E. coli Polymerase I	NEB
E. coli Ligase	NEB
Lyticase	Sigma
T4 Ligase	Boehringer, NEB
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	USB
RNase H	Boehringer
RNase A	Boehringer
Taq Polymerase	BRL

1.1.3 Restriktionsenzyme

Enzym	Erkennungsstelle	Puffer NEB	Temperatur	Herkunft
NotI	5'GC↓GGCCGC3'	3	37°C	NEB
SaII	5'G↓TCGAC3'	SaII Puffer	37°C	NEB
XhoI	5'C↓TCGAG3'	2 oder 3	37°C	NEB

1.1.4 Nährmedien

Die Herstellung der Medien erfolgte mit demineralisiertem Wasser. Die Bestandteile werden in Wasser gelöst und für 20 min bei 120 °C mittels Dampfsterilisationsverfahren autoklaviert.

Zur Herstellung von festen Medien erfolgte die Zugabe von jeweils 15 g Agar / l.

Nährmedien für *E.coli*

LB-Broth

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH 7,0 mit NaOH	

SOB-Medium

Bactotrypton	2 %
Hefe Extrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgSO ₄	10 mM
MgCl ₂	10 mM

SOC-Medium

Bactotrypton	2 %
Hefe Extrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgSO ₄	10 mM
MgCl ₂	10 mM
Glucose	20 mM

Diese Salze werden erst nach dem Autoklavieren zugefügt.

NZY-Medium

NaCl	5 g/l
MgSO x 7 H ₂ O	2 g/l
Hefe Extrakt	5 g/l
NZ-Amine (Caseinhydrolysat)	10 g/l
pH 7,5	

NZY Topagar

NaCl	5 g/l
MgSO x 7 H ₂ O	2 g/l
Hefe Extrakt	5 g/l
NZ-Amine (Caseinhydrolysat)	10 g/l
Agar 0,7 %	

NZCY-Medium

NaCl	5 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 g/l
Hefe Extrakt	5 g/l
NZ-Amine (Caseinhydrolysat)	10 g/l
# Casamino Acids	2 g/l pH 7,5

Casamino Acids werden aus einer steril filtrierten 20 % Stammlösung nach dem Autoklavieren zugegeben.

Nährmedien für Saccharomyces cerevisiae

YPD-Medium

Hefe Extrakt	10 g/l
Pepton	20 g/l
Glucose	20 g/l

YPS-Medium

Hefe Extrakt	10 g/l
Pepton	20 g/l

Saccharose 20 g/l
Antimycin A 2 µg/ml (Endkonz.)
Bromkresol-Purpur 2 µmg/ml (Endkonz.)
nach dem Autoklavieren zufügen.

YPR-Medium

Hefe Extrakt 10 g/l
Pepton 20 g/l
Raffinose 20 g/l
Antimycin A 2 µg/ml (Endkonz.)
Bromkresol-Purpur 2 µmg/ml (Endkonz.)
nach dem Autoklavieren zufügen.

SD Uracil-freies Medium

Hefestickstoffbasis
ohne Aminosäure 6,7 g/l
Glucose 20 g/l
nach dem Autoklavieren zufügen:
Ura-dropout-Mix 10 ml/l

1.1.5 Zusätze zu den Nährmedien

Ura-dropout Mix 100x

Adenin 2 g/l
Tryptophan 2 g/l
Histidin 2 g/l
Leucin 2 g/l
Lysin 2 g/l steril filtrieren, bei -20°C lagern

IPTG

Stammlösung 0,1 M in H₂O, steril filtrieren, bei -20 °C lagern
2 ml pro 1 l Medium zufügen (Endkonz.: 0,2 mM)

X-Gal

Stammlösung 20 mg/ml in Dimethylformamid, bei -20 °C lagern

2 ml pro 1 l Medium (Endkonz.: 40 µg/ml)

Bromkresol-Purpur

Stammlösung 2 mg/ml in H₂O, steril filtrieren, bei -4 °C lagern

1 ml pro 1 l Medium (Endkonz.: 2 µg/ml)

Antibiotika

Antibiotikum	Abkürzung	Konzentration µg/ml	Lösungsmittel
Antimycin A		2	Ethanol
Ampicillin	Ap	100	20% Ethanol
Kanamycin	Km	25	H ₂ O
Tetracyclin	Tc	20	H ₂ O

1.2 Puffer und Lösungen

* Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde demineralisiertes Wasser verwendet.

* Anschließend werden die Puffer autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen hergestellt.

* Der pH Wert wird, sofern nicht anders beschrieben, mit NaOH oder HCl eingestellt.

1.2.1 Puffer zur Herstellung von kompetenten Zellen

TB-Puffer

PIPES	10 mM
MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
pH Wert mit KOH auf pH 6,7	

1.2.2 Enzym-Puffer

NEB-Puffer 1 1x

Bis Tris Propane-HCl pH 7,0	10 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM

NEB-Puffer 2 1x

Tris-HCl pH 7,9	10 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM
NaCl	50 mM

NEB-Puffer 3 1x

Tris-HCl pH 7,9	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM
NaCl	100 mM

NEB-Puffer 4 1x

Tris-Acetat pH 7,9	20 mM
Magnesiumacetat	10 mM
DTT	1 mM
Kaliumacetat	50 mM

NEB-Puffer Sall 1x

Tris-HCl pH 7,9	10 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM
NaCl	150 mM

T4-DNA-Ligase-Puffer 1x (Stratagene)

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
MgCl ₂	7 mM
DTT	1 mM

T4-DNA-Ligase-Puffer 1x (NEB)

Tris-HCl pH	7,5 50 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	10 mM
ATP	1 mM
BSA	25 µg/ml

PCR-Puffer

Tis-HCl pH 8,8	67 mM
MgCl ₂	2 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	16 mM
BSA	170 µg/ml
DTT	16 mM

5 x Erststrang Puffer (BRL)

Tris-HCl pH 7,5	250 mM
KCl	375 mM
MgCl ₂	15 mM

Zweitstrang-Puffer

Tris-HCl pH 7,5	80 mM
KCl	240 mM
MgCl ₂	10 mM
BSA (MB-grade)	130 µg/ml

ATP-Lösung

ATP	100 mM
Tris-HCl Puffer pH 7,5 auffüllen	

1.2.3 Puffer und Lösungen für die Isolierung von DNA und RNA

Hefe-Minipräp Lösung I

D-Sorbitol 1,2 mM

EDTA 1 mM

Tris-HCl pH 8,0 20 mM

vor Gebrauch Lyticase 1000 U/ml (Endkonzentration) zugeben

Hefe Minipräp Lösung II

NaOH 200 mM

SDS 1 %

Hefe Minipräp Lösung III

Kaliumacetat 3 M

pH 5,7 mit Eisessig einstellen

E.coli Minipräp Lösung

Qiagen Kit-Lösungen P1, P2, P3 (siehe unten)

TE-Puffer

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA 0,1 mM

pH 8,0

Phenol / Chloroformlösung (Roth, Karlsruhe)

Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol = 25:24:1

Phenol ist redestilliert und in TE-Puffer pH 7,5 äquilibriert.

Trizol-Lösung (GibcoBRL)

Phenol

Guanidine Isothiocyanat

SSC-Lösung 20x

NaCl 3 M

Na₃Citrat 0,3 M

pH 7,0

Na-Acetat-Lösung

Na-Acetat 3 M

pH 5,2 mit 100 % Essigsäure einstellen

Lösungen aus Qiagen Kits

Puffer 1 (Resuspendierungspuffer)

RNase 100 µg/ml

Tris-HCl 50 mM

EDTA 10 mM

pH 8,0

Puffer 2 (Lyse - Puffer)

NaOH 200 mM

SDS 1 %

Puffer 3 (Neutralisierungspuffer)

Kaliumacetat 3 M

pH 5,5

QBT-Puffer (Eqzilibrierungs-Puffer)

NaCl 750 mM

MOPS 50 mM

Ethanol 15 %

Triton X-100 0,15 %

pH 7,0

QC-Puffer (Wasch-Puffer)

NaCl 1 M
MOPS 50 mM
Ethanol 15 %
pH 7,0

QF-Puffer (Elutionpuffer)

NaCl 1,25 M
Tris-HCl 50 mM
Ethanol 15 %
pH 8,5

L2-Puffer

Polyethylenglycol 6000 30 % (w/v)
NaCl 3 M

L3 Puffer

NaCl 100 mM
Tris-HCl pH 7,5 100 mM
EDTA 25 mM

L4 Puffer

SDS 4 %

L5 Puffer

Kaliumacetat 3 M
pH 5,5

1.2.4 Elektrophoresepuffer und Lösungen

1 x TAE-Puffer

Tris-Acetat 40 mM
EDTA 1 mM
pH 8,3

1 x TBE-Puffer

Tris 75 mM

Borsäure 25 mM

EDTA 0,1 mM

pH 8,9

DNA Ladungspuffer

Harnstoff 4 M

Saccharose 50 %

Bromphenol-Blau 0,1 %

EDTA (pH 8) 50 mM

RNA Ladungspuffer

MEN-Puffer 10x 15 %

Formaldehyd 37 % 20 %

Formamid 63,5 %

Ethidiumbromid 10 mg/ml 1,5 %

Bromphenol-Blau 0,1 %

Färbebad

1 µg Ethidiumbromid / ml demineralisiertes Wasser

DNA- Agarosegel-Lösung

100 ml TAE oder TBE-Puffer

x g Agarose für ein x %iges Gel

MEN-Puffer 10x

MOPS 41,9 g

Na-Acetat 4,1 g

EDTA 3,72 g

mit Wasser auf 1000 ml auffüllen

pH 7,0 mit NaOH einstellen

RNA-Gel

Agarose	0,75 g
DEPC-Wasser	37 ml
10x MEN Puffer	5 ml
37 % Formaldehyd	8,3 ml

1.2.5 Puffer und Lösungen für Northern Blot

10 x SSC (Transferlösung)

NaCl	1,5 M
Na ₃ -Citrat	0,15 M
pH 7,0	

Vor-Hybridisierungslösung

Formamid	50 %
NaCl	1 M
SDS	1 %
Dextransulfat	1 %
Lachsspermien-DNA	100 µg/ml

Wasch-Lösung I

SSC 2x
SDS 0,1 %

Wasch-Lösung II

SSC 0,2x
SDS 0,1 %

1.2.6 Sonstige Puffer

PBS-Puffer

NaH ₂ PO ₄	10 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
NaCl	145,4 mM

SM-Puffer

NaCl	5,8 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 g/l
1 M Tris-HCl pH 7,5	50 ml/l
2 % Gelatinesg.	5 ml/l

DEPC-Behandlung von Lösungen

Diethylpyrocarbonat (DEPC, Sigma) dient zur Zerstörung von RNAsen, die ubiquitär auf Oberflächen und in den Lösungen vorhanden sind. Die Endkonzentration der Lösungen mit DEPC beträgt 0,1 %. Die Lösung wird 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Autoklavieren wird dann DEPC inaktiviert. Substanzen mit freien Aminogruppen können nicht mit DEPC behandelt werden (z.B. Tris).

2. Bakterienstämme, Hefestämme und DNA – Moleküle

2.1 Bakterienstämme

2.1.1 Escherichia coli

Escherichia coli K12	relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
XL1-Blue MRF'	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proAB, lacI ^q ZΔM15, Tn10 (tet)];	Stratagene USA Jerpseth, 1992
SOLR™	sbcC, recB, recJ, uvrC, umuC::Tn5 (Kan ^r) lac gyrA96, relA1, thi-1, endA1, λ ^R [F'proAB, lacI ^q ZΔM15]; Su ⁻ (nonsuppressing)	Stratagene USA

2.2 Hefestämme

2.2.1 Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae	relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
YT 455	suc2Δ9, ade2-101, ura3-52	Dr. D.Botstein (Stanford Univ.) Kaiser <i>et al.</i> , 1987 ; Boeke <i>et al.</i> , 1987

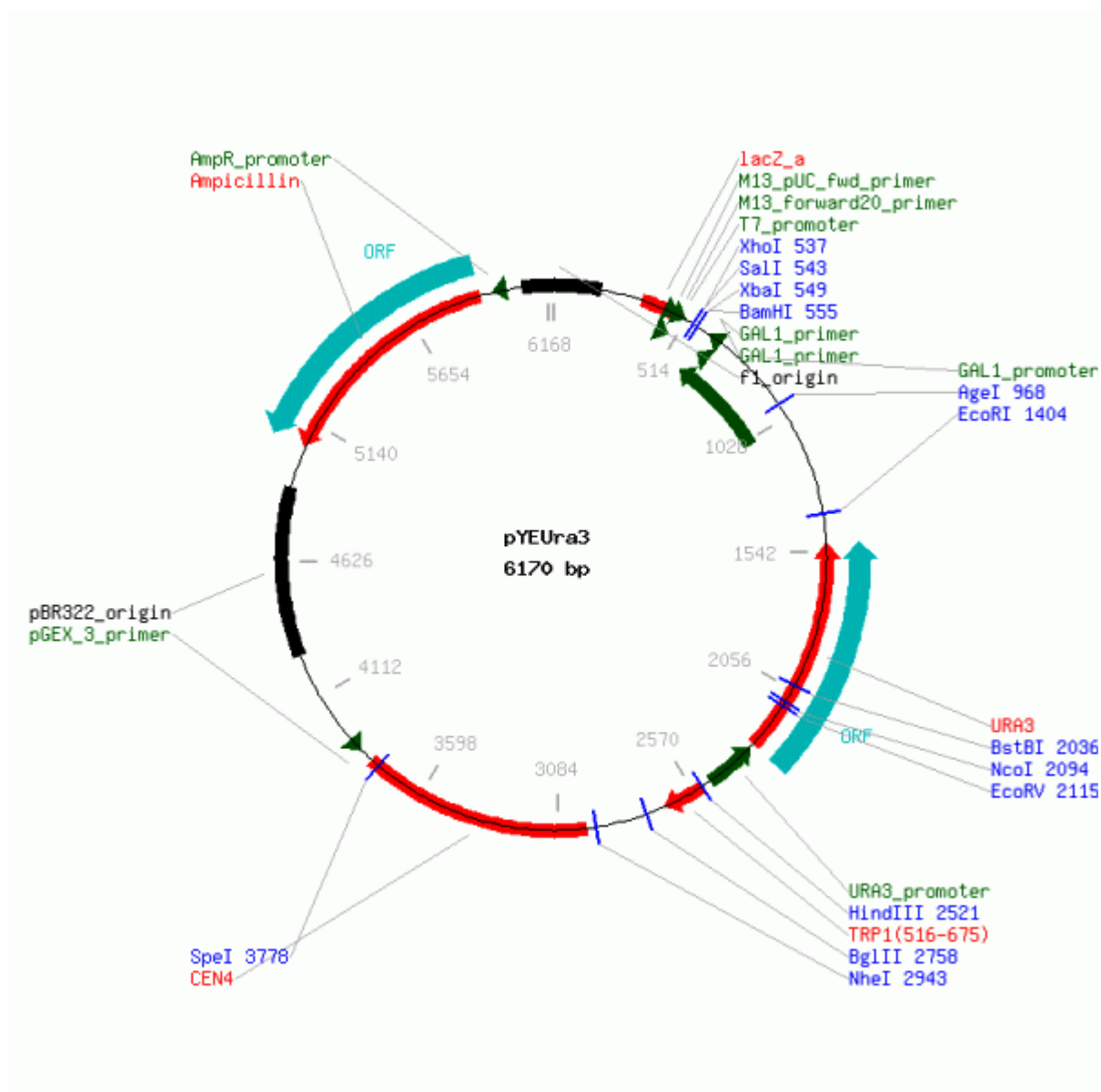
Saccharomyces cerevisiae (Bäckerhefe) sind einzellige, eukaryontische Organismen, mit einem Durchmesser von ca. 3-5 µm. Sie besitzen 16 Chromosomen von denen eine detaillierte Genkarte existiert und die vollständige Sequenz bekannt ist. Saccharomyces cerevisiae vermehrt sich durch eine als Zellsprossung (budding) bezeichnete asymmetrische Zellteilung. Diploide Zellen können durch Sporulation vier haploide Sporen liefern.

2.3 DNA – Moleküle

2.3.1 Plasmide

2.3.1.1 Das pYEura3-Plasmid

Der E. coli-Hefe Shuttlevector pYEura3 wurde von der Firma Clontech bezogen. Er besitzt eine Ampicillin-Resistenz für die Selektion in E. coli sowie das Ura 3 Gen für die Selektion in S. cerevisiae. Es enthält jeweils eine XhoI und eine Sall Schnittstelle.



2.3.2 Phagen

2.3.2.1 λ ZapII-Phage

1. Der λ ZapII-Phage stammt von der Firma Stratagene.
2. Die Selektion erfolgt über Blau/Weiß Farbenidentifikation unter der Anwendung von IPTG und X-gal.
3. Die Zelllinie als Wirt dient XL1-Blue MRF' (E. coli).
4. Eine in vivo Exzision von Plasmiden mittels Ex Assist™ M13 Helferphage ist möglich.

2.3.2.2 Ex Assist™ M13 Helferphage

Der Ex Assist™ M13 Helferphage wurde ebenfalls von der Firma Stratagene bezogen und wurde zur in vivo Exzision von integriertem Plasmiden im λ ZapII Phage benutzt:

Die in vivo Exzision dient der Exzision des λ pYDc-Phagemids aus dem Bakteriophagen. Dazu werden XL1 Blue Zellen mit λ pYDc (Phagenbibliothek) und dem ExAssist Helferphagen coinfiziert (Short *et al.*, 1988).

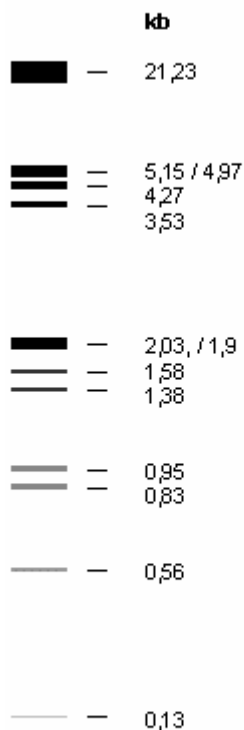
In den *E. coli* Zellen schneiden M13-Proteine an der Initiatorstelle der f1-ori-Region das λ -Genom und beginnen mit der Replikation einzelsträngiger DNA-Moleküle bis zur Terminatorstelle. Es erfolgt eine vielfache Vermehrung der durch die λ Phagen in die XL1-Blue-Zellen gebrachten Phagemide und ihrer cDNA-Inserts. Die einzelsträngigen Phagemide werden nach ihrer Zirkularisierung in M13-Phagen verpackt und aus den Bakterien geschleust. Die λ Phagen dagegen können die Zellen infolge ihres unterbrochenen Genoms nicht verlassen. Mit der M13-Phagenbibliothek wird *E. coli* SOLR (resistent gegenüber λ) infiziert. Aufgrund einer Amber Mutation kann der ExAssist Helferphage in dem Nicht-Suppressor-Stamm nicht replizieren. Nur die Phagemide werden stabil repliziert. Zellen mit dem pYDc-Phagemid können aufgrund der vom Phagemid codierten Ap-Resistenz selektioniert werden.

2.3.3 Oligonukleotide

Bezeichnung	Moleküle	Herkunft
sucsf	5' aacaatctctgttcttgc 3'	Invitek Berlin
sucsr	5' ttttcatcgtaccaccacc 3'	Invitek Berlin
sucsf* für Sequenzierungen	5' aacaatctctgttcttgc 3', fluoreszenzmarkiert 800nm	MWG
sucsr* für Sequenzierungen	5' ttttcatcgtaccaccacc 3', fluoreszenzmarkiert 700nm	MWG
NotI-Linker	5' agcggccgct 3' (phosphoryliert)	Stratagene
randomSal	5' tcccgattgaattctagacctgcgtcgacnnnnn 3'	MWG

DNA-Molekulargewichtsmarker

DNA Marker: λ HindIII/EcoRI DNA-Fragmente, Schematische Darstellung der DNA-Fragmente in einem 1 % igem Agarosegel.



III. Methoden

Versuchsablauf:

Die Versuchsprotokolle, die zur Bearbeitung des Themas verwendet wurden, sind entweder kommerziell erhältlich gewesen oder stammen aus dem Laborbuch von Sambrook, Fritsch und Maniatis (1989). Alle Protokolle werden in diesem Kapitel ausführlich beschrieben.

Der Versuchsablauf zur Konstruktion einer cDNA Bibliothek wird folgend in übersichtlicher Form dargestellt:

1. Die Zellen werden zunächst in ihren Einzelbestandteilen aufgelöst. Anschließend wird durch Zentrifugation eine Phasentrennung herbeigeführt. Die Gesamt-RNA des Materials kann dann als einzelne Phase gewonnen werden. Als Isolationskit ist es kommerziell erhältlich und basiert auf das Prinzip der Phenolextraktion nach Chomczynski et al., 1987.
2. Die mRNA Isolierung erfolgt über das PolyAtract® mRNA Isolation System von Promega®, das die poly(A) Region am 3`Ende der mRNA als Selektionsbasis benutzt.
3. Im nächsten Schritt wird aus der mRNA eine cDNA Bibliothek konstruiert. Die einzelnen Enzyme und Puffer werden jeweils kommerziell bezogen. Zunächst wird aus der mRNA eine cDNA synthetisiert. Im ersten Schritt erfolgt die Erststrangsynthese, die einen komplementären DNA-Strang an die mRNA synthetisiert. Hierbei werden Oligonukleotide mit einer SalI-Erkennungssequenz und einer Zufallssequenz (Zufallprimer) und das Enzym Reverse Transkriptase verwendet. Anschließend erfolgt die Synthese des zweiten DNA Stranges, wobei zunächst Strangbrüche in den RNA Strang des DNA/RNA-Hybrids durch die E. coli RNase H herbeigeführt werden. Die entstandenen RNA-Fragmente dienen dann als Primer für die DNA Polymerase I, die dann den zweiten komplementären DNA Strang an den ersten Strang synthetisiert. Die Strangbrüche in der doppelsträngigen DNA (cDNA) werden durch E. coli Ligase repariert. Die so erhaltene cDNA wird mit T4-Polynukleotidpolymerase behandelt, um glatte Enden zu erhalten. Ein NotI Linker wird anschließend ligiert, um im nächsten Schritt ein NotI und SalI Restriktionsverdau durchzuführen. Die cDNA wird dann gelelektrophoretisch aufgetrennt und die cDNA Fragmente mit einer Größe von 400 - 1000 bp aus dem Gel isoliert.
4. Die cDNA besitzt nun am 5`Ende einen NotI-Überhang und am 3`Ende einen SalI Überhang. Sie wird dann in die NotI und XhoI Schnittstellen von pYD kloniert. Die Ligation von SalI-Überhängen mit den komplementären XhoI-Überhängen führt zu einer Sequenz, die von beiden Enzymen nicht mehr erkannt wird. Eine unmittelbar vor dem 5` Ende des suc2-Gens

vorhandene SalI Schnittstelle kann für die Klonierung der cDNA nicht benutzt werden, da noch eine zweite SalI Schnittstelle im Phagen existiert. Die SalI Schnittstelle vor dem suc2-Gen kann allerdings eingesetzt werden, um das cDNA-Fragment später mit NotI und SalI aus dem Plasmid herauszuschneiden.

5. Die Kontrolle, ob die cDNA in den Vektor wirklich kloniert wurde, wird über die PCR Methode durchgeführt.

6. Der pYD Vektor mit cDNA (pYDc) wird in den Phagen ligiert und in Phagenköpfe verpackt (λ pYDc). Hierzu wird der λ ZapII Phage von Stratagene® benutzt. Anschließend werden XLI-Blue-Zellen (E. coli) mit dem λ pYDc Phagen infiziert. Dieser Schritt dient zur Amplifikation der cDNA.

7. Nach erfolgter Amplifikation wird dann das Plasmid (pYDc) aus dem λ ZapII Phage isoliert. Dies erfolgt über eine in vivo Exzision mittels ExAssist M13 Helferphage. Der schneidet effizient den Selektionsvektor mit integrierter cDNA (pYDc) aus dem Bakteriophagen heraus.

8. Das gewonnene Plasmid cDNA wird nun in den Hefeselektionsstamm YT 455 transformiert. Im ersten Schritt wird die Uracil Selektion durchgeführt, um zunächst das pYD Plasmid, das auf uracilfreiem Medium wachsen kann, selektiv zu isolieren. Denn die Hefe YT 455 kann ohne Zusatz von Uracil nicht wachsen, da sie eine Mutation im ura3-52 Gen besitzt, das für das Enzym Oritidin-5`phosphat Decarboxylase codiert.

9. Im zweiten Schritt erfolgt die Saccharose Selektion, um die Plasmide mit hydrophobem Signalpeptid zu selektionieren. Dazu werden die positiven Uracil Kolonien auf Saccharose Medium überstempelt. Dieses Medium enthält als einzige Kohlenstoffquelle Saccharose, so ist die für die Metabolisierung notwendige Spaltung des Zuckers nur solchen Hefeklonen möglich, die in der Lage sind, das Enzym Invertase zu sezernieren. Die YT 455 Hefe hat eine suc2 - Gen Mutation und kann daher kein funktionierendes Enzym Invertase bilden. Das pYD Genom enthält ein defektes Invertase Gen (suc2-Gen), da zuvor dessen Signalpeptid und Startkodon deletiert wurden und mit einer NotI Schnittstelle versehen wurde. An dieser Stelle kann dann eine cDNA mit Signalpeptid und Startkodon ligiert werden. Eine Sekretion des Enzyms ist nur in Anwesenheit von einem hydrophoben Signalpeptid mit Startkodon bei vollständigem Invertasegen möglich.

Demnach können nur solche Klone wachsen, die ein hydrophobes Signalpeptid mit Startkodon aus der einklonierten cDNA im Leserahmen des Plasmids besitzen.

10. Im nächsten Schritt werden dann die Plasmide über die Hefe Plasmid Minipräparation aus der Hefe isoliert, um anschließend die Plasmid DNA direkt zur Transformation von E. coli

zu verwenden. Denn es gelang nicht, Plasmidpräparationen direkt aus Hefekolonien zu sequenzieren.

11. Über E. coli Plasmid Minipräparation wird das Plasmid isoliert, um anschließend mit NotI und SalI Restriktionsverdau die cDNA herauszuschneiden.

12. Als letzten Schritt erfolgt dann die Sequenzierung.

1. RNA Isolierung

1.1 Gesamt - RNA Isolierung aus Zellkulturen

1.1.a Rothi® Quick Kit von Roth®

Material: Rothi Quick® Kit von Roth®, Karlsruhe. Diese Methode basiert auf der sauren Phenolextraktion nach Chomczynski et al., 1987: Durch Gabe von Phenol Chloroform Gemisch zum Gewebe kommt es zum Auflösen der Zellen. Dabei kommt es zum Ausfallen der Proteine, die anschließend in der phenolischen Phase vorliegen. Durch Zentrifugation wird eine Phasentrennung herbeigeführt. Die RNA Phase stellt sich als oberste Schicht dar. Daraufhin kann man aus dieser Phase die RNA reinigen.

Durchführung:

- 10 ml Roti®Quick Lösung 1 zu 1 g Gewebe hinzufügen und 3 min mittels Ika Ultraturrax Homogenisator homogenisieren.
- Die 2 Phasen der Rothi®Quick Lösung 2 durch Schütteln mischen und anschließend 10 ml von dieser Lösung zum Homogenisat zugeben.
- Vortexen und 15 min auf Eis inkubieren.
- Bei 15000 x g und 4 °C 15 min abzentrifugieren und anschließend die obere wässrige Phase mit RNA abnehmen. Die untere Phase enthält DNA und Protein.
- Obere Phase 40 min bei -20 °C inkubieren.
- Wieder bei 15000 x g und 4 °C 15 min zentrifugieren.
- Pellet mit 3 ml Rothi®Quick 1 lösen und anschließend 1 Volumen Isopropanol zugeben.
- Bei -20 °C 30 min inkubieren, um die RNA zu fällen.
- Bei 15000 x g und 4 °C 10 min zentrifugieren.
- Überstand verwerfen und das Pellet mit 2 ml 70 % Ethanol 10 min waschen und die RNA bei 15000 x g und 4 °C 10 min abzentrifugieren.

- Das RNA Pellet bei RT trocknen.
- Die RNA in 1 ml H₂O auflösen und bei -20 °C lagern.

1.1.b Gesamt RNA Isolierung mit der Trizol®Reagent von GibcoBRL nach Chomczynski et al., 1987

Diese Methode basiert ebenfalls wie oben beschrieben auf der sauren Phenolextraktion.

Durchführung:

1. Homogenisieren

- 1 ml Trizol zu je 3.5 cm große humane Endothel-Zellplatte geben und mehrmals hin und her pipettieren. Dadurch werden die Zellen lysiert.

2. Phasen Aufteilung

- 5 min bei Raumtemperatur inkubieren, um die Nukleoprotein Komplexe aufzulösen.
- 0,2 ml Chloroform pro 1ml Trizol zugeben und 15 sec vorsichtig schütteln.
- 3 min bei RT inkubieren.
- 10 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugieren.
- Es entsteht eine obere wässrige Phase mit der RNA, mittlere Phenol-Chloroform Phase und untere rote Phase.

3. RNA Präzipitation

- Obere wässrige Phase abnehmen und 0,5ml Isopropanol pro 1ml verbrauchtem Trizol zugeben, um die RNA zu fällen.
- 10 min bei RT inkubieren.
- 10 min, bei 4 °C und 12000 x g zentrifugieren.
- Es entsteht ein RNA-Pellet mit Überstand.

4. RNA Waschen

- Überstand verwerfen.
- RNA mit je 1 ml 70 % Ethanol pro 1 ml verbrauchtem Trizol waschen.
- Vortexen und bei 7500 x g und 4 °C 10 min abzentrifugieren
- Überstand verwerfen.

5. RNA Auflösung

- RNA Pellet für 10 min bei RT trocknen.
- RNA in 1ml RNase freies Wasser auflösen.

- RNA bei -20 °C lagern.

1.2 mRNA Isolation

Material: PolyATtract® mRNA Isolation System von Promega®

Die meisten Eukaryonten Zellen produzieren mRNA mit einem poly(A) Region am 3'Ende der mRNA. Daher benutzt dieses System ein Biotin-oligo(dT)-Primer, der mit dem poly(A) der mRNA hybridisiert. Der mRNA Komplex mit Biotin Oligo(dT) wird wiederum an Streptavidin Partikel gebunden und anschließend mittels eines Magneten aus der RNA Lösung isoliert. Nach mehreren Waschschrten mit Salzlösungen wird die mRNA mit Wasser eluiert (s.Abb. III.1). Grundvoraussetzung ist ein ribonukleasefreies Arbeiten.

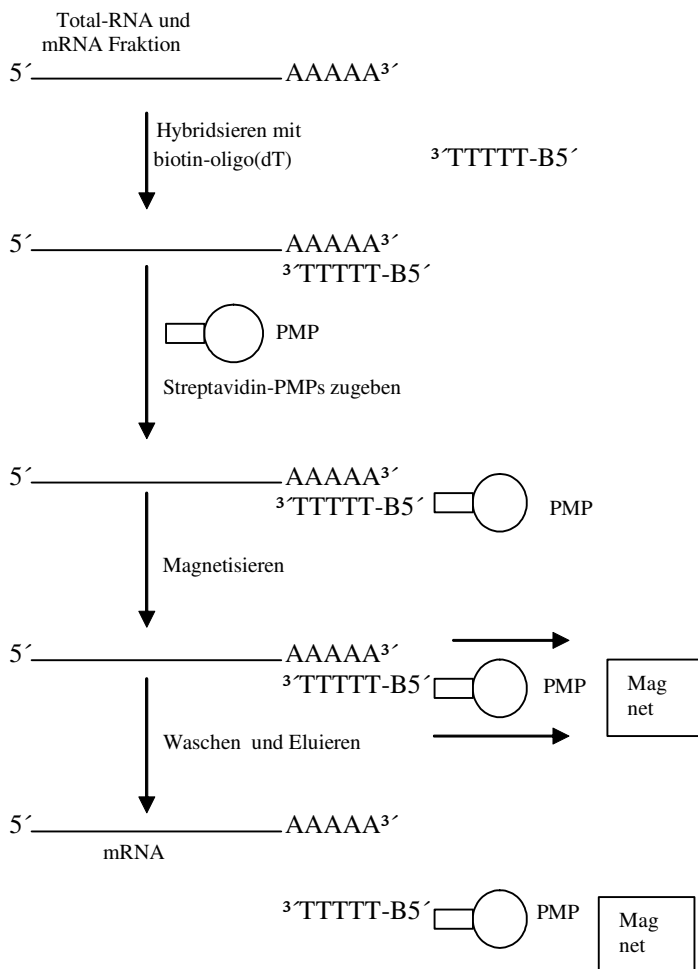


Abb.III.1 : Schematische Darstellung der mRNA Isolation

Durchführung:

1. Proben Vorbereitung

- 1 mg total RNA in 500 µl RNase freies Wasser auflösen.
- Bei 65 °C 10 min erhitzen.
- Zur Probe 3 µl oligo(dT) und 13 µl 20x SSC zugeben.
- Schütteln und 10 min bei RT inkubieren.

Währenddessen Herstellung von 0,5x SSC und 0,1x SSC:

- 0,5 x SSC=30 µl 20x SSC + 1,170 ml H₂O
- 0,1 x SSC=7 µl 20x SSC + 1,393 ml H₂O

2. Waschen der Streptavidin Para Magnet Partikel (SA-PMP)

- Partikeln am Magneten aufsammeln und Überstand verwerfen.
- 3 mal mit jeweils 300 µl 0,5x SSC waschen.
- SA-PMPs in 100 µl 0,5x SSC resuspendieren.

3. Reaktion

- Probe mit der RNA zu den Partikeln geben.
- 10 min bei RT inkubieren und jeweils jede Minute kurz schütteln.
- SA-PMP mit dem Magneten aufsammeln und Überstand verwerfen.
- 4 mal mit je 0,1x SCC waschen und dabei die SA-PMP immer aufsammeln.
- Überstand verwerfen.

4. Elution

- Die SA-PMP in 100 µl H₂O auflösen.
- SA-PMP aufsammeln und die wässrige Phase mit der mRNA in ein neues Eppendorfgefäß geben.
- SA-PMP in 150 µl auflösen und wieder aufsammeln.
- Wässrige Phase zu den anderen 100 µl H₂O zugeben.

Insgesamt ist die mRNA in 250 µl aufgelöst.

5. mRNA Fällung

- 1 Vol Isopropanol=250 µl zugeben.
- 0,1 Vol NaAc=25 µl jeweils zur mRNA zugeben.
- o/n bei -20 °C inkubieren.

6. Wiederaufreinigung

- mRNA bei 13000 rpm und 4 °C 20 min abzentrifugieren.
- Pellet mit 100 % EtOH waschen.

- Pellet mit H₂O auflösen und 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugieren.
- Überstand verwerfen.
- mRNA in 20 µl H₂O auflösen.

2. cDNA Bibliothek Konstruktion

2.1 cDNA Synthese modifiziert nach Gubler und Hoffmann (1983)

In diesem Kapitel wird die cDNA Konstruktion beschrieben, die aus mehreren Einzelschritten besteht.

a. Erststrangsynthese

Im ersten Schritt wird zunächst ein komplementärer DNA-Strang an die mRNA gebildet. Die Initiation wird durch ein Zufallsprimer (Oligonukleotide) gestartet, um den Anteil an 5' Genbereichen im Gegensatz zu oligodT-geprimter cDNA zu erhöhen. Zusätzlich befindet sich noch eine SalI Erkennungsstelle, die es erlaubt später die cDNA direkt in den Vektor zu ligieren. Das Enzym Reverse Transkriptase ist für die Synthese verantwortlich.

Durchführung:

- Füge zu 85 µl mRNA jeweils 5 µl random SalI-Primer 5 µg/µl hinzu.
- Mischen und 10 min bei 65 °C inkubieren.
- Dann auf Eis jeweils 30 µl Erststrang-Puffer, 7,5 µl dNTPs je 10 mM, 15 µl 100 mM DTT und 7,5 µl M-MLV Reverse Transkriptase zugeben.
- Mischen und vorerst 10 min bei RT und dann 1h bei 37 °C inkubieren.

Dabei entsteht ein mRNA/DNA Hybrid.

b. Zweitstrangsynthese

Im nächsten Schritt wird der zweite DNA Strang komplementär an den ersten DNA Strang synthetisiert. Dabei werden Strangbrüche in den RNA Strang des DNA/RNA-Hybrids durch die E. coli RNase H herbeigeführt. Die entstandenen RNA-Fragmente dienen dann als Primer für die DNA Polymerase I, die dann den zweiten komplementären DNA Strang an den ersten Strang synthetisiert. Die Strangbrüche in der doppelsträngigen DNA (cDNA) werden durch E. coli Ligase repariert. Anschließend wird die cDNA mit der Phenol/Chloroform Lösung extrahiert, um im nächsten Schritt die cDNA zu fällen und in Wasser aufzulösen.

Durchführung:

- Auf Eis direkt zum Erststrang jeweils 150 µl Zweitstrang Puffer 2,5x, 7,5 µl RNase H (Boehringer 1 U/l), 19 µl DNA Polymerase I (NEB 10 U/l), 5 µl E.coli Ligase, NAD⁺ 50 mM und 43 µl H₂O zugeben.
- 4 h bei 16 °C inkubieren.
- 3 µl T4-DNA Polymerase hinzufügen und 5 min bei 16 °C inkubieren.
- Auf Eis 10 µl 0,5 M EDTA zugeben, um die Reaktion zu stoppen.
- 375 µl Phenol/Chloroform zugeben, vortexen und 5 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugieren.
- Obere Phase mit cDNA abnehmen und 1 Vol Chloroform-Isoamylalkohol zugeben, vortexen und 5 min bei 12000 x g, 4 °C abzentrifugieren. Obere Phase enthält die cDNA.
- Reextraktion wird durch Zugabe von 150 µl TE-Puffer und Zentrifugation für 5 min bei 13000 x g, 4 °C erreicht.
- Obere Phase mit der cDNA abnehmen.
- cDNA wird mit jeweils ½ Vol 8 M NH₄-Acetat und 2,5 Vol 100 % EtOH, -20 °C gefällt.
- Sofort 20 min bei 12000 x g und 20 °C zentrifugieren.
- Pellet mit 500 µl 70 % EtOH waschen und 5 min bei 12000 x g und 4 °C abzentrifugieren.
- cDNA-Pellet 10 min trocknen und in 15 µl TE-Puffer auflösen.

Als Ergebnis entsteht eine doppelsträngige, komplementäre DNA (cDNA), die wie oben beschrieben aus der mRNA synthetisiert wird.

c. Blunting (Auffüllen der Enden mit der T4-Polymerase)

Um glatte Enden zu bekommen, wird die cDNA mit T4 Polymerase behandelt.

Durchführung:

- Jeweils 15 µl cDNA- Lösung, 2 µl Ligase-Puffer ohne ATP (Stratagene), 2 µl dNTP je 1 mM und 1 µl T4-Polymerase (3 U/µl) zugeben.
- 20 min bei 14 °C inkubieren.
- Das Enzym 15 min bei 75 °C inaktivieren.

d. NotI-Linker-Ligation

In diesem Schritt erfolgt die Ligation von NotI in die cDNA

Durchführung:

- 20 µl Blunting-Lösung, 3 µl NotI-Linker 0,5 µg/µl, 1 µl Ligase-Puffer mit ATP (NEB), 2 µl ATP 10 mM, 2 µl T4-Ligase 400 U/µl (NEB) und 2 µl H₂O zugeben.
- Die Ligation erfolgt o/n bei 16 °C.
- Ligase bei 70 °C und 10 min inaktivieren.
- Lösung auf 50 µl auffüllen und mit einer Sephadex G50 Säule aufreinigen.

Im Ergebnis hat man nun eine cDNA mit jeweils SalI und NotI Restriktionsstellen geschaffen.

e. NotI-SalI-Restriktion

In diesem Ansatz wird ein Restriktionsverdau mit SalI und NotI durchgeführt.

Durchführung:

- 52 µl Säuleneluat mit cDNA, 32,5 µl H₂O, 10 µl SalI Puffer, 1 µl BSA 100x (NEB), 3 µl SalI (20 U/µl), 1,5 µl NotI (50 U/µl) zugeben.
- Reaktion 3,5 h bei 37 °C inkubieren.
- Mit 150 µl Phenol/Chloroform extrahieren. 5 min bei 12000 x g und 20 °C zentrifugieren und mit 150 µl TE-Puffer reextrahieren. Dabei entsteht 230 µl cDNA-Lösung.
- Im nächsten Schritt die cDNA mit 2,5 Vol 100 % EtOH = 580 µl und ½ 8 M NH₄-Acetat = 115 µl fällen. Sofort 20 min bei 12000 x g und 20 °C abzentrifugieren.
- cDNA-Pellet trocknen und in 10 µl TE-Puffer lösen.

f. cDNA Größenselektionierung

Die cDNA wird auf einem Agarosegel aufgetragen und im Bereich zwischen 400 – 1000 bp herausgeschnitten und aufgereinigt.

Durchführung:

- 10 µl cDNA auf ein 1,4 % Agarosegel auftragen.
- Gelstück im Bereich von 400 - 1000 bp unter UV-Licht ausschneiden.
- Gelstück mit dem QIAEX-Kit aufreinigen und in 10 µl H₂O lösen.

g. cDNA Ligation in Vektor pYD

In diesem Schritt wird die cDNA in den Selektionsvektor pYD ligiert. Die cDNA enthält am 3' Ende einen SalI Überhang und am 5' Ende einen NotI Überhang. Sie wird in die NotI und XhoI Schnittstelle von pYD kloniert. Die Ligation von SalI-Überhängen mit den komplementären XhoI-Überhängen führt zu einer Sequenz, die von beiden Enzymen nicht mehr erkannt wird. Eine unmittelbar vor dem 5' Ende des suc2-Gens vorhandene SalI Schnittstelle kann für die Klonierung der cDNA nicht benutzt werden, da noch eine zweite SalI Schnittstelle im Phagen existiert. Die SalI Schnittstelle vor dem suc2-Gen kann allerdings eingesetzt werden, um das cDNA-Fragment später mit NotI und SalI aus dem Plasmid herauszuschneiden.

Durchführung:

- Zu 10 µl cDNA 1 µl pYD, 1,5 µl Ligase-Puffer und 1,5 µl Ligase 1 Weiss U/µl (Boehringer) geben.
- 2 x o/n bei 4 °C inkubieren.

Nun ist die cDNA im Selektionsvektor pYD integriert und wird pYDc genannt.

h. in vitro Verpackung der Ligation in Phagenköpfe

Im nächsten Schritt erfolgt die Amplifikation der cDNA über eine Klonierung des Plasmids in den Bakteriophagen Lambda ZapII. Der Phage kann dann Bakterien infizieren und so zu einer Vermehrung der Phagen mit der integrierten cDNA in hohem Ausmaß führen. Der Bakteriophage mit Plasmid und cDNA wird λpYD genannt.

Durchführung:

- Zu 15 µl Verpackungsmix (Gigapack® III Gold Packaging Extraktion, Stratagene) 5 µl cDNA mit pYD zum Verpackungsmix geben.
- 110 min bei RT inkubieren.
- 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform zur Reaktion geben.
- Kurz zentrifugieren.
- Dann Phagen Titer bestimmen: 1 µl Phagen-cDNA, 200 µl XLI-Blue-Zellen zusammengeben. 15 min bei 37 °C inkubieren und dann auf 3 ml NZY-Topagar ausplattieren.
- Die Bibliothek Amplifikation erfolgt durch Zugabe von jeweils 500 µl Phagen-cDNA und 600 µl XLI-Blue-Zellen. 15 min bei 37 °C inkubieren. Dann anschließend 6,5 ml NZY-Topagar zugeben.

- Auf 140 mm² Platten ausplattieren.
- 6 - 8 h bei 37 °C inkubieren. Es sollte nicht mehr als 50000 Plaques pro Platte sein und die einzelnen Plaques sollten nicht größer als 2 mm im Durchmesser sein.
- Als nächstes muss das Phagenlysat gewonnen werden: Topagar abkratzen und in einem Becherglas schütten, 0,5 Vol SM-Puffer zugeben und 30 min rühren. Mehrfach bei 5000 x g und 4 °C 10 min lang zentrifugieren, bis man ein klares Lysat bekommt.
- Phagentiter des cDNA- λpYD-Lysats bestimmen.

Als Ergebnis bekommt man eine Vermehrung des λpYD.

2.2 In vivo Exzision

Die in vivo Exzision dient der Exzision des pYDc Phagemids aus λpYD. Dazu werden XL1 Blue Zellen mit λpYD (Phagenbibliothek) und dem ExAssist Helferphagen coinfiziert (Short *et al.*, 1988).

In den *E. coli* Zellen schneiden M13-Proteine an der Initiatorstelle der f1-ori-Region das λ-Genom und beginnen mit der Replikation einzelsträngiger DNA-Moleküle bis zur Terminatorstelle. Es erfolgt eine vielfache Vermehrung der durch die λ Phagen in die XL1-Blue-Zellen gebrachten Phagemide und ihrer cDNA-Inserts. Die einzelsträngigen Phagemide werden nach ihrer Zirkularisierung in M13-Phagen verpackt und aus den Bakterien geschleust. Die λ Phagen dagegen können die Zellen infolge ihres unterbrochenen Genoms nicht verlassen. Mit der M13-Phagenbibliothek wird *E. coli* SOLR (resistent gegenüber λPhage ZapII) infiziert. Aufgrund einer Amber Mutation kann der ExAssist Helferphage in dem Nicht-Suppressor-Stamm nicht replizieren. Nur die Phagemide werden stabil repliziert. Zellen mit dem pYDc-Phagemid können aufgrund der vom Phagemid codierten Ap-Resistent selektioniert werden.

Durchführung:

Tag 1:

- Zwei Kulturen von XL1-Blue-MRF'-Zellen und SOLR-Zellen in NZY-Medium geben.
- Dann erfolgt die Zugabe von 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ (Endkonzentration).
- Über Nacht bei 30 °C inkubieren.

Tag 2:

- 5 min bei 1000 x g und 4 °C die Zellen abzentrifugieren.

- Zellen in 10 mM MgSO₄ bis ein o.D. 600 von 1,0 wachsen lassen (8×10^8 Zellen/ml).
- Es wird die zehnfache primäre Bibliotheksgröße eingesetzt. Dann wird die λ Phagen Bibliothek, XL1 Blue MRF⁺Zellen und Helferphage ExAssistant im Verhältnis von 1:10:100 wie z.B. Zugabe von 50 μ l λ pYD (10^7 pfu), 125 μ l XL1Blue MRF⁺Zellen (10^8) und 14 μ l Helferphage ExAssistant(10^9 pfu) in einem 50 ml Falcon-Tube zusammengegeben.
- 15 min bei 37 °C inkubieren.
- 20 ml NZY-Medium zugeben und 2,5 h bei 37 °C und 250 rpm inkubieren.
- 20 min bei 65 °C inkubieren.
- 10 min bei 2000 x g und 4 °C Zellreste abzentrifugieren.
- Exzidierter M13 Phage befindet sich im Überstand. Titer des M13 Phagenlysats durch Infektion von 200 μ l SOLR-Zellen mit anschließender Ausplattierung auf LB-Ap-Platten bestimmen (sollte ca. $1-7 \times 10^6$ pfu/ml betragen).
- Eine Anzahl von Apr-SOLR Kolonien auf 140 mm² Platten ausplattieren, die der 10x Bibliotheksgröße entsprechen. Über Nacht bei 37 °C inkubieren.
- Kolonien-Plaques von Platten abkratzen und die Plasmide mit dem Qiagen Tip 500 Säulen isolieren.

Die so gewonnen pYDc Plasmide (Plasmid mit cDNA) können nun direkt zur Transformation von YT 455 eingesetzt werden.

3. PCR - Polymerase Ketten Reaktion

PCR wird alternativ zur Klonierung benutzt, um einzelne DNA Stränge unter in vitro Bedingungen zu amplifizieren. Die Vermehrung der einzelnen DNA erfolgt über Denaturierung, Anlagerung von Primer und davon ausgehende Komplementärstrangsynthese mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase, wobei der dreißigfache Zyklus mehrfach wiederholt wird. Hier wurde die PCR verwendet, um die Klonierung der cDNAs in den Vektoren zu überprüfen. Der Primermix ist ein kommerzielles Produkt (s. Seite 33).

Durchführung:

- Im suc-PCR Ansatz wird jeweils 0,6 μ l MgCl₂ 50 mM, 0,4 μ l dNTPs je 5 mM, 2,0 μ l PCR-Puffer 10x, 0,4 μ l suc^sf/r Primermix je 25 pmol/ μ l und 16,6 μ l H₂O zugegeben.
- Das PCR-Programm erfolgt in mehreren Zyklen:

1. 3 min 95 °C
2. 15 s 95 °C
3. 30 s 56 °C
4. 30 s 72 °C
5. 2 min 70 °C
6. 1 min 4 °C

Die Schritte 2 - 4 werden jeweils 30x durchgeführt.

4. Mikrobiologische Techniken

4.1 Sterilisation

Die Voraussetzung zum Arbeiten mit Reinkulturen ist die Sterilisation der Kulturgefäße, Nährlösungen und Geräte. Dies bedeutet das Abtöten aller möglichen vermehrungsfähigen Partikel. Das Autoklavieren (121 °C, 20 min) und die Sterilfiltration (Schleicher & Schuell Einmal-Filter, Porengröße 0,2 µl) wurden zur Sterilisation verwendet.

4.2 Konservierung

Hefe und Bakterien werden bei -70 °C als 7 %ige DMSO-Kultur eingefroren, dadurch sind sie über längere Zeit haltbar und revitalisierbar.

4.3 Bakterientiterbestimmung (cfu/ml)

Um die Kolonienzahl einer Hefe- / Bakteriensuspension feststellen zu können, wurde zunächst eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100) erstellt. Anschließend werden dann jeweils 100 µl der einzelnen Verdünnungsreihe ausplattiert, die bei bestimmter Temperatur (Hefe 30 °C, Bakterien 37 °C) solange inkubiert werden, bis man einzelne Kolonien sieht. Dadurch ist es dann möglich, die einzelnen Kolonien zu zählen.

4.4 Ausplattierung von Phagen (Sambrook et al., 1989)

In einem Bakterienrasen bilden λ -Phagen einzelne Plaques. Zuerst wird eine Verdünnungsreihe in SM-Puffer angelegt, um danach zusammen mit XL1-Blue MRF' Zellen ausplattiert zu werden.

Durchführung in 50 mm² Platte:

Tag 1:

- XL1 Blue MRF' Zellen in LB-Medium mit Zugabe von 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ (Endkonzentration) o/n bei 37 °C und 250 rpm wachsen lassen

Tag 2:

- Zellen bei 2000 x g und 4 °C 5 min abzentrifugieren.
- 10 mM MgSO₄ zugeben. Resuspendieren bis eine o.D. 600 von 0,5 erreicht ist.
- Dann erfolgt die Zugabe von jeweils 200 μ l Zellsuspension zu den einzelnen Phagensuspensionen in SM-Puffer.
- 15 min bei 37 °C inkubieren.
- 3 ml flüssigem NZY Top-Agar zugeben und schütteln.
- Agar gleichmäßig auf eine NZY-Platte verteilen.
- 6 h bei 37 °C inkubieren, bis die Plaques sichtbar und auszählbar sind.

4.5 Optische Dichte (o.D.) Messung

Das Wachstum von Hefe und Bakterien wird in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Als Referenzwert dient die o.D. von Wasser. Bei einer o.D. 600 von 1 ergibt erfahrungsgemäß für E. coli eine Koloniezahl von $5 - 8 \times 10^8$ cfu/ml. Gegebenfalls wird mit Wasser verdünnt, um in den Arbeitsbereich zu gelangen.

4.6 Reinigung von Einzelkolonien

Es werden einzelne Kolonien ausgestrichen, um diese Kolonien (Population) zu selektionieren.

4.7 Stempeltest zur Charakterisierung von Hefen

Zur Charakterisierung von Hefen und Bakterien ist die Überprüfung des Phänotyps notwendig. Darunter versteht man neben der optisch sichtbaren Merkmalen (Zell-Koloniemorphologie, Farbe) auch die Feststellung der StoffwechsellLeistungen, die Resistenz gegenüber Agenzien (z.B. Antibiotika) oder Wachstumsverhalten bei verschiedenen Temperaturen. Beim Stempeltest werden Hefekolonien mittels eines Replika-Abdrucks von einer Agarplatte auf ein anderes Medium übertragen. Für den Übertrag der Zellmasse wird von den Kolonien ein Abdruck auf Samt gemacht.

5. DNA-Isolierung

5.1 Plasmidisolierung mit dem Qiagen Plasmid Kit

Man kann mit diesem Kit unterschiedliche Mengen an Plasmid-DNA isolieren, wobei das System auf eine modifizierte alkalische Lyse von Birnboim und Doly (1979) und der anschließende Bindung der DNA aus dem Zellysate an ein Anionenaustauscherharz (Vogelstein et al., 1979) basiert. Es werden hier 500 (Maxi) Säulen mit einer Kapazität von 500 µg Plasmid-DNA verwendet.

Durchführung:

- 100 ml LB-Ap o/n-Kultur 10 min bei 10000 x g und 4 °C abzentrifugieren oder Zellen von 10 140 mm² LB-Ap-Platten mit Gummispatel abkratzen.
- Überstand entfernen und Zellpellet in 10 ml Puffer 1 resuspendieren.
- 100 µl RNase zugeben.
- 10 ml Puffer 2 zugeben und 4 - 6 mal invertieren.
- 5 min bei RT inkubieren.
- 10 ml Puffer 3 zugeben und 4 - 6 mal invertieren und 15 min bei RT inkubieren.
- 30 min bei 4 °C, 13000 rpm zentrifugieren.
- Überstand in ein neues Röhrchen geben und nochmal 15 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugieren.
- Qiagen Tip 500 Säule mit 10 ml Puffer QBT equilibrieren.
- Zentrifugationsüberstand durch die Säule durchlaufen lassen.
- Säule mit 30 ml QC-Puffer waschen.

- Plasmid-DNA mit 15 ml QF-Puffer eluieren.
- Mit 0,7 Vol Isopropanol Plasmid-DNA fällen.
- 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugieren.
- Überstand entfernen und DNA - Pellet mit 5 ml 70 % Ethanol waschen.
- Überstand entfernen und Pellet trocknen lassen.
- DNA in 500 µl TE-Puffer lösen.

5.2 Plasmidisolierung mit QiAprep-Spin Plasmid Kit

Die Plasmidisolierung mit dem „QiAprep-Spin Plasmid Kit“ von Qiagen basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979) und der anschließenden Adsorption von DNA an eine Silikat-Matrix in Gegenwart hoher Salzkonzentration (Vogelstein et al., 1979). Man kann mit diesem Kit schnell DNA bis 20 µg aus 1 - 5 ml E. coli Kultur isolieren.

Durchführung:

- 5 ml Kultur 10 min bei 12000 x g abzentrifugieren.
- Pellet in 250 µl Puffer 1 resuspendieren.
- 250 µl Puffer 2 zugeben, mischen und 5 min bei RT inkubieren.
- 350 µl gekühlter Puffer 3 hinzugeben, vorsichtig schütteln und 5 min auf Eis inkubieren
- 10 min bei 12000 x g zentrifugieren.
- QIAprep-Spin-Säule in ein 2 ml Eppendorfgefäß einsetzen.
- Zentrifugationsüberstand auf die Säule geben.
- 1 min bei 12000 x g zentrifugieren.
- 750 µl PE-Waschpuffer zugeben und wieder 1 min zentrifugieren.
- Waschpuffer entfernen und wieder 1 min den restlichen Waschpuffer abzentrifugieren.
- Säule in ein neues Eppendorfgefäß überführen.
- 100 µl TE-Puffer zugeben (pH 8,5).
- DNA-Elution mittels Zentrifugation (30 sec, 12000 x g, 4 °C).
- DNA bei -20 °C lagern.

5.3 λ Phagen-DNA Isolierung (modifiziert nach Sambrook et al., 1989)

Mit dieser Methode werden Phagen-DNA isoliert, wobei man zunächst die Phagen anzüchtet, dann die Phagen lysiert und im letzten Schritt die DNA isoliert.

1. Phagen Anzucht

- Zwei 2 l Kolben mit je 500 ml NZCY-Medium mit je 2 ml NZCY-o/n-Kultur von XL1 Blue MRF' animpfen.
- Bei 37 °C, 250 rpm schütteln bis oD 600 = 0,5.
- Lyse: ca. 10^{10} pfu λ Phagen pro Kolben inokulieren bis Lyse eintritt, wobei es an den sichtbaren Kristallen zu erkennen ist.
- Noch ca. 2 h inkubieren. Lyse Dauer beträgt ca. 5 h.
- Pro Kolben 5 ml Chloroform zusetzen und 10 min weiterschütteln
- Chloroform abgießen.
- 5min bei 4500 x g und 20 °C Zellreste abzentrifugieren.
- 100 μ l DNase 10 mg/ml und 100 μ l RNase A zugeben und 30 min bei 37 °C inkubieren.
- Phagenpräzipitation: 0,2 Vol kalten L2-Puffer unter Rühren zugeben und mind. 1 h oder o/n bei 4 °C inkubieren.

2. Lyse der Phagenhülle

- Bei 15000 x g und 4 °C 15 min Phagen abzentrifugieren.
- Überstand vollständig entfernen.
- Phagen-Pellet in 9 ml L3-Puffer resuspendieren.
- 9 ml L4-Puffer zugeben.
- Bei 70 °C 20 min inkubieren und dann auf Eis abkühlen.
- 9 ml L5-Puffer zugeben und sofort invertieren.
- Bei 20000 x g und 4 °C 10 min zentrifugieren, um ein partikelfreies Lysat zu erhalten.

3. Phagen-DNA Aufreinigung

- Tip 500 Säule von Qiagen mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrieren.
- Zentrifugationsüberstand auf die Säule geben und durchlaufen lassen.
- Mit 30 ml QC-Puffer Säule waschen.
- Phagen-DNA mit 15 ml QF-Puffer eluieren.
- DNA mit 0,7 Vol Isopropanol fällen
- 30 min bei 20000 x g und 4 °C zentrifugieren.
- Überstand entfernen.

- DNA-Pellet mit 5 ml 70 % Ethanol waschen.
- Überstand entfernen.
- Pellet kurz bei RT trocknen und DNA in 200 µl TE-Puffer lösen.
- Phagen-DNA nicht vortexen und bei 4 °C lagern.

5.4 E. coli Plasmid Minipräparation

Die Methode basiert auf die alkalische Lyse von Birnboim und Doly (1979). Man kann mit dieser Methode bis zu 5 µg Plasmid-DNA schnell aus Kulturmedien isolieren, wobei die DNA für Transformationen, Restriktionsspaltungen und zum Sequenzieren benötigt wird.

Durchführung:

- o/n -Kulturen mit 1ml LB-Ap-Medium bei 37 °C und 300 rpm wachsen.
- 15 sec bei 12000 x g abzentrifugieren.
- Medium (Überstand) absaugen.
- Pellet in 200 µl P1-Puffer resuspendieren.
- 200 µl P2-Puffer zugeben, invertieren und 5 min inkubieren.
- 200 µl P3-Puffer zugeben und invertieren.
- 10 min bei 12000 x g, 4 °C zentrifugieren.
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß geben.
- 0,7 Vol Isopropanol zur Fällung geben.
- 15 min bei RT und 12000 x g zentrifugieren.
- Überstand entfernen.
- DNA-Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol waschen.
- 5 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugieren.
- Überstand entfernen und DNA-Pellet bei 37 °C 5 min trocknen.
- DNA in 30 µl TE-Puffer lösen.

5.5 Hefe Plasmid Minipräparation

Die Hefezellen werden zuerst durch die Lyticase in Sphaeroblasten überführt, die dann mit SDS lysiert werden. Kaliumacetat präzipitiert die Zellbestandteile und SDS, wobei die Plasmid-DNA im Überstand gefällt wird. Die Plasmidpräparation erfolgt in 96 Loch Platten. Alle Pipettierungsschritte werden mit einer 8 Kanal Pipette ausgeführt. Dies beschleunigt die Arbeit und verringert die Verwechslungsgefahr. Die Zentrifugation wird in einer Beckmann Tischzentrifuge durchgeführt.

Durchführung:

- Hefeklone über 2 - 3 Tage in 500 µl SD-ura dropout-Ap-Medium bei 30 °C und 300 rpm wachsen.
- 2 min bei 2000 rpm und RT zentrifugieren.
- Überstand absaugen und Zellpellets in 100 µl Hefe Minipröp Lsg. I resuspendieren.
- 100 µl Hefe Minipröp Lsg II zugeben, schütteln und 5 min inkubieren.
- 100 µl Kaliumacetat 3 M zugeben, schütteln und 5 min inkubieren.
- 15 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugieren.
- Überstand in eine neue Platte überführen und DNA mit 400 µl 100 % Ethanol (-20 °C) fällen.
- 20 min bei -20 °C inkubieren
- 30 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugieren.
- Überstand entfernen und Pellet 20 min bei 37 °C trocknen.
- DNA in 20 µl TE-Puffer lösen.

Die gewonnene Plasmid DNA wird direkt zur Transformation von E.coli eingesetzt. Die kompetenten Zellen (50 µl) werden zur DNA pipettiert.

6. Reinigung von Nukleinsäuren

6.1 DNA Extraktion aus Agarosegelen QIAEX II Kit von Qiagen

Man kann mit dieser Methode DNA in der Größe von 40 bp - 50 kb aus Agarosegelen mit einer Ausbeute von 60 - 95 % extrahieren. Die DNA wird dabei auf Silica-Gel Partikel unter Einsatz von hohen Salzkonzentrationen gebunden. Anschließend wird die DNA nach mehreren

Waschschritten zur Entfernung von Agarosegel, EtBr und Proteinen mit schwach konzentrierten Salzlösungen eluiert.

Durchführung:

- Unter UV-Licht wird das gewünschte Gel-Stück herausgeschnitten.
- 1 Vol Gel (Masse) jeweils in 3 Vol SALT-Puffer lösen.
- Bei 55 °C 5 min inkubieren und mischen.
- BIND-Partikel 1 min vortexen.
- Je nach erwarteter Menge DNA 5 µl BIND plus 1 µl BIND pro 1 µg erwarteter DNA zugeben.
- 5 min bei RT inkubieren und mischen.
- Max. 5 sec zentrifugieren und Überstand entfernen.
- Pellet in 1 ml Wasch-Lsg. resuspendieren und 5 min bei RT inkubieren.
- Max. 5 sec zentrifugieren und Überstand entfernen.
- Bei RT vollständig trocknen lassen.
- Elution: 20 µl TE-Puffer zum Pellet geben und 5 min inkubieren.
- 1min zentrifugieren bei 13000 rpm und 4 °C.
- DNA-Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen.

6.2 Aufreinigung über eine Sephadex Probe Quant G 50 Säule (Pharmacia)

Sie eignet sich zur Aufreinigung von Nukleotide und Oligonukleotide aus Lösungen.

Durchführung:

- Probe mit TE-Puffer auf ein Volumen von 50 µl auffüllen und vortexen.
- Säule in ein 2 ml Eppendorfgefäß 2 min bei 3000 rpm zentrifugieren.
- Probe tropfenweise auf die Säule geben.
- Säule in 1,5 ml Eppendorfgefäß 1min bei 3000 rpm zentrifugieren, um das Eluat aufzufangen.

6.3 Phenol / Chloroform-Extraktion

Diese Methode dient dazu Enzyme zu inaktivieren und Proteine aus einer DNA-Lösung zu entfernen. Dabei wird eine wassergesättigte Phenol / Chloroform Lösung zur Probe gegeben, was zu einer Fällung der Proteine in der phenolischen Phase führt, die man durch Zentrifugation auftrennen kann. Die DNA befindet sich in der oberen wässrigen Phase, die man durch Isopropanol oder Ethanol separat fällen kann.

Durchführung:

- 1 Vol Phenol / Chloroform zur DNA-Probe geben und vortexen.
- 5 min bei 13000rpm und 4 °C zentrifugieren.
- Obere wässrige Phase ohne Phenol abziehen und in ein neues Eppendorfgefäß überführen.
- DNA fällen.

6.4 DNA und RNA Fällung

Durch die Gabe von Isopropanol oder 100 % Ethanol wird der Nukleinsäure die Hydrathülle entzogen und fällt unter Salzbedingungen aus, wobei die Salze die Fällung begünstigen.

Durchführung:

- 0,1 Vol 3 M Na-Acetat-Lsg. mit einem pH5,2 zur Nukleinsäure geben.
- 0,6 Vol Isopropanol oder 2 Vol 100 % Ethanol geben.
- Bei -20 °C 30 min inkubieren.
- 15 - 30min bei 12000 x g und 4°C abzentrifugieren.
- Überstand entfernen.
- Pellet mit 70 % Ethanol waschen, kurz zentrifugieren und Überstand entfernen.
- Pellet trocknen und DNA oder RNA in TE-Puffer lösen.

RNA und Phagen-Pellets kurz trocknen. Sonst gehen sie schlecht in Lösung.

7. Analyse von Nukleinsäuren

7.1 Bestimmung von DNA und RNA Konzentrationen

Die heterozyklischen Ringe der Nukleotide absorbieren Licht im UV-Bereich, wobei das Extinktionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm liegt. Daher kann so photometrisch die Konzentration der DNA oder RNA gemessen werden. Eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50 mg/ml DNA bzw. 40 mg/ml RNA oder 33 mg/ml einzelsträngiger DNA (PCR- und Sequenzprimer). Die Reinheit der Nukleinsäuren wird anhand der Extinktionen bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Der Extinktionsquotient aus E₂₆₀ und E₂₈₀ soll zwischen 1,65 und 2,0 liegen, um die DNA oder RNA als rein zu bezeichnen. Es wird ein Wellenlängenbereich zwischen 200 nm und 300 nm aufgenommen, um das Extinktionsmaximum bei 260 nm zu sehen.

7.2 Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophorese dient zur Trennung von DNA und RNA Molekülen. Als Material zur Trennung dient die Agarose, die aus alternierenden glykosidischer Verbindung D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose besteht. Im elektrischen Feld bewegen sich die Nukleinsäuren aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen zur Anode. Die Geschwindigkeit wird durch die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die angelegte Gleichspannung bestimmt. Da die Bewegung der DNA in Agarosegelen abhängig vom Molekulargewicht ist, wählt man in Abhängigkeit davon die Agarosekonzentration, um eine effektive Trennung der DNA zu erreichen. Als Molekulargewichtsmarker wird mit EcoRI und HindIII verdaute λ -DNA verwendet.

Durchführung:

- Agarose in TAE-Puffer für DNA oder MEN-Puffer für RNA mit der entsprechenden Konzentration aufkochen. Bei der RNA zusätzlich noch Formaldehyd zugeben.
- Nach dem Abkühlen luftblasenfrei in einem vorbereiteten Gelträger mit Kamm gießen.
- Nach Festwerden des Gels Kamm herausziehen, Gelträger in eine Pufferkammer legen und mit Puffer überschichten.
- DNA: Probe mit 0,2 Vol Ladungspuffer versetzen, 5 – 25 μ l in die Geltasche pipettieren.

- RNA: Probe mit 0,5 Vol Ladungspuffer versetzen, 10 min bei 56 °C kochen und dann pipettieren.
- Spannung von ca. 10 V/cm anlegen.

Anschließend wird das Gel mit Ethidiumbromid 5 min in einem Bad vermischt, um die DNA Banden zu färben. Alternativ kann man vorher Ethidiumbromid 0,1 µg/ml zum Gel geben. Die RNA-Gele enthalten schon im Ladungspuffer EtBr. EtBr fluoresziert unter UV-Licht, daher ist es möglich die jeweiligen Banden unter einem UV-Transilluminator sichtbar zu machen und zu fotografieren.

7.3 Northern Blot Hybridisierung

Um die Qualität der mRNA weiter zu kontrollieren wird eine Northern-Blot Analyse durchgeführt. Als Probe wird eine radioaktiv markierte DNA Sonde des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) eingesetzt.

Durchführung:

1. Auftrennung der RNA mittels RNA-Gel Elektrophorese

a. RNA-Gel

b. Elektrophorese: Puffer besteht aus 1xMEN ca. 280 ml. 100 Volt Gleichspannung ansetzen. ca. 1,5 h bis 2/3 des Gels die blaue Bande laufen lassen.

2. Blot mit Transferieren der RNA vom Gel auf eine Nylonmembran (Sambrook et al. 1989)

Zuerst wird eine Kammer mit 10 x SSC gefüllt und auf einer Apparatur wird ein mit 10 x SSC getränktes Filterpapier (3 M Whatman™) gelegt. Anschließend wird das RNA-Gel auf das Filterpapier überführt und mit einer Nylonmembran (Hybond™ - N+, Amersham) abgedeckt.

Zwei weitere mit 10 x SSC getränkte Filterpapiere kommen auf die Membran. Die nächste Schicht besteht aus ca. 10 cm hohen Zellulose-Tücher und ein Gewicht von ca. 500 g übt Druck auf das Gebilde aus. Der überstehende Bereich des Filterpapiers wird mit Frischhaltefolie abgedeckt. Über Nacht erfolgte der Transfer der DNA über den 10 x SSC Diffusionsgradienten auf die Membran. Nach der Übertragung wird die DNA mit UV-Licht kovalent an die Membran gebunden.

3. Hybridisierung von radioaktiv markierter Sonde

- Der Northern-Blot wird in eine Hybridisierungsflasche eingerollt und 3 h bei 42 °C mit 10 ml Vorhybridisierungslösung inkubiert.

- Eine denaturierte radioaktiver Sonde zugesetzt.
- Die Hybridisierung erfolgt bei 65 °C und 16 h mit der Vorhybridisierungslösung.
- Zweimal mit 0,2 x SSC, 0,1 SDS und 1 min bei 60 °C waschen.
- Membran aus der Flasche entnehmen und feucht in Frischhaltefolie einwickeln.
- Auf einen Röntgenfilm (Kodak X-OMAT™) bei -80 °C o/n exponieren.

7.4 Radioaktive Markierung von DNA

Die Markierung der DNA Sonde erfolgte mit dem Kit „Prime-it® Rmt random primer labelling kits“ von Stratagene. Die Initiation der Komplementärstrangsynthese wird durch Zufallsprimer gestartet.

Durchführung:

- Zum fertigen Gemisch aus dNTPs, Primer und Puffersubstanzen wird 42 µl in H₂O gelöste DNA (20 – 30 ng) zugegeben.
- 5 min bei 95 °C denaturieren.
- 5 µl α-32 P-dCTP (10 µCi/µl, 3000 Ci/mmol) zufügen.
- Mit 3 µl Magenta-Polymerase Reaktion starten.
- 10 min bei 37 °C inkubieren.
- Auf Eis Reaktion mit 2 µl Stop-Mix beenden.
- Sonde 10 min bei 94 °C denaturieren.
- Freie Nukleotide mittels Sephadex G50 Säule entfernen.
- DNA-Sonde zur Hybridisierungslösung zugeben.

7.5 DNA-Sequenzierung

Als Sequenzierer dient das Gerät „Li-Cor Sequenzierautomat“ der Firma MWG, wobei sich die Methode auf das von Sanger (1977) entwickelte Verfahren stützt. Sanger benutzte radioaktive Markierungen, hier jedoch werden zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Primer verwendet (Smith et al., 1986), die in einem Ansatz in zwei verschiedene Richtungen sequenzieren können. Die Sequenzierung von DNA erfolgt auf enzymatischer Basis mit der Kettenabbruchmethode, wobei 2´3´-Didesoxynukleotide als Analoga zu 2´Desoxynukleotide zur Verwendung kommen.

Da das 3'OH-Ende in den 2'3'Dideoxynukleotide fehlt, kommt es nach deren Einbau zu Kettenabbrüchen der DNA-Synthese, weil keine weitere Phosphodiesterbindung zustande kommen kann. Die Fluoresceinmarkierte Oligonukleotid-Primer lagern sich an die Einzelstrang-DNA und von dort ausgehend wird der Komplementärstrang in 5'3'-Richtung durch die hitzestabile Polymerase synthetisiert. Die Synthese erfolgt in vier Ansätzen, wobei jeder Ansatz jeweils vier 2' Desoxynukleotide und nur eines der vier 2'3'Dideoxynukleotide hat. Dabei entstehen in jedem Ansatz DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, wobei jeder Ansatz nur Fragmente enthält, die nur nach einem bestimmten Nukleotid entstehen kann wie z. B. Fragment nach Einbau eines ddATP-Moleküls. Danach werden die einzelnen Fragmente auf ein hochauflösendes Polyacrylgel aufgetrennt. Die Fluoreszierung wird mittels eines Lasers aufgedeckt und in einem Computerbild mittels eines Auswertungsprogramms ausgelesen.

Durchführung:

1. Sequenzgel

Für die Sequenzgelelektrophorese werden 41 cm lange Polyacrylamidgelplatten nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese bestehen aus 7,5 ml Sequagel Puffer™, 30 ml Sequagel XR™ 6 %, 400 µl 10 % APS. Sequenzgel luftblasenfrei gießen und 1 h trocknen lassen. Sequenzierer nach Herstellerangaben in Betrieb nehmen.

2. Reaktion

Die PCR dient als Labelling-Reaktion, wobei der Ansatz entsprechend der Angaben des „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer Cycle Sequencing Kit“ der Firma Amersham durchgeführt wird.

- 1 µg DNA mit H₂O auf 20 µl auffüllen und mit je 1 pmol fluoreszenzmarkierten Primern versehen.
- In jede Vertiefung je 1,6 µl fertige Sequenziermische (A, T, C oder G) vorlegen.
- Je 6 µl der DNA pro Vertiefung auf 4 Vertiefungen der Mikrotiterplatte verteilen.
- Mikrotiterplatte mit einer Folie bedecken, die dann in der PCR Maschine mit Deckelheizung die Platte zuschweißt.
- Die PCR Bedingungen für die Sequenzierung von pYDc mit Primern sucf* und sucr* sind wie folgt:

1. 2 min 95 °C
2. 15 sec 95 °C
3. 30 sec 53 °C
4. 30 sec 72 °C

5. 2 min 95 °C

6. 1 min 4 °C

Schritte 2 - 4 jeweils 30x wiederholt

- 3 µl Stop-Mix zu jeder Reaktion nach der PCR zugeben.
- Auf dem Sequenziergel werden 1 µl der Reaktionen aufgetragen.

8. Klonierungsversuche

8.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme werden zu den Endonukleasen gerechnet, die aus Bakterien isoliert werden. Sie spalten Doppelstrang-DNA sequenzspezifisch durch Hydrolyse der Phosphordiesterbindungen. Diese Enzyme spalten an rotationssymmetrische Erkennungssequenzen (meist Palindrome), wobei ihr Aufbau aus identischen Untereinheiten besteht. Als Cofactor wird dabei Magnesium benötigt. Die verwendeten Endonukleasen gehören zu den Typ-II-Enzyme, wobei ihre Zielstelle ein Palindrom von 4 - 5 Basenpaare ist. Als Standardbedingungen benötigen die Enzyme eine bestimmte Temperatur und einen bestimmten Puffer, wobei der Glyceringehalt des Puffers 5 % bei bestimmten Enzymen nicht überschreiten sollte.

Durchführung:

Zu 5 µl DNA-Lsg (ca. 1 µg DNA) 1 µl Enzympuffer 10 x konzentriert, 3,5 µl Wasser und 0,5 µl Restriktionsenzym (10 Units/µl) geben.

Spaltung 1 - 2 h bei der entsprechenden Temperatur inkubieren

8.2 Dephosphorylierung von DNA

Zur Dephosphorylierung von Vektoren vor einer Ligation wird die Shrimp Alkalische Phosphatase verwendet, weil sie an 3' und 5' Enden Phosphatgruppen hydrolysiert. Als weiterer Vorteil bietet dieses Enzym Hitzestabilität. T4-Ligase, die 5' Phosphat mit 3' OH verknüpft, wird zur Insertionsligation verwendet. Durch die Vorbehandlung mit der Shrimp Alkalischen

Phosphatase wird verhindert, daß schon gespaltene Vektoren wieder ligiert werden, dadurch kann man den Anteil rekombinanter Plasmide steigern.

Durchführung:

1 pmol DNA-Enden mit 0,1 - 0,5 U Enzym in 1x Puffer bei 37 °C 1h inkubieren.

Bei 65 °C 15 min Enzym inaktivieren.

8.3 DNA-Fragment Ligation

Als Enzym dient die T4-Ligase, weil sie sowohl glatte als auch komplementäre Enden ligieren kann. Ein Verhältnis von 1:3 zwischen Vektor und Insert hat sich bewährt.

Durchführung:

30 fmol Vektor-DNA, 90 fmol Insert-DNA, 1 µl T4-Ligase (1 U/µl Boehringer), 1 µl T4-Ligasepuffer 10x und 8 µl Wasser zusammengeben.

4 h bei RT oder 24 h bei 4 °C inkubieren.

8.4 E. coli Transformation

Dieses Protokoll wird verwendet, um Plasmid DNA in E. coli zu transformieren.

Durchführung:

1. Herstellung kompetenter Zellen (nach Inoue et al., 1990)

- Eine 6 ml LB- Medium Vorkultur mit E. coli XL1-Blue MRF' animpfen und bei 37 °C und 250 rpm 8 h wachsen lassen.
- In 2l Kolben jeweils 500 ml SOB-Medium geben.
- Mit der Vorkultur die Kolben 1:200 animpfen. Bei RT und 250 rpm bis ein O.D. 600 von 0,6 o/n wachsen lassen.
- Zellen bei 700 x g und 4 °C 10 min abzentrifugieren.
- In 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendieren.
- 10 min auf Eis inkubieren.
- Zellen bei 700 x g und 4 °C 10 min abzentrifugieren.
- Überstand entfernen.

- In 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendieren.
- DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % träufeln.
- 10 min auf Eis inkubieren.
- Aliquotieren und in flüssigem Stickstoff schockfrieren.
- Lagerung der Zellen erfolgt bei -70 °C.

Als Ergebnis erhält man kompetente Zellen, die man dann jederzeit verwenden kann.

2. Transformation kompetenter Zellen

- 50 µl kompetenten Zellen auftauen und in Falcon-Röhrchen geben.
- DNA zupipettieren und mit Pipettenspitze mischen.
- 30 min auf Eis inkubieren.
- Hitzeschock bei 42 °C 1 min durchführen.
- 2 min auf Eis inkubieren.
- 500 µl SOC-Medium zugeben.
- 60 min bei 37 °C und 220 rpm inkubieren.
- Zellen auf Selektionsmedium (LB - Ap) ausplattieren.

DNA ist in die Zellen transformiert worden.

8.5 Transformation von Hefezellen (Gietz et al., 1992, 1995)

Das Protokoll wird verwendet, um Plasmid DNA in Hefezellen zu transformieren.

Durchführung:

- 50 ml YPD-Medium mit 1 ml einer o/n-Vorkultur von YT 455 animpfen.
- Bei 30 °C und 150 rpm bis zu einer O.D. 600 von 0,6 wachsen lassen.
- Bei 3000 x g und 4 °C 2 min abzentrifugieren.
- Überstand abgießen und Zellen mit 25 ml H₂O waschen.
- Bei 3000 x g und 4 °C 2 min zentrifugieren.
- Zellen in 1 ml 100 mM Li-Acetat resuspendieren und in Eppendorfgefäße überführen. Ab hier können die Zellen einige Tage bei 4 °C gelagert werden.
- 5 sec bei 10000 rpm zentrifugieren.
- Überstand entfernen.
- In 450 µl 100 mM Li-Acetat resuspendieren.

- Für eine Transformation 50 µl der Zellen in ein neues Gefäß geben.
- 3 sec bei 10000 rpm zentrifugieren.
- Überstand entfernen.
- Der Transformations-Mix besteht aus 240 µl 50 % (w/v) PEG 3350, 36 µl Li-Acetat 1 M, 25 µl denaturierte ssDNA 2 µg/µl und 50 µl H₂O mit 0,1 - 10 µg Plasmid-DNA. Jeweils in dieser Reihenfolge geben.
- 1 min vortexen.
- 30 min bei 30 °C inkubieren.
- Hitzeschock 23 min bei 42 °C durchführen.
- 20 sec bei 6000 rpm zentrifugieren.
- Überstand entfernen.
- Zellen in 400 µl H₂O resuspendieren.
- Zellen auf Selektionsmedium (SD-Ura/do-Medium) ausplattieren.

Die Plasmid DNA kann so in die Hefezellen transformiert werden.

9. Computeranalyse

9.1. Datenbank

Genbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast/Jform=0>

Motif: <http://www.motif.genome.ad.jp>

CBS/SignalP <http://www..cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

Identify <http://dna.Stanford.EDU/identify/>

Translate <http://www.expasy.ch/www/tools.html#translate>

DNA Sequenzen von positiven Klonen sind mit dem Gapped BLAST-Programm analysiert worden, das über das Internet für jedermann zugänglich ist. Mit diesem Programm hat man zu folgende Gen-Banken Zugriff: GenBank®, EMBL Nucleotide Sequence Database, DNA Data Bank of Japan, Proteinsequenzbank SWISS-PROT. Dadurch ist ein Vergleich der Sequenzen möglich.

9.2. Vorhersage von Signalpeptidsequenzen (Nielsen et al., 1997)

Aufgrund der großen Sequenzvariationen innerhalb von Signalpeptiden ist es heute nicht möglich, beliebige DNA-Sequenzen mit ausreichender Sicherheit auf das Vorhandensein von Signalpeptiden zu analysieren. Man kann jedoch durch den computerisierten Vergleich mit N-terminalen Sequenzen bekannter, sezernierter und nicht-sezernierter Proteine mit guter Zuverlässigkeit eine Vorhersage treffen, ob eine Peptidsequenz aus ca. 70 Aminosäuren ein Signalpeptid sein könnte. Auf dieser Grundlage wurden neuronale Netzwerke zur Diskriminierung von Signalpeptiden und Nicht-Signalpeptiden, sowie zur Voraussage der Spaltstelle entwickelt (Nielsen *et al.*, 1997). Sie stehen der Öffentlichkeit über einen WWW-Server frei zur Verfügung.

Mit den Algorithmen der neuronalen Netzwerke werden für jede Aminosäureposition zwei Scores C, S und ein daraus abgeleiteter dritter Y-Score errechnet. Der S-Score ist das Ergebnis des Signalpeptid/Nicht-Signalpeptid Netzwerks und kann als eine "Abschätzung der Wahrscheinlichkeit interpretiert werden, daß eine Position zum Signalpeptid gehört" (zitiert aus Nielsen *et al.*, 1997, S. 4). Der C-Score ist das Ergebnis des Netzwerkes zur Bestimmung der Spaltstelle und kann als "Abschätzung der Wahrscheinlichkeit interpretiert werden, daß eine Position die erste des reifen Proteins ist (Position +1 relativ zur Spaltstelle)" (zitiert aus Nielsen *et al.*, 1997 S.4).

Die Wahrscheinlichkeit einer Position mit hoher C-Score scheint die tatsächliche Spaltstelle zu sein und korreliert positiv mit der Wahrscheinlichkeit der Position, die im Bereich des Übergangs vom Signalpeptid zum reifen Protein liegt. Der Übergangsbereich wiederum ist durch einen steilen Abfall des S-Scores gekennzeichnet. Diese Überlegungen lassen sich mathematisch in einer dritten Größe, dem Y-Score fassen. Dieser geht aus einer in Testdurchläufen ermittelten, optimierten Abhängigkeit von S-Score und C-Score hervor. Die Stelle mit einem maximalen Y-Wert besitzt die größte Wahrscheinlichkeit die tatsächliche Spaltstelle zu sein.

Bei der Diskriminierung zwischen Peptid und Signalpeptid hat sich die Formulierung einer weiteren Größe als zweckmäßig erwiesen. Der durchschnittliche S-Score (mean S-Score) errechnet sich als Durchschnitt der S-Werte im Bereich des vorhergesagten Signalpeptids bis zur Position mit dem maximalen Y-Wert. Liegt der Durchschnitts-S-Score über 0,5, so wird die Vorhersage getroffen, daß ein Signalpeptid vorliegt. Unter diesen Voraussetzungen wurden mit Testsets von Peptiden folgende Vorhersage-Genauigkeiten erzielt:

Quelle der Sequenzdaten	Richtig vorhergesagte Spaltstellen in %	Signalpeptid Diskriminierung angegeben als Korrelations-Koeffizient C
Eukaryonten	70,2	0,97
Gram-Positive Bakterien	67,9	0,96
Gram-Negative Bakterien	79,3	0,88

Tabelle 1: Genauigkeiten der Vorhersagen von Spaltstellen und dem Vorhandensein von Signalpeptidsequenzen, ermittelt mit Testpeptiden verschiedener Organismen (nach SignalP-Server)

$$C = \frac{(PN) - (N'P')}{\sqrt{(N + N')(N + P')(P + N')(P + P')}}$$

mit N und N' als die Anzahl von Richtig-Negativen und Falsch-Negativen bzw. P und P' als die Anzahl von Richtig-Positiven und Falsch-Positiven.

IV. Ergebnisse

IV.1 pYD Plasmid Vektor

Eigenschaften:

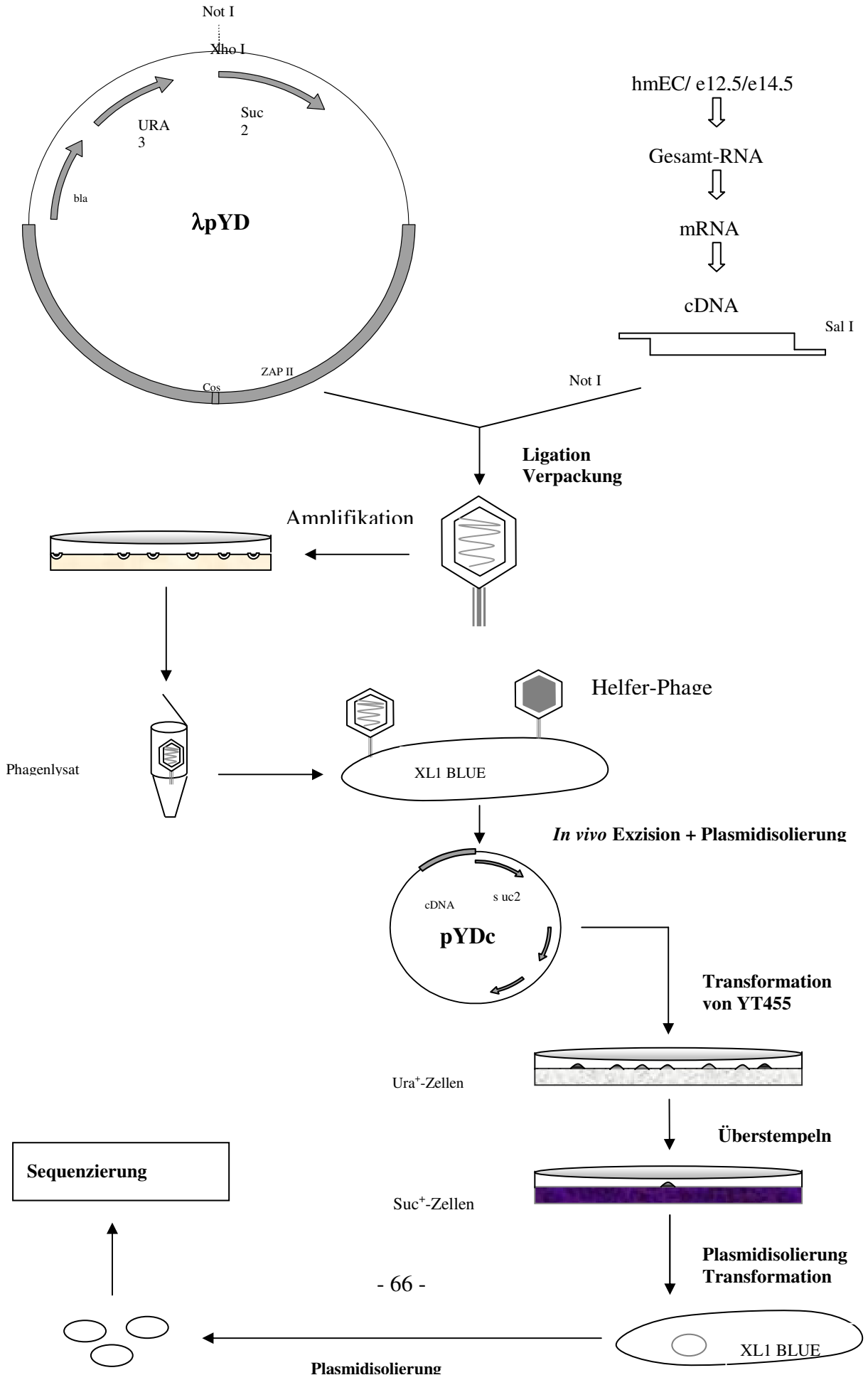
1. intaktes *ura3* Gen, das es erlaubt, in uracilfreiem Mangelmedium auxotrophe YT 455 Hefezellen auf die Anwesenheit des Plasmids zu selektionieren.
2. Das Hefegen *suc2* (Invertasegen) wurde einkloniert. Im Invertase-Gen wurden zuvor das Startkodon und das Signalpaptid deletiert und eine neue, einmalige Restriktionsstelle NotI an Stelle des Startkodons geschaffen. Somit ist dieses Gen ohne Signalpeptid und Startkodon nicht voll funktionsfähig. Zur Erreichung der vollen Funktionsfähigkeit des Gens kann man eine gröbenselektionierte cDNA mit hydrophobem Signalpeptid und Startkodon in die NotI-Schnittstelle einklonieren
3. Der Vektor bsitzt NotI, XhoI und SalI Schnittstellen.
4. Das Plasmid kann in den Lamda ZapII Phage kloniert werden $\Rightarrow \lambda$ pYD.

Hier kann mittels einem Helferphagen eine in vivo Exzision erfolgen, die den Plasmid aus dem Lamda Phagen effizient herausschneiden kann.

IV.2 Einführung mit Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es den neu entwickelten pYD Vektor auf dessen Sensitivität und Spezifität zu testen und ein Selektionssystem zu entwickeln, welches das Screening von cDNA Bibliotheken auf sezernierte Proteine oder integrale Membranproteine ermöglicht. Hierzu wurde eine humane microvaskuläre Endothelzell-Bibliothek (hmEC-library) konstruiert und mit den zuvor in der Forschungsgruppe konstruierten Mäuseembryonen Bibliothek des Entwicklungsstadiums 12,5 (e12,5) und zwei des Entwicklungsstadiums 14,5 (I.e14,5 und II.e14,5) verglichen: Die cDNA-Bank wurde in dem neu entwickelten Hefeselektionssystem auf solche Sequenzen selektioniert, die für hydrophobe Signalpeptide kodieren.

Abb. IV.1 Ablauf des Screens



1.pYDc \Rightarrow pYD Plasmid-Vektor mit kloniertem cDNA Fragment

2. λ pYDc \Rightarrow LamdaZapII Phage mit integriertem pYDc

1. cDNA - Bibliothek Konstruktion

1.1 Isolierung von Total-RNA (T-RNA)

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte aus 2×10^{13} hmEC. Die RNA wurde durch Messung der optischen Dichte im UV-Bereich nachgewiesen. (s. Abb IV.2). Weil RNA schnell durch Kontamination mit RNasen degradiert wird, wurde die Qualität nach gelelektrophoretischer Auftrennung optisch beurteilt. Die 28S und 18S Banden der ribosomalen RNA sollen klar erkennbar sein, wobei die 28S Bande doppelt so stark sein sollte wie die 18S Bande (s. Abb. IV.4).

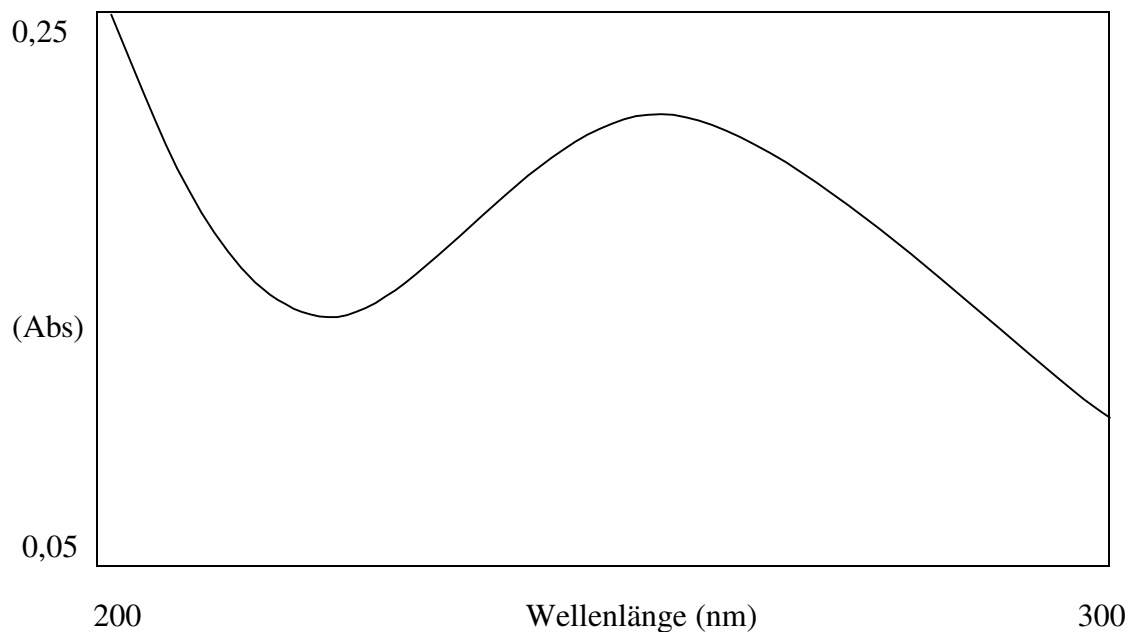


Abb. IV.2 (hmEC)-RNA

Optische Dichte der RNA im UV Bereich: Das Maximum liegt bei 260 nm . Der berechnete Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} ist größer 1,5, was für das Vorhandensein von RNA spricht.

1.2. Isolierung von mRNA (poly-A+ -RNA)

Zur Isolierung von mRNA wurde jeweils 1 mg T-RNA eingesetzt. Daraus ließen sich im Durchschnitt 10 - 20 μ g poly A+-RNA (mRNA) isolieren. Als Isolationskit wurde dabei der Kit

von Promega verwendet: Das System benutzt Biotin-oligo(dT) Primer, die sich spezifisch an den Poly-A+ Schwanz der mRNA binden. Die Biotin – oligo(dT) - mRNA wird dann an die Streptavidin-Partikel gebunden und am Magneten gesammelt. Anschließend wird die mRNA über einen Waschschrift gereinigt und in H₂O gelöst (s. Abb. IV.3). Dabei wurde die ribosomale RNA (rRNA), welche den Screen nur gestört hätte, wirkungsvoll entfernt. Den größten Anteil an falsch-Positiven Sequenzen besitzen cDNA Insertionen, die für rRNA codieren. Ein Teil der cDNA Insertionen befand sich in Antisense Richtung. Dies tritt auf, wenn die cDNA nicht mit XhoI bzw. SalI verdaut wurde und dabei illegitime Ligationen stattgefunden haben.

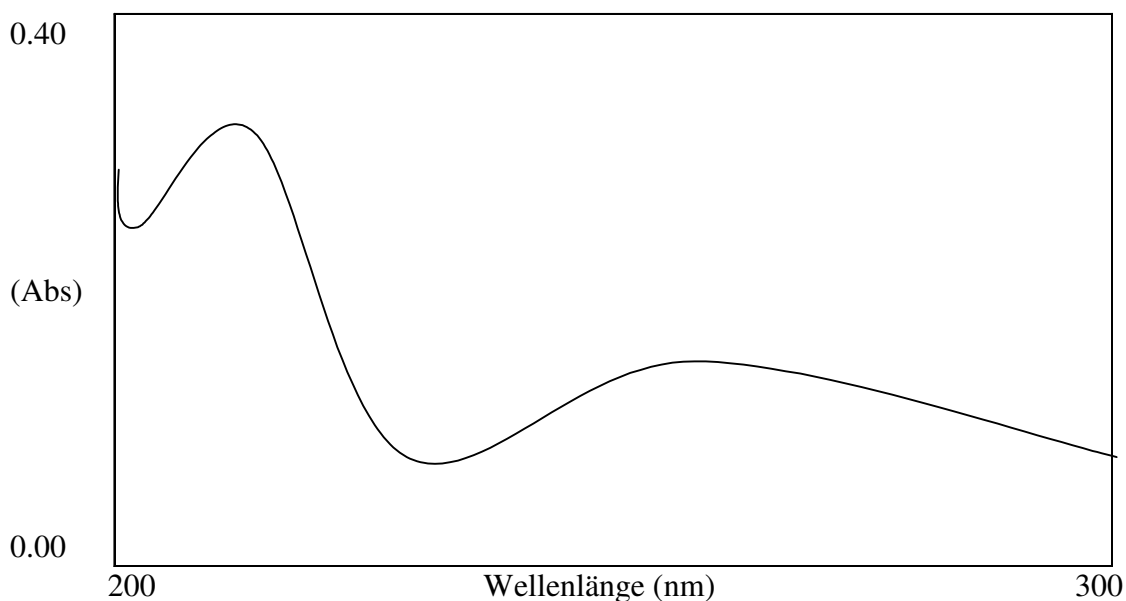


Abb. IV.3 (hmEC)-mRNA

Optische Dichte der mRNA im UV Bereich: Das Maximum liegt ebenfalls bei 260 nm und der Absorptionsquotient A₂₆₀/A₂₈₀ ist größer als 1,5, was für die Existenz von RNA spricht.

Zur weiteren Bestätigung der mRNA und der T-RNA wurde eine Gelelektrophorese und ein Northern-Blot-Analyse durchgeführt (s. Abb.IV.4): Die Qualität der mRNA wurde optisch durch Vergleich mit der T - RNA abgeschätzt. Die mRNA besaß das gleiche Größenspektrum wie die T - RNA und die Intensität der rRNA war deutlich reduziert. Um die Qualität weiter zu bestätigen, wurde eine Northern-Blot Analyse durchgeführt. Als Probe wurde eine radioaktiv markierte DNA Sonde des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH Sonde) eingesetzt. Die Northern-Blot Analyse ergab eine starke Anreicherung von mRNA und zeigte auch, dass die mRNA intakt war.

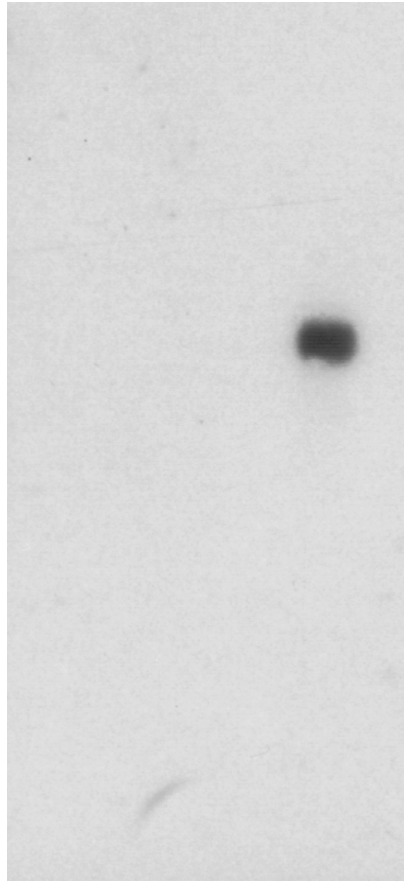
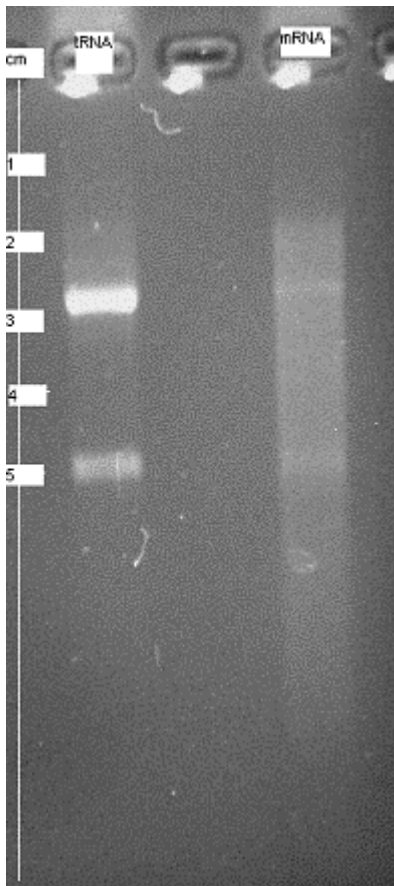


Abb. IV. 4 : Gel: hmEC Gesamt RNA, 300ng (links) und die daraus isolierte polyA⁺-RNA, 300ng (rechts). Rechts : **Northern Blot** des Gels mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase Gens (GAPDH). Die erkennbare Bande liegt im Bereich der polyA⁺-RNA.

1.3 cDNA Synthese

Es wurde ein Protokoll entwickelt, das es erlaubt, direktional klonierbare cDNA in ausreichender Menge zu synthetisieren. Hierbei wurden Oligonukleotide mit einer SalI-Erkennungssequenz und einer Zufallssequenz als Primer verwendet. Die Verwendung von Oligonukleotiden mit zufälliger Sequenz führt im Vergleich zu Poly-dT-Primern zu einer Erhöhung der 5' Enden der Gene in der cDNA.

Im ersten Schritt wird ein komplementärer DNA-Strang an die mRNA synthetisiert, wobei als Enzym die Reverse Transkriptase von den Primern ausgehend diesen DNA-Strang bildet (Erststrangsynthese). Anschließend wird der zweite DNA-Strang synthetisiert, indem die RNase H Strangbrüche in die mRNA durchführt, die dann der DNA Polymerase I als Primer zur Zweitstrangsynthese dienen. Die entstandenen Brüche werden dann mit E. coli Ligase repariert (Zweitstrangsynthese). Durch die anschließende Behandlung mit T4-Polymerase werden glatte Enden mit gleich langen Strängen geschaffen. Nach der Ligation von NotI-Linker wird mit NotI und SalI ein Restriktionsverdau durchgeführt.

Daraufhin wurde die cDNA auf ein Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Bande zwischen 400-1000 bp ausgeschnitten und isoliert. Die erhaltenen Fragmente wurden dann direktionell in den Vektor pYD ligiert.

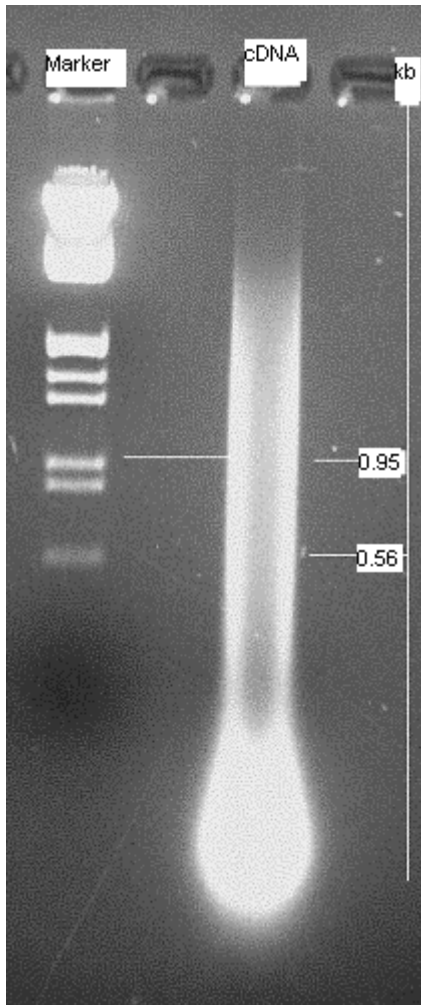


Abb. IV.5 : cDNA, die zur Herstellung der hmEC Bibliothek benutzt wurde. Die große Menge sehr kleiner Fragmente besteht in der Hauptsache aus Oligonukleotiden (Primer). Fragmente im Größenbereich zwischen 400 - 1000 bp wurden aus dem Gel isoliert. Als DNA Marker diente der DNA-Marker : λ EcoRI/HindIII.

1.4 Klonierung der cDNA

Die hergestellte cDNA enthält am 5'-Ende einen NotI - Überhang und am 3'-Ende einen SalI - Überhang, wobei man so diese cDNA in den Plasmid-Vektor pYD ligieren kann. Der pYD-Vektor besitzt NotI und XhoI Schnittstellen, in welche die cDNA hineinligiert wurde. XhoI Schnittstellen sind komplementär zu SalI Schnittstellen. Die vorhandene SalI-Schnittstelle vor dem suc-Gen konnte nicht benutzt werden, da noch eine weitere SalI -Schnittstelle im Phagen existierte. Deshalb wurde die komplementäre XhoI-Schnittstelle benutzt, wobei die so

entstandene Sequenz dann später von beiden Enzymen, SalI und XhoI, nicht mehr erkannt wird. Die zweite SalI-Schnittstelle wurde dann gemeinsam mit der NotI - Schnittstelle zum Schneiden der cDNA aus dem Plasmid verwendet.

Es wurde das optimale Mengenverhältnis von cDNA und Vektor ermittelt, wobei 50 ng Vektor und unterschiedliche Mengen cDNA verwendet wurden. Die Testligation, die nach Verpackung und Infektion von Bakterien den höchsten Phagentiter erzielte, wurde für die Hauptligation zur Erstellung der Bibliothek verwendet.

Hier wurde auch die zehnfache Menge an cDNA im Vergleich zum Vektor eingesetzt, um eine effiziente Ligation zu erreichen. Anschließend wurde pYD - cDNA in den Phagen verpackt und dann der Phagentiter mittels XLI-Blue Zellen bestimmt. Die Qualität der Phagenbibliothek hängt von der Anzahl der primären Klone ab, bei denen eine cDNA-Insertion im Vektor vorliegt. Die Qualität dieser Bibliothek wurde ermittelt, indem überprüft wurde, ob cDNA - Insertion im Vektor vorlagen: Dazu wurden Phagen aus 15 zufällig ausgewählten Plaques ausgesucht und mittels PCR nach cDNA-Insertion untersucht. (s. Abb. IV.6). Plaques sind Regionen von lysierten Bakterien in einem Bakterienrasen. In einem Plaque sind ca. 10^7 Phagen vorhanden.

Anzahl primärer Plaques: 550000 Kolonien

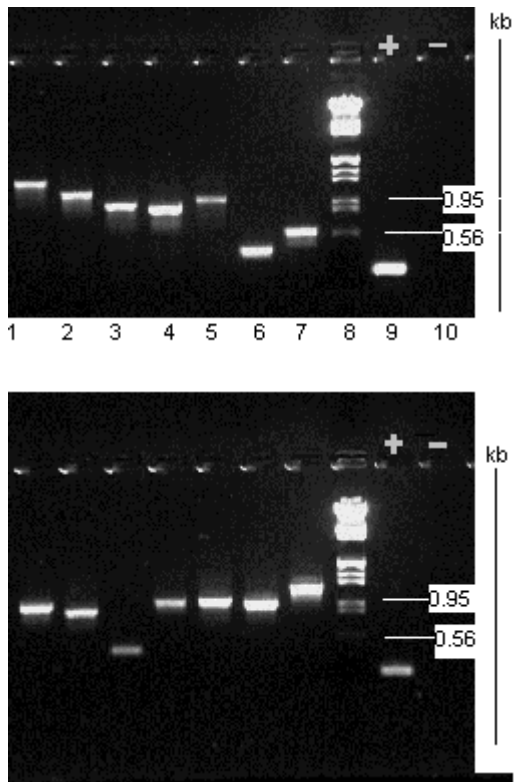


Abb. IV6 : PCR mit Phagen aus 14 einzelnen Plaques der hmEC-Bibliothek.

Gel oben und unten :

Bahn 1-7 : Plaques aus hmEC

Bahn 8 : DNA-Marker : λ EcoRI/HindIII

Bahn 9 (+) : Kontrolle: Plaque eines Phagen
mit Vektor-DNA (λ pYD)*

Bahn 10 (-) : Kontrolle: ohne Phagen

*Die Größe des sichtbaren Fragmentes der positiven Kontrolle (Bahn 9) entspricht der Größe des DNA-Stückes, das im Vektor zwischen den Bindungsstellen der als Primer eingesetzten Oligonukleotide liegt.

1.5 In vivo Exzision der λ pYD-cDNA Bibliothek

Die in vivo Exzision mittels eines Helfer-Phagen dient dazu, den λ pYD Plasmid mit cDNA aus dem Phagen zu isolieren. Aus der Phagenbibliothek wird so eine Plasmidbibliothek. Dazu wurde die zehnfache Menge an λ pYD-Phage im Vergleich zu den primären Kolonien verwendet, um eine gute Repräsentativität einzelner Klone zu bekommen. Anschließend wurde E.coli XL1 Blue mit dem λ pYD - Phage und dem M13-Helferphage infiziert, um danach mit dem erhaltenen Lysat E. coli SOLR zu infizieren. Im nächsten Schritt wurden E.coli SOLR auf Ampicillin LB-Medium selektioniert, um sie danach für die Plasmidpräparation zu verwenden.

Um die Plasmide aus Ampicillin-resistenten SOLR-Kolonien zu testen, wurden 15 Kolonien mit Hilfe von PCR untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Größenverteilung der PCR-Produkte der zuvor direkt in λ Phagen beobachteten Verteilung entsprach.

Die Plasmide wurden aus dem Phagen Lysat isoliert:

$$c = 22,5 \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

Bei 500 μ l Lösung ergibt dies eine Menge von 11,25 mg Plasmid - cDNA

Jetzt kann die cDNA in die Hefe transformiert werden.

2. Selektion

Zuerst wurde die Plasmid - cDNA in den Hefeselektionsstamm YT 455 transformiert, um sie der Selektion zu unterwerfen. Es wurden zwei Selektionen, Uracil - und Saccharose - Selektion, durchgeführt. Zuerst wurde die Plasmid-DNA auf uracilfreiem Medium für die Aufnahme des Plasmids selektioniert. Danach folgte eine Selektion der Uracil - positiven Zellen auf Saccharose-Agar.

2.1 Uracil Selektion

Die Hefe YT 455 hat eine Mutation im *ura3-52* Gen, das für das Enzym Oritidin - 5' phosphat Decarboxylase codiert. Somit sind diejenigen Zellen, die diese Mutation haben, nicht in der Lage Uracil zu synthetisieren, wobei sie deshalb auf uracilfreiem Medium nicht wachsen können und auf den Zusatz von Uracil angewiesen sind. Das Plasmid pYD besitzt dieses Gen und kann so

auf Uracil-freiem Medium wachsen, wobei damit eine selektive Selektion durchgeführt wird. Daher wurde YT 455 mit pYD-Plasmid transformiert. Anschließend wurden dann die Zellen auf Uracil-freiem Mangelmedium ausplattiert.

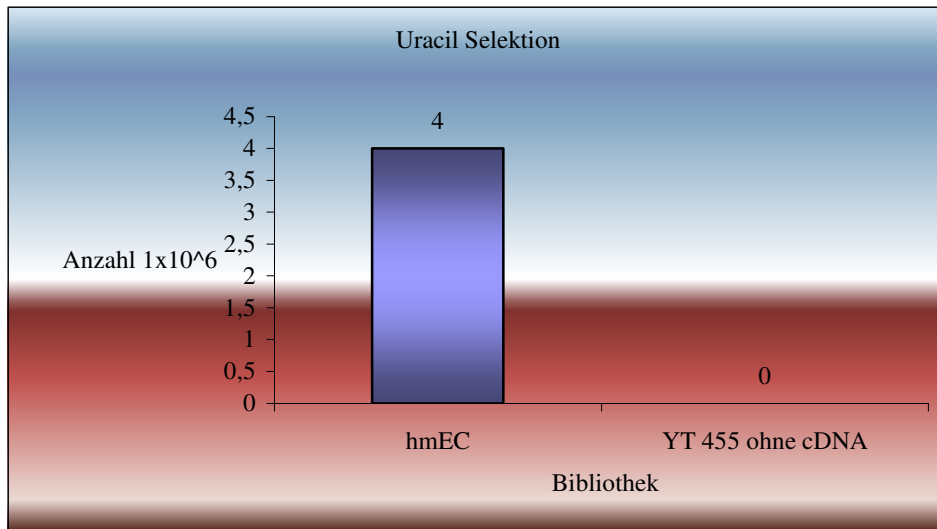


Abb. IV.7: Die Abbildung zeigt 4000 000 Uracilpositive Kolonien nach Transformation von YT 455 mit Plasmid-DNA der hmEC Bibliothek. Zum Vergleich wurde YT 455 ohne cDNA dargestellt, das kein Wachstum aufweist.

2.2 Saccharose Selektionssystem

2.2.1 Saccharose Selektion

Man lässt die Ura⁺ Kolonien 2 - 3 Tage auf Uracil freiem Medium wachsen und stempelt sie dann auf YPS Agar.

Das YT 455 Hefestamm hat eine *suc2* - Gen Mutation, das für das Enzym Invertase codiert, wobei dieses Enzym die Spaltung von Saccharose in Glucose und Fructose durchführt. In dem Plasmid pYD mit dem einkloniertem *suc2* Gen (Invertase Gen) wurde das Signalpeptid und das Startcodon deletiert und mit einer NotI Schnittstelle anstelle des Startcodons versehen, um anschließend die schon beschriebene Plasmidbibliothek zu konstruieren. Diese Plasmide mit der eingebauten cDNA wurden dann in die Invertasenegativen-YT 455-Hefestamm transformiert und auf das Selektionsmedium YPS Agar über den Uracil-Selektions-Schritt überstempelt. Dieses Medium enthält als einzige Kohlenstoffquelle Saccharose, so ist die für die Metabolisierung notwendige Spaltung des Zuckers nur solchen Hefeklonen möglich, die in der

Lage sind, das Enzym Invertase zu sezernieren. Eine Sekretion erfolgt aber nur dann, wenn sich auf dem Plasmid im Leserahmen ein hydrophobes Signalpeptid aus der einklonierten cDNA befindet.

Die YPS Platten inkubierten 2 - 3 Tage bei 30 °C und gewachsene Klone wurden dann mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, um anschließend wieder auf YPS Medium einzeln selektioniert zu werden.

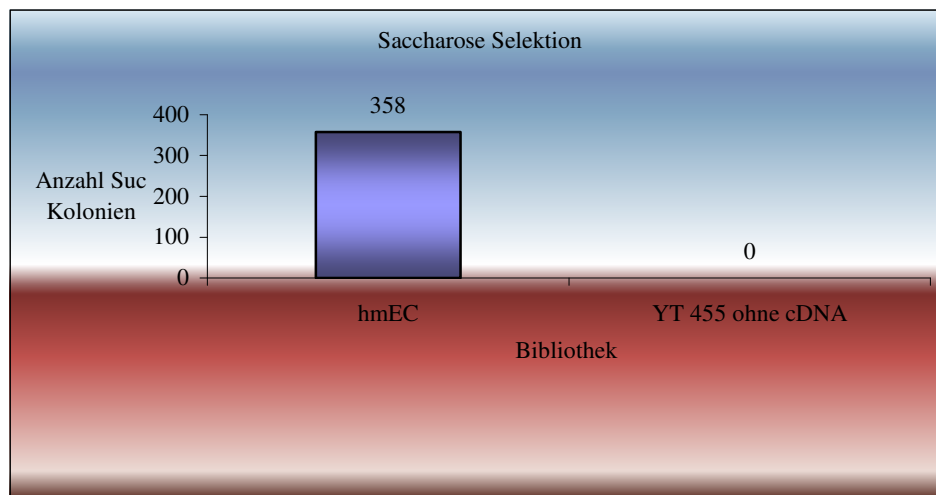


Abb. IV.8 Saccharose Selektion: Nach Überstempeln der Uracil Platten auf YPS Medium mit anschliessender Inkubation auf Saccharose Medium sind 358 Kolonien in der hmEC Bibliothek gewachsen. YT455 ohne cDNA Platten zeigten auf YPS Medium ebenfalls kein Wachstum. Der Prozentsatz von Suc-positiven Kolonien unter den Uracilpositiven Kolonien entspricht 0,00895 Prozent.

Sequenzierte Einzelkolonien der hmEC Bibliothek: 29 Klone

2.2.2 Einzelselektion

Nach der obigen Selektion mussten die Plasmide zur Sequenzbestimmung isoliert werden. Einzelkolonien wurden deshalb auf isolierte YPS Platten wieder ausplattiert und 2 - 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden jeweils einzelne Klone auf einzelne SD Uracil freies Medium übertragen und auch 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Plasmid DNA wurde mit dem Hefe-Minipräparations Protokoll aus der Hefe isoliert und in E.coli XL1 Blue transformiert. Von den Ampicillin resistenten E.coli Kolonien wurden Flüssigkulturen angelegt, um daraus die Plasmide zur Sequenzbestimmung zu isolieren. Bevor die Sequenzierung durchgeführt wurde, wurde zuerst mit Sall und NotI die cDNA aus dem Plasmid rausgeschnitten.

3. Sequenzen von hmEC Bibliothek

Die so erhaltenen cDNA Fragmente wurden mit den Primer sucf und sucr in 5'-3' und in 3'-5' Richtung mit dem LICOR-Sequenzierer sequenziert. Danach wurden die Sequenzen mit Hilfe der Computerprogramme BLASTN;X;P mit bekannten Sequenzen verglichen. Es wurden 29 Klone isoliert. Davon gehörten 24 zu der Gruppe der bekannten Sequenzen und lediglich 5 Sequenzen waren bisher unbekannt.

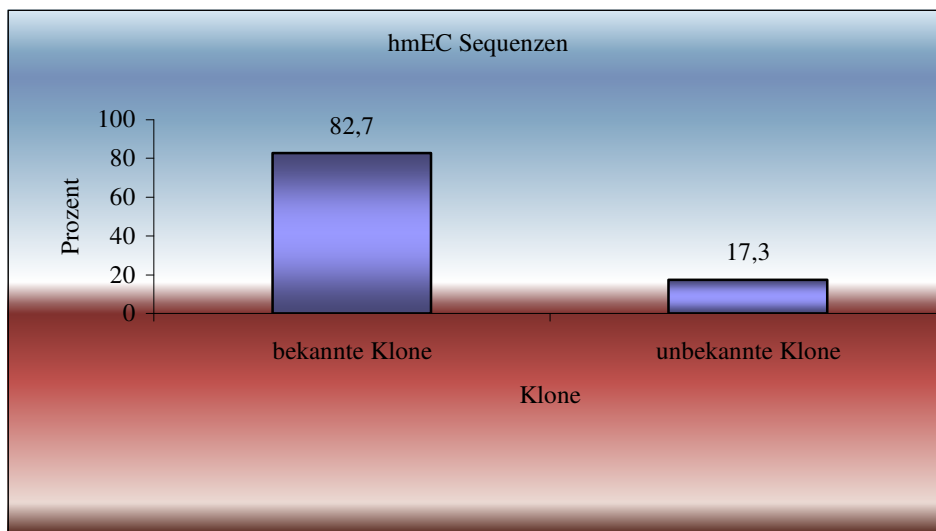


Abb. IV.9 hmEC Sequenzen: 82,7 % der selektionierten Klone waren der Gruppe der bekannten Klone zuzuordnen und 17,3 % gehörten der Gruppe der unbekannte Klone.

3.1 Unbekannte Klone

Damit sind alle Sequenzen gemeint, die nicht eindeutig bekannten Proteinen zugeordnet werden konnten. In manchen Fällen waren Teile dieser Sequenzen als Maus - est oder ähnliche ests anderer Spezies in Datenbanken aufgeführt.

Drei der Sequenzen hatten Ähnlichkeiten zu bekannten Genen. Lediglich zwei Sequenzen waren bisher unbekannt und hatten keine Ähnlichkeiten zu bisher bekannten Proteinen.

Tab. IV.1 Liste der unbekannt Sequenzen der hmEC Bibliothek

	Klon	Gel	EST	EST Nr.	Länge (bp)	Bemerkung
1	2F	05019806	Ja	HeLa cell s3 937216	750	
2	05/1a	200198	JA	H.sapiens cDNA clone 264419	500	
3	12/2a	200198	Ja	KIAA02777 gene H. sapiens cDNA clone 213941	500	Unbekannte Funktion
4	21/3c	200198	Nein		200	
5	29/4c	200198	Nein		200	

3.2 Bekannte Klone

Als Voraussetzung galt hier das Vorhandensein der Signalpaptidsequenz und die Übereinstimmung des Leserahmens des sezernierten Proteins und der Invertase im Bereich der Fusion.

Tab. IV.2 Liste der bekannten Sequenzen der hmEC Bibliothek

	Klon	Gel	Identität		Bemerkung
1	3F	05019812	Human extracellular protein (S1-5)	M	3 unabhängige Klone 15 Isolate
2	3E	05019811	Human biotinidase mRNA	M	
3	2E	05019805	Human mRNA for insuline-like growth factor	M	
4	6F	05019802	Human mRNA for fibronectin receptor beta subunit	M	
5	6B	05019801	Mus musculus calumenin mRNA	M	ER protein
6	8C	06019810	Human Csaid's binding protein (CSBP1)	M	
7	8B	06019809	Human integral membrane protein CII-3	M	Mitochondrial membrane
8	8H	06019814	Human glycogen synthase kinase	C	Cytoplasmatic, aber signal peptid
9	8B	07019810	Human C2 integral membrane protein	M	
10	XX	070198	Cdc21	M	

4. Sequenzen von Mäuse Embryonen

4.1 e12,5 Sequenzen

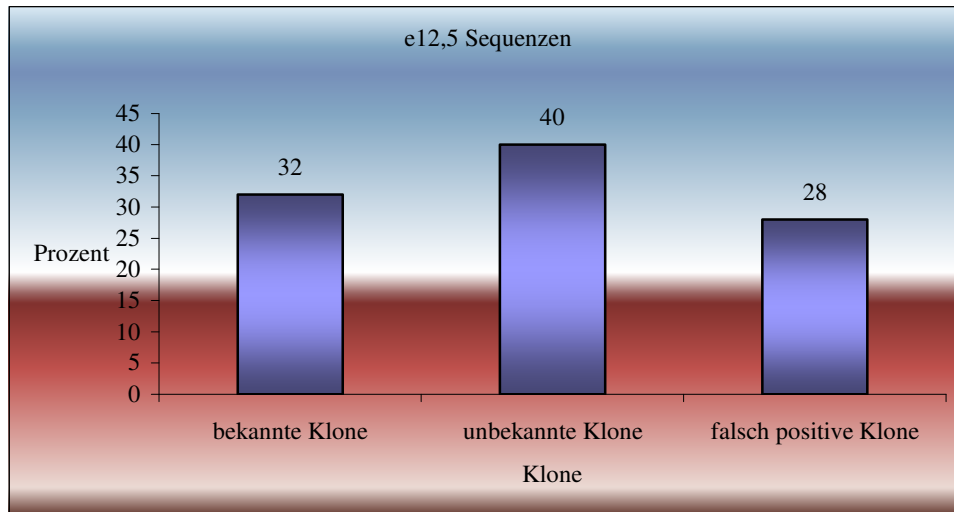


Abb. IV.10 e12,5 Sequenzen:

- Die Abbildung zeigt die einzelnen sequenzierten Klone der e12,5 Bibliothek im prozentualen Vergleich.
- Die Klone wurden in drei Gruppen unterteilt: bekannte Klone (32 %), unbekannte Klone (40 %) und falsch positive Klone (28 %).

a. bekannte Klone

Von insgesamt 92 sequenzierten cDNAs gehörten 29 (32%) zur Gruppe der bekannten Sequenzen. Die 29 cDNA-Sequenzen wurden nur von 6 unterschiedlichen Genen codiert (Tab. IV.3). Das Auftreten identischer Isolate ist wahrscheinlich auf die Amplifikation eines primären Klonen bei der Herstellung der Bibliotheken und nicht auf die Klonierung identischer cDNA - Stücke zurückzuführen. Eine Selektion für bestimmte cDNA-Sequenzen innerhalb eines Gens kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Tab. IV.3: Liste der bekannten, richtig-positiven Sequenzen der e12,5 Bibliothek.

Unterschiedliche Klone besitzen verschiedene cDNA Stücke. Bei allen Sequenzen ist die 5'-Region mit der Signalpeptid-Sequenz eingeschlossen. Die Gesamtzahl resultiert aus dem mehrfachen Vorkommen von Isolaten mit identischer cDNA-Sequenz. Die Spaltstelle des Signalpeptides ist durch einen Bindestrich (-) gekennzeichnet.

	Protein	Genbank Nr.	Gesamtzahl der Isolate	Anzahl unterschiedlicher Klone	Signalpeptid
1	Chondromodulin-1 (Chm-1)	AF05142 (Rattus norvegicus)	6	1	MTENSDKVPITMV GPEDVEFCSPAY ATVTVKPSGSPTR3 LLKVGAVVLISGA VLLL-FGAIGA-FY
2	Serum Albumin	AJ011413	9	1	MKWVTFLLLLFVS GSA-FSRG
3	Typ I Rezeptor BRK-1T (BMP-Rezeptor)	U04673	2	1	MTQLYTYIRLLGA CLFIISHVQG- QNLDSMLH
4	Alpha-Fetoprotein	V00743	8	1	MKWITPASLILLH FAASKA- LHENEFGI
5	Apolipoprotein D (apoD)	L39123	1	1	MVTMLMFLATLA GLFTTAKG- QNFHLGK
6	Insulin-like growth factor binding protein-5	X81583	3	1	MVISVLLLLLAAY AVPAQG- LGSFVHCEP

b. Falsch-Positive Klone

28 % der e12,5 cDNAs waren Falsch-Positive. In den meisten Fällen konnte kein Signalpeptid mit Hilfe des SignalP V1.1 Programm identifiziert werden. Den größten Anteil an falsch-positiven Sequenzen besitzen cDNA-Insertionen, die für ribosomale RNA codieren (Tab. IV.4). Ein Teil der cDNA-Insertionen befand sich in Antisense-Richtung. In wenigen dieser Fälle war eine NotI-Schnittstelle am Anfang und Ende der Fragmente vorhanden. Dies tritt auf, wenn die cDNA nicht mit XhoI bzw. SalI verdaut wurde und illegitime Ligation stattgefunden hat. Unter

den Antisense-Insertionen fanden sich jedoch meist über die NotI und SalI Schnittstellen regulär klonierte Fragmente. Die Gründe für ihr Auftreten sind unbekannt.

Tab. IV.4: Liste der bekannten, falsch-positiven Sequenzen der e12,5 Bibliothek.
AS (Antisense) bedeutet, daß die Proteinhomologie nicht auf dem Sinnstrang lag.

	Protein bzw. rRNA	Genbank Nr.	Signalpeptid; Anmerkungen
1	8 Klone 18;45S rRNA	X82564; X00525; X00686; U13369;	Insgesamt acht verschiedene Klone, davon 3 in AS-Orientierung
2	mitotic control protein DIS3	AA081429	AS
3	fascin	L33726	AS
4	calnexin	L18888	ER-Protein; Antisense; Signalpeptid im Antisense-Rahmen
5	high mobility group 2 protein	Z46757	
6	mitochondrial 12S ribosomal RNA	X84382	
7	beta-tubulin (isotype Mbeta 5)	X04663	
8	mitochondrial genome	V00711	
9	Y-box binding protein mYB-1a	U33196	
10	similar to SW:AF9_HUMAN AF-9 PROTEIN	P42568	
11	14-3-3 tau	D87662	
12	ornithine decarboxylase	S64539	AS
13	protein synthesis elongation factor eEF-Tu,	M22432	AS
14	Sox-4	X70298	AS
15	pro-alpha-1 type I collagen	M14423	Signalpeptid nicht in cDNA; Protein nicht im Leserahmen der Invertase
16	HuD	D31953	
17	fibulin-2	X75285	extrazelluläres Protein; Signalpeptid nicht in cDNA
18	beta-1,4-galactosyltransferase	D37790	
19	Rattus norvegicus casein kinase 1 gamma 3 isoform	U22321	

c. Unbekannte Klone

Ein großer Anteil der Klone konnte nicht eindeutig identifiziert werden (40%). In den meisten Fällen fanden sich Homologien zu ests. Die Sequenzen wurden in den 3 möglichen Leserahmen übersetzt und versucht, ein Signalpeptid in einem offenen Leserahmen zu finden.

Tab. IV.5 Liste der unbekanntenen Sequenzen der e12,5 Bibliothek

Nr.	Ähnlichkeiten bzw. Identitäten zu ests	Signalpeptid; Anmerkungen
1 6x	AI121742	HRLKSCILLECFKHSLVCFNITSYT
2 3x	S82240 rhoE	MCEIRFUALCDLFRLTFCFULFVLFT HKXX; Antisense
3	AA748061	hydrophobe Aminosäuren
4	neu	
5	AI121742 Soares mouse mammary gland	
6	AA725965 Stratagene mouse skin	hydrophobe Aminosäuren
7	AA007915 Soares mouse embryo NbME13.5 14.5 similar to HUMAN P15586 N-ACETYLGLUCOSAMINE-6-SULFATASE PRECURSOR	Signalpeptid MKYSLWALLLAVLGTQLLGS LCSTV RSQ
8	AA691123 Knowles Solter mouse 2 cell Mus cDNA clone	Signalpeptid MLPHGPVILSVLYCCXHQT VAGNYA EHT
9	R08266 Homo sapiens cDNA clone	MVPFSILLAAVPSAPVAYVVAFVSG VSI AVSLLL PWFAGYEAG-ACQ
10	AF017630 Mus musculus vascular actin single-stranded DNA-binding factor 2 p44	Antisense; Signalpeptid : MVISLNYIILFFFXFSSSAASPDPSPL
11	D87957 Homo sapiens gene for protein involved in sexual development	MHSLATAAPVPTALA QVDREKIYQ WINELSSPETRENALLEL
12	U44839 Human putative ubiquitin C-terminal hydrolase	MPTFSPSLSHFLFFPSSFSVLTCTTSPX LXLFWXLLPQCLSNVP
13	Proteinhomologien zu einem	hydrophobe Aminosäuren

	hypothetischen Transmembran-Protein gil872041 (Z49907) [C. elegans]	
14 2x	R58613 Fetal heart Homo sapiens	MLGIHLVQLNSTVTXWCHSYLTLY WGQVCLSXXNSNQMFPPNQQPQQH LL
15	Homologie zu 5' genomischem Bereich vor dem S56581 alpha inhibin gene {5' region} [rats, Genomic]	
16	AA431528 Soares testis	
17	neu	
18	neu, 200 bp Insert	MLLTLRPLHFLMSAIPFPQIFQVC
19	AA967991 Soares mouse hypothalamus	
20 2x	AA217774 Soares mouse 3NME12 5	
21	M16228 Rat neuronal growth protein 43 (GAP-43)	Antisense
22	AA008070 Soares mouse embryo NbME13.5	MetQALAFFEGPAGLLCLLCRSYFPL GHCCMLFV
23	AI048138 Sugano mouse liver similar to WP:R10E9.1 CE01050 RNA BINDING PROTEIN	MetAGLTLFVGRLPPSARSDQLEELFS QV
24	A54592 110k actin filament-associated protein - chicken	
25	AA166283 Life Tech mouse embryo 13 5dpc	Antisense
26	AA462945 Soares mouse mammary gland similar to SW:YBN5_YEAST P38219 HYPOTHETICAL 44.2 KD PROTEIN	Das hypothetische Protein besitzt kein Signalpeptid.
27	AA542020 Soares mouse mammary gland similar to SYNAPSE- ASSOCIATED PROTEIN	Antisense
28	Neu	

4.2 Sequenzen der I.e14,5 und II.e14,5 Bibliothek

Ausgehend von der gleichen mRNA-Präparation wurden die beiden Mäuse-Embryonen Bibliotheken des Entwicklungsstadiums 14,5 (I.e14,5 und II.e14,5) unabhängig voneinander erstellt. Sie unterscheiden sich in der Komplexität der Bibliotheken.

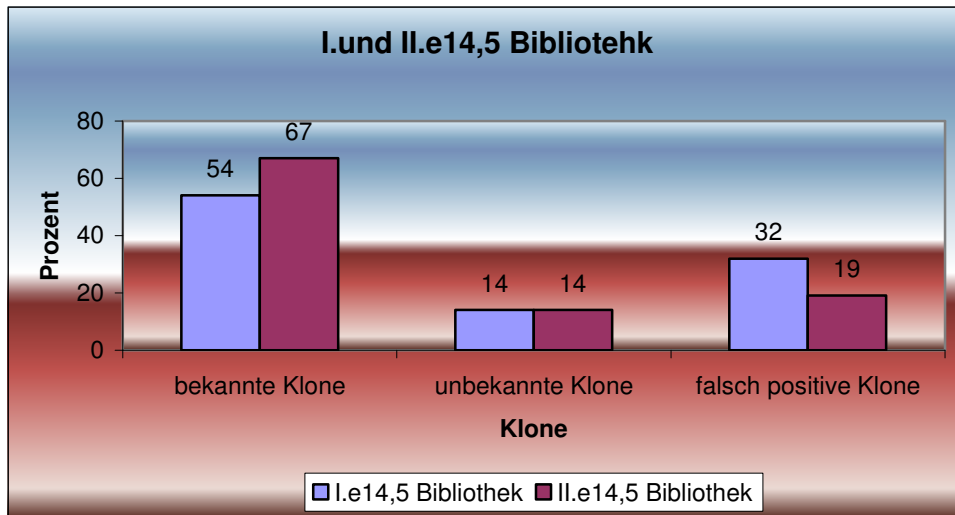


Abb. IV11 I. und II.e14,5 Bibliothek:

- Darstellung der zwei e14,5 Bibliotheken im prozentualen Vergleich
- Unterteilung in drei Gruppen: bekannte Klone, unbekannte Klone und falsch positive Klone
- Die I.e14,5 Bibliothek ergab 54 % bekannte, 14 % unbekannte und 32 % falsch positive Klone
- In der II.e14,5 Bibliothek waren 67 % bekannte, 14 % unbekannte und 19 % falsch positive Klone

a. bekannte Klone

Von der I.e14,5 Bibliothek wurden 81 Klone sequenziert: 44 (54%) waren richtig-positiv. In der II.e14,5 Bibliothek waren 66 (67%) von 99 sequenzierten Klonen richtig-positiv. Es fällt auf, daß einige Gene in beiden Bibliotheken sowohl in der Gesamtzahl der Isolate, wie in der Anzahl unterschiedlicher Klone stark repräsentiert sind (Tab. IV.6). Als Erklärung kommen a) hohe mRNA-Konzentrationen, b) Amplifikationen eines primären Klonen und c) bevorzugtes Wachstum von Klonen mit bestimmten Invertasefusionen in Betracht.

Tab. IV.6: Liste der bekannten, richtig-positiven Sequenzen der I.e14,5 und II.e14,5 Bibliotheken. Unterschiedliche Klone besitzen verschiedene cDNA Stücke innerhalb der Gensequenz des Proteins. Bei allen Klonen ist die 5'-Region (Signalpeptid) eingeschlossen. Die Gesamtzahl der Isolate resultiert aus dem mehrfachen Vorkommen.

	Protein	Genbank Nr.	Bibliothek	Gesamtzahl der Isolate	Unterschiedliche Klone	Signalpeptid
1	serum albumin	AJ011413	I.e14,5	7	6	MKWVTFLLLLFVSGS A-FSRG
			II.e14,5	7	6	
2	alpha-1 type-III collagen	M18933	I.e14,5	7	2	MMSFVQSGTWFLTL LHPTLILA-QQSNVDEL
			II.e14,5	13	6	
3	alpha-fetoprotein	V00743	I.e14,5	7	5	MKWITPASLILLHFA ASKAL
			II.e14,5	7	3	
4	Rattus norvegicus chondromodulin (Chm-1)	AF051425	I.e14,5	9	1	MTENSDKVPITMVGPE DVEFCSPPAYATVTVK PSGSPTRLLKVGAVVL ISGAVLLL-FGAIGA-FYFK
			II.e14,5	1	1	
5	tissue factor pathway inhibitor	AF004833	I.e14,5	3	1	MTYKMKKEYAFWAT VCLLLSLVPEFLNA-LSEEA
			II.e14,5	1	1	
6	corticosteroid-binding globulin	X70533	I.e14,5	1	1	MSLALYTCLFWLCTS GLWTTQA-VT
			II.e14,5	27	6	
7	calumenin	U81829	I.e14,5	3	1	MDLRQFLMCLSLCTA FALS- KPTEKKDRVHHE (ER Protein mit C-terminaler ER-retention sequence)
			II.e14,5	4	2	
8	Sprague-Dawley	U05675	I.e14,5	4	2	MRHLWLLLLSVSLVQ TQAATT

	fibrinogen					
9	alpha-1 protease inhibitor 5	M75717	I.e14,5	3	1	MTPSISWCLLLLGLC CLVPSFLAE
10	prekininogen	D84415	II.e14,5	1	1	MKLITLLLCSGLLTL TQG-EEAQE
11	integral membrane protein 1 (Itm1)	L34260	II.e14,5	1	1	MTKLGFLRLSYEKQD TLLKLLLSMAAVLSFS TRLFA-VLRFESV
12	osteopontin/ Minopontin	J04806	II.e14,5	2	2	MRLAVICFCLFGIASSL PVKV-TDSGSSE
13	B subunit of coagulation factor XIII	D10071	II.e14,5	1	1	MTLRHLPFILLLISGE LYA-EEKQCDFPTVEN
14	ecto-apyrase CD39	AF037366	II.e14,5	1	1	MEDIKDSKVKRFC SKN ILILGFTSILAVIALIAV GLT-QNK

b. Falsch-Positive Klone

In der I.e14,5 Bibliothek betrug der Anteil der falsch-positiven Klone 32 %, in der II.e14,5 Bibliothek lag der Anteil bei 19 %. Die Klone mit Sequenzen für ribosomale RNA machten die größte Klasse aus. Desweiteren fanden sich mitochondriale, cytoplasmatische und nukleäre Proteine. Die Sequenzen für sezernierte Proteine beinhalteten nicht das Signalpeptid oder lagen in Antisense-Orientierung vor (Tab. IV.7).

In einigen Fällen konnten in den translatierten Sequenzen Signalpeptide oder hydrophobe Aminosäureabfolgen in offenen Leserastern identifiziert werden. So findet sich z.B. in dem nur 80 Aminosäuren großen cDNA-Stück für das "adipose differentiation related protein", welches in Antisense - Orientierung vorliegt, ein Signalpeptid, das im Leserahmen der Invertase fusioniert ist.

Tab. IV.7: Liste der bekannten, falsch-positiven Klone der I.e14,5 und II.e14,5 Bibliotheken. Antisense bedeutet, daß die Proteinhomologie nicht auf dem Sinnstrang lag.

Protein bzw. rRNA	Genbank Nr.	Bibliothek	Signalpeptid; Anmerkungen
6 Klone 18S rRNA 3 Klone aus der I.e14,5 Bibliothek 3 Klone aus der II.e14,5 Bibliothek	X00525; X00686; U13369; X82564	I.e14,5 und II.e14,5	
8x ATPase subunit 6 (Atpase6) mitochondrial	AF093677	I.e14,5	Antisense
RW1 protein	AF060565	I.e14,5	
Homo sapiens Arp2/3 protein complex subunit p34-Arc (ARC34)	AF006085	I.e14,5	hydrophobe Aminosäuren
2x bone sialoprotein (IBSP)	L20232	I.e14,5	Antisense
stimulatory GTP-binding protein alpha subunit	Y00703	I.e14,5	
H.sapiens mRNA for RNA polymerase II	X63563	I.e14,5	hydrophobe Aminosäuren
multiubiquitin-chain-binding protein (Mcb1)	AF013099	I.e14,5	

Human mRNA for 26S proteasome subunit p31,	D38047	I.e14,5	hydrophobe Aminosäuren
SCG10 gene	L20263	I.e14,5	
laminin receptor	J02870	I.e14,5	Antisense
mitochondrial genome.	V00711	I.e14,5	Antisense
cdc37 homolog	U43076	I.e14,5	
2x glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	M32599	I.e14,5	hydrophobe Aminosäuren
mitochondrial genome	V00711	I.e14,5	Klonierungsartefakt
mitochondrial 5' similar to SW:ATP6_MOUSE P00848 ATP SYNTHASE A CHAIN	L07095	II.e14,5	hydrophobe Aminosäuren
glycinamide ribonucleotide synthetase	U2089	II.e14,5	
HMGI-C nuclear phosphoprotein	X58380	II.e14,5	
homeobox protein (Dlx5)	AF033011	II.e14,5	
microtubule-associated protein 4 (MAP4)	M72414	II.e14,5	MILLAWAASVPV SSSMSWARNIS
HUMAN EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4H (EIF-4H)	Q15056	II.e14,5	
calumenin	U81829	II.e14,5	Antisense
Homo sapiens chromosome-associated protein-C (hCAP-C)	AF092564	II.e14,5	
guanine nucleotide-exchange protein [Bos taurus]	2674107	II.e14,5	nein
N-acetylglucosaminyltransferase I	L07037	II.e14,5	Antisense
Human translation initiation factor eIF-2 gamma subunit	L19161	II.e14,5	
adipose differentiation related protein	M93275	II.e14,5	Antisense; MALFXPLFMXCI

			PKTVLMLPLTTX LVLSTLPV
p52 pro-apototic protein [Gallus gallus]	2599492	II.e14,5	
Rat brain creatine kinase	M14400	II.e14,5	
sox-4	X70298	II.e14,5	
Homo sapiens cell cycle progression 2 protein (CPR2)	AF011792	II.e14,5	

c. Unbekannte Klone

Als nicht eindeutig identifizierbar erwiesen sich 11 Sequenzen (14 %) der I.e14,5 Bibliothek und 14 Sequenzen (14 %) der II.e14,5 Bibliothek. Einige der Klone (Nr. 6; 8; 15; 17; 19; 23) besitzen Homologien zu nicht sezernierten Proteinen und sind daher potentiell weniger interessant. Der Klon Nr. 2 zeigt Homologie zum humanen Apolipoprotein F. Es ist davon auszugehen, daß die klonierte Sequenz das Maus-Homolog des Proteines oder ein verwandtes Protein darstellt.

Die Klone Nr. 5 und 18 besitzen in Teilen ihrer Sequenzen Homologien zu Ionen-Kanälen. Bei diesen Proteinen könnte es sich um bisher unbekannte transmembrane Kanäle handeln (Tab.IV.8).

Tab. IV.8: Liste der unbekanntenen Sequenzen der I.e14,5 und II.e14,5 Bibliotheken. Wenn in der translatierten Sequenz eine signalpeptid - ähnliche Aminosäuresequenz gefunden wurde, ist diese angegeben.

Nr.	Ähnlichkeiten bzw. Identitäten zu ests	Bibliothek	Signalpeptid
1	AA944451 Normalized rat embryo	I.e14,5	
2 2x	435967 Die Aminosäuresequenz des Klons ist zu 64% identisch zu humanem Apolipoprotein F	I.e14,5	Signalpeptid : MetHSLRLILMSIQLL CYLLCPVDATSH
3	neu	I.e14,5	Signalpeptid : MLLKIFDXFFLLKPS KCITL

4	AA276642 Soares mouse 3NbMS	I.e14,5	
5	AF02798 Rattus norvegicus low voltage-activated, T-type calcium channel alpha subunit	I.e14,5	MGVGMLVVTWNVL ALVXRLAAGRGC GG RAVGGGL
6	1572600 Zik1 Aminosäuresequenz des Klons ist zu 57% identisch zu murinem Zik1	I.e14,5	
7	AI121742 Soares mouse mammary gland	I.e14,5	MHRLRSCLLC FKH SLVLFNITSY TXX
8	AA253945 Soares mouse 3NME12 5 Mus musculus cDNA clone 670023 5'similar to TR:G190352 G190352 PEREGRIN.	I.e14,5	
9	AI256405	I.e14,5	MWWGLVLSLLTNLF LLPLHYLPINDNLLL
10	1297319 (U53445) DOC1 [Homo sapiens]	I.e14,5	
11	neu	II.e14,5	MFIHLLPIFSSCWQN SNSSCDRC
12 2x	AA174626 Soares mouse 3NbMS Mus musculus	II.e14,5	MSLSLSLFPYFLKHF LLIFIFFLRC E FVAG- VNYL
13	H86802 Homo sapiens	II.e14,5	
14	similar to X07868_putative insulin-like groth factor II associated protein (HUMAN)	II.e14,5	
15	X58380 HMGI-C mRNA for a nuclear phosphoprotein	II.e14,5	
16	AA387906 Ko mouse embryo 11 5dpc Mus mus.	II.e14,5	
17	AI181329 Soares 2NbMT Mus musculus cDNA clone 1395074 5' similar to TR:O13024 XL-inner centromer protein	II.e14,5	
18	AA397575 Soares testis NHT Homo sapiens cDNA clone 729387 5' similar to TR:G758110 G758110 SODIUM CHANNEL ALPHA SUBUNIT	II.e14,5	MetSHVRVPCQAPCR TXRVGPVPAWCVLS PAFSFSVWPAILGLP RPRLPCP

19	AJ007590 Homo sapiens mRNA for XPR2 protein	II.e14,5	
20	AA415726 Knowles Solter mouse 2 cell Mus musculus AB005754 Homo sapiens mRNA for LAK-1,	II.e14,5	
21	AA674768 Knowles Solter mouse blastocyst	II.e14,5	
22	AA138902 Stratagene mouse heart	II.e14,5	
23	d1035557 Die Aminosäuresequenz des Klons ist zu 30% identisch zu humanem nolP (nukleär)	II.e14,5	

5. Vergleich der hmEC Bibliothek mit den Mäuse Embryonen Bibliotheken

5.1 Uracil Selektion

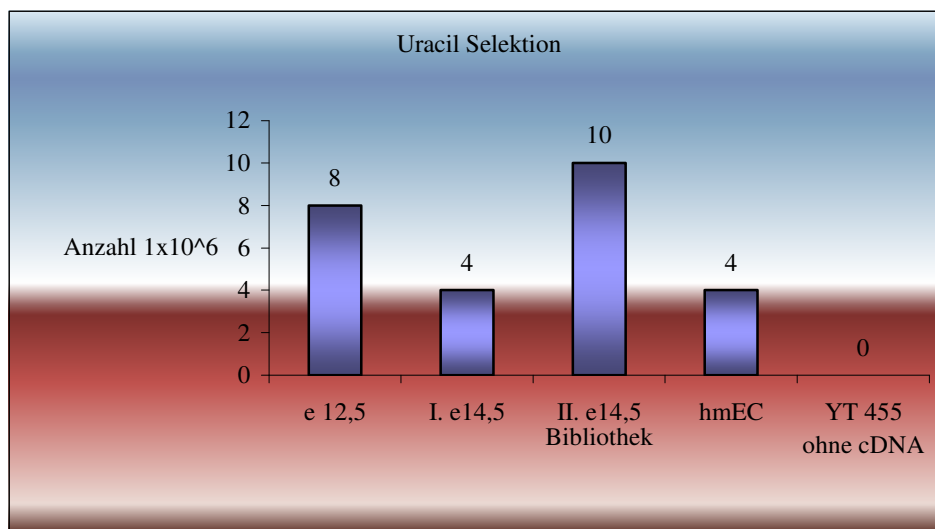


Abb. IV.12 Uracil Selektion: Anzahl der Uracilpositiven Kolonien nach Transformation von YT455 mit Plasmid - DNA der verschiedenen cDNA Banken. Die ausplattierte Menge an kompetenten Hefezellen in der Negativkontrolle YT 455 betrug 1/50 der Menge, die für die

cDNA Banken verwendet wurde. Die einzelnen Bibliotheken zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Die hmEC Bibliothek hat die gleiche Anzahl an positive Uracilkolonien wie die I.e14,5 Bibliothek. Der Anteil der II.e14,5 lag mit 10×10^6 Kolonien am größten und mit 8×10^6 Kolonien lag die e12,5 Bibliothek im Mittelfeld.

5.2 Saccharose Selektion

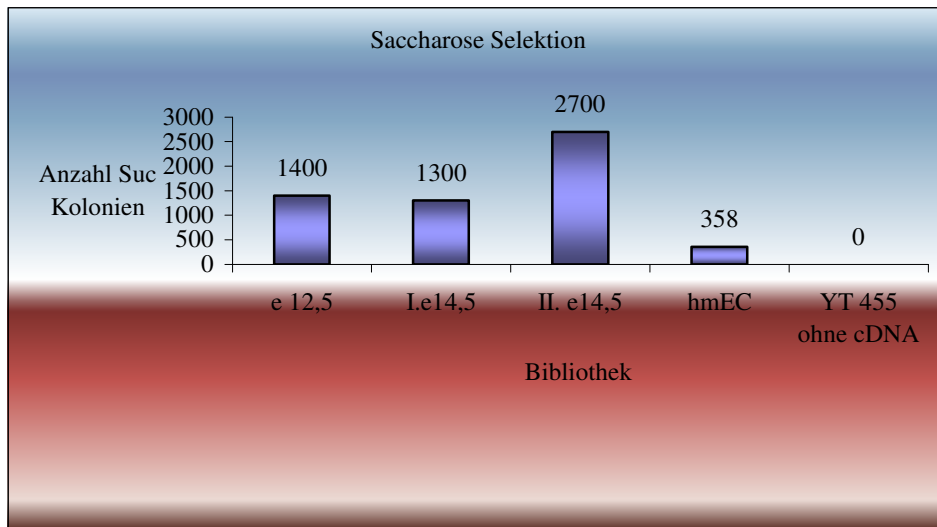


Abb. IV.13 Sacchararose Selektion: Ergebnis der Selektion der Uracilpositiven Kolonien auf Saccharose Selektionsagar nach drei tägiger Inkubation. Auf diesem Medium wachsen Zellen, die das Enzym Invertase sezernieren. Mit 2700 Kolonien der II.e14,5 Bibliothek war ihr Anteil am größten und mit 358 Kolonien lag der Anteil der hmEC Bibliothek am niedrigsten. Die I.e14.5 (1300 Kolonien) und e12,5 (1400 Kolonie) Bibliotheken lagen demnach im Mittelfeld.

5.3 Sequenzen der einzelnen Bibliotheken

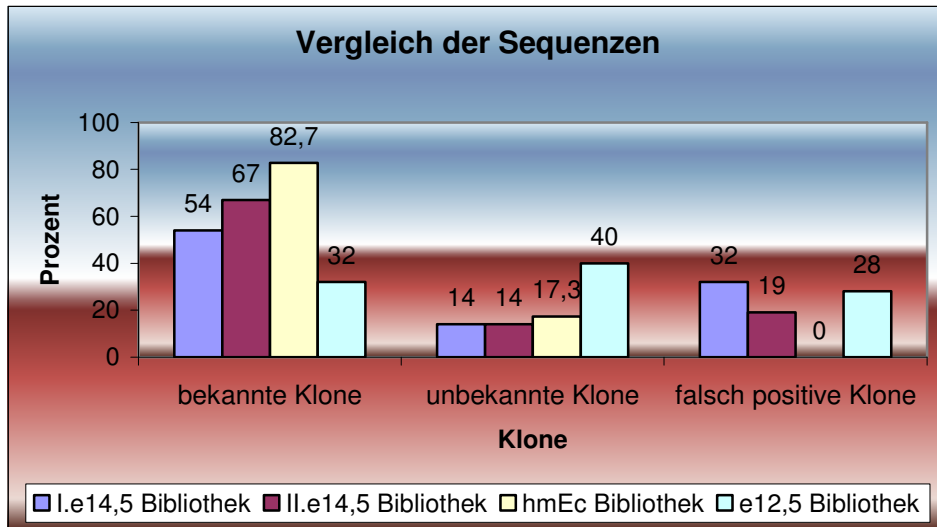


Abb. IV.14 Vergleich der Sequenzen:

Die einzelnen Bibliotheken wurden in drei Kategorien unterteilt:

1. bekannte Klone: Der Anteil variiert zwischen 32 % (e12,5 Bibliothek) und 82,7 % (hmEC Bibliothek) unter den Bibliotheken.
2. unbekannte Klone: Der Anteil liegt hier zwischen 14 % (I.e14,5 und II.e14,5 Bibliothek) und 40 % (e12,5 Bibliothek) unter den Bibliotheken. Mit 17,5 % lag die hmEC Bibliothek in der Mitte.
3. falsch positive Klone: Diese Gruppe ergab Anteile zwischen 0 % für die hmEC Bibliothek und 32 % für die I.e14,5 Bibliothek. Mit 19 % für die II.e14,5 Bibliothek und 28 % für die e12,5 Bibliothek lagen sie mit ihren Anteilen im Mittelfeld.

V. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es die Rolle des neuentwickelten pYD-Vektor bei der Entwicklung eines Selektionssystems zum Screening von cDNA Bibliotheken auf sezernierte Proteine und Membranproteine darzustellen. Die Überprüfung der Sensitivität und Spezifität des Systems sollte mit einer humanen Endothelzellbibliothek im Vergleich zu Mäuseembryonen Bibliotheken durchgeführt werden. Gleichzeitig sollen neue Moleküle gefunden werden, die eventuell Kontrollfunktion in der Angiogenese ausüben.

1. Funktionsfähigkeit des pYD-Vektors

Zunächst musste ein geeigneter Vektor neu konstruiert werden. Als Ausgangspunkt für die Vektorkonstruktion wurde der E. coli-Hefe Shuttlevektor pYEUra3 benutzt. In dieses Plasmid wurde das Hefegen *suc2* (Invertase-Gen) kloniert. Im Invertase-Gen wurden zuvor Startkodon und Signalpeptid deletiert und eine einmalige Restriktionsstelle NotI an Stelle des Startkodons geschaffen. Das neue Konstrukt wurde pYD Vektor benannt. Danach konnte man das Plasmid in den Bakteriophagen Lamda ZapII einklonieren.

Als weitere wichtige Eigenschaft blieb die *in vivo* Exzision des einklonierten pYD-Plasmid (λ pYD), welcher aus dem Bakteriophagen Lamda ZapII mittels Helferphagen erhalten wurde. Mit Hilfe dieses Vektors war es nun möglich, Genbanken aus beliebigen Geweben oder Zellen auf sezernierte Proteine zu untersuchen.

Um die Funktionsfähigkeit des Plasmids nachzuweisen, wurde eine gröbenselektionierte (400-1000 bp) random-primed cDNA-Bibliothek aus Endothelzellen in die NotI Schnittstelle kloniert und mittels *in vivo* Exzision des Bakteriophagen eine Plasmidbibliothek hergestellt.

Als Selektionsbasis diente ein neuartiges Hefe-System, mit dem die Selektion für Signalpeptide möglich ist. Sezernierte Proteine weisen stets ein solches Peptid auf. Das Hefe Enzym Invertase (kodiert durch das *suc2* Gen) diente als Grundelement. Hefezellen können Disaccharide nicht katabolisieren. Invertase katalysiert extrazellulär die Spaltung von Saccharose in Glucose und Fructose. Hefezellen vermögen mit Hilfe dieser neu entstandenen Monosaccharide in einem Medium, in dem Saccharose als alleinige Energiequelle vorhanden ist, zu wachsen. Als

Selektionsstamm wurde eine Hefe verwendet, deren Invertase-Gen (*suc2*) deletiert wurde. Diese Hefe wurde mit pYD-Plasmid transformiert, welche zwar ein Invertase-Gen besitzt, aber kein Signalpeptid und kein Startkodon trägt. In das Selektionsplasmid wurden dann die cDNAs mit Startkodon und Signalpeptid inkloniert (pYDc), was die Funktionsfähigkeit des Plasmids gewährleistete. Dadurch konnten die cDNAs, die für ein Signalpeptid mit vorangehendem Startkodon kodierten, wieder eine Sezernierung einer funktionellen Invertase ermöglichen. Diese Zellen konnten somit identifiziert werden, weil sie Saccharose als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen können.

1.1 hmEC Bibliothek

In dieser Arbeit wurde eine humane Endothelzell cDNA Bibliothek hergestellt, wobei die cDNAs dem Selektionsverfahren der Hefe–Invertase-Selektionssystem unterworfen wurden. Aus den gewachsenen Klonen wurde das Plasmid isoliert, um anschließend das inserierte cDNA Fragment näher zu charakterisieren.

Die jeweilige cDNA wurde dann aus dem Plasmid isoliert und als cDNA Fragment sequenziert. Die Sequenzen wurden anschließend einer Computeranalyse unterworfen. Die Sequenzen wurden in zwei Gruppen eingeteilt:

1. Klone, die identisch mit bekannten Genen sind;
2. Klone, die Homologien zu ESTs („expressed sequence tags“) oder keine Homologien zu einem Protein der Datenauswertung aufwiesen, also als unbekannte Sequenzen zu bezeichnen sind.

1. Bekannte Klone

Unter den bekannten Klonen befinden sich strukturell unterschiedliche Proteine wie sezernierte Proteine und Membranproteine. Der Hauptteil der Sequenzen kodierte für integrale Membranproteine, wobei ein ER Protein Calumenin und ein Mitochondriales Membranprotein identifiziert werden konnten. Der Sekretionsweg für extrazelluläre Proteine und ER Proteine ist dagegen identisch und die Information für den Verbleib im ER liegt im nicht klonierten, C-terminalen Bereich des Proteins. Desweiteren wurden extrazelluläre Proteine wie der Insuline-Like Growth Factor gefunden, die aber mit einer geringeren Frequenz als integrale

Membranproteine in Erscheinung traten. Das humane extrazelluläre Protein, ein membran Protein, wurde 15 mal isoliert.

2. Unbekannte Klone

Die Analyse der nicht bekannten Sequenzen hat sich aufgrund der begrenzten Größe der cDNA als schwierig erwiesen. Die Mehrzahl dieser Sequenzen trat nur einmal auf, was darauf hinweisen könnte, dass es sich um schwach exprimierte Gene handelte. Einige dieser Sequenzen zeigten Homologien zu bekannten ESTs, die vielleicht auf ihre Funktion hinweisen könnten. Letztendlich ist die Klonierung der gesamten cDNA notwendig, um genauere Angaben über deren Funktion sagen zu können. Zusätzliche Information zur möglichen Funktion können Expressionsanalysen mittels in situ Hybridisierung geben. In der Analyse der humanen Endothelzell Bibliothek waren keine Endothelzell spezifische Gene eruiert. Somit sind auch keine Moleküle gefunden worden, die möglicherweise an der Entwicklung des vaskulären Systems beteiligt sein könnten.

Unter den 15 sequenzierten Klonen waren keine falsch positiven Klone zu finden. Dies ist möglicherweise auf die begrenzte Anzahl der sequenzierten Klone zurückzuführen.

1.2 Mäuse Embryonen Bibliothek

Die Sequenzen der Mäuse Embryonen Bibliothek wurden in drei Kategorien unterteilt:

1. bekannte Klone: cDNA Fragmente, die für ein Signalpeptid eines bekannten, sezernierten Proteins kodierten.
2. unbekannte Klone: cDNA Fragmente, die unbekannte Sequenzen enthielten.
3. falsch positive Klone: cDNA Fragmente, die für bekannte, nicht sezernierte Proteine kodierten.

In den drei Mäuse Embryonen Bibliotheken wurden unterschiedliche Anteile dieser drei Kategorien gefunden.

1. bekannte Klone:

Der Anteil der bekannten Klone variiert in den Mäuse Embryo Bibliotheken zwischen 32-67%. Es befinden sich strukturell unterschiedliche Proteine wie integrale Membranproteine und sezernierte Proteine. Außerdem wurde mit Calumenin ein Protein der ER gefunden. Dies ist nicht verwunderlich, da der Sekretionsweg ins ER für ER Proteine und extrazelluläre Proteine identisch ist und die Information für den Verbleib im ER im nicht klonierten C-

terminalen Bereich des Proteins liegt. Ein Hauptteil der bekannten Sequenzen kodiert für Serum Proteine, die in der Leber produziert werden. In den drei Bibliotheken kamen die Leberproteine Alpha-Fetoprotein, Serumalbumin und corticosteroid binding Globulin mit hoher Frequenz vor. Desweiteren wurden mit geringer Frequenz der Faktor VIII und Fibrinogen als Komponenten des Blut Gerinnungssystem gefunden. Die Leber macht ca. 10 % des Gesamtgewebes der Embryonen aus und ist damit das größte embryonale Organ. Man kann darüber hinaus annehmen, dass die Leber auch im Embryo einen, im Vergleich zum restlichen Gewebe, großen Anteil sezernierter Proteine kodiert. Viele davon sind Serumproteine, die in großen Mengen im wachsenden Embryo synthetisiert werden. Aus diesen Gründen ist davon auszugehen, dass ein großer Teil aller mRNA- Moleküle für sezernierte Proteine aus der Leber stammt. Die Prävalenz mit der in allen drei Embryonen Bibliotheken cDNA Klone mit Sequenzen für Leberproteine selektioniert wurden, wird durch die obigen Überlegungen erklärbar. Neben Leberproteine wurden mit Kollagen und Chondromodulin zwei bekannte Proteine der extrazellulären Matrix gefunden, die ebenfalls in grossen Mengen im Embryo vorkommen. Das häufige Auftreten gewisser Sequenzen, die für sezernierte Proteine kodieren, ist sicher zum größten Teil durch die relativ großen mRNA Konzentration bedingt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß bestimmte Proteine präferentiell selektioniert wurden. Dies kann z. B. mit der Erkennung des Signalpeptids, der Stabilität und Sekretionsfähigkeit des Fusionsproteins oder der katalytischen Aktivität des Fusionsproteins zusammenhängen.

Grundsätzlich scheint das Zufügen N-terminaler Aminosäuren wenig Auswirkungen auf die funktionelle Aktivität der Invertase zu besitzen. In vorherigen Arbeiten (Kaiser et al., 1987; Jacobs et al., 1997; Klein et al., 1996) eine grosse Anzahl in Peptiden an die Invertase fusioniert, ohne dass Wachstum auf Sucrose drastisch eingeschränkt wurde. Messungen der extrazellulären Invertaseaktivität verschiedener Fusionsproteine haben gezeigt, dass noch 3,4% der Wildtypen ausreichen, um gutes Wachstum auf Sucrose zu ermöglichen (Kaiser et al., 1987). Da das Wachstum von Embryonen von der Vaskulogenese und Angiogenese abhängig ist, wäre zu erwarten, daß Faktoren selektioniert werden, die eine Rolle in der Gefässentwicklung eine Rolle spielen könnten. Die Selektion solcher Gene ist jedoch ausgeblieben. Die Ursache liegt entweder in der selektiven Anreicherung bestimmter Signalpeptide im Hefesystem oder in den quantitativen Unterschiede in der mRNA. Manche Sequenzen wurden in identischer Form mehrmals isoliert. Dies lässt sich wahrscheinlich auf die Amplifikation eines ursprünglichen, primären Klons zurückführen. Da die Bibliotheken

über zwei Schritte amplifiziert wurden, könnte eine präferentielle Amplifikation bestimmter Klone dieses Phänomen erklären.

2. Unbekannte Klone

Der Anteil der unbekannt Sequenzen der Mäuse Embryonen Bibliotheken betrug zwischen 14 – 40 %. Es ist auffällig, dass die Mehrzahl der Sequenzen, ähnlich wie in der Gruppe der falsch positiven Klone, nur einmal auftreten. Dies kann zum einen darauf hindeuten, dass ein Teil falsch positiv ist. Andererseits kann es sich auch um Fragmente schwach exprimierbarer Gene für sezernierte Proteine handeln. Es ist anzunehmen, dass der Anteil bekannter Sequenzen unter schwach exprimierten Genen größer ist als in der Klasse stark exprimierter Gene. Einige Sequenzen zeigten Homologien zu bekannten Proteinen, die einen Hinweis auf ihre mögliche Funktion geben. Beispiel dafür sind zwei Sequenzen, die für potentielle Ionenkanäle kodierten und eine Sequenz mit starker Ähnlichkeit zum humanen Apolipoprotein F. Einige unbekannt Fragmente enthielten Signalpeptid ähnliche Sequenzen. Die weitere Charakterisierung dieser Fragmente kann durch die zuverlässige Bestimmung ihrer Sequenz und einer Datenbanksuche nach ähnlichen oder identischen est-Klone erfolgen. Letzendlich wird auch die Klonierung der gesamten cDNA nötig sein, um verlässliche Vorhersagen über ihre Funktion treffen zu können.

3. falsch positive Klone

Der Anteil der falsch positiven Klone machte 19-32% der drei verschiedenen Bibliotheken aus. In allen Mäuse Embryo Bibliotheken sind Sequenzen für ribosomale RNA die häufigste Klasse. Es ist unklar, ob dies auf bestimmte strukturelle Eigenschaften der tanslatierten Peptide zurückzuführen ist. Unter den Selektionierten scheint der Anteil von Antisense Insertionen gegenüber nicht selektionierten Sequenzen erhöht zu sein. In einigen Fällen sind signalähnliche hydrophobe Sequenzen ermittelt worden. Allgemein ist davon auszugehen, dass die falsch positiven Sequenzen nicht genau analysiert worden sind, so dass wahrscheinlich Signalpeptide übersehen worden sind. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein gewisser Anteil solcher Sequenzen als Signale für alternative Sekretionsmechanismen dient. Es existierten alternative Sekretionsmechanismen, die nicht über hydrophobe Signalpeptide gesteuert werden. Welche Signale in Proteinen in diesen Fällen Sekretion ermöglichen, ist nicht bekannt. Etwa 20% aller Zufallssequenzen, die im Leserahmen fusionierten und kein Stopkodons enthielten, könnten als Signalpeptid dienen. Falsch positive, ähnlich wie die unbekannt Klone, wurden auch nur einmal isoliert.

2. Vor- und Nachteile des Selektionssystems

Das Hefe-Selektionsverfahren hat sich grundsätzlich als effizient erwiesen, systematisch nach sezernierten Proteinen zu suchen, die eine Signalpeptidsequenz aufweisen können.

Der Vorteil dieses Selektionsverfahrens liegt in der Handhabung und in der einfachen, effektiven Selektion ohne Anwendung hochkomplizierter, zeitintensiver Anwendung von immunologischen Verfahren.

In vitro kultivierte humane Endothelzellen spiegeln nicht die Komplexität der Expression wieder, die man für diesen Screen erwarten würde. Dies könnte man überwinden, indem man eine Normalisierung der Bibliothek durchführte. Denn in den meisten Zellen werden die Kopien von den häufigen mRNAs auf über 100.000 geschätzt. Daher repräsentiert der größte Teil der cDNAs einer unmodifizierten Bibliothek, die wir auch für den Screen eingesetzt haben, die häufigen mRNAs. Dabei werden die seltenen mRNAs nicht kloniert. Dies führt dazu, dass die schwach transkribierten Gene nicht gefunden werden. Daher ist es sehr wichtig, eine cDNA Bibliothek zu konstruieren, in der die Frequenz jedes cDNA Klon in gleicher Häufigkeit auftritt (normalisierte Bibliothek). Durch die Normalisierung einer Bibliothek werden sehr häufige mRNAs aus dem Screen minimiert und erscheinen in gleicher Häufigkeit wie die seltenen mRNAs, die für schwach exprimierte Moleküle kodieren. Dadurch ist es auch möglich, in gleicher Häufigkeit seltene mRNAs wie die reichlichen mRNAs zu klonieren und anschließend zu sequenzieren. Die Wahrscheinlichkeit ist dann größer, selten transkribierte Gene zu finden und deren Moleküle zu identifizieren.

Im Vergleich zu den Methoden, die cDNAs für verschiedene Moleküle auf der Basis der Funktion des einzelnen Moleküls und der biologischen Aktivität klonen, bietet das Hefe-Invertase System folgende Unterschiede:

Hier wird eine Methode beschrieben, die nicht die Funktion des Moleküls zum Nachweis benutzt. Zum Nachweis von neuen Molekülen ist die Methode unabhängig von der Funktionalität des Proteins, ist jedoch auf die Anwesenheit von einer Signalpeptidsequenz angewiesen. Da die meisten sezernierten Proteine und Membranproteine Signalpeptide haben, ist es auch möglich gleichzeitig verschiedenen Moleküle einer Zelle systematisch nachzuweisen, wobei es mit der herkömmlichen Methode ohne Benutzung der Signalpeptidsequenz äußerst schwierig erscheint. Denn man müsste für jedes Molekül spezifisch ein eigenes System entwickeln und kann dann auch nicht gleichzeitig verschiedene Moleküle nachweisen. Aber es gibt auch Proteine wie zum Beispiel das Transmembranprotein „Rhodopsin mit seinen sieben

Einheiten“, die keine Signalpeptidsequenzen beinhalten. Es ist unmöglich solche Proteine mit dem Hefe-Invertase System zu identifizieren.

Ein weiterer Nachteil muss noch erwähnt werden nämlich, dass keine Spezifität auf einzelne Proteine besteht, sondern lediglich zufällig sezernierte Proteine und Membranproteine mit Signalpeptidsequenzen nachgewiesen werden können.

Gemeinsam ist in den etablierten Selektionssystemen die Fusion von cDNA-Fragmenten mit einem Reporter gen und die Ausnutzung der ortsbestimmenden Wirkung des Signalpeptides auf die Lokalisation des chimären Proteins: Tashiro beschrieb 1993 als erster Autor die „Signal Sequence Trap“ Methode, die die Eigenschaft eines Signalpeptides benutzt, um sezernierte Proteine und Membranproteine nachzuweisen. Dazu wurde ein Vektor benutzt, der die Synthese von Interleukin-2 Rezeptor fördert, falls ein Signalpeptid in der einklonierten cDNA Sequenz vorhanden ist. Der Nachweis erfolgte mit einem Antikörper gegen den Rezeptor mittels der Immunfluoreszenzmethode (Tashiro, K. et al., 1993 und Shirozu, M. et al., 1996). Eine modifizierte Form der Signal Trap Methode wurde mittels Epstein-Barr Virus Shuttle Vektor mit einklonierter CD4 cDNA ohne Signal Sequenz entwickelt. Die einklonierten cDNAs mit Signal Sequenz werden anschließend mit der Immunfluoreszenz Methode (antiCD4 Antikörper) auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Hier werden nur Klone nachgewiesen, die eine Signal Sequenz beinhalten, die dann die Expression des CD4 auf der Zelloberfläche ermöglichen (Imai, T. et al., 1996). Im Gegensatz zur Hefe Selektions Methode wurde hier spezifisch ein Molekül gefunden, nämlich ein neues CC Chemokine Molekül genannt „TARC“, das T-Zellen direkt aktivieren kann. Der Unterschied liegt hier in der Benutzung von Säugerzellen statt Hefezellen und der Nachweis wird zusätzlich in einem weiteren Schritt über immunologische Methoden mit Antikörper durchgeführt. Der Vorteil des Hefe-Selektionssystems liegt lediglich in der Art und Weise und einfachen Handhabung der Methode, bringt jedoch keine nennenswerte Vorteile bezüglich der Selektivität und Effizienz im Vergleich zur „Signal Sequenz Trap“ Methode. Beide Methoden sind nicht in der Lage Transmembranmoleküle nachzuweisen, die kein Signalpeptid Sequenz haben. Als Beispiel ist hier das wichtige Transmembran Protein Rhodopsin genannt, das kein Signalpeptid Sequenz beinhaltet. Sugano und Mitarbeiter entwickelten im Jahre 1998 eine neue Methode genannt „Transmembrane-Domain Trapping“, die es ermöglicht solche Proteine nachzuweisen. Der benutzte Vektor beinhaltet den extrazellulären Part des IL-2 Rezeptors mit Signalpeptid Sequenz. Falls die einklonierte cDNA eine Aminosäuresequenz beinhaltet, die eine Funktion in der Membran ausübt, so wird dieses chimäre Protein auf der Zelloberfläche exprimiert und kann dann so mittels Antikörper über der

Immunfluoreszenz Technik nachgewiesen werden. Der Nachteil liegt hier darin, dass keine Sekretionsproteine nachgewiesen werden können.

Hier sind bisher komplexe, und zeitintensive Methoden beschrieben worden. Chen und Leder beschrieben 1999 eine einfachere Methode, die das humane plazenta alkalische Phosphatase Gen (PLAP) als Reporter Gen benutzen. Der Vektor beinhaltet das PLAP mit deletiertem Startkodon und Signalpeptid. Falls die einklonierte cDNA Signalpeptid und Startkodon beinhaltet, so kann dann das chimäre Protein sezerniert oder in der Membran verankert werden. Der Nachweis erfolgt dann über eine einfache Fluoreszenz Methode mit Zugabe von kommerziell erhältlichen Substraten als Indikator. Andere alkalische Phosphatasen, die im Gegensatz zur benutzen PLAP hitzelabil sind, werden durch Hitze inaktiviert und können so das System nicht negativ beeinflussen. Als Reporter Zellen werden hier jedoch ebenfalls Säugierzellen (COS-Zellen) benutzt. Komplizierte immunologische Methoden entfallen. Diese Methode ist vom Umfang her am einfachsten. Der Nachweis von neuen Molekülen kann nur durch Zugabe eines Indikators erfolgen.

Eine weitere Methode (Kojima und Kitamura, 1999) basiert darauf, Signalpeptide in cDNAs nachzuweisen, indem die Eigenschaft vom Signalpeptid benutzt wird, ein Zytokin Rezeptor (veränderter Thrombopoetin Rezeptor) an die Zelloberfläche zu dirigieren. Die veränderte Form erlaubt es, bestimmte Zellen IL-3 unabhängig zu züchten. Diese Eigenschaft wird benutzt, um neue Klone über Zellproliferation zu identifizieren. Der Unterschied zum Hefe-Invertase System besteht darin, daß hier Säugierzellen statt Hefezellen benutzt werden. Dieses System der Zellproliferation ist vom Umfang her ein wenig einfacher, denn das Hefe Invertase System benötigt zwei weitere Schritte, nämlich die Hefetransformation mit anschließender mehrtägiger Inkubation.

Eine neuere Methode benutzt *Escherichia coli*, um humane Sekretions und Membranproteine zu identifizieren (Tan, R. et al., 2003): Als Reporter gen wird das β Lactamase Gen benutzt, das die Eigenschaft besitzt, Carbenicillin zu inaktivieren. Der benutzte Vektor besitzt kein Signalpeptid und kein Startkodon im β -Lactamase Gen. Die einklonierte cDNA muss diese Eigenschaften mitbringen, um ein Fusionsprotein zu produzieren, das den Zellen erlaubt, den Einsatz von Carbenicillin zu überleben. Dieses System zeigte, dass die Methode noch einfacher als andere Verfahren und sensitiver als alle anderen Methoden ist. Die Selektionsrate liegt hier bei 0,5 – 1 %, bei den Methoden, die Säugierzellen benutzen, liegt die Rate kleiner 0,04 % (Kojima und Kitamura 1999) und schließlich liegt die Rate bei der Hefemethode noch weniger. Insgesamt bietet das Hefe Invertase System keine überragenden Vorteile gegenüber den etablierten Methoden.

3. Verwendung des pYD-Vektors zur Erforschung von Angiogenetisch wirksamen Molekülen

Ein weiteres wichtiges Gewebe, das zum Screen von angiogenetischen Faktoren und anderen Signalmolekülen eingesetzt werden kann, ist das Tumorgewebe. Denn die Angiogenese spielt als limitierender Faktor eine wichtige Rolle im Tumorwachstum und Metastasierung (Folkman, 1995). In verschiedenen Tumoren wurde eine hohe Vaskularisation mit einer schlechteren Prognose korreliert. Auf dies bezogen zeigen hoch maligne Gliome eine erhöhte Expression von VEGF als Tumoren mit niedriger Malignität. (Hatva et al., 1995). Tumordurchblutung, Eintritt von Tumorzellen in den Blutstrom und die konsekutive Metastasierung wird wesentlich durch die Produktion von VEGF mitbestimmt, indem es die Vaskularisation und Endothelzellpermeabilität im Tumor und im umliegenden Gewebe erhöht. Außerdem führt es zur Fenestration von Blutgefäßen (Esser et al., 1998) und zur Bildung von vesiculo-vacuolar Organellen, die Proteinkanäle bilden können und so Proteinen zur Extravasion verhelfen (Dvorak et al., 1996). Dies führt zur Bildung eines extravaskulären Fibringels, welches das Wachstum von Endothel und Tumorzellen unterstützt und so eine Invasion von Stromazellen ermöglicht (Dvorak et al., 1992).

Die VEGF Expression wird sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wesentlich durch einen niedrigen pO_2 induziert (Ferrara, 1999). Auch Tumor Hypoxie erhöht die VEGF Expression, indem sie zu einer Induktion von VEGFR-2 im Endothel führt (Plate et al., 1992). Der VEGFR-2 ist notwendig für die Tumorangiogenese, denn VEGFR-2 negativen Mäuse weisen kein Tumorwachstum auf (Millauer et al., 1996). Obwohl das VEGFR-1 auch durch Hypoxie stimulierbar ist, wird dieser Rezeptor nicht durch Tumolvaskularisierung hochreguliert. Der dritte Rezeptor, VEGFR-3, ist sowohl in metastasierten Lymphknoten und Lymphangiomen als auch im Kaposi Sarkom auffindbar (Lymboussaki et al., 1998; Jusilla et al., 1998). VEGF-B wurde in den meisten Tumoren, VEGF-C in lymphatischen Tumoren und PIGF im Hemangioblastom entdeckt. (Hatva et al., 1996). Aber diese Faktoren sind Hypoxie unabhängig und werden von anderen Faktoren reguliert.

Als konkretes Beispiel für die Rolle der Angiogenese im Tumorwachstum ist das Kaposi Sarkom (KS). Es stellt eine neoplastische Manifestation des AIDS dar, das durch das human immundeficiency virus (HIV) induziert wird. Der durch das KS Herpesvirus/Human Herpesvirus-8 kodierte G-Protein Rezeptor induziert VEGF (Cornali et al., 1996), Zell Transformation und Tumorbildung in Mäusen (Bais et al., 1998). HIV-1 kodiert für ein

Transkriptions-Regulatorprotein Tat, das auch angiogenetische Fähigkeiten besitzt. Tat stimuliert das Wachstum von KS-Zellen und induziert Neovaskularisation in vivo (Albini et al., 1996; Ensoli et al., 1994). Tat bindet und aktiviert VEGFR-2 (Albini et al. 1996; Ganju et al., 1998). Diese Daten zeigen, was für eine wichtige Rolle VEGF und VEGFRs in der Entwicklung von KS spielen.

Diese kurzen Ausführungen zeigen, welche wichtige Bedeutung die Angiogenese für das Tumorstadium hat. Man kam daher zu dem Erkenntnis, dass neue Gefäße für einen Tumor, der größer ist als 2 mm im Durchmesser ist, absolut notwendig sind, um die weitere Expansion des Tumors ins umliegende Gewebe zu gewährleisten (Griffioen et al., 2000). Es wird daher zur Zeit versucht, die Angiogenese als Target für die Karzinomtherapie zu benutzen.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass lymphoproliferative Erkrankungen wie Leukämie und Lymphome von der Angiogenese abhängig sind. Expression von FGF (Fibroblast Growth Factor) und VEGF wurde in der akuten myelischen Leukämie, in der akuten lymphoblastischen Leukämie und in Lymphomen beobachtet (Fiedler et al., 1997; Foss et al., 1997; PerezAtayde et al., 1997). Diese Studien zeigen, daß auch die hämatologischen Tumoren als Target für eine antiangiogenetische Therapie zugänglich sind.

Bisher waren die Versuche in Tiermodellen erfolversprechend, aber es fehlt noch die klinische Bestätigung. Als alleinige antiangiogenetische Therapie waren die Ergebnisse bisher tatsächlich enttäuschend (Griffioen et al., 2000). Daher wird es in Zukunft eher eine Kombination von antiangiogenetischer und herkömmlicher Therapien geben.

Erkrankungen, die von der therapeutischen Angiogenese profitieren könnten, sind dagegen die ischämischen Erkrankungen wie z. B. die koronare Herzerkrankung und die peripheren arterielle Verschluss-Krankheiten verschiedener Ätiologie. Erste Versuche wurden daher schon gestartet, bei denen VEGF₁₆₅ cDNA intramuskulär injiziert wurde (Baumgartner et al., 1998).

Tatsächlicher Gen Transfer konnte in dieser Studie in neun von zehn Patienten nachgewiesen werden, die an nicht heilenden Ulcera auf dem Boden einer peripheren arteriellen Gefäßerkrankung erkrankt waren. Ein Kollateralkreislauf wurde in sieben Fällen mittels Kontrastmittelangiographie direkt sichtbar gemacht. Magnet Resonanz Arteriographien zeigten anschließend einen Blutfluß distal der Stenose. Diese Studien sind jedoch nicht Placebo kontrolliert durchgeführt worden.

Schumacher et al. injizierte in seiner Studie von 1998 FGF-1 direkt in das ischämische Areal des Myocards von Patienten, die eine Bypass Operation hinter sich hatten. Follow-up Arteriographien 12 Wochen nach der Injektion zeigten eine Vaskularisierung um die Injektionsstelle. Auch diese Untersuchungen waren nicht Placebo kontrolliert.

Die wichtigste Zelle in der Vaskulogenese und Angiogenese ist die Endothelzelle, die mit ihren angiogenetischen Rezeptoren und Signalmolekülen eine wichtige Rolle in Proliferation, Migration und Zellinteraktion einnimmt. Wir haben zum Screen in vitro kultivierte Endothelzellen verwendet, die aber kein spezifisches angiogenetisches Molekül aufwiesen. In den konstruierten Mäuse Embryonen Bibliotheken waren ebenfalls keine Moleküle nachweisbar, die eine Rolle bei der Angiogenese spielen könnten.

4. Schlussfolgerung

Um weitere solcher Moleküle finden zu können, ist es daher zu empfehlen, die Arbeit entweder mit in vivo Endothelzellen oder aber auch mit einem proliferationsreichem Gewebe wie z. B. Tumorgewebe fortzuführen. Aber aufgrund der bisher erbrachten Ergebnisse mit vier verschiedenen Bibliotheken ist es auch nicht zu erwarten, dass neue Bibliotheken neue Moleküle entdeckt werden, die eine Rolle in der Angiogenese spielen könnten.

Daher muss eine Schlussfolgerung gezogen werden, dass dieser Screen ungeeignet ist, um nach neuen angiogenetischen Molekülen zu suchen.

Die Arbeit hat gezeigt, dass der pYD Vektor funktionstüchtig ist und in dem Screen eine zentrale Rolle übernimmt, jedoch insgesamt der Screen mit dem pYD Vektor kein geeignetes Verfahren erscheint, um nach spezifischen Proteinen zu suchen. Die Proteine, die selektiert wurden, unterlagen eher dem Zufallsprinzip, obwohl man mit den konstruierten Bibliotheken, bestimmte Moleküle erwartet hätte. Daher erscheint es auch nicht sinnvoll, diesen Screen für kommerzielle Zwecke zu benutzen, da z. B. der Screen zu viele komplexe Zwischenschritte mit längerer Dauer beinhaltet und somit zwangsläufig Fehlerquellen entstehen könnten, die jedes Mal zum erneuten Beginn einer Versuchsreihe zwingen würde. Da man mit diesem Screen auch keine spezifische Proteingruppe selektionieren kann, wird es dann auch unmöglich sein, Moleküle zu finden, die man dann kommerziell in der Pharmaindustrie für medizinische Zwecke verwenden könnte.

VI. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist die Rolle des neuentwickelten pYD-Vektor bei der Entwicklung eines Selektionssystems zum Screening von cDNA Bibliotheken auf sezernierte Proteine und Membranproteine darzustellen. Die Überprüfung der Sensitivität und Spezifität des Systems sollte mit einer humanen Endothelzellbibliothek durchgeführt werden. Gleichzeitig sollten eventuell gefundene neue Moleküle, die Kontrollfunktion in der Angiogenese ausüben, identifiziert und charakterisiert werden.

Der Sekretionsweg durch die Zellmembran wird für die meisten bekannten Proteine über eine aminoterminal Sequenz, bekannt als Signalpeptid, vermittelt. Hier wurde unter Verwendung des in der Hefe *S. cerevisiae* sezerniertes Enzyms Invertase eine praktikable Lösung zur Erforschung dieser Proteine gefunden:

Hierzu wurde der Selektionsplasmid pYD entwickelt. Als Ausgangspunkt für die Vektorkonstruktion wurde der *E.coli*-/Hefe Shuttlevektor pYEura3 benutzt. In diesem Plasmid wurde das Hefegen *suc2* (Invertase-Gen) kloniert. Im Invertase-Gen wurden zuvor Startcodon und Signalpeptid deletiert und eine neue, einmalige Restriktionsstelle NotI an Stelle des Startcodons geschaffen. Danach wurde dieses Konstrukt in den Bakteriophagen Lamda Zap II kloniert, der eine *in vivo* Exzision des Plasmids ermöglicht. Mit Hilfe dieses Vektors war es nun möglich, Genbanken aus beliebigen Geweben oder Zellen auf sezernierte Proteine zu untersuchen. Hierzu wurde eine gröÙenselektionierte (400 - 1000 bp) random-primed cDNA Bibliothek in die NotI Schnittstelle kloniert und mittels *in vivo* Exzision des Bakteriophagen eine Plasmidbibliothek hergestellt. Diese Plasmide wurden in einem Hefestamm transfiziert, dessen Invertase-Gen durch Mutation inaktiviert worden ist. Plattiert man die so transformierte Hefe auf einem Selektionsmedium aus, das als einzige Kohlenhydratquelle Saccharose enthält, so ist die für die Metabolisierung notwendige Spaltung des Zuckers nur solchen Hefeklonen möglich, die in der Lage sind, das Enzym Invertase zu sezernieren. Eine Sekretion erfolgt nur dann, wenn das Enzym sich auf das Plasmid im Leserahmen mit einem hydrophoben Signalpeptid aus der einklonierten cDNA befindet.

Um die Funktionsfähigkeit des Plasmids nachzuweisen, wurde eine cDNA-Bibliothek aus Endothelzellen in die NotI Schnittstelle des pYD Plasmids kloniert und mittels *in vivo* Exzision des Bakteriophagen eine Plasmidbibliothek hergestellt. Nach der Hefetransformation und Isolierung des Plasmids aus den gewachsenen Klonen, wurde das inserierte cDNA Fragment isoliert und sequenziert. Dabei wurden bekannte und unbekannte Klone

identifiziert. Mit diesem Verfahren wurden jeweils drei Mäuse Embryonen Bibliotheken konstruiert, analysiert und mit der hmEC Bibliothek verglichen:

Das Hefe-Selektionsverfahren hat sich grundsätzlich als effizient erwiesen, systematisch nach sezernierten Proteinen zu suchen, die eine Signalpeptidsequenz aufweisen können.

Der Vorteil dieses Selektionsverfahrens liegt in der Handhabung und in der einfachen, effektiven Selektion ohne Anwendung hochkomplizierter, zeitintensiver Anwendung von immunologischen Verfahren.

In vitro kultivierte humane Endothelzellen spiegeln jedoch nicht die Komplexität der Expression wieder, die man für diesen Screen erwarten würde. Im Vergleich zu den etablierten Methoden bietet das Hefe Invertase System keine überragenden Vorteile. Die Ergebnisse mit vier verschiedenen Bibliotheken ergaben folgende Erkenntnis: Konstruktion neuer Bibliotheken mit anderen proliferationstüchtigen Geweben werden wahrscheinlich ebenfalls keine neuen Moleküle entdecken, die eine Rolle in der Angiogenese spielen könnten. Daher muss eine Schlussfolgerung gezogen werden, dass dieser Screen ungeeignet ist, um nach neuen angiogenetischen Molekülen zu suchen.

Die Arbeit hat zwar gezeigt, dass der pYD Vektor funktionstüchtig ist und in dem Screen eine zentrale Rolle übernimmt, jedoch insgesamt der Screen mit dem pYD Vektor kein geeignetes Verfahren erscheint, um nach spezifischen Proteinen zu suchen. Die Proteine, die selektioniert wurden, unterlagen eher dem Zufallsprinzip, obwohl man mit den konstruierten Bibliotheken, bestimmte Moleküle erwartet hätte. Daher erscheint es auch nicht sinnvoll, diesen Screen für kommerzielle Zwecke zu benutzen. Da man mit diesem Screen auch keine spezifische Proteingruppe selektionieren kann, wird es dann auch unmöglich sein, Moleküle zu finden, die man dann kommerziell in der Pharmaindustrie für medizinische Zwecke verwenden könnte.

VII. Literatur

1. Albini A, Benelli R, Presta M, Rusnati M, Ziche M, Rubartelli A, Paglialunga G, Bussolino F, Noonan D: **HIV-tat protein is a heparin-binding angiogenic growth factor.** *Oncogene* 1996; **12**: 289-297
2. Albini A, Soldi R, Giunciuglio D, Giraud E, Benelli R, Primo L, Noonan D, Salio M, Camussi G, Rockl W, Bussolino F: **The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells.** *Nature Med* 1996; **2**: 1371-1375
3. van Anken E, Braakman I: **Versatility of the Endoplasmatic Protein Folding Factory.** *Crit Rev Biochem mol Biol* 2005; **40(4)**: 191-228
4. Auterio M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lam Ambrechts D, Kroll J, Plaisance S, de Mol M, Bono F Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet: **Role of PlGF in the intra and inermolecular coss talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1.** *Nat Med* 2003; **9**: 936-943
5. Bais C, Santomasso B, Coso O, Arvanitakis L, Raaka EG, Gutkind JS, Asch AS, Cesarman E, Gerhengorn MC, Mesri EA: **G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator.** *Nature* 1998; **391**: 86-89
6. Baldwin HS: **Early embryonic vascular development.** *Cardiovascular Research* 1996; **31**: E34-E45
7. Baldwin ME, Halford MM, roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, Kubo H, Stracker SA, Achen MG: **Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system.** *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 2441-2449
8. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner J: **Constitutive Expression of phVEGF₁₆₅ After Intramuscular Gene Transfer Promotes Collateral Vessel Development in Patients With Critical Limb Ischemia.** *Circulation* 1998; **97**: 1114-1123
9. Beck L, D'Amore PA: **Vascular development: cellular and molecular regulation.** *FASEB* 1997; **11**: 365-373
10. Bellomo D, Headrick JP, Silin GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings

- MC, Hayward NK, Kay GF: **Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia.** *Circ Res* 2000; **86**: E29-E35
11. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E: **A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF.** *Development* 1998; **125**: 1591-1598
 12. Birnboim HC, Doly J: **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** *Nucleic Acids Res* 1979; **7(6)**: 1513-1523
 13. Blobel G: **Isolation of a 5S RNA-Protein Complex from Mammalian Ribosomes.** *Proc. Nat. Acad. Sci* 1971. USA; **68 (8)**: 1881-1885
 14. Carmeliet P, Collen D: **Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease.** *J Pathol* 2000; **190**: 387-405
 15. Chomczynski P, Sacchi N: **Signal Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987; **162(1)**: 156-159
 16. Cornali E, Zietz C, Benelli R, Weninger W, Masiello L, Breier G, Tschachler E, Albini A, Stürzl M: **Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Angiogenesis and Vascular Permeability in Kaposi's Sarcoma.** *Am J Pathol* 1996; **149**: 1851-1869
 17. Chen H, Leder P: **A new signal sequence trap using alkaline phosphatase as a reporter.** *Nucleic Acids Research* 1999; **27 Nr.4**: 1219-1222
 18. Davis S, Aldrich ST, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD: **Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning.** *Cell* 1996; **87**: 1161-1169
 19. Delacour D, Jacob R: **Apical protein transport.** *Cell Mol Life Sci* 2006; **63(21)**: 2491-2505
 20. Doudna JA, Batey RT: **Structural insights into the signal recognition particle.** *Annu Rev Biochem* 2004; **73**: 539-557
 21. Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML: **Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development.** *Dev Dyn* 1995; **203**: 80-92

22. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri PC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML: **Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo.** *Genes Dev* 1994; **8**: 1897-1909
23. Dvorak AM, Kohn S, Morgan ES, Fox P, Nagy JA, Dvorak HF: **The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation.** *J. Leukocyte Biol.* 1996; **59**: 100-115
24. Dvorak HF, Nagy JA, Berse B, Brown LF, Yeo KT, Yeo TK, Dvorak AM, van de Water L, Sioussat TM, Senger DR: **Vascular Permeability Factor, Fibrin, and the Pathogenesis of Tumor Stroma Formation.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992; **667**: 101-111
25. Dzau VJ, Gibbons GH, Mann M, Braun-Dullaeus R: **Future Horizons in Cardiovascular Molecular Therapeutics.** *Am J Cardiol* 1997; **80(9A)**: 33I-39I
26. Ensoli B, Gendelman R, Markham P, Fiorelli V, Colombini S, Raffeld M, Cafaro A, Chang HK, Brady JN, Gallo RC: **Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma.** *Nature* 1994; **371**: 674-680
27. Eriksson U, Alitalo K: **Structure, Expression and Receptor-Binding Properties of Novel Vascular Endothelial Growth Factors.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; **237**: 41-57
28. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W: **Vascular Endothelial Growth Factor Induces Endothelial Fenestrations In Vitro.** *J. Cell Biol* 1998; **140**: 947-959
29. Ferrara N: **Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis.** *Kidney International* 1999; **56**: 794-814
30. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: **The biology of VEGF and its receptors.** *Nat. Med.* 2003; **9**: 669-676
31. Fiedler W, Graeven U, Ergün S, Verago S, Kilic N, Stockschläder M, Hossfeld DK: **Vascular Endothelial Growth Factor, a Possible Paracrine Growth Factor in Human Acute Myeloid Leukemia.** *Blood* 1997; **89**: 1870-1875
32. Folkman J, Klagsbrun M: **Angiogenic Factor.** *Science* 1987; **235**: 442-447
33. Folkman J, Shing Y: **Angiogenesis.** *J Biol Chem* 1992; **267**: 10931-10934

34. Folkman J: **Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease.** Nature Med 1995; **1**: 27-31
35. Foss HD, Araujo I, Demel G, Klotzbach H, Hummel M, Stein H: **Expression of vascular endothelial growth factor in lymphomas and castleman`s disease.** J Pathol 1997; **183**: 44-50
36. Ganju RK, Munshi N, Nair BC, Liu ZY, Gill P, Groopman JE: **Human Immunodeficiency Virus Tat Modulates the Flk-1/KDR Receptor, Mitogen-Activated Protein Kinases, and Components of Focal Adhesion in Kaposi's Sarcoma Cells.** J Virol 1998; **72**: 6131-6137
37. Gietz D, Jean AS, Woods RA, Schiestl RH: **Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells.** Nucleic Acids Res 1992; **20(6)**: 1424
38. Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA: **Studies of the transformation of intact yeast cells by the LiAc/ss-DNA/PEG procedure.** Yeast 1995; **11(4)**: 355-60
39. Griffioen AW, Molema G: **Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation.** American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 2000; **52**: 237-268
40. Gubler U, Hoffmann BJ: **A simple and very efficient method for generating cDNA libraries.** Gene 1983; **25**: 263-269
41. Hanahan D: **Signaling vascular morphogenesis and maintenance.** Science 1997; **277**: 48
42. Hatva E, Kaipainen A, Mentula P, Jääskeläinen J, Paetau A, Haltia M, Alitalo K: **Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors.** Am J Pathol. 1995; **146 (2)**: 368-378
43. Hatva E, Bohling T, Jääskeläinen J, Persico MG, Haltia M, Alitalo K: **Vascular growth factors and receptors in capillary hemangioblastomas and hemangiopericytomas.** Am J Pathol. 1996; **148 (3)**: 763-775
44. von Heijne G: **Signal sequences. The limits of variation.** J. Mol. Biol 1985; **184**: 99-105
45. Imai T, Yoshida T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Yoshie O: **Molecular Cloning of a Novel T Cell-directed CC Chemokine Expressed in Thymus by Signal Sequence Trap Using Epstein-Barr Virus Vector.** The Journal Of Biological Chemistry Aug. 1996, **271**: 21514-21521

46. Inoue H, Nojima H, Okayama H: **High efficiency Transformation of Escherichia coli with plasmids.** Gene 1990; **96(1)**: 23-28
47. Jacobs KA, Collins-Racie LA, Colbert M, Duckett M, Golden-Fleet M, Kelleher K, Kriz R, LaVallie ER, Merberg D, Spaulding V, Stover J, Williamson MJ, McCoy JM: **A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins.** Gene 1997; **198 (1-2)**: 289-296
48. Jussila J, Valtola J, Partanen TA, Salven P, Heikkila P, Matikainen MT, Renkonen R, Kaipainen A, Detmar M, Tschachler E, Alitalo R, Alitalo K: **Lymphatic endothelium and Kaposi's sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3.** Cancer Res. 1998; **58 (8)**: 1599-1604
49. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VWM, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K: **Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 genes becomes restricted to lymphatic endothelium during development.** Proc Natl Acad Sci USA 1995; **92**: 3566-3570
50. Kaiser CA, Preuss D, Grisafi P, Botstein D: **Many random sequences functionally replace the secretion signal sequence of yeast invertase.** Science 1987; **235**: 312-317
51. Karkkainen MJ, Haiko P, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K: **Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins.** Nat Immunol. 2004; **5**: 74-80
52. Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM, Walter P: **The signal recognition particle.** Annu Rev Biochem 2001; **70**: 755-775
53. Klagsbrun M, D'Amore PA: **Regulators of angiogenesis.** Annu Rev Physiol 1991; **53**: 217-239
54. Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R: **The role of neuropilin in vascular and tumor biology.** Adv Exp Med Biol 2002; **515**: 33-48
55. Klein RD, Gu Q, Goddard A, Rosenthal A: **Selection for genes encoding secreted proteins and receptors.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; **93**: 7108-7113
56. Kojima T, Kitamura T: **A signal sequence trap based on a constitutively active cytokine receptor.** Nature Biotechnology 1999; **17**: 487-490
57. Korpelainen EI, Alitalo K: **Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis.** Curr Opin Cell Biol 1998; **10**: 159-164

58. Kristofferson P, Teichmann T, Stracke R, Palme K: **Signal Sequence Trap to Clone cDNA Encoding Secreted or Membrane-Associated Plant Proteins.** Analytical Biochemistry 1996, **243**: 127-132
59. Lymboussaki A, Partanen TA, Olofsson B, Thomas-Crussels J, Fletcher CD, de Waal RM, Kaipainen A, Alitalo K: **Expression of the vascular endothelial growth factor C receptor VEGFR-3 in lymphatic endothelium of the skin and in vascular tumors.** Am J Pathol. 1998; **153** (2): 395-403
60. Mattei MG, Borg JP, Rosnet O, Marmè D, Birnbaum D: **Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively.** Genomics 1996; **32**: 168-169
61. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Büttner M, Rziha HJ, Dehioet C: **A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases.** EMBO J 1999; **18**: 363-374
62. Millauer B, Longhi MP, Plate KH, Shawver LK, Risau W, Ullrich A, Strawn LM: **Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo.** Cancer Res. 1996; **56** (7): 1615-1620
63. Mould AW, Tonks ID, Cahill MM, Pettit AR, Thomas R, Hayward NK, Kay GF: **VEGF-B gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis.** Arthritis Rheum 2003; **48**: 2660-2669
64. Mustonen T, Alitalo K: **Endothelial Receptor Tyrosine Kinase Involved in Angiogenesis.** The Journal of Cell Biology 1995; **129**, 4: 895-898
65. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: **Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.** FASEB J 1999; **13**: 9-22
66. Neupert W: **Protein Import Into Mitochondria.** Ann Rev Biochem 1997; **66**: 863-917
67. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G: **Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites.** Protein Eng 1997; **10**(1): 1-6
68. Noden DM: **Embryonic Origins and Assembly of Blood Vessels.** Am Rev Respir Dis 1989; **140**: 1097-1103

69. Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M: **A Novel Type of Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), Preferentially Utilizes KDR/Flk-1 Receptor and Carries a Potent Mitotic Activity without Heparin-binding Domain.** J. Biol. Chem.1998; **273**: 31273-31282
70. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L: **VEGF receptor signalling-in control of vascular function.** Nat Rev Mol Cell Biol 2006; **7(5)**. 359-371
71. PerezAtayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J: **Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia.** Am J Pathol 1997; **150**: 815-821
72. Persico MG, Vincenti V, Dipalma T: **Structure, Expression and Receptor-Binding Properties of Placenta Growth Factor (PlGF).** Curr Top Microbiol Immunol 1999; **237**: 31-40
73. Poole TJ, Coffin JD: **Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern.** J Exp Zool 1989; **251**: 224-231
74. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W: **Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo.** Nature 1992; **359 (6898)**: 845-848
75. Rapoport TA: **Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane.** Science 1992; **258 (5084)**: 931-936
76. Risau W: **Vasculogenesis, angiogenesis and endothelial cell differentiation during embryonic development.** In: R. N. Feinberg, G. K. Sherer. R. Auerbach. The development of the vascular system, Basel: Issues Biomed, Karger 1991; **14**: 58-68
77. Risau W.: **Differentiation of Endothelium** FASEB J 1995; **9**: 926-933
78. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herrtuuala: **Biology of vascular endothelial growth factors.** FEBS Letters 2006; **580**: 2879-2887
79. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular Cloning - A laboratory Manual, 2nd Edition.** Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York 1989
80. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA Sequencing with chain terminating inhibitors.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977; **74**: 5463-5467
81. Sato TN, Qin Y, Kozak CA, Audus KL: **tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system.** Proc. Natl Acad Sci USA 1993; **90**: 9355-9358

82. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y: **Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation.** *Nature* 1995; **376**: 70-74
83. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: **Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites fluid.** *Science* 1983; **219**: 983-985
84. Scheiffele P, Füllekrug J: **Glycosylation and protein transport.** *Essays Biochem* 2000; **36**: 27-35
85. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann T: **Induction of Neoangiogenesis in Ischemic Myocardium by Human Growth Factors: First Clinical Results of a New Treatment of Coronary Heart Disease.** *Circulation* 1998; **97**: 645-650
86. Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L: **Structure and Function of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and -2.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; **237**: 59-83
87. Shimizu Y, Hendershot LM: **Organization of the Functions and Components of the Endoplasmatic Reticulum.** *Adv Exp Med Biol* 2007; **594**: 37-46
88. Shirozu M, Tada H, Tashiro K, Nakamura T, Lopez ND, Nazarea M, Hamada T, Sato T, Nakano T, Honjo T: **Characterization of Novel Secreted and Membrane Proteins Isolated by the Signal Sequence Trap Method.** *Genomics* 1996, **37**: 273-280
89. Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD: **Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties.** *Nucleic Acids Res.* 1988; **16 (15)**: 7583-6000
90. Smith LM, Sanders JZ, Kaise RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SBH, Hood LE: **Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis.** *Nature* 1986; **321(6071)**: 674-679
91. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M: **Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform-Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor.** *Cell* 1998; **92**: 735-745
92. Sugano S, Yoshitomo-Nakagawa K, Yu YS, Mizushima-Sugano J, Yoshida K: **Transmembrane-Domain Trapping: A Novel Method for Isolation of cDNAs Encoding Putative Membrane Proteins.** *DNA Research* 1998, **5**: 187-193

93. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K: **The biology of vascular endothelial growth factors.** Cardiovasc Res 2005, **65**: 550-563
94. Tan R, Jiang X, Jackson A, Jin P, Yang J, Lee E, Duggan B, Stuve LL, Fu GK: **E. coli Selection of Human Genes Encoding Secreted and Membrane Proteins Based on cDNA Fusions to a Leaderless β -Lactamase Reporter.** Genome Research 2003; **13**: 1938-1943
95. Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T: **Signal Sequence Trap: A Cloning Strategy for Secreted Proteins and Type I Membrane Proteins.** Science 1993, **261**: 600-603
96. Tjwa M, Luttun A, Autiero M, Carmeliet P: **VEGF and PlGF, two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis.** Cell Tissue Res 2003; **314**: 5-14
97. Veikkola T, Alitalo K: **VEGFs, receptors and angiogenesis.** Cancer Biol 1999; **9**: 211-220
98. Vogelstein B, Gillespie D: **Preparative and analytical purification of DNA from agarose.** Proc Natl Acad Sci USA 1979; **76(2)**: 615-619
99. Walter P, Johnson AE: **Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane.** Annu Rev Cell Biol. 1994; **10**: 87-119
100. Yokoyama-Kobayashi M, Sugano S, Kato T: **A signal sequence detection system using secreted prot.** Gene 1995, **163 (2)**, 193-196

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Herr
Mansur Duran
Sresemannstr. 42

40210 Düsseldorf

Campus Charité Mitte
Promotionsausschuß
Hindenburgdamm 30
12203 Berlin

Düsseldorf, den 23.04.2008

Betr.: Erklärung an Eides Statt

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Unterschrift

M. Duran