

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Genzentrum
(Vorstand: Prof. Dr. Eckhard Wolf)

und dem

Laboratorium für funktionale Genomanalyse (LAFUGA)
Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Abteilung Genomics
Dr. Helmut Blum

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Dr. Helmut Blum

**Analyse des Transkriptoms
von bovinem Milchdrüsengewebe
nach experimenteller Infektion mit *E. coli* 1303**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Simone Mitterhuemer
aus Ried im Innkreis

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichtersteller: Univ.-Prof. Dr. Wolf
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Mansfeld

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Gefördert im Rahmen des DFG-Projektes FOR 585 (Pathogenspezifische
Abwehrmechanismen in der Milchdrüse des Rindes) durch Personal- und Sachmittel

Für meine Familie

Wissen ist das einzige Gut, das sich vermehrt wenn man es teilt.

Marie von Ebner Eschenbach

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturteil	3
2.1	Die Mastitis des Rindes	3
2.1.1	Definition und Klassifikation.....	3
2.1.2	Ökonomie der Eutergesundheit	4
2.1.3	Ätiologie und Pathogenese	5
2.2	<i>Escherichia coli</i> Mastitis	6
2.2.1	Lipopolysaccharid (LPS).....	7
2.3	Inflammatorisches System	8
2.4	Relevanz der Studie	9
2.5	Hinweise auf eine systemische Immunantwort	9
2.6	Mastitis-Infektionsmodell	10
2.7	Warum Analysen des Transkriptoms?	12
2.8	Analysen des Transkriptoms mit DNA Microarrays	12
2.8.1	Herstellung von Affymetrix GeneChips™	14
2.8.2	Affymetrix GeneChip™ - Design der Sonden	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1.1	Geräte.....	17
3.1.2	Chemikalien	18
3.1.3	Lösungen, Enzyme und sonstige Reagenzien	18
3.1.4	Molekulargewichtsstandards für DNA.....	19
3.1.5	Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterial	19
3.1.6	Verwendete Software	20
3.2	Bakterienstamm	21
3.3	Versuchstiere	21
3.4	Methoden	21

3.4.1	Vorbereitung und Infektion der Versuchstiere	21
3.4.2	Probengewinnung.....	22
3.4.3	RNA-Extraktion	23
3.4.3.1	TRIzol™ Methode	23
3.4.3.2	Ammoniumacetat-Fällung.....	24
3.4.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	25
3.4.4.1	TBE-Agarosegele	25
3.4.5	Erstellung von Expressionsprofilen nach dem Affymetrix Verfahren	26
3.4.5.1	Herstellung biotinylierter cRNA.....	27
3.4.5.2	Fragmentierung der cRNA.....	32
3.4.5.3	Hybridisierung.....	32
3.4.5.4	Waschen und Färben	34
3.4.5.5	Scannen.....	35
3.4.6	Statistische und Bioinformatische Auswertung.....	35
3.4.6.1	Ermittlung differentiell exprimierter Gene	36
3.4.6.2	Ermittlung differentiell exprimierter Gene durch Limma.....	36
3.4.6.3	Ermittlung differentiell exprimierter Gene durch SAM.....	37
3.4.6.4	GO Analyse	37
4	Ergebnisse.....	38
4.1	Auswahl der Versuchstiere und experimentelle Infektion mit <i>E. coli</i> 1303..	38
4.1.1	Klinische Befunde	39
4.2	Isolierung und Analyse der Gesamt-RNA	41
4.3	Herstellung und Kontrolle von biotinylierter cRNA.....	43
4.4	Analyse der Genexpression von Milchdrüsengewebe nach experimenteller Infektion mit <i>E. coli</i> 1303.....	44
4.4.1	Untersuchung der frühen Phase der Infektion	45
4.4.2	Analyse der Genexpression in der späten Phase der Infektion mit <i>E. coli</i> 1303 ..	49
4.4.2.1	Untersuchung der Genexpression in infizierten Eutervierteln.....	49
4.4.2.2	Untersuchung der Genexpression in nicht-infizierten Eutervierteln infizierter Tiere	52
4.4.3	Vergleichende Analyse der Genexpression in der frühen und späten Phase der Infektion mit <i>E. coli</i> 1303.....	56

4.4.4	Detaillierte Analyse der differentiell exprimierten <i>probe sets</i>	58
4.4.5	Analyse der Genontologien der differentiell exprimierten <i>probe sets</i>	60
5	Diskussion	65
5.1	Das Tiermodell	65
5.2	Genexpressionsänderungen in der Milchdrüse 6 h nach der Infektion mit <i>E. coli</i> 1303	66
5.3	Genexpressionsänderungen in der Milchdrüse 24 h nach Infektion mit <i>E. coli</i>	68
5.3.1	Auswirkung der Infektion mit <i>E. coli</i> 1303 auf infizierte und nicht-infizierte Euterviertel.....	68
5.3.2	Nachweis einer lokalen und einer systemischen Reaktion in der Milchdrüse	68
5.3.3	Umfang der lokalen und der systemischen Reaktion	69
5.3.4	Strategie der Auswertung	70
5.3.5	Analyse der <i>probe sets</i> der lokalen Reaktion auf eine Infektion mit <i>E. coli</i> 1303	70
5.3.6	Analyse der <i>probe sets</i> der systemischen Reaktion auf eine Infektion mit <i>E. coli</i> 1303	73
5.3.7	Biologische Bedeutung einer systemischen Reaktion nach Infektion mit <i>E. coli</i> 1303	74
5.3.8	Die Immunantwort im Euter als Summe von lokalen und systemischen Prozessen	75
5.4	Fazit und Ausblick	76
6	Zusammenfassung	78
7	Summary	80
8	Anhang	82
8.1	Differentiell exprimierte Gene.....	82
8.2	R-Script.....	109
9	Abbildungsverzeichnis	118
10	Tabellenverzeichnis	120
11	Abkürzungsverzeichnis.....	121

12	Literaturverzeichnis	125
13	Danksagung.....	135

1 Einleitung

Mastitis zählt nach wie vor weltweit zu den häufigsten und verlustreichsten infektiösen Erkrankungen von Nutztieren in der Milchwirtschaft (Miller et al., 1993). Sie liegt in Deutschland mit ca. 15% seit vielen Jahren an zweiter Stelle der Gründe für die vorzeitige Schlachtung von Milchkühen (Roosen et al., 2004). Etwa ein Drittel aller Kühe erleidet zumindest einmal im Jahr eine Euterinfektion (Seegers et al., 2003) und weltweit werden die durch Mastitiden verursachten finanziellen Einbußen auf rund 25 Milliarden Euro geschätzt (Pareek et al., 2005). Entzündungen der Milchdrüse haben jedoch nicht nur eine große wirtschaftliche Bedeutung für den Landwirt, sie beeinträchtigen auch das Wohlergehen der Tiere und stellen beim Verzehr von Rohmilch und Rohmilchprodukten, die Rückstände von Antibiotika oder humanpathogene Mikroorganismen beinhalten, ein Problem für die Lebensmittelsicherheit dar (Tenhagen et al., 2006).

Vom Verlauf her werden akute, chronische und subklinische Mastitiden unterschieden. Die Erreger werden in Umweltkeime (*Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus uberis*) und sogenannte Kuh-assoziierte kontagiöse Keime (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*) eingeteilt. Letztere leben fast ausschließlich im Euter und gelangen über den Melkvorgang von Kuh zu Kuh. Durch verbesserte Managementpraktiken und präventive Maßnahmen konnten kontagiöse, gram-positive Pathogene einigermaßen unter Kontrolle gebracht werden, während Mastitiden verursacht durch opportunistisch invadierende Umweltpathogene für die Milchwirtschaft eine steigende Belastung darstellen.

E. coli ist der häufigste gram-negative Erreger, welcher für die Mehrheit aller akuten klinischen Mastitiden verantwortlich ist. Euterentzündungen bedingt durch *E. coli* sind üblicherweise von kurzer Dauer und heilen durch Keimelimination spontan von selbst. Des Öfteren jedoch manifestieren sie sich in markanten lokalen und schwerwiegenden systemischen Symptomen begleitet von verminderter Milchleistung, Änderungen der Milchzusammensetzung und ausgedehnter Zerstörung des Milchdrüsengewebes. In Einzelfällen kann es durch Septikämie zum Versterben des Tieres kommen.

Mastitisempfänglichkeit hängt sowohl vom vorherrschenden Hygienestatus als auch den Virulenzfaktoren der Pathogene ab, die die Milchdrüse bevorzugt über den Strichkanal invadieren. Klinische Mastitiden treten beim Rind gehäuft im geburtsnahen Zeitraum auf. Ihr Verlauf wird hauptsächlich vom Immunstatus des Wirts beeinflusst. Die frühzeitige Erkennung der Anwesenheit von Pathogenen durch den Wirt und die darauffolgende prompte Einwanderung von Leukozyten sind von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese vieler Infektionskrankheiten. Die Schwere der Symptome hängt von

tierindividuellen Faktoren ab und bleibt auch bei wiederholter zeitversetzter Infektion eines Tieres mit dem selben *E. coli* Stamm gleich (Hirvonen et al., 1999).

Generelles Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer Infektion mit *E. coli* 1303 auf das Transkriptom des Milchdrüsengewebes in der frühen und späten Phase der Infektion zu untersuchen. Durch bioinformatische Analysen der differentiell exprimierten Gene sollten ablaufende Prozesse erfasst und charakterisiert werden.

Die Untersuchungen sollten an einem standardisierten Mastitis-Modellsystem durchgeführt werden, in dem Tiere im Bezug auf Alter, Parität, Laktationsstadium, Milchleistung und -zellzahl und vor allem auf Eutergesundheit nach streng definierten Kriterien ausgewählt wurden. Dadurch sollten die beschriebenen tierindividuellen Schwankungen in der Symptomatik nach Infektion mit *E. coli* (Hirvonen et al., 1999) vermieden und die Aussagekraft der Ergebnisse trotz relativ kleiner Gruppenstärke (n=5) verbessert werden.

Bei *E. coli* Mastitiden treten für gewöhnlich nur an einem Euterviertel klinische Symptome auf, während die restlichen Viertel asymptomatisch bleiben (Bradley and Green, 2001). Jedoch kann in Fällen wiederauftretender Mastitis derselbe Genotyp von *E. coli* aus Eutervierteln isoliert werden, die ursprünglich keine Symptome einer Infektion gezeigt hatten (Dopfer et al., 1999). Eine zeitversetzte natürliche Infektion mit demselben Genotyp des Umweltkeims *E. coli* ist sehr unwahrscheinlich und so muss sich die ursprüngliche Infektion auch auf andere Euterviertel ausgebreitet haben ohne dort klinische Symptome zu verursachen. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Infektion mit *E. coli* nicht nur infizierte Euterviertel beeinflusst. Dieser mögliche Einfluss auf benachbarte, nicht-infizierte Euterviertel sollte nach experimenteller Infektion mit *E. coli* 1303 untersucht werden. Dazu sollte das Transkriptom von Milchdrüsengewebe gesunder Tiere erfasst und mit dem Transkriptom von Milchdrüsengewebe nicht-infizierter Euterviertel infizierter Tiere verglichen werden. Durch bioinformatische Analysen der differentiell exprimierten Gene sollten ablaufende Prozesse identifiziert und charakterisiert werden.

2 Literaturteil

2.1 Die Mastitis des Rindes

2.1.1 Definition und Klassifikation

Als Mastitis des Rindes wird eine entzündliche Reaktion der Milchdrüse in der Gesamtheit ihrer milchbildenden, -ableitenden und speichernden Kompartimente bezeichnet. Bezüglich ihrer Verlaufsform kann je nach zeitlicher Dauer zwischen einer akuten und einer chronischen Mastitis unterschieden werden. Neben der klinisch manifesten Entzündung der Milchdrüse, welche mit sichtbaren pathologischen Veränderungen des Euterviertels und der Milch einhergeht (Rodenburg, 1990), tritt auch eine sogenannte subklinische Form auf. Diese ist nur durch labordiagnostische Untersuchung der Milch erkennbar. Davon abzugrenzen sind Reizzustände, latente Infektionen der Milchdrüse und Besiedlungen des Zitzenkanals durch Mastitiserreger (Schulz, 1994).

Die Ursachen einer Mastitis können infektiöser, traumatischer oder toxischer Natur sein, wobei den Mikroorganismen ätiologisch die größte Bedeutung beizumessen ist. Weiters kann die Form der Mastitis nach den morphologischen Befunden klassifiziert werden. Dabei wird zwischen einer katarrhalischen, interstitiellen, parenchymatösen, abszedierenden sowie hämorrhagisch-nekrotisierenden Mastitis unterschieden.

Die Anzahl an somatischen Zellen in der Milch ist ein Maßstab für die Eutergesundheit von Milchkühen (Hillerton, 1999). Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft schlug 1994 (DVG, 1994) basierend auf den Beobachtungen von Hess und Egger (Hess and Egger, 1969) sowie Reichmuth (Reichmuth, 1975) im Rahmen der Mastitisiagnostik ein Schema für orientierende Aussagen zur Beurteilung zytologisch-mikrobiologischer Befunde vor. Dabei wird empfohlen den Gehalt an somatischen Zellen im Viertelanfangsgemelk mit dem Nachweis von mikrobiologischen Erregern zu kombinieren.

Tabelle 1: Beurteilung zytologisch-mikrobiologischer Befunde (DVG 1994)

Zellgehalt der Milch	Euterpathogene Mikroorganismen	
	negativ	positiv
< 100.000 Zellen/ml	normale Sekretion (NS)	latente Infektion (LI)
> 100.000 Zellen/ml	unspezifische Mastitis (US)	Mastitis (M)

Die Definition gilt für die Untersuchung von Viertelanfangsgemelken, die zur üblichen Melkzeit von Kühen in normaler Laktation gewonnen werden.

Die Kategorien der verschiedenen Stadien der Eutergesundheit wurden von der DVG (1994) wie folgt definiert:

Tabelle 2: Stadien der Eutergesundheit (DVG 1994)

Normale Sekretion	gesunde Euterviertel: keine äußerlichen pathologischen Veränderungen Milch: keine euterpathogenen Mikroorganismen, normaler Zellgehalt
Latente Infektion	normaler Zellgehalt euterpathogene Mikroorganismen nachweisbar
Unspezifische Mastitis	keine euterpathogenen Mikroorganismen erhöhte Zellzahlen nachweisebar
Mastitis	euterpathogene Mikroorganismen und erhöhte Zellzahlen nachweisbar
Subklinische Mastitis	keine äußerlichen klinischen Symptome erkennbar chemische Zusammensetzung der Milch verändert
Klinische Mastitis	äußerliche klinische Symptome erkennbar (erhöhte Temperatur, Schmerzen, Schwellung, Rötung), makroskopisch veränderte Milch (Flocken)

2.1.2 Ökonomie der Eutergesundheit

Mastitiden zählen zu den meist verbreitetsten Erkrankungen der Rinder in der Milchviehproduktion (Rajala-Schultz and Grohn, 1999). Mit ca. 15,2% stehen diese neben Fruchtbarkeitsstörungen in Deutschland an zweiter Stelle der Gründe für eine vorzeitige Schlachtung der Kühe (Roosen et al., 2004). Ungefähr ein Drittel aller Kühe erleiden einmal im Jahr eine Mastitis (Tenhagen et al., 2006) und verursachen damit einen weltweiten Schaden von umgerechnet 25 Milliarden Euro (Pareek et al., 2005).

Die Milch zählt nach wie vor zu den Grundnahrungsmitteln und ihre Erzeugnisse bereichern in vielfältiger Weise die Ernährung des Menschen. Der Rinderreport Bayern (Bayern, 1999) belegt, dass 79% der Erlöse der milchviehhaltenden Betriebe mit dem Milchverkauf erzielt werden.

Als Folge mit erheblicher wirtschaftlicher Konsequenz gelten vor allem der Milchverlust bei akut verlaufenden Mastitiden (nicht verkehrsfähige Milch, Milchleistungsrückgang), sowie die Milchminderleistung bei chronischen und subklinischen Mastitiden. Durch Extrapolation von Stichprobenuntersuchungen auf die Gesamtpopulation kann die mastitisbedingte Milchleistungsverminderung auf ca. 5% der produzierten Milchmenge geschätzt werden (Krömker, 2007; Seegers et al., 2003). Weitere Verluste entstehen durch die Merzung von infizierten Kühen, die mastitisbedingte Minderung der Rohmilchqualität, die Kosten für therapeutische Maßnahmen und die Gefahr der Erregerübertragung auf andere Kühe (Schulz 1994). Durch die vorzeitige Merzung wird eine Erhöhung der Kosten für die Bestandsremontierung verursacht sowie die Ausschöpfung des wirtschaftlichen Potentials von fünf Laktationen deutlich unterschritten (\emptyset der Nutzungsdauer: drei Laktationen).

2.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Euterentzündungen werden zum größten Teil durch bakterielle Erreger hervorgerufen, aber auch Pilze (Hefen) und Algen (Prototheken) verursachen gelegentlich Mastitiden (Bradley and Green, 2001). Über virale Genesen ist nur wenig bekannt. Die pathogenen Mikroorganismen gelangen durch den Zitzenkanal in die Milchdrüse und beginnen sich darin zu vermehren (Bannerman et al., 2004). Bei der Entwicklung einer Mastitis spielen jedoch neben dem ursächlichen Agens eine Vielzahl weiterer Faktoren eine große Rolle wie die genetische Konstitution des Wirts, die Melk- und Stallhygiene und das Management (Hogan and Smith, 2003; Oviedo-Boyso et al., 2007).

Eine Einteilung der verschiedenen Erreger kann aufgrund der Hauptquelle, aus der sie stammen, erfolgen. Dabei werden sogenannte euterassozierte Erreger, die sich nur innerhalb des Euters vermehren können (*Streptococcus agalactiae* und euterpathogene *Mycoplasma spp.*), von jenen die außerhalb des Euters leben können (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Klebsiella*) unterschieden. Letztere vermehren sich im Darmtrakt, in Genitalorganen oder infektiösen Hautwunden und werden auch als Umweltkeime bezeichnet. Eine Übertragung dieser Keime findet vor allem über Stalleinrichtungen oder Einstreu statt.

Weiters können die Erreger entsprechend ihrer Pathogenität in sogenannte *major pathogens* und *minor pathogens* unterteilt werden. Vertreter der ersten Gruppe stellen alle bereits genannten Erreger dar, während koagulase negative Staphylokokken sowie *Corynebacterium bovis* als weniger pathogen eingestuft werden (Schulz, 1994).

Eine dritte Klassifikation, wie sie die DVG (1994) vorschlägt, kann bezüglich des Reservoirs der Mastitiserreger erfolgen. Dabei wird einerseits die infizierte Milchdrüse als Infektionsherd genannt, worüber Keime wie *S. aureus*, *Str. agalactiae* und *Str. dysgalactiae* in erster Linie in der Melkzeit über die Melkmaschine oder den Melker übertragen werden. Andererseits gilt die Umwelt als weiteres Reservoir für Keime wie *E. coli*, *Str. uberis* und *Klebsiella*. Bei diesen sogenannten umweltassoziierten Keimen liegt vor allem in den Zwischenmelkzeiten ein erhöhtes Infektionsrisiko vor. Ungefähr 65% der klinischen Fälle werden durch Umwelterreger hervorgerufen (Radostits et al., 2000).

Die Resistenzlage des Wirts, die Pathogenität und Virulenz des Erregers, prädisponierende Faktoren, der Funktionszustand des Milchdrüsengewebes und die Ausprägung der Blut-Euter-Schranke spielen in komplexer Weise zusammen und bestimmen die Ausprägung klinischer Symptome und den Entzündungsverlauf (Seffner and Bergmann, 1994). Je nach Spezies, Gattung, Stamm oder Standortvariante der Krankheitserreger variiert deren Pathogenizität und Virulenz. Das Ein- und Vordringen der euterpathogenen Keime in das Euterinnere erfolgt über den Zitzenkanal und weiter über die Zitzenzisterne aufsteigend über die Drüsenzisterne, die Milchgänge bis hinein in die Alveolarhöhlräume. Dieser galaktogene Infektionsweg ist neben dem hämatogenen und lymphogenen der bedeutendste.

2.2 *Escherichia coli* Mastitis

Escherichia coli wurde erstmalig im Jahre 1885 vom deutschen Kinderarzt Theodor Escherich beschrieben (Polen, 2003). Dieser gram-negative, fakultativ anaerobe und saprophytär lebende Einzeller ist eine der verbreitetsten Spezies der Familie der *Enterobacteriaceae* und lebt im Verdauungstrakt des Menschen und vieler Tiere. *E. coli* und andere (coliforme) Keime werden mit dem Kot ausgeschieden. Ein Teil dieser Mikroorganismen kann in Geweben außerhalb des Intestinaltrakts eine pathogene Wirkung entfalten. Beispielsweise ruft *E. coli* opportunistisch Euterentzündungen hervor (Nemeth et al., 1994). Für die Manifestation einer intramammären Infektion mit *E. coli* bedarf es weder einer Adhärenz am Drüsenepithel noch besonderer Virulenzfaktoren (Opdebeeck et al., 1988). Voraussetzung ist lediglich die Laktoseverwertung und das Wachstum bei nahezu anaeroben Bedingungen. Ungefähr 40% der jährlich auftretenden bovinen Mastitiden werden durch gram-negative Bakterien verursacht (Erskine et al., 1991; Ziv, 1992), welche gehäuft unmittelbar nach der Geburt und in den ersten Laktationswochen auftreten (Burvenich et al., 2003). Diese Form der Mastitis verläuft meist akut oder perakut und in der Mehrzahl der Fälle unter erheblichen Allgemeinsymptomen, die von einer massiven Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (polymorphkerniger Leukozyten, PMN) begleitet werden. Diese tragen wiederum zur Elimination der invadierten Keime bei (Riollet et al., 2000).

Klinisch kommt es lokal zu einer starken Umfangsvermehrung des betroffenen Euters, welches vermehrt warm, gerötet und schmerzhaft ist. Die Haut ist nicht abziehbar und manchmal blau-rot verfärbt. Durch massive Endotoxinproduktion (Lipopolysaccharide, LPS) werden Permeabilitätsstörungen der Gefäße hervorgerufen. Diese führen zur Ödematisierung des Interstitiums, einer hochgradigen Gewebsschädigungen und Zerstörung der Alveolarepithelien. Auch durch häufig vorkommende Thromben in den Blut- und Lymphgefäßen können sich einzelne Bezirke des Euters sequestrieren und nekrotisch werden. Dies ist makroskopisch durch diffuse bzw. herdförmige Rötungen erkennbar. Das Sekret des betroffenen Viertels ist hochgradig vermindert, wässrig, serös, blutig oder sogar eitrig-jauchig und mit Fibrin- oder Eiterflocken durchsetzt. Systemisch kommt es zu einem erheblich gestörten Allgemeinbefinden mit hochgradigem Fieber (< 41 °C). Je nach Menge der ausgeschütteten Toxine sind die Skleralgefäße stark injiziert bis verwaschen und die Schleimhäute blassviolett verfärbt (Stampa et al., 2006). Bedingt durch die Septikämie kann eine „Coli-Mastitis“ vereinzelt zu Todesfällen führen, jedoch findet auch oftmals eine zügige Heilung statt (Hogan and Smith, 2003). Infektionen mit coliformen Keimen persistieren in über 50% aller Fälle weniger als 10 Tage (Krömker, 2007).

Die Vermehrung des Keimes und die Störung des Allgemeinbefindens sind von der Effektivität und Schnelligkeit der Antwort der neutrophilen Granulozyten abhängig. Jedoch dauert es zwischen 7 und 9 Stunden nach experimenteller intramammärer Infektion, bis eine erhöhte PMN-Zahl in der Milch nachgewiesen werden kann (Van Werfen, 1999). Unter

günstigen Bedingungen können Keime Populationsdichten von 10^8 Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) pro mL Milch erreichen (Hogan et al., 1992). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass sich die Wachstumsbedingungen für *E. coli* in der Milch von individuellen Kühen maßgebend unterscheiden. Nach einer Inkubation von 6 h in Vollmilch differiert die Bakterienzahl bis zu 100fach zwischen einzelnen Kühen, was jedoch nicht mit dem Gehalt an somatischen Zellen (SCC, *somatic cell count*) assoziiert war (Kornalijnslijper et al., 2003). Neben phagozytierenden Zellen enthält die Milch eine Vielzahl an antibakteriellen Faktoren wie Immunglobulinen, Laktoperoxidase oder Laktoferrin (van Hooijdonk et al., 2000). Laktoferrin limitiert die nutritive Grundlage von *E. coli*, indem es Eisen bindet und dieses demnach den Bakterien nicht zur Verfügung steht (Welty et al., 1976). Auch Peptide, die von Kaseinen (α_{S1} -, α_{S2} -, β - und κ -Kaseine) stammen, welche den größten Proteinanteil in der Milch darstellen (Shah, 2000), scheinen verschiedene bioaktive Eigenschaften zu besitzen. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass ein Fragment von bovinem α_{S2} -Kasein dazu in der Lage war, das Wachstum von *E. coli* zu hemmen (Zucht et al., 1995).

2.2.1 Lipopolysaccharid (LPS)

Die Zellwand gram-negativer Bakterien ist aus drei Schichten aufgebaut: der Zytoplasmaschicht, der Außenmembran und einer Peptidoglycanschicht, welche die beiden voneinander trennt. Die äußere Zellmembran besteht aus Phospholipiden, Membranproteinen und Lipopolysacchariden (LPS). LPS besteht aus drei Teilbereichen, die miteinander verbunden sind: Lipid A, der Kernregion und repetitiven Polysaccharid-Einheiten, den sogenannten O-Antigenen (Cullor and Tyler, 2001). Lipid A bildet den lipophilen inneren Bereich des LPS und wirkt als Endotoxin (Tyler et al., 1992). Diese kann aufgrund eines Endotoxinschocks zum Tod des Tieres führen (Zheng et al., 2006). LPS wird während der bakteriellen Vermehrung und dem bakteriellen Tod freigesetzt und initiiert eine entzündliche Reaktion. Es stellt den primären Virulenzfaktor gram-negativer Bakterien dar (Bannerman et al., 2003; Lee et al., 2003), ist charakteristisch für *E. coli* und ist phylogenetisch hoch konserviert. Dieses Strukturmotiv wird den pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPS) zugeordnet, welche wiederum von Mustererkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) an der Oberfläche verschiedener Immunzellen erkannt werden (Aderem and Ulevitch, 2000). Toll-like Rezeptoren stellen eine Untergruppe der PRRs dar und spielen bei der Induktion der angeborenen Immunantwort und der Auslösung einer Entzündungsreaktion eine große Rolle (Akira et al., 2006; Iwasaki and Medzhitov, 2004; Takeda and Akira, 2005). Bisher konnten 13 TLR bei Säugetieren identifiziert werden (Beutler, 2004). TLR4 stellt den signaltransduzierenden Rezeptor für LPS dar (Hirschfeld et al., 2000). LPS wird über CD14,

LBP und MD-2 an den TLR4 auf Zellen gebunden und stimuliert über eine intrazelluläre Reaktionskaskade deren Aktivierung (Dauphinee and Karsan, 2006; Schumann et al., 1990). Die Stimulation durch LPS führt zur Sekretion von Akut-Phase Proteinen (Wong et al., 2000) und der vermehrten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) und Interleukin 1B (IL1B) (Medzhitov, 2007). Die beiden letztgenannten scheinen sowohl an der Ausprägung von lokalen als auch systemischen Reaktionen beteiligt zu sein (Dinarello, 1996; Thijs et al., 1996). Beispielsweise werden systemische Effekte wie Inappetenz, Fieber, Dehydration und Diarrhoe durch LPS verursacht. Eine Reduktion der Milchleistung kann direkt bzw. indirekt auf die lokalen und systemischen LPS-Effekte zurückgeführt werden.

2.3 Inflammatorisches System

Stressoren, wie in diesem Fall eine Mastitis, aber auch Schock, oxidativer Stress, oder Hyperthermie, rufen eine Stress- und Entzündungsreaktion des Körpers hervor, die auf komplexen ineinander greifenden Kaskaden endogener Immunmediatoren basiert. Die inflammatorische Reaktionsabfolge beginnt mit der Immunaktivierung auf molekularer Ebene durch erhöhte Expression entzündungsspezifischer Gene, welche die zelluläre Rekrutierung, das Rolling, die Adhäsion, Diapedese und schließlich die Infiltration von inflammatorischen Zellen nach sich zieht. Eine Mastitis triggert also prompte, unspezifische Entzündungsvorgänge durch eine direkte und massive Expression inflammatorischer Induktoren wie z.B. Zytokinen, Chemokinen, Akut-Phase Proteinen und Adhäsionsmolekülen.

Die allgemeinen Prinzipien des Immunsystems sind sehr anschaulich in dem Lehrbuch „Immuno Biology“ (Janeway et al., 2004) dargestellt und werden im Folgenden nur kurz erläutert.

Das Immunsystem gliedert sich funktionell in zwei interagierende Teilsysteme, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Alle Immunzellen gehen aus einer pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks hervor, welche durch Teilung zwei spezialisierte Typen von Stammzellen erzeugt: eine gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle (adaptiv) und eine gemeinsame myeloide Vorläuferzelle (angeboren).

Die Zellen des angeborenen Immunsystems (Phagozyten wie Makrophagen, Monozyten, Granulozyten) bilden die erste Verteidigungslinie in der Abwehr eindringender Pathogene, bevor die antigenspezifischen Zellen des adaptiven Immunsystems (T- und B-Lymphozyten, Natürliche Killer (NK)-Zellen) aktiviert werden. Fremdzellen werden von Phagozyten anhand typischer Oberflächenstrukturen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPS) und des Fehlens bestimmter körpereigener Moleküle (*major histocompatibility complex*, MHC-Antigene) erkannt und anschließend durch Phagozytose intrazellulär oder durch

Ausschüttung zytotoxischer Moleküle zerstört. Die Zellen des adaptiven Immunsystems, die B- und T-Lymphozyten, bilden Rezeptoren, die Antigene spezifisch binden können. B-Zellen differenzieren nach dem ersten Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen zu reifen Plasmazellen und lösen eine humorale Immunantwort aus, indem sie Antigen-spezifische Antikörper bilden und ins Blut sezernieren. T-Zellen unterteilen sich in zwei Subtypen. Die zytotoxischen T-Zellen können durch direkten Kontakt mit Zellen, die das spezifische Antigen präsentieren, deren Apoptose auslösen. Die Helfer-T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung und Aufrechterhaltung sowohl der zellulären als auch der humoralen Immunabwehr.

2.4 Relevanz der Studie

Die Euterentzündung gilt als eine der verlustreichsten Einzeltierkrankungen in der Milchwirtschaft, deren Schaden auf 25 Milliarden Euro weltweit pro Jahr geschätzt wird (Pareek et al., 2005). Ein Großteil der Verluste wird durch *Escherichia coli* verursacht, einen gram-negativen Umweltkeim der meist akute Verläufe einer Mastitis hervorruft. In der frühen Phase einer akuten Infektion steht die unspezifische Immunantwort im Vordergrund, wobei die Milchdrüse verschiedene Immunmediatoren bildet. Dadurch werden Leukozyten angelockt und aus dem Blut rekrutiert. Den polymorphkernigen Leukozyten (PMN) wird die Hauptfunktion bei der Bekämpfung von eindringenden Mikroorganismen zugeschrieben (Prgomet et al., 2005), aber auch das milchbildende Epithel scheint eine wesentliche Rolle zu spielen. Während einer Immunantwort bildet es z.B. Laktoferrin, Zytokine und Akut-Phase Proteine. In letzter Zeit wurden auch vermehrt Hinweise darauf gefunden, dass es selbst in den nicht betroffenen Nachbarvierteln eines infizierten Tieres zu Veränderungen in der Genexpression kommt.

2.5 Hinweise auf eine systemische Immunantwort

Die Immunantwort des Wirts auf pathogene Mikroorganismen zählt zu den am häufigsten untersuchten Modellen für zelluläre Reaktionen auf externe Stimuli (Jenner and Young, 2005).

Aufgrund der anatomischen Abgrenzung der einzelnen Mammarkomplexe voneinander wird allgemein angenommen, dass es bei einer Infektion eines Euterviertels zu keinem Übergreifen auf die benachbarten Viertel kommt. Kürzliche Studien beim Rind können jedoch so interpretiert werden, dass Abwehrmechanismen auf systemischer Ebene angeschaltet werden, welche nicht-infizierte Euterviertel schützen. Merle et al. beschreiben beispielsweise ein Phänomen, das auf eine Auswirkung der Infektion eines Euterviertels auf die

Zellaktivitäten der Nachbarviertel hinweist (Merle et al., 2007). Sie konnten nachweisen, dass sich die Zusammensetzung der somatischen Zellen in nicht-infizierten Vierteln infizierter Tiere von der gesunder Tiere signifikant unterscheidet. Der Anteil an polymorphkernigen Leukozyten (PMN) überstieg erheblich jenen, der für die Kontrolltiere ermittelt wurde. PMN stellen eine wesentliche Komponente des angeborenen Immunsystems dar und spielen eine entscheidende Rolle in der akuten Phase einer Entzündung. Sequenzielle Infektionsstudien mit *E. coli* zeigten, dass es in den anfänglich infizierten Eutervierteln zu einem massiven Einstrom von Zellen kommt, während in den nachfolgend infizierten Vierteln ein Zellanzug nachweisbar geblockt wird (Yang et al., 2008). Während dieser Zeit steigt der SCC im initial infizierten Viertel jedoch weiterhin an, was eine Limitierung chemotaktischer Zellen ausschließen lässt. Neben den Änderungen in der Zellzusammensetzung fällt sowohl in den infizierten Vierteln (> 50%) als auch den nicht-infizierten Nachbarvierteln (~1/3) die Milchproduktion dramatisch ab. Vangroenweghe et al. (Vangroenweghe et al., 2004a) führten die Einbußen der Milchleistung der nicht-infizierten Viertel nach Infektion eines Nachbarviertels mit *E. coli* auf die ausgeprägten systemischen Effekte zurück.

In einer kürzlichen Arbeit wurden auch Änderungen in der Genexpression der gesunden Viertel in Reaktion auf eine Infektion eines benachbarten Viertels aufgezeigt (Jaffrezic et al., 2007). Beim Vergleich der nicht-infizierten Viertel aus zwei Versuchstierkollektiven, die an einem Viertel entweder mit *E. coli* oder mit *S. aureus* infiziert wurden, konnte man unerwartet ein Set von Genen identifizieren, deren Expression in den *E. coli* gegenüber den *S. aureus* behandelten Tieren signifikant geändert war.

2.6 Mastitis-Infektionsmodell

In dieser Arbeit wurde ein etabliertes, streng definiertes Mastitis-Infektionsmodell verwendet, das eine von genotypischen Faktoren weitgehend unbeeinflusste Mastitisinduktion erlaubt. Bei Untersuchungen an Tierinfektionsmodellen können die Rahmenbedingungen bewusst vorgegeben werden, welche bei spontan erkrankten Tieren nur schwer kontrollier- bzw. interpretierbar sind. Eine Vielzahl an physiologischen Faktoren (Wirtsfaktoren) haben neben der Pathogenität des Erregers (Erregerfaktor) und dem Stallmanagement (Umweltfaktor) einen großen Einfluss auf den Verlauf einer *E. coli* Mastitis (Burvenich et al., 2003), deren Berücksichtigung für die Güte des Tiermodells entscheidend ist. Aus der genauen Analyse bisheriger Mastitismodelle geht hervor, dass die Voruntersuchungen und Auswahl der Tiere auf sehr unterschiedlichem Niveau stattfanden. Nur in wenigen Fällen wurden die Versuchstiere streng nach Laktationsstadium, Anzahl bisheriger Laktationen, niedriger Zellzahl und wiederholt bakteriologisch negativen Befunden ausgewählt (Schukken et al., 1999). Standardisierte Bedingungen und strenge Modellgrenzen bezüglich der Euter- sowie der Allgemeingesundheit galten deshalb in unserem Tiermodell als unerlässlich.

Eine Reihe von Studien untersuchten rasseabhängige Unterschiede bezüglich des Risikos einer Mastitis (Bannerman et al., 2008; Begley et al., 2009; Walsh et al., 2007). Um eventuelle rassespezifische genetische Varianzen zu vermeiden wurden für unsere Experimente nur Kühe der Rasse Deutsche Holstein Frisian herangezogen. Die Empfänglichkeit der Milchdrüse für eine intramammäre Infektion ist während der frühen Involution zum Zeitpunkt des Trockenstellens (Nickerson, 1989) und während der frühen Laktation im geburtsnahen Zeitraum (Smith et al., 1985) merklich gesteigert. Dies ist vor allem auf die eingeschränkte Leukozytenfunktion zurückzuführen, welche einige Wochen vor und nach der Kalbung auftritt (Burton and Erskine, 2003; Mehrzad et al., 2002; Sordillo and Peel, 1992). Diese Immunsuppression wird durch einen erhöhten Bedarf an Nährstoffen aufgrund der Umstrukturierung und Sekretproduktion des Milchdrüsengewebes hervorgerufen (Burvenich et al., 2007), aber auch perinatale Krankheiten wie Nachgeburtsverhaltung können die Widerstandsfähigkeit negativ beeinflussen (Kimura et al., 2002). Demnach wurden bei uns ausschließlich Tiere eingesetzt, die sich zwischen dem 3. und 6. Laktationsmonat befanden. Zusätzlich zum Laktationsstadium hat auch die Parität einen großen Einfluss auf den Schweregrad einer klinischen Mastitis (Gilbert et al., 1993). Erstgebärende und damit jüngere Kühe erwiesen sich als resistenter gegenüber einer intramammären *E. coli*-Infektion als ihre multiparen Pendanten (Vangroenweghe et al., 2004b). Dies ist durch die erhöhte Aktivität der Leukozyten im Blut bedingt (Begley et al., 2009). Für unsere Versuche wurden deshalb nur Erstkalbinnen verwendet. Parameter wie die Anzahl der zirkulierenden Leukozyten im Blut, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Neutrophile (Heyneman et al., 1990; Vandeputte-Van Messom et al., 1993) sowie die chemotaktische Aktivität der PMN (Dosogne et al., 1997; Van Werven et al., 1997), welche eine Vorhersage über den Grad der klinischen Ausprägung einer Mastitis erlauben, wurden bereits eingehend untersucht. In diesem Zusammenhang verdiente insbesondere der initiale Gehalt an somatischen Zellen („somatic cell count“; SCC) in der Milch Beachtung, da dieser als aussagekräftiger Parameter für die Beurteilung des Gesundheitszustandes des Euters angesehen wird (Pyorala, 2003). Bereits ab einer Zellzahl von 100.000 Zellen/ml Milch wird angenommen, dass die normale zelluläre Abwehr in eine entzündliche Reaktion überzugehen beginnt. Es gibt in der Literatur jedoch Hinweise darauf, dass eine zu starke züchterische Reduktion des Zellgehaltes die physiologischen Abwehrmechanismen außer Kraft setzen könnte (Schukken et al., 1989; Shuster et al., 1996). Suriyasathaporn et al. konnten eine negative Korrelation zwischen dem SCC und der Inzidenz einer *E. coli*-Mastitis aufzeigen (Suriyasathaporn et al., 2000). Aber auch die verwendeten Probanden in dem Mastitis-Modell von Petzl (Petzl, 2005), die einen initialen Zellgehalt von 100.000 Zellen/ml Milch nicht überschritten, reagierten individuell sehr unterschiedlich auf die Inokulation von Mastitiserregern. Darüber hinaus wird vermutet, dass die Aktivität residenter Zellen in der Milchdrüse möglicherweise hormonellen Einflüssen unterliegen (Suriyasathaporn et al., 2000). Als weiteres wichtiges Kriterium für die Selektion der Tiere galt, dass diese noch nie

zuvor an klinischer Mastitis erkrankt waren und somit durch das Vorhandensein von erregerspezifischen Antikörpern in ihrer Abwehrfähigkeit divergieren.

In vivo Studien belegen, dass bereits mit einer Injektion von 72-74 KbE *E. coli* in ein Euterviertel eine Mastitis ausgelöst werden kann (Bannerman et al., 2004). Aus der Studie von Petzl et al. (Petzl et al., 2008) geht hervor, dass alle Kühe nach Injektion von 500 KbE *E. coli* innerhalb der ersten 12 h p.i. Fieber mit Maximalwerten zwischen 12 h und 18 h p.i. entwickelten.

2.7 Warum Analysen des Transkriptoms?

Viele physiologische Prozesse gehen mit umfangreichen Änderungen des Transkriptoms und/oder des Proteoms einher. Der beste Weg, solche Prozesse zu untersuchen und die beteiligten Gene zu identifizieren, wäre die Erfassung und Quantifizierung aller Proteine des betroffenen Gewebes. Solche Untersuchungen sind extrem schwierig und aufwendig. Proteine können beispielsweise extrem unterschiedliche biochemische Eigenschaften besitzen. Sie können von einigen wenigen Kopien pro Zelle bis zu mehr als 10^8 Kopien pro Zelle vorkommen, wodurch die Erfassung seltener Spezies extrem aufwendig wird. Zurzeit reicht die Leistungsfähigkeit der vorhandenen Verfahren zur Analyse des Proteoms nicht aus, um mit vertretbarem Aufwand Proteome vollständig zu erfassen. Deshalb werden in der Regel nur bestimmte Anteile des Proteoms untersucht, wie z.B. die jeweils in höchster Kopienzahl vorkommenden Proteinspezies. Eine Alternative zur aufwendigen Analyse des Proteoms ist die Analyse des Transkriptoms, die gleich mehrere Vorteile hat. Im Vergleich zu Proteinen haben Nukleinsäuren definierte chemische Eigenschaften. Sie können reproduzierbar in hoher Qualität aus Geweben isoliert und durch wenig aufwendige Verfahren mit hoher Empfindlichkeit nachgewiesen werden. Die Nachweisverfahren können miniaturisiert und hochparallel durchgeführt werden, so dass innerhalb kurzer Zeit komplette Transkriptome erfasst werden können. Allerdings können bei physiologischen Abläufen nur solche Prozesse durch Analysen des Transkriptoms untersucht werden, die eine erhöhte oder erniedrigte Transkriptionsrate von Genen auslösen. Prozesse, die dagegen nur auf der Proteinebene reguliert werden wie z.B. über Phosphorylieren von Proteinen oder deren Abbau, werden nicht erfasst.

2.8 Analysen des Transkriptoms mit DNA Microarrays

Das Genom eines Säugetieres enthält etwas mehr als 20.000 Gene für Proteine, von denen jeweils mehrere mRNA-Spezies transkribiert werden können. Als Konsequenz werden zur Erfassung aller mRNA-Spezies einer Zelle sehr leistungsfähige Verfahren benötigt. Durch

die Entwicklung von Microarrays (Freeman et al., 2000; Schena et al., 1995; Schulze and Downward, 2001) wurde es möglich, in einem einzigen Experiment die Transkriptionsraten aller bekannten mRNA-Spezies einer Zelle zu erfassen und genomweite Expressionsprofile zu erstellen. Die Technologie beruht auf dem klassischen Northernblot, der die Expression eines Gens durch Hybridisierung gegen mRNA nachwies. Bei Analysen mit Microarrays wird diese Technologie umgekehrt und die komplette mRNA gegen eine definierte Sonde hybridisiert, die auf einem festen Träger aufgebracht ist. Der Vorteil dieses „Reverse Northernblotting“ liegt darin, dass die Fläche für eine Sonde bis in den Bereich von einigen wenigen μm^2 verkleinert werden kann.

Es gibt verschiedene Microarray-Technologien, die mit verschiedenen Ansätzen die Genexpression untersuchen und sich jeweils für spezielle Fragestellungen besonders gut eignen (Ahmed, 2006; Mandruzzato, 2007). Für die Untersuchung einer begrenzten Anzahl von Genen können mit selbst angefertigten Arrays hochwertige Ergebnisse erzielt werden. Diese bewähren sich besonders dann, wenn es keine kommerziellen Arrays für den untersuchten Organismus gibt. Kommerzielle Systeme benötigen nur wenige μm^2 . Dadurch können auf einem Quadratcentimeter mehrere Millionen verschiedener Sonden untergebracht und gleichzeitig in einem Experiment unter völlig identischen Bedingungen gegen eine Sonde aus markierten Nukleinsäuren hybridisiert werden, die z.B. aus Gesamt-RNA hergestellt wurde. Die Menge an gebundener markierter Sonde entspricht der Häufigkeit der zugehörigen mRNA im untersuchten Gewebe. Mit empfindlichen Nachweisverfahren können Gene erfasst werden, deren Transkript nur in einer Kopie pro Zelle vorkommt. Trotz dieser hohen Leistungsfähigkeit wurde die Qualität und Reproduzierbarkeit dieser Technologie in Frage gestellt, weil widersprüchliche Ergebnisse mit verschiedenen Plattformen aber auch mit derselben Plattform erhalten wurden. So verglichen Hoffmann et al. die Ergebnisse einer Expressionsanalyse mit Affymetrix GeneChips, die mit vier verschiedenen Verfahren zur Normalisierung der Expressionsdaten erhalten worden waren (Hoffmann et al., 2002). Sie fanden heraus, dass die Anzahl der jeweils identifizierten differentiell exprimierten Gene von der Normalisierungsmethode der Daten abhing.

Im Rahmen des MicroArray Quality Control (MAQC) Project wurde die Leistungsfähigkeit verschiedener Microarray Plattformen und alternativer Technologien untersucht (Shi et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression in verschiedenen Laboren mit verschiedenen Technologien reproduzierbar erfasst werden konnte. Auch wurden die Ergebnisse von Analysen mit Microarrays mit verschiedenen Verfahren zur quantitativen Erfassung der Genexpression untersucht (Canales et al., 2006). Dabei stellte sich heraus, dass die Ergebnisse beider Verfahren weitgehend übereinstimmten. Jedoch wurden im Vergleich zu den quantitativen Verfahren bei den Analysen mit Microarrays weniger aussagekräftige Ergebnisse bei niedrig exprimierten Genen erhalten. Dennoch konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Qualität der Ergebnisse von Microarray-Analysen durch

Optimierung und Standardisierung der verwendeten Methoden verbessert werden konnte und auch bei verschiedenen Plattformen reproduzierbare Ergebnisse lieferte (Yauk and Berndt, 2007).

Die Anforderungen an die Leistungsfähigkeit von Verfahren zur Analyse des Transkriptoms sind in der letzten Zeit durch die Erkenntnisse über die sogenannten noncoding RNAs gewachsen. Ausführliche Untersuchungen haben gezeigt, dass das Transkriptom von Säugetieren eine enorm große Anzahl von Transkripten enthält, die nicht für Proteine kodieren und deshalb noncoding RNA (ncRNA) genannt werden (Carninci et al., 2005; Katayama et al., 2005). Diese können mit den üblichen Hochleistungsarrays nicht erfasst werden. Zur Untersuchung der ncRNA wurden sogenannte „Tiling“-Arrays entwickelt, die Sonden zur Erfassung der gesamten nicht-repetitiven Sequenzen des humanen Genoms enthalten (Bertone et al., 2004). Mit diesen Arrays konnten nicht nur Transkripte von bekannten oder vorhergesagten Genen erfasst werden sondern mehr als zehntausend bislang unbekannte transkribierte Bereiche des Genoms. Viele davon liegen außerhalb der Bereiche bekannter Gene.

Keine zurzeit verfügbare Array-Technologie kann die zur Erfassung vollständiger Transkriptome notwendige Anzahl von Sonden auf einem einzigen Array unterbringen. Deshalb sind holistische Analysen mit Tiling-Arrays sehr zeitaufwendig und sehr teuer. Für solche Analysen müssen neue Arrays mit wesentlich höherer Anzahl an Oligos und kleineren Flächen pro Oligo sowie entsprechend leistungsfähige Scanner mit angepasster Auflösung und hoher Sensitivität entwickelt werden. Vor kurzem wurde ein neues Verfahren zum Auslesen von Microarrays entwickelt, das mit einer CCD-Kamera durch zeitverzögerte und integrierte Erfassung der Daten eine Auflösung von 200 nm erzielt und Signale von Einzelmolekülen auf Arrays erfassen kann (Hesse et al., 2006; Mir, 2006). Dieses revolutionäre Verfahren zeigt einen möglichen Ansatzpunkt für die Weiterentwicklung der Microarrays auf.

2.8.1 Herstellung von Affymetrix GeneChips™

In der vorliegenden Arbeit wurden GeneChip™ Bovine Genome Arrays zur Analyse des Transkriptoms eingesetzt. Affymetrix GeneChips™ werden durch Photolithographie auf SiO₂-Wafers hergestellt. Das Verfahren beruht auf hochparallel durchgeführter kombinatorischer Chemie und wurde 1991 erstmals als Verfahren zur *in situ* Synthese von Peptiden und Oligonukleotiden auf Glasoberflächen (Fodor et al., 1991) beschrieben. Durch eine Verknüpfung von kombinatorischer Chemie mit Verfahren zur Herstellung von Halbleitern wurden die gewünschten Biomoleküle aufgebaut. Die Synthese der Biomoleküle wurde über Lochmasken gesteuert, die bestimmte Areale der Glasoberfläche abdunkeln oder belichten. Der Aufbau der Lochmaske legt fest, auf welcher Fläche eine Spezies von Molekülen

synthetisiert wird. Über die Größe und Anzahl der Löcher wird gesteuert, wie viele dieser Flächen (*Features*) parallel auf einem Array zur Verfügung stehen. Ein derzeit erhältlicher kommerzieller Array, der so genannte Affymetrix GeneChip™, kann auf 1,3 x 1,3 cm etwa 1,3 Millionen verschiedener *Features* (Oligonukleotide) enthalten, die jeweils 25 Basen lang und auf einer Fläche von 11 x 11 µm untergebracht sind. Ein solches *Feature* oder *probe cell* enthält hunderttausende Kopien des entsprechenden Oligonukleotides.

Die Synthese der Oligos erfolgt in mehreren Schritten (Abb. 1). Durch Aufbringen einer photolabilen Schutzschicht auf den Glasträger (*Wafer*) wird verhindert, dass die Reaktivchemikalien unspezifisch an die Oberfläche gekoppelt werden. Der Glasträger wird dann durch die erste Lochmaske mit Licht bestrahlt. An den belichteten Stellen werden die lichtempfindlichen Schutzgruppen abgespalten und dort bindet das als nächstes aufgebraute Nukleotid. Dieses enthält seinerseits wieder eine Schutzgruppe am 5'-Ende, die jedoch durch Belichtung entfernt werden kann. In den nächsten Schritten wird jeweils die vorhergehende Lochmaske durch eine andere ersetzt und das nächste Nukleotid nach Belichtung gekoppelt. So können durch Belichtung oder Abdunklung eines *Features* alle benötigten Sequenzen an genau definierten Positionen synthetisiert werden. Die exakt 25 B langen Sonden (*probes*) der Affymetrix Microarrays werden in genau 100 Prozessschritten hergestellt. Zuletzt werden die fertig gestellten Arrays aus dem *Wafer* ausgeschnitten und in Kartuschen verpackt.

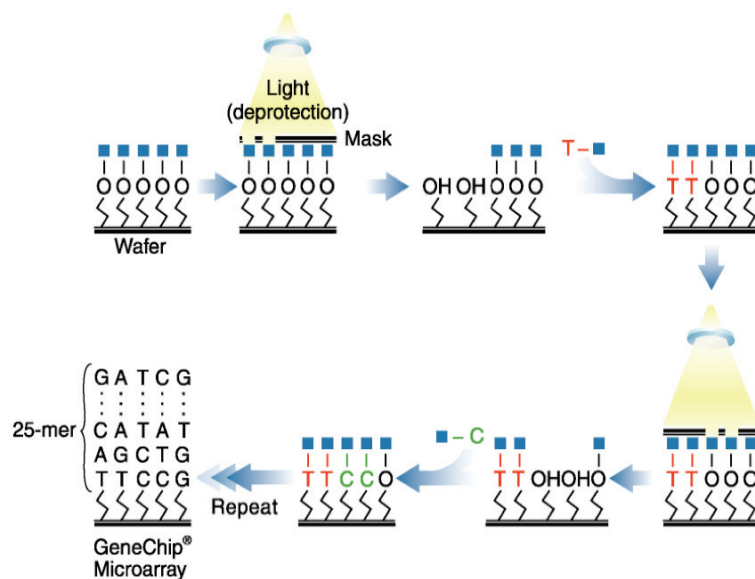


Abbildung 1: Photolithographischer Herstellungsprozess – Affymetrix
(<http://www.affymetrix.com/index.affx>, 2009)

Durch Belichtung des Wafers über eine Lochmaske werden die Schutzgruppen an den belichteten Stellen entfernt. Im so entschützten Bereich wird das als nächstes zur Verfügung stehende Nukleotid angekoppelt. Dieses Nukleotid enthält am 5'-Ende eine lichtempfindliche Schutzgruppe, die durch Belichtung entfernt werden kann. Durch Wiederholung von Belichtung und Kopplungsreaktion werden gezielt beliebige 25 B lange Oligonukleotide aufgebaut.

2.8.2 Affymetrix GeneChip™ - Design der Sonden

Die Oligonukleotide des GeneChip™ Bovine Genome Arrays wurden aus bovinen Nukleotidsequenzen in öffentlich zugänglichen Datenbanken (dbEST, GenBank, RefSeq und UniGene) abgeleitet. Der bovine GeneChip enthält für jedes zum Zeitpunkt der Erstellung der Lochmasken bekannte Gen ein *probe set* von 11 perfekt passenden Oligonukleotiden und ein weiteres Set von 11 Oligonukleotiden mit einem Mismatch (Abb. 2). Die Sequenzen werden aus einem Bereich innerhalb von ca. 600 Bp des 3'-Endes jedes Gens abgeleitet. Bei der Auswahl der Sequenzen wurde darauf geachtet, dass diese keine Sekundärstrukturen wie Haarnadelschleifen (*hairpin loops*) oder Dimere ausbilden können.

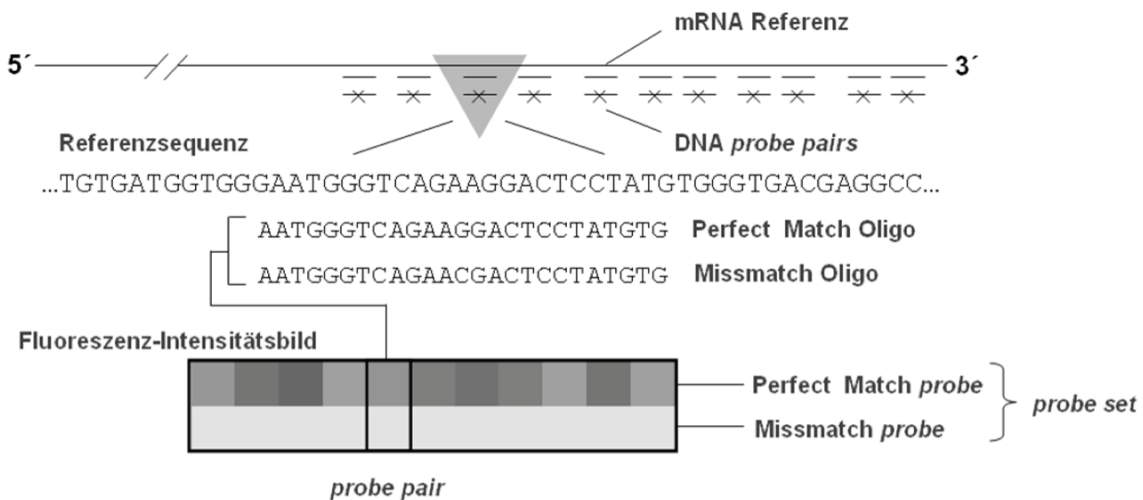


Abbildung 2: GeneChip™ Sonden-Design – modifiziert nach Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/index.affx>, 2009)

Aus dem 3'-Bereich der Referenzsequenz werden 11 Oligonukleotide ausgewählt, die jeweils 25 B lang sind und weitgehend optimale Hybridisierungseigenschaften haben (*perfect match oligos*). Durch Austausch der zentralen Base an Position 13 dieser Oligonukleotide werden 11 *mismatch oligos* erzeugt. Alle 11 *perfect match oligos* und 11 *mismatch oligos* bilden ein *probe set*, das die Expressionswerte des entsprechenden Gens erfassen kann.

Jedem *probe set* wurde eine Affymetrix-Identifikationsnummer (*affyID*) zugeordnet. Der gebräuchlichste Algorithmus zur Auswertung von Expressiondaten RMA (Robust Multiarray Average), welcher auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde, berücksichtigt die Signalintensität der *mismatch probe cells* nicht. Die *probe pairs* eines *probe sets* sind über den ganzen Chip verstreut vorzufinden, damit größere räumlich begrenzte Artefakte (Flusen, unlösliche Partikel) nach Möglichkeit nicht mehrere *probe pairs* eines *probe sets* beeinflussen. Auf einem GeneChip™ Bovine Genome Array befinden sich über 24.000 solcher *probe sets*, die in etwa 23.000 Transkripte und 19.000 UniGene Cluster repräsentieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Analysenwaage Mettler AE 200	Mettler Toledo GmbH, Giessen
Analysenfeinwaage LA120S	Sartorius, Göttingen
Automatische Pipette EDOS 5222	Eppendorf, Hamburg
Crosslinker	Spectrolinker, Albany, NY, USA
<i>Gelelektrophorese-Apparaturen</i>	
Gibco BRLHorizontal Gel	Gibco BRL, Invitrogen, Karlsruhe
GeneChip™ Fluidics station 450	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip™ Scanner 3000 7G	Affymetrix, Santa Clara, USA
Gewebe-Homogenisator (DIAX900)	Heidolph, Schwabach
Dispergierstab 10 F	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer IkaMag™ RCT	Ika Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipetten	Gilson, Bad Camberg
Mikrowelle 8521	Privileg
PCI-Gel-Imagers	INTAS, Göttingen
Schüttler IKA VIBRAX VXR	Ika Labortechnik, Staufen
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2 G560E	Scientific Industries, INC., NY, USA
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
<i>Hybridisierungsöfen</i>	
GeneChip™ Hybridization Oven 640	Affymetrix, Santa Clara, USA
Herahybrid12	Kendro, Langenselbold
<i>Zentrifugen</i>	
Micro Centrifuge II (GMC-060)	Neolab, Heidelberg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417	Eppendorf, Hamburg

3.1.2 Chemikalien

2-Propanol (Isopropanol)	Merck KGaA Darmstadt
<i>Agarosen</i>	
Agarose, high resolution	Sigma, Steinheim
Agarose (Electrophoresis Grade)	Invitrogen, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Riedel-de Hâen, Deisenhofen
Ethanol (Rotipuran > 99,8% p.a.)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NAOH)-Plätzchen	Merck KGaA Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN, Irvine, CA, USA
RNA ^{later} TM	Ambion, Huntingdon, UK
Saccharose	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris)	Roth, Karlsruhe
TRIzol TM Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.3 Lösungen, Enzyme und sonstige Reagenzien

10x TBE-Puffer	108 g	Tris Base
	55 g	Borsäure
	40 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
	ad 1 Liter Wasser	

2,5x Probenpuffer für Agarosegele (2,5x HSE, 10 ml)	2,4 g	Harnstoff
	5 g	Saccharose
	1 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
	1 ml	1% Bromphenolblau
	ad 10 ml Wasser	

Wasser

AccuGene (frei von DNase, RNase)	Cambrex Bio Science
Millipore-Wasser (ultrafiltriert)	Millipore, Schwalbach

Enzyme, Reagenzien und Kits

Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
One-Cycle cDNA Synthesis Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
MessageAmp™ II-Biotin <i>Enhanced</i> Kit	Ambion, Austin, USA
Sample Cleanup Module	Affymetrix, Santa Clara, USA
IVT Labeling Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
Hybridization Control Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
Wash and Stain Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA

3.1.4 Molekulargewichtsstandards für DNA

Gene Ruler™	
100 bp DNA Ladder Plus (SM0321/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
1 kb DNA Ladder (N3232S)	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
DNA Molecular Weight Marker IX	Roche, Mannheim

3.1.5 Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterial

GeneChip™ Bovine Genome Array	Affymetrix, Santa Clara, USA
0,5/1,5/2,0 ml Reaktionsgefäße („safe lock“)	Eppendorf, Hamburg
Aesculap-Skalpellgriffe	tibed, Wilhelmshaven
Aesculap-Skalpellklingen 13	tibed, Wilhelmshaven
Anschneidemesser (18 cm)	tibed, Wilhelmshaven
Chirurgische Pinzette	tibed, Wilhelmshaven
Gentle Skin™ Latexhandschuhe	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden
Nitrilhandschuhe	Kimberly-Clark Roswell
Kolbenhubpipette 2/10/20/100/200/1000 µl	Gilson, Bad Camberg
Kolbenhubpipette 500-2500 ml	Eppendorf, Hamburg
Kurzzeitmesser	Roth, Karlsruhe

RNase freie Spitzen	MßP Molecular
RNase freie 2,5 ml Spitzen	Eppendorf, Hamburg
Transportbehälter für Zentrifugenröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen spitz 50 ml	Peske (TPP), Aindling-Arnhof
Zentrifugenröhrchen 12 ml round bottum	Peske (TPP), Aindling-Arnhof
Objekträger	Menzel GmbH, Braunschweig

3.1.6 Verwendete Software

Programme

Excel Software	Microsoft
Nanodrop V3.5.2	Peqlab, Erlangen
Bioconductor	http://www.bioconductor.org/
R Software V2.8.0	http://www.r-project.org/
SAM Software V3.0 (Significance Analysis of Microarrays)	http://www-stat.stanford.edu/_tibs/SAM/
Microarray Analysis Suite V5.0	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip Operating Software V1.2	Affymetrix, Santa Clara, USA
TIGR (The Institute for Genomic Research)	http://www.tm4.org/
MeV (Multitexperiment Viewer) V4.2.02	http://www.tm4.org/mev.html

Datenbanken

Affymetrix NetAffx™ Analysis Center	https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx
National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Ensembl	http://www.ensembl.org
DAVID Bioinformatics Resources 2008	http://david.abcc.ncifcrf.gov/
CoPub	http://services.nbic.nl/cgi-bin/copub/CoPub.pl
Panther	http://www.pantherdb.org/panther/goToPanther.jsp

3.2 Bakterienstamm

Der verwendete *E. coli*-Stamm 1303 gehört der phylogenetischen Gruppe A (*E. coli* collection of reference strains, ECOR-A) an und war aus Milchsekreten von Kühen mit natürlich auftretender klinischer Mastitis isoliert worden. Das verwendete Isolat konnte durch Multiplex-PCR-Analyse der Virulenz-assoziierten Gene keinem extraintestinalen oder intestinalen pathogenen Stamm von *E. coli* zugeordnet werden. Die Injektionslösung für die Infektion der Versuchstiere enthielt 500 KbE *E. coli* pro 2 ml steriler, pyrogenfreier 0,9%iger Kochsalzlösung und wurde aus kryokonservierten Stammkulturen hergestellt (Van Oostveldt et al., 2002). Die tatsächlich verwendete Keimzahl wurde durch Verdünnungsausstriche auf Selektivmedium (Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar) bestimmt und lag zwischen 421-613 KbE/2 ml.

3.3 Versuchstiere

Für diese Arbeit wurden 15 Milchkühe der Rasse Deutsche Schwarzbunte, Typ Holstein Frisian benötigt. Alle Tiere waren klinisch gesund, zwischen 25 und 30 Monate alt und befanden sich in der Mitte ihrer ersten Laktation (3 bis 6 Monate post partum). Die Kühe wiesen eine tägliche Milchleistung von durchschnittlich 20 l (15 bis 25 l) auf und waren zuvor nie an einer klinischen oder subklinischen Mastitis erkrankt.

3.4 Methoden

3.4.1 Vorbereitung und Infektion der Versuchstiere

Die Auswahl und Vorbereitung der Versuchstiere und die Infektionsversuche wurden vom Kooperationspartner (Arbeitsgruppe Prof. Zerbe) an der Klinik für Wiederkäuer der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München mit der Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt. Die Auswahl der Versuchstiere erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurden in Frage kommende Tiere über mehrere Wochen hinweg in regionalen Bauernhöfen untersucht. Für die Infektionsversuche wurden Tiere benötigt, deren Milch in mindestens 3 Eutervierteln weniger als 50.000 Zellen pro ml und zudem keine Bakterien enthielt. Eines der Euterviertel durfte einen SCC von bis zu 150.000/ml Viertel aufweisen. Viertel mit einem SCC von mehr als 50.000 wurden nicht für Infektionsversuche verwendet. Für die Untersuchungen wurden wöchentlich Viertel-Gemelksproben aseptisch gewonnen und zytologisch bzw. mikrobiologisch untersucht. Geeignete Tiere wurden in die Klinik für Wiederkäuer eingestellt und mindestens drei Wochen lang an die Umgebung gewöhnt. Vor dem Versuch wurde der Sexualzyklus der Versuchstiere synchronisiert durch zweimalige Injektion von (+)-Cloprostenol-Natriumsalz (PGF_{2α}, Prostaglandin-F_{2α}-Analogon; DalmazinTM) im Abstand von 12 Tagen.

Infektionsversuche mit *E. coli* wurden drei Tage nach der zweiten Injektion im brunstnahen Zeitraum (Östrus) durchgeführt.

Vor Beginn jedes Versuchs wurde den Versuchstieren Oxytocin (20 IE) in die Schwanzvene injiziert. Alle Zitzen wurden mit trockenem Zellstoff gereinigt. Dann wurden 5 ml an Milchsekret (Vorgemelk) aus dem Euterviertel gemolken. Nach makroskopischer Begutachtung der Beschaffenheit des Vorgemelks wurde ein Schalm-Tests (California Mastitis Test, CMT) durchgeführt. Es folgte eine gründliche Reinigung und Desinfektion der Zitzen mit 70%igem Ethanol und die aseptische Entnahme der Milchproben (Anfangsgemelk) für die bakteriologische Untersuchung und die Bestimmung des SCC. Rückstellproben wurden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Dann wurden alle Euterviertel maschinell (Eimermelkanlage) gemolken und danach sorgfältig nochmals manuell vollständig ausgemolken.

Zur Infektion eines Euterviertels (vorzugsweise hinten rechts) wurden 2 ml Bakteriensuspension (500 KbE *E. coli* in 2 ml 0,9%iger steriler, pyrogenfreier Kochsalzlösung) über den Strichkanal in die Zisterne injiziert. Das Placeboviertel wurde entsprechend behandelt, jedoch enthielt die Injektionslösung nur Kochsalzlösung. Nach der Injektion wurde die eingebrachte Lösung durch Massieren des Euterviertels verteilt. Vom Beginn der Infektion bis zum Schlachten der Versuchstiere nach 6 h oder 24 h wurden klinische Daten wie z.B. die Körpertemperatur von den infizierten und unbehandelten Tieren erfasst. Zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 12 und 24 h wurden Blutproben von der Jugularvene entnommen und auf die Leukozytenzahl hin untersucht. Unmittelbar vor dem Schlachten (6 h oder 24 h nach der Infektion) und nach 12 h wurde wie oben beschrieben ein California Mastitis Test durchgeführt und das Euter ausgemolken. Zudem wurde der SCC bestimmt und geprüft, ob *E. coli* in der Milch nachgewiesen werden kann.

3.4.2 Probengewinnung

Die Schlachtung der Versuchstiere erfolgte am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim mit Unterstützung der Pathologin Priv. Doz. Dr. med. vet. Angela Hafner. Die Tiere wurden mittels Bolzenschussgerät und anschließend Entbluten durch die Eröffnung der Halsschlagader getötet. Nach Abtrennen des Euters wurden Eutergewebsproben unter aseptischen Bedingungen innerhalb von 10 Minuten gewonnen. Dazu wurde aus dem Bereich 7 cm dorsal von der Milchzisterne ein Stück Gewebe mit einer Kantenlänge von 5 cm herausgeschnitten (Abb. 3 A). Aus dem inneren Bereich dieses Gewebestückes wurde ein Gewebestück von ca. 5 x 5 x 5 mm (ca. 250 mg) präpariert (Abb. 3 B) und in ein Reaktionsgefäß mit 5 ml RNA/later™ überführt. RNA/later™ verhindert den enzymatischen Abbau von RNA und ermöglicht ihre Konservierung bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurden die Gewebestücke gewogen und bis zu deren Weiterverarbeitung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

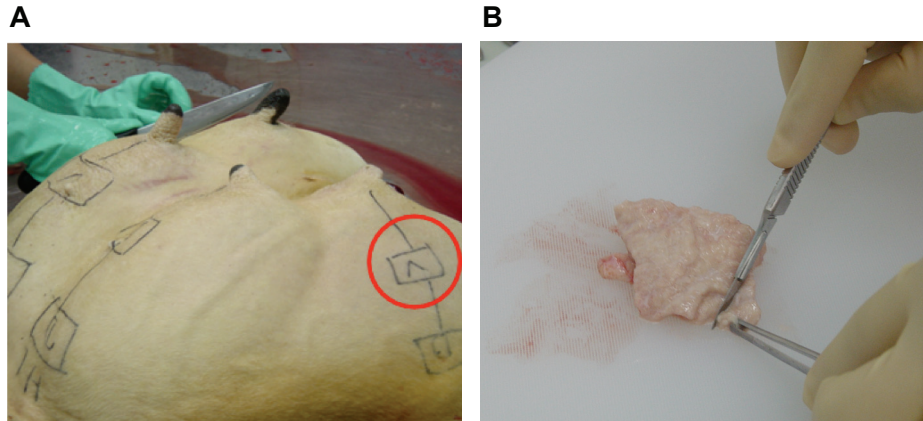


Abbildung 3: Entnahme von Milchdrüsenewebe

A: Aus dem ventralen Bereich (**V**) 7 cm dorsal der Milchzisterne wurde ein Probenstück mit einer Kantenlänge von 5 cm herausgeschnitten. Zusätzlich wurde auch Eutergewebe aus einer weiter dorsal gelegenen Lokalisation (**D**) gewonnen. **B:** Für die Transkriptomanalysen wurde aus dem Inneren des Probenstücks eine Gewebeprobe von ca. 5 x 5 x 5 mm präpariert.

3.4.3 RNA-Extraktion

Anmerkung: Bei allen Arbeiten mit RNA musste darauf geachtet werden, dass unspezifischer Abbau durch Kontamination mit RNasen vermieden wird. Deshalb wurden bei allen Arbeitsschritten Handschuhe getragen. Für die Isolierung und Bearbeitung der RNA wurden nur RNase-freie Plastikwaren verwendet. Die Arbeitsflächen wurden vor Aufnahme der Arbeiten mit einer 1%igen SDS-Lösung gereinigt.

Die isolierte RNA wurde für Analysen des Transkriptoms benötigt. Für eine aussagekräftige Auswertung dieser Profile ist es unbedingt nötig, dass alle Gewebeproben unter identischen Bedingungen aufgearbeitet werden.

3.4.3.1 TRIzol™ Methode

Aus den Gewebeproben wurde mittels TRIzol™ Gesamt-RNA entsprechend den Herstellervorgaben isoliert. Zum Schutz von Haut und Augen wurden Nitrilhandschuhe und eine Schutzbrille getragen. Wegen der Flüchtigkeit von Phenol und Chloroform wurden die Arbeiten unter einem Abzug durchgeführt.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden die Eutergewebsproben zunächst im S2-Labor unter einer sterilen Werkbank in kleine Scheiben zerschnitten und in Reaktionsgefäße mit TRIzol™ überführt. Eingesetzt wurden 2 ml TRIzol™ pro 100 mg Gewebe. Unmittelbar danach wurde das Eutergewebe mit einem Homogenisator (Heidolph DIAX 900 mit Dispergierstab 10 F) 1 Minute lang zerkleinert und dann 30 s auf Eis abkühlen lassen. Dieser Vorgang wurde 2 x wiederholt.

Das erhaltene Homogenat wurde auf einen Schüttler (IKA VIBRAX VXR) überführt und zur Vervollständigung der Lyse für 10 min bei Raumtemperatur und 1000 Upm geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (12.000 g für 10 min bei RT) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, auf Trockeneis eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Proben bei Raumtemperatur geschüttelt (IKA VIBRAX VXR, 1000 Upm). Nach Zugabe von 200 µl Chloroform je Milliliter TRIzol™ wurde 15 s lang so kräftig wie möglich von Hand geschüttelt. Dann wurde der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Vervollständigung der Phasentrennung wurden die Proben für 15 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Dabei trennte sich die Probe in 3 Phasen: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase (enthielt Proteine), eine trübe weiße Interphase (enthielt DNA), und eine obere farblose wässrige Phase, welche die RNA enthielt. Zur Fällung der RNA wurde die wässrige Phase, deren Volumen ca. 60% der ursprünglichen TRIzol™-Menge entsprach, mit einer Pipette abgenommen und mit 500 µl Isopropanol pro ml Ausgangsvolumen an TRIzol™ versetzt. Nach kurzem Durchmischen auf dem Vortex wurde die Probe zur Vervollständigung der Fällung für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde die RNA durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das gut sichtbare Sediment wurde vorsichtig mit 1 ml 75%igem Ethanol überschichtet und danach bei 12.000 g und 4 °C erneut zentrifugiert. Der Überstand an Ethanol wurde mit Hilfe einer Pipette möglichst vollständig entfernt. Das Sediment wurde für ca. 30 min an der Bunsenbrennerflamme getrocknet und nach Zugabe von 600 µl nukleasefreiem Wasser für 1 h auf Eis gelöst. Zur Vervollständigung der Lösung wurde die Probe für 10 min bei 58 °C geschüttelt (Thermomixer 5437, ca. 100 Upm) und durch Fällung mit Ammoniumacetat weiter gereinigt.

3.4.3.2 Ammoniumacetat-Fällung

Ziel der Ammoniumacetat-Fällung ist es, mögliche Verunreinigungen wie z.B. Proteine aus RNA-Präparationen zu entfernen. Dieses Verfahren beruht auf einer selektiven Fällung von RNA durch Konkurrenz hoher Konzentrationen an Ammoniumacetat um Hydrathüllen, wodurch bevorzugt lange Nukleinsäuren (mRNA) gefällt und kleine Nukleinsäuren sowie Proteine und andere Verunreinigungen abgetrennt werden.

Die RNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen einer 5 M Ammoniumacetat-Lösung versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 15 min bei 25.000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Sediment mit 250 µl 2,5 M Ammoniumacetat-Lösung und danach mit demselben Volumen an 75%igem Ethanol gewaschen. Dazu wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde vorsichtig mit der Waschlösung überschichtet, für 5 min bei RT aufbewahrt und dann für 5 min bei 25.000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des restlichen 75%igen

Ethanol wurde das Sediment für ca. 20 min bei Raumtemperatur an der Bunsenbrennerflamme getrocknet und anschließend in 600 µl nukleasefreiem Wasser gelöst. Zur Bestimmung der Konzentration wurde ein Aliquot von 1,5 µl der gelösten RNA am Nanodrop spektrophotometrisch vermessen. Zur Beurteilung der Qualität wurden ca. 250 ng der isolierten RNA durch Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese in Anwesenheit von Ethidiumbromid ermöglichte die Beurteilung der Qualität der isolierten RNA. Durch den Molekularsiebeffekt der Agarose werden die aufgetragenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte über Ethidiumbromid, welches nach Einlagerung in doppelsträngige Bereiche von Nukleinsäuren seine Fluoreszenzquantenausbeute um mehr als zwei Größenordnungen erhöht. Dadurch können bei Bestrahlung mit UV-Licht Banden nachgewiesen werden, die einige wenige Nanogramm an doppelsträngiger Nukleinsäure enthalten. Das Verhältnis der Intensitäten der ribosomalen 18 S und 28 S RNA und auch deren Verhältnis zu niedermolekularen Komponenten waren ein Maß für die Intaktheit der isolierten RNA und ein Qualitätskriterium für vergleichende Analysen der Genexpression. Im Idealfall sollte das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der 18 S und 28 S rRNA zwischen 1:1,5 – 1:2,5 liegen.

3.4.4.1 TBE-Agarosegele

Für die Auftrennung der RNA wurden 0,8%ige Agarosegele angefertigt. Zur Herstellung eines 9 x 10 x 0,5 cm Gels benötigt man 45 ml ionenfreies Millipore-Wasser und 0,4 g Agarose (Invitrogen™, Life Technologie). Die Agarose wurde abgewogen und in einen Weithals-Erlenmeyerkolben durch Umschwenken so gut wie möglich in 45 ml Wasser suspendiert. Die Suspension wurde unter gelegentlichem Schwenken in der Mikrowelle erhitzt und solange aufgeköcht, bis eine klare, partikelfreie Lösung entstanden war. Dann wurde die Menge an verdampftem Wasser ersetzt. Der Erlenmeyerkolben wurde nach Zugabe eines Rührfisches auf einen Magnetrührer gestellt und bei niedriger Drehzahl so lange gerührt, bis die Agaroselösung etwa 60 °C erreicht hatte. Dann wurden 5 ml an 10x TBE-Puffer zugegeben, der 0,5 µg Ethidiumbromid pro ml enthielt. Nach Gießen der fertigen Gellösung in einen vorbereiteten Gelträger wurde ein Taschenformer für ~20 µl Taschenvolumen eingesetzt. Apparatur, Gelträger und Taschenformer waren zuvor gründlich mit 1%iger SDS-Lösung gereinigt worden. Nach Aushärten des Gels wurde der Taschenformer entfernt. Das Gel wurde samt Gelträger in die Elektrophoreseapparatur überführt und mit 250 ml eines ethidiumbromidhaltigen (0,5 µg/ml) 1x TBE-Puffers überschichtet. Pro Geltasche wurden 250 ng RNA mit einer entsprechenden Menge an RNA-Probenpuffer (1x HSE-Puffer) versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese der Nukleinsäuren erfolgte zunächst für 18 min bei einer Spannung von 3 V/cm und dann für

1,5 h bei 5 V/cm (Elektrodenabstand: 17 cm). Die Stromstärke wurde auf maximal 100 mA begrenzt. Als Kontrolle wurden sowohl der 100 bp Plus als auch der 1 kb DNA-Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel im INTAS PCI-Gel-Imager mit 254 nm UV-Licht bestrahlt. Die Fluoreszenz wurde mit einer Digitalkamera dokumentiert.

3.4.5 Erstellung von Expressionsprofilen nach dem Affymetrix Verfahren

Der eingesetzte bovine Affymetrix GeneChip™ enthielt ca. 24.000 *probe sets* von insgesamt 19.000 UniGene Clustern (bovine mRNAs). Jedes *probe set* besteht aus 22 verschiedenen Oligonukleotiden. Die Erfassung aller auf dem Chip abgebildeten mRNA-Spezies eines Gewebes erfolgt in einem mehrstufigen Prozess, der in Abbildung 4 dargestellt ist. Für den ersten Schritt gibt es zwei verschiedene kommerzielle Verfahren zur Herstellung biotinylierter cRNA. Die übrigen Schritte von der Hybridisierung bis zur Analyse der Ergebnisse erfolgen unabhängig von der Herstellung der Sonden.



Abbildung 4: Analyse der Genexpression nach dem Affymetrix-Verfahren
(<http://www.affymetrix.com/index.affx>, 2009)

Im ersten Schritt wird unter Verwendung eines Oligo(dT)-Primers aus der Gesamt-RNA cDNA synthetisiert. Diese wird anschließend in Gegenwart von biotinmarkierten Ribonukleotiden in cRNA umgeschrieben. Die so markierten cRNA Moleküle werden fragmentiert und mit dem GeneChip™ hybridisiert. Gebundene cRNA wird durch Umsetzung mit biotinbindenden und fluoreszierenden Molekülen markiert. Nach Abwaschen der überschüssigen Agenzien wird der Chip gescannt, ausgelesen und analysiert.

3.4.5.1 Herstellung biotinylierter cRNA

Die Herstellung von biotinylierter cRNA aus Gesamt-RNA erfolgte entweder mit dem One-cycle cDNA Synthesis und IVT Labeling Kit der Firma Affymetrix oder mit dem MessageAmp™ II-Biotin *Enhanced* Kit der Firma Ambion. Beide Methoden verwendeten dieselben enzymatischen Verfahren. Der Ablauf des Verfahrens ist in Abbildung 5 dargestellt.

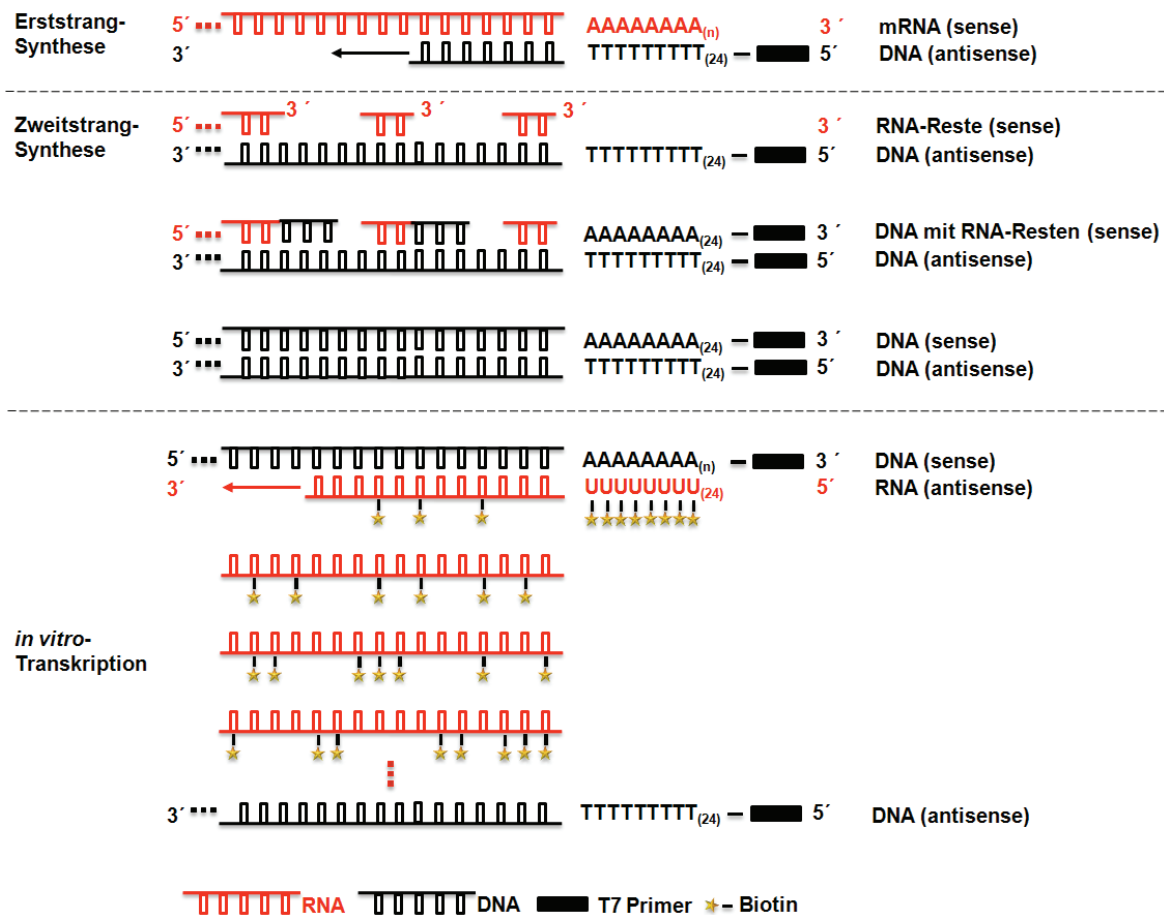


Abbildung 5: cDNA-Synthese und in vitro-Transkription – modifiziert nach Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/index.affx>, 2009)

In einer reversen Transkription wird zuerst der Erststrang der cDNA synthetisiert und im Anschluss daran mit Hilfe von DNA Polymerase und RNase H in einen Doppelstrang überführt. Danach erfolgt die Herstellung und Amplifizierung biotinylierter cRNA mit T7-RNA-Polymerase.

Ausgehend von Gesamt-RNA erfolgte zuerst die Synthese des Erststrangs mit einer reversen Transkriptase mit einem T7-Oligo(dT)-Primer. Der Aufbau des Zweitstrangs wurde durch RNase H ermöglicht und von der DNA-Polymerase I durchgeführt. Die doppelsträngige cDNA wurde gereinigt und in einer *in vitro*-Transkriptionsreaktion (IVT) eingesetzt. In dieser Reaktion erzeugte T7-RNA-Polymerase biotinylierte cRNA ausgehend vom T7-Promotor am 3'-Ende der cDNA. Da T7-RNA-Polymerase im Gegensatz zur DNA-Polymerase I nicht nur

eine Kopie pro DNA-Molekül erstellt, wird durch dieses Enzym die Ausbeute an biotinylierter cRNA erhöht.

Durchführung der cDNA-Synthese

Entsprechend der Tabelle 3 wurden alle notwendigen Komponenten zusammengegeben, gründlich durchmischt (Vortex) und nach einer kurzen Zentrifugation (10 s, Micro Centrifuge II) für 10 min bei 70 °C im Hybridisierungssofen (Fa. Kendro) inkubiert.

Tabelle 3: Vorbereiten der RNA für die Erststrangsynthese

Affymetrix		Ambion	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
Gesamt-RNA (10 µg)	7 µl	Gesamt-RNA (1 µg)	9 µl
Poly-A Kontrollen	2 µl	Poly-A Kontrollen	2 µl
T7-Oligo(dT)-Primer	2 µl	T7-Oligo(dT)-Primer	1 µl
Komponenten mischen und kurz zentrifugieren			
Denaturieren bei 70 °C	10 min	Denaturieren bei 70 °C	10 min
Abkühlen der Probe auf Eis und kurz zentrifugieren			

Während der Inkubation bei 70 °C wird der Mastermix angesetzt wie in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Synthese des Erststrangs der cDNA

Affymetrix		Ambion	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
5x Erststrang-Reaktionsmix	4 µl	10x Erststrang-Puffer	2 µl
dNTP (10 mM)	1 µl	dNTP Mix	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl	RNase Inhibitor	1 µl
		Array Script	1 µl
Erststrang-Mastermix	7 µl	Erststrang-Mastermix	8 µl
Komponenten mischen und kurz zentrifugieren			
RNA-Lösung zugeben (11 µl)		RNA-Lösung zugeben (12 µl)	
Synthese der cDNA bei 42 °C	1 h	Synthese der cDNA bei 42 °C	2 h
Super Script II (Zugabe nach 2 min bei 42 °C)	2 µl		
Abkühlen der Probe auf Eis und kurz zentrifugieren			

Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42 °C im Hybridisierungssofen (Affymetrix) bzw. im T3-Thermocycler (Ambion). Während dieser Zeit wurde der Zweitstrang-Mastermix wie in Tabelle 5 angesetzt.

Tabelle 5: Synthese des Zweitstrangs der cDNA

Affymetrix		Ambion	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
nukleasefreies Wasser	91 µl	nukleasefreies Wasser	63 µl
5x Zweitstrang-Reaktionsmix	30 µl	10x Zweitstrang Puffer	10 µl
dNTP (10 mM)	3 µl	dNTP Mix	4 µl
<i>E. coli</i> DNA Polymerase I	4 µl	DNA Polymerase	2 µl
RNase H	1 µl	RNase H	1 µl
<i>E. coli</i> Ligase	1 µl		
Zweitstrang-Mastermix	130 µl	Zweitstrang-Mastermix	80 µl
Komponenten mischen und kurz zentrifugieren			
Reaktionsansatz der Zweitstrangsynthese (20 µl) zugeben			
2 h bei 16 °C inkubieren			
T4-DNA-Polymerase	2 µl		
5 min bei 16 °C			
EDTA (0,5 M)	10 µl		

Nach Zugabe des Zweitstrang Mastermix zur cDNA Probe wurde der Ansatz vorsichtig auf dem Vortex (Stufe 3) gemischt, kurz zentrifugiert und bei 16 °C im Wasserbad (Affymetrix) bzw. im T3-Thermocycler (Ambion) inkubiert. Danach wurden ausschließlich bei der Affymetrix-Methode die Enden durch T4 Polymerase geglättet. Nach der Reaktion wurde die hergestellte doppelsträngige cDNA gereinigt.

Aufreinigung der cDNA

Die cDNA wurde entsprechend den Angaben in der Tabelle 6 gereinigt. Die Probe wurde zunächst mit Bindungspuffer vermischt und dann auf den Filtereinsatz einer Reinigungssäule („Spincolumn“) übertragen. Bei diesem Schritt wurde die cDNA an das Filtermaterial gebunden während alle anderen Komponenten in Lösung blieben und durch eine Zentrifugation abgetrennt werden konnten. Nach der Zentrifugation wurde der Durchlauf verworfen. Bei der Affymetrix-Methode wurde dieser Schritt aufgrund des großen Ansatzvolumens ein zweites Mal mit dem Rest der Probe durchgeführt. Reste des Reaktionsansatzes wurden durch Waschen mit Waschpuffer vom Filter entfernt. Danach wurde der Durchlauf verworfen und der Filtereinsatz zur vollständigen Entfernung restlicher Flüssigkeit mit offenem Deckel zentrifugiert. Der Filtereinsatz mit der gebundenen cDNA

wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die cDNA mit nukleasefreiem Wasser durch Zentrifugation eluiert. Beim Ambion-Verfahren wurde der Filtereinsatz zur Erhöhung der Ausbeute an cDNA ein zweites Mal mit Wasser eluiert. Nach Zentrifugation wurden ungefähr 12 µl (Affymetrix) bzw. 20 µl (Ambion) an cDNA-Lösung erhalten. Davon wurden 6 µl (Affymetrix) oder die gesamte gereinigte doppelsträngige cDNA (Ambion) in die *in vitro*-Transkription (IVT) eingesetzt.

Tabelle 6: Reinigen der hergestellten cDNA

Affymetrix		Ambion	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
Ansatz der cDNA-Synthese	162 µl	Ansatz der cDNA-Synthese	100 µl
Bindungspuffer	600 µl	Bindungspuffer	250 µl
Mischen und auf Spincolumn geben*		Mischen und auf Spincolumn geben	
Zentrifugieren für 1 min bei 8.000 g*		Zentrifugieren für 1 min bei 10.000 g	
Durchlauf verwerfen*		Durchlauf verwerfen	
750 µl Waschpuffer zur Spincolumn geben		500 µl Waschpuffer zur Spincolumn geben	
Zentrifugieren für 1 min bei 8.000 g		Zentrifugieren für 1 min bei 10.000 g	
Durchlauf verwerfen			
Zentrifugieren für 1 min bei 8.000 g		Zentrifugieren für 1 min bei 10.000 g	
Spincolumn in neues Gefäß überführen			
14 µl Elutionspuffer zugeben		13 µl Wasser (50-55 °C warm) zugeben	
1 min bei RT		2 min bei RT	
Zentrifugieren für 1 min bei 25.000 g		Zentrifugieren für 1,5 min bei 10.000 g	
		13 µl Wasser (50-55 °C warm) zugeben	
		Zentrifugieren für 1,5 min bei 10.000 g	
cDNA-Lösung	~12 µl	cDNA-Lösung	~12 µl

* Wegen des großen Ansatzvolumens wird dieser Schritt zweimal durchgeführt.

Durchführung der *in vitro*-Transkription zur Herstellung biotinylierter cRNA

Biotinylierte cRNA wurde wie in Tabelle 7 angegeben aus doppelsträngiger cDNA hergestellt. Der Probe wurde die entsprechende Menge an Mastermix zugesetzt und nach vorsichtigem Mischen und kurzem Zentrifugieren für 16 h (Affymetrix) bzw. 6 h (Ambion) bei 37 °C im Hybridisierungsofen inkubiert. Der Reaktionsansatz enthielt T7-RNA-Polymerase, die ausgehend vom T7-RNA-Promotor der cDNA biotinylierte cRNA synthetisierte. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 µl nukleasefreiem Wasser gestoppt. Danach wurde die erhaltene cRNA gereinigt.

Tabelle 7: Ansetzen des IVT-Mastermix für eine Reaktion

Affymetrix		Ambion	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
10x Markierungspuffer	4 µl	T7 10x Reaktionspuffer	12 µl
IVT dNTP Mix	12 µl	Biotin-NTP Mix	4 µl
IVT Enzym Mix	4 µl	T7 Enzym Mix	4 µl
nukleasefreies Wasser	14 µl		
IVT-Mastermix	34 µl	IVT-Mastermix	20 µl
Komponenten mischen und kurz zentrifugieren			
Eluat der gereinigten cDNA	6 µl	Eluat der gereinigten cDNA	20 µl
Komponenten mischen und kurz zentrifugieren			
16 h bei 37 °C inkubieren		6 h bei 37 °C inkubieren	

Aufreinigung der cRNA

Biotinylierte cRNA wurde wie in Tabelle 8 angegeben gereinigt. Dazu wurde die cRNA mit Bindungspuffer und Ethanol gemischt und auf den entsprechenden Filtereinsatz übertragen. Unter diesen Bedingungen wurde die cRNA an den Filter gebunden, während die übrigen Komponenten der IVT-Reaktion in Lösung blieben und durch Zentrifugation abgetrennt werden konnten. Verbliebene Reste des Reaktionsansatzes wurden durch Aufbringen von Waschpuffer und anschließende Zentrifugation entfernt. Beim Affymetrix-Verfahren wurde die gebundene cRNA nochmals mit Ethanol gewaschen. Nach vollständigem Trocknen des Filtereinsatzes durch Zentrifugation wurde die cRNA mit nukleasefreiem Wasser durch Zentrifugieren eluiert. Das Eluieren wurde beim Affymetrix-Verfahren wiederholt. Erhalten wurden ca. 20 µl (Affymetrix) bzw. ca. 100 µl (Ambion) an gelöster cRNA.

Tabelle 8: Reinigen der hergestellten biotinylierten cRNA

Affymetrix		Ambion	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
Ansatz der IVT-Reaktion	40 µl	Ansatz der IVT-Reaktion	40 µl
nukleasefreies Wasser	60 µl	nukleasefreies Wasser	60 µl
Bindungspuffer	350 µl	Bindungspuffer	350 µl
Mischen			
Ethanol (100%)	250 µl	Ethanol (100%)	250 µl
Mischen und auf Spincolumn geben			
Zentrifugieren für 15 s bei 8.000 g		Zentrifugieren für 1 min bei 10.000 g	
Durchlauf verwerfen			

MATERIAL UND METHODEN

Waschpuffer	500 µl	Waschpuffer	650 µl
Zentrifugieren für 15 s bei 8.000 g		Zentrifugieren für 1 min bei 10.000 g	
Durchlauf verwerfen			
Ethanol (80%)	500 µl		
Zentrifugieren für 15 s bei 8.000 g			
Durchlauf verwerfen			
Zentrifugieren für 5 min bei 25.000 g		Zentrifugieren für 1 min bei 10.000 g	
Spincolumn in neues Gefäß überführen			
11 µl Wasser zugeben		100 µl Wasser (50-60 °C warm) zugeben	
		2 min bei RT	
Zentrifugieren für 1 min bei 25.000 g		Zentrifugieren für 1,5 min bei 10.000 g	
11 µl Wasser zugeben			
Zentrifugieren für 1 min bei 25.000 g			
cRNA-Lösung	~20 µl	cRNA-Lösung	~100 µl

Die Ausbeute an cRNA wurde durch Vermessen von 1,5 µl der aufgereinigten cRNA am Nanodrop bestimmt. 250 ng der cRNA wurden zusätzlich mittels eines Agarosegels auf die Qualität hin getestet.

3.4.5.2 Fragmentierung der cRNA

Zur optimalen Hybridisierung der biotinylierten cRNA mit den komplementären Oligonukleotidsequenzen musste diese vorher fragmentiert werden. 15 µg cRNA wurde hierzu in einem Volumen von 24 µl mit 6 µl Fragmentierungspuffer versetzt und 35 Minuten bei einer Temperatur von 94 °C inkubiert. Dabei wurde die biotinylierte cRNA durch Mg²⁺-induzierte Hydrolyse in 35-200 Bp lange Stücke fragmentiert. Abschließend wurde die Länge der fragmentierten cRNA durch Agarosegel-Elektrophorese (2% Agarose in 1x TBE, 0,5 µg/ml EtBr) analysiert.

3.4.5.3 Hybridisierung

Zunächst wurde der Hybridisierungscocktail entsprechend den Angaben in Tabelle 9 angesetzt. Er wurde durch Vereinigen der Einzelkomponenten hergestellt und enthielt 10 µg fragmentierter cRNA, das Control-Oligo B2, Hybridization Controls sowie weitere Agenzien.

Tabelle 9: Ansetzen des Hybridisierungscocktails

Komponente	Menge
fragmentierte cRNA	X µl (10 µg)
60x Control Oligo B2, 3 nM	3,3 µl
20x Eukaryotic Hybridization Controls (<i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> , <i>cre</i>)	10 µl
2x Hybridization Mix	100 µl
DMSO	20 µl
nukleasefreies H ₂ O	X µl
Hybridisierungsmix	200 µl

Vor dem Befüllen wurden die gekühlt gelagerten Affymetrix GeneChips™ mindestens 30 min lang bei RT äquilibriert. Als erstes wurden die Arrays zum Absättigen unspezifischer Bindungen vorhybridisiert. Dazu wurden sie mit 200 µl Prehybridization-Mix gefüllt und im Hybridisierungssofen (GeneChip™ Hybridization Oven 640, Affymetrix) 10 min lang bei einer Drehzahl von 60 Upm und 45 °C inkubiert. Das manuelle Befüllen und Waschen der GeneChips™ erfolgte immer auf die gleiche Weise. Die Arrays wurden mit der beschrifteten Seite nach unten abgelegt. Dann wurde eine 200 µl Spitze in das obere Septum des Chips eingeführt (Abb. 6). Eine weitere 200 µl Spitze wurde auf eine Kolbenhubpipette aufgesteckt und mit der benötigten Menge an Lösung gefüllt. Nach Einführen der Spitze in das untere Septum wurde der GeneChip™ leicht schräg gehalten (Septum mit leerer Spitze zeigt nach oben). Dann wurde die Lösung langsam in den Reaktionsraum gefüllt wobei die verdrängte Luft über die Spitze im oberen Septum entwich. Nach dem Befüllen wurde das obere und untere Septum mit gelben runden Aufklebern abgedichtet.

In der Zwischenzeit wurde der Hybridisierungscocktail für 5 min bei 99 °C denaturiert, danach 5 min auf 45 °C abgekühlt und 5 min lang bei 25.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen ohne das Sediment zu verwirbeln. Der vorbereitete Hybridisierungscocktail wurde nach Entfernen des Prehybridization-Mix in den GeneChip™ gefüllt. Anschließend wurde für 16 Stunden bei 45 °C und 60 Upm hybridisiert. Danach wurde die Hybridisierungslösung entfernt und der Array mit 160 µl Waschpuffer A befüllt und bis zum Waschen und Färben im Kühlschrank aufbewahrt (maximal für 2 Stunden).

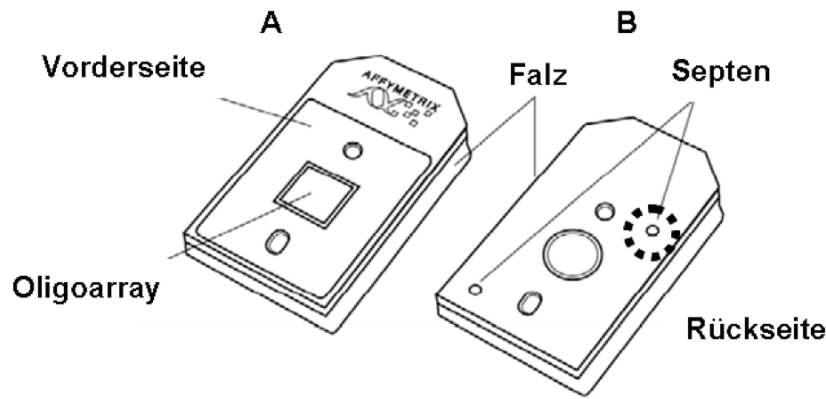


Abbildung 6: Aufbau eines Affymetrix GeneChips™

Auf der Vorderseite (A) des GeneChips™ befindet sich der Glasträger mit dem Oligoarray. Auf der Rückseite (B) sind zwei Septen zum Befüllen und Entleeren des GeneChips™.

3.4.5.4 Waschen und Färben

Der anschließende Wasch- und Färbeprozess (Tab. 10) erfolgte in einem automatischen Array-Waschmodul (GeneChip™ Fluidics Station 450; Affymetrix) mit dem entsprechenden Programm (FS450_0002) für diesen Arraytyp.

Tabelle 10: Wasch- und Färbeprotokoll FS450_0002

Schritt	Zyklus
Waschgang 1	10 Zyklen mit 2 Mischungen mit Waschpuffer A bei 30 °C
Waschgang 2	6 Zyklen mit 15 Mischungen mit Waschpuffer B bei 50 °C
Färbung 1	Färben für 5 min mit SAPE-Lösung bei 35 °C
Waschgang 3	10 Zyklen mit 4 Mischungen mit Waschpuffer A bei 30 °C
Färbung 2	Färben für 5 min mit Antikörper-Lösung bei 35 °C
Färbung 3	Färben für 5 min mit SAPE-Lösung bei 35 °C
Waschgang 4	15 Zyklen mit 4 Mischungen mit Waschpuffer A bei 35 °C und abschließender Dauertemperatur von 25 °C

Durch das Waschen (Waschgang 1 und 2) mit nicht stringenter Waschlösung (A) und mit stringenter Waschlösung (B) wurde die unspezifisch gebundene und überschüssige biotinylierte cRNA entfernt. Die übrige biotinylierte RNA wurde in einem mehrstufigen Verfahren mit Fluoreszenzfarbstoff versehen. In einem ersten Färbeschritt wurde Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) an die Biotin-Reste der cRNA gebunden. Nach erneutem Waschen wurden biotinylierte Anti-Streptavidin-Antikörper angelagert und zuletzt nochmals Streptavidin-Phycoerythrin. Dadurch wurde das ursprünglich durch Phycoerythrin erzeugte Fluoreszenzsignal verstärkt.

3.4.5.5 Scannen

Nach dem Waschen und Färben des Chips wurden die Intensitäten der Fluoreszenzsignale der Microarrays mit dem Affymetrix Scanner 3000 7G erfasst und als Bilddatei (DAT-File) gespeichert. An allen vier Seiten des verwendeten bovinen Array befinden sich Bereiche mit Oligonukleotiden, die komplementär zum zugesetzten Oligo B2 sind. Dadurch wird ein Schachbrettmuster von Signalen erzeugt, das als Koordinatensystem zur Orientierung und Zuordnung der Messwerte dient. Aus den primären Messdaten mit einer Vielzahl von Pixeln pro Oligonukleotid wird ein CEL-File erzeugt, das für jedes Oligo den Durchschnitt aller erfassten Messpunkte enthält. Jede mRNA wird auf dem Array mit mindestens 22 Oligonukleotiden abgebildet. Der Kondensierungsalgorithmus (Microarray Analysis Suite V5.0; MASV5.0) fasst für jede mRNA alle Einzelwerte seiner 22 Oligonukleotide zusammen und legt den errechneten Wert als CHP-File ab. Qualitätskriterien und andere Eigenschaften eines Experiments werden in einer Berichtsdatei (RPT-File) zusammengefasst.

3.4.6 Statistische und Bioinformatische Auswertung

Die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen (*standard error of mean*, SEM) sowie die Erstellung von Graphiken wurden unter anderen mit dem Excel-Programm durchgeführt.

Programme zum Auswerten von Expressionsdaten gibt es als eigenständige Programme oder auch als Erweiterung für Microsoft Excel. Für die Auswertung der Affymetrix-Experimente wurde sowohl das frei verfügbare Statistik-Softwarepaket R (<http://www.r-project.org/>, 2009) mit den Erweiterungspaketen des Bioconductor-Projekts (<http://www.bioconductor.org/>, 2009) als auch das Excel Add-in SAM (Significance Analysis of Microarrays (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>, 2009; Tusher et al., 2001)) genutzt.

Bei R handelt es sich um eine freie Software-Umgebung für statistische Berechnungen und Visualisierungen, welche für die vorliegende Auswertung in Version 2.8.0 verwendet wurde. Im Bereich der Microarray-Analyse gehört R zu den Standardwerkzeugen, das über zeilenweise Eingabe von Befehlen in ein R-Terminalfenster gesteuert wird.

Für die standardmäßige Auswertung der Microarray-Experimente wurden die Bioconductor-Pakete *affy*, *affyPLM*, *genefilter*, *IDPmisc* und *limma* benutzt. Das *affy*-Paket bietet Methoden zum Einlesen von CEL-Files, zur Normalisierung der eingelesenen Daten aller zu vergleichenden Datensätze als Voraussetzung zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene und zur primären Qualitätskontrolle. Die Qualität der Proben und der Hybridisierung wurde basierend auf den „*perfect match*“ Intensitätsverteilungen mit Hilfe von Histogrammen, 5'-3'-RNA-Degradationsplots oder Boxplots überprüft. Die Normalisierung der Rohdaten der einzelnen Microarrays erfolgte mit dem RMA-Algorithmus (Robust Multiarray Average). Differenziell exprimierte Gene wurden mit Hilfe des *limma*-Pakets (Smyth, 2004) oder der SAM-Software V3.0 identifiziert. Im Anhang dieser Arbeit ist ein R-Script, welches zur

statistischen und bioinformatischen Auswertung der Microarrayexperimente eingesetzt wurde, aufgeführt.

3.4.6.1 Ermittlung differentiell exprimierter Gene

Die einfachste Methode zur Ermittlung differentiell exprimierter Gene ist der Vergleich des Quotienten der logarithmierten Expressionswerte der *probe sets* zweier Gruppen mit einem vorgegebenen Schwellenwert. Alle Werte, deren Quotient den Schwellenwert überschreitet, werden als differentiell exprimiert erklärt. Verbreitet ist die sogenannte Fold Change-Methode: Sie besagt, dass eine Erhöhung auf mehr als das Doppelte gegenüber der Kontrolle als überexprimiert, eine Erniedrigung auf weniger als die Hälfte als unterexprimiert gilt. Diese Methode hat allerdings den Nachteil, dass sie die Varianz der Expressionswerte der Proben einer Gruppe ignoriert und den detektierten Genen auch kein statistisches Konfidenzmaß zuordnet. Eine Alternative besteht darin, für jedes Gen einer Messreihe einen statistischen t-Test auf den Unterschied der Mittelwerte der Expressionswerte verschiedener Gruppen durchzuführen (Björn, 2004). Werden allerdings viele Einzeltests durchgeführt, wie es etwa bei der Auswertung von Microarray-Daten notwendig ist, steigt die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse. Die sogenannte Bonferroni-Korrektur ist eine einfache Möglichkeit, diesem Problem des multiplen Testens entgegenzutreten, indem die *family-wise-error-rate* (FWER), also die Wahrscheinlichkeit kontrolliert wird, dass mindestens ein falsch positives identifiziertes Gen vorkommt.

Allerdings ist die Kontrolle der FWER, wie sie z.B. bei *limma* angewandt wird, nur in solchen Fällen angebracht, in denen nur wenige Gene als differentiell exprimiert identifiziert werden sollen, da die statistische Mächtigkeit eines Testes durch die Bonferroni-Korrektur stark eingeschränkt wird. Eine Lösung dieses Problems bietet sich mit der Kontrolle der sogenannten *false-discovery-rate* (FDR, Anteil falsch positiv detektierter Gene unter allen differentiell exprimierten Genen), die praktische Anwendung bei der Detektion differentiell exprimierter Gene mittels SAM-Methode findet.

3.4.6.2 Ermittlung differentiell exprimierter Gene durch Limma

Zur Bestimmung differenziell exprimierter Gene zwischen zwei Experimenten wurde das *limma*-Paket in R eingesetzt. Die *limma*-Analyse basiert auf einer Implementierung des Empirischen-Bayes-Ansatzes von Gordon Smyth (Smyth, 2004; Smyth et al., 2005). Diese Methode wird auch als moderierter t-Test bezeichnet und verwendet Informationen mehrerer *probe sets* eines Experiments zur Berechnung der Varianzen. *Limma* ist selbst für die stabile Analyse von Experimenten mit geringer Probenanzahl geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurden mehr als zweifache Unterschiede in der Genexpression (Log_2 Fold Change ≥ 1) und ein korrigierter p-Wert $< 0,01$ als signifikant angesehen.

3.4.6.3 Ermittlung differentiell exprimierter Gene durch SAM

Bei SAM (Significance Analysis of Microarrays) handelt es sich um eine an der Stanford Universität entwickelte Software, welche die Signifikanz von differentiell exprimierten Genen ermittelt (Tusher et al., 2001). Dieser Algorithmus basiert auf einer modifizierten t-Test Statistik und umfasst Permutationsanalysen zur Bewertung der statistischen Signifikanz. Alle Daten wurden unter Verwendung des Zwei-Klassen-Modus für zwei ungepaarte Gruppen von Microarrayexperimenten über 100 Zyklen permutiert. Als Schwellenwert für die Signifikanz wurde durch Einstellung des Parameters Delta eine FDR (false discovery rate) von 10% festgelegt. Der Wert für die Signifikanz des Expressionsunterschiedes eines Gens wurde durch den q-Wert ausgedrückt (kleinste FDR, bei der ein Gen als signifikant unterschiedlich exprimiert betrachtet wird). Signifikante Unterschiede in der Genexpression einzelner Gene wurden durch einen q-Wert $< 10\%$ definiert.

Die Annotation der *probe sets* der GeneChips™ erfolgte mit Hilfe einer Liste, die basierend auf bioinformatischen Methoden wie z.B. dem *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) im Rahmen einer Masterarbeit erstellt wurde (Hintermair, 2007). Neben den Rind-spezifischen Informationen enthielt diese auch Informationen über orthologe humane Gene. Für alle bioinformatischen Analysen wurden *Human Entrez Gene IDs* verwendet.

3.4.6.4 GO Analyse

Mit einer GO-Analyse wurde untersucht, zu welchen Genontologie-Kategorien die gefundenen differentiell exprimierten Gene gehören. Das Programm bestimmte zunächst, wie oft eine bestimmte Ontologie in einer entsprechend großen Anzahl beliebig ausgewählter Gene vorkommen dürfte und glich diesen Erwartungswert mit den ermittelten Werten für die ausgewählten Kandidatengene ab. Ontologien, denen mehr Gene als statistisch erwartet zugeordnet wurden, wurden als angereichert bezeichnet. Die Analyse lieferte damit einen Hinweis, an welchen Prozessen die untersuchten Kandidatengene beteiligt sind. Die Ontologien wurden im Rahmen des Gene Ontology Consortiums 1998 (2001; 2006; Ashburner et al., 2000) entwickelt und legten den Grundstein für eine standardisierte und strukturierte Beschreibung von Eigenschaften und Funktionen von Genen. GO bietet eine Einteilung der Gene in drei Ontologien: „Biologische Prozesse“, „Molekulare Funktion“ und „Zelluläre Komponente“, die jeweils in verschiedene Ebenen unterteilt sind. Die Ontologie „Molekulare Funktionen“ beschreibt die Aktivität von Genprodukten auf molekularer Ebene (z.B. Katalyse, Bindung, Transport, etc.). Mit dem „Biologischen Prozess“ wird ein zielgerichteter biologischer Vorgang beschrieben, an dem ein Genprodukt beteiligt ist. Über die Zelluläre Komponente wird ein Genprodukt einem funktionellen Kompartiment (morphologische Struktur oder makromolekularer Komplex) innerhalb der Zelle zugeordnet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Genlisten bezüglich der beiden Ontologien „Biologische Prozesse“ und „Molekulare Funktion“ ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl der Versuchstiere und experimentelle Infektion mit *E. coli* 1303

Für die Untersuchung der Auswirkung von *E. coli* 1303 auf das Transkriptom des Milchdrüsengewebes wurden insgesamt 15 hochlaktierende Milchkühe benötigt, die nach strengen Kriterien ausgewählt worden waren. Als Ausschlusskriterium für die Eutergesundheit wurde die Anzahl der somatischen Zellen in der Milch herangezogen. Tiere, die im Zeitraum von 2 Wochen vor Versuchsbeginn mehr als 50.000 somatische Zellen pro Milliliter in mehr als einem Euterviertel aufwiesen, wurden ausgeschlossen. Die Geburt des ersten Kalbes musste mindestens 3 Monate und längstens 6 Monate zurückliegen. Die ausgewählten Milchkühe wurden durch Hormonbehandlung im Zyklus synchronisiert und in 3 Gruppen von je 5 Versuchstieren (Abb. 7) eingeteilt.

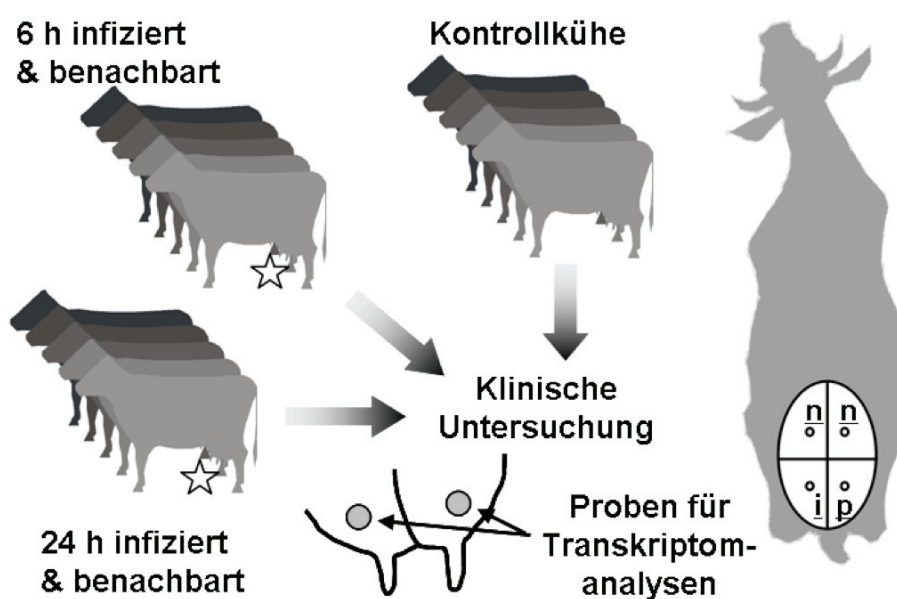


Abbildung 7: Einteilung der Versuchstiere für die experimentelle Infektion mit *E. coli* 1303

Je ein Euterviertel von zehn Versuchstieren wurde mit je 500 KbE *E. coli* 1303 (i, Stern) oder mit der entsprechenden Menge an isotonischer Kochsalzlösung (p) infundiert. Zwei Euterviertel blieben unbehandelt (n). Während des Versuchs wurden die Anzahl der somatischen Zellen in der Milch und die Körpertemperatur bestimmt. Fünf der infizierten Tiere wurden 6 Stunden später geschlachtet, die restlichen 5 Tiere 24 Stunden nach der Infektion. Weitere 5 gesunde Milchkühe wurden 24 h nach Beginn des Versuchs geschlachtet. Aus jedem der Euterviertel aller 15 Tiere wurden Proben des Milchdrüsengewebes entnommen (grauer Kreis) und sofort nach der Entnahme mittels RNAlater™ für Expressionsanalysen konserviert.

Zwei Gruppen á 5 Tiere wurden mit *E. coli* 1303 infiziert. Dazu wurden 500 KbE des Pathogens in ein Euterviertel jedes Tieres infundiert (i). In ein weiteres Euterviertel wurde die entsprechende Menge an physiologischer Kochsalzlösung als Placebo (p) injiziert. Die beiden verbleibenden Euterviertel wurden nicht behandelt und dienten als tierinterne Kontrollen (n).

Zur Kontrolle des Infektionsverlaufs wurde in regelmäßigen Abständen während des gesamten Versuchszeitraums die Körpertemperatur gemessen und die Anzahl der somatischen Zellen in der Milch bestimmt. Je fünf infizierte Tiere wurden 6 h nach der Infektion getötet, die restlichen fünf 24 h nach Infektion. Fünf weitere Milchkühe wurden ohne Behandlung der Euter (c) 24 h nach Beginn des Versuchs getötet. Aus dem Euter der getöteten Tiere wurden Proben des Milchdrüsengewebes entnommen und in RNAlater™ konserviert.

4.1.1 Klinische Befunde

Als Maß für den Verlauf der Infektion mit *E. coli* 1303 wurden Parameter wie Körpertemperatur, Blutleukozytenzahl, Gehalt an somatischen Zellen in der Milch und Milchleistung von allen infizierten und nicht-infizierten Tieren erfasst. Diese Daten wurden zumindest am Beginn (0 h) und am Ende des Versuches (nach 6 h oder 24 h) sowie beim Melken nach 12 h erhoben.

Die Körpertemperatur der nicht-infizierten Kontrolltiere war über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg konstant und lag bei $38,3 \pm 0,08$ °C (Abb. 8 A). Die Milchleistung betrug zu jeder Melkzeit (alle 12 h) durchschnittlich $3,4 \pm 0,1$ Liter pro Euterviertel. Die Sekretbeschaffenheit der Milch wies keine pathologischen Veränderungen auf.

Nach Infektion eines Euterviertels mit 500 KbE *E. coli* zeigten alle Versuchstiere folgende Symptome einer klinischen Mastitis: Hyperthermie (Fieber), Leukopenie, Zellzahlenanstieg in der Milch der infizierten Viertel mit gleichzeitigem Anstieg des Anteils der polymorphkernigen Leukozyten (PMN), Milchleistungsabfall (Abb. 8), Euterschwellung (Unterhautödem) und Änderungen der Milchzusammensetzung. Bei allen Tieren wurden in ihrer Ausprägung vergleichbare Symptome beobachtet, die frühestens 9 Stunden nach der Infektion einsetzten. Das Testen der Viertelanfangsgemelksproben auf das Vorhandensein von *E. coli* Bakterien ergab bei allen inokulierten Vierteln bakteriologisch positive Befunde während die benachbarten Viertel und alle Viertel der nicht-infizierten Kontrolltiere negativ waren. Die innere Körpertemperatur der infizierten Tiere wurde zumindest alle 3 Stunden rektal ermittelt. Sie stieg nach 9 h auf $38,8 \pm 0,44$ °C an (Fiebergrenze bei 39,2 °C) und erreichte 15 h nach der Infektion ein Maximum ($41,1 \pm 0,47$ °C). 18 h nach der Infektion fiel die Temperatur auf $39,1 \pm 0,91$ °C (Abb. 8 A) und war 24 h nach der Infektion nur noch geringfügig höher als bei den nicht-infizierten Kontrolltieren.

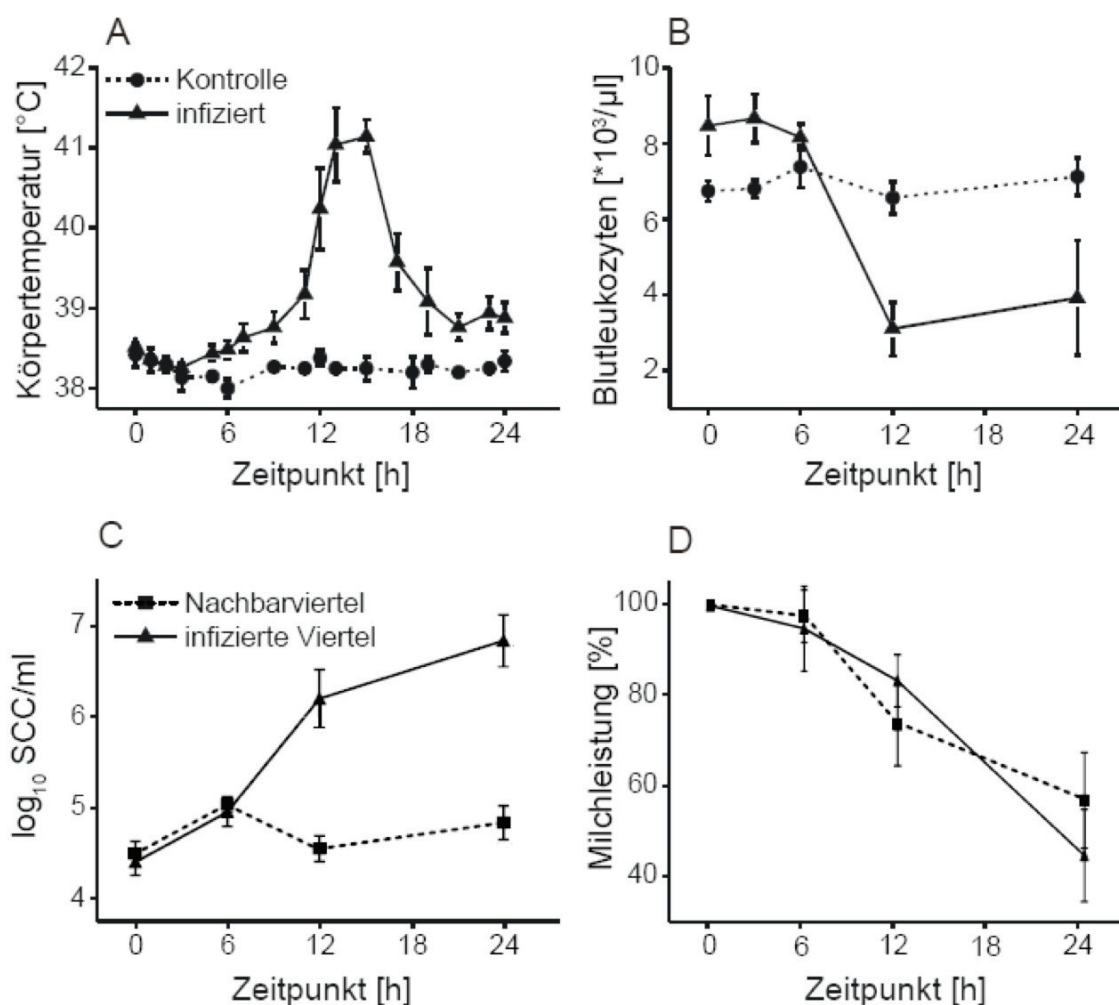


Abbildung 8: Klinische Befunde nach experimentell induzierter Mastitis

Je ein Euterviertel von fünf Tieren wurde mit 500 KbE *E. coli* 1303 infiziert. Im Abstand von ca. 3 h wurde die Körpertemperatur aller Tiere rektal gemessen (A) und gleichzeitig wurden Blutproben zur Bestimmung der Leukozyten (B) entnommen. An fünf nicht-infizierten gesunden Tieren wurden die selben Untersuchungen durchgeführt. Alle Tiere wurden zum Zeitpunkt 0 h, 12 h und 24 h gemolken. Anhand der Milchproben wurden die Anzahl der somatischen Zellen in der Milch (C) sowie der prozentuale Rückgang der Milchleistung (D) der infizierten Tiere bestimmt.

Die Bestimmung der Leukozyten im Blut der Tiere ergab, dass die Konzentration der Leukozyten 12 h nach der Infektion auf 38% des ursprünglichen Wertes abgefallen war (Abb. 8 B). Gleichzeitig stieg die Konzentration der somatischen Zellen in der Milch um etwa zwei Größenordnungen an (Abb. 8 C). Zu diesem Zeitpunkt waren die infizierten Euterviertel hochgradig geschwollen und ihr Milchsekret war wässrig flockig. Die Viertelgemelksleistung fiel innerhalb von 12 h nach der Infektion in allen Eutervierteln der infizierten Tiere auf rund 80% ab und weitere 12 h später auf etwa 50% der Ausgangsmilchleistung (Abb. 8 D).

Gleichzeitig veränderte sich das Differentialzellbild der Milch durch einen steigenden Anteil der neutrophilen Granulozyten (PMN). In den benachbarten nicht-infizierten Eutervierteln stieg der Anteil der PMNs ebenfalls an, während die Konzentration der lymphoiden Zellen (LYM) und nicht näher differenzierter Zellen (Sonstige = Makrophagen und Epithelzellen) abnahm, so dass sich die Gesamtzahl der somatischen Zellen nicht wesentlich veränderte (Abb. 9).

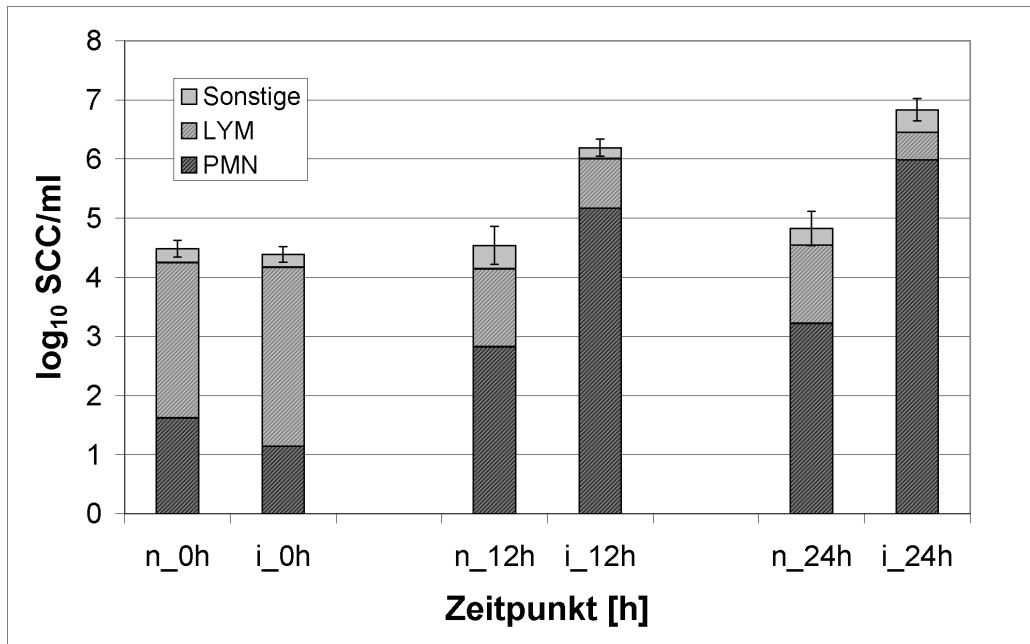


Abbildung 9: Einfluss einer experimentellen Infektion mit *E. coli* 1303 auf ausgesuchte Parameter des Differentialzellbildes in der Milch

Ein Euterviertel von fünf Tieren wurde mit 500 KfE *E. coli* 1303 infiziert. Unmittelbar vor der Infektion (0 h), 12 h und 24 h später wurden sowohl die infizierten Euterviertel (i) als auch die benachbarten nicht-infizierten Viertel (n) gemolken. Von allen Milchproben wurde der Gehalt an polymorphkernigen Neutrophilen (PMN), Lymphozyten (LYM) und sonstigen somatischen Zellen bestimmt. Die Messungen wurden von Kooperationspartnern an der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt (Meyer, 2008).

4.2 Isolierung und Analyse der Gesamt-RNA

Für vergleichende Analysen der Genexpression wurde Gesamt-RNA zur Erstellung von Expressionsprofilen benötigt. Deshalb wurde zunächst Gesamt-RNA nach dem TRIzol™-Protokoll aus den bovinen Eutergewebsproben isoliert und durch Fällung mit Ammoniumacetat gereinigt. Die Ausbeute und Reinheit an RNA als auch deren Qualität wurde mit Hilfe des Nanodrop-Photometers bestimmt bzw. durch Agarosegelelektrophorese ermittelt. Die isolierte RNA wies ein Verhältnis der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm (OD 260/280) von 1,9-2,1 bzw. eine OD 260/230 von über 2,2 auf. Dies entspricht

den Werten einer sehr reinen RNA, da Verunreinigungen wie Proteine, Salze und andere Lösungsmittel bei 230 nm oder 280 nm absorbieren. Abbildung 10 zeigt typische Absorptionskurven der isolierten Gesamt-RNA. Die Messkurven erreichen ihren Maximalwert bei 260 nm und zeigen sehr niedrige Extinktionswerte bei 230 nm. Diese Ergebnisse belegen die hohe Reinheit der untersuchten RNA. Die Ausbeute pro 100 mg Gewebe betrug ca. 250 µg Gesamt-RNA.

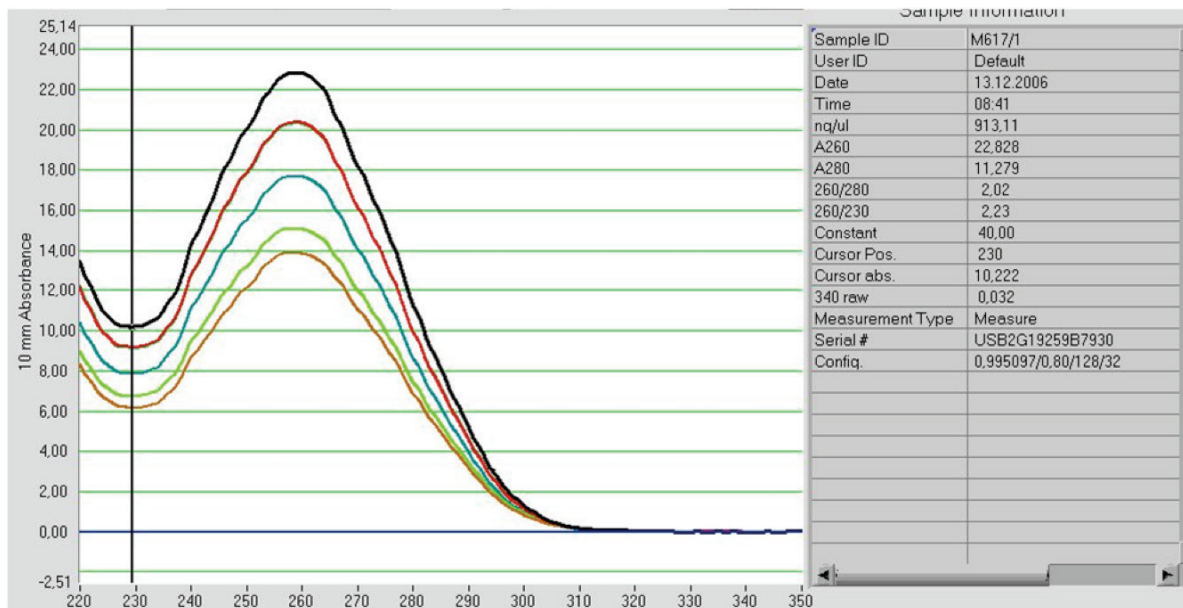


Abbildung 10: Absorptionsspektren der Gesamt-RNA aus Eutergewebsproben

Aus Milchdrüsenngewebe von 5 verschiedenen Tieren wurde Gesamt-RNA isoliert. Am Nanodrop Photometer wurde ausgehend von einem 1,5 µl Aliquot der Präparation ein Absorptionsspektrum zwischen 220 und 350 nm erstellt (Graphik links). Die Messwerte für eine Probe sind in der Tabelle auf der rechten Seite angegeben.

Die erhaltenen UV-Spektren wiesen zwar auf eine hohe Reinheit der isolierten Gesamt-RNA hin, ermöglichten jedoch keine Aussage darüber ob die isolierten RNA-Stränge intakt oder z.B. durch RNasen abgebaut worden waren. Deshalb wurde die präparierte RNA aller Proben durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Abbildung 11 zeigt das typische Ergebnis einer Analyse von Gesamt-RNA. In den Spuren eins bis acht sind jeweils zwei starke definierte Banden zu sehen, die im Vergleich mit dem doppelsträngigen Molekulargewichtstandard (m) bei ca. 800 und 1400 Bp aufgetrennt werden. Diese Banden entsprechen der ribosomalen 18 S und 28 S RNA. Die diskrete Form dieser Banden ist ein Beweis für die Unversehrtheit dieser RNA. Das Verhältnis der Bandenintensitäten 18 S zu 28 S rRNA liegt annähernd im Bereich von 1:1,5 – 1:2,5. Das Fehlen einer Bande oberhalb von 10 kBp (M) weist darauf hin, dass die Präparationen keine nachweisbaren Mengen an genomischer DNA enthielten. Bei genauer Betrachtung ist in jeder Spur eine schwache

Färbung zu erkennen, die sich über einen großen Molekulargewichtsbereich erstreckt und auf mRNA zurückzuführen ist. Die intakte 18 S und 28 S rRNA sowie das Fehlen von Abbauprodukten im Bereich von 100 Bp (des Standards m) sind ein guter Hinweis auf die hohe Qualität der isolierten RNA.

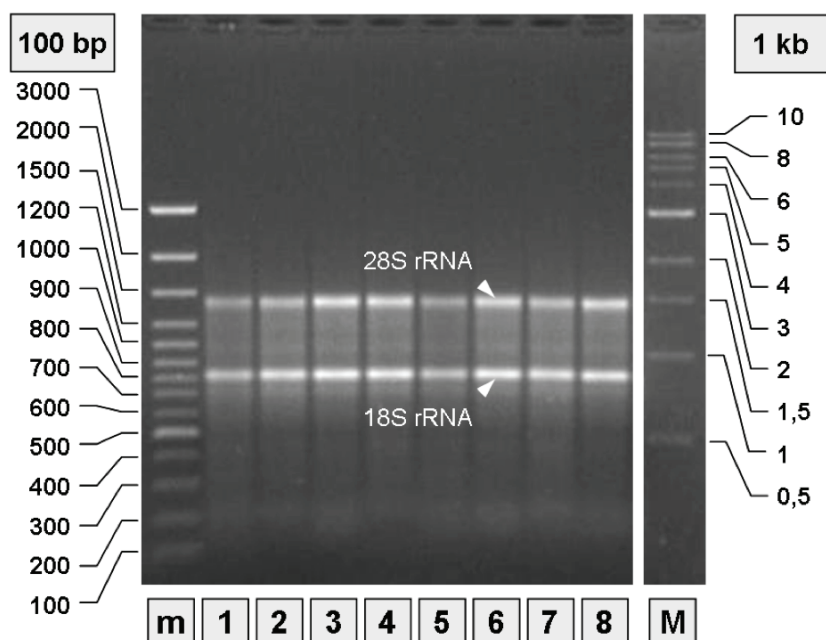


Abbildung 11: Agarosegelbild der Gesamt-RNA aus Eutergewebsproben

250 ng Gesamt-RNA aus 8 verschiedenen Eutergewebsproben (1-8) wurden auf einem 0,8%igen Agarosegel in Gegenwart von Ethidiumbromid aufgetrennt und durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Als Längenstandard dienten der 100 bp Plus- (m) sowie der 1 kb DNA Ladder (M). Die Lage der 28 S rRNA und 18 S rRNA ist durch Pfeile gekennzeichnet.

4.3 Herstellung und Kontrolle von biotinylierter cRNA

Für die Hybridisierung der Affymetrix GeneChips™ wird fragmentierte biotinylierte cRNA benötigt, die aus isolierter Gesamt-RNA hergestellt wurde. Dazu wurde entweder das Verfahren von Affymetrix oder das von Ambion verwendet. Als wichtige Voraussetzung für aussagekräftige Ergebnisse bei Analysen des Transkriptoms mussten diese cRNAs unter weitestgehend identischen Bedingungen hergestellt werden, um unspezifische Schwankungen in den Expressionsprofilen zu vermeiden. Deshalb wurden bei allen Schritten der Herstellung der cRNA Qualitätskontrollen durchgeführt. Die Abbildung 12 A zeigt das Ergebnis einer Analyse von 8 verschiedenen cRNAs durch Elektrophorese auf einem 0,8%igen Agarosegel. Die cRNAs wurden entsprechend dem Affymetrix-Protokoll hergestellt. Ein Vergleich mit dem doppelsträngigen Standard zeigt unter Berücksichtigung der Auftrennung in Abbildung 11, dass die biotinylierten cRNAs zwischen einigen hundert und

mehreren tausend Basen lang sind. Auf Höhe der 650 Bp- und 750 Bp-Bande sind zwei intensive Banden sichtbar. Solche Banden weisen auf mRNA Spezies hin, die im Milchdrüsengewebe sehr stark exprimiert sind und in entsprechend hoher Kopienzahl vorkommen. Die relativ gleichförmige Verteilung der Produkte in allen untersuchten Proben belegt die Reproduzierbarkeit der cRNA-Synthesen. Zur Erhöhung der Effizienz der Hybridisierung wurde die biotinylierte cRNA mit Mg^{2+} -Ionen fragmentiert und auf einem speziellen hochauflösenden 2%igen Agarosegel analysiert (Abb. 12 B). Nach der Fragmentierung wandert der überwiegende Teil der erhaltenen cRNA-Moleküle schneller als die unterste, 72 Bp lange Bande des Standards. Im oberen Trennbereich ist noch eine schwache Doppelbande erkennbar, die möglicherweise von der prominenten Bande in der unfragmentierten cRNA übrig geblieben ist (Abb. 12 A). Zusammenfassend belegt diese Analyse die reproduzierbare Durchführung der Synthese und Fragmentierung von biotinylierter cRNA.

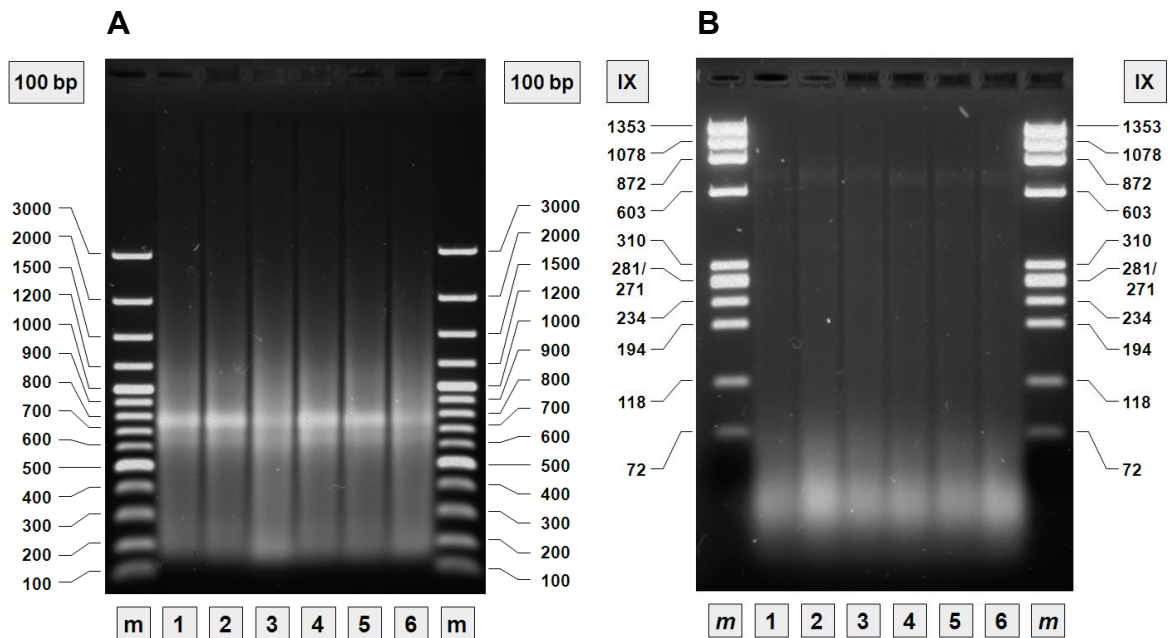


Abbildung 12: Agarosegelbilder biotinylierter cRNA vor und nach der Fragmentierung

Aliquote von 250 ng cRNA aus 6 verschiedenen Präparationen (1-6) wurden auf einem 0,8%igen Agarosegel (A) oder einem 2%igen Small-DNA-Agarosegel (B) in Gegenwart von Ethidiumbromid aufgetrennt und unter Bestrahlung mit UV-Licht dokumentiert. Als Längenstandard wurde der 100 bp Plus DNA Ladder (m, 100 bp) oder DNA-Standard IX (m, IX) eingesetzt. A: 250 ng cRNA direkt nach *in vitro*-Transkription B: 250 ng Aliquote der cRNA (A) nach Fragmentierung durch Mg^{2+} -Ionen.

4.4 Analyse der Genexpression von Milchdrüsengewebe nach experimenteller Infektion mit *E. coli* 1303

Die hergestellten fragmentierten cRNAs wurden zur Hybridisierung von GeneChips™ eingesetzt. Die verwendeten bovinen Genome Arrays enthalten etwa 24.000 probe sets und

können dadurch die Expression von etwa 23.000 Transkripten bzw. 19.000 UniGene Clustern erfassen. Mit Hilfe dieser GeneChips™ wurde untersucht, welchen Einfluss die Infektion eines Euterviertels mit *E. coli* 1303 auf die Genexpression des Milchdrüsenparenchyms in der frühen Phase (6 h) und der späten Phase (24 h) der Infektion hat. Dazu wurden Transkriptionsprofile von Gewebeproben aus dem distalen Milchdrüsenparenchym von hochlaktierenden Kühen erstellt. Die Gewebeproben wurden aus infizierten (i) und den benachbarten nicht-infizierten Eutervierteln (n) gewonnen. Zudem wurden auch Proben aus Eutervierteln untersucht, in welche Injektionslösung ohne *E. coli* infundiert worden war (Plazebo-Viertel, p). In die Analysen wurden auch Gewebeproben einbezogen, die aus Eutervierteln von gesunden, nicht-infizierten Tieren gewonnen worden waren und die als externe Referenz (c) dienten. Die Vorbereitung der Kontrolltiere erfolgte gleich jener der infizierten Tiere, sie wurden lediglich 24 h nach Beginn des Versuches geschlachtet. Durch einen Vergleich mit Proben aus gesunden Tieren sollten mögliche systemische Effekte erfasst werden, die infizierte und nicht-infizierte Euterviertel eines Tieres gleichermaßen betreffen.

4.4.1 Untersuchung der frühen Phase der Infektion

Der Einfluss von *E. coli* auf das Transkriptom des Milchdrüsenparenchyms in der frühen Phase der Infektion wurde an Gewebeproben aus folgenden Eutervierteln untersucht: aus infizierten Eutervierteln (i6 h), aus benachbarten nicht-infizierten Plazebovierteln (p6 h) derselben Tiere und aus gesunden Eutervierteln gesunder Tiere (c24 h). Dazu wurde aus den Gewebeproben von jeweils 5 Tieren Gesamt-RNA isoliert und entsprechend dem Affymetrix-Verfahren zur Herstellung von biotinylierter cRNA eingesetzt. Die Hybridisierung mit Bovine GeneChips™ wurde in zwei Ansätzen durchgeführt. In einem ersten wurden die Proben i6 h und p6 h eingesetzt, in einem zweiten die Proben i6 h und c24 h.

Nach der Hybridisierung wurden die Expressionsprofile mit dem Affymetrix-Scanner erfasst und mit Hilfe des RMA-Algorithmus normalisiert. Die Abbildung 13 (A und B) zeigt die Verteilung der Expressionswerte vor (A) und nach der Normalisierung (B). Die Lage des eingerahmten rot eingefärbten Bereichs (A) zeigt, dass sich die Häufigkeitsverteilung der Expressionswerte in allen Proben unterscheidet. Nach der Normalisierung (B) ist der umrahmte gelb gefärbte Bereich in allen Proben annähernd gleich groß und umfasst auch weitgehend denselben Expressionsbereich. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Häufigkeitsverteilungen in den Expressionsprofilen durch Normalisierung mit RMA aneinander angeglichen werden konnten.

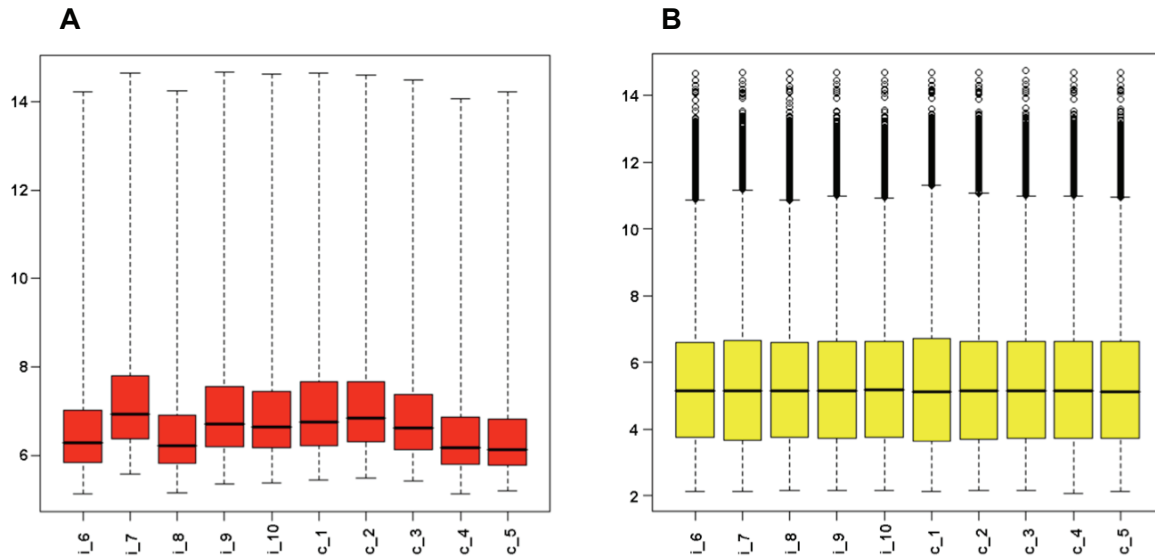


Abbildung 13: Boxplots der Log_2 -Expressionswerte der Rohdaten (A) und der RMA normalisierten Daten (B) im Vergleich

Gewebeproben wurden 6 h nach der Infektion mit *E. coli* 1303 aus infizierten Eutervierteln von fünf Tieren gewonnen (*i*_6 bis *i*_10) oder aus den Eutervierteln gesunder Tiere (*c*_1 bis *c*_5). Nach Herstellung biotinylierter cRNA wurde diese mit bovinen Affymetrix GeneChips™ hybridisiert und die erhaltenen Signale ausgelesen. Die so ermittelten Expressionsdaten sind als Boxplot vor (A) und nach der Normalisierung durch RMA (B) angezeigt. Die gestrichelte Linie gibt jeweils den Umfang der gemessenen Signalintensitäten wieder. Der rot/gelb gefärbte Rahmen umfasst 50% der Daten („mittlere Hälfte“) und die fettgedruckte Linie im Rahmen gibt den Median an. Der Rahmen zeigt somit an, wo das obere und untere Quartil der Expressionswerte beginnt. Datenwerte oberhalb der gestrichelten Linie (B) werden als Ausreißer angesehen.

Vergleich der Expressionsprofile durch Clusteranalysen

Nach der Normalisierung wurden mit dem Programm MAS5 Detektions-p-Werte für alle *probe sets* berechnet. Durch Anwendung eines Datenfilters wurden alle Datensätze mit nicht-signifikanten Detektions-p-Werten entfernt und somit nur jene ausgewählt, die im untersuchten Milchdrüsengewebe exprimiert waren. Diese werden als „*present probe sets*“ bezeichnet. In einem ersten Schritt wurden mit diesen Datensätzen hierarchische Clusteranalysen durchgeführt. Dieses Verfahren vergleicht Expressionsmuster und ordnet sie nach Ähnlichkeit zueinander in Cluster ein. Das Ergebnis ist in der Abbildung 14 als Heatmap dargestellt. Beim Vergleich der Expressionsprofile *i*_6 bis *i*_10 (infiziertes Viertel, 6 h nach Infektion) mit *p*_6 bis *p*_10 (nicht-infiziertes Plazebo-Viertel, selbes Tier, 6 h nach der Infektion) (Abb. 14 A) werden mit Ausnahme des Tieres 7 die Expressionsmuster aus infiziertem und schein-infiziertem Euterviertel desselben Tieres je einer Zweiergruppe zugeordnet. Die Kürze der Äste der Baumstruktur zwischen den errechneten Gruppen deutet darauf hin, dass sich die Genexpression der Gruppen nur gering unterscheidet. Dies weist

darauf hin, dass in der frühen Phase der Infektion die Unterschiede der Expressionsmuster zweier Tiere größer sind als der Einfluss von *E. coli* auf das Transkriptom.

Beim Vergleich der Expressionsprofile i_6 bis i_10 (infiziertes Viertel, 6 h nach Infektion) mit c_1 bis c_5 (unbehandelte Euterviertel gesunder Tiere) (Abb. 14 B) wurden die Expressionsprofile in zwei Cluster eingeordnet. Jedes Cluster enthielt Expressionsprofile aus infizierten und gesunden Eutervierteln. Die Längen der Äste der Heatmap wiesen darauf hin, dass sich die gebildeten Gruppen in ihrer Genexpression nur geringfügig unterschieden. Dieses Ergebnis zeigt, dass *E. coli* die Genexpression der benachbarten Euterviertel zum frühen Zeitpunkt der Infektion nicht so stark beeinflusst, dass Cluster mit Expressionsmustern von ausschließlich infizierten oder gesunden Eutervierteln erhalten werden. Die Verteilung der Expressionsprofile auf die beiden Cluster belegt, dass die gesunden und infizierten Tiere unter identischen Bedingungen vorbereitet wurden.

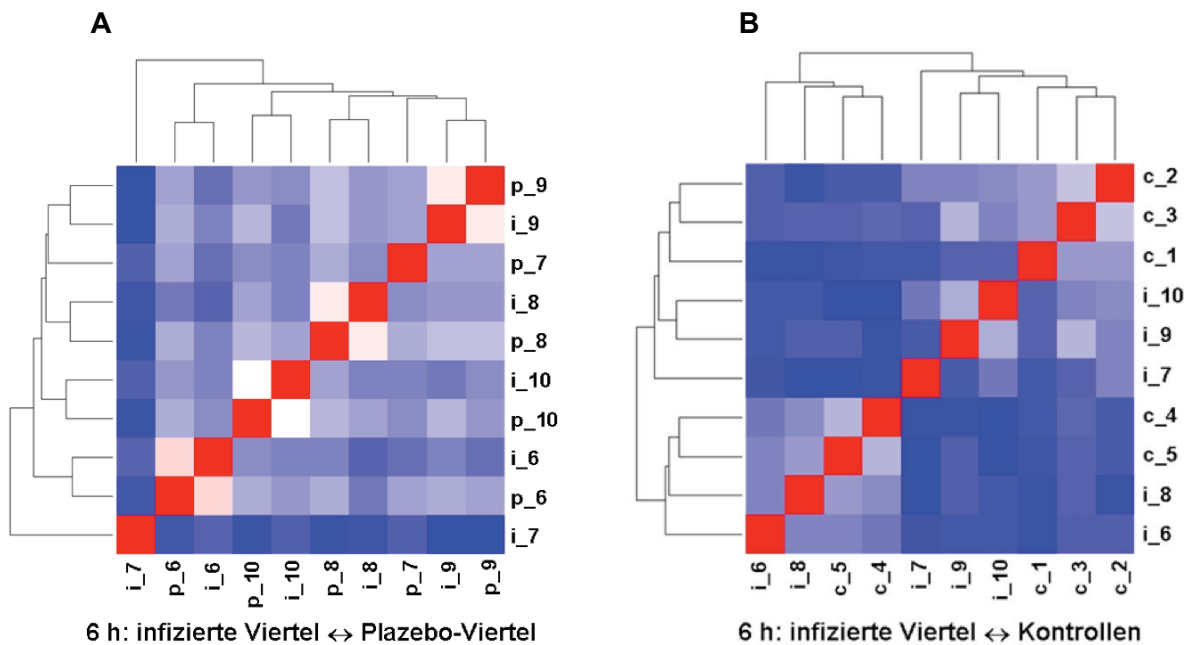


Abbildung 14: Heatmap der Clusteranalyse der Genexpression 6 h nach Infektion mit *E. coli* 1303

Ausgehend von normalisierten Expressionsprofilen wurden zunächst anhand der MAS5-Detektions-p-Werte die nicht-detektierbaren Datensätze entfernt. Durch hierarchisches Clustern (R, Bioconductor) wurden die Expressionsprofile i_6 bis i_10 (infiziertes Viertel, 6 h nach Infektion) entweder mit p_6 bis p_10 (nicht-infiziertes Plazebo-Viertel, selbes Tier, 6 h nach der Infektion) (A) oder mit c_1 bis c_5 (Euterviertel gesunder nicht-infizierter Tiere) (B) verglichen. Die Farben der Quadrate geben den Grad der Ähnlichkeit der verglichenen Expressionsmuster an. Diese können dunkelrot (bedeutet Übereinstimmung der Expressionsmuster) bis dunkelblau (bedeutet maximal gefundene Unähnlichkeit) sein. Die Baumstruktur gibt die Beziehung zwischen den Expressionsprofilen an, wobei die Länge der Äste anzeigt, wie stark sich die Genexpression zwischen den gebildeten Gruppen unterscheidet.

Identifizierung von differentiell exprimierten Genen

Zur Identifizierung von Genen, deren Expression als Reaktion auf eine Infektion mit 500 KbE *E. coli* in der frühen Phase einer akuten klinischen Mastitis geändert wird, wurden Expressionsprofile der infizierten Viertel und unbehandelter Viertel von gesunden Kontrolltieren erstellt. Nach der Normalisierung und Filterung der Daten auf solche mit nachweisbarem Signal (*present probe sets*) wurden differentiell exprimierte Gene mit SAM identifiziert. Bei einer Rate von weniger als 10% an falsch Positiven wurden 32 *probe sets* ermittelt, die signifikant differentiell exprimiert wurden (Abb. 15). Aus der graphischen Darstellung der ermittelten Genexpression ist ersichtlich, dass die Expression aller differentiell exprimierten *probe sets* durch die Infektion gesteigert wurde (Abb. 15, rote Signale). Es wurden keine *probe sets* von Genen gefunden, deren Expression in Folge der Infektion erniedrigt wurde. Bei weiterer Verschärfung der Auswahlkriterien konnten nur 13 *probe sets* identifiziert werden, deren Expression als Reaktion auf die Infektion um den Faktor 2 oder größer gesteigert wurde. Diese 13 *probe sets* konnten 12 Genen zugeordnet werden, welche in Tabelle 11 aufgelistet sind.

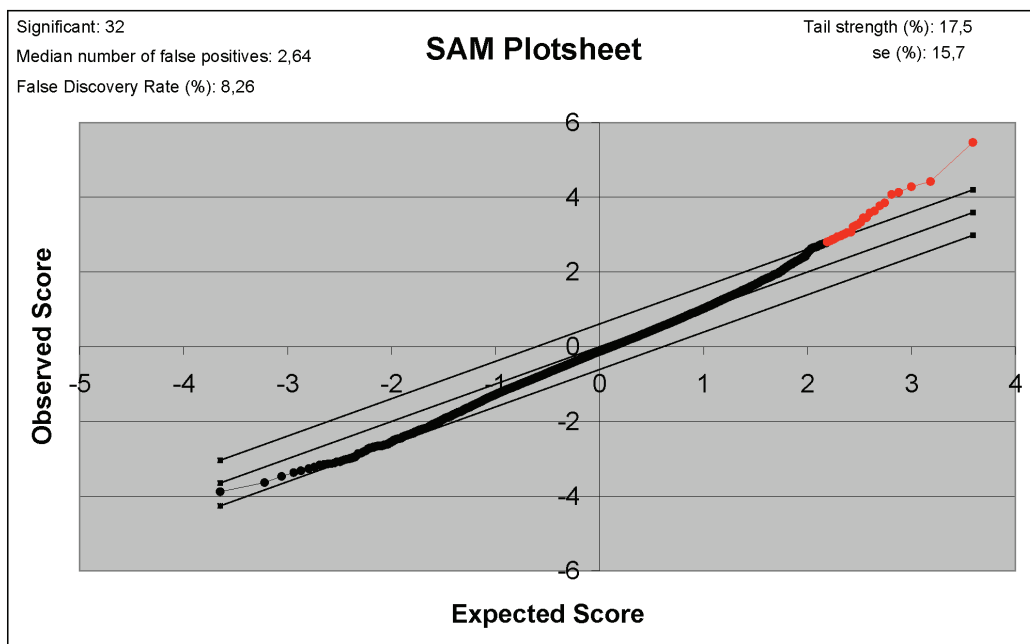


Abbildung 15: SAM-Plot der Analyse in infizierten Eutervierteln 6 h nach Infektion mit *E. coli* 1303

Die normalisierten und nach *present probe sets* gefilterten Expressionsprofile *i_6* bis *i_10* (infiziertes Viertel, 6 h nach Infektion) wurden mit Hilfe von SAM mit den entsprechend ermittelten Expressionsprofilen *c_1* bis *c_5* (Euterviertel gesunder nicht-infizierter Tiere) verglichen. Das Ergebnis dieser Analyse ist für jedes *probe set* als Punkt dargestellt (Erlaubte Rate an falsch Positiven: 10%). Die 32 *probe sets*, die in infizierten Eutervierteln ein signifikant stärkeres Signal ergeben, sind rot dargestellt (*probe sets* von Genen, die im nicht-infizierten Viertel ein signifikant stärkeres Signal gezeigt hätten, wären grün dargestellt).

Die höchsten Änderungen der Genexpression zeigten die Gene *PTX3* (Pentraxin related gene, Log₂ Fold Change (lfc): 2,9) und *NRG1* (Neuregulin 1, lfc 1,9).

Tabelle 11: Differenziell exprimierte Gene in infizierten Eutervierteln 6 h nach Infektion mit *E. coli* 1303

PROBE SET ID	FC [log2]	p-WERT	GEN-SYMBOL	GENNAME
Bt.10398.1.S1_at	2,90	0	PTX3	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta
Bt.411.1.S1_at	1,90	0	NRG1	neuregulin 1
Bt.4606.1.S1_at	1,57	0,074	KLF6	Kruppel-like factor 6
Bt.8238.1.A1_at	1,56	0	TRIB3	tribbles homolog 3
Bt.15802.2.S1_at	1,44	0,059	KLF5	Kruppel-like factor 5
Bt.11990.1.S1_at	1,38	0,083	C10orf45	chromosome 10 open reading frame 45
Bt.13330.1.S1_at	1,38	0,083	PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4
Bt.15802.1.S1_at	1,35	0	KLF5	Kruppel-like factor 5
Bt.17573.1.A1_at	1,29	0,074	ZBTB16	zinc finger and BTB domain containing 16
Bt.20329.2.S1_at	1,14	0	ARL4D	ADP-ribosylation factor-like 4D
Bt.12769.1.S1_at	1,09	0,083	PCK2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2
Bt.25189.1.A1_at	1,08	0,074	FAM55C	family with sequence similarity 55, member C
Bt.27854.2.S1_at	1,00	0	NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated

Ausgehend von den RMA-normalisierten und nach present probe sets gefilterten Expressionsprofilen *i*₆ bis *i*₁₀ (infiziertes Viertel, 6 h nach Infektion) und den entsprechend ermittelten Expressionsprofilen *c*₁ bis *c*₅ (Euterviertel gesunder nicht-infizierter Tiere) wurden mit SAM (Excel Add-In) differenziell exprimierte probe sets ermittelt, deren Expression nach Infektion mit *E. coli* 1303 um mehr als einen Faktor 2 geändert wurde. Die Fehlergrenze (fdr) wurde auf 10% gesetzt. Für die probe sets der differenziell exprimierten Gene sind die Gensymbole der humanen Homologen angegeben.

4.4.2 Analyse der Genexpression in der späten Phase der Infektion mit *E. coli* 1303

4.4.2.1 Untersuchung der Genexpression in infizierten Eutervierteln

Erstellen und Normalisieren von Expressionsprofilen

Der Einfluss von *E. coli* auf das Transkriptom des Milchdrüsengewebes in der späten Phase der Infektion wurde an Gewebeproben aus infizierten Eutervierteln (i24 h) und aus gesunden Eutervierteln gesunder Tiere (c24 h) untersucht. Dazu wurde aus den Gewebeproben von jeweils 5 Tieren Gesamt-RNA isoliert und entsprechend dem Affymetrix-Verfahren zur Herstellung von biotinylierter cRNA eingesetzt. Diese wurde mit bovinen GeneChips™ umgesetzt. Nach dem Hybridisieren und Auslesen der hybridisierten Arrays wurden die

erfassten Expressionswerte mit Hilfe des RMA-Algorithmus normalisiert und als Boxplot vor und nach der Normalisierung dargestellt. Die Analyse der erhaltenen Boxplots zeigt, dass die Expressionsdaten erfolgreich normalisiert werden konnten (Ergebnisse werden nicht gezeigt).

Vergleich der Expressionsprofile durch hierarchisches Clustern

Nach der Normalisierung der Expressionswerte wurden mit dem Programm MAS5 Detektions-p-Werte für alle *probe sets* berechnet. Durch Anwendung eines Datenfilters wurden alle Datensätze mit nicht-signifikanten Detektions-p-Werten entfernt und somit nur jene ausgewählt, die im untersuchten Milchdrüsengewebe exprimiert waren. Mit den Expressionswerten der *present probe sets* wurden hierarchische Clusteranalysen durchgeführt (Abb. 16). Die Expressionsmuster der infizierten Viertel und der nicht-infizierten Viertel der Kontrolltiere werden in zwei Gruppen eingeteilt, die jeweils 5 Expressionsmuster enthalten.

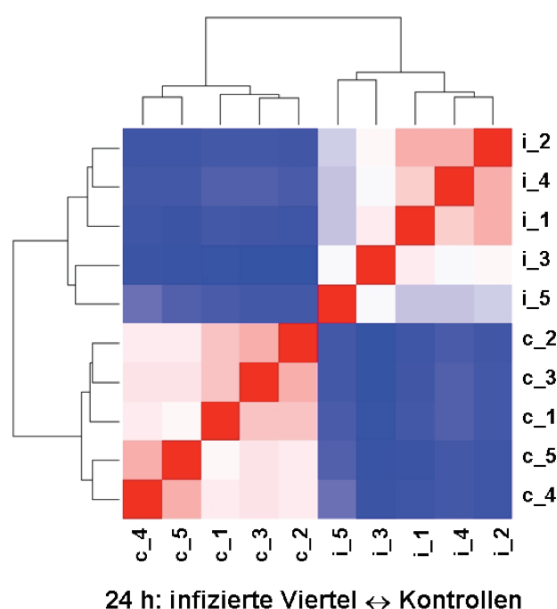


Abbildung 16: Heatmap der Clusteranalyse der Genexpression 24 h nach Infektion mit *E. coli* 1303

Ausgehend von normalisierten Expressionsprofilen wurden zunächst anhand der MAS5-Detektions-p-Werte die Datensätze ohne Signal entfernt. Durch hierarchisches Clustern (R, Bioconductor) wurden die Expressionsprofile *i*₁ bis *i*₅ (infiziertes Viertel, 24 h nach Infektion) mit *c*₁ bis *c*₅ (Euterviertel gesunder nicht-infizierter Tiere) verglichen. Die Farben der Quadrate geben den Grad der Ähnlichkeit der verglichenen Expressionsmuster an. Diese können dunkelrot (bedeutet Übereinstimmung der Expressionsmuster) bis dunkelblau (bedeutet maximal gefundene Unähnlichkeit) sein. Die Baumstruktur gibt die Beziehung zwischen den Expressionsprofilen an, wobei die Länge der Äste anzeigt, wie stark sich die Genexpression zwischen den gebildeten Gruppen unterscheidet.

Einer Gruppe werden die Expressionsprofile der infizierten Euterviertel zugeordnet, die andere enthält die Profile aller nicht-infizierten Euterviertel der gesunden Tiere. Der Farbumfang der Quadrate in den Clustern reicht von intensiv blau bis rot und weist ebenso wie die Länge der Äste der Gruppen im Clusterbaum darauf hin, dass es große Unterschiede in der Genexpression zwischen den erhaltenen Gruppen gibt. Die relativ gleichmäßige Verteilung der Farben innerhalb der zwei Gruppen zeigt dagegen an, dass sich die Expressionsmuster innerhalb jeder Gruppe sehr ähnlich sind. Von diesem Ergebnis weicht lediglich die Probe i_5 ab, deren Expressionsmuster zwar korrekt zur Gruppe der infizierten zugeordnet, jedoch hellblau wiedergegeben wird. Dies weist darauf hin, dass sich dieses Expressionsmuster von allen anderen der infizierten Euterviertel unterscheidet. Dieser Datensatz wurde bei den folgenden Analysen nicht berücksichtigt um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen.

Identifizierung von differentiell exprimierten Genen

Zur Identifizierung von Genen, deren Expression als Reaktion auf eine Infektion mit 500 KbE *E. coli* in der späten Phase einer akuten klinischen Mastitis geändert wird, wurden Expressionsprofile der infizierten Viertel mit unbehandelten Vierteln gesunder Kontrolltiere erstellt. Nach der Normalisierung und Filterung der Daten auf solche mit nachweisbarem Signal (*present probes sets*) wurden differentiell exprimierte Gene mit LIMMA (Linear Models for MicroArray data (Smyth, 2004), Bioconductor-Software-Projekt (Gentleman et al., 2004)) identifiziert. Die Analysen wurden mit den Datensätzen c24h_1 bis 5 und i24h_1 bis 4 durchgeführt. Dabei wurden 1771 *probe sets* gefunden, deren Expressionsrate in der späten Phase der Infektion durch Einwirkung des Pathogens signifikant geändert wird (korrigierter p-Wert < 1%). Abbildung 17 zeigt die Verteilung der signifikant differentiell exprimierten *probe sets* in Form eines Vulkanplots. Relativ zu den nicht-infizierten Eutervierteln gesunder Tiere werden 1250 *probe sets* mehr als doppelt so häufig (rote Punkte) und 521 weniger als halb so oft (grüne Punkte) exprimiert. Die signifikant differentiell exprimierten Gene sind im Anhang aufgelistet.

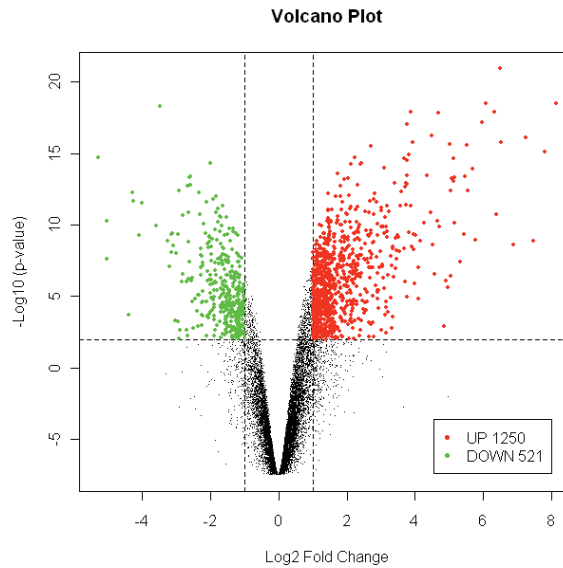


Abbildung 17: Vulkanplot der Expressionswerte in infizierten Eutervierteln in der späten Phase der Infektion

Die present probe sets der Expressionsprofile i_1 bis i_4 (infiziertes Viertel, 24 h nach Infektion) wurden mit Hilfe des LIMMA-Pakets in R (Bioconductor) mit denen der Profile c_1 bis c_5 (Euterviertel gesunder nicht-infizierter Tiere) verglichen. Die erhaltenen Expressionswerte wurden als Vulkanplot dargestellt. Die horizontale gestrichelte Linie verläuft auf dem gewählten p-Wert von 0,01. Die gestrichelten vertikalen Linien zeigten den Faktor 2 als Schwellenwert der differentiellen Expression an. Die farbigen Punkte stellen probe sets dar, die im infizierten Viertel in der späten Phase der Infektion mindestens doppelt so häufig (rot) oder weniger als halb so oft (grün) exprimiert werden wie im gesunden Gewebe nicht-infizierter Tiere.

4.4.2.2 Untersuchung der Genexpression in nicht-infizierten Eutervierteln infizierter Tiere

Erstellen und Normalisieren von Expressionsprofilen

Untersucht werden sollte, wie sich die Infektion eines Euterviertels auf die Genexpression der benachbarten nicht-infizierten Euterviertel in der späten Phase der Infektion auswirkt. Dazu wurden Gewebeproben aus nicht-infizierten Eutervierteln (n24 h) infizierter Tiere und aus unbehandelten Eutervierteln gesunder Tiere (c24 h) verwendet. Von jedem infizierten Versuchstier standen Gewebeproben aus drei nicht-infizierten Eutervierteln zur Verfügung und von den gesunden Tieren Proben aus allen 4 Eutervierteln. Aus allen wurde RNA isoliert. Wegen der hohen Kosten für Affymetrix-Analysen konnten nicht alle Proben untersucht werden. Deshalb wurde die RNA aus maximal zwei Vierteln eines Tieres vereinigt, wenn sie im Zeitverlauf annähernd vergleichbare, niedrige Werte an somatischen Zellen in der Milch aufwiesen. Die Tabelle 12 zeigt die Anzahl der somatischen Zellen in der Milch der Versuchstiere an. Grau hinterlegt sind jene Viertel, deren RNA vereinigt wurde.

Proben aus Eutervierteln mit abweichender oder zu hoher Anzahl an somatischen Zellen in der Milch wurden nicht einbezogen. Aus den RNAs wurde entsprechend dem Protokoll von Ambion biotinylierte cRNA hergestellt und mit bovinen GeneChips™ umgesetzt. Nach dem Hybridisieren und Auslesen der Arrays wurden die erfassten Expressionswerte mit Hilfe des RMA-Algorithmus normalisiert und als Boxplot vor und nach der Normalisierung dargestellt. Die Analyse der erhaltenen Boxplots zeigt, dass die Expressionsdaten erfolgreich normalisiert werden konnten (Ergebnisse werden nicht gezeigt).

Tabelle 12: Anzahl der somatischen Zellen in der Milch

Externe Kontrolltiere (c24h)						<i>E. coli</i> infizierte Tiere (24h)					
Tier-ID	Zeitpunkt [h]	SCC-hl [1x10 ³ /ml]	SCC-hr [1x10 ³ /ml]	SCC-vl [1x10 ³ /ml]	SCC-vr [1x10 ³ /ml]	Tier-ID	Zeitpunkt [h]	SCC-hl [1x10 ³ /ml]	SCC-hr [1x10 ³ /ml]	SCC-vl [1x10 ³ /ml]	SCC-vr [1x10 ³ /ml]
1	0	10	75	5	55	1	0	7	3	23	8
	12	12	67	11	49		12	23	491	30	20
	24	8	51	9	40		24	36	1388	51	29
2	0	10	7	24	10	2	0	25	34	21	27
	12	17	14	45	18		12	16	1192	18	21
	24	37	35	105	36		24	53	9999	147	51
3	0	129	29	52	63	3	0	37	25	22	23
	12	133	17	48	71		12	16	2664	20	14
	24	148	40	56	102		24	17	7020	45	16
4	0	12	15	11	13	4	0	28	28	33	30
	12	6	7	4	9		12	7317	2072	19	6
	24	9	5	6	10		24	7129	18520	177	41
5	0	46	108	44	52	5	0	128	36	42	42
	12	49	91	42	51		12	194	2820	52	33
	24	50	83	42	56		24	163	8204	33	32

Die Werte der somatischen Zellen (SCC) in der Milch jedes Euterviertels der Versuchstiere (hl/r: hinten links/rechts, vl/r: vorne links/rechts) wurden von den Kooperationspartnern der Wiederkäuerklinik bestimmt und sind in 1000 Zellen pro ml Milch angegeben. Dunkelgrau hinterlegt sind die Werte der Euterviertel, deren Proben für die Affymetrix-Analysen zur Untersuchung der Genexpression in nicht-infizierten Eutervierteln von infizierten Tieren verwendet wurden. hellgrau: infizierte Viertel, schraffiert: Viertel, in welche Injektionslösung ohne Pathogen verabreicht wurde (Placeboviertel).

Vergleich der Expressionsprofile durch hierarchisches Clustern

Nach der Normalisierung der Expressionswerte wurden mit dem Programm MAS5 für alle *probe sets* Detektions-p-Werte berechnet. Durch Anwendung eines Datenfilters wurden alle Datensätze mit nicht-signifikanten Detektions-p-Werten entfernt und somit nur jene ausgewählt, die im untersuchten Milchdrüsengewebe exprimiert waren. Mit den Expressionswerten dieser *present probe sets* wurden hierarchische Clusteranalysen durchgeführt (Abb. 18). Die Abbildung 18 zeigt eine Heatmap als Ergebnis dieser Analysen. Die untersuchten Expressionsmuster werden in zwei Gruppen eingeordnet.

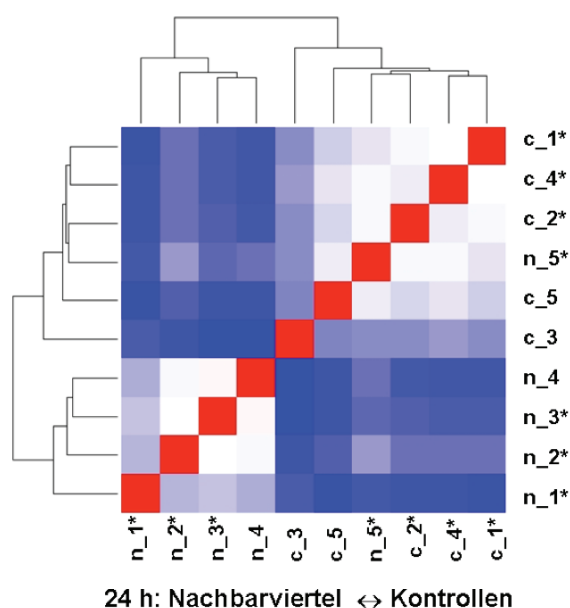


Abbildung 18: Heatmap der Clusteranalyse der Genexpression in nicht-infizierten Eutervierteln infizierter Tiere 24 h nach Infektion mit *E. coli* 1303

Ausgehend von normalisierten Expressionsprofilen wurden zunächst anhand der MAS5-Detektions-p-Werte die Datensätze ohne Signal entfernt. Durch hierarchisches Clustern (R, Bioconductor) wurden die Expressionsprofile *n*₁ bis *n*₅ (nicht-infiziertes Euterviertel infizierter Tiere, 24 h nach Infektion) mit *c*₁ bis *c*₅ (Euterviertel gesunder nicht-infizierter Tiere) verglichen. Die Farben der Quadrate geben den Grad der Ähnlichkeit der verglichenen Expressionsmuster an. Diese können dunkelrot (bedeutet Übereinstimmung der Expressionsmuster) bis dunkelblau (bedeutet maximal gefundene Unähnlichkeit) sein. Die Baumstruktur gibt die Beziehung zwischen den Expressionsprofilen an, wobei die Länge der Äste anzeigt, wie stark sich die Genexpression zwischen den gebildeten Gruppen unterscheidet. Der Stern bei der Beschriftung der Datensätze zeigt an, dass zur Herstellung der entsprechenden biotinylierten cRNA Gewebeproben von mehr als einem Euterviertel desselben Tieres verwendet wurden (Tab. 12).

Vier Expressionsprofile der nicht-infizierten Euterviertel werden einer Gruppe zugeordnet, das fünfte (n_5, Abb. 18) wird zusammen mit den fünf Expressionprofilen der gesunden Tiere der zweiten Gruppe zugeordnet. Der Farbumfang der Quadrate in den Clustern reicht von intensiv blau bis rot und weist ebenso wie die Länge der Äste der Gruppen im Clusterbaum darauf hin, dass es signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den erhaltenen Gruppen gibt. Diese sind jedoch nicht sehr groß. Die relativ gleichmäßige Verteilung der Farben innerhalb der zwei Gruppen zeigt dagegen an, dass sich die Expressionsmuster innerhalb jeder Gruppe sehr ähnlich sind. Die Probe n_5 wird der Gruppe der gesunden Tiere zugeordnet und passt sowohl bezüglich des Farbtons seiner Quadrate als auch der Länge des Astes in der Baumstruktur gut in diese Gruppe. Dies weist darauf hin, dass sich dieses Expressionsmuster n_5 von allen anderen Expressionsmustern nicht-infizierter Euterviertel aus infizierten Tieren (n_1 bis n_4) unterscheidet und dem eines gesunden Tieres gleicht. Zusammenfassend zeigt dieses Ergebnis, dass die Infektion eines Euterviertels in der späten Phase der Infektion das Transkriptom benachbarter Euterviertel nachweisbar beeinflusst. Die Auswirkung auf das Transkriptom der untersuchten infizierten Tiere ist individuell unterschiedlich. Kaum Reaktion zeigt das Expressionsprofil n_5, weshalb dieser Datensatz bei den folgenden Analysen nicht berücksichtigt wurde, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen.

Identifizierung von differentiell exprimierten Genen

Zur Identifizierung der differentiell exprimierten Gene wurden die Expressionsmuster von nicht-infizierten Vierteln der vier infizierten Tiere n_1 bis n_4 mit denjenigen der fünf externen Kontrollen c_1 bis c_5 verglichen. Nach der Normalisierung der Rohdaten und Filterung der Daten auf solche mit nachweisbarem Signal (*present probe sets*) wurden unter Anwendung der Limma-Methode 401 *probe sets* gefunden, deren Expressionsrate in den nicht-infizierten Vierteln infizierter Tiere signifikant höher oder niedriger war als in den unbehandelten Eutervierteln gesunder Tiere (korrigierter p-Wert < 1%). Davon war die Expression von 242 *probe sets* um mehr als das Doppelte erhöht und die von 160 *probe sets* um mehr als die Hälfte erniedrigt. Abbildung 19 zeigt das Ergebnis einer hierarchischen Clusteranalyse mit Hilfe des MeV-Programms auf Grundlage dieser 401 *probe sets*. Diese werden zwei Gruppen zugeordnet, die sich in der Genexpression stark unterscheiden. Die Mitglieder der einen Gruppe werden in nicht-infizierten Eutervierteln infizierter Tiere stärker exprimiert, die der anderen im Euterviertel gesunder Tiere.

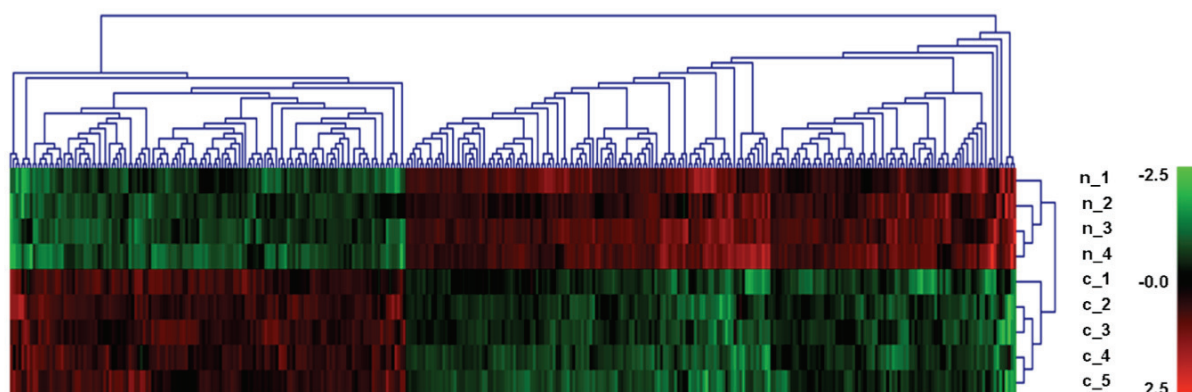


Abbildung 19: Hierarchisches Cluster von 401 differentiell exprimierten probe sets in nicht-infizierten Eutervierteln 24 h nach der Infektion mit *E. coli* 1303

Ausgehend von normalisierten Expressionsprofilen wurden zunächst anhand der MAS5-Detektions- p -Werte die Datensätze ohne Signal entfernt. Mittels LIMMA wurden die Expressionsprofile n_1 bis n_4 (infizierte Tiere 24 h nach Infektion, nicht-infiziertes Euterviertel) mit c_1 bis c_5 (Euterviertel gesunder nicht-infizierter Tiere) verglichen und 401 probe sets ($lfc \geq 1$; korrigierter p -Wert $< 1\%$) identifiziert, die differentiell exprimiert waren. Basierend auf diesen wurde eine hierarchische Clusteranalyse unter Verwendung des MeV-Programms durchgeführt. Die Farbskalierung des erhaltenen Dendrogramms zeigt eine stärkere (rot) bzw. schwächere (grün) Expression einzelner probe sets im Verhältnis zur mittleren Expressionsstärke (\log_2 -Expressionswerte) aller Replikate dieses Experiments. Die Länge der Äste der Baumstruktur zeigt an, wie stark sich die gebildeten Gruppen im Bezug auf die Genexpression unterscheiden.

4.4.3 Vergleichende Analyse der Genexpression in der frühen und späten Phase der Infektion mit *E. coli* 1303

Die bisher beschriebenen Untersuchungen zum Einfluss von *E. coli* auf das Transkriptom des Milchdrüsegewebes beruhen auf paarweise durchgeführten Vergleichen und konnten jeweils eine bestimmte Anzahl an differentiell exprimierten probe sets identifizieren. Diese einzelnen Analysen ermöglichen keinen direkten Vergleich der Experimente im Hinblick auf das Ausmaß der Änderungen des Transkriptoms. Dieser wird möglich, wenn die durchgeführten Untersuchungen auf einer gemeinsamen Messgröße wie z.B. die Expressionsprofile der gesunden Euterviertel gesunder Tiere beruhen. Die Abbildung 20 zeigt das Ergebnis von drei Clusteranalysen, bei denen die Expressionsprofile der gesunden Euterviertel c_1 bis c_5 verglichen wurden mit denen infizierter Euterviertel 6 h (i_6 bis i_{10} , **A**) oder 24 h (i_1 bis i_5 , **B**) nach der Infektion oder verglichen wurden mit Expressionsprofilen nicht-infizierter Euterviertel infizierter Tiere (n_1 bis n_5 , **C**). Bei der Berechnung der Cluster wurde der größte Unterschied zwischen zwei Profilen beim Vergleich infizierter Euterviertel 24 h nach der Infektion mit gesunden Eutervierteln gesunder Tiere gefunden (B). Diesem Wert wurde die Farbe Tiefblau zugewiesen. Die so ermittelte

Distanz zwischen größtem Unterschied (tiefblau) und maximaler Ähnlichkeit (tiefrot) wurde bei der Berechnung der anderen beiden Cluster beibehalten. Dadurch wurden Heatmaps erhalten, die direkt verglichen werden können. Abbildung 20 B zeigt den größten Farbkontrast und die längsten Äste im Clusterbaum. Dies weist auf einen starken Einfluss des Pathogens auf die Genexpression im infizierten Euterviertel 24 h nach der Infektion hin. Der schwächste Farbkontrast und die kürzesten Astlängen im Clusterbaum werden in der frühen Phase der Infektion erhalten (Abb. 20 A). Bei diesem Vergleich erfolgt nicht die erwartete Zuordnung der Profile aus infizierten und nicht-infizierten Gewebeprobe. Stärkere Farbkontraste werden beim Vergleich von Expressionsprofilen nicht-infizierter Euterviertel infizierter Tiere mit unbehandelten Eutervierteln gesunder Tiere erhalten (Abb. 20 C).

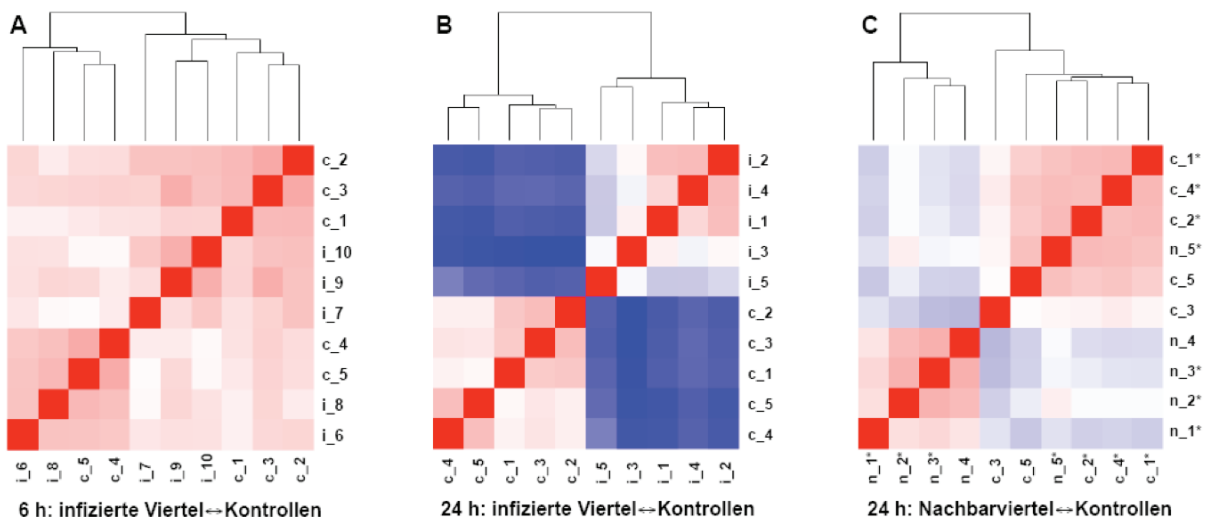


Abbildung 20: Heatmaps der Clusteranalysen der Genexpression 6 h und 24 h nach Infektion mit *E. coli* 1303

Ausgehend von normalisierten Expressionsprofilen wurden zunächst anhand des MAS5-Algorithmus Datensätze ohne signifikante Signale entfernt. Mittels R (Bioconductor) wurde durch den Vergleich der Expressionsprofile *c*₁ bis *c*₅ (Euterviertel gesunder nicht-infizierter Tiere) mit *i*₁ bis *i*₅ (infizierte Euterviertel, 24 h nach Infektion, **B**) eine Heatmap erstellt. Die ermittelte Distanz zwischen stärkster Übereinstimmung (rote Quadrate) und größte Differenz (blaue Quadrate) der Expressionsprofile wurde beibehalten bei der Erstellung zwei weiterer Heatmaps durch den Vergleich der Expressionsprofile *c*₁ bis *c*₅ mit *i*₆ bis *i*₁₀ (infizierte Euterviertel, 6 h nach Infektion, **A**) oder mit *n*₁ bis *n*₅ (infizierte Tiere 24 h nach Infektion, nicht-infiziertes Euterviertel, **C**). Die Farben der Quadrate geben den Grad der Ähnlichkeit der verglichenen Expressionsmuster an. Diese können dunkelrot (bedeutet Übereinstimmung der Expressionsmuster) bis dunkelblau (bedeutet maximal gefundene Unähnlichkeit) sein. Die Baumstruktur gibt die Beziehung zwischen den Expressionsprofilen an, wobei die Länge der Äste anzeigt, wie stark sich die Genexpression zwischen den gebildeten Gruppen unterscheidet. Der Stern bei der Beschriftung der Datensätze zeigt an, dass zur Herstellung der entsprechenden biotinylierten cRNA Gewebeprobe von mehr als einem Euterviertel desselben Tieres verwendet wurden (Tab. 12).

Die Infektion beeinflusst das Transkriptom des benachbarten Viertel in deutlich geringerem Ausmaß als die des infizierten Viertels. Dies ist gut an den hellblauen und weißen Farbtönen der Quadrate ersichtlich. Zudem wird eines der Expressionsprofile (n_5) zum Cluster der gesunden Kontrolltiere zugeordnet.

4.4.4 Detaillierte Analyse der differentiell exprimierten *probe sets*

Durch Analysen des Transkriptoms konnten mehr als 1900 *probe sets* identifiziert werden, deren Expression im Vergleich zum gesunden Tier in der frühen oder späten Phase einer *E. coli* Infektion geändert wird. Mit verschiedenen bioinformatischen Verfahren sollte untersucht werden, an welchen Prozessen diese *probe sets* beteiligt sind und welche regulatorischen Elemente deren Expression steuern.

Vergleich der Listen der differentiell exprimierten *probe sets*

Die größte Anzahl an differentiell exprimierten *probe sets* (1771) wurde beim Vergleich der Genexpression von gesundem mit infiziertem Milchdrüsengewebe 24 Stunden nach der Infektion gefunden (siehe oben). In allen anderen Untersuchungen wurden deutlich weniger *probe sets* gefunden. Damit stellt sich die Frage, ob in den nicht-infizierten Eutervierteln eines infizierten Tieres die gleichen Gene exprimiert werden wie im infizierten Viertel, jedoch nur im schwächeren Ausmaß. Zur Beantwortung dieser Frage wurden alle Ergebnisse der paarweise durchgeführten Analysen des Transkriptoms miteinander auf übereinstimmende *probe sets* untersucht.

6 h nach der Infektion wurden 13 *probe sets* identifiziert (siehe oben). 3 davon wurden ebenfalls 24 h nach der Infektion in infizierten Eutervierteln gefunden und 8 davon in nicht-infizierten Eutervierteln. Dies weist darauf hin, dass zum frühen Zeitpunkt der Infektion bereits spezifische Prozesse stattfinden, die zum späten Zeitpunkt der Infektion nicht mehr nachweisbar sind. Dies belegt ebenfalls, dass zum frühen Zeitpunkt Reaktionen beginnen, die bis zum späten Zeitpunkt der Infektion aufrechterhalten werden.

24 Stunden nach der Infektion wurden 1771 *probe sets* beim Vergleich von infizierten und gesunden Eutervierteln gefunden (siehe oben) und weitere 401 *probe sets* beim Vergleich von gesunden Eutervierteln und nicht-infizierten Eutervierteln infizierter Tiere. Durch einen Vergleich beider Listen wurden 238 übereinstimmende *probe sets* gefunden. Diese Schnittmenge weist darauf hin, dass die Infektion eines Euterviertels mit *E. coli* Änderungen des Transkriptoms auslöst, die sowohl in infizierten als auch in nicht-infizierten Eutervierteln ablaufen und damit systemisch alle Euterviertel betreffen. Unter Berücksichtigung dieser Schnittmenge bleiben jedoch 163 *probe sets* übrig, die ausschließlich in nicht-infizierten Eutervierteln infizierter Tiere gefunden wurden. Dies weist darauf hin, dass zum späten Zeitpunkt der Infektion spezifische Prozesse in nicht-infizierten Eutervierteln ablaufen, die lokal begrenzt nur in nicht-infizierten Eutervierteln nachgewiesen werden können.

Suche nach koregulierten Genen durch SOTA-Analyse

Der beschriebene Vergleich von Listen differentiell exprimierter *probe sets* identifiziert Schnittmengen zwischen diesen Listen. Das Vorgehen gibt jedoch keinen Hinweis darauf, ob Gene dieser Liste gemeinsam reguliert werden und welche Faktoren an deren Regulation beteiligt sein könnten. Zur Identifizierung gleichartig regulierter Gene wurde eine *Self-organizing-tree-algorithm* (SOTA)-Analyse (Herrero et al., 2001) durchgeführt. Als Ausgangspunkt für diese Analyse wurde eine Liste der *probe sets* erstellt, deren Expression 24 h nach Infektion mit *E. coli* im Vergleich zum gesunden Tier geändert war. Die Liste umfasste die ID der *probe sets* und deren Expressionswerte in infizierten und deren benachbarten nicht-infizierten Eutervierteln. Die Expressionswerte der zugrunde liegenden zwei verschiedenen Affymetrix-Analysen wurden zunächst auf den Mittelwert der Expressionswerte der Euterviertel gesunder Tiere normiert und dadurch vergleichbar gemacht. Die SOTA-Analyse ordnete die *probe sets* nach dem Verlauf ihrer Expressionswerte in den untersuchten Geweben zu Gruppen mit möglichst gleichartigem Expressionsverlauf. Zur Berechnung der Cluster wurden auch Expressionswerte herangezogen, die unter dem Schwellenwert ($\text{lfc} \geq 1$) für die Zuordnung zu differentiell exprimierten *probe sets* liegen. Die Abbildung 21 zeigt die erhaltenen Cluster dieser SOTA-Analyse.

Die untersuchten *probe sets* wurden 3 Typen von Clustern zugeordnet. Typ 1 enthält *probe sets*, die sowohl in infizierten als auch in deren Nachbarvierteln exprimiert werden (Abb. 21, **1**, **4**, **6**). Die Expression der beteiligten *probe sets* wird entweder gleichsinnig erhöht (Abb. 21, **1**), erniedrigt (Abb. 21, **6**) oder gegenläufig in infizierten erniedrigt und den benachbarten Vierteln erhöht (Abb. 21, **4**). Diese *probe sets* sind an einer Reaktion des Transkriptoms beteiligt, die systemisch in allen Eutervierteln der infizierten Tiere abläuft.

Der zweite Typ enthält *probe sets*, die nur lokal in infizierten Eutervierteln exprimiert werden (Abb. 21, **2**, **3**). Ihre Expression wird durch die Infektion erhöht (Abb. 21, **2**) oder erniedrigt (Abb. 21, **3**) oder gegenläufig in infizierten erniedrigt und den benachbarten Vierteln erhöht (Abb. 21, **4**). Diese *probe sets* sind an einer Reaktion des Transkriptoms beteiligt, die lokal nur in infizierten Eutervierteln abläuft. Der dritte Typ umfasst nur ein Cluster (Abb. 21, **5**) mit 28 *probe sets*, deren Expression durch die Infektion nur lokal in nicht-infizierten Nachbarvierteln gesteigert wird. Zusammenfassend weist das Ergebnis der SOTA-Analyse darauf hin, dass die Infektion mit *E. coli* sowohl eine ausgeprägte lokale Reaktion des Transkriptoms im infizieren Euter hervorruft als auch eine nur geringfügig weniger ausgeprägte systemische Antwort, die alle Euterviertel betrifft. An jeder dieser Reaktionen sind mehr als 900 *probe sets* beteiligt.

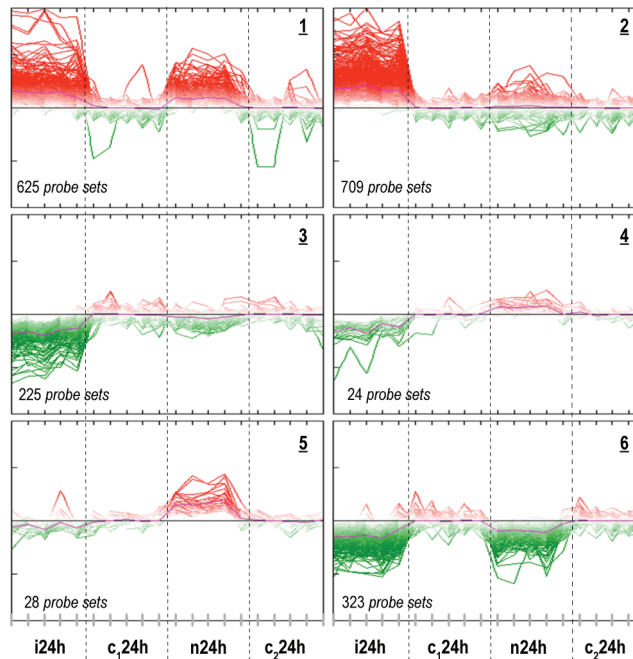


Abbildung 21: SOTA-Analyse der differentiell exprimierten probe sets

Die Expressionswerte der 1934 differentiell exprimierten probe sets 24 h nach Infektion mit *E. coli* wurden in Relation zu den Mittelwerten der Kontrolltiergruppe gesetzt und zur Basis 2 logarithmiert. Mit diesen Werten wurde eine Self-organizing-tree-algorithm (SOTA, MeV4.2.02)-Analyse (Herrero et al., 2001) unter Verwendung der Pearson-Korrelation durchgeführt. Diese ordnet probe sets zu Clustern basierend auf den ähnlichen Verläufen der Expressionswerte über alle Proben. Der Verlauf der Expression der probe sets ist als durchgehende Linie gekennzeichnet (rot: hochreguliert, grün: herabreguliert). Die Mittelwerte der Expressionswerte einer jeden Probe werden als Linie in Magenta dargestellt. Die ersten fünf Proben eines Cluster stammen aus infizierten Eutervierteln (**i24h**), die darauf folgenden fünf aus Vierteln der externen Kontrolltiere (**c₁24h**). Die Gruppe **n24h** repräsentiert die Nachbarviertel eines infizierten Viertels und die Gruppe **c₂24h** kennzeichnet wiederum unbehandelte Kontrolltiere. **c₁24h** und **c₂24h** sind technische Replikate und ermöglichen den Vergleich der beiden separat durchgeführten Analysen **i24h** vs **c₁24h** und **n24h** vs **c₂24h**.

4.4.5 Analyse der Genontologien der differentiell exprimierten probe sets

Durch eine SOTA-Analyse gelang der Nachweis einer ausgeprägten lokalen Reaktion in infizierten Eutervierteln und einer ebenso ausgeprägten systemischen Reaktion des gesamten Euters. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welche Prozesse an beiden Reaktionen beteiligt sind. Dazu wurden die *probe sets* der SOTA-Cluster (Abb. 21) mit Hilfe des Panther-Genexpressions-Tools und mit dem CoPub-Keyword-Enrichment-Calculator untersucht. Bei diesen Analysen wurde von jedem *probe set* die zugehörige Genontologie ermittelt. Dann wurde überprüft, wie häufig die verschiedenen Ontologien in den untersuchten Clustern vorkommen. Ontologien, die häufiger vorkamen als es in einer vergleichbaren Liste zufällig ausgewählter Gene erwartet wurde, wurden als angereichert bezeichnet. In Abbildung 22 ist das Ergebnis dieser Analysen graphisch dargestellt. Ein

erster Blick auf die Farbverteilung zeigt, dass jedes der untersuchten Cluster ein charakteristisches Set an biologischen Prozessen, Pathways und molekularen Funktionen aufweist.

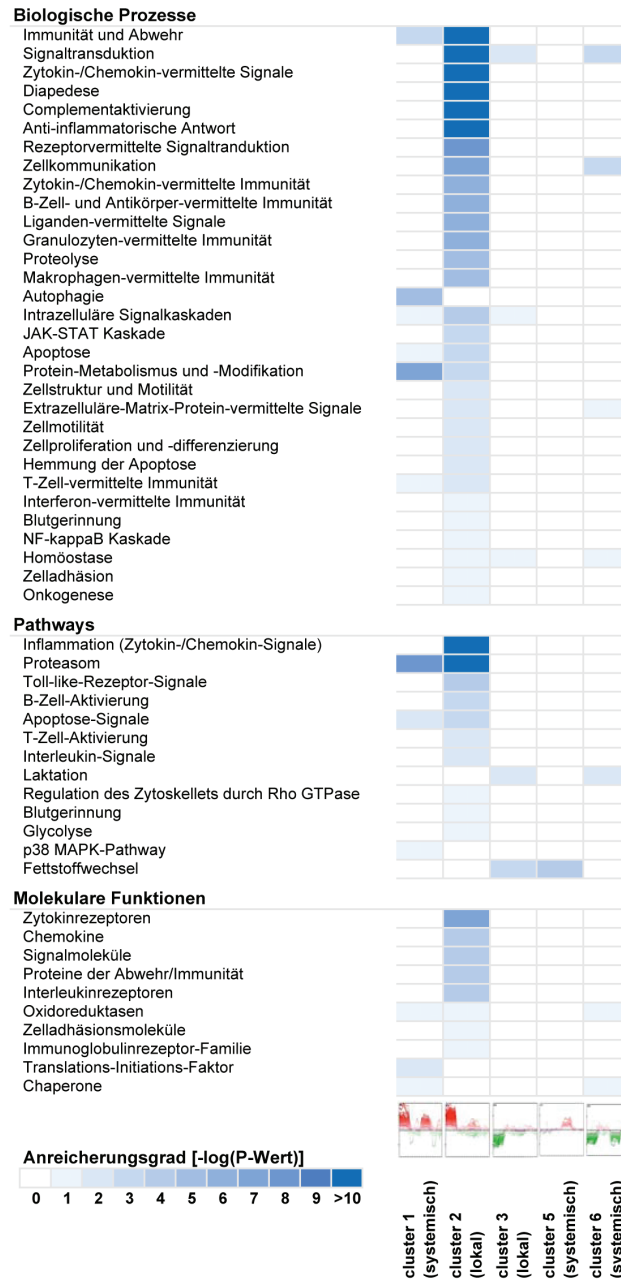


Abbildung 22: Anreicherung der Genontologien und Pathways innerhalb der SOTA-Cluster

Mittels SOTA-Analyse wurden 1934 differentiell exprimierte probe sets zu Clustern zusammengefasst (Abb. 21). Die probe sets von Cluster 1 bis 6 wurden mit dem Panther-Genexpressions-Tool und dem CoPub-Keyword-Enrichment-Calculator untersucht. Die Ergebnisse wurden für signifikant (p -Wert $< 0,1$) angereicherte biologische Prozesse, Pathways und molekulare Funktionen dargestellt. Der Farbton der Zellen gibt den Anreicherungsgrad wieder. Zellen mit p -Werten größer als der Schwellenwert von 0,1 sind weiß gefärbt. Mit zunehmendem Wert des Anreicherungsgrades steigt die Sättigung der blauen Farbgebung. Gene aus dem Cluster 4 der Abbildung 21 zeigten keine Anreicherung in einer der Kategorien und wurden deshalb in dieser Abbildung nicht berücksichtigt.

Charakterisierung der lokalen Reaktion 24 h nach der Infektion mit *E. coli* 1303

Die lokale Reaktion in infizierten Eutervierteln umfasst die *probe sets* der Cluster **2** und **3** (Abb. 21). Das Profil des Clusters 2 zeigt die intensivsten Blautöne und damit die höchsten Anreicherungswerte aller Cluster und beinhaltet die größte Anzahl an signifikanten biologischen Prozessen, Pathways und molekularen Funktionen. Unter den biologischen Prozessen sind Immunabwehr, Signaltransduktion und Chemotaxis sowie die Zelladhäsion und Diapedese besonders signifikant. Viele der gefundenen Gene dieses Clusters zählen zu den Akut-Phase Genen wie z.B. Haptoglobin (*HP*), Serumamyloid A3 (*SAA3*), Pentraxin 3 (*PTX3*) und das Ferritin-Leicht Polypeptid (*FTL*) und andere mit klassischen Entzündungsreaktionen assoziierte Gene. Unter den Pathways sind Inflammation und Proteasom am meisten signifikant. Diese Ergebnisse weisen auf eine aktive Immunabwehr und Entzündungsreaktion in den infizierten Eutervierteln hin. Die hoch signifikanten Werte für die anti-inflammatorische Antwort zeigen an, dass zum späten Zeitpunkt die Gegenreaktion des Euters auf die Infektion stark ausgeprägt ist. Die Pathways Laktation und Fettstoffwechsel fallen im Cluster 3, welches herabregulierte *probe sets* enthält, auf.

Charakterisierung der systemischen Reaktion 24 h nach der Infektion mit *E. coli* 1303

Die systemische Reaktion in infizierten Eutervierteln und den benachbarten nicht-infizierten Eutervierteln umfasst die *probe sets* der Cluster **1**, **4**, **5** und **6** (Abb. 21). Die Profile dieser Cluster zeigen nur einige wenige signifikante biologische Prozesse, Pathways und molekulare Funktionen und deren Anreicherungsgrad (Blauton) erreicht nicht die Werte der lokalen Reaktion. Unter den stärker exprimierten *probe sets* (Cluster **1**) sind die Pathways Proteasom und Apoptose am höchsten signifikant. An biologischen Prozessen zeigen Autophagie, Protein-Metabolismus und -Modifikation sowie Immunität und Abwehr die höchsten Anreicherungsgrade. Zudem sind die biologischen Funktionen Translationsinitiation, Oxidoreduktase und Chaperone schwach angereicht. Unter den *probe sets* mit herabregulierter Expression (Cluster **3** und **6**) fallen die biologischen Prozesse Signaltransduktion, Zellkommunikation, Extra-Zelluläre-Matrix-Protein-vermittelte Signale und Homöostase auf.

Diese Ergebnisse können als Hinweis auf eine Abwehr- und Immunreaktion betrachtet werden. Beispielsweise werden Komponenten der Antigenprozessierung und -präsentation stärker exprimiert. Auch Gene wie Chemokinligand 2 (*CXCL2*) und Chemokinligand 13 (*CXCL13*) waren systemisch stärker exprimiert. Unter den systemisch regulierten *probe sets* wurden hauptsächlich chemotaktische Zytokine vom CXC-Typ gefunden und im Gegensatz dazu bei der lokalen Reaktion hauptsächlich Zytokine vom CC-Typ.

Die gesteigerte Transkription von Glutathion Peroxidase (*GPX3*), Glutaredoxin 2 (*GLRX2*), Glutathion Reduktase (*GSR*), Glutathion Sythetase (*GSS*), Metallothionein 1E (*MT1E*), Metallothionein 2A (*MT2A*) und Superoxiddismutase (*SOD2*) weist auf erhöhten oxidativen

Stress in allen Eutervierteln hin. Xenobiotischer Stress zeigt sich durch die erhöhte Expression des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 2, Subgruppe 1 Alpha (*EIF2S1*) und seinem Zielgen dem Aktivierenden Transkriptionsfaktor 5 (*ATF5*). Gesteigert wird auch die Transkription von Genen mit antimikrobiellen Genprodukten wie Calgranulin A (*S100A8*), Calgranulin B (*S100A9*) oder Laktoferrin (*LTF*) und zudem von Akut-Phase Genen für die Detektion (Lipopolysaccharid-Bindungsprotein (*LBP*)) und Wachstumshemmung (Ceruloplasmin (*CP*)) von Erregern. Auch einige Faktoren des Komplementsystems, wie Komplement Komponente 6 (*C6*), Komplement Komponente 4-Bindungsprotein-Alpha (*C4BPA*), Komplement Faktor I (*IF*) weisen eine gesteigerte Transkriptionsrate auf.

Der Cluster 5 umfasst nur eine vergleichsweise geringe Anzahl von *probe sets*, deren Expression spezifisch in den nicht-infizierten Euterviertel gesteigert wird. Ein Großteil der Gene dieses Clusters wurde dem Pathway Fettsäurestoffwechsel zugeordnet.

Suche nach regulatorischen Elementen

Durch eine SOTA-Analyse konnten die differentiell exprimierten *probe sets* entsprechend ihrer Expression in infizierten und nicht-infizierten Eutervierteln in Gruppen eingeteilt werden, die einen gleichen Expressionsverlauf zeigten. Die gleichartige Regulation der Genexpression unter verschiedenen Bedingungen könnte darauf hinweisen, dass die gleichen regulatorischen Elemente an der Steuerung der Transkription beteiligt sind. Zur Identifizierung möglicher Transkriptionsfaktoren wurden die *probe sets* der Cluster 1 bis 6 (Abb. 21) annotiert und die erhaltenen Gene mit der Software oPOSSUM analysiert. Diese identifiziert mögliche Bindungsstellen von humanen Transkriptionsfaktoren innerhalb eines definierbaren Bereichs vor und nach dem offenen Leserahmen jedes humanen Gens. In der Tabelle 13 sind die gefundenen Transkriptionsfaktoren aufgelistet, deren Z-score mindestens 10 beträgt.

Tabelle 13: Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in den SOTA-Clustern

Cluster	TFBS	Distanz zur TSS [kb]	Gene	Z-score	Fisher score
1 (systemisch, 501 Gene)	TP53	5/2	3	15.6	2.6E-02
	FOXF2	2/0	37	10.4	2.2E-01
	NFIL3	2/2	70	9.7	2.9E-01
2 (lokal, 583 Gene)	RELA	2/2	146	19.9	2.5E-05
	ELF5	5/5	406	16.4	7.6E-04
	REL	2/2	223	14.3	8.4E-05
	NF-κB	2/2	171	13.1	3.3E-04
	RORA_2	5/2	84	12.4	1.5E-03
	SPIB	5/5	424	11.7	2.4E-02
3 (lokal, 173 Gene)	STAT1	5/5	85	10.7	1.5E-02
	HMG-IY	2/0	48	12.1	6.3E-04
	Pdx1	5/5	140	10.6	9.4E-04
	Hand1-Tcfe2a	2/2	111	10.6	2.4E-05

ERGEBNISSE

6 (systemisch, 256 Gene)	Nkx2-5	2/2	176	17.5	3.0E-05
	TBP	2/2	118	16.1	2.2E-06
	Pdx1	2/2	174	15.4	1.1E-05
	Prrx2	5/5	193	15.2	7.2E-05
	SRY	5/2	174	14.9	1.3E-04
	Foxa2	2/2	123	14.6	3.1E-07
	FOXI1	2/2	118	14.4	2.1E-05
	FOXD1	2/2	119	13.5	1.2E-07
	NFIL3	5/2	71	12.8	1.9E-04
	HLF	5/5	100	10.2	4.8E-04

Mittels SOTA-Analyse wurden 1934 differentiell exprimierte probe sets zu Clustern zusammengefasst (Abb. 21). Die probe sets von Cluster 1 bis 6 wurden annotiert und mit der Software oPOSSUM analysiert. Diese identifiziert mögliche Bindungssequenzen von humanen Transkriptionsfaktoren. Der Wert „Distanz zur TSS“ gibt den Sequenzbereich um die Startstelle der Transkription an, in dem Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren gesucht werden. Der Wert „Gene hits“ gibt die Anzahl der Gene des Clusters wieder, die Bindungssequenzen für den Transkriptionsfaktor aufweisen. Der Z-score bewertet die Häufigkeit der vorhanden Bindungssequenzen innerhalb des vorgegebenen Sequenzbereichs des untersuchten Gens und wird oberhalb von 10 als signifikant angesehen. Der Fisher score prüft, ob eine Bindungssequenz in einem Gen vorhanden ist und wird ab Werten signifikant, die unter 1% ($< 1.1E-01$) liegen.

Die oPOSSUM-Analyse lieferte für die Gene der Cluster 4 und 5 keine signifikanten Ergebnisse. Für alle anderen Cluster wurde jeweils ein charakteristisches Set von Transkriptionsfaktoren erhalten. Der große Teil der vorhergesagten Transkriptionsfaktoren wird bislang nicht im Bezug auf Mastitis beschrieben. Von den systemisch im gesamten Euter induzierten Genen des Clusters 1 haben 70 eine Bindungssequenz für NFIL3. Dieser Interleukin 3 regulierte nukleäre Faktor wird als Regulator inflammatorischer oder apoptotischer Gene beschrieben (Cowell, 2002). Die Gene des Clusters 2 (induziert lokal im infizierten Euterviertel) enthalten Bindungsstellen für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation von inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, wie z.B. REL, RELA, NFkB und STAT1. Weiterhin wird der Faktor ELF5 als möglicher Transkriptionsfaktor für 406 Gene gefunden. Dieser Faktor wird im Umfeld Laktation und Entwicklung der Milchdrüse beschrieben. 71 der Gene des Clusters 6 (systemisch, herabreguliert in infizierten und nicht-infizierten Eutervierteln) enthalten Bindungssequenzen für NFIL3. Dieser Faktor wurde auch als möglicher Transkriptionsfaktor für Gene im Cluster 1 gefunden, die nach Infektion mit *E. coli* systemisch induziert wurden. Dieser Faktor wirkt somit nach der Infektion mit *E. coli* sowohl als Aktivator (Gene des Clusters 1) als auch Suppressor (Gene des Clusters 6) der Genexpression im Milchdrüsengewebe infizierter und nicht-infizierter Euterviertel.

5 Diskussion

5.1 Das Tiermodell

Ziel dieser Arbeit war es, die Reaktion von bovinem Milchdrüsengewebe auf eine Infektion mit *E. coli* 1303 durch Analysen des Transkriptoms zu untersuchen und Gene zu erfassen, deren Expression durch die Infektion beeinflusst wird. Anhand der gefundenen Gene sollten die Prozesse identifiziert werden, die in der frühen und späten Phase der Infektion ablaufen. Grundlage für aussagekräftige Ergebnisse sind ein optimiertes Tiermodell zur Gewinnung der Gewebeproben und die Verfügbarkeit einer ausreichend hohen Anzahl von Proben.

Als Versuchstiere wurden 10 Deutsche Holstein Frisian in Hochlaktation eingesetzt, denen 500 KbE an *E. coli* 1303 in ein Euterviertel injiziert wurden. Die Versuchstiere waren nach strengen Vorgaben ausgewählt und im Sexualzyklus synchronisiert worden. Alle Tiere entwickelten innerhalb von 12 Stunden eine akute Mastitis mit moderatem Verlauf. Zeitgleich zeigten alle Tiere eine palpierbare Ödematisierung des infizierten Euterviertels sowie Veränderungen der Milchzusammensetzung mit Flockenbildung. Ein perakuter Verlauf mit hochgradiger Störung des Allgemeinbefindens konnte bei keinem der Versuchstiere beobachtet werden. Dies kann jedoch mit dem fortgeschrittenen Laktationsstadium begründet werden, da schwerwiegende *E. coli* Mastitiden meist nur im peripartalen Zeitraum auftreten (Burvenich et al., 2003). Die Milchleistung ging wie in der Literatur beschrieben (Shuster et al., 1996) innerhalb von 24 h um ca. 50% zurück und zwar sowohl in infizierten als auch nicht-infizierten Vierteln. Die infizierten Tiere zeigten nach 12 h eine signifikante Leukopenie im Blut. Auch konnten Unterschiede in der Zusammensetzung der Milchzellpopulation aller Viertel infizierter Tiere beobachtet werden. Zusammenfassend waren alle untersuchten klinischen Parameter wie z.B. die Milchmenge, die Anzahl der somatischen Zellen oder der Verlauf der Körpertemperatur bei allen Tieren gleich. Schwankungen im Verlauf der Infektion oder in der Stärke der Symptome, wie sie bei Infektionen mehrerer Tiere beschrieben sind (Kornalijnslijper et al., 2004), traten nicht auf. Dieses Ergebnis belegt, dass die Auswahlkriterien für das Tiermodell ideal für die geplanten Untersuchungen des Transkriptoms waren.

Das Euter der Kuh ist für Untersuchungen des Verlaufs von Infektionen mit *E. coli* anscheinend ideal geeignet. Man ging davon aus, dass die Infektion auf ein Euterviertel beschränkt bleibt und beobachtete in den benachbarten Eutervierteln keinen nennenswerten Anstieg der Anzahl somatischer Zellen in der Milch. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die Euterviertel eines Tieres unabhängig voneinander reagieren. Demzufolge wäre ein nicht-infiziertes Euterviertel die ideale Kontrolle für die Analyse der Genexpression in infizierten Nachbarvierteln, da beide unter identischen Bedingungen

vorbereitet wurden und darüber hinaus denselben Immunstatus haben sollten. Zudem ist eine Kontrollprobe aus demselben Tier auch aufgrund der genetischen Identität von Vorteil. Deshalb wurden zur Untersuchung von Mechanismen bei der Mastitis überwiegend Euterviertel des selben Tieres als Kontrolle verwendet (Swanson et al., 2009; Yang et al., 2008; Zheng et al., 2006). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Infektion eines Euterviertels das Verhalten der benachbarten Viertel beeinflusst (Merle et al., 2007). Folglich würden bei Verwendung tierinterner Kontrollen vor allem solche Effekte nicht erfasst werden können, die sowohl im infizierten als auch im nicht-infizierten Euterviertel ablaufen. Aus diesem Grund wurde der Versuchsansatz trotz hoher Kosten für zusätzlich benötigte Tiere und Analytik für die vorliegende Studie um gesunde Tiere als externe Kontrollen erweitert. Die Analysen der Genexpression wurden an Proben aus infizierten und nicht-infizierten Eutervierteln in der frühen Phase (6 h) oder späten Phase (24 h) der Infektion *E. coli* 1303 durchgeführt und zudem an Proben aus den Eutervierteln unbehandelter gesunder Tiere.

5.2 Genexpressionsänderungen in der Milchdrüse 6 h nach der Infektion mit *E. coli* 1303

Zum Zeitpunkt 6 h nach experimenteller Infektion mit *E. coli*, noch vor dem Einsetzen des Fiebers, konnten 13 differentiell exprimierte *probe sets* identifiziert werden. Diese konnten nur erfasst werden, wenn eine Rate von 10% an falsch positiven Ergebnissen zugelassen wurde, also unter wenig stringenten Bedingungen. Clusteranalysen der erstellten Expressionsprofile belegten, dass die niedrige Anzahl an gefundenen Genen nicht durch große Schwankungen in der Genexpression verursacht wurde. Die fünf Expressionsprofile der infizierten Euterviertel waren untereinander sehr ähnlich und stimmten zudem gut mit den Profilen der gesunden Euterviertel überein.

Dieses Ergebnis kann bedeuten, dass die Infektion nach 6 Stunden nur geringfügige Auswirkungen auf das Transkriptom der Milchdrüse hat. Unter Berücksichtigung des Volumens eines Euterviertels und der frühen Phase der Infektion ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass sich die Infektion gleichmäßig über das Eutergewebe ausgebreitet und alle milchbildenden Einheiten (Alveolen) erfasst hat. Für die Analyse der Genexpression wurde nur ein kleines Gewebestück von 100 mg eingesetzt und dementsprechend ist auch die Wahrscheinlichkeit gering, dass dieses Gewebestück vollständig infiziert ist. Deshalb kann angenommen werden, dass die Expression dieser 13 *probe sets* nicht durch die Infektion der untersuchten Gewebeprobe, sondern durch ein Signal gesteigert wird, das sich ausgehend von infizierten Bereichen auf umliegende Areale in der Milchdrüse ausbreitet. Dafür spricht, dass in der späten Phase der Infektion 8 der 13 *probe sets* im nicht-infizierten Euterviertel differentiell exprimiert waren.

Für einige Genprodukte der differentiell exprimierten *probe sets* wurden Funktionen beschrieben, die gut in das Umfeld des Infektionsgeschehens passen. Pentraxin 3 (*PTX3*), dessen Transkription 6 h nach experimenteller Infektion am stärksten von allen *probe sets* gesteigert wurde, ist bereits vor einigen Jahren im Zusammenhang mit entzündlichen Vorgängen beschrieben worden (Breviario et al., 1992). Zudem konnte vor kurzem gezeigt werden, dass seine Expression in bovinem Milchdrüsengewebe durch eine Infektion mit *S. aureus* beeinflusst wird (Lutzow et al., 2008). *PTX3* ist ein sezerniertes Glykoprotein, das sowohl an Mikroorganismen als auch an die erste Komponente des klassischen Komplement-Pathways C1q bindet (Bottazzi et al., 1997) und somit die Opsonisierung der Bakterien bzw. die Aktivierung dieses Pathways fördert. Auch wurde Pentraxinen generell eine große Bedeutung bei der Fc γ -vermittelten Aktivierung der Phagozytose und Zytokinsekretion von Leukozyten zugesprochen (Lu et al., 2008).

Das am zweitstärksten hochregulierte Gen *NRG1* kodiert für ein Protein aus der Familie der Wachstumsfaktoren. Dieses überträgt ähnlich dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF Signale über transmembrane Tyrosinkinase-Rezeptoren der ERBB-Familie und ist sowohl an der Entwicklung als auch der Differenzierung der Milchdrüse während der Laktation beteiligt (Stern, 2003; Sternlicht, 2006). Auch sollen Neureguline anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen (Cannella et al., 1998; Dimayuga et al., 2003). Es wird vermutet, dass *NRG1* mit dem Transkriptionsfaktor NF κ B interferiert, der eine Reihe entzündlicher Reaktionen vermittelt (Ghosh et al., 1998). *NRG1* senkt die Expression verschiedener Gene wie *CD44* und *ICAM*, die an der Leukozytenmigration bzw. -aktivierung beteiligt sind (Xu et al., 2005). Dies deutet darauf hin, dass *NRG1* einer akuten Immunantwort entgegenwirkt. Tatsächlich wird diesem Protein ein neuroprotektiver Effekt durch die Unterdrückung des Interleukin-1 β mRNA-Levels (Xu et al., 2004) sowie die Aktivierung des Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase/Akt-Signalpathways zugesprochen (Buonanno and Fischbach, 2001; Li et al., 2003).

Unter den differentiell exprimierten *probe sets* finden sich auch die Krüppel-like-Faktoren *KLF5* und *KLF6*. Diese beeinflussen Signaltransduktion, Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese und regulieren dadurch die Zellentwicklung und -differenzierung (Bieker, 2001; Black et al., 2001; Suzuki et al., 2005). Es wird beschrieben, dass LPS unter Beteiligung von MAP-Kinasen die Expression von *KLF5* erhöht. *KLF5* wiederum aktiviert den NF κ B-Pathway und induziert dadurch die Expression pro-inflammatorischer Gene (Chanchevalap et al., 2006).

Zudem spielt *KLF5* bei der Rekrutierung von Leukozyten durch die Induktion von *ICAM1* eine wichtige Rolle (Chanchevalap et al., 2006). Somit könnte bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Grundstein für eine effektive Immunabwehr gelegt werden.

Tribbles-homog 3 (*TRIB3*) entspricht einem weiteren *probe set* mit gesteigerter Expression in der frühen Phase der Infektion. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *TRIB3* selektiv die Aktivierung von ERKs, JNKs und p38 MAPK reguliert (Kiss-Toth et al., 2004). Demnach

könnte die Induktion von *TRIB3* in der Milchdrüse sowohl eine Proliferation und Differenzierung des Gewebes fördern, oder aber apoptotische Funktion ausüben.

Mit Ausnahme von *PTX3* wurde noch keines der zum frühen Zeitpunkt differentiell exprimierten Gene im Zusammenhang mit einem entzündlichen Geschehen in der Milchdrüse beschrieben. Dies weist darauf hin, dass diese Gene an einem neuen, bislang unbekanntem Prozess beteiligt sein könnten, der in infizierten Eutervierteln in der frühen Phase der Infektion abläuft.

5.3 Genexpressionsänderungen in der Milchdrüse 24 h nach Infektion mit *E. coli*

5.3.1 Auswirkung der Infektion mit *E. coli* 1303 auf infizierte und nicht-infizierte Euterviertel

In der späten Phase der Infektion wurden zwei Transkriptomanalysen durchgeführt. Expressionsprofile von gesunden Eutervierteln gesunder Kühe wurden entweder mit denen von infizierten Eutervierteln oder mit denen von benachbarten nicht-infizierten Eutervierteln verglichen. Clusteranalysen zeigten, dass sich die Expressionsprofile der infizierten und nicht-infizierten Eutergewebsproben stark unterschieden. In infizierten Eutervierteln fand eine sehr ausgeprägte Änderung der Genexpression statt, von der mehr als 1700 *probe sets* betroffen waren. Alle infizierten Euterviertel zeigten einheitlich dieselbe starke Reaktion auf die Infektion mit *E. coli* 1303. Dies weist darauf hin, dass die infizierten Euterviertel aller Tiere gleichartig auf die Infektion reagieren. Dies könnte mit der Pathogenizität von *E. coli* 1303 zusammenhängen. Im Vergleich dazu war die Änderung der Genexpression in den benachbarten, nicht-infizierten Eutervierteln viel schwächer und nur 400 *probe sets* wurden differentiell exprimiert. Die Veränderungen der Expressionsmuster der verschiedenen Tiere waren unterschiedlich stark ausgeprägt. Eines der Tiere zeigte so schwache Änderungen, dass es den Expressionsprofilen der gesunden Euterviertel zugeordnet wurde. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die systemische Reaktion von tierindividuellen Faktoren beeinflusst wird, auch wenn die Tiere nach strengen Kriterien besonders im Bezug auf die Eutergesundheit ausgewählt wurden.

5.3.2 Nachweis einer lokalen und einer systemischen Reaktion in der Milchdrüse

Ein Vergleich aller etwa 2000 differentiell exprimierten *probe sets* ergab, dass etwas mehr als 200 *probe sets* sowohl in infizierten als auch in nicht-infizierten Eutervierteln gefunden wurden. Diese Schnittmenge war ein erster Hinweis darauf, dass im untersuchten Tiermodell zwei verschiedene Prozesse als Reaktion auf die Infektion mit *E. coli* stattfinden. Der eine läuft nur in infizierten Eutervierteln ab und ist damit lokal begrenzt, der andere läuft in infizierten und nicht-infizierten Eutervierteln ab und ist damit systemisch. Der systemische

Prozess konnte nur durch den Vergleich mit gesunden Eutervierteln gesunder Tiere als externe Kontrolle erfasst werden und ist bislang im Umfeld der Mastitis noch nicht beschrieben worden. Der Grund dafür ist, dass vergleichbare Untersuchungen ohne externe Kontrolltiere durchgeführt wurden (Swanson et al., 2009; Yang et al., 2008; Zheng et al., 2006). Dagegen konnte in einer kürzlich durchgeführten Studie gezeigt werden, dass die Infusion von LPS in ein Euterviertel das Transkriptom der Leber der behandelten Milchkühe beeinflusst (Jiang et al., 2008). Diese Studie belegt, dass der systemische Prozess nicht nur wie in dieser Arbeit beschrieben die benachbarten Euterviertel beeinflusst, sondern auch weit entfernt liegende Organe wie die Leber. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es Übereinstimmungen zwischen den gefundenen Änderungen des Transkriptoms der Leber (Jiang et al., 2008) und der systemischen bzw. der lokalen Reaktion im Euter gibt. Der Vergleich der Ergebnisse wurde unter Verwendung der Gene-Set Enrichment Analyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Änderungen der Genexpression in der Leber eine größere Ähnlichkeit mit den systemisch regulierten *probe sets* hat als mit lokal regulierten Genen in infizierten Vierteln (Daten nicht gezeigt).

5.3.3 Umfang der lokalen und der systemischen Reaktion

Die differentiell exprimierten *probe sets* wurden unter strengen Bedingungen ausgewählt (Schwellenwert der Expression: 2 facher Unterschied, Anzahl an falsch Positiven: 1%), so dass *probe sets* mit geringen Expressionsunterschieden nicht als differentiell exprimiert gewertet wurden. Die rund 200 gefundenen *probe sets*, die sowohl in infizierten als auch nicht-infizierten Eutervierteln gemeinsam als differentiell exprimiert gefunden wurden, könnten demzufolge nur einen Teil der systemisch ablaufenden Prozesse abbilden. Um das Ausmaß der systemischen und lokalen Reaktion genau zu erfassen, wurden alle differentiell exprimierten *probe sets* mit dem SOTA-Algorithmus analysiert. Dieses Clusterverfahren untersucht die Expressionsprofile von mehreren Analysen nach Ähnlichkeiten im Verhalten der Genexpression und ordnet die *probe sets* in Gruppen mit gleichem Expressionsverlauf. Die SOTA-Analyse teilte die untersuchten *probe sets* prinzipiell in zwei Gruppen ein. Wie erwartet, wird die eine nur in infizierten Eutervierteln differentiell exprimiert, die andere in infizierten Eutervierteln und in nicht-infizierten Eutervierteln. Der Umfang beider Gruppen war jedoch größer, als es die oben beschriebene Schnittmenge von ~200 *probe sets* hätte erwarten lassen. Beide Gruppen umfassten jeweils etwa 900 *probe sets* und waren damit im Bezug auf die Anzahl der betroffenen *probe sets* vergleichbar ausgeprägt. Der große Unterschied zwischen der ursprünglichen Schnittmenge von 200 differentiell exprimierten *probe sets* und 900 *probe sets* pro Gruppe ist darauf zurückzuführen, dass der SOTA-Algorithmus primär nicht nach der Höhe von Expressionsunterschieden einteilt, sondern nach dem Verlauf der Genexpression in den Expressionsprofilen.

5.3.4 Strategie der Auswertung

Die wenigen differentiell exprimierten Gene der frühen Phase der Infektion wurden alle auf mögliche Funktionen und ihre Rolle im Infektionsgeschehen ausgewertet. Ein solches Vorgehen ist bei der großen Zahl von *probe sets*, die jeweils an der lokalen oder systemischen Reaktion der Milchdrüse in der späten Phase der Infektion beteiligt sind, nicht möglich. Deshalb wurde untersucht, zu welchen Genontologien die differentiell exprimierten Gene zugeordnet werden können. Auch wurde nach Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren auf den entsprechenden Genen gesucht, um so regulatorische Elemente zu erfassen, die möglicherweise die Expression der differentiell exprimierten Gene steuern. Dadurch sollte ermittelt werden, welche Prozesse bei der lokalen und systemischen Reaktion ablaufen und wie sich diese unterscheiden.

5.3.5 Analyse der *probe sets* der lokalen Reaktion auf eine Infektion mit *E. coli* 1303

Die *probe sets*, die der lokalen Reaktion in infizierten Eutervierteln zugeordnet wurden, sind hauptsächlich an Prozessen der Immunabwehr, der Entzündung, Akut-Phase Antwort und in der Chemokin-Zytokin-Signalübertragung beteiligt.

Einer der wichtigen Immunmechanismen des angeborenen Immunsystems ist der TLR4-Pathway. Unter den differentiell exprimierten *probe sets* befinden sich Gene für die Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) TLR2 sowie TLR4 sowie dessen Hilfsproteine LBP und CD14. Diese erkennen das bakterielle Oberflächenmolekül Lipopolysaccharid (LPS = PAMP; pathogen associated molecular pattern). Die Bindung von LPS löst über intrazelluläre Signalmoleküle wie z.B. MyD88 zwei verschiedene Signalkaskaden aus, nämlich die I κ B/NF κ B- und die MAPK-Kaskade (Chen et al., 2004). Die Transkription von *MyD88* wurde durch die Infektion signifikant gesteigert. Die I κ B/NF κ B-Kaskade aktiviert die NF κ B-Transkriptionsfaktorfamilie, während die MAPK-Kaskade über die MAP-Kinasen (p38 und JNK) zur Aktivierung der AP1-Transkriptionsfaktorfamilie führt. Die Transkription der gängigsten Dimerformen von NF κ B und AP1, p50 (NF κ B1)/p65 (RELA) beziehungsweise FOS/JUN wurde bis auf p65 durch die Infektion erhöht. Auch konnte eine gesteigerte Expression von Zielgenen nachgewiesen werden, welche an der inflammatorischen Antwort und der Chemotaxis beteiligt sind, wie z.B. eine Reihe von Zytokinen. So wird die Transkription von *IL1B*, welches für ein pro-inflammatorisches Zytokin kodiert, durch die Infektion gesteigert. Es ist weiter beschrieben, dass IL1B in der Leber zur Produktion von Akut-Phase Proteinen (Ganter et al., 1989) führt. Vor kurzem konnten Akut-Phase Proteine in der Milch infizierter Tiere nachgewiesen werden (Gronlund et al., 2005). Die gesteigerte Transkription der Gene für die Akut-Phase Proteine HP und SAA3 in infizierten Eutervierteln deutet darauf hin, dass diese Proteine als Antwort auf die Infektion synthetisiert werden. Die Funktion von Akut-Phase Proteinen ist nicht restlos geklärt, aber sie scheinen bei der

Leukozytenattraktion eine große Rolle zu spielen (Badolato et al., 1994). Durch die Infektion mit *E. coli* 1303 wurde die Expression von *CEBPB*, *STAT3* und *CEBPD* gesteigert. Diese Transkriptionsfaktoren können über IL1B die Expression von Akut-Phase Genen steigern (Poli, 1998).

Vor kurzem wurde beschrieben, dass Zytokine wie IL1B die Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen induzieren und damit die Adhäsion und Diapedese von Leukozyten fördern (Zheng et al., 2006). Adhäsionsmoleküle sind oberflächliche Glykoproteine und interagieren mit inflammatorischen Zellen, um deren Rekrutierung und Invasion in das entzündete Gewebe zu fördern. In infizierten Eutervierteln wurde die Transkription der Gene einer ganzen Reihe solcher Zelladhäsionsmoleküle (*CD68*, *ICAM1*, *2*, *VCAM1*, *EVA1*, *ITGAL*, *ITGAX*, *ITGB2*, *3*, *6*, *SELL*, *SELP*) gesteigert, welche zusammen mit den induzierten Chemokinen, Chemokinrezeptoren und anderen chemotaktisch wirkenden Faktoren die Infiltration von Immunzellen ins Milchdrüsengewebe bedingen.

Der rasche Einstrom von Immunzellen, im speziellen von Neutrophilen, in die Milchdrüse und die effektive Elimination von Pathogenen zum frühesten Zeitpunkt einer Infektion sind die Schlüsselfaktoren einer Wirtsabwehr gegen eindringende Pathogene (Paape et al., 2002). Andererseits ist eine zu starke, aber ineffektive Immunantwort schädlich für den Wirt und kann aufgrund eines hypovolämischen Schocks zum Tod führen. Deshalb muss die Immunantwort reguliert werden, um die maximale Abwehrkraft beizubehalten. Interleukine aktivieren Leukozyten, amplifizieren Fieberreaktionen und triggern Akut-Phase-Reaktionen peripherer Organe. Diese Reaktionen werden von IL1RN, einem IL1-Rezeptor Antagonisten gehemmt (Steinkasserer et al., 1992). Die beobachtete gesteigerte Transkription von IL1RN lokal in infizierten Eutervierteln deutet darauf hin, dass in der späten Phase der Infektion die Immunantwort zurückgefahren wird um beispielsweise die Milchdrüse vor pro-inflammatorischen Kaskaden zu schützen. Dafür spricht auch die gesteigerte Expression von Genen, welche die TLR-Signalkaskade negativ beeinflussen. Hemmer der Zytokin-Signaltransduktion (Suppressors of cytokine signaling = SOCS) sind an der negativen Feedback-Regulation von verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden, wie dem JAK/STAT- und TLR4-Pathway, beteiligt (Heeg and Dalpke, 2003; Larsen and Ropke, 2002). Es wurde beschrieben, dass die Überexpression von *SOCS1* in Makrophagen zu einer Hemmung einer LPS-induzierten NFκB-Aktivierung führt. *SOCS1* war nicht unter den differentiell exprimierten Genen, wohl aber dafür *SOCS3*, ein anderes Mitglied der SOCS-Familie. Ein weiterer Hinweis für ein Eindämmen der Immunantwort in der späten Phase der Infektion ist die gesteigerte Expression von *IκBα* (*NFκBIA*), einem Inhibitor der IκB/NFκB-Kaskade.

Die Ergebnisse der durchgeführten Analysen lassen keinen Rückschluss darauf zu, welcher Zelltyp der komplex aufgebauten Milchdrüse die beschriebenen Reaktionen steuert. Makrophagen und neutrophile Granulozyten können Zytokine, Chemokine und andere inflammatorische Mediatoren synthetisieren. Möglicherweise sind aktivierte eingewanderte

oder residente Immunzellen zumindest zum Teil dafür verantwortlich. Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch Epithelzellen maßgeblich an der Abwehr von Pathogenen beteiligt sind. Für Milchdrüsenepithelzellen konnte gezeigt werden, dass sie zumindest *in vitro* Zytokine, Chemokine sowie Akut-Phase Proteine produzieren können (Okada et al., 1997; Strandberg et al., 2005; Wellnitz and Kerr, 2004).

Ein weiterer wichtiger Prozess bei der Wechselwirkung zwischen Pathogen und Milchdrüse ist die Apoptose. So wurde berichtet, dass bakterielle Erreger Apoptose induzieren können (Weinrauch and Zychlinsky, 1999). Das Pathogen *E. coli* kann *in vivo* den programmierten Zelltod hervorrufen und trägt damit bei einer Mastitis maßgeblich zum Abfall der Milchleistung bei (Long et al., 2001). Unter den differentiell exprimierten Genen waren sowohl proapoptotische wie *CASP4* und *CASP7* als auch antiapoptotische wie *BIRC1*, *2*, *3* und *BCL2A1*. Dieses spricht dafür, dass die Apoptose in der späten Phase der Infektion moduliert wird.

Die Analyse der Genontologien der differentiell exprimierten *probe sets* ergab, dass in der späten Phase der Infektion vermehrt Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren transkribiert wurden, die an der Zellproliferation beteiligt sind. Zelluläre regulatorische Prozesse sind zum Schutz des betroffenen Gewebes und somit für den Verlauf einer Infektion wichtig. Hierzu zählen zum Beispiel Vorgänge der Feinregulation des Zellstoffwechsels, welche durch die schnelle Aktivierung oder Deaktivierung von Proteinen oder Enzymen gesteuert werden. Die verstärkt exprimierten Transkriptionsfaktoren gehören zu den sogenannten frühen Transkriptionsfaktoren, oder „immediate early genes“ (IEGs), und werden als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli, wie z.B. Hormone oder Stress rapide induziert (Schuurs et al., 2004).

Zur weiteren eingehenden Analyse der differentiell exprimierten Gene wurde nach potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren gesucht. Dabei wurde neben den klassischen Transkriptionsfaktoren wie z.B. NFκB und STAT1 noch ein weiterer identifiziert, der so genannte Ets Transkriptionsfaktor ELF5. Dieser prolactinregulierte Faktor ist in vielen Drüsengeweben vorzufinden und wird als Hauptregulator der Alveolarentwicklung und Differenzierung des sekretorischen Epithels in der Milchdrüse angesehen (Choi et al., 2009; Lapinskas et al., 2004; Oakes et al., 2008). Möglicherweise weist die erhöhte Expression von Genen, die über ELF5 reguliert werden, auf die Regeneration des milchbildenden Gewebes in der späten Phase der Infektion hin. Diese Annahme wird gestützt durch die Anreicherung der Genontologie-Kategorien der Blutgerinnung, Zellproliferation und –differenzierung im Clusters 2 (Abb. 22). Unter den differentiell exprimierten Genen finden sich auch solche, deren Expression im infizierten Euter gesenkt wurde. Die Gene dieser Gruppe (Abb. 22, Cluster 3) wurden den Genontologien „Laktation“ und „Lipidstoffwechsel“ zugeordnet. Dies würde den vermindertem Fettgehalt der Milch während einer Mastitis erklären (Bansal et al., 2005) und auch den beobachteten Rückgang der Milchleistung bei allen infizierten Tieren in der späten Phase der Infektion. Dieser könnte jedoch auch auf einen Mangel verfügbarer Nährstoffe durch die Einstellung der Nahrungsaufnahme zurückzuführen sein (Lohuis et al.,

1988). Eine schwächere Expression wurde auch für die Arachidonat-15-Lipoxygenase gefunden, welche die Synthese pro-inflammatorischer Leukotriene katalysiert, die eine Rolle bei der Differenzierung von dendritischen Zellen spielen (Okunishi et al., 2004).

5.3.6 Analyse der *probe sets* der systemischen Reaktion auf eine Infektion mit *E. coli* 1303

Die *probe sets* der lokalen Reaktion konnten durch Genontologieanalysen (Abb. 22) eindeutig und mit sehr hoher Signifikanz definierten Prozessen oder Funktionen zugeordnet werden. Bei den *probe sets* der systemischen Reaktion in infizierten und deren benachbarten nicht-infizierten Eutervierteln waren diese Ergebnisse weit weniger signifikant. Sie sind funktionell sehr breit gefächert, wobei die angereicherten Prozesse die Chemokin-Zytokin-Signalübertragung, den Abbau von oxidativen Stress, die Apoptose und Autophagie sowie die Antigenprozessierung und –differenzierung umfassen.

In allen Eutervierteln konnte eine gesteigerte Expression einiger Zytokin- und Chemokingene nachgewiesen werden. Diese kleinen sezernierten Moleküle spielen bei der Immunantwort eine bedeutende Rolle. Sie vermitteln inflammatorische Signale und locken verschiedene Subpopulationen von Leukozyten an. Chemokine werden in zwei Subgruppen eingeteilt: C-X-C und C-C, je nach Vorhandensein einer Aminosäure zwischen den ersten beiden Cystein-Resten des 4-Cystein-Grundmotivs.

Eine detaillierte Analyse der beteiligten Chemokine lieferte ein bemerkenswertes Ergebnis. Während Chemokine des CC-Typs ausschließlich in infizierten Vierteln hochreguliert wurden, wurde die Expression vieler CXC-Chemokine systemisch auch in nicht-infizierten Eutervierteln gesteigert. Im Allgemeinen bewirken CXC-Chemokine einen Einstrom von neutrophilen Granulozyten, während CC-Chemokine mononukleäre Zellen anlocken (Kurihara and Bravo, 1996). Auch sei zu erwähnen, dass die Genprodukte von *CXCL2* und *CXCL13*, welche systemisch in ihrer Expression erhöht wurden, antimikrobielle Eigenschaften gegen *E. coli* aufweisen (Yang et al., 2003) und somit möglicherweise einer Invasion nicht-infizierter Viertel mit *E. coli* entgegenwirken. Eine weitere Gruppe pro-inflammatorischer Zytokine stellt die Familie der kalziumbindenden Proteine dar (Heizmann, 2002). Dazu gehören *S100A8* (Calgranulin A) und *S100A9* (Calgranulin B), deren Genexpressionsraten systemisch erhöht waren (lfc 2,6 bzw. 2,2). Diesen multifunktionellen Proteinen wird unter anderem die Eigenschaft zugeschrieben, ebenfalls die Migration von PMNs zu fördern (Ryckman et al., 2003), wobei sie an Zelloberflächen kummulieren und durch Interaktionen mit karboxylierten Glykanen die Bindung von Phagozyten auf dem Gefäßendothel vereinfachen (Bailly et al., 2002; Bouma et al., 2004). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Einstrom von Neutrophilen und PMNs exakt gesteuert wird. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass eine akute mikrobielle Mastitis die Anzahl

der somatischen Zellen in der Milch infizierter Euterviertel erhöht. In benachbarten Eutervierteln bleibt die Zahl der somatischen Zellen relativ unverändert, während sich trotzdem der Anteil der PMNs an den somatischen Zellen erhöht (Merle et al., 2007). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der somatischen Zellen in infizierten Eutervierteln im Verlauf der Infektion dramatisch ansteigt, während sie in den benachbarten nicht-infizierten Eutervierteln relativ unverändert bleibt (Abb. 8 C).

Systemisch wird weiters die Expression von Genen induziert, die einem oxidativen Stress entgegenwirken. Dies ist ein indirekter Hinweis darauf, dass als Reaktion auf die Infektion metabolisch aktive polymorphkernige Leukozyten (PMN) in alle Euterviertel einströmen und dort durch ihre Aktivierung oxidativen Stress erzeugen.

Verglichen mit der lokal ablaufenden Reaktion waren systemisch nur wenige Gene der Immunabwehr differentiell exprimiert. Demzufolge muss davon ausgegangen werden, dass systemisch keine vollständige Immunantwort abläuft sondern vielmehr eine ausbalancierte Vorbereitung auf eine Immunantwort. Dafür spricht beispielsweise die Induktion von antiapoptotischen Genen (*CFLAR*, *MCL1*) als Antwort auf eine gesteigerte Expression von Apoptosegenen, welche zur Exfoliation der mit Bakterien behafteten Epithelien führen (Mysorekar et al., 2002). Dies könnte als eine ausgleichende Gegenreaktion angesehen werden, um die Funktion des Milchdrüsenepithels zumindest zum Teil aufrecht zu erhalten. Die Untersuchung von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in den differentiell exprimierten Genen identifizierte den Interleukin3-regulierten nukleären Faktor (NFIL3) und zwar als potentiellen Regulator sowohl von Genen mit gesteigerter als auch solchen mit erniedrigter Transkriptionsrate. Studien an Mäusen weisen darauf hin, dass Nfil3 eine bedeutende Rolle bei der funktionellen Regulierung des Milchdrüsenepithels spielt (Rudolph et al., 2007). Die erhöhte Expression von *NFIL3* könnte demnach auf Umstrukturierungen des Epithels in beiden, infizierten und benachbarten nicht-infizierten Vierteln hinweisen. Damit könnte auch der beobachtete, generelle Milchleistungsabfall in allen Vierteln (Abb. 8 D) als Konsequenz einer veränderten Epithelzellfunktion erklärt werden. Die Aussagekraft dieser theoretisch errechneten Beteiligung von NFIL3 an der Regulation der Genexpression wird dadurch untermauert, dass schon in der frühen Phase der Infektion eine signifikant gesteigerte Transkription von *NFIL3* nachgewiesen werden konnte.

5.3.7 Biologische Bedeutung einer systemischen Reaktion nach Infektion mit *E. coli* 1303

Die gefundenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach einer Infektion der Milchdrüse Signale an das umliegende Gewebe und die benachbarten Viertel weitergeleitet werden. Dies wird bereits 6 h nach Infektion durch die verstärkte Expression von *NFIL3* angezeigt. Die Signale lösen eine systemische Reaktion in allen

Eutervierteln aus, welche in Folge dessen die Vermehrung des Pathogens in den benachbarten Vierteln verhindert und die Progression der Infektion in den infizierten Vierteln beeinflusst. Diese Hypothese erklärt, warum bei zeitversetzten Inokulationen von verschiedenen Eutervierteln mit dem gleichen Bakterien-Titer nur in dem erstinfizierten Viertel ein Leukozyteneinstrom beobachtet wird (Petzl, 2005; Yang et al., 2008). Auch könnte damit das Auftreten von rezidivierenden Mastitiden in verschiedenen Eutervierteln durch denselben Stamm von *E. coli* erklärt werden (Dopfer et al., 1999). Der Erreger wird möglicherweise zeitversetzt von dem zuerst infizierten Viertel auf das benachbarte übertragen, aber die angeschaltete systemische Reaktion hemmt die Multiplikation des Pathogens in später infizierten Vierteln. Dennoch kann sich das Pathogen dort einnisten und verursacht nach Abklingen der systemischen Reaktion eine Mastitis der betroffenen Viertel.

5.3.8 Die Immunantwort im Euter als Summe von lokalen und systemischen Prozessen

Vor kurzem haben Jenner und Young die Ergebnisse von verschiedenen Transkriptomanalysen zur Immunantwort auf verschiedene Pathogene miteinander verglichen und die übereinstimmenden Prozesse in einer Abbildung zusammengefasst (Jenner and Young, 2005). In das Gerüst dieser Abbildung wurden die Ergebnisse der Expressionsanalysen der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Von den ursprünglichen Genen wurden nur die übernommen, die auch im Euter des Rindes gefunden wurden. Erhalten wurde ein detailliertes Bild der Immunreaktion in der Milchdrüse des Rindes in der späten Phase der Infektion mit *E. coli* 1303 (Abb. 23). Es gibt die Prozesse wieder, die auf Ebene des Transkriptoms ablaufen und unterteilt diese in lokale, die nur in infizierten Eutervierteln stattfinden und solche, die systemisch sowohl in infizierten als auch nicht-infizierten Eutervierteln nachgewiesen wurden. Zusätzlich zum ursprünglichen Konzept von Jenner und Young kann aus der Abbildung 23 noch ersehen werden, ob der angegebene Faktor als Reaktion auf die Infektion stärker oder schwächer exprimiert wird.

Aus der Abbildung 23 geht hervor, wie komplex die Immunreaktion im infizierten Euter abläuft. Die erfassten Prozesse insbesondere solche, die systemisch ablaufen, können möglicherweise als Grundlage für eine Selektion auf Widerstandsfähigkeit gegen *E. coli* induzierte Mastitiden dienen.

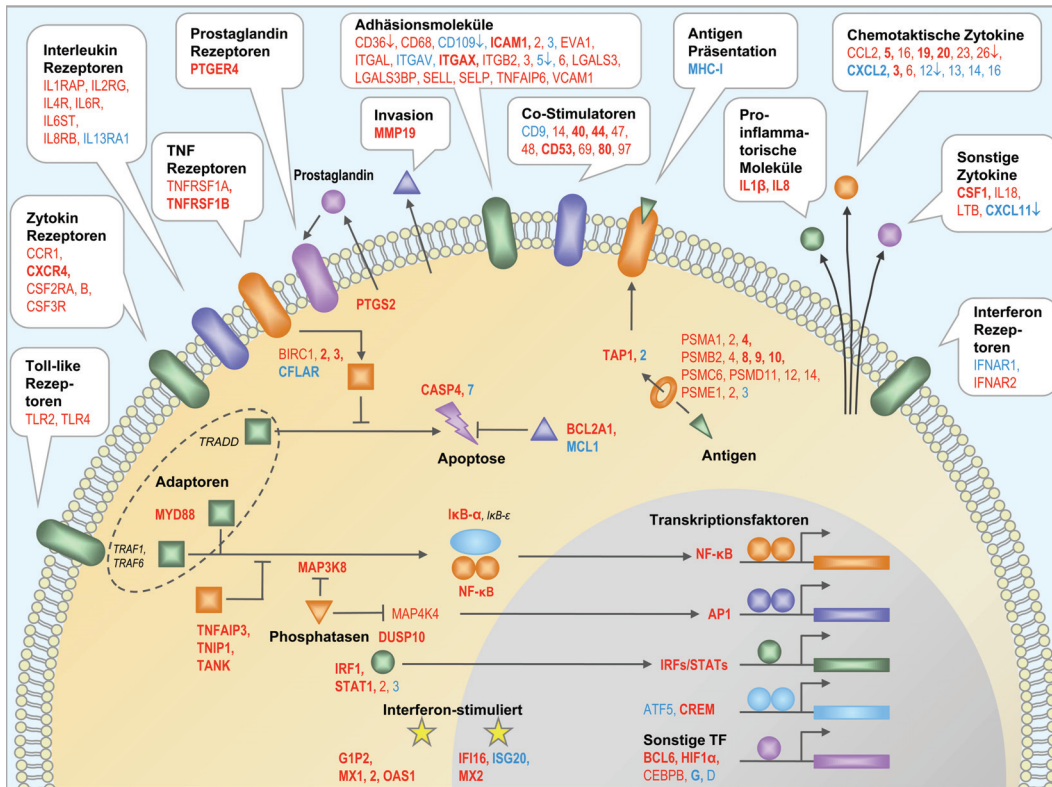


Abbildung 23: Lokale und systemische Immunantwort in der Milchrüse des Rindes 24 h nach Infektion mit E. coli 1303

Die Graphik beruht auf einem Konzept von Jenner und Young (Jenner and Young, 2005). Die dort dargestellten Ergebnisse von Transkriptionsstudien der Immunreaktion wurden um die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzt. Angegeben sind differentiell exprimierte Gene im Milchrüsen-gewebe des Rindes nach Infektion mit E. coli. Rot markierte Gene werden lokal in infizierten Eutervierteln exprimiert, blau markierte systemisch in infizierten und nicht-infizierten Eutervierteln. Fett gekennzeichnet sind Übereinstimmungen mit Daten der ursprünglichen Abbildung (Jenner and Young, 2005). Alle nach Infektion mit E. coli 1303 schwächer transkribierte Gene sind mit einem nach unten weisenden Pfeil gekennzeichnet. Die stärker exprimierte Gene sind nicht gekennzeichnet. Die Füllfarben der Formen sind willkürlich gewählt und geben keinen Hinweis auf Signalkaskaden.

5.4 Fazit und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkung einer Infektion mit E. coli 1303 auf das Transkriptom des Milchrüsen-gewebes in der frühen (6 h) und späten (24 h) Phase der Infektion zu untersuchen. Differentiell exprimierte Gene sollten erfasst und charakterisiert werden. Für die Untersuchungen wurde die Affymetrix-Microarray-Technologie eingesetzt. Diese kann ausgehend von Gesamt-RNA in einer Hybridisierungsreaktion die Expressionsraten von etwa 20.000 Genen in einem Experiment bestimmen und ermöglicht damit die fast vollständige Erfassung aller mRNAs des Transkriptoms. Die Gewebeproben für diese Untersuchungen wurden aus besonders sorgfältig ausgewählten Milchkuhen

gewonnen. Durch strenge Auswahlkriterien im Bezug auf die Eutergesundheit, den Lakationsstatus und exakt definierte Infektionsbedingungen konnten mit einer Infektionsdosis von 500 KbE *E. coli* innerhalb von 12 h reproduzierbar Symptome einer akuten klinischen Mastitis ausgelöst werden. In der frühen Phase verursachte die Infektion keine nachweisbaren klinischen Symptome und nur minimale Änderungen des Transkriptoms. Möglicherweise hatte sich *E. coli* in der frühen Phase der Infektion noch nicht bis zur beprobten Stelle der Milchdrüse ausgebreitet und die Analysen erfassten das Einsetzen einer systemischen Reaktion, die in der späten Phase der Infektion sehr viel stärker ausgeprägt sein kann. Dafür spricht, dass die Mehrzahl der frühen Gene in der späten Phase als systemisch regulierte Gene gefunden wurde. Zur Klärung dieses Sachverhalts müsste eine höhere Anzahl von Gewebeproben gewonnen und ihr Gehalt an *E. coli* bestimmt werden. Dadurch wird einerseits die Wahrscheinlichkeit erhöht, ein infiziertes Gewebestück zu untersuchen und andererseits könnte analysiert werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Konzentration des Erregers in der Gewebeprobe und der Auswirkung auf das Transkriptom gibt.

In der späten Phase verursachte die Infektion lokal in infizierten Eutervierteln umfangreiche Änderungen des Transkriptoms und vergleichbar große Änderungen in infizierten und nicht-infizierten Eutervierteln. Die zweite, systemische Reaktion konnte nur über einen Vergleich mit Gewebeproben aus gesunden Eutervierteln von gesunden Tieren erfasst werden. Die große Anzahl der beteiligten Gene machte eine Auswertung auf der Basis von Einzelgenen unmöglich. Deshalb wurden verschiedene bioinformatische Verfahren eingesetzt um funktionelle Prozesse sowie regulatorische Elemente zu identifizieren. Die Entdeckung einer systemischen Reaktion eröffnet vielversprechende Ansätze für zukünftige Arbeiten. So weist sie auf die Aktivität protektiver Mechanismen hin, die möglicherweise eine Vermehrung von *E. coli* in gesunden Eutervierteln verhindern. Gleichzeitig ist die systemische Reaktion in den untersuchten Tieren unterschiedlich stark ausgeprägt. Sollte sich ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der systemischen Reaktion und der Schwere der klinischen Symptome einer Mastitis experimentell bestätigen lassen und die dafür verantwortlichen Genvarianten gefunden werden, so könnten Mastitis-resistente Rinder auf der Grundlage der entdeckten systemischen Reaktion gezüchtet werden. Somit zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten viele Ansatzpunkte für weitere vielversprechende Untersuchungen der Mastitis bei Rind auf.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beruhen ausschließlich auf Untersuchungen des Transkriptoms mit Microarrays. Zur Bestätigung der Ergebnisse und zur Erhöhung der Aussagekraft müssen weitere Untersuchungen folgen. So fehlen für Schlüsselgene wie z.B. *NFIL3* quantitative Messungen der gesteigerten Transkription mit qPCR. Mittels *in situ*-Hybridisierung könnte untersucht werden, in welchem Zelltyp die Schlüsselgene exprimiert werden. Durch Immunohistochemie könnte überprüft werden, von welchen interessanten Genen *in vivo* Proteine synthetisiert werden.

6 Zusammenfassung

Transkriptomanalysen der Milchdrüse nach experimenteller Infektion von Milchkühen mit *E. coli* 1303 mittels Microarraytechnology

Koliforme Bakterien sind die häufigste Ursache von schweren klinischen Mastitiden bei Kühen. *Escherichia coli* infiziert meist nur ein einzelnes Euterviertel, während benachbarte Viertel klinisch unauffällig bleiben. Dies weist auf spezielle Vorgänge hin, welche benachbarte Euterviertel schützen. Auf der Suche nach den zugrunde liegenden Mechanismen wurde eine Transkriptomstudie mit Gewebeproben aus der bovinen Milchdrüse durchgeführt. Die Proben wurden aus den infizierten und nicht-infizierten Eutervierteln der selben Tiere 6 h beziehungsweise 24 h nach einer Infektion mit 500 KbE *E. coli* 1303 gewonnen sowie aus unbehandelten gesunden Kühen, die als externe Kontrollen dienten.

Zum Zeitpunkt 6 h nach der Infektion wurden durch Vergleich der Expressionsprofile der infizierten Viertel mit denen der externen Kontrollviertel lediglich 13 differentiell exprimierte *probe sets* identifiziert. Diese geringe Anzahl weist darauf hin, dass der Keim in der frühen Phase der Infektion die Milchdrüse kaum beeinflusst. Achtzehn Stunden später wurden 1771 *probe sets* in infizierten und 401 *probe sets* in benachbarten nicht-infizierten Vierteln jeweils durch einen Vergleich mit den externen Kontrollen erfasst. Diese wurden durch eine Clusteranalyse drei Gruppen von differentiell exprimierten Genen (DEG) zugeordnet, wovon erstere allein in infizierten Vierteln gefunden wurde und als lokale Antwort auf die Infektion angesehen werden kann. Die zweite Gruppe der DEG wurde in infizierten als auch nicht-infizierten Vierteln exprimiert und weist auf eine systemische Antwort hin. Eine dritte Gruppe von einigen wenigen DEG wurde nur in den Nachbarvierteln exprimiert. Mitglieder der ersten Gruppe mit lokal in infizierten Vierteln hochregulierten Genen wurden hauptsächlich den funktionellen Gruppen „Immunantwort“ und „Entzündung“ zugeordnet. Auch der Großteil der Akut-Phase Gene (z.B. *HP*, *SAA3*, *PTX3*, *FTL*) wurde nur lokal exprimiert. Eine Analyse der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen (TFBS) wies auf die klassischen inflammatorischen Transkriptionsfaktoren wie NFκB und STAT1 hin. Auch ELF5, der bei der Entwicklung und Wiederherstellung des Milchdrüsenepithels eine große Rolle spielt, wurde als Transkriptionsfaktor vorhergesagt. Die zweite Gruppe von Genen, deren Expression in der späten Phase der Infektion systemisch gesteigert wird, ist beteiligt an der Antigenprozessierung und -präsentation, am p38 Pathway und enthält Gene von Zytokinen und Chaperonen, sowie zu Proteindegradation und Apoptose gehörende Gene. Eine verstärkte Expression von antimikrobiellen Genen (*S100A8*, *S100A9*, *CXCL2*, *CXCL13*, *LTF*), Akut-Phase Genen (*LBP*, *CP*, *C6*, *C4BPA*, *IF*) und Indikatoren des oxidativen Stress

(*GPX3*, *MT2A*, *SOD2*) deuten auf eine aktive Abwehrreaktion in infizierten und nicht-infizierten Vierteln hin. Der frühzeitige Beginn dieser Reaktion wird durch die gesteigerte Transkription von *NFIL3* bereits 6 h nach der Infektion angezeigt. In der späten Phase der Infektion wird *NFIL3* als mutmaßlicher Regulator von vielen Genen der systemischen Reaktion vorhergesagt.

Durch Integration der Ergebnisse dieser Studie in ein allgemeingültiges Konzept der transkriptionellen Antwort auf eine Infektion wird ein detailliertes Bild der Prozesse erhalten, die sich 24 h nach experimenteller Infektion mit *E. coli* 1303 in der bovinen Milchdrüse ereignen. Zusätzlich wird ein völlig neuer funktionaler Aspekt eingeführt, indem die Antwort auf eine *E. coli* Infektion in lokal und systemisch regulierte Gene unterteilt wird.

Letztere weisen darauf hin, dass in der späten Phase der Infektion die Zusammensetzung der Milch verändert wird und schützende Faktoren wie antimikrobielle Agenzien und reaktive Sauerstoff-Derivate (ROS) gebildet werden, wodurch das Wachstum von *E. coli* effektiv gehemmt und der Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die benachbarten nicht betroffenen Viertel eingeschränkt wird.

Zusammenfassend stellt diese erste umfassende Analyse der komplexen systemischen Effekte in der Milchdrüse nach einer Infektion mit *E. coli* der Mastitisforschung ein neues Konzept zur Verfügung. Weiterhin liefert die beobachtete tierspezifische Schwankung in der Ausprägung der systemischen Antwort einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Präventivmedizin und Therapie oder die selektive Zucht auf eine Resistenz gegen eine *E. coli*-Mastitis.

7 Summary

Transcriptome analysis of the mammary gland after experimental infection with *E. coli* 1303 in dairy cows using the microarray technology

Coliform bacteria are the most common etiologic agents in severe mastitis of cows. *Escherichia coli* infections are mostly restricted to a single udder quarter. Neighboring quarters stay clinically inapparent, implicating the presence of a systemic defence reaction. To address its underlying mechanism, we performed a transcriptome study of mammary tissue from udder quarters inoculated with *E. coli* 1303 for 6 h and 24 h post infection, respectively, from neighboring noninfected quarters of the same animals, and from untreated control animals.

After 6 h 13 differentially expressed probe sets were captured in infected quarters versus control animals, indicating minute effects of the pathogen on the mammary gland at this time point. Eighteen hours later 1771 and 401 probe sets were detected in infected and in neighboring quarters vs. control animals. Cluster analysis revealed three categories of DEG. The first was solely found in infected udder quarters and comprised the local response whereas DEG of the second category were detected in both infected and neighboring quarters indicating a systemic response. A third group, consisting of only few genes was solely expressed in neighboring quarters. The cluster of genes up-regulated only in the infected quarters was dominated by terms related to the immune response and inflammation. Furthermore, the majority of observed acute phase genes (e.g. *HP*, *SAA3*, *PTX3*, *FTL*) was assigned to this cluster. Transcription factor binding site enrichment analysis revealed the classical inflammatory transcription factors NFκB and STAT1 but also ELF5, which is related to development and restoration of mammary epithelium, was among the predicted transcription factors. Genes that were systemically up-regulated in the mammary gland 24 h after *E. coli* infection included components of the antigen processing and presenting machinery, the p38 pathway, cytokines and chaperones and genes related to protein degradation and apoptosis. Enhanced expression of antimicrobial genes (*S100A8*, *S100A9*, *CXCL2*, *CXCL13*, *LTF*), acute phase genes (*LBP*, *CP*, *C6*, *C4BPA*, *IF*) and indicators of oxidative stress (*GPX3*, *MT2A*, *SOD2*) point to an active defence reaction in infected and neighboring healthy quarters. The early onset of this reaction is indicated by increased transcription of *NFIL3* already at 6 h. *NFIL3* is a predicted regulator of many genes of the systemic response at 24 h.

By integration of our findings into a consensus scheme of the transcriptional response to infections we could provide a detailed picture of the processes occurring in the bovine mammary gland 24 h after inoculation with *E. coli* 1303 and add a new functional dimension

by differentiating the genome wide response to *E. coli* into locally and systemically regulated genes. The latter group points to altered milk composition and synthesis of protection factors, such as antimicrobials and reactive oxygen species in the late stage of infection. These effects could effectively prevent growth of *E. coli* and thereby moderate neutrophil influx in neighboring unaffected quarters. In summary, this first comprehensive analysis of complex systemic effects in the mammary gland after *E. coli* infection introduces a new concept to mastitis research. Moreover, the observed animal specific variation in the systemic response offers a promising target for intervening against mastitis either in prophylaxis and therapy or by selective breeding towards resistance against *E. coli* induced mastitis.

8 Anhang

8.1 Differentiell exprimierte Gene

Tabelle 14: Differentiell exprimierte Gene in der Milchdrüse des Rindes 6 h bzw. 24 h nach Infektion mit *E. coli* 1303

PROBE SET ID	FC [log ₂]	GEN-SYMBOL	GENNAME
VERGLEICH i24h-c:24h			
CLUSTER 1			
Bt.16201.1.S1_at	8,13	S100A9	S100 calcium binding protein A9
Bt.9360.1.S1_at	7,23	S100A8	S100 calcium binding protein A8
Bt.16453.1.A1_at	6,51	SLC6A14	solute carrier family 6, member 14
Bt.5878.1.A1_at	6,31	SDS	serine dehydratase
Bt.5878.2.S1_at	5,51	SDS	serine dehydratase
Bt.611.1.S1_at	5,32	CXCL2	chemokine ligand 2
Bt.5238.1.S1_at	5,12	CHI3L1	chitinase 3-like 1
Bt.27361.1.A1_at	5,04	TNFRSF6B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy
Bt.611.1.S1_x.at	5,04	CXCL2	chemokine ligand 2
Bt.29824.1.S1_s.at	4,97	BOLA	MHC class I heavy chain
Bt.611.1.S2_at	4,9	CXCL2	chemokine ligand 2
Bt.24181.1.S1_at	4,72	MGC5618	hypothetical protein MGC5618
Bt.17810.1.S1_a.at	4,66	LBP	lipopolysaccharide binding protein
Bt.2529.1.S1_at	4,1	RBP1	retinol binding protein 1, cellular
Bt.14200.1.A1_at	4,01	MT2A	metallothionein 2A
Bt.8624.1.S1_at	3,9	MT1E	metallothionein 1E
Bt.4748.1.S1_at	3,7	ARG2	arginase, type II
Bt.12610.1.A1_at	3,6	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial
Bt.3774.1.A1_at	3,33	CP	centrioplasm
Bt.29814.1.S1_at	3,15	RND1	Rho family GTPase 1
Bt.4707.1.A1_at	3,15	BOLA	major histocompatibility complex, class I, A
Bt.367.1.S1_at	3,08	C4BPA	complement component 4 binding protein, alpha
	3,07	OLR1	oxidised low density lipoprotein receptor 1

Bt.27822.2.S1_at	3,02	SNX10	sorting nexin 10
Bt.3964.1.S1_at	3,01	SLC2A3	solute carrier family 2, member 3
Bt.6406.1.S3_at	3	CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein, delta
Bt.2600.1.A1_at	2,98	--	--
Bt.27760.1.S1_at	2,91	BOLA	major histocompatibility complex, class I, A
Bt.13330.1.S1_at	2,87	PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4
Bt.28088.1.S1_at	2,8	CXCL13	chemokine ligand 13
Bt.13330.2.A1_at	2,78	--	--
Bt.7780.1.S1_at	2,73	LTF	lactotransferrin
Bt.21603.2.S1_at	2,71	RNF121	ring finger protein 121
Bt.11933.1.S1_at	2,67	CDK7	cyclin-dependent kinase 7
Bt.982.1.S1_at	2,66	SERPINA1	serine proteinase inhibitor, clade A, member 1
Bt.17849.2.S1_at	2,65	SORL1	sorilin-related receptor, L A repeats-containing
Bt.17819.1.S1_at	2,59	SCNN1G	sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma
Bt.8592.1.S1_a.at	2,59	C20orf119	chromosome 20 open reading frame 119
Bt.23505.1.S1_at	2,58	PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4
Bt.20104.1.S1_at	2,54	SESN1	sestrin 1
Bt.17819.2.A1_at	2,51	SCNN1G	sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma
Bt.12295.1.S1_at	2,5	T1A-2	lung type-I cell membrane-associated glycoprotein
Bt.27822.1.A1_at	2,46	SNX10	sorting nexin 10
Bt.17036.1.A1_s.at	2,46	WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase
Bt.22009.2.S1_a.at	2,44	CXCL16	chemokine ligand 16
Bt.28906.1.A1_at	2,44	NLF1	nuclear localized factor 1
Bt.25471.1.S1_at	2,41	ATXN3	ataxin 3
Bt.6406.1.S2_at	2,41	CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein, delta
Bt.9625.1.S1_at	2,41	SPINK4	serine protease inhibitor, Kazal type 4
Bt.982.1.S1_a.at	2,4	SERPINA1	serine protease inhibitor, clade A, member 1
Bt.9239.1.S1_at	2,38	ADORA2B	adenosine A2b receptor

ANHANG

Bt.15334.2A1_at	2,36	STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	Bt.5026.1.S1_at	2,01	ANXA8	annexin A8
Bt.4657.1.S1_at	2,36	IFNAR1	interferon receptor 1	Bt.23263.1.S1_s_at	2,01	HSPCB	heat shock 90kDa protein 1, beta
Bt.16725.2A1_at	2,34	UBE2L6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	Bt.4441.1.S1_at	1,99	FOSL2	FOS-like antigen 2
Bt.19349.1A1_at	2,33	GOLGA4	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4	Bt.6685.1.S1_at	1,98	MTHFD2	methylene tetrahydrofolate dehydrogenase I factor
Bt.2531.1.S1_at	2,31	ZNF259	zinc finger protein 259	Bt.13387.1.S1_at	1,97	IF	zinc finger CCH type, antiviral 1
Bt.21071.2A1_at	2,31	SLC26A2	solute carrier family 26, member 2	Bt.11826.1.S1_at	1,96	ZC3HAV1	coproporphyrinogen oxidase
Bt.16896.1A1_at	2,3	AGXT2	alanine-glyoxylate aminotransferase 2	Bt.26709.2A1_at	1,96	CPOX	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15
Bt.29580.1.S1_at	2,29	KCNJ15	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15	Bt.27605.1A1_at	1,95	KCNJ15	interferon receptor 1
Bt.17949.1A1_at	2,28	SORL1	sortilin-related receptor, L A repeats-containing	Bt.22665.1.S1_at	1,94	IFNAR1	similar to Family with sequence similarity 100, member B
Bt.2749.1.S1_at	2,28	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	Bt.22224.1.S1_at	1,93	LOC618617	integrin, alpha V
Bt.21071.1.S1_at	2,26	SLC26A2	solute carrier family 26, member 2	Bt.5273.1.S1_at	1,92	ITGAV	interferon receptor 1
Bt.16310.1A1_at	2,21	SLC1A2	solute carrier family 1, member 2	Bt.24741.1.S1_at	1,91	IFNAR1	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 2
Bt.25471.2A1_at	2,21	ATXN3	ataxin 3	Bt.27036.1.S1_at	1,9	CYP4F2	---
Bt.28750.1.S1_at	2,21	IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1	Bt.23654.1.S1_at	1,88	OPTN	optineurin
Bt.16101.1.S1_at	2,19	GPLY	granulysin	Bt.17777.2.S1_at	1,88	ANXA2	annexin A2
Bt.15334.1.S1_at	2,17	STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	Bt.4314.1.S1_at	1,87	ITGAV	integrin, alpha V
Bt.7339.1.S1_at	2,17	FLJ10815	amino acid transporter	Bt.5273.1.S2_at	1,87	ITGAV	Kruppel-like factor 6
Bt.13278.2.S1_a_at	2,15	TSAP6	tauadin 2	Bt.4606.1.S1_at	1,86	KLF6	PTPRF interacting protein, binding protein 2
Bt.12504.1.S1_at	2,14	CLU	clusterin	Bt.9277.1.S1_at	1,85	PPFIBP2	chromosome 20 open reading frame 119
Bt.22167.2A1_at	2,14	LRRC2	leucine rich repeat containing 2	Bt.8592.2.S1_at	1,85	C20orf119	nuclear factor, interleukin 3 regulated
Bt.27645.1A1_at	2,14	C20orf82	chromosome 20 open reading frame 82	Bt.27654.2.S1_at	1,84	NFIL3	solute carrier family 1, member 1
Bt.20409.1.S1_at	2,13	PARP9	poly polymerase family, member 9	Bt.557.1.S1_at	1,84	SLC1A1	oncostatin M receptor
Bt.2841.2.S1_a_at	2,13	WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	Bt.22083.2.S1_at	1,83	OSMR	integrin beta 4 binding protein
Bt.14022.1.S1_at	2,12	RNF121	ring finger protein 121	Bt.4426.1.S1_at	1,83	ITGB4BP	basic leucine zipper and W2 domains 1
Bt.15529.1.S1_at	2,11	ZC3HAV1	zinc finger CCH type, antiviral 1	Bt.23604.1.S1_at	1,82	BZW1	chemokine ligand 16
Bt.11413.1.S1_at	2,1	RAB7B	RAB7B, member RAS oncogene family	Bt.22009.1.S1_at	1,81	CXCL16	chemokine ligand 16
Bt.12916.1.S1_at	2,1	GPX3	glutathione peroxidase 3	Bt.13702.1.S1_at	1,81	SIAT1	siyalitransferase 1
Bt.15882.2.S1_a_at	2,1	SRI	sorcin	Bt.29148.1A1_at	1,81	SPPL2A	putative intramembrane cleaving protease
Bt.9736.1.S1_at	2,1	SLPI	secretory leukocyte protease inhibitor	Bt.29552.1A1_at	1,79	---	---
Bt.18643.2.S1_at	2,09	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Bt.25489.1A1_at	1,79	MTAC2D1	membrane targeting C2 domain containing 1
Bt.21055.1.S1_at	2,09	MKNK1	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1	Bt.28500.1.S1_at	1,78	TBC1D14	TBC1 domain family, member 14
Bt.19517.1.S1_at	2,08	ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3	Bt.9742.1.S1_at	1,78	PDCD6IP	programmed cell death 6 interacting protein
Bt.5382.1.S1_at	2,08	NT5C2	5'-nucleotidase, cytosolic II	Bt.12927.2.S1_at	1,78	TD-60	RCC1-like
Bt.20862.1A1_at	2,07	MTHFD2	methylene tetrahydrofolate dehydrogenase	Bt.5038.5.S1_at	1,77	RAB24	RAB24, member RAS oncogene family
Bt.24859.2.S1_at	2,06	OSMR	oncostatin M receptor	Bt.21537.1A1_at	1,76	FKBP5	FK506 binding protein 5
Bt.17777.1.S1_at	2,04	OPTN	optineurin	Bt.18740.2.S1_at	1,75	GDAP2	ganglioside induced differentiation associated protein 2
Bt.2841.1.S1_at	2,04	WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	Bt.23098.1.S1_at	1,74	QSCN6	quiescin Q6
Bt.23905.1A1_at	2,04	MIG-6	mitogen-inducible gene 6	Bt.21433.1.S1_at	1,73	MCM6	MCM6 minichromosome maintenance deficient 6
Bt.22390.2.S1_at	2,03	CP	ceruloplasmin	Bt.24341.1.S1_at	1,73	TSPAN2	tetraspan 2
Bt.2518.1.S1_at	2,02	EGFR	epidermal growth factor receptor	Bt.28383.1.S1_at	1,73	GPLY	granulysin
Bt.26157.1A1_at	2,02	---	---	Bt.299.1.S1_at	1,72	SIAT1	siyalitransferase 1
Bt.1489.1.S1_at	2,02	---	---	Bt.7594.1.S1_at	1,71	SAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase

Bt.17148.1.S1_at	FEM1C	1,7	fem-1 homolog c	Bt.2317.1.S1_at	1,53	TRNT1	IRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1
Bt.22080.1.S1_at	FLJ14834	1,7	hypothetical protein FLJ14834	Bt.24206.1.A1_at	1,53	BTBD1	BTB domain containing 1
Bt.8227.1.S1_at	NFKBIZ	1,69	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	Bt.7641.2.S1_a_at	1,53	PDXK	pyridoxal kinase
Bt.16101.1.S1_s_at	GNLV	1,67	granulysin	Bt.18414.1.S1_at	1,52	GK	glycerol kinase
Bt.20219.1.S1_at	PIGT	1,67	phosphatidylinositol glycan, class T	Bt.19243.2.S1_at	1,52	SNX6	sorting nexin 6
Bt.22865.1.S1_at	RAC1	1,67	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	Bt.21433.2.S1_at	1,52	MCM6	MCM6 minichromosome maintenance deficient 6
Bt.17151.1.S1_at	LRRG5	1,67	leucine rich repeat containing 5	Bt.12885.1.S1_at	1,51	ACY1	aminoacylase 1
Bt.29345.1.A1_at	DDX10	1,66	DEAD box polypeptide 10	Bt.685.1.A1_at	1,51	ASRGL1	asparaginase like 1
Bt.22729.1.S1_at	FLJ45422	1,65	FLJ45422 protein	Bt.14380.1.S1_at	1,51	C9orf80	chromosome 9 open reading frame 80
Bt.6668.1.S1_at	---	1,65	---	Bt.137.1.S1_at	1,5	ANGPT2	angiopoietin 2
Bt.2994.1.A1_at	C6orf4	1,65	chromosome 6 open reading frame 4	Bt.16613.1.A1_at	1,5	---	---
Bt.28523.1.S1_at	DTX3L	1,64	deltex 3-like	Bt.22133.2.S1_a_at	1,5	STX17	syntaxin 17
Bt.18116.3.A1_s_at	ZC3HDC1	1,64	zinc finger CCH type domain containing 1	Bt.22626.2.S1_at	1,5	ANKRD12	ankyrin repeat domain 12
Bt.16672.1.A1_at	FLJ36031	1,63	hypothetical protein FLJ36031	Bt.23551.3.S1_at	1,5	MAK3	Mak3 homolog
Bt.26808.1.S1_at	THADA	1,63	thyroid adenoma associated	Bt.6989.1.S1_at	1,5	PP1201	PP1201 protein
Bt.3024.1.S1_at	BLOC1S2	1,62	biogenesis of lysosome-related organelles complex-1, subunit 2	Bt.13710.3.S1_a_at	1,49	PGS1	phosphatidylglycerophosphate synthase
Bt.24987.1.S1_at	NCKIPSD	1,62	NCK interacting protein with SH3 domain	Bt.21912.1.S2_at	1,49	EIF2C2	eukaryotic translation initiation factor 2C, 2
Bt.22275.1.A1_at	ISG20	1,61	interferon stimulated gene 20kDa	Bt.2518.2.S1_at	1,49	---	---
Bt.24270.1.S1_at	HSPD1	1,61	heat shock 60kDa protein 1	Bt.4725.1.S1_at	1,49	BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative
Bt.24641.1.S1_at	FLJ32440	1,61	hypothetical protein FLJ32440	Bt.4477.2.S1_a_at	1,49	C2orf24	chromosome 2 open reading frame 24
Bt.12067.1.S1_at	ADAM9	1,59	a disintegrin and metalloproteinase domain 9	Bt.23722.1.A1_at	1,48	C6	complement component 6
Bt.6685.2.A1_at	MTHFD2	1,59	methylene tetrahydrofolate dehydrogenase	Bt.4110.1.S1_at	1,48	HRH1	histamine receptor H1
Bt.1785.2.A1_at	CPD	1,59	carboxypeptidase D	Bt.4869.1.S1_at	1,48	SQSTM1	sequestosome 1
Bt.4816.1.S1_at	ANGPTL4	1,58	angiopoietin-like 4	Bt.6715.2.S1_at	1,48	HSPC117	hypothetical protein HSPC117
Bt.13723.1.S1_at	SULT1B1	1,58	sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1	Bt.13118.1.S1_at	1,47	ADAM9	a disintegrin and metalloproteinase domain 9
Bt.13880.1.S1_at	DKK1	1,57	Dickkopf homolog 1	Bt.22490.2.S1_at	1,47	PLRG1	pleiotropin regulator 1
Bt.16857.1.A1_at	IFIH1	1,57	interferon induced with helicase C domain 1	Bt.26709.1.S1_at	1,47	CPOX	coproporphyrinogen oxidase
Bt.21415.1.S1_at	TBC1D14	1,57	TBC1 domain family, member 14	Bt.24386.1.A1_at	1,47	CGI-48	CGI-48 protein
Bt.7490.1.A1_at	MTHFD1L	1,57	methylentetrahydrofolate dehydrogenase 1-like	Bt.12436.1.S1_at	1,46	BRI3	brain protein I3
Bt.1895.1.S1_at	TTC17	1,57	tetratricopeptide repeat domain 17	Bt.13163.1.S1_at	1,46	AP2B1	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit
Bt.7135.1.S1_at	HSPC152	1,57	hypothetical protein HSPC152	Bt.22000.1.A1_at	1,46	CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
Bt.2610.1.S1_at	MOCOS	1,56	molybdenum cofactor sulfuryase	Bt.22359.1.A1_at	1,46	RIOK3	RIO kinase 3
Bt.6380.1.S1_at	STK24	1,56	serine/threonine kinase 24	Bt.26692.1.S1_a_at	1,46	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
Bt.17015.1.A1_at	FLJ36031	1,56	hypothetical protein FLJ36031	Bt.4532.1.S1_at	1,46	CSNK1A1	casein kinase 1, alpha 1
Bt.1785.1.A1_at	CPD	1,56	carboxypeptidase D	Bt.5096.1.S1_at	1,46	CCT3	chaperonin containing TCP1, subunit 3
Bt.23172.1.S1_at	BAX	1,55	BCL2-associated X protein	Bt.6795.1.S1_at	1,46	ARPC3	actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa
Bt.2723.1.A1_at	CDO1	1,55	cysteine dioxygenase, type I	Bt.3171.1.A1_at	1,46	ITGAV	integrin, alpha V
Bt.27425.1.A1_a_at	EGFR	1,55	epidermal growth factor receptor	Bt.6411.1.S1_at	1,46	C1H3orf38	chromosome 3 open reading frame 38 ortholog
Bt.3721.1.S1_at	CARHSP1	1,55	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	Bt.5397.1.S1_at	1,46	SEC11L1	SEC11-like 1
Bt.4360.1.S1_at	CYB561	1,54	cytochrome b-561	Bt.13850.3.S1_a_at	1,45	LYPLA1	lysophospholipase I
Bt.16124.1.A1_at	BPIL2	1,54	bactericidal/permeability-increasing protein-like 2	Bt.22207.1.S1_at	1,45	PMMK	phosphomevalonate kinase
Bt.12472.1.S1_at	GLUL	1,53	glutamate-ammonia ligase	Bt.4733.1.S1_at	1,45	PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase

ANHANG

Bt.5466.3.S1_at	BZW1	1,45	basic leucine zipper and W2 domains 1	Bt.4345.1.S1_at	1,36	FAS	Fas
Bt.27380.1.A1_at	HRMT1L3	1,45	HMT1 hnRNP methyltransferase-like 3	Bt.4554.1.S1_at	1,36	COMMD8	COMM domain containing 8
Bt.727.1.S1_at	CGI-116	1,44	CGI-116 protein	Bt.6427.1.S1_at	1,36	CCT4	chaperonin containing TCP1, subunit 4
Bt.22359.3.S1_at	R1OK3	1,43	R1OK3	Bt.6958.3.A1_at	1,36	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
Bt.16124.2.S1_at	P2RXL1	1,43	P2RXL1	Bt.21419.1.S1_at	1,36	CGI-30	CGI-30 protein
Bt.21982.1.S1_a_at	IQGAP1	1,42	IQGAP1	Bt.11192.1.S1_at	1,35	PABPC4	poly binding protein, cytoplasmic 4
Bt.222.1.S1_at	CRYAB	1,42	CRYAB	Bt.20193.1.S1_at	1,35	GARS	glycyl-tRNA synthetase
Bt.24652.1.A1_at	PTPN2	1,42	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2	Bt.24859.1.A1_at	1,35	OSMR	oncostatin M receptor
Bt.24916.1.A1_at	DOCK7	1,42	dedicator of cytokinesis 7	Bt.26921.1.A1_at	1,35	SLC27A6	solute carrier family 27, member 6
Bt.3215.1.S1_at	EFNA1	1,42	EFNA1	Bt.3999.1.S1_at	1,35	NAGA	N-acetylgalactosaminidase, alpha-
Bt.4762.1.S1_at	BOLA-NC1	1,42	non-classical MHC class I antigen	Bt.3323.2.S1_at	1,34	PLXNB2	plexin B2
Bt.12769.1.S1_at	PCK2	1,41	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2	Bt.422.1.S1_at	1,34	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
Bt.13947.1.S1_at	C14orf153	1,41	chromosome 14 open reading frame 153	Bt.4293.1.S1_at	1,34	ICAM3	intercellular adhesion molecule 3
Bt.15864.1.S1_at	FGF2	1,41	fibroblast growth factor 2	Bt.24799.1.S1_at	1,34	PARP3	poly polymerase family, member 3
Bt.20219.2.S1_a_at	P1GT	1,41	phosphatidylinositol glycan, class T	Bt.13908.1.S1_at	1,33	MRPS22	mitochondrial ribosomal protein S22
Bt.26715.1.S1_at	ST14	1,41	suppression of tumorigenicity 14	Bt.16733.1.A1_s_at	1,33	NARF	nuclear prelamin A recognition factor
Bt.27192.1.S1_at	ETF1	1,41	eukaryotic translation termination factor 1	Bt.4948.1.S1_at	1,33	PSEN1	presenilin 1
Bt.28031.1.S1_s_at	SQSTM1	1,41	sequestosome 1	Bt.5123.2.S1_at	1,33	FLII	flightless I homolog
Bt.9578.1.S1_at	PPP1OC	1,41	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform	Bt.612.2.S1_at	1,33	GSR	glutathione reductase
Bt.28064.2.S1_at	ARL10C	1,41	ADP-ribosylation factor-like 10C	Bt.27919.1.S1_at	1,33	C10orf119	chromosome 10 open reading frame 119
Bt.10352.1.S1_at	POP5	1,4	processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP subunit	Bt.20662.2.S1_at	1,32	MTHFD2	methylene tetrahydrofolate dehydrogenase
Bt.12285.2.S1_a_at	NMI	1,4	N-myc interactor	Bt.25462.1.S1_at	1,32	CDK6	cyclin-dependent kinase 6
Bt.5487.1.S1_at	ALDH3A2	1,4	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	Bt.4086.1.S1_at	1,32	ATP6V1B2	ATPase, H+-transporting, lysosomal 56/68kDa, V1 subunit B, isoform 2
Bt.9706.2.S1_at	C20orf24	1,4	chromosome 20 open reading frame 24	Bt.9300.1.A1_at	1,32	OGFRL1	opioid growth factor receptor-like 1
Bt.9088.1.S1_at	---	1,39	---	Bt.9630.1.S1_at	1,32	TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2
Bt.24384.1.A1_at	ACATE2	1,39	likely ortholog of mouse acyl-Coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	Bt.17824.1.S1_at	1,32	C13orf9	chromosome 13 open reading frame 9
Bt.14219.1.S1_at	C10orf10	1,39	chromosome 10 open reading frame 10	Bt.7111.1.S1_at	1,32	MPZL3	myelin protein zero-like 3
Bt.26797.1.S1_at	FLJ22457	1,39	hypothetical protein FLJ22457	Bt.15561.1.S1_at	1,31	EFHD2	EF hand domain containing 2
Bt.12462.1.S1_at	LISCH7	1,39	liver-specific bHLH-Zip transcription factor	Bt.18740.1.S1_at	1,31	GDAP2	ganglioside induced differentiation associated protein 2
Bt.23905.2.S1_at	MIG-6	1,39	mitogen-inducible gene 6	Bt.20307.1.S1_at	1,31	DNPEP	aspartyl aminopeptidase
Bt.22532.1.S1_at	DARS	1,38	aspartyl-tRNA synthetase	Bt.28532.1.S1_at	1,31	MIMRN1	multimerin 1
Bt.2255.1.S1_at	IMP2DH2	1,38	IMP dehydrogenase 2	Bt.1526.1.S1_at	1,31	RAN	RAN, member RAS oncogene family
Bt.22579.1.S1_at	CBARA1	1,38	calcium binding atopy-related autoantigen 1	Bt.23244.1.S1_at	1,31	EIF3S7	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 7 zeta, 66/67kDa
Bt.25055.1.A1_at	IPMK	1,38	inositol polyphosphate multikinase	Bt.734.1.S1_at	1,3	ADAM9	a disintegrin and metalloproteinase domain 9
Bt.16436.2.A1_at	EliS1	1,38	hypothetical protein EliS1	Bt.22055.2.S1_at	1,3	CYBRD1	cytochrome b reductase 1
Bt.2889.1.S1_at	GTL3	1,38	likely ortholog of mouse gene trap locus 3	Bt.9235.1.A1_at	1,3	C1orf19	chromosome 1 open reading frame 19
Bt.3583.1.S1_at	VIL2	1,38	villin 2	Bt.28646.1.S1_at	1,3	D15Wsu75e	DNA segment, Chr 15, Wayne State University 75, expressed
Bt.13670.1.S1_at	ALPL	1,37	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	Bt.23277.3.S1_a_at	1,29	HNRPDL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
Bt.20240.1.S1_at	SASH1	1,37	SAM and SH3 domain containing 1	Bt.19278.1.S1_at	1,28	SIP1	survival of motor neuron protein interacting protein 1
Bt.7240.1.S1_at	LAP3	1,37	leucine aminopeptidase 3	Bt.19465.1.S1_at	1,28	AAADHPPT	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase
Bt.13780.1.A1_at	SPRY1	1,36	sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling	Bt.4218.2.S1_a_at	1,28	MFHAS1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1
Bt.14031.1.S1_at	SDC4	1,36	syndecan 4				

Bt.14347.1.S1_at	1,15	SGPL1	sphingosine-1-phosphate lyase 1	Bt.1373.1.A1_at	1,12	FLJ11280	hypothetical protein FLJ11280
Bt.22532.2.S1_at	1,15	DARS	aspartyl-tRNA synthetase	Bt.12861.1.S1_at	1,12	KIF2	kinesin heavy chain member 2
Bt.22564.2.S1_at	1,15	GGTA1	glycoprotein, alpha-galactosyltransferase 1	Bt.23597.1.S1_at	1,12	P8	p8 protein
Bt.23141.1.A1_at	1,15	PDCD11	programmed cell death 11	Bt.5537.1.S1_at	1,12	PSME3	proteasome activator subunit 3
Bt.28090.1.S1_at	1,15	ABHD4	abhydrolase domain containing 4	Bt.3543.1.S1_at	1,12	TXNL2	thioredoxin-like 2
Bt.28534.1.A1_at	1,15	PLEK2	pleckstrin 2	Bt.13415.1.A1_at	1,11	LEPROTL1	leptin receptor overlapping transcript-like 1
Bt.5495.1.S1_at	1,15	BZW2	basic leucine zipper and W2 domains 2	Bt.16104.1.S1_at	1,11	EXOSC3	exosome component 3
Bt.5754.3.S1_at	1,15	STRAP	serine/threonine kinase receptor associated protein	Bt.18730.1.A1_at	1,11	DHFR	dihydrofolate reductase
Bt.8782.1.S1_at	1,15	---	---	Bt.20275.1.S1_at	1,11	ARPC5L	actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like
Bt.9728.1.S1_at	1,15	ATPIB3	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 3 polypeptide	Bt.24522.2.S1_at	1,11	KLF6	Kruppel-like factor 6
Bt.11154.2.S1_at	1,15	C10orf9	chromosome 10 open reading frame 9	Bt.27909.1.S1_at	1,11	SERPINB1	serpine proteinase inhibitor, clade B, member 1
Bt.16273.1.A1_at	1,15	DSCR1L2	Down syndrome critical region gene 1-like 2	Bt.28749.1.S1_at	1,11	SEPHS1	selenophosphate synthetase 1
Bt.29506.1.S1_at	1,15	FLJ23518	hypothetical protein FLJ23518	Bt.7014.1.S1_at	1,11	PAICS	phosphoribosylaminimidazole carboxylase
Bt.3040.1.S1_at	1,15	PAI-RBP1	PAI-1 mRNA-binding protein	Bt.20008.2.S1_at	1,11	FLJ34433	hypothetical protein FLJ34433
Bt.5636.2.S1_at	1,15	SEC3L1	SEC3-like 1	Bt.5963.1.S1_at	1,11	LOC285148	hypothetical protein LOC285148
Bt.19146.1.A1_at	1,15	UNR	upstream of NRAS	Bt.22998.1.S1_at	1,1	SLC5A6	solute carrier family 5, member 6
Bt.12365.1.S1_at	1,14	CCT2	chaperonin containing TCP1, subunit 2	Bt.23277.1.A1_at	1,1	HNRPL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
Bt.2629.1.S1_at	1,14	RENBP	renin binding protein	Bt.26825.1.A1_at	1,1	XRN2	5'-3' exoribonuclease 2
Bt.28336.1.S1_at	1,14	FBXO22	F-box protein 22	Bt.28559.1.S1_a_at	1,1	DNASE1L1	deoxyribonuclease I-like 1
Bt.5389.1.S1_at	1,14	EIF4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	Bt.29271.1.A1_at	1,1	RBL1	retinoblastoma-like 1
Bt.11187.1.S1_at	1,14	FLJ10307	hypothetical protein FLJ10307	Bt.9731.1.S1_at	1,1	GLRX2	glutaredoxin 2
Bt.23683.1.S1_at	1,14	ARMCX5	armadillo repeat containing, X-linked 5	Bt.1524.1.S1_a_at	1,1	TEX10	testis expressed sequence 10
Bt.20336.2.S1_at	1,14	DDX19	DEAD box polypeptide 19	Bt.16222.1.S1_at	1,09	EIF2B4	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 4, delta, 67kDa
Bt.25379.1.A1_at	1,14	HDCMA18P	HDCMA18P protein	Bt.211.1.S1_at	1,09	DNAJC3	DnaJ homolog, subfamily C, member 3
Bt.10299.1.S1_at	1,14	MED10	mediator complex subunit 10	Bt.26687.1.S1_at	1,09	AAAS	achalasia, adrenocortical insufficiency, alacrimia
Bt.28200.1.A1_at	1,14	RBM12	RNA binding motif protein 12	Bt.26946.1.S1_at	1,09	SNX2	sorting nexin 2
Bt.18115.1.A1_at	1,13	QKI	quaking homolog, KH domain RNA binding	Bt.4227.1.S1_at	1,09	ATP6V0B	ATPase, H+ transporting, lysosomal 21kDa, Y0 subunit c"
Bt.20965.1.S1_at	1,13	PHB	prohibitin	Bt.4573.1.S1_at	1,09	CRBN	cereblon
Bt.27929.1.S1_at	1,13	WDFY1	WD repeat and FYVE domain containing 1	Bt.8646.1.S1_at	1,09	LTBR	lymphotxin beta receptor
Bt.4532.1.S2_at	1,13	CSNK1A1	casein kinase 1, alpha 1	Bt.9632.1.S1_at	1,09	RAB22A	RAB22A, member RAS oncogene family
Bt.4796.1.S1_at	1,13	PREP	prolyl endopeptidase	Bt.9698.1.S1_at	1,09	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14
Bt.1474.1.S1_at	1,13	MKL2	MKL/myocardin-like 2	Bt.28094.1.S1_at	1,09	CASP7	caspase 7, apoptosis-related cysteine protease
Bt.1526.2.S1_at	1,13	RAN	RAN, member RAS oncogene family	Bt.22094.1.A1_at	1,09	C9orf26	chromosome 9 open reading frame 26
Bt.21582.1.S1_at	1,13	PHLDA3	pleckstrin homology-like domain, family A, member 3	Bt.20578.1.S1_s_at	1,09	DRB1	developmentally regulated RNA-binding protein 1
Bt.4534.2.S1_at	1,13	C6orf11	chromosome 6 open reading frame 11	Bt.7007.1.S1_at	1,09	GHTM	growth hormone inducible transmembrane protein
Bt.6391.1.A1_at	1,13	C6orf79	chromosome 6 open reading frame 79	Bt.6145.1.S1_at	1,09	ZCSL2	zinc finger, CSL domain containing 2
Bt.1703.1.S1_at	1,12	EIF2S1	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1, alpha, 35kDa	Bt.15722.1.S1_at	1,08	FBL	fibrillarin
Bt.250.1.S1_at	1,12	NMT1	N-methyltransferase 1	Bt.20221.1.S1_at	1,08	TFE3	transcription factor binding to IGHM enhancer 3
Bt.4737.1.S2_at	1,12	PRNP	prion protein	Bt.21912.1.S1_at	1,08	EIF2C2	eukaryotic translation initiation factor 2C, 2
Bt.8706.1.S1_at	1,12	MAPKAPK3	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	Bt.6405.1.S1_at	1,08	MBP	myelin basic protein
Bt.19937.1.S1_at	1,12	CPD	carboxypeptidase D	Bt.24529.1.S1_at	1,08	CCDC5	coiled-coil domain containing 5
Bt.4910.1.S1_at	1,12	NOC2L	nuclear complex associated 2 homolog (S. cerevisiae)	Bt.25520.1.S1_at	1,08	ZNF326	zinc finger protein 326

ANHANG

Bt.3353.1.A1_at	1,08	LOC403313	hypothetical LOC403313	Bt.25655.2.A1_at	1,03	CYP4F8	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 8
Bt.1586.1.S1_at	1,08	ATG12	ATG12 autophagy related 12 homolog (S. cerevisiae)	Bt.8326.1.S1_at	1,03	RP42	RP42 homolog
Bt.2657.1.S1_at	1,08	C2F	C2f protein	Bt.18918.2.A1_at	1,03	SEC22L3	SEC22 vesicle trafficking protein-like 3
Bt.18316.2.S1_at	1,08	RIPC513587	Similar to Adult retina protein	Bt.7398.1.S1_at	1,03	SELH	NOT_AVAILABLE
Bt.12197.2.S1_a_at	1,07	RIPK2	receptor-interacting serine-threonine kinase 2	Bt.1932.1.S1_at	1,02	AHSA1	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1
Bt.15802.1.S1_at	1,07	KLf5	Kruppel-like factor 5	Bt.2150.1.S1_at	1,02	GFSM2	G-protein signalling modulator 2
Bt.19585.2.S1_at	1,07	GTF2H1	general transcription factor IIH, polypeptide 1, 62kDa	Bt.22771.1.S1_at	1,02	RAB31	RAB31, member RAS oncogene family
Bt.29954.1.S1_at	1,07	GKAP1	G kinase anchoring protein 1	Bt.300.1.A1_at	1,02	SULT1E1	sulfotransferase family 1E, estrogen-prefering, member 1
Bt.413.1.S1_at	1,07	GGTA1	glycoprotein, alpha-galactosyltransferase 1	Bt.4535.1.S1_at	1,02	YARS	tyrosyl-tRNA synthetase
Bt.9223.1.A1_at	1,07	FKSG44	FKSG44 gene	Bt.5133.1.S1_at	1,02	CAP1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1
Bt.28757.1.S1_at	1,07	HIST1H2BH	histone 1, H2bh	Bt.7866.1.S1_at	1,02	VAPA	VAMP-associated protein A, 33kDa
Bt.28203.1.S1_at	1,07	PPAPDC2	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 2	Bt.9479.2.S1_at	1,02	PHF11	PHD finger protein 11
Bt.8587.1.S1_at	1,07	XRN2	5'-3' exonuclease 2	Bt.24039.1.A1_at	1,02	CCDC6	coiled-coil domain containing 6
Bt.11184.1.S1_at	1,06	SFXN4	sideroflexin 4	Bt.9272.2.S1_at	1,02	FLJ10774	N-acetyltransferase-like protein
Bt.12613.1.S1_at	1,06	KLf6	Kruppel-like factor 6	Bt.742.1.S1_at	1,02	HMG81	high-mobility group box 1
Bt.21503.1.S1_at	1,06	PPP1CA	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform	Bt.10184.1.S1_a_at	1,01	CSNK1D	casein kinase 1, delta
Bt.3414.1.S1_at	1,06	HRB	HIV-1 Rev binding protein	Bt.19723.1.A1_at	1,01	ACTR10	actin-related protein 10 homolog
Bt.3633.1.A1_at	1,06	PSENI1	presenilin 1	Bt.2048.1.S1_at	1,01	AGPS	alkylglycerone phosphate synthase
Bt.6851.1.S1_at	1,06	B4GAL T5	UDP-Gal:beta-GlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5	Bt.26249.1.A1_at	1,01	C18orf1	chromosome 18 open reading frame 1
Bt.9031.1.S1_at	1,06	PTBP1	polypyrimidine tract binding protein 1	Bt.2882.1.A1_at	1,01	CETN4	centrin 4
Bt.18144.1.A1_at	1,06	ARMCK5	armadillo repeat containing, X-linked 5	Bt.24263.1.S1_at	1,01	CGI-30	CGI-30 protein
Bt.27283.1.S1_x_at	1,06	BOLA	MHC class I heavy chain	Bt.7300.1.S1_at	1,01	EIF3S9	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9 eta, 116kDa
Bt.23708.1.A1_at	1,06	TEX27	testis expressed sequence 27	Bt.7032.1.S1_at	1,01	TRIP3	thyroid hormone receptor interactor 3
Bt.18756.1.S1_at	1,05	CDC42SE2	CDC42 small effector 2	Bt.10230.2.A1_at	1	MLSTD2	male sterility domain containing 2
Bt.23299.1.S1_at	1,05	USP15	ubiquitin specific protease 15	Bt.15938.1.S1_at	1	LRP10	low density lipoprotein receptor-related protein 10
Bt.27926.1.S1_at	1,05	UCHL3	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3	Bt.2004.1.A1_at	1	RIOK3	RIO kinase 3
Bt.29880.1.S1_at	1,05	EGFR	epidermal growth factor receptor	Bt.4234.1.S1_at	1	HK1	hexokinase 1
Bt.19225.1.S1_at	1,05	FZD7	frizzled homolog 7	Bt.4738.1.S1_at	1	CAST	calpastatin
Bt.19833.1.S1_at	1,05	MGC134577	exonuclease NEF-sp	Bt.5242.1.S1_at	1	SSRP1	structure specific recognition protein 1
Bt.15892.1.S1_at	1,04	---	---	Bt.6774.2.S1_at	1	MAP1LC3B	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
Bt.499.1.S1_a_at	1,04	PRLR	prolactin receptor	Bt.14658.1.A1_at	1	---	---
Bt.9569.1.S1_at	1,04	TACSTD1	tumor-associated calcium signal transducer 1	Bt.20454.1.S1_at	1	RHBDD1	rhomboid domain containing 1
Bt.28743.1.S1_at	1,04	STK4	serine/threonine kinase 4	Bt.5089.1.S1_at	1	H3F3B	H3 histone, family 3A
Bt.21546.1.S1_at	1,04	ATP9A	ATPase, Class II, type 9A	Bt.16963.1.S1_at	1	TYW3	tRNA-YW synthesizing protein 3 homolog (S. cerevisiae)
Bt.1193.1.S1_at	1,04	UBE2D3	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3	CLUSTER 2			
Bt.12396.1.S1_at	1,03	SGSH	N-sulfoglucosamine sulfohydrolase	Bt.357.1.S1_at	7,79	S100A12	S100 calcium binding protein A12
Bt.12606.1.S1_a_at	1,03	---	---	Bt.12553.1.S1_at	7,46	HP	haptoglobin
Bt.20263.1.S1_at	1,03	RABGGTB	Rab geranylgeranyltransferase, beta subunit	Bt.610.1.A1_at	6,89	CXCL2	chemokine ligand 2
Bt.25720.2.A1_s_at	1,03	FLOT2	flotillin 2	Bt.13542.1.S1_at	6,5	BF	B-factor, properdin
Bt.7655.1.S1_at	1,03	CSDA	cold shock domain protein A	Bt.278.1.S1_at	6,38	SAA3P	serum amyloid A3 pseudogene
Bt.2147.1.S1_at	1,03	PRKX	protein kinase, X-linked	Bt.4208.1.S1_at	6,07	IL8RB	interleukin 8 receptor, beta
Bt.6987.1.S1_at	1,03	B4GALT5	UDP-Gal:beta-GlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5	Bt.22322.1.S1_at	5,96	SAA3	serum amyloid A 3

ANHANG

Bt.155.1.S1_at	IL8	interleukin 8	Bt.28708.1.S1_at	IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein
Bt.1983.1.S1_at	EMR1	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1	Bt.7066.1.S1_at	ALOX5AP	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein
Bt.4199.1.S1_at	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	Bt.632.1.S1_at	TIMP1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1
Bt.26991.2.S1_a_at	ATP5F1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1	Bt.632.1.S1_s_at	TIMP1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1
Bt.7165.1.S1_at	CXCL6	chemokine ligand 6	Bt.21868.1.A1_at	IGSF6	immunoglobulin superfamily, member 6
Bt.13125.1.S1_s_at	BNBD-4	neutrophil beta-defensin 4	Bt.8022.1.S1_at	CTSC	cathepsin C
Bt.13628.2.S1_a_at	TGM3	transglutaminase 3	Bt.19072.1.A1_at	CTSC	cathepsin C
Bt.146.1.S1_at	BNBD-4	neutrophil beta-defensin 4	Bt.24600.1.S1_at	SOC3	suppressor of cytokine signaling 3
Bt.9974.1.S1_at	CCL3L1	chemokine ligand 3-like 1	Bt.2408.1.S1_s_at	CCL2	chemokine ligand 2
Bt.17989.1.A1_at	MGC165939	Hypothetical LOC517231	Bt.19160.1.A1_at	VNN2	vanin 2
Bt.10398.1.S1_at	PTX3	pentaxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	Bt.27757.1.S1_at	CHI3L2	chitinase 3-like 2
Bt.571.1.S1_at	LAP	lingual antimicrobial peptide	Bt.209.3.S1_at	LYZ	lysozyme
Bt.22116.1.A1_at	IL18BP	interleukin 18 binding protein	Bt.28015.1.S1_at	NCR1	natural cytotoxicity triggering receptor 1
Bt.26980.1.S1_at	BNBD10	beta-defensin 10	Bt.22637.1.S1_at	CTSC	cathepsin C
Bt.23042.1.S1_at	MT2A	metallothionein 2A	Bt.28225.1.A1_at	SAMSN1	SAM domain, SH3 domain and nuclear localisation signals, 1
Bt.24417.2.S1_at	DAF	decay accelerating factor for complement	Bt.13293.1.S1_at	CD48	CD48 antigen
Bt.28393.1.S1_at	DAF	decay accelerating factor for complement	Bt.13628.1.S1_at	TGM3	transglutaminase 3
Bt.16201.2.A1_at	S100A9	S100 calcium binding protein A9	Bt.22050.1.S1_at	HCK	hemopoietic cell kinase
Bt.24438.1.S1_a_at	CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor	Bt.5494.1.S1_at	CD44	CD44 antigen
Bt.24073.1.S1_at	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	Bt.8140.1.S1_at	FCER1G	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide
Bt.9693.1.S1_at	SERPINB3	serine proteinase inhibitor, clade B, member 3	Bt.2408.1.S1_at	CCL2	chemokine ligand 2
Bt.9774.1.S1_a_at	NMES1	normal mucosa of esophagus specific 1	Bt.23152.1.S1_at	RETN	resistin
Bt.15713.1.A1_at	PLEK	pleckstrin	Bt.26231.1.S1_at	ITGAX	integrin, alpha X
Bt.22079.1.A1_at	IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	Bt.1694.1.S1_at	TACSTD2	tumor-associated calcium signal transducer 2
Bt.1377.1.S1_at	CCR1	chemokine receptor 1	Bt.11061.1.S1_at	TNC	tenascin C
Bt.24217.1.S1_at	NFE2	nuclear factor, 45kDa	Bt.10865.1.S1_at	CTSC	cathepsin C
Bt.7625.1.S1_a_at	NCF4	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa	Bt.10855.1.S1_at	RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa
Bt.24417.1.A1_at	DAF	decay accelerating factor for complement	Bt.14005.1.S1_at	CD53	CD53 antigen
Bt.12206.1.S1_x_at	BNBD-9-LIKE	neutrophil beta-defensin-9 like peptide	Bt.9679.1.S1_at	KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence
Bt.27364.1.S1_at	PTAFR	platelet-activating factor receptor	Bt.2314.1.S1_at	SELL	selectin L
Bt.9208.1.S1_at	TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	Bt.18234.1.S1_at	IGSF6	immunoglobulin superfamily, member 6
Bt.21220.1.S1_at	EMR3	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 3	Bt.24918.1.A1_at	---	---
Bt.16048.1.S1_at	PRG1	proteoglycan 1, secretory granule	Bt.8544.1.S1_at	CD69	CD69 antigen
Bt.29351.1.A1_at	PRSS22	protease, serine, 22	Bt.14100.1.S1_at	OLFMD4	olfactomedin 4
Bt.5970.1.S1_a_at	S100A2	S100 calcium binding protein A2	Bt.2129.2.S1_at	CSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2
Bt.16425.1.A1_at	---	---	Bt.12304.1.S1_at	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier
Bt.9054.1.A1_at	---	---	Bt.12500.2.S1_a_at	LCP1	lymphocyte cytosolic protein 1
Bt.9391.2.S1_at	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	Bt.28561.1.S1_at	MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8
Bt.5373.1.S1_at	SLC11A1	solute carrier family 11, member 1	Bt.3809.1.S1_at	LDHA	lactate dehydrogenase A
Bt.2334.1.S1_at	CD68	CD68 antigen	Bt.18855.1.A1_at	---	---
Bt.7542.1.S1_at	BCL2A1	BCL2-related protein A1	Bt.21868.2.S1_at	IGSF6	immunoglobulin superfamily, member 6
Bt.142.1.S1_at	NCF1	neutrophil cytosolic factor 1	Bt.26655.1.S1_at	CCL19	chemokine ligand 19

ANHANG

Bt.17571.1.A1_at	2,87	SP11	spleen focus forming virus proviral integration oncogene spi1	Bt.15616.1.S1_at	2,34	SLC16A3	solute carrier family 16, member 3
Bt.8939.1.S1_at	2,84	TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	Bt.784.1.A1_at	2,34	SLA	Src-like adaptor
Bt.16018.1.S1_a_at	2,81	CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	Bt.1409.1.S1_at	2,34	CGI38	brain specific protein
Bt.28073.1.S1_at	2,8	PSTPIP2	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	Bt.15886.1.S1_at	2,33	ACSL5	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5
Bt.5395.1.S1_a_at	2,78	CSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2	Bt.19423.1.S1_at	2,32	ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A, member 1
Bt.11904.1.S1_at	2,77	ACSL6	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	Bt.16329.1.A1_at	2,32	TGIF	TGFB-induced factor
Bt.27087.1.A1_at	2,76	FLJ23235	hypothetical protein FLJ23235	Bt.3624.1.S1_at	2,31	PSMB10	proteasome subunit, beta type, 10
Bt.2899.1.S2_at	2,75	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Bt.4615.1.S1_at	2,31	ITGB2	integrin, beta 2
Bt.9485.1.S1_at	2,75	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	Bt.15751.1.S1_at	2,3	AMPD2	adenosine monophosphate deaminase 2
Bt.9841.1.S1_at	2,74	VMP1	likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1	Bt.15828.1.S1_at	2,3	TRIB1	tribbles homolog 1
Bt.29415.1.A1_at	2,72	C6orf32	chromosome 6 open reading frame 32	Bt.6837.1.S1_a_at	2,29	RFFL	fing
Bt.18469.1.S1_at	2,72	SLC7A3	solute carrier family 7, member 3	Bt.9027.1.S1_at	2,28	NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
Bt.16018.1.S2_at	2,7	CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	Bt.8015.3.A1_at	2,28	ACSL4	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4
Bt.4001.1.S1_at	2,7	HMOX1	heme oxygenase 1	Bt.6984.2.S1_a_at	2,25	ME2	malic enzyme 2, NAD-dependent, mitochondrial
Bt.6963.1.A1_at	2,7	EV12B	ecotropic viral integration site 2B	Bt.4474.2.S1_a_at	2,25	C20orf35	chromosome 20 open reading frame 35
Bt.9391.1.A1_at	2,69	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	Bt.15828.2.S1_at	2,24	TRIB1	tribbles homolog 1
Bt.8945.1.S1_at	2,68	TLR2	tol-like receptor 2	Bt.29477.1.A1_at	2,24	CHI3L2	chitinase 3-like 2
Bt.11088.1.S1_a_at	2,67	CD97	CD97 antigen	Bt.5538.1.S1_at	2,24	UGDH	UDP-glucose dehydrogenase
Bt.1389.1.S1_at	2,66	SLC39A2	solute carrier family 39, member 2	Bt.5774.1.S1_at	2,24	ETS2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
Bt.3046.2.S1_at	2,66	FCN1	ficoin 1	Bt.22179.1.S1_at	2,24	C1orf38	chromosome 1 open reading frame 38
Bt.5259.1.S1_at	2,66	HSXIAPAF1	XIAP associated factor-1	Bt.3525.1.S1_at	2,24	VMP1	likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1
Bt.9605.1.S1_at	2,64	MS4A8B	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8B	Bt.7469.1.S1_at	2,23	FCAR	Fc fragment of IgA, receptor for
Bt.14198.1.S1_at	2,63	LOC783295	Hypothetical protein LOC783295	Bt.25110.1.A1.at	2,22	H1FA	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit
Bt.6817.2.S1_at	2,62	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	Bt.16521.1.S1_at	2,22	PION	pigeon homolog (Drosophila)
Bt.3990.1.S1_at	2,6	SCIN	scinderin	Bt.23659.1.S1_at	2,21	SLC1A1	solute carrier family 1, member 1
Bt.2129.1.S1_at	2,59	CSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2	Bt.19670.1.A1_at	2,2	--	--
Bt.958.1.A1_at	2,58	TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	Bt.16123.2.S1_a_at	2,2	SGK	serum/glucocorticoid regulated kinase
Bt.16521.2.A1_at	2,58	PION	pigeon homolog (Drosophila)	Bt.9560.1.S1_at	2,19	CCL20	chemokine ligand 20
Bt.19272.1.A1_at	2,57	GPR84	G protein-coupled receptor 84	Bt.13289.2.S1_at	2,19	ARID5B	AT rich interactive domain 5B
Bt.24760.1.S1_at	2,55	LILRB3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 3	Bt.7588.1.A1_at	2,19	LCP1	lymphocyte cytosolic protein 1
Bt.20596.1.S1_at	2,54	EVA1	epithelial V-like antigen 1	Bt.15903.1.S1_at	2,18	TPMT	thiopurine S-methyltransferase
Bt.11586.1.S1_at	2,53	PYCARD	PYD and CARD domain containing	Bt.9379.1.S1_at	2,18	MAOA	monoamine oxidase A
Bt.351.1.S1_at	2,53	CORO1A	coronin, actin binding protein, 1A	Bt.17195.1.A1.at	2,18	EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
Bt.4130.1.S1_at	2,48	F5	coagulation factor V	Bt.23227.1.S1_at	2,18	MAD	MAX dimerization protein 1
Bt.1031.1.S1_at	2,44	CTSH	cathepsin H	Bt.6817.1.S1_at	2,18	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
Bt.1974.1.S1_at	2,42	RASL11B	RAS-like, family 11, member B	Bt.7912.1.A1_at	2,18	C11orf32	chromosome 11 open reading frame 32
Bt.16271.2.A1_at	2,42	CLECSF9	C-type lectin, superfamily member 9	Bt.16337.1.A1.at	2,16	IER5	immediate early response 5
Bt.28624.1.S1_at	2,41	SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9	Bt.4675.1.S1_a_at	2,15	MX1	myxovirus resistance 1, interferon-inducible protein p78
Bt.25307.1.A1_at	2,38	--	--	Bt.132.1.S1_at	2,15	DEFB1	defensin, beta 1
Bt.23174.2.S1_at	2,37	CLIC1	chloride intracellular channel 1	Bt.5401.1.S1_at	2,14	TGM2	transglutaminase 2
Bt.3661.1.S1_at	2,37	MMP19	matrix metalloproteinase 19	Bt.8957.1.S1_at	2,13	CXCR4	chemokine receptor 4
Bt.7130.1.S1_at	2,36	BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2	Bt.20286.1.S1_at	2,12	PDE4B	phosphodiesterase 4B, cAMP-specific

Bt.20288.1.S1_at	2, 11	NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2	Bt.12250.1.S1_at	1, 9	C14orf10	chromosome 14 open reading frame 10
Bt.15912.1.S1_at	2, 1	PLAC8	placenta-specific 8	Bt.20549.1.S1_at	1, 88	RGS19	regulator of G-protein signalling 19
Bt.22390.3.A1_at	2, 1	CP	ceruloplasmin	Bt.18469.2.A1_at	1, 88	---	---
Bt.19352.1.A1_at	2, 07	KPNA3	karyopherin alpha 3	Bt.3880.1.S1_at	1, 87	MARCKSL1	MARCKS-like 1
Bt.26722.1.A1_a_at	2, 07	WDFY4	WDFY family member 4	Bt.4915.1.S1_at	1, 87	COTL1	coactosin-like 1
Bt.15788.1.S1_a_at	2, 06	---	---	Bt.21238.1.S1_at	1, 86	NRP2	neuropilin 2
Bt.25839.1.A1_at	2, 05	IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1	Bt.21539.1.S1_at	1, 86	FAM49B	family with sequence similarity 49, member B
Bt.17514.1.S1_at	2, 04	TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	Bt.5432.3.S1_at	1, 86	TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1
Bt.27854.1.S1_at	2, 03	NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated	Bt.5605.2.S1_at	1, 86	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
Bt.24354.1.S1_at	2, 03	CSTB	cystatin B	Bt.26552.1.S1_at	1, 85	IL10RB	interleukin 10 receptor, beta
Bt.22978.2.S1_at	2, 02	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	Bt.4946.1.S1_at	1, 85	RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
Bt.3863.1.S1_at	2, 02	ZFP36	zinc finger protein 36, C3H type, homolog	Bt.19945.1.A1_at	1, 85	---	---
Bt.15788.3.S1_at	2, 02	SLC27A1	solute carrier family 27, member 1	Bt.27151.2.S1_at	1, 85	PIIRA	paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha
Bt.4670.1.S1_at	2, 02	TGFB1	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	Bt.942.1.S1_at	1, 84	C20orf117	chromosome 20 open reading frame 117
Bt.231.1.S1_at	2, 01	TXN	thioredoxin	Bt.3994.2.S1_a_at	1, 84	SMN2	survival of motor neuron 2, centromeric
Bt.21736.1.A1_at	2, 01	RASSF2	Ras association domain family 2	Bt.15675.1.S1_at	1, 83	ADAMTS4	a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 4
Bt.20542.1.S1_at	2	JUNB	jun B proto-oncogene	Bt.22692.1.A1_at	1, 83	IL6R	interleukin 6 receptor
Bt.5432.1.S1_at	2	TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1	Bt.4898.1.S1_at	1, 83	BASP1	brain abundant, membrane attached signal protein 1
Bt.12645.1.S1_at	1, 99	RAB15	RAB15, member RAS oncogene family	Bt.612.1.S1_at	1, 83	GSR	glutathione reductase
Bt.8820.1.S1_a_at	1, 99	HOLS1	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	Bt.15957.1.S1_at	1, 83	MX2	myxovirus resistance 2
Bt.28271.1.A1_at	1, 99	MAD	MAX dimerization protein 1	Bt.16925.1.A1_at	1, 83	STEAP	six transmembrane epithelial antigen of the prostate
Bt.8137.1.S2_at	1, 98	SOC33	suppressor of cytokine signaling 3	Bt.28225.2.S1_at	1, 82	SAMSN1	SAM domain, SH3 domain and nuclear localisation signals, 1
Bt.2432.1.S1_at	1, 97	WTAP	Wilms tumor 1 associated protein	Bt.4067.1.S1_at	1, 82	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
Bt.4317.1.S1_at	1, 97	GPX1	glutathione peroxidase 1	Bt.5390.1.S1_at	1, 82	MVP	major vault protein
Bt.17467.1.S1_at	1, 96	EMB	emigin homolog	Bt.5774.2.S1_at	1, 82	ETS2	vets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
Bt.1333.1.S1_at	1, 96	RYR1	ryanodine receptor 1	Bt.20327.1.S1_a_at	1, 81	UPP1	uridine phosphorylase 1
Bt.18643.1.A1_at	1, 95	---	---	Bt.9423.1.S1_at	1, 81	PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
Bt.22824.1.A1_at	1, 94	ZNF326	zinc finger protein 326	Bt.2657.1.S1_a_at	1, 81	URP2	UNC-112 related protein 2
Bt.28723.1.A1_at	1, 93	RASL11B	RAS-like, family 11, member B	Bt.22803.1.S1_at	1, 8	TUBB	tubulin, beta polypeptide
Bt.5590.2.S1_at	1, 93	PTPN2	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2	Bt.9158.1.A1_at	1, 8	---	---
Bt.11230.1.S1_at	1, 93	AGPAT9	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9	Bt.19204.1.S1_at	1, 77	FGL2	fibrinogen-like 2
Bt.9202.1.S1_at	1, 92	FGL2	fibrinogen-like 2	Bt.18827.1.A1_at	1, 76	MEFV	Mediterranean fever
Bt.24228.1.S1_at	1, 92	---	---	Bt.1322.1.S1_at	1, 75	TXNDC	thioredoxin domain containing
Bt.3988.1.S1_at	1, 92	BZRP	benzodiazepine receptor	Bt.16467.1.S1_at	1, 74	KLHL8	kelch-like 8
Bt.5229.1.S1_at	1, 91	SERPINE1	serine proteinase inhibitor, clade E, member 1	Bt.234.1.S1_at	1, 74	IL18	interleukin 18
Bt.19897.1.A1_at	1, 91	ATP5F1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1	Bt.2519.1.S1_at	1, 74	PLAU	plasminogen activator, urokinase
Bt.24884.1.A1_a_at	1, 91	CSF2RA	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity	Bt.4140.1.S1_at	1, 74	CYBA	cytochrome b-245, alpha polypeptide
Bt.22021.1.S1_at	1, 91	IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	Bt.10185.1.S1_at	1, 74	CTMP	C-terminal modulator protein
Bt.17926.1.A1_at	1, 9	CTSB	cathepsin B	Bt.6091.1.S1_at	1, 74	GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Bt.27964.1.A1_at	1, 9	RCL1	RNA terminal phosphate cyclase-like 1	Bt.21399.3.S1_a_at	1, 74	NEGR1	neuronal growth regulator 1
Bt.9792.1.S1_at	1, 9	ARRDC4	arrestin domain containing 4	Bt.19623.1.S1_at	1, 73	EV12B	ecotropic viral integration site 2B
				Bt.13278.1.S1_at	1, 73	TSAP6	tsap6

ANHANG

Bt.24441.1.S1_at	KIR2DS5	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 5	Bt.6009.1.S1_at	SLC7A7	solute carrier family 7, member 7
Bt.21221.1.S1_at	NCR3	leukocyte specific transcript 1	Bt.22360.1.S1_at	BIRC1	baculoviral IAP repeat-containing 1
Bt.10212.1.S1_at	PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	Bt.3001.1.S1_at	C14orf147	chromosome 14 open reading frame 147
Bt.643.1.S1_at	CCL23	chemokine ligand 23	Bt.4474.1.S1_at	C20orf35	chromosome 20 open reading frame 35
Bt.16382.1A1_at	CALCLR	calcitonin receptor-like	Bt.16889.1.S1_at	WBSCR5	Williams-Beuren syndrome chromosome region 5
Bt.2153.1.S1_at	IER3	immediate early response 3	Bt.11080.1.S1_at	IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma
Bt.552.1.S1_at	CCL5	chemokine ligand 5	Bt.12891.1.S1_at	RRAD	Ras-related associated with diabetes
Bt.13022.1.S2_at	ITGAL	integrin, alpha L	Bt.20923.1.S1_at	EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2, alpha kinase 2
Bt.2899.1.S1_at	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Bt.27316.2A1_at	RBBP8	retinoblastoma binding protein 8
Bt.20942.1.S1_at	PIK3AP1	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1	Bt.7671.1.S1_at	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3
Bt.8745.1.S1_at	FLJ23231	hypothetical protein FLJ23231	Bt.1083.2.S1_at	LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
Bt.1457.1A1_at	PILRA	paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha	Bt.15713.2S1_at	PLEK	pleckstrin
Bt.17148.2S1_at	FEM1C	fem-1 homolog c	Bt.18623.1A1_at	MAPRE2	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2
Bt.21431.1.S1_at	LTB	lymphotoxin beta	Bt.2626.1.S1_at	CD47	CD47 antigen
Bt.22430.1A1_at	CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptide	Bt.28761.1A1_s_at	SQRDL	sulfide quinone reductase-like
Bt.1052.1A1_at	CH25H	cholesterol 25-hydroxylase	Bt.19706.1.S1_at	ZFP36L2	zinc finger protein 36, C3H type-like 2
Bt.12195.1.S1_at	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	Bt.13604.1.S1_at	ADAM19	a disintegrin and metalloproteinase domain 19
Bt.16467.2A1_at	KLHL8	kelch-like 8	Bt.24098.1A1_at	IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1
Bt.27351.1.S1_at	SLC5A5	solute carrier family 5, member 5	Bt.409.1.S1_at	GNG5	guanine nucleotide binding protein, gamma 5
Bt.461.1.S1_at	ARF2	ADP-ribosylation factor 2	Bt.5200.1.S1_at	DDX39	DEAD box polypeptide 39
Bt.26567.1.S1_at	AP4S1	adaptor-related protein complex 4, sigma 1 subunit	Bt.5897.2.S1_at	UBD	ubiquitin D
Bt.4067.1.S1_a_at	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	Bt.28321.1A1_at	D8S2298E	reproduction 8
Bt.16123.1.S1_at	SGK	serum/glucocorticoid induced regulated kinase	Bt.21342.1.S1_at	S100A14	S100 calcium binding protein A14
Bt.1556.1.S1_at	HRSP12	heat-responsive protein 12	Bt.3120.1A1_at	LIPA	lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase
Bt.1847.1.S1_at	SIGLEC5	sialic acid binding Ig-like lectin 5	Bt.13670.1.S2_at	ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
Bt.4598.1.S1_at	pp9099	PH domain-containing protein	Bt.4018.1.S1_at	ARRB1	arrestin, beta 1
Bt.10997.1.S1_at	DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	Bt.5604.1A1_at	--	--
Bt.19263.1.S1_at	SNX24	sorting nexin 24	Bt.17644.1A1_at	MGC143392	Hypothetical LOC509493
Bt.9351.1.S1_at	NFAM1	NFAT activation molecule 1	Bt.15808.1.S1_at	MARCH3	membrane-associated ring finger 3
Bt.9947.1.S1_at	SNN	stannin	Bt.16049.1.S1_at	LAPTM5	lysosomal associated multispanning membrane protein 5
Bt.3887.1.S1_at	EPIIM	epimorphin	Bt.27877.1.S1_at	MYO1F	myosin IF
Bt.27077.1.S1_at	FY	Duffy blood group	Bt.5296.1.S1_at	SQRDL	sulfide quinone reductase-like
Bt.4902.1.S1_at	CTSZ	cathepsin Z	Bt.7043.2.S1_a_at	VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
Bt.23969.1A1_at	MGC54289	hypothetical protein MGC54289	Bt.7467.1.S1_at	KCTD12	potassium channel tetramerisation domain containing 12
Bt.29928.1.S1_at	SSH2	slingshot homolog 2	Bt.20236.1.S1_at	TSRC1	thrombospondin repeat containing 1
Bt.29099.1.S1_at	CD80	CD80 antigen	Bt.4558.1.S1_at	CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptide
Bt.10230.1A1_at	MLSTD2	male sterility domain containing 2	Bt.5372.1.S1_at	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1, human rhinovirus receptor
Bt.8143.1.S1_at	MX2	myxovirus resistance 2	Bt.19784.1A1_at	AMPD3	adenosine monophosphate deaminase
Bt.9211.1.S1_at	APBB1IP	amyloid beta precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein	Bt.8328.1.S1_at	SLC11A2	solute carrier family 11, member 2
Bt.11166.1.S1_at	--	--	Bt.16147.1A1_at	PRSS2	protease, serine, 2
Bt.24434.1A1_at	SEIMA6A	sema domain, transmembrane domain, and cytoplasmic domain, 6A	Bt.23655.1.S1_at	PTPRE	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E
Bt.29715.1.S1_at	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	Bt.1729.1A1_at	FTL	ferritin, light polypeptide

ANHANG

Bt.22265.1.S1_at	ZNF225	zinc finger protein 225	1,52	RNF183	ring finger protein 183	1,42
Bt.21164.1.S1_at	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	1,51	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	1,41
Bt.3750.1.S1_at	S100A11	S100 calcium binding protein A11	1,51	FBXW7	ferritin, heavy polypeptide 1	1,41
Bt.5092.1.S1_at	MTAP	methylthioadenosine phosphorylase	1,51	CSF2RA	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity	1,41
Bt.983.1.S1_at	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	1,5	ISGF3G	interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa	1,41
Bt.19945.2.A1_at	---	---	1,5	SOAT1	sterol O-acyltransferase 1	1,4
Bt.18643.1.A1_a_at	---	---	1,49	PSMB8	proteasome subunit, beta type, 8	1,4
Bt.7171.1.S1_at	TAPBP1	TAP binding protein-like	1,49	IL6ST	interleukin 6 signal transducer	1,4
Bt.13873.2.S1_at	LPGAT1	lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1	1,49	HCLS1	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	1,4
Bt.20165.2.S1_at	---	---	1,49	FLJ32332	likely ortholog of mouse protein phosphatase 2C eta	1,4
Bt.14676.1.S1_at	PARP14	poly polymerase family, member 14	1,48	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	1,39
Bt.21803.1.A1_at	NTF53	5'-nucleotidase, cytosolic III	1,48	MOV10	Mov10, Moloney leukemia virus 10, homolog	1,39
Bt.27082.1.S1_at	ZDHHC2	zinc finger, DHHC domain containing 2	1,48	CTSS	cathepsin S	1,39
Bt.22783.1.S1_at	ENO1	enolase 1,	1,47	TBXAS1	thromboxane A synthase 1	1,38
Bt.22785.1.S1_at	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein, beta	1,47	VAV1	vav 1 oncogene	1,38
Bt.23180.1.S1_at	PFN1	profilin 1	1,47	CKAP4	cytoskeleton-associated protein 4	1,38
Bt.8077.1.S1_at	PGK1	phosphoglycerate kinase 1	1,47	PTPRE	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	1,38
Bt.8947.1.S1_at	LGMM	legumain	1,47	TM4SF17	transmembrane 4 superfamily member 17	1,38
Bt.2183.1.A1_at	HEXB	hexosaminidase B	1,46	STX6	syntaxin 6	1,38
Bt.24492.1.S1_at	STAT2	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	1,46	IL10RA	interleukin 10 receptor, alpha	1,38
Bt.366.2.S2_a_at	CSF1	colony stimulating factor 1	1,46	FLJ40342	hypothetical protein FLJ40342	1,38
Bt.16024.1.S1_at	SEMA4D	sema domain, immunoglobulin domain, transmembrane domain and short cytoplasmic domain, 4D	1,46	PTPNS1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	1,38
Bt.13410.1.S1_at	RPS6KA3	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3	1,45	HINT3	histidine triad nucleotide binding protein 3	1,37
Bt.16673.1.S1_at	VAMP5	vesicle-associated membrane protein 5	1,45	DCBLD2	discoidin, CUB and LCC domain containing 2	1,37
Bt.20776.1.A1_at	---	---	1,45	LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	1,36
Bt.393.1.S1_at	CTSB	cathepsin B	1,45	PKM2	pyruvate kinase, muscle	1,36
Bt.9571.2.S1_a_at	RBM3	RNA binding motif protein 3	1,45	CD14	CD14 antigen	1,36
Bt.9972.1.S1_at	ITGB6	integrin, beta 6	1,45	OTUB1	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 1	1,36
Bt.23631.1.S1_at	ZNF281	zinc finger protein 281	1,45	NFE2L2	nuclear factor-like 2	1,36
Bt.15729.1.S1_at	PSME2	proteasome activator subunit 2	1,44	PSMA1	proteasome subunit, alpha type, 1	1,35
Bt.16478.1.A1_at	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	1,44	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3	1,35
Bt.4635.1.S1_at	CNN2	calponin 2	1,44	IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30	1,35
Bt.8345.1.S1_at	LEPROT	leptin receptor overlapping transcript	1,44	C9orf64	chromosome 9 open reading frame 64	1,35
Bt.1915.1.S1_at	SAV1	salvador homolog 1	1,44	PSME1	proteasome activator subunit 1	1,35
Bt.20891.1.S1_at	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	1,44	ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase 1	1,35
Bt.21410.1.S1_at	PPGB	protective protein for beta-galactosidase	1,44	SLOC2A24	solute carrier family 25, member 24	1,35
Bt.6372.1.A1_at	SLC7A3	solute carrier family 7, member 3	1,44	SOX4	SRY-box 4	1,35
Bt.13130.1.S1_at	CD40	CD40 antigen	1,43	CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptide	1,35
Bt.143.1.S1_at	NCF2	neutrophil cytosolic factor 2	1,43	IL1B	interleukin 1, beta	1,34
Bt.1494.1.S1_at	GALNT2	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	1,42	NRP2	neuropilin 2	1,34
Bt.27240.1.A1_at	SLC04A1	solute carrier organic anion transporter family, member 4A1	1,42	GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	1,34
				PRR13	proline rich 13	1,34

Bt.19807.1.S1_at	SCAP2	src family associated phosphoprotein 2	Bt.8820.1.S1_at	HCLS1	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1
Bt.11352.1.S1_at	EBNA1BP2	EBNA1 binding protein 2	Bt.22849.1.S1_at	GARNL4	GTPase activating Rap/RanGAP domain-like 4
Bt.27563.1.A1_at	OSBPL11	oxysterol binding protein-like 11	Bt.4541.3.S1_a_at	FLJ32332	likely ortholog of mouse protein phosphatase 2C eia
Bt.6597.1.S1_at	LGALS3BP	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	Bt.4261.1.S1_at	PTK9L	PTK9L protein tyrosine kinase 9-like
Bt.12609.1.A1_at	RASGRP3	RAS guanyl releasing protein 3	Bt.12506.1.S1_at	SERPINE2	serine proteinase inhibitor, clade E, member 2
Bt.21929.1.S1_at	LOC151162	hypothetical protein LOC151162	Bt.13134.1.S1_at	JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog
Bt.8549.2.S1_at	---	---	Bt.23135.1.S1_at	TAGLN2	transgelin 2
Bt.20532.1.S1_at	PSMB9	proteasome subunit, beta type, 9	Bt.6219.1.S1_at	NINJ1	ninjurin 1
Bt.25669.1.S1_at	MCOLN2	mucoilin 2	Bt.7190.1.S1_at	CYP11A1	cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1
Bt.5897.1.S1_at	UBD	ubiquitin D	Bt.9448.1.S1_at	TPM3	tropomyosin 3
Bt.20245.1.S1_at	CKIP-1	CK2 interacting protein 1; HQ0024c protein	Bt.9286.1.S1_at	LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor
Bt.19243.1.A1_at	SNX6	sorting nexin 6	Bt.6397.2.S1_at	HMG2	high-mobility group box 2
Bt.8308.2.S1_at	NRP2	neuropilin 2	Bt.4884.1.S1_at	RILP2	Rab interacting lysosomal protein-like 2
Bt.24884.2.S1_at	CSF2RA	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity	Bt.21717.1.S1_at	VAV1	vav 1 oncogene
Bt.8785.1.S1_at	DRCTNMB1A	down-regulated by Ctnb1, a	Bt.12322.1.S1_at	AHCY	S-adenosylhomocysteine hydrolase
Bt.28320.1.A1_at	ANKRD17	ankyrin repeat domain 17	Bt.16340.1.A1_at	FLJ32810	hypothetical protein FLJ32810
Bt.15736.1.S1_at	HA-1	minor histocompatibility antigen HA-1	Bt.20416.1.S1_at	TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B
Bt.11164.1.S1_at	FGD2	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 2	Bt.21732.1.S1_at	RNASET2	ribonuclease T2
Bt.21154.2.S1_at	STK4	serine/threonine kinase 4	Bt.3890.1.S1_at	TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
Bt.6434.1.S1_at	RNF149	ring finger protein 149	Bt.4750.1.S1_at	TKT	transketolase
Bt.17090.1.S1_at	DKFZp434M2	hypothetical protein DKFZp434M202	Bt.24069.1.A1_at	---	---
Bt.26417.1.A1_at	APG5L	APG5 autophagy 5-like	Bt.9296.1.A1_at	GBP3	guanylate binding protein 3
Bt.5605.1.S1_at	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	Bt.11264.1.S1_at	IHPK2	inositol hexaphosphate kinase 2
Bt.28471.1.S1_at	ZNF281	zinc finger protein 281	Bt.15972.1.S1_at	GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa
Bt.19423.2.S1_at	ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A, member 1	Bt.23218.1.S1_at	CTSK	cathepsin K
Bt.21819.1.S1_at	PSTPIP1	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1	Bt.4292.1.S1_at	ACTR3	ARP3 actin-related protein 3 homolog
Bt.16118.1.S1_at	MICL	myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor	Bt.903.1.S1_at	CDC10	coiled-coil domain containing 10
Bt.22216.1.S1_at	FEM1C	fem-1 homolog c	Bt.20276.1.S1_at	OACT1	O-acyltransferase domain containing 1
Bt.6785.1.A1_at	---	---	Bt.11159.1.S1_at	JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog
Bt.25812.1.A1_at	GPR109B	G protein-coupled receptor 109B	Bt.14578.1.A1_at	CALCRL	calcitonin receptor-like
Bt.3651.2.A1_at	---	---	Bt.20297.1.S1_at	MYD88	myeloid differentiation primary response gene
Bt.865.1.S1_at	LOC257106	hypothetical protein LOC257106	Bt.21950.1.S1_at	CCL16	chemokine ligand 16
Bt.9720.1.S1_at	SH3MD2	SH3 multiple domains 2	Bt.2506.1.S1_at	DKK3	Dickkopf homolog 3
Bt.1942.1.S1_at	PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	Bt.11259.1.S1_at	FAM14A	family with sequence similarity 14, member A
Bt.22773.1.S1_at	SLC25A19	solute carrier family 25, member 19	Bt.15534.1.S1_a_at	K-ALPHA-1	tubulin, alpha, ubiquitous
Bt.23488.1.S1_at	PFC	properdin P factor, complement	Bt.13516.1.S1_at	TBXAS1	thromboxane A synthase 1
Bt.14624.2.S1_at	PSMD14	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 14	Bt.15545.1.S1_at	EIF4A1	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1
Bt.16597.1.S1_at	EXOSC4	exosome component 4	Bt.24531.1.S1_at	IL4R	interleukin 4 receptor
Bt.20095.2.S1_a_at	FXYD5	FXYD domain containing ion transport regulator 5	Bt.4574.1.S1_at	SDCBP	syndecan binding protein
Bt.5508.1.S1_at	IFNAR2	interferon receptor 2	Bt.27239.1.A1_at	FLJ34389	hypothetical protein FLJ34389
Bt.6411.1.S1_at	PSMA2	proteasome subunit, alpha type, 2	Bt.21999.1.S1_at	CCDC88A	Coiled-coil domain containing 88A
			Bt.25087.1.A1_at	RHOQ	ras homolog gene family, member Q

Bt.10077.1.S2_at	1,2	IRF1	interferon regulatory factor 1	Bt.21364.1.A1_at	1,15	SLC38A1	solute carrier family 38, member 1
Bt.1290.1.A1_a_at	1,2	PSMB2	proteasome subunit, beta type, 2	Bt.28662.1.A1_at	1,15	RAB27B	RAB27B, member RAS oncogene family
Bt.22472.1.S1_at	1,2	CREM	cAMP responsive element modulator	Bt.9170.1.A1_at	1,15	LOHN	LOHN protein
Bt.411.1.S1_at	1,2	NRG1	neuregulin 1	Bt.4541.1.S1_at	1,15	FLJ32332	likely ortholog of mouse protein phosphatase 2C eta
Bt.4303.1.S1_at	1,2	ADA	adenosine deaminase	Bt.1027.1.S1_at	1,14	PRKCD	protein kinase C, delta
Bt.526.1.S1_at	1,2	PROCR	protein C receptor, endothelial	Bt.22854.1.S1_at	1,14	CA2	carbonic anhydrase II
Bt.24096.1.A1_at	1,2	IGF1	insulin-like growth factor 1	Bt.27421.1.S1_at	1,14	ARHGEF2	rho/rac guanine nucleotide exchange factor 2
Bt.12649.1.S1_at	1,2	IMPA3	myo-inositol monophosphatase A3	Bt.4966.1.S1_at	1,14	PSMB4	proteasome subunit, beta type, 4
Bt.10997.3.S1_a_at	1,19	DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	Bt.7500.1.S1_at	1,14	RAB8B	RAB8B, member RAS oncogene family
Bt.16087.1.S1_at	1,19	NID2	nidogen 2	Bt.13284.1.A1_at	1,14	RNF19	ring finger protein 19
Bt.1986.1.S1_at	1,19	CSTB	cystatin B	Bt.22162.1.S1_at	1,14	GLB1	galactosidase, beta 1
Bt.9309.1.A1_at	1,19	NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	Bt.21227.1.A1_at	1,14	FLJ23091	putative NFKB activating protein 373
Bt.9662.1.S1_at	1,19	PTGER4	prostaglandin E receptor 4	Bt.12030.2.S1_at	1,13	ACTN4	actinin, alpha 4
Bt.16221.1.A1_at	1,19	DKFZP564J0863	DKFZP564J0863 protein	Bt.20163.2.S1_a_at	1,13	PP1L1	peptidylprolyl isomerase -like 1
Bt.15794.1.S1_at	1,19	MBD2	methyl-CpG binding domain protein 2	Bt.21154.1.A1_at	1,13	STK4	serine/threonine kinase 4
Bt.15942.1.A1_at	1,18	SUSD3	sushi domain containing 3	Bt.4398.1.S1_at	1,13	EDN1	endothelin 1
Bt.19845.2.A1_at	1,18	F13A1	coagulation factor XIII, A1 polypeptide	Bt.7176.1.S1_at	1,13	SPON1	spondin 1, extracellular matrix protein
Bt.393.1.S2_at	1,18	CTSB	cathepsin B	Bt.7612.1.S1_at	1,13	GTF2F2	general transcription factor IIF, polypeptide 2, 30kDa
Bt.4856.1.S2_at	1,18	IL1B	interleukin 1, beta	Bt.9129.1.S1_at	1,13	JMJD3	jumonji domain containing 3
Bt.7640.1.S1_at	1,18	GNPDA1	glucosamine-6-phosphate deaminase 1	Bt.14029.1.S1_at	1,13	GALNACT-2	chondroitin sulfate GalNACT-2
Bt.7707.1.S1_at	1,18	CCM2	cerebral cavernous malformation 2	Bt.23380.2.S1_at	1,13	HNRPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
Bt.8781.1.S1_at	1,18	GFPT2	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	Bt.20554.1.S1_at	1,13	PREX1	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent RAC exchanger 1
Bt.11875.1.S1_at	1,17	BIN2	bridging integrator 2	Bt.9589.1.S1_at	1,13	TPM4	tropomyosin 4
Bt.18165.1.A1_at	1,17	MAPK6	mitogen-activated protein kinase 6	Bt.21343.2.A1_a_at	1,12	GMFG	glia maturation factor, gamma
Bt.29559.1.S1_at	1,17	CNOT6	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6	Bt.5237.1.S1_at	1,12	IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4
Bt.6798.1.A1_at	1,17	ZDHHC2	zinc finger, DHHC domain containing 2	Bt.5362.1.S1_at	1,12	SERPINA3	serine proteinase inhibitor, clade A, member 3
Bt.23544.1.S1_at	1,17	PTTG2	pituitary tumor-transforming 2	Bt.9448.1.S2_at	1,12	TPM3	tropomyosin 3
Bt.27263.1.A1_at	1,17	ZNF217	zinc finger protein 217	Bt.22564.1.A1_at	1,12	GGTA1	glycoprotein, alpha-galactosyltransferase 1
Bt.10014.1.S1_at	1,17	SBNO2	strawberry notch homolog 2 (Drosophila)	Bt.6146.1.S1_at	1,12	KIF21B	kinesin family member 21B
Bt.22362.1.S1_at	1,16	SH3KBP1	SH3-domain kinase binding protein 1	Bt.24978.1.A1_at	1,12	MOCS2	molybdenum cofactor synthesis 2
Bt.22773.2.S1_at	1,16	SLC25A19	solute carrier family 25, member 19	Bt.20163.3.S1_a_at	1,11	PP1L1	peptidylprolyl isomerase -like 1
Bt.5499.1.S1_at	1,16	CAPG	capping protein, gelsolin-like	Bt.26968.1.S1_at	1,11	PLXNC1	plexin C1
Bt.9064.1.S1_at	1,16	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Bt.422.1.S2_at	1,11	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
Bt.25303.1.A1_at	1,16	GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	Bt.4585.1.S1_at	1,11	ACTP2	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2
Bt.3923.1.S1_at	1,16	C21orf63	chromosome 21 open reading frame 63	Bt.7081.2.S1_at	1,11	PTPRE	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E
Bt.16082.1.S1_at	1,15	C1QBP	complement component 1, q subcomponent binding protein	Bt.8743.1.S1_at	1,11	TACC3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3
Bt.22344.1.S1_at	1,15	BHLHB2	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	Bt.10130.1.S1_at	1,11	SQRDL	sulfide quinone reductase-like
Bt.23233.2.S1_at	1,15	USP18	ubiquitin specific protease 18	Bt.2344.1.S1_at	1,1	PSEN2	presenilin 2
Bt.26612.2.S1_at	1,15	RGS16	regulator of G-protein signalling 16	Bt.7552.1.S1_at	1,1	AP2M1	adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit
Bt.27694.1.S1_at	1,15	SRD5A1	steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1	Bt.24484.2.S1_a_at	1,1	MITD1	MIT, microtubule interacting and transport, domain containing 1
Bt.4307.1.S1_at	1,15	RHOG	ras homolog gene family, member G	Bt.13983.1.A1_at	1,1	LYRIC	LYRIC/3D3
				Bt.28275.1.S1_at	1,1	MICAL-L2	MICAL-like 2

ANHANG

Bt.13198.1.S1_at	1,1	PTPN1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	Bt.9578.1.S2_at	1,06	PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform
Bt.1345.1.S1_at	1,09	F2RL2	coagulation factor II receptor-like 2	Bt.20220.1.S1_at	1,06	E2F2	E2F transcription factor 2
Bt.6350.1.A1_at	1,09	UBE2H	ubiquitin-conjugating enzyme E2H	Bt.20738.1.S1_at	1,06	MILSTD2	male sterility domain containing 2
Bt.7281.1.S1_at	1,09	ELOVL5	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids	Bt.13331.2.S1_a_at	1,05	TANK	TRAF family member-associated NFKB activator
Bt.832.1.S1_at	1,09	HADHB	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, beta subunit	Bt.17465.1.S1_at	1,05	RHBDL2	rhomoid, veinlet-like 2
Bt.848.1.S1_at	1,09	NDUFV2	NADH dehydrogenase flavoprotein 2, 24kDa	Bt.22533.1.S1_at	1,05	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate
Bt.9632.2.S1_at	1,09	DMBT1	deleted in malignant brain tumors 1	Bt.27240.2.S1_at	1,05	SLCO4A1	solute carrier organic anion transporter family, member 4A1
Bt.9179.1.A1_at	1,09	C17orf27	chromosome 17 open reading frame 27	Bt.27358.2.S1_at	1,05	TREML2	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 2
Bt.11993.1.S1_at	1,09	DHR38	dehydrogenase/reductase member 8	Bt.5326.2.S1_at	1,05	BTG2	BTG family, member 2
Bt.5252.1.S1_at	1,09	PGAM2	2,3-bisphosphoglycerate mutase	Bt.7670.1.A1_at	1,05	BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6
Bt.2959.1.A1_at	1,09	PIGX	phosphatidylinositol glycan, class X	Bt.9754.1.S1_at	1,05	NGO1	NADH dehydrogenase, quinone 1
Bt.10933.1.S1_at	1,08	FYB	FYB binding protein	Bt.21866.1.S1_at	1,05	NOT_AVAILABLE	NOT_AVAILABLE
Bt.16094.1.S1_at	1,08	EZH2	enhancer of zeste homolog 2	Bt.9086.1.S1_at	1,05	AP1S2	adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit
Bt.2173.1.S1_at	1,08	ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	Bt.9974.1.S1_a_at	1,05	CCL3L1	chemokine ligand 3-like 1
Bt.27564.1.A1_at	1,08	LGP2	likely ortholog of mouse D11lgp2	Bt.26005.1.A1_at	1,05	CRK7	CDC2-related protein kinase 7
Bt.9207.1.S1_at	1,08	MSN	moesin	Bt.13679.2.S1_a_at	1,04	ZNF207	zinc finger protein 207
Bt.26397.1.A1_at	1,08	ARRB1	arrestin, beta 1	Bt.19933.1.S1_at	1,04	FUBP1	far upstream element binding protein 1
Bt.6846.1.S1_at	1,08	ARPC2	actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34kDa	Bt.20583.1.S1_at	1,04	VBP1	von Hippel-Lindau binding protein 1
Bt.5599.1.S1_at	1,08	C9orf19	chromosome 9 open reading frame 19	Bt.21475.3.S1_a_at	1,04	AA1F	apoptosis antagonizing transcription factor
Bt.24704.1.S1_at	1,08	CXorf26	chromosome X open reading frame 26	Bt.22740.1.A1_at	1,04	C1GALT1	core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase, 1
Bt.28680.1.S1_at	1,08	FLJ12519	hypothetical protein FLJ12519	Bt.23438.1.S1_at	1,04	ANTXR2	anthrax toxin receptor 2
Bt.3994.2.S1_s_at	1,08	SMN2	survival of motor neuron 2, centromeric	Bt.4311.1.S1_at	1,04	GNAI2	guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting activity polypeptide 2
Bt.22078.1.S1_at	1,07	ATP6AP2	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 2	Bt.21853.1.S1_at	1,04	AP1S2	adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit
Bt.272.1.S1_at	1,07	PIM1	pim-1 oncogene	Bt.26851.1.S1_at	1,04	FLJ11259	hypothetical protein FLJ11259
Bt.5590.1.S1_at	1,07	PTPN2	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2	Bt.9811.1.S1_at	1,04	TNFSF5IP1	tumor necrosis factor superfamily, member 5-induced protein 1
Bt.6557.1.S1_at	1,07	GPSM3	G-protein signalling modulator 3	Bt.12035.1.S1_at	1,03	TIMM13	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog
Bt.7963.1.S1_at	1,07	EHD1	EH-domain containing 1	Bt.2070.1.A1_at	1,03	DUSP10	dual specificity phosphatase 10
Bt.16263.1.A1_s_at	1,07	LCHN	LCHN protein	Bt.21678.1.S1_at	1,03	TAPBP	TAP binding protein
Bt.8718.1.S1_at	1,07	KIAA0247	KIAA0247	Bt.28177.1.A1_at	1,03	MCTP2	multiple C2-domains with two transmembrane regions 2
Bt.9781.1.S1_at	1,07	EGFL5	EGF-like domain, multiple 5	Bt.4149.1.S1_at	1,03	PTPN6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6
Bt.2174.2.A1_at	1,07	FLJ10808	hypothetical protein FLJ10808	Bt.10884.1.S1_at	1,03	CDK6	cyclin-dependent kinase 6
Bt.21250.1.S1_a_at	1,07	LR8	LR8 protein	Bt.21851.1.A1_at	1,03	SP100	nuclear antigen Sp100
Bt.13237.1.S1_at	1,06	PSMA4	proteasome subunit, alpha type, 4	Bt.24692.1.S1_at	1,03	ADRBK2	adrenergic, beta, receptor kinase 2
Bt.14987.1.A1_at	1,06	ATP6AP2	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 2	Bt.28700.1.S1_at	1,03	C2orf22	chromosome 2 open reading frame 22
Bt.17809.2.S1_at	1,06	ACTR6	ARP6 actin-related protein 6 homolog	Bt.1154.1.S1_at	1,02	WDR1	WD repeat domain 1
Bt.20249.1.S1_a_at	1,06	ABCD3	ATP-binding cassette, sub-family D, member 3	Bt.13528.1.A1_at	1,02	PSMD12	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 12
Bt.22456.2.S1_a_at	1,06	ADAM8	a disintegrin and metalloproteinase domain 8	Bt.13719.1.S1_at	1,02	IL6ST	interleukin 6 signal transducer
Bt.23123.1.S1_at	1,06	BHLHB2	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	Bt.17999.3.A1_a_at	1,02	ICAM2	intercellular adhesion molecule 2
Bt.27316.1.S1_at	1,06	RBBP8	retinoblastoma binding protein 8	Bt.22570.1.S1_at	1,02	PSM6C	proteasome 26S subunit, ATPase, 6
Bt.29377.1.S1_at	1,06	VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein	Bt.22608.1.S1_at	1,02	MAFG	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G
Bt.6950.1.S1_at	1,06	SYS1	NOT_AVAILABLE	Bt.22803.1.S2_at	1,02	TUBB	tubulin, beta polypeptide
Bt.9516.2.A1_at	1,06	CDC37L1	cell division cycle 37 homolog -like 1				

Bt.3485.1.S1_at	MANSC1	1,02	MANSC1	MANSC domain containing 1	Bt.23354.1.S1_at	-1,03	EPHX1	epoxide hydrolase 1, microsomal
Bt.3487.1.S1_at	TP11	1,02	TP11	triophosphate isomerase 1	Bt.12209.1.S1_at	-1,03	TMCC1	transmembrane and coiled-coil domains 1
Bt.4342.1.S1_at	SELP	1,02	SELP	selectin P	Bt.13334.1.S1_at	-1,03	TEF	thyrotrophic embryonic factor
Bt.648.2.S1_at	LRRPIP1	1,02	LRRPIP1	leucine rich repeat interacting protein 1	Bt.18336.1.A1_at	-1,03	FLJ36754	hypothetical protein FLJ36754
Bt.9030.1.S1_at	TLR4	1,02	TLR4	toll-like receptor 4	Bt.18404.1.S1_at	-1,03	HNT	neurotrimin
Bt.7547.1.S1_at	TAL2	1,02	TAL2	T-cell acute lymphocytic leukemia 2	Bt.11069.1.S1_at	-1,04	ADCY6	adenylate cyclase 6
Bt.8971.1.A1_a_at	WAS	1,02	WAS	Wiskott-Aldrich syndrome	Bt.13096.1.S1_at	-1,04	FIGF	c-fos induced growth factor
Bt.10883.1.S1_at	ANXA2	1,02	ANXA2	annexin A2	Bt.28253.1.S1_at	-1,05	GGT1	gamma-glutamyltransferase 1
Bt.21374.2.S1_a_at	APG3L	1,02	APG3L	APG3 autopagy 3-like	Bt.7338.1.S1_at	-1,05	ZNF651	zinc finger protein 651
Bt.3052.1.S1_at	OCIL	1,02	OCIL	lectin-like NK cell receptor	Bt.9100.1.S1_at	-1,05	SYNCRIP	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein
Bt.12141.2.S1_a_at	ZCCHC6	1,01	ZCCHC6	zinc finger, CCHC domain containing 6	Bt.20732.1.A1_at	-1,06	PIP5K1B	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta
Bt.15554.1.A1_at	---	1,01	---	---	Bt.6000.2.S1_at	-1,06	HSPC159	HSPC159 protein
Bt.16901.1.A1_at	RAB8B	1,01	RAB8B	RAB8B, member RAS oncogene family	Bt.26530.1.S1_at	-1,06	ACAD10	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 10
Bt.20176.1.S1_at	CCT5	1,01	CCT5	chaperonin containing TCP1, subunit 5	Bt.13211.1.A1_at	-1,06	MEG3	maternally expressed 3
Bt.2342.1.S1_at	CDS2	1,01	CDS2	CDP-diacylglycerol synthase 2	Bt.11301.1.S1_at	-1,07	ABLIM3	actin binding LIM protein family, member 3
Bt.2374.1.S1_at	GNB1	1,01	GNB1	guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 1	Bt.1525.1.S1_at	-1,07	AQP1	aquaporin 1
Bt.24636.2.S1_at	PAX8	1,01	PAX8	paired box gene 8	Bt.9567.1.S1_at	-1,07	TM7SF2	transmembrane 7 superfamily member 2
Bt.27199.1.S1_at	MKLN1	1,01	MKLN1	muskelin 1, intracellular mediator containing kelch motifs	Bt.23532.1.S1_at	-1,07	---	---
Bt.3898.1.S1_at	IDH3A	1,01	IDH3A	isocitrate dehydrogenase 3 alpha	Bt.6001.1.S1_s_at	-1,07	LOC530342	similar to Chromosome 16 open reading frame 24
Bt.7776.3.S1_at	IQGAP1	1,01	IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	Bt.13769.1.S1_at	-1,08	MAP2	microtubule-associated protein 2
Bt.9516.1.S1_at	CDC37L1	1,01	CDC37L1	cell division cycle 37 homolog-like 1	Bt.2278.1.S1_at	-1,08	GP2	glycoprotein 2
Bt.12112.1.S1_at	TMEM16F	1,01	TMEM16F	transmembrane protein 16F	Bt.9004.1.S1_at	-1,08	BCAT2	branched chain aminotransferase 2, mitochondrial
Bt.17932.2.S1_a_at	CNCL1	1,01	CNCL1	cyclin L1	Bt.16753.1.A1_at	-1,08	ZNF652	zinc finger protein 652
Bt.16125.1.A1_at	RNF11	1,01	RNF11	ring finger protein, transmembrane 1	Bt.21930.2.S1_at	-1,08	SIX4	sine oculis homeobox homolog 4
Bt.11409.1.A1_a_at	MAP4K4	1,01	MAP4K4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	Bt.24153.1.A1_at	-1,08	SUPT4H1	suppressor of Ty 4 homolog 1
Bt.15732.1.S1_a_at	LHFPL2	1	LHFPL2	lipoma HMGIC fusion partner-like 2	Bt.17024.1.A1_at	-1,1	ARFRP2	ADP-ribosylation factor related protein 2
Bt.3135.1.A1_at	BRD7	1	BRD7	bromodomain containing 7	Bt.21359.1.S1_at	-1,1	SYN2	synapsin II
Bt.3992.1.S1_a_at	PISD	1	PISD	phosphatidylserine decarboxylase	Bt.25657.1.S1_at	-1,1	GULP1	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1
Bt.9089.1.S1_a_at	P-SMD11	1	P-SMD11	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 11	Bt.11298.1.A1_at	-1,11	---	---
Bt.9081.1.S1_at	SCLY	1	SCLY	selenocysteine lyase	Bt.27749.1.A1_at	-1,11	LMAN1L	lectin, mannose-binding, 1 like
CLUSTER 3					Bt.29185.1.S1_at	-1,12	MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1
Bt.22409.1.S1_at	HSPA12A	-1	HSPA12A	heat shock 70kDa protein 12A	Bt.12510.2.S1_at	-1,12	MEG3	maternally expressed 3
Bt.26841.1.A1_at	GARNL3	-1	GARNL3	GTPase activating Rap/RanGAP domain-like 3	Bt.11196.1.S1_at	-1,14	HINT2	histidine triad nucleotide binding protein 2
Bt.13993.1.A1_at	PGR	-1	PGR	progesterone receptor	Bt.27196.1.A1_at	-1,14	CRTAC1	cartilage acidic protein 1
Bt.26805.1.S1_at	RASAL1	-1,01	RASAL1	RAS protein activator like 1	Bt.15975.1.A1_at	-1,15	SOD1	superoxide dismutase 1, soluble
Bt.3883.1.S1_at	DDO	-1,01	DDO	D-aspartate oxidase	Bt.20969.1.S1_at	-1,15	PEMT	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
Bt.9444.1.S1_at	STK17A	-1,01	STK17A	serine/threonine kinase 17a	Bt.5505.1.S1_at	-1,15	TENC1	tensin like C1 domain containing phosphatase
Bt.24139.1.A1_at	TMCC1	-1,01	TMCC1	transmembrane and coiled-coil domains 1	Bt.10232.1.A1_at	-1,16	PARD6B	par-6 partitioning defective 6 homolog beta
Bt.8563.1.S1_at	CYB5-M	-1,01	CYB5-M	outer mitochondrial membrane cytochrome b5	Bt.24413.1.S1_at	-1,16	LOC781126	similar to transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 2 (predicted)
Bt.3174.1.A1_at	UBPH	-1,01	UBPH	similar to ubiquitin binding protein	Bt.21959.3.S1_at	-1,16	TMEIM64	Transmembrane protein 64
Bt.5141.1.S2_at	B4GALT1	-1,02	B4GALT1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 1	Bt.21008.1.S1_at	-1,18	FGFR1	fibroblast growth factor receptor-like 1
Bt.13306.2.S1_at	---	-1,03	---	---	Bt.7536.1.S1_at	-1,18	LOC285812	hypothetical protein LOC285812

ANHANG

Bt.21614.2.S1_at	-1,18	---	---	---	Bt.22139.1.S1_at	-1,35	COBL1	COBL-like 1
Bt.11242.1.S1_at	-1,19	BRP44L	brain protein 44-like	---	Bt.27003.2.S1_at	-1,35	RetSat	all-trans-13,14-dihydroretinol saturase
Bt.18262.1.A1_at	-1,19	---	---	---	Bt.835.1.A1_at	-1,35	SNTB1	syntrophin, beta 1
Bt.8995.1.A1_at	-1,19	CRY1	cryptochrome 1	---	Bt.15740.2.S1_at	-1,36	TPD52L1	tumor protein D52-like 1
Bt.6438.1.A1_at	-1,2	TGFEB2	transforming growth factor, beta 2	---	Bt.4177.3.A1_at	-1,36	ROBO2	roundabout, axon guidance receptor, homolog 2
Bt.1435.1.S1_at	-1,21	OSBPL1A	oxysterol binding protein-like 1A	---	Bt.16916.3.S1_at	-1,37	KLF11	Kruppel-like factor 11
Bt.800.1.S1_at	-1,21	MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13	---	Bt.16916.1.S1_at	-1,38	KLF11	Kruppel-like factor 11
Bt.28965.1.A1_at	-1,21	---	---	---	Bt.20920.1.S1_at	-1,38	PPARGC1A	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1, alpha
Bt.21027.2.S1_at	-1,21	SPIRE1	spire homolog 1	---	Bt.18094.1.A1_at	-1,4	---	---
Bt.20745.1.A1_at	-1,22	MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A	---	Bt.20161.1.S1_at	-1,4	RASSF4	Ras association domain family 4
Bt.22303.3.S1_at	-1,22	KIAA0040	KIAA0040 gene product	---	Bt.21777.2.S1_at	-1,4	LOC511583	similar to Family with sequence similarity 114, member A1
Bt.4735.1.S2_at	-1,22	ACACA	acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	---	Bt.2266.3.S1_at	-1,41	T3JAM	TRAF3-interacting Jun N-terminal kinase-activating modulator
Bt.12565.1.S1_at	-1,23	SLC31A2	solute carrier family 31, member 2	---	Bt.11092.1.S1_at	-1,41	C1orf21	chromosome 1 open reading frame 21
Bt.16412.1.S1_a_at	-1,23	FAH	fumarate hydratase	---	Bt.14209.1.A1_at	-1,42	ADAMTSL3	ADAMTS-like 3
Bt.12579.1.A1_at	-1,23	MGC40579	hypothetical protein MGC40579	---	Bt.22251.1.A1_at	-1,42	---	---
Bt.20890.1.S1_at	-1,23	AMY2B	amylase, alpha 2B; pancreatic	---	Bt.26875.1.A1_at	-1,42	NAALADL2	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2
Bt.26422.1.A1_at	-1,24	C6orf97	chromosome 6 open reading frame 97	---	Bt.9672.1.S1_at	-1,42	ShimL	Shroom-related protein
Bt.18048.2.S1_at	-1,24	DDX26B	DEAD/H box polypeptide 26B	---	Bt.15697.1.A1_at	-1,43	PER2	period homolog 2
Bt.16611.1.A1_at	-1,25	MID1	midline 1	---	Bt.9612.1.S1_at	-1,43	LOC388564	hypothetical gene supported by BC052596
Bt.12819.1.S1_at	-1,25	ELF5	E74-like factor 5	---	Bt.21069.1.S1_at	-1,44	CSF2RB	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity
Bt.3372.2.S1_a_at	-1,26	AGPAT6	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6	---	Bt.15697.2.S1_at	-1,45	PER2	period homolog 2
Bt.17731.2.S1_at	-1,27	ABLIM3	actin binding LIM protein family, member 3	---	Bt.12455.1.S1_at	-1,46	SNTB1	syntrophin, beta 1
Bt.28786.1.A1_at	-1,27	ACAD10	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 10	---	Bt.22206.1.S1_at	-1,46	LOC387712	similar to RIKEN cDNA 6430537H07 gene
Bt.13429.2.S1_at	-1,27	WBP4	WW domain binding protein 4	---	Bt.9406.1.S1_at	-1,47	RAB26	RAB26, member RAS oncogene family
Bt.17906.1.S1_at	-1,27	FLJ14011	hypothetical zinc finger protein FLJ14011	---	Bt.2266.1.A1_at	-1,47	T3JAM	TRAF3-interacting Jun N-terminal kinase-activating modulator
Bt.3372.3.S1_a_at	-1,28	AGPAT6	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6	---	Bt.20407.2.A1_at	-1,48	CPEB4	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4
Bt.23840.1.S1_at	-1,29	PCSK6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	---	Bt.19644.1.A1_at	-1,49	---	---
Bt.22303.2.S1_at	-1,29	KIAA0040	KIAA0040 gene product	---	Bt.21202.1.S1_at	-1,49	TOB1	transducer of ERBB2, 1
Bt.3732.1.A1_at	-1,29	ARG99	ARG99 protein	---	Bt.18808.1.S1_at	-1,5	HES1	hairy and enhancer of split 1,
Bt.12744.1.S1_at	-1,29	ATP2C2	ATPase, Ca++ transporting, type 2C, member 2	---	Bt.21614.1.A1_at	-1,5	TMEM120B	transmembrane protein 120B
Bt.15740.1.A1_at	-1,31	TPD52L1	tumor protein D52-like 1	---	Bt.546.1.S1_at	-1,51	KCNMA1	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1
Bt.17741.1.A1_at	-1,31	ST7L	suppression of tumorigenicity 7 like	---	Bt.8618.1.S1_at	-1,51	---	---
Bt.20428.2.S1_a_at	-1,32	PRC1	protein regulator of cytokinesis 1	---	Bt.11808.1.S1_at	-1,53	MOSPD1	motile sperm domain containing 1
Bt.4597.1.S1_at	-1,32	GPR68	G protein-coupled receptor 68	---	Bt.17731.1.A1_at	-1,53	ABLIM3	actin binding LIM protein family, member 3
Bt.5560.1.S1_at	-1,33	---	---	---	Bt.12644.1.A1_at	-1,53	C3orf3	chromosome 3 open reading frame 3
Bt.2177.1.S1_at	-1,33	LOC511583	similar to Family with sequence similarity 114, member A1	---	Bt.10444.1.S1_at	-1,54	GATA3	GATA binding protein 3
Bt.10925.1.S1_at	-1,34	MSRB2	methionine sulfoxide reductase B2	---	Bt.29022.1.S1_at	-1,54	KLHL14	kelch-like 14
Bt.4551.1.S1_at	-1,34	CTPS	CTP synthase	---	Bt.8563.1.S2_at	-1,55	CYB5-M	outer mitochondrial membrane cytochrome b5
Bt.17445.1.A1_at	-1,34	SLC2A3P1	solute carrier family 2, member 3 pseudogene 1	---	Bt.2236.1.S1_at	-1,56	CREB3L1	cAMP responsive element binding protein 3-like 1
Bt.28945.1.A1_at	-1,34	ARL4A	ADP-ribosylation factor-like 4A	---	Bt.4414.2.S1_at	-1,56	SYT17	synaptotagmin XVII
Bt.12694.1.S1_at	-1,35	TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	---	Bt.14565.1.A1_at	-1,57	RELN	reelin
Bt.15735.1.S1_at	-1,35	AGRN	agrin	---	Bt.28910.1.A1_at	-1,57	MAPK4	mitogen-activated protein kinase 4

Bt.27099.1.A1_at	TLOC1	-1,12	translocation protein 1	Bt.8963.1.S1_at	-1,21	LOXL1	lysyl oxidase-like 1
Bt.17771.3.A1_at	---	-1,13	---	Bt.10388.3.S1_at	-1,22	LOC635165	similar to KIAA1102 protein
Bt.19917.2.S1_at	FLJ31295	-1,13	hypothetical protein FLJ31295	Bt.20713.2.A1_at	-1,23	BCAR3	breast cancer anti-estrogen resistance 3
Bt.22077.1.S1_at	SOX7	-1,13	SRY-box 7	Bt.17416.1.S1_a_at	-1,23	GPD1L	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like
Bt.2735.1.A1_at	---	-1,13	---	Bt.27651.1.S1_at	-1,23	SLC4A7	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7
Bt.20120.2.S1_at	---	-1,14	---	Bt.24343.1.A1_at	-1,24	CLDN1	claudin 1
Bt.26618.1.S1_at	DNAJB9	-1,14	DnaJ homolog, subfamily B, member 9	Bt.9870.2.A1_at	-1,25	LOC128387	hypothetical protein LOC128387
Bt.13218.1.S1_at	SERP1	-1,15	stress-associated endoplasmic reticulum protein 1	Bt.9063.2.S1_a_at	-1,25	LRP16	LRP16 protein
Bt.3405.2.S1_at	---	-1,15	---	Bt.9412.3.S1_at	-1,26	COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1
Bt.8521.1.A1_at	LMAN1	-1,15	lectin, mannose-binding, 1	Bt.21896.1.S1_at	-1,27	COL21A1	collagen, type XXI, alpha 1
Bt.12199.1.A1_at	SLC41A1	-1,15	solute carrier family 41, member 1	Bt.28034.1.S1_at	-1,27	ERCC5	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5
Bt.22734.1.A1_at	ENPP4	-1,16	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4	Bt.28942.1.S1_at	-1,27	SLC35C1	solute carrier family 35, member C1
Bt.23911.1.A1_at	XIST	-1,16	X-specific transcript	Bt.1927.1.S1_at	-1,27	CRISPLD2	cysteine-rich secretory protein LOC1 domain containing 2
Bt.3247.1.S1_at	MATN2	-1,16	matrilin 2	Bt.4804.2.A1_at	-1,28	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
Bt.4886.1.A1_at	LRRC17	-1,16	leucine rich repeat containing 17	Bt.11605.1.S1_at	-1,29	LOC126917	hypothetical protein LOC126917
Bt.7948.1.S1_at	CYFIP2	-1,16	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2	Bt.5468.1.S1_at	-1,3	CST6	cystatin E/M
Bt.9614.1.S1_at	42248	-1,16	15 kDa selenoprotein	Bt.17416.1.S1_at	-1,3	GPD1L	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like
Bt.19772.1.A1_at	FAD158	-1,16	factor for adipocyte differentiation 158	Bt.20905.1.S1_at	-1,31	ZAP70	zeta-chain associated protein kinase 70kDa
Bt.28518.1.S1_at	TFPI2	-1,16	tissue factor pathway inhibitor 2	Bt.3589.2.A1_at	-1,31	TLE1	transducin-like enhancer of split 1
Bt.4852.1.S1_at	GSTM1	-1,17	glutathione S-transferase M1	Bt.12743.1.A1_at	-1,32	ABCD4	ATP-binding cassette, sub-family D, member 4
Bt.8362.1.A1_at	ASPH	-1,17	aspartate beta-hydroxylase	Bt.13239.1.A1_at	-1,32	HNRP1L	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like
Bt.15682.1.A1_at	BR13BP	-1,17	BR13 binding protein	Bt.22595.1.S1_at	-1,32	LOC55924	hypothetical protein LOC55924
Bt.1825.1.S1_at	MGC128255	-1,17	dehydrogenase/reductase SDR family member 11	Bt.1366.1.S1_at	-1,32	TNA	tetranectin
Bt.13239.2.S1_at	HNRP1L	-1,18	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	Bt.28429.1.S1_at	-1,33	FKBP14	FK506 binding protein 14, 22 kDa
Bt.1541.1.S1_at	AGPAT1	-1,18	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1	Bt.23661.1.A1_at	-1,34	DDAH1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1
Bt.23894.1.A1_at	UBE2J1	-1,18	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1	Bt.8549.1.S2_at	-1,34	COL1A1	collagen, type I, alpha 1
Bt.8521.1.A2_at	LMAN1	-1,18	lectin, mannose-binding, 1	Bt.10214.1.S1_at	-1,35	STK17A	serine/threonine kinase 17a
Bt.4070.1.S1_at	FLJ10618	-1,18	hypothetical protein FLJ10618	Bt.15511.1.A1_at	-1,35	FABP3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart
Bt.6000.1.A1_at	AFTIPHILIN	-1,18	afipilin protein	Bt.26461.1.A1_at	-1,35	ANKH	ankylosis, progressive homolog
Bt.22435.1.S1_at	FN5	-1,18	FN5 protein	Bt.6361.1.S1_at	-1,36	DDX5	DEAD box polypeptide 5
Bt.13899.1.A1_at	ENPP1	-1,19	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	Bt.8321.1.A1_at	-1,36	LOC538506	similar to Genetic suppressor element 1
Bt.27352.1.S1_at	ARHGEF16	-1,19	Rho guanine exchange factor 16	Bt.10388.2.S1_at	-1,36	LOC635165	similar to KIAA1102 protein
Bt.5389.1.S1_at	FXYD6	-1,19	FXYD domain containing ion transport regulator 6	Bt.1458.1.S1_at	-1,37	PGM5	phosphoglucomutase 5
Bt.7541.1.S1_at	NME4	-1,19	non-metastatic cells 4, protein expressed in	Bt.2696.1.A1_at	-1,37	CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin
Bt.5343.1.A1_at	---	-1,19	---	Bt.3862.1.S1_a_at	-1,38	PPARG	peroxisome proliferative activated receptor, gamma
Bt.28159.1.S1_at	DTNA	-1,2	dystrobrevin, alpha	Bt.4912.1.S1_at	-1,38	PI16	protease inhibitor 16
Bt.405.1.S1_at	FST	-1,2	folistatin	Bt.26813.1.S1_at	-1,38	CACHD1	cache domain containing 1
Bt.5398.1.S1_at	TNXB	-1,2	tenascin XB	Bt.29910.1.S1_at	-1,39	SCGE	sarcoglycan, epsilon
Bt.7478.1.S1_at	HSPB6	-1,2	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	Bt.18015.1.A1_at	-1,39	PYGB	phosphorylase, glycogen; brain
Bt.15847.1.S1_at	CDR2	-1,21	cerebellar degeneration-related protein 2, 62kDa	Bt.4827.1.S1_at	-1,39	CAMKK2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta
Bt.18483.1.A1_at	---	-1,21	---	Bt.6410.1.A1_at	-1,39	C11orf34	chromosome 11 open reading frame 34
Bt.3229.1.S1_at	HAPLN3	-1,21	hyaluronan and proteoglycan link protein 3	Bt.26919.1.S1_at	-1,4	NTN4	netrin 4

ANHANG

Bt.3797.1.S1_at	-1,4	FMOD	fibromodulin	Bt.5814.1.A1_at	-1,64	PPARGC1A	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1, alpha
Bt.11482.1.S1_at	-1,41	NKIRAS1	NFKB inhibitor interacting Ras-like 1	Bt.2479.1.A1_at	-1,64	SYCP3	synaptonemal complex protein 3
Bt.16739.1.A1_at	-1,41	GSTM1	glutathione S-transferase M1	Bt.10734.1.A1_at	-1,64	ASXL1	additional sex combs like 1
Bt.19932.1.S1_at	-1,41	CYS1	cystin 1	Bt.9053.1.S1_a_at	-1,66	LRP16	LRP16 protein
Bt.26836.2.A1_at	-1,42	CL640	hypothetical protein CL640	Bt.4167.1.S1_at	-1,67	NUCB2	nucleobindin 2
Bt.20407.1.S1_at	-1,43	CPEB4	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4	Bt.5582.1.S1_at	-1,67	SH3BGR	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein
Bt.29697.1.S1_at	-1,43	ART3	ADP-ribosyltransferase 3	Bt.19958.1.A1_at	-1,67	PIK3C2G	phosphoinositide-3-kinase, class 2, gamma polypeptide
Bt.16573.1.A1_at	-1,43	SD1	staphylococcal nuclease domain containing 1	Bt.3780.1.S1_at	-1,68	C5orf13	chromosome 5 open reading frame 13
Bt.18048.1.A1_at	-1,43	DDX26B	DEAD/H box polypeptide 26B	Bt.15900.2.S1_at	-1,68	AHCYL2	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2
Bt.6449.1.S1_at	-1,44	FBLN5	fibulin 5	Bt.17332.3.A1_at	-1,68	NR3C2	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2
Bt.9807.1.S1_at	-1,44	GNPMB	glycoprotein nmb	Bt.17332.2.S1_at	-1,68	NR3C2	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2
Bt.26788.1.S1_at	-1,44	FLJ11588	hypothetical protein FLJ11588	Bt.19567.1.A1_at	-1,69	NEBL	nebulin
Bt.14156.1.S1_at	-1,46	---	---	Bt.10333.1.S1_at	-1,69	LOC538506	Hypothetical LOC538506
Bt.20637.1.S1_at	-1,47	---	---	Bt.15900.1.A1_at	-1,69	AHCYL2	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2
Bt.20983.1.S1_at	-1,48	ANG	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	Bt.27709.1.A1_at	-1,7	DKFZp568M1	putative lysophosphatidic acid acyltransferase
Bt.22534.1.S1_at	-1,48	PMP22	peripheral myelin protein 22	Bt.6778.1.S1_at	-1,7	APLN	apelin, AGTRL1 ligand
Bt.19917.1.A1_at	-1,48	FLJ31295	hypothetical protein FLJ31295	Bt.24211.2.S1_at	-1,72	ASPIN	asporin
Bt.24729.1.A1_at	-1,49	SLC38A3	solute carrier family 38, member 3	Bt.2424.1.S1_at	-1,73	DPYD	dihydropyrimidine dehydrogenase
Bt.21696.1.S1_at	-1,49	C8orf1	chromosome 8 open reading frame 1	Bt.3100.1.A1_at	-1,75	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5
Bt.13349.1.S1_at	-1,49	FLJ20533	hypothetical protein FLJ20533	Bt.17332.1.S1_at	-1,77	NR3C2	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2
Bt.6171.1.A1_at	-1,5	HIBADH	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	Bt.12722.1.A1_at	-1,77	RNASE4	ribonuclease, RNase A family, 4
Bt.6630.1.S1_at	-1,5	CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle	Bt.20619.1.S1_at	-1,8	MSI2	musashi homolog 2
Bt.26433.1.A1_at	-1,5	CD109	CD109 antigen	Bt.14153.1.S1_at	-1,81	NEB	nebulin
Bt.21589.1.S1_at	-1,51	ANGPTL2	angiopoietin-like 2	Bt.668.1.S1_at	-1,81	TMEPAI	transmembrane, prostate androgen induced RNA
Bt.28034.2.S1_at	-1,51	ERCC5	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5	Bt.24830.1.A1_at	-1,84	---	---
Bt.22303.1.S1_at	-1,51	TNN	tenascin N	Bt.21959.2.S1_at	-1,84	TMEI64	transmembrane protein 64
Bt.13482.1.S1_at	-1,52	NOV	nephroblastoma overexpressed gene	Bt.21981.1.A1_at	-1,85	ANTXR1	anthrax toxin receptor 1
Bt.26895.2.S1_at	-1,52	FAM20A	family with sequence similarity 20, member A	Bt.21981.3.S1_at	-1,85	ANTXR1	anthrax toxin receptor 1
Bt.7788.1.S1_at	-1,52	URB	steroid sensitive gene 1	Bt.1899.1.A1_at	-1,86	ISLR	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat
Bt.19120.1.A1_at	-1,53	---	---	Bt.24444.2.S1_a_at	-1,86	RORA	RAR-related orphan receptor A
Bt.19567.2.S1_at	-1,53	NEBL	nebulin	Bt.9659.1.S1_a_at	-1,87	ENPP3	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3
Bt.29900.1.S1_at	-1,53	HS25T1	heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	Bt.17562.1.A1_at	-1,87	LOC196996	hypothetical protein LOC196996
Bt.9412.1.S1_at	-1,55	COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1	Bt.28062.1.S1_at	-1,89	GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle
Bt.22869.1.S2_at	-1,56	FABP5	fatty acid binding protein 5	Bt.4695.1.S1_at	-1,89	PIGR	polymeric immunoglobulin receptor
Bt.3202.1.A1_at	-1,56	PRELP	proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein	Bt.27084.1.S1_at	-1,89	SEMA3C	sema domain, immunoglobulin domain, short basic domain, secreted, 3C
Bt.12199.2.S1_at	-1,56	SLC41A1	solute carrier family 41, member 1	Bt.13324.4.S1_at	-1,92	IDH1	isocitrate dehydrogenase 1, soluble
Bt.4539.1.S1_at	-1,57	AGTR1	angiotensin II receptor, type 1	Bt.15623.1.S1_at	-1,93	DST	dystonin
Bt.6802.1.S1_at	-1,57	RGS5	regulator of G-protein signalling 5	Bt.47.1.S1_at	-1,94	CA6	carbonic anhydrase VI
Bt.8127.1.S1_at	-1,58	HPSE	heparanase	Bt.4703.1.S1_at	-1,94	MYOC	myocilin, trabecular meshwork inducible glucocorticoid response
Bt.140.1.S1_at	-1,59	OXTR	oxytocin receptor	Bt.23635.1.S1_at	-1,94	SYCP3	synaptonemal complex protein 3
Bt.22735.1.S1_at	-1,61	SYTL2	synaptotagmin-like 2	Bt.26930.1.S1_at	-1,96	DDEF1	development and differentiation enhancing factor-like 1
Bt.26117.1.A1_at	-1,62	C1D	nuclear DNA-binding protein				

ANHANG

Bt.20862.1.A1_at	1,99	MTHFD2	methylene tetrahydrofolate dehydrogenase	Bt.6668.1.S1_at	1,59	--	--
Bt.20862.2.S1_at	1,99	MTHFD2	methylene tetrahydrofolate dehydrogenase	Bt.5273.1.S2_at	1,58	ITGAV	integrin, alpha V
Bt.6685.1.S1_at	1,99	MTHFD2	methylene tetrahydrofolate dehydrogenase	Bt.21071.1.S1_at	1,58	SLC26A2	solute carrier family 26, member 2
Bt.6685.2.A1_at	1,99	MTHFD2	methylene tetrahydrofolate dehydrogenase	Bt.21071.2.A1_at	1,58	SLC26A2	solute carrier family 26, member 2
Bt.12047.1.S1_at	1,96	HIST2H2AA	histone 2, H2aa	Bt.137.1.S1_at	1,57	ANGPT2	angiopoietin 2
Bt.17619.1.S1_at	1,95	SCNN1G	sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma	Bt.23505.1.S1_at	1,57	PKD4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4
Bt.17619.2.A1_at	1,95	SCNN1G	sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma	Bt.7111.1.S1_at	1,57	MPZL3	myelin protein zero-like 3
Bt.20193.1.S1_at	1,95	GARS	glycyl-tRNA synthetase	Bt.23172.1.S1_at	1,55	BAX	BCL2-associated X, protein
Bt.611.1.S1_x.at	1,93	CXCL2	chemokine ligand 2	Bt.10299.1.S1_at	1,55	MED10	mediator complex subunit 10
Bt.25099.1.A1_at	1,92	PSPH	phosphoserine phosphatase	Bt.6786.1.S1_at	1,54	PIK3CG	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide
Bt.25099.2.S1_at	1,92	PSPH	phosphoserine phosphatase	Bt.1552.1.S1_at	1,53	SARS	sealy-4rRNA synthetase
Bt.8624.1.S1_at	1,92	ARG2	arginase, type II	Bt.9239.1.S1_at	1,53	ADORA2B	adenosine A2b receptor
Bt.22224.1.S1_at	1,92	MGC29814	hypothetical protein MGC29814	Bt.22487.3.S1_at	1,53	AZGP1	alpha-2-glycoprotein 1, zinc
Bt.20104.1.S1_at	1,91	SESN1	sestrin 1	Bt.3211.1.S1_at	1,52	GABARAPL1	GABA receptor-associated protein like 1
Bt.13387.1.S1_at	1,88	IF	I factor	Bt.3211.1.S2_at	1,52	GABARAPL1	GABA receptor-associated protein like 1
Bt.8238.1.A1_at	1,83	TRIB3	tribbles homolog 3	Bt.24270.1.S1_at	1,51	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1
Bt.22275.1.A1_at	1,82	ISG20	interferon stimulated gene 20kDa	Bt.26403.1.A1_at	1,51	--	--
Bt.24341.1.S1_at	1,81	TSPAN2	tetraspan 2	Bt.12916.1.S1_at	1,50	GPX3	glutathione peroxidase 3
Bt.22055.1.S1_at	1,80	CYBRD1	cytochrome b reductase 1	Bt.727.1.S1_at	1,49	CG-116	CG-116 protein
Bt.22055.2.S1_at	1,80	CYBRD1	cytochrome b reductase 1	Bt.29954.1.S1_at	1,47	GKAP1	G kinase anchoring protein 1
Bt.16453.1.A1_at	1,79	SLC6A14	solute carrier family 6, member 14	Bt.13898.1.S1_at	1,46	RPS27L	ribosomal protein S27-like
Bt.26808.1.S1_at	1,79	THADA	thyroid adenoma associated	Bt.18380.1.A1_at	1,46	--	--
Bt.21582.1.S1_at	1,77	PHLDA3	pleckstrin homology-like domain, family A, member 3	Bt.2600.1.A1_at	1,45	--	--
Bt.2749.1.S1_at	1,76	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	Bt.9519.1.S1_at	1,45	SESN2	sestrin 2
Bt.21453.1.S1_at	1,75	SLC3A2	solute carrier family 3, member 2	Bt.18918.2.A1_at	1,45	SEC22L3	SEC22 vesicle trafficking protein-like 3
Bt.13344.1.S1_a.at	1,75	SLC7A8	solute carrier family 7, member 8	Bt.3357.1.S1_at	1,44	HMGCL	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase
Bt.13344.2.S1_a.at	1,75	SLC7A8	solute carrier family 7, member 8	Bt.13619.1.A1_at	1,43	FARSLB	phenylalanine-tRNA synthetase-like, beta subunit
Bt.8738.1.S1_at	1,71	HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	Bt.20588.1.S1_at	1,43	MKNK2	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2
Bt.23263.1.S1_s.at	1,70	HSPCB	heat shock 90kDa protein 1, beta	Bt.12610.1.A1_at	1,43	CP	ceruloplasmin
Bt.2841.1.S1_at	1,70	WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	Bt.24901.1.A1_at	1,42	NAP1L5	nucleosome assembly protein 1-like 5
Bt.2841.2.S1_a.at	1,70	WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	Bt.7157.1.S1_at	1,40	NFC1	Niemann-Pick disease, type C1
Bt.17036.1.A1_s.at	1,70	WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase	Bt.14200.1.A1_at	1,40	MT1A	metallothionein 1A
Bt.20896.1.A1_at	1,69	RNASEH2	ribonuclease, RNase A family, 12	Bt.12309.1.S1_at	1,39	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8
Bt.2521.1.S1_at	1,67	--	--	Bt.7390.1.S1_at	1,38	RNF157	ring finger protein 157
Bt.13413.2.A1_at	1,63	NSE1	NSE1	Bt.4733.1.S1_at	1,36	PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase
Bt.24411.1.A1_at	1,63	FLJ25416	hypothetical protein FLJ25416	Bt.9731.1.S1_at	1,35	GLRX2	glutaredoxin 2
Bt.13413.1.S1_at	1,63	NSE1	NSE1	Bt.26996.1.S1_at	1,34	GTPBP2	GTP binding protein 2
Bt.11034.1.S1_at	1,61	MID1P1	MID1 interacting protein 1	Bt.3774.1.A1_at	1,34	RND1	Rho family GTPase 1
Bt.3024.1.S1_at	1,61	BLOC1S2	biogenesis of lysosome-related organelles complex-1, subunit 2	Bt.13265.1.A1_at	1,31	TM4SF11	transmembrane 4 superfamily member 11
Bt.7594.1.S1_at	1,61	SAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	Bt.19517.1.S1_at	1,30	ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3
Bt.2723.1.A1_at	1,60	CDO1	cysteine dioxygenase, type I	Bt.28757.1.S1_at	1,30	H2B	histone H2B-like
Bt.4748.1.S1_at	1,60	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	Bt.5382.1.S1_at	1,29	NT5C2	5'-nucleotidase, cytosolic II

Bt.9101.1.S1_at	TMPO	thymopoietin	Bt.21546.1.S1_at	1,13	ATP9A	ATPase, Class II, type 9A
Bt.2518.2.S1_at	---	---	Bt.5963.1.S1_at	1,13	IAH1	isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog (S. cerevisiae)
Bt.6147.1.S1_a_at	---	---	Bt.4725.1.S1_at	1,12	BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative
Bt.9197.1.S1_at	C6orf80	chromosome 6 open reading frame 80	Bt.6063.1.S1_at	1,12	HSPA9B	heat shock 70kDa protein 9B
Bt.11192.1.S1_at	PABPC4	poly binding protein, cytoplasmic 4	Bt.18639.1.A1_at	1,12	FBXO32	F-box protein 32
Bt.13702.1.S1_at	SIAT1	sialyltransferase 1	Bt.18639.2.S1_at	1,12	FBXO32	F-box protein 32
Bt.25616.1.S1_at	GPR27	G protein-coupled receptor 27	Bt.28379.1.S1_at	1,10	UHRF1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1
Bt.14637.1.A1_at	CARKL	carbohydrate kinase-like	Bt.3826.1.S1_at	1,10	LONP	peroxisomal lon protease
Bt.23905.1.A1_at	MIG-6	mitogen-inducible gene 6	Bt.7655.1.S1_at	1,09	CSDA	cold shock domain protein A
Bt.23905.2.S1_at	MIG-6	mitogen-inducible gene 6	Bt.1526.1.S1_at	1,09	RAN	RAN, member RAS oncogene family
Bt.16101.1.S1_at	GPLY	granulysin	Bt.1526.2.S1_at	1,09	RAN	RAN, member RAS oncogene family
Bt.28383.1.S1_at	GPLY	granulysin	Bt.20427.1.S1_at	1,09	HCA66	hepatocellular carcinoma-associated antigen 66
Bt.1932.1.S1_at	AHSA1	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1	Bt.10352.1.S1_at	1,08	POP5	processing of precursor 5, ribonuclease P/MPRP subunit
Bt.951.1.S1_at	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1	Bt.13434.1.S1_at	1,08	MKRN1	makorin, ring finger protein, 1
Bt.4707.1.A1_at	C4BPA	complement component 4 binding protein, alpha	Bt.15334.1.S1_at	1,08	STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
Bt.29698.1.S1_at	GHR	growth hormone receptor	Bt.19278.1.S1_at	1,08	SIP1	survival of motor neuron protein interacting protein 1
Bt.1408.1.S1_at	CSNK2A2	casein kinase 2, alpha prime polypeptide	Bt.21835.1.S1_at	1,08	PKIG	protein kinase inhibitor gamma
Bt.20965.1.S1_at	PHB	prohibitin	Bt.12295.1.S1_at	1,08	TIA-2	lung type-I cell membrane-associated glycoprotein
Bt.4380.1.S1_at	CYB561	cytochrome b-561	Bt.15856.1.S1_at	1,08	C20orf72	chromosome 20 open reading frame 172
Bt.6726.1.S1_at	RAB11FIP1	RAB11 family interacting protein 1	Bt.7007.1.S1_at	1,08	GHTM	growth hormone inducible transmembrane protein
Bt.26157.1.A1_at	---	---	Bt.7007.1.S2_at	1,08	GHTM	growth hormone inducible transmembrane protein
Bt.28390.1.S1_at	DSIP1	delta sleep inducing peptide, immunoreactor	Bt.17970.1.S1_at	1,07	NEK3	NIMA -related kinase 3
Bt.14464.1.A1_at	GPHN	gephyrin	Bt.18881.1.A1_at	1,07	---	---
Bt.6774.1.S1_at	MAP1LC3B	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	Bt.12472.1.S1_at	1,06	GLUL	glutamate-ammonia ligase
Bt.6774.2.S1_at	MAP1LC3B	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	Bt.18951.2.S1_at	1,06	RDH11	retinol dehydrogenase 11
Bt.15688.1.S1_at	CBS	cystathionine-beta-synthase	Bt.27909.1.S1_at	1,05	SERPINE1	serine proteinase inhibitor, clade B, member 1
Bt.16896.1.A1_at	AGXT2	alanine-glyoxylate aminotransferase 2	Bt.426.1.S1_at	1,05	DBT	dihydroipamide branched chain transacylase
Bt.20677.1.S1_at	C1orf48	chromosome 1 open reading frame 48	Bt.23600.1.S1_at	1,05	MGC2963	hypothetical protein MGC2963
Bt.16725.2.A1_at	UBE2L6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	Bt.12732.1.S1_at	1,04	NYREN18	NEDD8 ultimate buster-1
Bt.6360.1.S1_at	STK24	serine/threonine kinase 24	Bt.21603.2.S1_at	1,04	RNF121	ring finger protein 121
Bt.28844.1.S1_at	---	---	Bt.21724.2.S1_a_at	1,04	FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
Bt.6427.1.S1_at	CCT4	chaperonin containing TCP1, subunit 4	Bt.24718.1.S1_at	1,04	LETMD1	LETM1 domain containing 1
Bt.20275.1.S1_at	ARP5L	actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like	Bt.14022.1.S1_at	1,04	RNF121	ring finger protein 121
Bt.25471.1.S1_at	ATXN3	ataxin 3	Bt.13311.1.S1_at	1,04	E1F1B	eukaryotic translation initiation factor 1B
Bt.3721.1.S1_at	CARHSP1	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	Bt.12216.1.S1_at	1,03	C1QTNF5	C1q and tumor necrosis factor related protein 5
Bt.8691.1.S1_at	CARHSP1	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	Bt.13847.1.S1_at	1,03	C14orf153	chromosome 14 open reading frame 153
Bt.18316.2.S1_at	LOC153222	adult retina protein	Bt.16945.1.S1_at	1,03	ETHE1	ethylmalonic encephalopathy 1
Bt.19781.1.A1_at	DZIP3	zinc finger DAZ interacting protein 3	Bt.1489.1.S1_at	1,03	---	---
Bt.11001.1.S1_at	BCL2L11	BCL2-like 11	Bt.16638.1.S1_at	1,02	RORC	RAR-related orphan receptor C
Bt.28523.1.S1_at	DTX3L	deltex 3-like	Bt.4642.1.A1_at	1,02	HBLD2	HESB like domain containing 2
Bt.20397.1.S1_at	CXCL14	chemokine ligand 14	Bt.4780.1.S1_at	1,02	HTATIP	HIV-1 Tat interacting protein, 60kDa
Bt.9581.1.S1_at	BFAR	bifunctional apoptosis regulator	Bt.24805.1.A1_at	1,02	C12H13orf27	chromosome 13 open reading frame 27 ortholog

Bt.13967.1.A1_at	1,01	---	---	---
Bt.14049.1.A1_at	1,01	MANEA	mannosidase, endo-alpha	---
Bt.19465.1.S1_at	1,01	AASDHPT	aminooxidate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase	---
Bt.22826.2.S1_at	1,01	ANKRD12	ankyrin repeat domain 12	---
Bt.4573.1.S1_at	1,01	CRBN	cereblon	---
Bt.28874.1.S1_at	1,00	NUP98	nucleoporin 98kDa	---
CLUSTER 2				
Bt.357.1.S1_at	2,15	S100A12	S100 calcium binding protein A12	---
Bt.7625.1.S1_a_at	1,27	NCF4	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa	---
Bt.22116.1.A1_at	1,21	IL118BP	interleukin 18 binding protein	---
Bt.10855.1.S1_at	1,04	RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	---
Bt.5259.1.S1_at	1,02	HSXIAPAF1	XAP associated factor-1	---
Bt.9722.1.S1_at	-1,04	---	---	---
Bt.9957.2.S1_at	-1,23	SFN	stratifin	---
Bt.15822.1.S1_at	-1,48	FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral oncogene homolog	---
Bt.29129.1.S1_at	-2,08	AGR2	anterior gradient 2 homolog	---
CLUSTER 3				
Bt.23516.1.S1_at	-1,02	AQP3	aquaporin 3	---
Bt.12984.1.S1_at	-1,08	SLC38A3	solute carrier family 38, member 3	---
Bt.28555.1.A1_at	-1,40	LOC158381	hypothetical protein LOC158381	---
Bt.25459.1.A1_at	-1,52	ATP13A4	ATPase type 13A4	---
Bt.84.1.S1_at	-1,60	SLC34A2	solute carrier family 34, member 2	---
Bt.21137.1.S1_at	-1,60	SLC34A2	solute carrier family 34, member 2	---
Bt.21137.2.S1_at	-1,60	SLC34A2	solute carrier family 34, member 2	---
CLUSTER 4				
Bt.17371.1.A1_at	1,81	SDCCAG10	serologically defined colon cancer antigen 10	---
Bt.21543.1.S1_at	1,23	PRKCA	protein kinase C, alpha	---
Bt.21543.2.S1_at	1,23	PRKCA	protein kinase C, alpha	---
Bt.20020.1.S1_at	1,03	HABP4	hyaluronan binding protein 4	---
Bt.8338.1.S1_at	1,03	CITED4	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 4	---
CLUSTER 5				
Bt.17242.1.A1_at	3,40	CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	---
Bt.21680.1.S1_a_at	2,47	PIR	pirin	---
Bt.21680.1.S1_at	2,47	PIR	pirin	---
Bt.23094.6.A1_at	2,25	AKR1C4	aldo-keto reductase family 1, member C4	---
Bt.113.1.S1_at	1,99	H4	histone H4	---
Bt.19825.1.S1_at	1,96	UGT2B4	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B4	---
Bt.2349.1.S1_at	1,92	STMN4	stathmin-like 4	---
Bt.6642.1.S1_a_at	1,78	LPIN1	lipin 1	---
Bt.6642.1.S1_at	1,78	LPIN1	lipin 1	---
Bt.6642.2.S1_at	1,78	LPIN1	lipin 1	---

Bt.23886.1.A1_at	1,75	---	---	---
Bt.15842.1.S1_at	1,70	THRSP	thyroid hormone responsive	---
Bt.27422.1.A1_at	1,57	ZMYND12	zinc finger, MYND domain containing 12	---
Bt.27627.1.A1_at	1,55	SNTA1	syntrophin, alpha 1	---
Bt.13922.1.A1_at	1,48	HES6	hair and enhancer of split 6	---
Bt.5030.1.S1_at	1,34	SLC18A2	solute carrier family 18, member 2	---
Bt.26343.1.S1_at	1,24	MTP	microsomal triglyceride transfer protein	---
Bt.24415.1.A1_at	1,20	RIMS4	regulating synaptic membrane exocytosis 4	---
Bt.15784.1.S1_at	1,20	EMP1	epithelial membrane protein 1	---
Bt.10159.1.S1_at	1,14	CEBPG	CCAAT/enhancer binding protein, gamma	---
Bt.20994.1.S1_at	1,14	---	---	---
Bt.9185.1.A1_at	1,12	GRAMD1C	GRAM domain containing 1C	---
Bt.13512.1.S1_at	1,12	PP35	protein similar to E.coli yhdg and R. capsulatus nifR3	---
Bt.805.1.S1_at	1,10	ADIPOR2	adiponectin receptor 2	---
Bt.10666.1.A1_s_at	1,09	LOC92558	hypothetical protein LOC92558	---
Bt.15543.1.A1_s_at	1,09	---	---	---
Bt.6147.3.A1_at	1,08	MGC2477	hypothetical protein MGC2477	---
Bt.11541.1.A1_at	1,08	SPNS3	spinster homolog 3 (Drosophila)	---
CLUSTER 6				
Bt.19356.1.A1_at	-1,00	---	---	---
Bt.4732.1.S1_at	-1,00	ALDH1A1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	---
Bt.26895.2.S1_at	-1,00	FAM20A	family with sequence similarity 20, member A	---
Bt.10648.1.S1_at	-1,01	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	---
Bt.2424.1.S1_at	-1,01	DPYD	dihydropyrimidine dehydrogenase	---
Bt.26466.1.A1_at	-1,01	---	---	---
Bt.5078.1.S1_at	-1,01	MAGED2	melanoma antigen, family D, 2	---
Bt.20619.1.S1_at	-1,01	MSI2	musashi homolog 2	---
Bt.26837.1.S1_at	-1,02	C5H12orf23	chromosome 12 open reading frame 23 ortholog	---
Bt.2346.1.S1_at	-1,03	LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	---
Bt.2520.1.S1_at	-1,03	SPOCK2	sparc/osteonectin, ovcv and kazal-like domains proteoglycan 2	---
Bt.19567.1.A1_at	-1,04	NEBL	nebulin	---
Bt.19567.2.S1_at	-1,04	NEBL	nebulin	---
Bt.19322.1.A1_at	-1,04	COL4A6	collagen, type IV, alpha 6	---
Bt.27708.1.A1_at	-1,04	---	---	---
Bt.9053.1.S1_a_at	-1,04	LRP16	LRP16 protein	---
Bt.7955.2.S1_at	-1,04	PCOLCE	procollagen C-endopeptidase enhancer	---
Bt.4680.1.S1_at	-1,05	DNAJC12	DnaJ homolog, subfamily C, member 12	---
Bt.7478.1.S1_at	-1,05	HSPB6	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	---
Bt.8433.1.S1_at	-1,05	SURF4	surfeit 4	---
Bt.1615.1.A1_at	-1,05	MYCPBP	c-myc promoter binding protein	---
Bt.28472.1.S1_at	-1,06	OLFML3	olfactomedin-like 3	---
Bt.9033.2.S1_at	-1,06	TRAM1	translocation associated membrane protein 1	---

Bt.4939.1.S1_at	-1,07	SFRP2	secreted frizzled-related protein 2	Bt.16861.2.S1_at	-1,19	DKFZp761N1114	hypothetical protein DKFZp761N1114
Bt.26813.1.S1_at	-1,07	CACHD1	cache domain containing 1	Bt.22002.1.S1_at	-1,19	FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
Bt.24729.1.A1_at	-1,08	SLC38A3	solute carrier family 38, member 3	Bt.15298.1.A1_at	-1,19	FLJ14054	hypothetical protein FLJ14054
Bt.13349.1.S1_at	-1,08	FLJ20533	hypothetical protein FLJ20533	Bt.29296.1.S1_at	-1,20	SEC23B	Sec23 homolog B
Bt.12555.1.S1_at	-1,09	BTNL9	butyrophilin-like 9	Bt.29900.1.S1_at	-1,20	HS2ST1	heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1
Bt.12927.1.S1_at	-1,09	HAS2	hyaluronan synthase 2	Bt.13376.1.S1_at	-1,21	DHRS1	dehydrogenase/reductase member 1
Bt.725.1.S1_at	-1,09	PDGFRL	platelet-derived growth factor receptor-like	Bt.15682.1.A1_at	-1,21	BR13BP	BR13 binding protein
Bt.22667.1.A1_at	-1,09	DDO	D-aspartate oxidase	Bt.18015.1.A1_at	-1,21	PYGB	phosphorylase, glycogen; brain
Bt.9799.1.S1_at	-1,09	EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2	Bt.140.1.S1_at	-1,22	OXTR	oxytocin receptor
Bt.7078.1.S1_at	-1,10	TXNDC5	thioredoxin domain containing 5	Bt.22595.1.S1_at	-1,22	LOC55924	hypothetical protein LOC55924
Bt.7078.1.S2_at	-1,10	TXNDC5	thioredoxin domain containing 5	Bt.24830.1.A1_at	-1,22	---	---
Bt.12743.1.A1_at	-1,10	ABCD4	ATP-binding cassette, sub-family D, member 4	Bt.13772.1.A1_at	-1,23	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
Bt.20280.1.S1_at	-1,10	GYTL1B	glycosyltransferase-like 1B	Bt.9958.1.S1_at	-1,23	IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 6
Bt.20296.1.S1_at	-1,11	SFXN2	sideroflexin 2	Bt.23635.1.S1_at	-1,23	SYCP3	synaptonemal complex protein 3
Bt.3137.1.S1_at	-1,11	STMN1	stathmin 1/oncoprotein 18	Bt.2479.1.A1_at	-1,23	SYCP3	synaptonemal complex protein 3
Bt.3229.1.S1_at	-1,11	HAPLN3	hyaluronan and proteoglycan link protein 3	Bt.17523.1.A1_at	-1,24	FLJ10378	FLJ10378 protein
Bt.4886.1.A1_at	-1,11	LRRC17	leucine rich repeat containing 17	Bt.12490.1.S1_at	-1,25	IGHG1	immunoglobulin heavy constant gamma 1
Bt.6449.1.S1_at	-1,11	FBLN5	fibulin 5	Bt.26942.1.S1_at	-1,25	SLC17A5	solute carrier family 17, member 5
Bt.7418.1.S1_at	-1,11	ANKH	ankylosis, progressive homolog	Bt.8549.1.S2_at	-1,25	COL1A1	collagen, type I, alpha 1
Bt.18265.1.A1_at	-1,11	BUB1B	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta	Bt.3277.1.S1_at	-1,27	ALDH18A1	aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1
Bt.17000.1.A1_at	-1,11	PRRC1	proline-rich coiled-coil 1	Bt.26788.1.S1_at	-1,27	FLJ11588	hypothetical protein FLJ11588
Bt.20770.1.A1_at	-1,12	CLOCK	clock homolog	Bt.28566.1.S1_at	-1,28	NR3C2	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2
Bt.28034.1.S1_at	-1,13	ERCC5	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5	Bt.9777.1.S1_at	-1,29	BDH	3-hydroxybutyrate dehydrogenase
Bt.28034.2.S1_at	-1,13	ERCC5	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5	---	---	---	---
Bt.25312.1.A1_at	-1,13	COLEC12	collectin sub-family member 12	Bt.20637.1.S1_at	-1,29	---	---
Bt.4852.1.S1_at	-1,13	GSTM1	glutathione S-transferase M1	Bt.27938.1.A1_at	-1,31	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G, member 2
Bt.21953.1.S1_at	-1,13	TMEM64	transmembrane protein 64	Bt.8496.1.S1_at	-1,33	GMPPB	GDP-mannose pyrophosphorylase B
Bt.26433.1.A1_at	-1,14	CD109	CD109 antigen	Bt.25258.1.A1_at	-1,33	ZNRF3	zinc and ring finger 3
Bt.27784.2.S1_a_at	-1,15	PPP1R10	protein phosphatase 1, regulatory subunit 10	Bt.29697.1.S1_at	-1,34	ART3	ADP-ribosyltransferase 3
Bt.7179.1.S1_a_at	-1,15	MMP23B	matrix metalloproteinase 23B	Bt.6630.1.S1_at	-1,34	CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle
Bt.26919.1.S1_at	-1,16	NTN4	netrin 4	Bt.28182.1.A1_at	-1,35	RGS5	regulator of G-protein signalling 5
Bt.19120.1.A1_at	-1,17	---	---	Bt.8963.1.S1_at	-1,39	LOXL1	lysyl oxidase-like 1
Bt.2696.1.A1_at	-1,17	CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin	Bt.17771.3A1_at	-1,40	---	---
Bt.2696.2.S1_at	-1,17	CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin	Bt.2524.1.S1_at	-1,41	CXCL12	chemokine ligand 12
Bt.8124.1.S2_at	-1,17	COL1A2	collagen, type I, alpha 2	Bt.5348.1.S1_at	-1,41	RPL6	ribosomal protein L6
Bt.3797.1.S1_at	-1,18	FMOD	fibromodulin	Bt.21518.1.S1_at	-1,42	SNF1LK	SNF1-like kinase
Bt.19917.1.A1_at	-1,18	FLJ31295	hypothetical protein FLJ31295	Bt.27331.1.S1_at	-1,43	C5orf13	chromosome 5 open reading frame 13
Bt.15900.1.A1_at	-1,18	AHCYL2	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2	Bt.3780.1.S1_at	-1,43	C5orf13	chromosome 5 open reading frame 13
Bt.15900.2.S1_at	-1,18	AHCYL2	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2	Bt.23575.1.A1_at	-1,44	ECM2	extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific
Bt.20733.1.S1_at	-1,18	AHCYL2	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2	Bt.28062.1.S1_at	-1,45	GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle
Bt.16861.1.A1_at	-1,19	DKFZp761N1114	hypothetical protein DKFZp761N1114	Bt.12199.1.A1_at	-1,45	SLC41A1	solute carrier family 41, member 1
				Bt.12199.2.S1_at	-1,45	SLC41A1	solute carrier family 41, member 1

Bt.17562.1.A1_at	-1,45	LOC196996	hypothetical protein LOC196996	Bt.2452.1.S1_at	-1,88	LUM	lumican
Bt.24660.1.S1_at	-1,45	PRO1855	hypothetical protein PRO1855	Bt.4137.1.A1_at	-1,94	GOS2	putative lymphocyte G0/G1 switch gene
Bt.3202.1.A1_at	-1,47	PRELP	proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein	Bt.15569.1.A1_at	-1,96	SIAT7C	siatyltransferase 7 C
Bt.7788.1.S1_at	-1,47	URB	steroid sensitive gene 1	Bt.12848.1.S1_at	-2,00	PTHLLH	parathyroid hormone-like hormone
Bt.1899.1.A1_at	-1,48	ISLR	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat	Bt.21465.1.S1_at	-2,05	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5
Bt.723.1.S1_at	-1,49	GFPT1	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1	Bt.12440.1.A1_at	-2,05	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5
Bt.17562.1.A1_at	-1,50	SEMA3E	sema domain, immunoglobulin domain, short basic domain, secreted, 3E	Bt.3100.1.A1_at	-2,05	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5
Bt.17582.1.S1_at	-1,52	ATP13A4	ATPase type 13A4	Bt.12283.1.A1_at	-2,08	DIRAS3	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3
Bt.28518.1.S1_at	-1,52	TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	Bt.12300.2.S1_at	-2,12	MYH2	myosin, heavy polypeptide 2, skeletal muscle, adult
Bt.5369.1.S1_at	-1,53	FXYD6	FXYD domain containing ion transport regulator 6	Bt.11057.1.S1_at	-2,33	SHISA3	shisa homolog 3 (Xenopus laevis)
Bt.23451.1.S1_at	-1,54	CCL26	chemokine ligand 26	Bt.17665.1.A1_at	-2,49	SLC25A21	solute carrier family 25, member 21
Bt.20372.1.S1_at	-1,55	PON3	paraoxonase 3	Bt.21761.1.S1_a_at	-2,55	TMOD4	tropomodulin 4
Bt.26930.1.S1_at	-1,55	DDEF1	development and differentiation enhancing factor-like 1	Bt.2598.1.S1_at	-3,03	ALOX15	arachidonate 15-lipoxygenase
Bt.16100.1.S1_at	-1,56	C2orf31	chromosome 2 open reading frame 31	VERGLEICH iRh-c24h			
Bt.16100.2.S1_at	-1,56	C2orf31	chromosome 2 open reading frame 31	CLUSTER 1			
Bt.18483.1.A1_at	-1,57	---	---	Bt.4606.1.S1_at	1,57	KLF6	Kruppel-like factor 6
Bt.18207.1.S1_at	-1,60	NFASC	neurofascin	Bt.8238.1.A1_at	1,56	TRIB3	tribbles homolog 3
Bt.21800.1.S1_at	-1,64	SEC24D	SEC24 related gene family, member D	Bt.15802.2.S1_at	1,44	KLF5	Kruppel-like factor 5
Bt.18444.1.A1_at	-1,65	C9orf4	chromosome 9 open reading frame 4	Bt.13330.1.S1_at	1,38	PKD4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4
Bt.28429.1.S1_at	-1,66	FKBP14	FK506 binding protein 14, 22 kDa	Bt.15802.1.S1_at	1,35	KLF5	Kruppel-like factor 5
Bt.26363.1.A1_at	-1,66	---	---	Bt.12769.1.S1_at	1,09	PCK2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2
Bt.13324.1.S1_a_at	-1,72	IDH1	isocitrate dehydrogenase 1, soluble	Bt.25189.1.A1_at	1,08	FAM55C	family with sequence similarity 55, member C
Bt.13324.4.S1_at	-1,72	IDH1	isocitrate dehydrogenase 1, soluble	Bt.27654.2.S1_at	1,00	NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated
Bt.4482.2.S1_at	-1,75	MSR1	macrophage scavenger receptor 1	CLUSTER 2			
Bt.10030.2.S1_a_at	-1,78	TMEPAI	transmembrane, prostate androgen induced RNA	Bt.10398.1.S1_at	2,90	PTX3	pentaxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta
Bt.668.1.S1_at	-1,78	TMEPAI	transmembrane, prostate androgen induced RNA	Bt.411.1.S1_at	1,90	NRG1	neuregulin 1
Bt.5341.1.S1_at	-1,79	OGN	osteo glycin	IN KEINEM CLUSTER			
Bt.21896.1.S1_at	-1,85	COL21A1	collagen, type XXI, alpha 1	Bt.11990.1.S1_at	1,38	C10orf45	chromosome 10 open reading frame 45
Bt.18368.1.S1_at	-1,88	CXCL11	chemokine ligand 11	Bt.17573.1.A1_at	1,29	ZBTB16	zinc finger and BTB domain containing 16
Bt.22869.1.S2_at	-1,88	FABP5	fatty acid binding protein 5	Bt.20329.2.S1_at	1,14	ARL4D	ADP-ribosylation factor-like 4D

Die aufgeführten Gene wurden in den Vierteln infizierter Tiere mindestens zweifach höher bzw. weniger als halb so oft exprimiert als in den externen Kontrollen. Der p-Wert wurde für die Vergleiche der Expressionsprofile c_1 bis c_5 (Euterviertel gesunder nicht-infizierter Tiere) mit l_1 bis l_5 (infizierte Euterviertel, 24 h nach Infektion) oder mit n_1 bis n_5 (nicht-infizierte Euterviertel infizierter Tiere, 24 h nach Infektion) auf < 0,01 gesetzt. Der Vergleich der Expressionsprofile c_1 bis c_5 (Euterviertel gesunder nicht-infizierter Tiere) mit l_6 bis l_10 (infizierte Euterviertel, 6 h nach Infektion) wurde mit einem p-Wert von < 0,1 ausgewertet.

8.2 R-Script

#Mit „#“ beginnende Zeilen werden nicht ausgeführt und dienen zum Kommentieren von Befehlen.

#„R“ starten - Eingabefenster erscheint

#Verzeichnis wechseln: Ordner angeben, in dem die CEL-Files gespeichert sind

```
setwd(„D://Data/Directory/Celfiles“)
```

#Folgende Pakete werden geladen: affy, affyPLM, geneplotter, limma, IDPmisc

```
library(affy)
library(affyPLM)
library(geneplotter)
library(limma)
library(IDPmisc)
```

#CEL-Files, welche die Signalintensitäten aller *probe sets* eines Chips enthalten, im angegebenen Ordner in das Objekt „data“ einlesen

```
data <- ReadAffy()
```

#Jeder Probe eine Bezeichnung zuordnen:

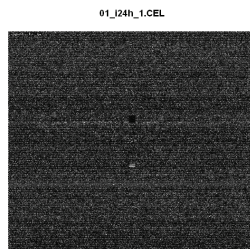
```
n <-
c("i_1", "i_2", "i_3", "i_4", "i_5", "c_1", "c_2", "c_3", "c_4", "c_5")
```

#Aus den Daten in „data“ eine lineares Probe-Modell „Pset“ errechnen:

```
Pset <- fitPLM(data)
```

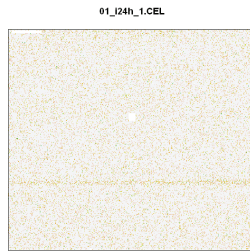
#Bild des ersten (1) Arrays anzeigen lassen:

```
image(data[,1])
```



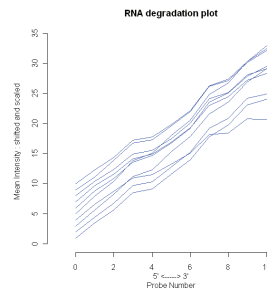
#Bild des ersten (1) Arrays als Falschfarbenbild anzeigen lassen:

```
image(Pset, which = 1)
```



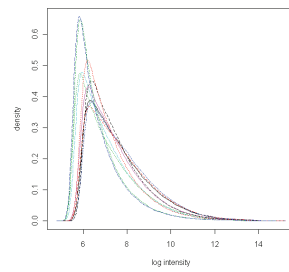
#Beurteilung der Signalintensitäten der 3'-5'-Sequenzbereiche mittels Degradationsplot/Digestion plot:

```
deg <- AffyRNAdeg(data); summaryAffyRNAdeg(deg);  
plotAffyRNAdeg(deg)
```



#Beurteilung der Häufigkeitsverteilung der Signalintensitäten mittels Histogramm:

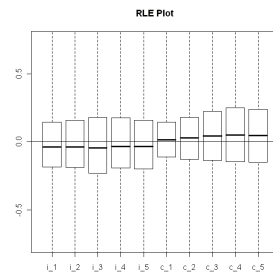
```
hist(data[, 1:10])
```



#Vergleich aller Hybridisierungsproben untereinander mittels RLE (Relative Log expression)

Plot:

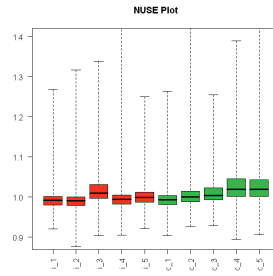
```
RLE(Pset, main = "RLE Plot", names=n)
```



#Vergleich aller Hybridisierungsproben untereinander mittels NUSE (normalized unscaled standard error) Plot:

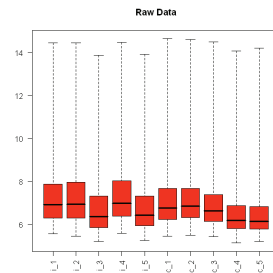
```
boxplot(Pset, col=c(2, 2, 2, 2, 2, 3, 3, 3, 3, 3), main="NUSE")
```

```
Plot", names=n, las=2, ylim=c(0.89, 1.4))
```



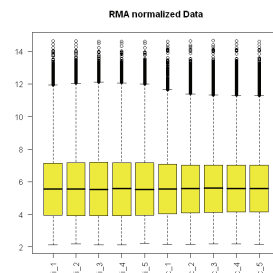
#Beurteilung der Häufigkeitsverteilung der Signalintensitäten mittels Histogramm:

```
boxplot(data, col="red", main="Raw Data", names=n, las=2)
```



#Normalisierung der Rohdaten mittels RMA (Robust Multiarray average) Algorithmus:

```
eset.rma <- rma(data)
boxplot(data.frame(exprs(eset.rma)), col="yellow", main="RMA
normalized Data", names=n, las=2)
```

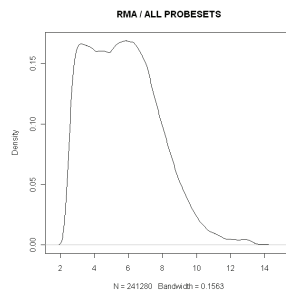


#RMA normaisierten Daten als Textfile exportieren:

```
write.exprs(eset.rma, file="data.rma.txt")
```

#Beurteilung der Häufigkeitsverteilung der RMA normalisierten und zur Basis 2 logarithmierten Signalintensitäten aller *probe sets* mittels Density Plot:

```
plot(density(exprs(eset.rma)), main="RMA / ALL PROBESETS")
```



#Ermitteln der *present calls* (*probe sets* mit eindeutigem Signal=detektierbar) mittels MAS5:

```
calls<-mas5calls(data)
ec<-exprs(calls)
```

#Definition der Anzahl an Proben einer Experimentgruppe, welche für ein *probe set* einen *present call* aufweisen müssen (hier > 2):

```
ecg1<-rowSums(ec[,1:5]=='P')>2
ecg2<-rowSums(ec[,6:10]=='P')>2
```

#Anzahl der detektierbaren *probe sets* der jeweiligen Experimentgruppe anzeigen lassen:

```
sum(ecg1)
sum(ecg2)
sum(ecg1|ecg2)
```

Filtern nach detektierbaren *probe sets* beider Experimentgruppen:

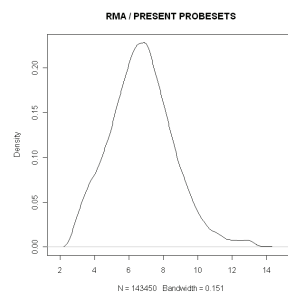
```
eset.rma.pp<-eset.rma[ecg1|ecg2,]
```

#Exportieren der RMA normalisierten und auf detektierbare *probe sets* gekürzten Daten als Textfile:

```
write.exprs(eset.rma, file="eset.rma.pp.txt")
```

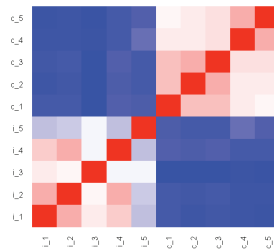
#Beurteilung der Häufigkeitsverteilung der RMA normalisierten und zur Basis 2 logarithmierten Signalintensitäten der *present probe sets* mittels Density Plot:

```
plot(density(exprs(eset.rma.pp)), main="RMA / PRESENT
PROBESETS")
```



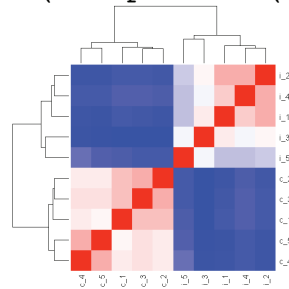
#Erstellung eines Distanzplots in Form einer sogenannten Heatmap:

```
exprs.rma.pp<-exprs(eset.rma.pp)
d1 <- dist(t(scale(exprs.rma.pp))); dN <-
dimnames(exprs.rma.pp)[[2]]; nS <- length(dN); d1M <-
as.matrix(d1); dimnames(d1M) <- list(n, n); par(mfrow = c(1,
1)); image(1:nS, 1:nS, d1M, col = rev(dChip.colors(50)), axes =
FALSE, xlab = "", ylab = ""); axis(1, at = (1:nS), label = n,
tick = FALSE,las=2); axis(2, at = (1:nS), label = n, tick =
FALSE,las=2)
```



#Erstellung eines Distanzplots mit hierarchischer Clusterung in Form einer sogenannten Heatmap:

```
heatmap(d1M, col = rev(dChip.colors(50)), scale = "none")
```



Mittels eines MA Plots kann die Qualität von einzelnen Replikaten innerhalb eines Experiments überprüft werden. Dabei wird die Differenz (M) eines Chips (Y-Achse) gegenüber dem Mittelwert (A) aller Chips (X-Achse) aufgetragen.

#Erstellung eines MA Plots:

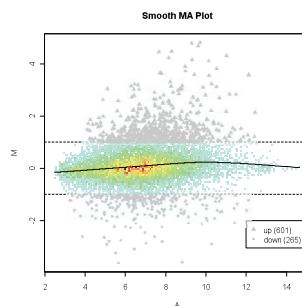
```
M<-rowMeans(exprs(eset.rma.pp[, 1]))-
rowMeans(exprs(eset.rma.pp[, 2:10]))
A<-
(rowMeans(exprs(eset.rma.pp[, 1]))+rowMeans(exprs(eset.rma.pp[, 2
:10])))/2
Genes.down <-M<(-1)
Genes.up <- M>(1)
down.m<-M[Genes.down]
down.a<-A[Genes.down]
up.m <- M[Genes.up]
up.a <- A[Genes.up]
sum(Genes.down)
sum(Genes.up)
par(mfrow=c(1,1))
plot(A,M,pch=".",cex=2)
abline(h=-1,lty=2)
abline(h=1,lty=2)
title(main="MA plot")
points(up.a,up.m,pch=".",col="red",cex=3)
```

```
points(down.a,down.m,pch=".",col="green",cex=3)
legend(12,-2,legend=c("up (601)", "down
(265)"),pch=c(19,19),col=c("red","green"))
```



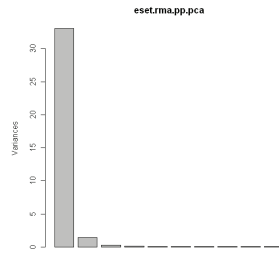
#Erstellung eines Smooth MA Plots mit Dichteverhältnis und Verlaufskurve:

```
M<-rowMeans(exprs(eset.rma.pp[,1]))-
rowMeans(exprs(eset.rma.pp[,2:10]))
A<-
(rowMeans(exprs(eset.rma.pp[,1]))+rowMeans(exprs(eset.rma.pp[,2
:10])))/2
Genes.down <-M<(-1)
Genes.up <- M>(1)
down.m<-M[Genes.down]
down.a<-A[Genes.down]
up.m <- M[Genes.up]
up.a <- A[Genes.up]
sum(Genes.down)
sum(Genes.up)
plot(A,M,type="n")
abline(h=-1,lty=2)
abline(h=1,lty=2)
title(main="Smooth MA Plot")
Image(A,M)
lines(smooth.spline(A,M))
points(up.a,up.m,pch=17,col="grey")
points(down.a,down.m,pch=18,col="grey")
legend(12,-2,legend=c("up (601)", "down
(265)"),pch=c(17,18),col=c("grey","grey"))
```



#Erstellung eines Principal component analysis plots mittels Hauptkomponentenanalyse:

```
eset.rma.pp.pca<-prcomp(exprs(eset.rma.pp))
plot(eset.rma.pp.pca)
```



#Identifizierung differentiell exprimierter Gene mittels LIMMA (linear models for microarray data).

#Erstellen eines Target-Textfiles mit den zugrundeliegenden Beziehungen des experimentellen Ansatzes.

Name	FileName	Target
i_1	1.cel	RNA1
i_2	2.cel	RNA1
i_3	3.cel	RNA1
i_4	4.cel	RNA1
i_5	5.cel	RNA1
c_1	6.cel	RNA2
c_2	7.cel	RNA2
c_3	8.cel	RNA2
c_4	9.cel	RNA2
c_5	10.cel	RNA2

#Einlesen des Target-Textfiles:

```
targets <- readTargets("targets.txt",
  sep=" ", row.names="filename")
```

#Definieren der zugrundeliegenden Beziehungen der einzelnen Proben eines experimentellen Ansatzes #untereinander:

#Erstellung einer Kontrastmatrix:

```
treatments <-
c("RNA1", "RNA1", "RNA1", "RNA1", "RNA1", "RNA2", "RNA2", "RNA2", "RNA2",
  "RNA2")
design <-
cbind(RNA1=c(1,1,1,1,1,0,0,0,0,0),RNA2=c(0,0,0,0,0,1,1,1,1,1))
colnames(design) <-c("RNA1", "RNA2")
design
```

#Erstellung eines linearen Modells aus den RMA normalisierten Daten der detektierbaren probe sets:

```
fit <- lmFit(exprs.rma.pp,design)
```

#Definieren der gewünschten Vergleiche

#Erstellung einer Distanzmatrix:

```
contrast.matrix <- makeContrasts(RNA2vsRNA1=RNA1-RNA2,
levels=design)
fit2 <- contrasts.fit(fit, contrast.matrix)
```

#Anwendung des Empirischen-Bayes-Ansatzes von Gordon Smyth = moderierter t-Test
(Entlehnung von Informationen mehrerer *probe sets*):

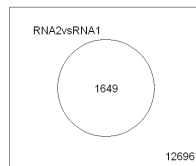
```
fit2 <- eBayes(fit2)
options(digits=2)
topTable(fit2, adjust="fdr")
```

#Durchführen einer Korrektur für Multiples Testen. Variablen für „adjust.method“ sind: none (keine) oder fdr (false discovery rate). Über „p.value“ wird der p-Wert festgelegt und über lfc (log fold change) der Grenzwert für die Größe der Änderung der Genexpression

```
results <- decideTests(fit2,
method="global",adjust.method="fdr",p.value=0.01, lfc=1)
```

#Visualisierung der differentiell exprimierten Gene mittels Venn-Diagramm:

```
vennDiagram(results)
```



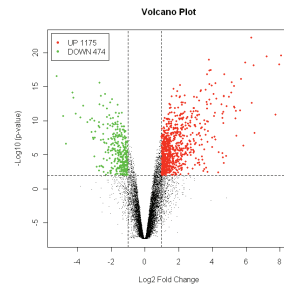
#Limma-Ergebnisse als Textfile exportieren:

```
write.fit(fit2, results, file="results_pv0.01_lfc1(1649).txt",
digits=2, adjust="fdr",sep="\t")
```

#Visualisierung der differentiell exprimierten Gene mittels Vulkanplot: In dieser Grafik werden differentiell exprimierte Gene mit mehr als zweifachen Unterschieden in der Genexpression (Log_2 Fold Change ≥ 1 ; X-Achse) und einem p-Wert $< 0,01$ ($-\text{Log}_{10}(\text{p-value})$; Y-Achse) dargestellt (hochreguliert: rot; herunterreguliert: grün), welche zuvor mittels eines statistischen Tests unter Verwendung von limma identifiziert wurden.

```
M<-fit2$coefficients
lods<-fit2$lods
M.sig.up<-M>=1
M.sig.down<-M<=(-1)
lod.sig<-lods>=(-log10(0.01))
plot(M,lods,xlab = "Log2 Fold Change",ylab = "-Log10 (p-
value)", main = "Volcano Plot", pch=".")
abline(v=-1,lty=2,cex=0.5)
abline(v=1,lty=2,cex=0.5)
abline(h=2,lty=2,cex=0.5)
M.sig.up<-M>=1
```

```
M.sig.down<-M<=(-1)
lod.sig<-lods>=(-log10(0.01))
points(M[lod.sig&M.sig.down],lods[lod.sig&M.sig.down],col="green",pch=20,cex=0.8)
points(M[lod.sig&M.sig.up],lods[lod.sig&M.sig.up],col="red",pch=20,cex=0.8)
legend(locator(1),pch=c(20,20),col=c("red","green"),legend=c("UP 1175",
"DOWN 474"))
```



9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Photolithographischer Herstellungsprozess – Affymetrix (http://www.affymetrix.com/index.affx , 2009).....	15
Abbildung 2:	GeneChip™ Sonden-Design – modifiziert nach Affymetrix (http://www.affymetrix.com/index.affx , 2009).....	16
Abbildung 3:	Entnahme von Milchdrüsengewebe	23
Abbildung 4:	Analyse der Genexpression nach dem Affymetrix-Verfahren (http://www.affymetrix.com/index.affx , 2009).....	26
Abbildung 5:	cDNA-Synthese und in vitro-Transkription – modifiziert nach Affymetrix (http://www.affymetrix.com/index.affx , 2009).....	27
Abbildung 6:	Aufbau eines Affymetrix GeneChips™	34
Abbildung 7:	Einteilung der Versuchstiere für die experimentelle Infektion mit <i>E. coli</i> 1303	38
Abbildung 8:	Klinische Befunde nach experimentell induzierter Mastitis.....	40
Abbildung 9:	Einfluss einer experimentellen Infektion mit <i>E. coli</i> 1303 auf ausgesuchte Parameter des Differentialzellbildes in der Milch.....	41
Abbildung 10:	Absorptionsspektren der Gesamt-RNA aus Eutergewebsproben	42
Abbildung 11:	Agarosegelbild der Gesamt-RNA aus Eutergewebsproben	43
Abbildung 12:	Agarosegelbilder biotinylierter cRNA vor und nach der Fragmentierung .	44
Abbildung 13:	Boxplots der Log ₂ -Expressionswerte der Rohdaten (A) und der RMA normalisierten Daten (B) im Vergleich	46
Abbildung 14:	Heatmap der Clusteranalyse der Genexpression 6 h nach Infektion mit <i>E. coli</i> 1303	47
Abbildung 15:	SAM-Plot der Analyse in infizierten Eutervierteln 6 h nach Infektion mit <i>E. coli</i> 1303	48
Abbildung 16:	Heatmap der Clusteranalyse der Genexpression 24 h nach Infektion mit <i>E. coli</i> 1303	50
Abbildung 17:	Vulkanplot der Expressionswerte in infizierten Eutervierteln in der späten Phase der Infektion.....	52
Abbildung 18:	Heatmap der Clusteranalyse der Genexpression in nicht-infizierten Eutervierteln infizierter Tiere 24 h nach Infektion mit <i>E. coli</i> 1303.....	54
Abbildung 19:	Hierarchisches Cluster von 401 differentiell exprimierten probe sets in nicht-infizierten Eutervierteln 24 h nach der Infektion mit <i>E. coli</i> 1303	56

Abbildung 20:	Heatmaps der Clusteranalysen der Genexpression 6 h und 24 h nach Infektion mit <i>E. coli</i> 1303	57
Abbildung 21:	SOTA-Analyse der differentiell exprimierten probe sets.....	60
Abbildung 22:	Anreicherung der Genontologien und Pathways innerhalb der SOTA-Cluster	61
Abbildung 23:	Lokale und systemische Immunantwort in der Milchdrüse des Rindes 24 h nach Infektion mit <i>E. coli</i> 1303.....	76

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Beurteilung zytologisch-mikrobiologischer Befunde (DVG 1994).....	3
Tabelle 2:	Stadien der Eutergesundheit (DVG 1994).....	4
Tabelle 3:	Vorbereiten der RNA für die Erststrangsynthese	28
Tabelle 4:	Synthese des Erststrangs der cDNA	28
Tabelle 5:	Synthese des Zweitstrangs der cDNA.....	29
Tabelle 6:	Reinigen der hergestellten cDNA	30
Tabelle 7:	Ansetzen des IVT-Mastermix für eine Reaktion	31
Tabelle 8:	Reinigen der hergestellten biotinylierten cRNA	31
Tabelle 9:	Ansetzen des Hybridisierungscocktails	33
Tabelle 10:	Wasch- und Färbeprotokoll FS450_0002	34
Tabelle 11:	Differentiell exprimierte Gene in infizierten Eutervierteln 6 h nach Infektion mit <i>E. coli</i> 1303	49
Tabelle 12:	Anzahl der somatischen Zellen in der Milch	53
Tabelle 13:	Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in den SOTA-Clustern	63
Tabelle 14:	Differentiell exprimierte Gene in der Milchdrüse des Rindes 6 h bzw. 24 h nach Infektion mit <i>E. coli</i> 1303.....	82

11 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
%	Prozent
IX	römische Zahl Neun
μ	mikro ($\times 10^{-6}$)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar ($\mu\text{mol/l}$)
Abb.	Abbildung
aRNA	“antisense” Ribonukleinsäure („antisense ribonucleic acid”)
B	Basen
Bp/bp	Basenpaare (“base pairs”)
bzw.	beziehungsweise
c	Kontrolle
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (“charge coupled device”)
cDNA	Desoxyribonukleinsäure-Kopie („copy deoxyribonucleic acid”)
cm	Zentimeter
CMT	California Mastitis Test
cRNA	Ribonukleinsäure-Kopie („copy ribonucleic acid”)
D	dorsal
db	Datenbank (“database”)
d.h.	das heisst
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid”)
dNTP	Desoxyribonucleotide-Triphosphate
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECOR-A	“ <i>E. coli</i> collection of reference strains, phylogentic group A”
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii

EtBr	Ethidiumbromid
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
FC	Fold Change
FDR	Fehlergrenze ("false discovery rate")
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung: 1 <i>g</i> = 9,81 m/s ² ; RCF („relative centrifugal force") (= 1,119 x 10 ⁻⁵ x rpm ² x r)
GO	Gene Ontology
h	„hora“ (lateinisch: Stunde)
H ₂ O	Wasser
hl	hinten links
hr	hinten rechts
i	infiziertes Viertel
IE	Internationale Einheiten
IVT	<i>in vitro</i> -Transkription
kb	kilo Basenpaare („kilo base pairs")
KbE	Koloniebildende Einheiten
kg	Kilogramm
l	Liter
lfc	Log ₂ Fold Change
limma	Lineares Modell für Microarrays ("linear model for microarray data")
LPS	Lipopolysaccharid
LYM	lymphoide Zellen
m	milli (x10 ⁻³)
M	Molar (mol/l)
M'	mittlerer Sequenzbereich
mA	Milliampere
MAS	Microarray Analysis Suite
MeV	"Multitexperiment Viewer"
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex")
min	Minute(n)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ml	Milliliter
MM	Missmatch
mM	Millimolar (mmol/l)
mm	Millimeter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure („messenger ribonucleic acid“)
n	Nachbarviertel
n	nano (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar (nmol/l)
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	Placeboviertel
p.a.	pro analysi
p.i.	post infectionem
p-wert	p-Wert; Überschreitungs-/Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polmerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PGF2 α	Prostaglandin-F2 α
pH	potentia hydrogenii
PM	Perfect Match
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten (“polymorphonuclear leucocytes“)
R	Software
RMA	Robust Multiarray Average
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
ROS	reaktive Sauerstoff-Derivate (“reactive oxygen spezies“)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure („ribosomal ribonucleic acid“)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Svedberg-Einheit
SAM	Signifikanzanalyse von Microarrays („Significance Anaysis of Microarrays“)
SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin
SCC	Gesamtzellzahl in der Milch („somatic cell count“)
SDS	Natriumlaurylsulfat („sodium dodecyl sulfat“)
SEM	Durchschnittsfehler der Standardabweichung („Standard error of mean“)

SiO ₂	Siliziumdioxid
SOTA	„Self organizing tree algorithm“
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i>
Tab.	Tabelle
TIGR	“The Institute for Genomic Research”
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TM	Trademark
TSS	Startstelle der Transkription („transcription start site“)
U	Einheit („unit“)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	ventral bzw. Version
V/cm	Volt pro Zentimeter
vl	vorne links
vr	vorne rechts
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

12 Literaturverzeichnis

2001. Creating the gene ontology resource: design and implementation. *Genome Res* 11(8):1425-1433.
2006. The Gene Ontology (GO) project in 2006. *Nucleic Acids Res* 34(Database issue):D322-326.
- Aderem A, Ulevitch RJ. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406(6797):782-787.
- Ahmed FE. 2006. Microarray RNA transcriptional profiling: part II. Analytical considerations and annotation. *Expert Rev Mol Diagn* 6(5):703-715.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4):783-801.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25(1):25-29.
- Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Lloyd AR, Michiel DF, Bausserman LL, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. 1994. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 180(1):203-209.
- Bailly V, Zhang Z, Meier W, Cate R, Sanicola M, Bonventre JV. 2002. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem* 277(42):39739-39748.
- Bannerman DD, Paape MJ, Hare WR, Sohn EJ. 2003. Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. *J Dairy Sci* 86(10):3128-3137.
- Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 11(3):463-472.
- Bannerman DD, Springer HR, Paape MJ, Kauf AC, Goff JP. 2008. Evaluation of breed-dependent differences in the innate immune responses of Holstein and Jersey cows to *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *J Dairy Res* 75(3):291-301.
- Bansal BK, Hamann J, Grabowski NT, Singh KB. 2005. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. *J Dairy Res* 72(2):144-152.
- Bayern R. 1999. Bayer Landesanstalt für Betriebswirtschaft und Agrarstruktur. *Arbeiten der LBA 27: (3. Aufl.)*.
- Begley N, Buckley F, Pierce KM, Fahey AG, Mallard BA. 2009. Differences in udder health and immune response traits of Holstein-Friesians, Norwegian Reds, and their crosses in second lactation. *J Dairy Sci* 92(2):749-757.
- Bertone P, Stolc V, Royce TE, Rozowsky JS, Urban AE, Zhu X, Rinn JL, Tongprasit W, Samanta M, Weissman S, Gerstein M, Snyder M. 2004. Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science* 306(5705):2242-2246.
- Beutler B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40(12):845-859.
- Bieker JJ. 2001. Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem* 276(37):34355-34358.

- Björn R. 2004. *Quantitative Methoden*. Springer-Verlag).
- Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. 2001. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 188(2):143-160.
- Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, De Gioia L, Matteucci C, Peri G, Spreafico F, Pausa M, D'Ettorre C, Gianazza E, Tagliabue A, Salmona M, Tedesco F, Introna M, Mantovani A. 1997. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 272(52):32817-32823.
- Bouma G, Lam-Tse WK, Wierenga-Wolf AF, Drexhage HA, Versnel MA. 2004. Increased serum levels of MRP-8/14 in type 1 diabetes induce an increased expression of CD11b and an enhanced adhesion of circulating monocytes to fibronectin. *Diabetes* 53(8):1979-1986.
- Bradley AJ, Green MJ. 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J Clin Microbiol* 39(5):1845-1849.
- Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Peri G, Bottazzi B, Bairoch A, Saccone S, Marzella R, Predazzi V, Rocchi M, et al. 1992. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 267(31):22190-22197.
- Buonanno A, Fischbach GD. 2001. Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 11(3):287-296.
- Burton JL, Erskine RJ. 2003. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 19(1):1-45, v.
- Burvenich C, Bannerman DD, Lippolis JD, Peelman L, Nonnecke BJ, Kehrl ME, Jr., Paape MJ. 2007. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *J Dairy Sci* 90 Suppl 1:E39-54.
- Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 34(5):521-564.
- Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermiller B, Barbacioru CC, Boysen C, Hunkapiller K, Jensen RV, Knight CR, Lee KY, Ma Y, Maqsoodi B, Papallo A, Peters EH, Poulter K, Ruppel PL, Samaha RR, Shi L, Yang W, Zhang L, Goodsaid FM. 2006. Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol* 24(9):1115-1122.
- Cannella B, Hoban CJ, Gao YL, Garcia-Arenas R, Lawson D, Marchionni M, Gwynne D, Raine CS. 1998. The neuregulin, glial growth factor 2, diminishes autoimmune demyelination and enhances remyelination in a chronic relapsing model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(17):10100-10105.
- Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C, Kodzius R, Shimokawa K, Bajic VB, Brenner SE, Batalov S, Forrest AR, Zavolan M, Davis MJ, Wilming LG, Aidinis V, Allen JE, Ambesi-Impiombato A, Apweiler R, Aturaliya RN, Bailey TL, Bansal M, Baxter L, Beisel KW, Bersano T, Bono H, Chalk AM, Chiu KP, Choudhary V, Christoffels A, Clutterbuck DR, Crowe ML, Dalla E, Dalrymple BP, de Bono B, Della Gatta G, di Bernardo D, Down T, Engstrom P, Fagiolini M, Faulkner G, Fletcher CF, Fukushima T, Furuno M, Futaki S, Gariboldi M, Georgii-Hemming P, Gingeras TR, Gojobori T, Green RE, Gustincich S, Harbers M, Hayashi Y, Hensch TK, Hirokawa N, Hill D, Huminiecki L, Iacono M, Ikeo K, Iwama A, Ishikawa T, Jakt M, Kanapin A, Katoh M, Kawasawa Y, Kelso J, Kitamura H, Kitano H, Kollias G, Krishnan SP, Kruger A, Kummerfeld SK, Kurochkin IV, Lareau LF, Lazarevic D, Lipovich L, Liu J, Liuni S, McWilliam S, Madan Babu M, Madera M, Marchionni L, Matsuda H, Matsuzawa S, Miki H, Mignone F, Miyake S, Morris K, Mottagui-Tabar S, Mulder N, Nakano N, Nakauchi H, Ng P, Nilsson R, Nishiguchi S, Nishikawa S, Nori F, Ohara O, Okazaki Y, Orlando V, Pang

- KC, Pavan WJ, Pavesi G, Pesole G, Petrovsky N, Piazza S, Reed J, Reid JF, Ring BZ, Ringwald M, Rost B, Ruan Y, Salzberg SL, Sandelin A, Schneider C, Schonbach C, Sekiguchi K, Semple CA, Seno S, Sessa L, Sheng Y, Shibata Y, Shimada H, Shimada K, Silva D, Sinclair B, Sperling S, Stupka E, Sugiura K, Sultana R, Takenaka Y, Taki K, Tammoja K, Tan SL, Tang S, Taylor MS, Tegner J, Teichmann SA, Ueda HR, van Nimwegen E, Verardo R, Wei CL, Yagi K, Yamanishi H, Zabarovsky E, Zhu S, Zimmer A, Hide W, Bult C, Grimmond SM, Teasdale RD, Liu ET, Brusic V, Quackenbush J, Wahlestedt C, Mattick JS, Hume DA, Kai C, Sasaki D, Tomaru Y, Fukuda S, Kanamori-Katayama M, Suzuki M, Aoki J, Arakawa T, Iida J, Imamura K, Itoh M, Kato T, Kawaji H, Kawagashira N, Kawashima T, Kojima M, Kondo S, Konno H, Nakano K, Ninomiya N, Nishio T, Okada M, Plessy C, Shibata K, Shiraki T, Suzuki S, Tagami M, Waki K, Watahiki A, Okamura-Oho Y, Suzuki H, Kawai J, Hayashizaki Y. 2005. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309(5740):1559-1563.
- Chanchevalap S, Nandan MO, McConnell BB, Charrier L, Merlin D, Katz JP, Yang VW. 2006. Kruppel-like factor 5 is an important mediator for lipopolysaccharide-induced proinflammatory response in intestinal epithelial cells. *Nucleic Acids Res* 34(4):1216-1223.
- Chen R, Lim JH, Jono H, Gu XX, Kim YS, Basbaum CB, Murphy TF, Li JD. 2004. Nontypeable *Haemophilus influenzae* lipoprotein P6 induces MUC5AC mucin transcription via TLR2-TAK1-dependent p38 MAPK-AP1 and IKKbeta-IkappaBalpha-NF-kappaB signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 324(3):1087-1094.
- Choi YS, Chakrabarti R, Escamilla-Hernandez R, Sinha S. 2009. Elf5 conditional knockout mice reveal its role as a master regulator in mammary alveolar development: Failure of Stat5 activation and functional differentiation in the absence of Elf5. *Dev Biol*.
- Cowell IG. 2002. E4BP4/NFIL3, a PAR-related bZIP factor with many roles. *Bioessays* 24(11):1023-1029.
- Cullor J, Tyler J. 2001. Mammary gland health and disorders, *Large Animal Internal Medicine*. Elsevier Health Science, St Louis:1177-1197.
- Dauphinee SM, Karsan A. 2006. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 86(1):9-22.
- Dimayuga FO, Ding Q, Keller JN, Marchionni MA, Seroogy KB, Bruce-Keller AJ. 2003. The neuregulin GGF2 attenuates free radical release from activated microglial cells. *J Neuroimmunol* 136(1-2):67-74.
- Dinarello CA. 1996. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol* 216:133-165.
- Dopfer D, Barkema HW, Lam TJ, Schukken YH, Gaastra W. 1999. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *J Dairy Sci* 82(1):80-85.
- Dosogne H, Burvenich C, van Werven T, Roets E, Noordhuizen-Stassen EN, Goddeeris B. 1997. Increased surface expression of CD11b receptors on polymorphonuclear leukocytes is not sufficient to sustain phagocytosis during *Escherichia coli* mastitis in early postpartum dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 60(1-2):47-59.
- DVG. 1994. Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. Sachverständigenausschuss (Subklinische Mastitis) des Arbeitskreises der Fachgruppe Milchhygiene des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene 3. Aufl. Kiel.
- Erskine RJ, Tyler JW, Riddell MG, Jr., Wilson RC. 1991. Theory, use, and realities of efficacy and food safety of antimicrobial treatment of acute coliform mastitis. *J Am Vet Med Assoc* 198(6):980-984.
- Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251(4995):767-773.
- Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. 2000. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques* 29(5):1042-1046, 1048-1055.

- Ganter U, Arcone R, Toniatti C, Morrone G, Ciliberto G. 1989. Dual control of C-reactive protein gene expression by interleukin-1 and interleukin-6. *Embo J* 8(12):3773-3779.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5(10):R80.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225-260.
- Gilbert RO, Grohn YT, Miller PM, Hoffman DJ. 1993. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 36(1):75-82.
- Gronlund U, Hallen Sandgren C, Persson Waller K. 2005. Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. *Vet Res* 36(2):191-198.
- Heeg K, Dalpke A. 2003. TLR-induced negative regulatory circuits: role of suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins in innate immunity. *Vaccine* 21 Suppl 2:S61-67.
- Heizmann CW. 2002. The multifunctional S100 protein family. *Methods Mol Biol* 172:69-80.
- Herrero J, Valencia A, Dopazo J. 2001. A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics* 17(2):126-136.
- Hess E, Egger B. 1969. Correlation between the cell count in milk and the results of histological and bacteriological examinations. *J Dairy Sci* 83:418-429.
- Hesse J, Jacak J, Kasper M, Regl G, Eichberger T, Winklmayr M, Aberger F, Sonnleitner M, Schlapak R, Howorka S, Muresan L, Frischauf AM, Schutz GJ. 2006. RNA expression profiling at the single molecule level. *Genome Res* 16(8):1041-1045.
- Heyneman R, Burvenich C, Vercauteren R. 1990. Interaction between the respiratory burst activity of neutrophil leukocytes and experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. *J Dairy Sci* 73(4):985-994.
- Hillerton JE. 1999. Redefining mastitis based on somatic cell count. *Inter Dairy Fed Bullet No* 345:4-6.
- Hintermair V. 2007. Comparative Analysis of *Bos taurus* and *Homo sapiens* DNA Microarrays. Ludwig Maximilian University Munich, Germany, Master's thesis.
- Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. 2000. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol* 165(2):618-622.
- Hirvonen J, Eklund K, Teppo AM, Huszenicza G, Kulcsar M, Saloniemi H, Pyorala S. 1999. Acute phase response in dairy cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Acta Vet Scand* 40(1):35-46.
- Hoffmann R, Seidl T, Dugas M. 2002. Profound effect of normalization on detection of differentially expressed genes in oligonucleotide microarray data analysis. *Genome Biol* 3(7):RESEARCH0033.
- Hogan J, Smith L. 2003. Coliform mastitis. *Vet Res* 34:507-519.
- Hogan JS, Weiss WP, Todhunter DA, Smith KL, Schoenberger PS. 1992. Efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial. *J Dairy Sci* 75(2):415-422.
- <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>. 2009.
- <http://www.affymetrix.com/index.affx>. 2009.
- <http://www.bioconductor.org/>. 2009.
- <http://www.r-project.org/>. 2009.
- Iwasaki A, Medzhitov R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5(10):987-995.

- Jaffrezic F, de Koning DJ, Boettcher PJ, Bonnet A, Buitenhuis B, Closset R, Dejean S, Delmas C, Detilleux JC, Dovic P, Duval M, Foulley JL, Hedegaard J, Hornshoj H, Hulsegge I, Janss L, Jensen K, Jiang L, Lavric M, Le Cao KA, Lund MS, Malinverni R, Marot G, Nie H, Petzl W, Pool MH, Robert-Granie C, San Cristobal M, van Schothorst EM, Schuberth HJ, Sorensen P, Stella A, Tosser-Klopp G, Waddington D, Watson M, Yang W, Zerbe H, Seyfert HM. 2007. Analysis of the real EADGENE data set: comparison of methods and guidelines for data normalisation and selection of differentially expressed genes (open access publication). *Genet Sel Evol* 39(6):633-650.
- Janeway C, Travers P, Walport M. 2004. Immunobiology. B&T, 6 Pap/Cdr.
- Jenner RG, Young RA. 2005. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat Rev Microbiol* 3(4):281-294.
- Jiang L, Sorensen P, Rontved C, Vels L, Ingvarsen KL. 2008. Gene expression profiling of liver from dairy cows treated intra-mammary with lipopolysaccharide. *BMC Genomics* 9:443.
- Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, Nishida H, Yap CC, Suzuki M, Kawai J, Suzuki H, Carninci P, Hayashizaki Y, Wells C, Frith M, Ravasi T, Pang KC, Hallinan J, Mattick J, Hume DA, Lipovich L, Batalov S, Engstrom PG, Mizuno Y, Faghihi MA, Sandelin A, Chalk AM, Mottagui-Tabar S, Liang Z, Lenhard B, Wahlestedt C. 2005. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 309(5740):1564-1566.
- Kimura K, Goff JP, Kehrli ME, Jr., Reinhardt TA. 2002. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *J Dairy Sci* 85(3):544-550.
- Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, Caunt JC, Oxley KM, Wyllie DH, Polgar T, Harte M, O'Neill L A, Qwarnstrom EE, Dower SK. 2004. Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 279(41):42703-42708.
- Kornalijnslijper JE, Daemen AJ, van Werven T, Niewold TA, Rutten VP, Noordhuizen-Stassen EN. 2004. Bacterial growth during the early phase of infection determines the severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in dairy cows. *Vet Microbiol* 101(3):177-186.
- Kornalijnslijper JE, van Werven T, Daemen AJ, van den Broek J, Niewold TA, Rutten VP, Noordhuizen-Stassen EN. 2003. In vitro growth of mastitis-inducing *Escherichia coli* in milk and milk fractions of dairy cows. *Vet Microbiol* 91(2-3):125-134.
- Krömker V. 2007. Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Georg Thieme Verlag.
- Kurihara T, Bravo R. 1996. Cloning and functional expression of mCCR2, a murine receptor for the C-C chemokines JE and FIC. *J Biol Chem* 271(20):11603-11607.
- Lapinskas EJ, Palmer J, Ricardo S, Hertzog PJ, Hammacher A, Pritchard MA. 2004. A major site of expression of the ets transcription factor Elf5 is epithelia of exocrine glands. *Histochem Cell Biol* 122(6):521-526.
- Larsen L, Ropke C. 2002. Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *Apmis* 110(12):833-844.
- Lee JW, Paape MJ, Elsasser TH, Zhao X. 2003. Recombinant soluble CD14 reduces severity of intramammary infection by *Escherichia coli*. *Infect Immun* 71(7):4034-4039.
- Li BS, Ma W, Jaffe H, Zheng Y, Takahashi S, Zhang L, Kulkarni AB, Pant HC. 2003. Cyclin-dependent kinase-5 is involved in neuregulin-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activity mediating neuronal survival. *J Biol Chem* 278(37):35702-35709.
- Lohuis JA, Verheijden JH, Burvenich C, van Miert AS. 1988. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. 1. Changes in body temperature and reticulo-rumen motility, and the effect of repeated administration. *Vet Q* 10(2):109-116.

- Long E, Capuco AV, Wood DL, Sonstegard T, Tomita G, Paape MJ, Zhao X. 2001. *Escherichia coli* induces apoptosis and proliferation of mammary cells. *Cell Death Differ* 8(8):808-816.
- Lu J, Marnell LL, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, Sun PD. 2008. Structural recognition and functional activation of FcγR by innate pentraxins. *Nature*.
- Lutzow YC, Donaldson L, Gray CP, Vuocolo T, Pearson RD, Reverter A, Byrne KA, Sheehy PA, Windon R, Tellam RL. 2008. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Vet Res* 4:18.
- Mandruzzato S. 2007. Technological platforms for microarray gene expression profiling. *Adv Exp Med Biol* 593:12-18.
- Medzhitov R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449(7164):819-826.
- Mehrzaad J, Duchateau L, Pyorala S, Burvenich C. 2002. Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *J Dairy Sci* 85(12):3268-3276.
- Merle R, Schroder A, Hamann J. 2007. Cell function in the bovine mammary gland: a preliminary study on interdependence of healthy and infected udder quarters. *J Dairy Res* 74(2):174-179.
- Meyer S. 2008. Untersuchungen zur Beeinflussung funktioneller Eigenschaften von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in der initialen Phase der bovinen Mastitis. Hannover, Tierärztl Hochsch, AG Immunol, Diss.
- Miller GY, Bartlett PC, Lance SE, Anderson J, Heider LE. 1993. Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 202(8):1230-1236.
- Mir KU. 2006. Ultrasensitive RNA profiling: counting single molecules on microarrays. *Genome Res* 16(10):1195-1197.
- Mysorekar IU, Mulvey MA, Hultgren SJ, Gordon JI. 2002. Molecular regulation of urothelial renewal and host defenses during infection with uropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 277(9):7412-7419.
- Nemeth J, Muckle CA, Gyles CL. 1994. In vitro comparison of bovine mastitis and fecal *Escherichia coli* isolates. *Vet Microbiol* 40(3-4):231-238.
- Nickerson SC. 1989. Immunological aspects of mammary involution. *J Dairy Sci* 72(6):1665-1678.
- Oakes SR, Naylor MJ, Asselin-Labat ML, Blazek KD, Gardiner-Garden M, Hilton HN, Kazlauskas M, Pritchard MA, Chodosh LA, Pfeffer PL, Lindeman GJ, Visvader JE, Ormandy CJ. 2008. The Ets transcription factor Elf5 specifies mammary alveolar cell fate. *Genes Dev* 22(5):581-586.
- Okada H, Ito T, Ohtsuka H, Kirisawa R, Iwai H, Yamashita K, Yoshino T, Rosol TJ. 1997. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 on cryopreserved bovine mammary epithelial cells in vitro. *J Vet Med Sci* 59(7):503-507.
- Okunishi K, Dohi M, Nakagome K, Tanaka R, Yamamoto K. 2004. A novel role of cysteinyl leukotrienes to promote dendritic cell activation in the antigen-induced immune responses in the lung. *J Immunol* 173(10):6393-6402.
- Opdebeeck JP, Frost AJ, O'Boyle D. 1988. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. *Vet Microbiol* 16(1):77-86.
- Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcon JJ, Cajero-Juarez M, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE, Bravo-Patino A, Baizabal-Aguirre VM. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect* 54(4):399-409.
- Paape M, Mehrzaad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C. 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7(2):109-121.

- Pareek R, Wellnitz O, Van Dorp R, Burton J, Kerr D. 2005. Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells. *J Appl Genet* 46(2):171-177.
- Petzl W. 2005. Untersuchungen zu frühen Erreger-Wirts-Interaktionen bei der Mastitis des Rindes. Hannover, Tierärztl Hochsch, AG Immunol, Diss.
- Petzl W, Zerbe H, Gunther J, Yang W, Seyfert HM, Nurnberg G, Schuberth HJ. 2008. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet Res* 39(2):18.
- Polen T. 2003. Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli*. Forschungszentrum Jülich.
- Poli V. 1998. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* 273(45):29279-29282.
- Prgomet C, Sarikaya H, Bruckmaier RM, Pfaffl MW. 2005. Short-term effects on pro-inflammatory cytokine, lactoferrin and CD14 mRNA expression levels in bovine immunoseparated milk and blood cells treated by LPS. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 52(7):317-324.
- Pyorala S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res* 34(5):565-578.
- Radostits O, Gay C, Blood D, Hinchcliff K. 2000. *Veterinary Medicine*, Elsevier Health Sciences.
- Rajala-Schultz PJ, Grohn YT. 1999. Culling of dairy cows. Part III. Effects of diseases, pregnancy status and milk yield on culling in Finnish Ayrshire cows. *Prev Vet Med* 41(4):295-309.
- Reichmuth J. 1975. Somatic cell counting-interpretation of results. IDF 85.
- Riollet C, Rainard P, Poutrel B. 2000. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin Diagn Lab Immunol* 7(2):161-167.
- Rodenburg J. 1990. Mastitis prevention, Environmental control: Ontario. Ministry of Agriculture and Food Fact-sheet AGDEX:410-662.
- Roosen S, Exner K, Paul S, Schroder JM, Kalm E, Looft C. 2004. Bovine beta-defensins: identification and characterization of novel bovine beta-defensin genes and their expression in mammary gland tissue. *Mamm Genome* 15(10):834-842.
- Rudolph MC, McManaman JL, Phang T, Russell T, Kominsky DJ, Serkova NJ, Stein T, Anderson SM, Neville MC. 2007. Metabolic regulation in the lactating mammary gland: a lipid synthesizing machine. *Physiol Genomics* 28(3):323-336.
- Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. 2003. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 170(6):3233-3242.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270(5235):467-470.
- Schukken YH, Leslie KE, Barnum DA, Mallard BA, Lumsden JH, Dick PC, Vessie GH, Kehrli ME. 1999. Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. *J Dairy Sci* 82(11):2393-2401.
- Schukken YH, Van de Geer D, Grommers FJ, Smit JA, Brand A. 1989. Intramammary infections and risk factors for clinical mastitis in herds with low somatic cell counts in bulk milk. *Vet Rec* 125(15):393-396.
- Schulz J. 1994. Erkrankungen der Milchdrüse des Rindes, Euter- und Gesäugekrankheiten. Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart.

- Schulze A, Downward J. 2001. Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nat Cell Biol* 3(8):E190-195.
- Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249(4975):1429-1431.
- Schuurs TA, Gerbens F, van der Hoeven JA, Ottens PJ, Kooi KA, Leuvenink HG, Hofstra RM, Ploeg RJ. 2004. Distinct transcriptional changes in donor kidneys upon brain death induction in rats: insights in the processes of brain death. *Am J Transplant* 4(12):1972-1981.
- Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res* 34(5):475-491.
- Seffner W, Bergmann A. 1994. Staphylokokken-Infektion, Euter- und Gesäugekrankheiten. Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart:349-359.
- Shah NP. 2000. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Br J Nutr* 84 Suppl 1:S3-10.
- Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, Collins PJ, de Longueville F, Kawasaki ES, Lee KY, Luo Y, Sun YA, Willey JC, Setterquist RA, Fischer GM, Tong W, Dragan YP, Dix DJ, Frueh FW, Goodsaid FM, Herman D, Jensen RV, Johnson CD, Lobenhofer EK, Puri RK, Schrf U, Thierry-Mieg J, Wang C, Wilson M, Wolber PK, Zhang L, Amur S, Bao W, Barbacioru CC, Lucas AB, Bertholet V, Boysen C, Bromley B, Brown D, Brunner A, Canales R, Cao XM, Cebula TA, Chen JJ, Cheng J, Chu TM, Chudin E, Corson J, Corton JC, Croner LJ, Davies C, Davison TS, Delenstarr G, Deng X, Dorris D, Eklund AC, Fan XH, Fang H, Fulmer-Smentek S, Fuscoe JC, Gallagher K, Ge W, Guo L, Guo X, Hager J, Haje PK, Han J, Han T, Harbottle HC, Harris SC, Hatchwell E, Hauser CA, Hester S, Hong H, Hurban P, Jackson SA, Ji H, Knight CR, Kuo WP, LeClerc JE, Levy S, Li QZ, Liu C, Liu Y, Lombardi MJ, Ma Y, Magnuson SR, Maqsoodi B, McDaniel T, Mei N, Myklebost O, Ning B, Novoradovskaya N, Orr MS, Osborn TW, Papallo A, Patterson TA, Perkins RG, Peters EH, Peterson R, Philips KL, Pine PS, Pusztai L, Qian F, Ren H, Rosen M, Rosenzweig BA, Samaha RR, Schena M, Schroth GP, Shchegrova S, Smith DD, Staedtler F, Su Z, Sun H, Szallasi Z, Tezak Z, Thierry-Mieg D, Thompson KL, Tikhonova I, Turpaz Y, Vallanat B, Van C, Walker SJ, Wang SJ, Wang Y, Wolfinger R, Wong A, Wu J, Xiao C, Xie Q, Xu J, Yang W, Zhang L, Zhong S, Zong Y, Slikker W, Jr. 2006. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 24(9):1151-1161.
- Shuster DE, Lee EK, Kehrli ME, Jr. 1996. Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. *Am J Vet Res* 57(11):1569-1575.
- Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. 1985. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J Dairy Sci* 68(6):1531-1553.
- Smyth GK. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3:Article3.
- Smyth GK, Michaud J, Scott HS. 2005. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21(9):2067-2075.
- Sordillo LM, Peel JE. 1992. Effect of interferon-gamma on the production of tumor necrosis factor during acute *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci* 75(8):2119-2125.
- Stampa F, Brunotte-Schütte G, Kalchreuter S. 2006. Handbuch Mastitis. Kamlage Verlag.
- Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P, Sim RB. 1992. The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1 beta loci. *Genomics* 13(3):654-657.
- Stern DF. 2003. ErbBs in mammary development. *Exp Cell Res* 284(1):89-98.

- Sternlicht MD. 2006. Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res* 8(1):201.
- Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, Donaldson L, Broadway M, Tellam R. 2005. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine* 31(1):72-86.
- Suriyasathaporn W, Schukken YH, Nielen M, Brand A. 2000. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *J Dairy Sci* 83(6):1248-1255.
- Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Nagai R. 2005. Vascular implications of the Kruppel-like family of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(6):1135-1141.
- Swanson KM, Stelwagen K, Dobson J, Henderson HV, Davis SR, Farr VC, Singh K. 2009. Transcriptome profiling of *Streptococcus uberis*-induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model. *J Dairy Sci* 92(1):117-129.
- Takeda K, Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17(1):1-14.
- Tenhagen BA, Koster G, Wallmann J, Heuwieser W. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci* 89(7):2542-2551.
- Thijs LG, Groeneveld AB, Hack CE. 1996. Multiple organ failure in septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol* 216:209-237.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9):5116-5121.
- Tyler JW, Cullor JS, Erskine RJ, Smith WL, Dellinger J, McClure K. 1992. Milk antimicrobial drug residue assay results in cattle with experimental, endotoxin-induced mastitis. *J Am Vet Med Assoc* 201(9):1378-1384.
- van Hooijdonk AC, Kussendrager KD, Steijns JM. 2000. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *Br J Nutr* 84 Suppl 1:S127-134.
- Van Oostveldt K, Tomita GM, Paape MJ, Capuco AV, Burvenich C. 2002. Apoptosis of bovine neutrophils during mastitis experimentally induced with *Escherichia coli* or endotoxin. *Am J Vet Res* 63(3):448-453.
- Van Werfen T. 1999. The role of leukocytes in bovine *Escherichia coli* mastitis, Diss. Utrecht University, Department of Farm Animal Health.
- Van Werven T, Noordhuizen-Stassen EN, Daemen AJ, Schukken YH, Brand A, Burvenich C. 1997. Preinfection in vitro chemotaxis, phagocytosis, oxidative burst, and expression of CD11/CD18 receptors and their predictive capacity on the outcome of mastitis induced in dairy cows with *Escherichia coli*. *J Dairy Sci* 80(1):67-74.
- Vandeputte-Van Messom G, Burvenich C, Roets E, Massart-Leen AM, Heyneman R, Kremer WD, Brand A. 1993. Classification of newly calved cows into moderate and severe responders to experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Res* 60(1):19-29.
- Vangroenweghe F, Duchateau L, Burvenich C. 2004a. Moderate inflammatory reaction during experimental *Escherichia coli* mastitis in primiparous cows. *J Dairy Sci* 87(4):886-895.
- Vangroenweghe F, Rainard P, Paape M, Duchateau L, Burvenich C. 2004b. Increase of *Escherichia coli* inoculum doses induces faster innate immune response in primiparous cows. *J Dairy Sci* 87(12):4132-4144.
- Walsh S, Buckley F, Berry DP, Rath M, Pierce K, Byrne N, Dillon P. 2007. Effects of breed, feeding system, and parity on udder health and milking characteristics. *J Dairy Sci* 90(12):5767-5779.
- Weinrauch Y, Zychlinsky A. 1999. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 53:155-187.

- Wellnitz O, Kerr DE. 2004. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. *Vet Immunol Immunopathol* 101(3-4):191-202.
- Welty FK, Smith KL, Schanbacher FL. 1976. Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 59(2):224-231.
- Wong PM, Chugn SW, Sultzer BM. 2000. Genes, receptors, signals and responses to lipopolysaccharide endotoxin. *Scand J Immunol* 51(2):123-127.
- Xu Z, Ford GD, Croslan DR, Jiang J, Gates A, Allen R, Ford BD. 2005. Neuroprotection by neuregulin-1 following focal stroke is associated with the attenuation of ischemia-induced pro-inflammatory and stress gene expression. *Neurobiol Dis* 19(3):461-470.
- Xu Z, Jiang J, Ford G, Ford BD. 2004. Neuregulin-1 is neuroprotective and attenuates inflammatory responses induced by ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun* 322(2):440-446.
- Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, Oppenheim JJ. 2003. Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* 74(3):448-455.
- Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Gunther J, Draing C, von Aulock S, Schuberth HJ, Seyfert HM. 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol* 45(5):1385-1397.
- Yauk CL, Berndt ML. 2007. Review of the literature examining the correlation among DNA microarray technologies. *Environ Mol Mutagen* 48(5):380-394.
- Zheng J, Watson AD, Kerr DE. 2006. Genome-wide expression analysis of lipopolysaccharide-induced mastitis in a mouse model. *Infect Immun* 74(3):1907-1915.
- Ziv G. 1992. Treatment of peracute and acute mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 8(1):1-15.
- Zucht HD, Raida M, Adermann K, Magert HJ, Forssmann WG. 1995. Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett* 372(2-3):185-188.

13 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des DFG-geförderten Forschungsvorhabens FOR585 „Pathogenspezifische Abwehrmechanismen in der Milchdrüse des Rindes“ erstellt.

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Eckhard Wolf für die mir gegebene Möglichkeit, am Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Universität München zu promovieren und seine Unterstützung bei der Durchführung meiner Doktorarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Helmut Blum für die Inspiration und Bereitstellung des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme im Laboratorium für funktionale Genomanalysen des Genzentrums München und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen. Durch seinen Ideenreichtum, die immerwährende und oft genutzte Diskussionsbereitschaft und seine motivierenden Worte hat er maßgeblich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen. Auch bei ihm möchte ich mich für die kritische und konstruktive Durchsicht des Manuskripts und viele hilfreiche Anregungen bedanken.

Bei Frau Dr. med. vet. Susanne Thieme und Herrn Dr. rer. nat. Stefan Krebs bedanke ich mich recht herzlich für ihre Betreuung während der Promotion, für ihr allzeit bereites Ohr und Verständnis für meine Belange und für wertvolle Korrekturvorschläge beim Verfassen der Doktorarbeit.

Ich danke meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. med. vet. Holm Zerbe, Dr. med. vet. Wolfram Petzl und Daniel Mehne von der Klinik für Wiederkäuer der Tierärztlichen Fakultät München für die ausgezeichnete Vorbereitung der Versuchstiere, sowie Priv. Doz. Dr. med. vet. Angela Hafner vom Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim für ihr Engagement bei der Schlachtung der Versuchstiere.

Sebastian Waszak danke ich für sein großes Interesse und die hilfreiche Unterstützung bezüglich der statistischen Auswertung der Daten.

Vielen Dank auch an Dr. rer. nat. Stefan Bauersachs für die Hilfsbereitschaft bei vielseitigen wissenschaftlichen und technischen Fragestellungen.

DANKSAGUNG

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Blum, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dabei möchte ich mich insbesondere bei Jenni Schumacher, Susanne Klose und Andrea Klanner für ihr Engagement bei der praktischen Durchführung der Arbeit im Labor und die freundliche, angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Auch danke ich meinen Eltern dafür, dass sie es mir ermöglicht haben, meinen Weg zu gehen und damit den Grundstein für diese Arbeit und vieles mehr gelegt haben.

Abschließend möchte ich mich für den Rückhalt von Christian Schachner bedanken, der nie an mir oder meinem Erfolg zweifelte. Ich danke dir für die liebevolle Begleitung meines Lebensweges und die unermüdliche Unterstützung in schlechten Zeiten.