Endothelzellproliferation und die Identifizierung pro-angiogener Gene durch ein neuartiges Hochdurchsatz-Screen-System

Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

eingereicht im November 2005

von
Stefan Heß

angefertigt bei der Xantos Biomedicine AG
bei
Prof. Dr. Peter Buckel

Teile dieser Arbeit wurden von der Xantos Biomedicine AG zum Patent angemeldet:

Gille, Hendrik; Gawin, Beate; Schäfer, Rolf; **Hess, Stefan**; Korherr, Christian; Boche, Irene; Walter, Theresia; Gnirke, Andrea
„A new angiogenic factor and its inhibitors“
WO-2004111088 Xantos Biomedicine AG (23-Dec-04)

Gille, Hendrik; Gawin, Beate; Schäfer, Rolf; **Hess, Stefan**; Korherr, Christian
„Angiogenic factor and its medical use“
WO-200411105 Xantos Biomedicine AG (23-Dec-04)

Diese Arbeit wurde vom November 2001 bis November 2005 angefertigt.

Erstgutachter	Prof. Dr. Peter Buckel
Zweitgutachter	Prof. Dr. Elisabeth Weiss
Drittgutachter	Prof. Dr. Heinrich Leonhardt
Viertgutacher	Dr. Günther Woehlke
Tag der Abgabe	04.11.2005
Tag der mündlichen Prüfung	15.12.2005

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst herzlich bei Herrn Prof. Dr. Peter Buckel für die Betreuung und Unterstützung der vorliegenden Arbeit bei der Xantos Biomedicine AG bedanken.

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiss bin ich dankbar für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Für die Aufnahme in die Gruppe „Functional Analysis II“, den freundschaftlichen Umgang und die geistige Grundsteinlegung dieses Projektes, möchte ich Dr. Hendrik Gille danken. Mein Dank geht überdies an alle Mitglieder dieser Gruppe, die mir oftmals mit Rat und Tat zur Seite standen. Dazu zählen Dr. Andrea Gnirke, Angelika Waldschmidt, Theresia Walter und Dr. Matthias Klein. Mein besonderer Dank gilt dabei Matthias und Theresia. Matthias hat mir stets mit Tipps im Labor geholfen und hat mich zudem tatkräftig bei den letzten Schritten meiner Arbeit mit verlässlichem und gewissenhaftem Korrekturlesen unterstützt. Theresia hat mir bei zahlreichen Versuchen geholfen.

Dr. Ulrich Brinkmann danke ich für die fachliche Betreuung, die stetige Diskussionsbereitschaft und seine Unterstützung in der Xantos Biomedicine AG.

Zudem danke ich allen Mitarbeitern der Xantos Biomedicine AG für die gute Zusammenarbeit und viele wertvolle Anregungen während der gesamten Arbeit. Ein spezieller Dank geht dabei an Dr. Irene Boche, Dr. Dieter Link, Dr. Christian Korherr, Dr. Sascha Röhrig und Dr. Rolf Schäfer für die wertvolle Unterstützung bei der Bearbeitung des „SEP-Projektes“.

Der Gruppe „Robotic und Screening“ bin ich für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung des Screen-Protokolls und dem Assay-Übertrag auf die Roboter-Plattform sowie für die einwandfreie Durchführung des Screens zu Dank verpflichtet.

Juliane Seyfarth danke ich für ihre Hilfe bei der Entfernung von Rechtschreibfehlern sowie bei der korrekten Verteilung der Kommas.

Für den Beistand während meiner gesamten Ausbildungszeit möchte ich mich außerordentlich bei meiner Familie bedanken. Ohne meine liebe Mutter Doris wäre ich gewiss nicht dort angekommen, wo ich heute bin. Auch meinem Vater möchte ich danken, ich bedaure sehr, dass er das Ende meiner Doktorarbeit nicht mehr erleben konnte. Vergessen will ich nicht meine Tante Emmi. Ich danke ihr für ihr fortwährendes Verständnis und ihre Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis i

Abkürzungen v

Zusammenfassung vii

1 Einleitung 1
1.1 Das Blutgefäßsystem 1
1.2 Angiogenese 1
1.2.1 Die Bedeutung der Endothelzellen 3
1.2.2 Ausbildung neuer Gefäße 4
1.2.3 Die Regulation der Angiogenese 5
1.2.3.1 Die wichtigsten Stimulatoren der Angiogenese 7
1.2.3.2 Die wichtigsten Inhibitoren der Angiogenese 10
1.2.4 Klinische Bedeutung der Angiogenese 10
1.2.4.1 Endothelzellen als therapeutisches Angriffziel 12
1.2.5 Spezielle Relevanz der Tumorangiogenese 13
1.2.5.1 Anti-Angiogenese-Therapie maligner Tumoren 15
1.2.5.2 Studien zu Angiogenese-Inhibitoren zur humanen Tumorbehandlung 15
1.3 Identifizierung neuer pro-angiogener Faktoren 20

2 Zielsetzung 22

3 Material 23
3.1 Chemikalien und andere Materialien 23
3.2 Transfektionsreagenzien 24
3.3 Kommerzielle Kits 24
3.4 Färbelösungen 24
3.5 Geräte 25
3.6 Kulturmedien und Platten 26
3.6.1 Medium für HEK 293- und HeLa-Zellen 26
3.6.2 Medium für HUVECs und HMVECs 26
3.6.3 Medium für NHDF 26
3.6.4 Sonstige Materialien für Zellkultur 26
3.7 Nukleinsäuren 27
3.7.1 PCR-Primer 27
3.7.2 Plasmide 27
3.7.3 cDNA-Kollektionen 28
3.8 Organismen 28
3.8.1 Bakterienstämme 28
3.8.2 Zellkulturlinien 28

3.9 Proteine und Peptide 28
3.9.1 Antikörper / Antiseren 28
3.9.2 Enzyme 29
3.9.3 Rekombinante Wachstumsfaktoren 29
3.9.4 Synthetische Peptide 29
3.10 Puffer und Lösungen 29

4 Methoden 31
4.1 Proteine 31
4.1.1 Anreicherung und Aufreinigung von Proteinen 31
4.1.1.1 Markierung von Proteinen mit einem V5-His-Fusionsprotein 31
4.1.1.2 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie Histidin-markierter Proteine 31
4.1.1.3 Abreicherung von V5-Fusionsprotein mittels Immunpräzipitation 32
4.1.1.4 Aufreinigung mit Anionenaustauschchromatographie (ÄKTA) 32
4.1.2 Dialyse 33
4.1.3 Analysemethoden 33
4.1.3.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 33
4.1.3.2 Westernblot-Analyse 34
4.1.3.3 Antikörperstrip von Membranen 35
4.1.3.4 hSEP-V5-Sandwich-ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) 35
4.1.3.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen 36
4.2 DNA 36
4.2.1 Analysemethoden 36
4.2.1.1 Agarosegelelektrophorese 36
4.2.1.2 Bestimmung der Konzentration 37
4.2.2 Klonierungstechniken 37
4.2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 37
4.2.2.2 Punktmutagenese mittels „Quik-Change Site Directed Mutagenesis Kit“ 38
4.2.2.3 Restriktion von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen 38
4.2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten (Rapid-Ligation-Kit, Roche) 38
4.2.2.5 Plasmidpräparation aus einer Mini-Kultur (NucleoSpin® Plasmid) 39
4.2.2.6 Plasmidpräparation aus einer Maxi-Kultur (Nucleobond AX) 39
4.2.2.7 Ethanol-Präzipitation von DNA 39
4.2.2.8 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten 39
4.3 Bakterien 40
4.3.1 Transformation von kompetenten Bakterienzellen 40
4.4 Zellkultur 40
4.4.1 Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen 40
4.4.2 Beschichtung der Zellkulturgefäße von HUVECs 41
4.4.3 Passagieren von Zellen 41
4.4.3.1 Passagieren von HEK 293-Zellen 41
4.4.3.2 Passagieren von HeLa-, MS1- und bEnd3-Zellen 42
4.4.3.3 Passagieren von primären Endothelzellen - HUVECs und HMVECs 42
4.4.3.4 Passagieren von primären Fibroblastenzellen - NHDF 42
4.4.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen 42
4.4.4.1 Transfektion von HEK 293-Zellen 42
4.4.4.2 Transfektion von HeLa-Zellen 43
4.4.4.3 Transfektion von MS1- und bEnd3-Zellen 43
4.4.4.4 Erzeugung von stabilen Reportergen-Zelllinien 43

4.4.4.5 Luziferase-Reportergenversuche ... *44*
4.4.4.6 Lokalisationsstudien von hSEP mit GFP-Fusionsprotein ... *45*
4.4.4.7 Fixierung von Zellen für Immunfluoreszenzfärbungen ... *45*
4.4.4.8 ER-Färbung mit ER-Tracker ... *46*
4.4.4.9 Hoechst-33342-Färbung von Zellkernen ... *46*
4.4.4.10 Golgi-Färbung mittels Anti-Golgin-97-Antikörper ... *46*
4.4.5 Gewinnung von zytosolischen Zelllysaten ... 46
4.4.6 Proliferationsversuch mit AlamarBlue ... 47
4.4.7 Migrationsversuch mit HUVECs ... 47
4.4.8 Mycoplasmen-Test von Zellkulturen ... 48
4.5 Die Roboter-Plattform der Xantos Biomedicine AG ... 49
4.5.1 Das Screening-System ... 49
4.5.1.1 Picken von Bakterienkolonien: High Efficiency Colony Picker (HECOP) ... 49
4.5.1.2 Präparation von cDNAs: High Efficiency DNA Isolation Station (HEDIS) ... 49
4.5.1.3 Transfektion von Zelllinien: High Efficiency Cell Transfection (HECTRA) ... 50
4.5.1.4 Auslesung der Versuchsergebnisse: High Efficiency Readout Station (HEROS) ... 51
4.6 Online Datenbanken und Programme ... 51

5 Ergebnisse ... 53
5.1 Etablierung eines Hochdurchsatz-Screen-Systems ... 53
5.1.1 Das Screen-Prinzip ... 53
5.2 Entwicklung des Screen-Protokolls ... 54
5.2.1 Auswahl der cDNA-Expressions-Zelllinie ... 55
5.2.2 Erzeugung konditionierter HEK 293-Überstände ... 56
5.2.3 Auswahl der Tester-Zellen ... 56
5.2.4 Verwendung endothelialer Zelllinien im Proliferationsversuch ... 57
5.2.5 Testung endothelialer Zelllinien im transienten Reportergen-Assay ... 58
5.2.6 Erzeugung und Analyse stabiler SRE-Luziferase-Reportergen-Zelllinien ... 58
5.2.7 Etablierung eines Proliferationsversuchs mit primären Endothelzellen ... 60
5.2.8 Evaluierung des Screen-Protokolls mit HUVECs als Tester-Zellen und HEK 293-Zellen als Expressions-Zelllinie ... 61
5.2.8.1 Proteinproduktion der HEK 293-Zellen in DMEM- und HUVEC-Medium 62
5.2.8.2 Zellaussaat von HUVECs und HEK 293-Zellen ... 63
5.2.8.3 Positionseffekte bei 96 Well-Platten ... 63
5.2.9 Definition eines Hits ... 64
5.2.10 Statistische Signifikanz - Wiederfindungsrate und falsch Positive/Negative ... 64
5.2.11 Transfer des Proliferationsversuchs auf die Roboter-Plattform ... 66
5.2.11.1 Testung verschiedener Inkubationszeiten der HUVECs ... 66
5.2.11.2 Anpassung der Antibiotika- und Mykotikakonzentration in den Medien ... 67
5.2.11.3 Zeitliches Ablaufschema und Plattenanzahl eines „Screen-Laufes“ ... 68
5.3 Der Screen ... 69
5.3.1 Anzahl und Qualität der verwendeten cDNA-Klone ... 69
5.3.2 Screen nach sezernierten endothelialen Wachstumsfaktoren ... 70
5.4 Charakterisierung von hSEP als Stimulator endothelialer Proliferation ... 73
5.4.1 Bioinformatische Analyse von hSEP ... 73
5.4.1.1 Homologe Proteine von hSEP ... 73
5.4.1.2 Analyse der Primärsequenz von hSEP ... 74

5.4.1.3 Analyse der Sekundärstruktur von hSEP ... 74
5.4.1.4 Signalsequenzen für eine posttranslative Modifikation ... 74
5.4.1.5 Vorhersage potentieller Transmembrandomänen und Signalpeptide ... 75
5.4.1.6 Hypothese der hSEP-Struktur ... 75
5.4.1.7 Genomische Organisation des hSEP-Gens ... 76
5.4.1.8 Expressionsstudien von hSEP ... 77
5.4.2 Biologische Aktivität von hSEP ... 78
5.4.2.1 Aktivität von SEP in Überständen verschiedener Expressions-Zelllinien ... 79
5.4.2.2 Aktivität von SEP auf verschiedenen Endothelzellen ... 79
5.4.3 Erzeugung und Expression verschiedener SEP-Proteinfragmente ... 80
5.4.3.1 SEP als potentiell prozessierter, löslicher Faktor ... 80
5.4.3.2 Lokalisierung von SEP1-510 und SEP ... 84
5.4.3.3 Abreicherung von SEP-Protein aus aktiven Überständen ... 86
5.4.4 Hemmung der stimulierenden Wirkung von SEP-Überständen ... 87
5.4.4.1 Generierung und Testung SEP-spezifischer Antikörper ... 88
5.4.4.2 Hemmung mit synthetischen SEP-Peptiden ... 91
5.4.5 Aufreinigung von SEP-Protein aus HEK 293-, E. coli- und Insekten-Zellen ... 93
5.4.5.1 Anionen-Austauschchromatographie von SEP aus HEK 293-Zellen ... 93
5.4.5.2 Rekombinantes SEP1-510-Protein aus E. coli-Inclusionbodies ... 96
5.4.5.3 Rekombinantes SEP1-510 aus Überständen infizierter Insekten-Zellen ... 97
5.4.6 Funktionsanalyse von SEP durch Migrationsversuch ... 98

6 Diskussion ... 99
6.1 Das Screen-System ... 99
6.1.1 Etablierung eines Proliferationsversuchs zum Nachweis von Angiogenese ... 99
6.1.2 Technische Durchführung des Screens ... 102
6.2 Identifizierung verschiedener Hits ... 105
6.2.1 Identifizierung zytosolischer Proteine als Hit ... 105
6.3 Charakterisierung von hSEP ... 106
6.3.1 Lokalisierung von SEP ... 108
6.3.2 Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen von SEP ... 109
6.3.3 Spezifität der Aktivität von SEP ... 113
6.3.4 Produktion von rekombinantem SEP in verschiedenen Systemen ... 113
6.3.5 Hemmung der spezifischen Aktivität von SEP ... 115
6.3.6 Alternative Wirkmechanismen der SEP vermittelten Aktivität ... 117
6.3.6.1 Induktion verschiedener pro-angiogener sezernierter Faktoren ... 117
6.3.7 Physiologische Rolle von SEP ... 121
6.3.8 Aussichten für weitere Versuche ... 122

7 Literaturübersicht ... 124

Ehrenwörtliche Erklärung ... 136

Lebenslauf ... 137

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
aFGF (FGF1)	acid Fibroblast Growth Factor
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BBE	Bovine Brain Extract
bEnd3	mouse brain Endothelial cell line
bFGF (FGF2)	basic Fibroblast Growth Factor
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	copy DNA
CGAP	Cancer Genome Anatomy Project
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMV	Cytomegalievirus
COS-7	immortalisierte Nierenfibroblasten der grünen Meerkatze
DMEM	Dulbbecco`s modified Eagle Medium
EC	Endothelzellen
ECL	Enhanced chemofluorescence
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EST	Estimated Sequence tag
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FLPC	Fast Performance Liquid Chromatography
GFP	Green fluorescent protein
HEDIS	High-throughput plasmid DNA preparation
hEGF	human Epidermal Growth Factor
HEK	Human Embryonic Kidney
HIF	Hypoxia-inducible Factor
Hit	Positives Assay-Signal
HMVEC	Human Microvascular Endothelial Cell
HTS	High Throughput Screening
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
mAU	Milliextinktionen (Milli Absorption Units)
MGC	Mammalian Gene Collection
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-κB	Nuclear Factor κB
NHDF-Neo	Dermal Fibroblast-Neonatal

ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PO	Peroxidase
RANTES	Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted
RFE	Relative Fluoreszenz Einheit
RLE	Relative Lumineszenz Einheit
RNase	Ribonuklease
RT-q-PCR	Real time-quantitative-Polymerase chain reaction
SEP	**S**timulator of **E**ndothelial **P**roliferation
SF-21	Spodoptera frugiperda
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool
SRE	Serum Response Element
SRP	Signal Recognition Particle
SV40	Simian Virus 40
TAF	Tumor-Angiogenesis Factor
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TMB	3,3´,5,5´ Tetramethylbenzidine
TNF-α	Tumor Necrose Factor α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Well	Vertiefung einer 96 Lochplatte

Zusammenfassung

Das Blutgefäßsystem eines Organismus stellt eines der größten Organe des menschlichen Körpers dar. Den Grundbaustein der Gefäße bilden Endothelzellen, die durch eine einfache Zellschicht das gesamte System von innen auskleiden. Bei einer Vielzahl an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, wie beispielsweise dem weiblichen Menstruationszyklus, der Wundheilung, den Entzündungsreaktionen oder aber der Ischämie und der Tumorprogression, spielt das Endothel eine wesentliche Rolle. Die Aktivierung der Endothelzellen wird durch zahlreiche verschiedene Faktoren reguliert, die entweder im Blut zirkulieren, von benachbarten Zellen oder aber auch von Tumorzellen sezerniert werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Hochdurchsatz-Screen etabliert, bei dem sich Gene mit einem pro-angiogenen Effekt identifizieren lassen. Hierzu erfolgte die individuelle Transfektion und Expression von 34.596 verschiedenen cDNAs in HEK 293-Zellen. Zur Testung wurden deren konditionierte Medienüberstände auf primäre Endothelzellen (HUVECs) transferiert. Zwei bereits aus der Literatur bekannte pro-angiogene Faktoren, bFGF und VEGF, wurden zur Protokoll-Etablierung als Positivkontrollen eingesetzt.

Im Screen konnten insgesamt 13 cDNAs identifiziert werden, die einen pro-angiogenen Effekt zeigten. Unter ihnen fanden sich auch die zwei Positivkontrollen wieder, was einen direkten Beleg für die Funktionalität des Screens darstellt. Des Weiteren wurden vier bekannte und fünf unbekannte cDNAs identifiziert, bei denen bisher noch kein Zusammenhang mit Angiogenese gezeigt werden konnte. Die vier bekannten Gene kodieren für zytosolisch lokalisierte Proteine, deren Expression in verschiedene Säuger-Zellen zur Produktion und Sekretion pro-angiogener Faktoren führt.

Im Anschluss an den Screen wurde eines der unbekannten Gene (NM_020746) detaillierter charakterisiert. Dieses Gen kodiert für ein 56,6 kDa großes Protein, das aufgrund erster Funktionshinweise den Namen hSEP (**h**uman **S**timulator of **E**ndothelial **P**roliferation) erhielt. Die Expression von hSEP in HEK 293-, sowie in anderen Säuger-Zellen, generierte konditionierte Überstände, welche in Mangelmedium gehaltene Endothelzellen, nicht aber Fibroblasten zum Wachstum stimulieren. Mit Hilfe biochemischer Analysen wurde die Sekretion von hSEP nach der Expression in HEK 293-Zellen nachgewiesen. Besondere Bedeutung bei der Lokalisierung des Proteins kam hierbei einer bioinformatisch vorhergesagten C-terminalen Transmembrandomäne zu. Die Deletion dieser Domäne erzeugte ein deutlich effektiver sezerniertes Protein-Fragment (SEP1-510), führte allerdings gleichzeitig zu einem signifikanten Rückgang

der Wachstums-Stimulation bei HUVECs. Des Weiteren ging die für hSEP nachgewiesene Lokalisierung im Golgi und ER zu Gunsten einer diffusen intrazellulären Verteilung verloren.
Um den Wirkungsmechanismus von hSEP aufzuklären, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Expressionsanalysen von HEK 293-Zellen, die hSEP exprimierten, zeigten die Induktion verschiedener pro-angiogener Gene wie beispielsweise IL-8, RANTES und VEGF. Des Weiteren korrelierte die Anwesenheit von hSEP im Überstand nicht reproduzierbar mit der Stimulation von HUVECs. Außerdem gelang es nicht, aktives hSEP-Protein rekombinant zu erzeugen, welches für einen direkten Beweis seiner Funktionalität erforderlich gewesen wäre. Darüber hinaus wurden Hinweise auf eine Ko-Expression von hSEP mit VEGF unter hypoxischen Bedingungen sowie in verschiedenen soliden Tumoren gefunden. In welchen Zusammenhang die Expression dieser beiden Proteine steht, müssen weitere detaillierte Untersuchungen zeigen.
Insgesamt ist es denkbar, dass hierdurch neue mögliche therapeutische Ansätze für eine Inhibition bei der Tumorangiogenese eröffnet werden könnten.

1 Einleitung

1.1 Das Blutgefäßsystem

Das Blutgefäßsystem eines Organismus wurde lange Zeit lediglich als Transportweg für das Blut betrachtet. Mit einer Gesamtfläche von mehr als 1.000 m^2 wird es mittlerweile als eines der größten Organe des menschlichen Körpers angesehen (Griffioen and Molema, 2000). Auf verschiedene Weise übernimmt es bedeutende Aufgaben bei der Aufrechterhaltung der Gewebe- und Organfunktionen. Die Gefäße bilden ein geschlossenes elastisches Röhrensystem aus, dessen Gesamtlänge sich auf über 1.440 km beläuft. Zu den Aufgaben des Blutgefäßsystems zählen die Versorgung der Zellen, Gewebe und Organe mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie die Regulation des Wärme- und Wasserhaushaltes eines Organismus. Überdies werden anfallende Abfallprodukte des Zellstoffwechsels entsorgt und verschiedene Botenstoffe, wie Hormone oder Wachstumsfaktoren, sowie Zellen des Immunsystems transportiert. Damit sämtliche Funktionen einwandfrei vom Blutgefäßsystem übernommen werden können, besitzt dieses einen komplexen Aufbau, wobei zwischen Arterien, Kapillaren und Venen unterschieden wird. In den Arterien wird das nähr- und sauerstoffreiche Blut durch den Körper gepumpt, und durch die Venen gelangt das Blut wieder zum Herzen (Madri et al., 1988). Über die Kapillaren erfolgt der Austausch von Stoffen und Gasen mit den umgebenden Geweben. Auf diese Weise werden auch Abbaustoffe von den Kapillaren aufgenommen. Zur dauerhaften Funktionserfüllung müssen Blutgefäße ein hohes Maß an Flexibilität, gerichtete Durchlässigkeit sowie Regenerationsfähigkeit und einen möglichst geringen Verschleiß aufweisen. Diese Punkte werden allesamt durch die maßgeblich am Aufbau beteiligten Endothelzellen gewährleistet (Michiels, 2003).

1.2 Angiogenese

Der Begriff Angiogenese bezeichnet die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen (Ribatti et al., 2003a). Dieser Vorgang umfasst eine Reihe verschiedener und komplexer Abläufe. Grundlegende Schritte sind zunächst der lokale Abbau der Basalmembran durch verschiedene Metalloproteasen (Stetler-Stevenson, 1999). Überdies kommt es zur Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen (Munoz-Chapuli et al., 2004), bis schließlich aus Fibronektin, Kollagenen und anderen Komponenten eine neue Basalmembran gebildet wird. Die Angiogenese hat ihre fundamentale Bedeutung vor allem in der Embryonalentwicklung, in dessen Verlauf mesodermale hämatopoetische Stammzellen zu

Endothelzellen differenzieren. Auf diese Weise entsteht ein verzweigtes primär vaskuläres Netzwerk (Flamme et al., 1995). Diese Art der Gefäßbildung wird auch als Vaskulogenese bezeichnet (Risau, 1997). Verschiedene Untersuchungen und die Existenz endothelialer Vorläuferzellen (Angioblasten) im adulten Organismus belegen jedoch auch das Vorkommen einer postnatalen Vaskulogenese (Asahara et al., 1999). Die Ausdehnung des primären Gefäßsystems erfolgt durch Angiogenese. Dabei werden hauptsächlich durch Sprossung neue Gefäße aus bereits bestehenden gebildet (Risau, 1997). Ein weiterer Mechanismus der Gefäßneubildung ist die so genannte Intussuszeption. Dabei entsteht durch die Teilung eines Gefäßes ein weiteres (Patan, 2000). Diese Form der Angiogenese ist vor allem in der Lunge, dem Herzen und in der Chorioallantoismembran zu finden (van Groningen et al., 1991). Die grundlegende Bedeutung des Blutgefäßsystems liegt vor allem in der Sicherstellung einer ausreichenden Sauerstoff- und Nährstoffversorgung aller Gewebe und Organe. Nach der Embryonalentwicklung findet Angiogenese normalerweise nur noch auf wenige physiologische Situationen beschränkt statt. Beispiele sind der weibliche Menstruationszyklus (Modlich et al., 1996), die Plazentaentwicklung (Djonov et al., 2001) und die Milchdrüsenentwicklung während der Schwangerschaft (Matsumoto et al., 1992). Darüber hinaus ist die Angiogenese essentiell für regenerative Prozesse bei der Wundheilung (Hunt et al., 1984). Sämtliche physiologischen Vorgänge unterliegen einem strengen Kontrollmechanismus und werden anschließend wieder vollständig inhibiert (Chavakis and Dimmeler, 2002). Eine fehlregulierte Angiogenese kann hingegen zu einem Krankheitsbild führen, das sowohl durch eine verminderte, als auch eine übermäßig stattfindende Blutgefäßbildung hervorgerufen werden kann. Im Rahmen einer verminderten oder fehlenden Angiogenese tritt eine mangelnde Nähr- und Sauerstoffversorgung der betroffenen Gewebe ein, wodurch Zellen geschädigt werden oder gar absterben. Ein bekanntes Beispiel hierfür sind die Herzmuskelzellen, deren Schädigung durch eine mangelnde Angiogenese einer der Gründe für einen Herzinfarkt sein kann. Des Weiteren kann eine reduzierte Angiogenese die Wundheilungsprozesse beeinträchtigen (Hunt et al., 1984). Im Gegensatz dazu führt eine aberrant gesteigerte Angiogenese zu Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis (Paleolog, 2002), der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) und der diabetischen Retinopathie (Kakizawa et al., 2004). Medizinisch sicherlich am bedeutendsten ist eine pathologische Angiogenese bei der Tumorprogression und der Metastasenbildung (Folkman, 1974). Diese Form der Angiogenese wird dann auch als Neovaskularisierung bzw. Tumorangiogenese bezeichnet. Die Neovaskularisierung eines Tumors ist eine essentielle Vorraussetzung dafür, dass er über einen Größendurchmesser von 2 - 3 mm hinauswachsen kann (Folkman, 1995). Die lokale Ausdehnung des kapillaren Netzwerkes sichert dem Tumor

nicht nur die Nähr- und Sauerstoffversorgung, sondern erschließt den Tumorzellen auch den Zugang zum Blutkreislaufsystem. Letzteres bildet die Grundlage dafür, dass sich Tumorzellen im Organismus über die Blutbahn verbreiten und dadurch in anderen Geweben oder Organen zur Metastasenbildung führen können (Weidner et al., 1991).

1.2.1 Die Bedeutung der Endothelzellen

Bei der Bildung neuer Blutgefäße kommt den Endothelzellen sowohl während der embryonalen Vaskulogenese als auch bei der postnatalen Angiogenese eine wesentliche Bedeutung zu. Diese spezialisierten Zellen kleiden als einschichtige Zelllage luminal das gesamte Blutgefäßsystem von innen aus und stellen somit den Grundbaustein der Gefäße dar (Hormia and Virtanen, 1986). Kapillare werden ausschließlich aus Endothelzellen aufgebaut und sind von einer Basalmembran (BM) umgeben, welcher von außen meist noch die Gefäßwände stützende Bindegewebszellen (Perizyten) aufsitzen. Arterien und Venen hingegen besitzen zwei zusätzliche Schichten, die aus glatten Muskelzellen, elastischen und kollagenen Fasern und aus einer Bindegewebsschicht, die ins umgebende Gewebe eingebettet ist, aufgebaut sind. Innen sind die Blutgefäße größtenteils von einem lückenlosen Endothel ausgekleidet. Man spricht dann von einem so genannten Schrankenendothel. Lückenlose vaskuläre Endothelien bilden eine Permeabilitätsbarriere zwischen Blut und umliegenden Geweben aus und regulieren den Stoff- und Gasaustausch zwischen diesen Kompartimenten (Fishman, 1982). Solche Endothelien sind vor allem in Gefäßen zu finden, in denen ein geringer oder kontrollierter Stoffaustausch stattfindet. Ein bekanntes Beispiel ist die Blut-Hirn-Schranke im Gehirn, an deren Ausbildung Endothelzellen maßgeblich beteiligt sind (Goldstein et al., 1986). Umgekehrt sind in Geweben, die besonders hohe Stoffaustauschraten aufweisen, lückenhafte Endothelien vorherrschend. Die Lücken sind entweder zwischen einzelnen Endothelzellen oder die Basalmembran ist diskontinuierlich oder fehlt vollständig. Derartige Gefäße ermöglichen den Austausch größerer Partikel und Zellen und sind hauptsächlich in der Leber, Milz, in Teilen der Niere und im Darm zu finden (Palade et al., 1979). Neben den Funktionen bei der Strukturbildung und dem Stoffaustausch, erfüllen Endothelzellen auch noch eine Reihe an synthetischen Aufgaben. So werden von ihnen z.B. verschiedene Proteine produziert, die zum Aufbau der Basalmembran erforderlich sind. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Kollagen IV, Laminin und das Heparansulfat-Proteoglykan Perlecan (Tilling et al., 2002). Ein weiteres Charakteristikum der Endothelzellen ist der Besitz spezieller Vesikeln, die auch als Weibel-Palade-Körperchen bezeichnet werden. Diese Organellen dienen der Speicherung einer Reihe von Proteinen, die in der frühen Phase der Blutgerinnung (Koagulation) von den

Endothelzellen sezerniert werden. Hierzu zählen der von-Willebrand-Faktor (vWF), Endothelin, P-Selectin und IL-8 (Romani et al., 2004). Der von-Willebrand-Faktor bewirkt beispielsweise die Adhäsion von Blutplättchen (Journet et al., 1993) und P-Selektin ist verantwortlich für die Interaktionen mit Leukozyten an den betroffenen Gefäßwänden (Wagner, 1993). Überdies produzieren Endothelzellen verschiedene Proteine, die regulierend auf das blutgerinnselauflösende System (Fibrinolyse) (Cines et al., 1998), den Abbau von Blutfetten (Jagla and Schrezenmeir, 2001) sowie den Gefäßtonus wirken (Griendling and Alexander, 1996). Insgesamt weist das Endothel eine sehr heterogene Population von Endothelzellen auf. Unterschiede zeigen sich u.a. bei verschiedenen Spezies und unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Überdies können Differenzen auch durch die Organ- oder Gewebeherkunft begründet sein (Aird et al., 1997), oder treten zwischen Endothelzellen aus großen und kleinen Gefäßen auf (Kumar et al., 1987). Diese Heterogenität tritt häufig bedingt durch Einflüsse umliegender Zellen und Gewebe auf, wobei sowohl Zell-Zell-Kontakte als auch lösliche Faktoren eine Rolle spielen (Ribatti et al., 2002). Alles in allem stellen Endothelzellen eine dynamische und heterogene Zellpopulation dar, die eine Vielzahl immunologischer, metabolischer und sekretorischer Aufgaben erfüllen (Cines et al., 1998). Diese Zellen bleiben während ihrer ganzen Lebenszeit teilungs- und wanderungsfähig.

1.2.2 Ausbildung neuer Gefäße

Die Angiogenese ist ein komplexer biologischer Prozess, der die genaue Koordination vieler unterschiedlicher Schritte erfordert. Dabei ist jeder Vorgang durch das exakte Zusammenspiel einer Reihe von pro- und anti-angiogener Faktoren strikt reguliert. In der folgenden Abbildung sind die wesentlichen Abläufe mit den dazugehörigen Faktoren aufgezeigt.

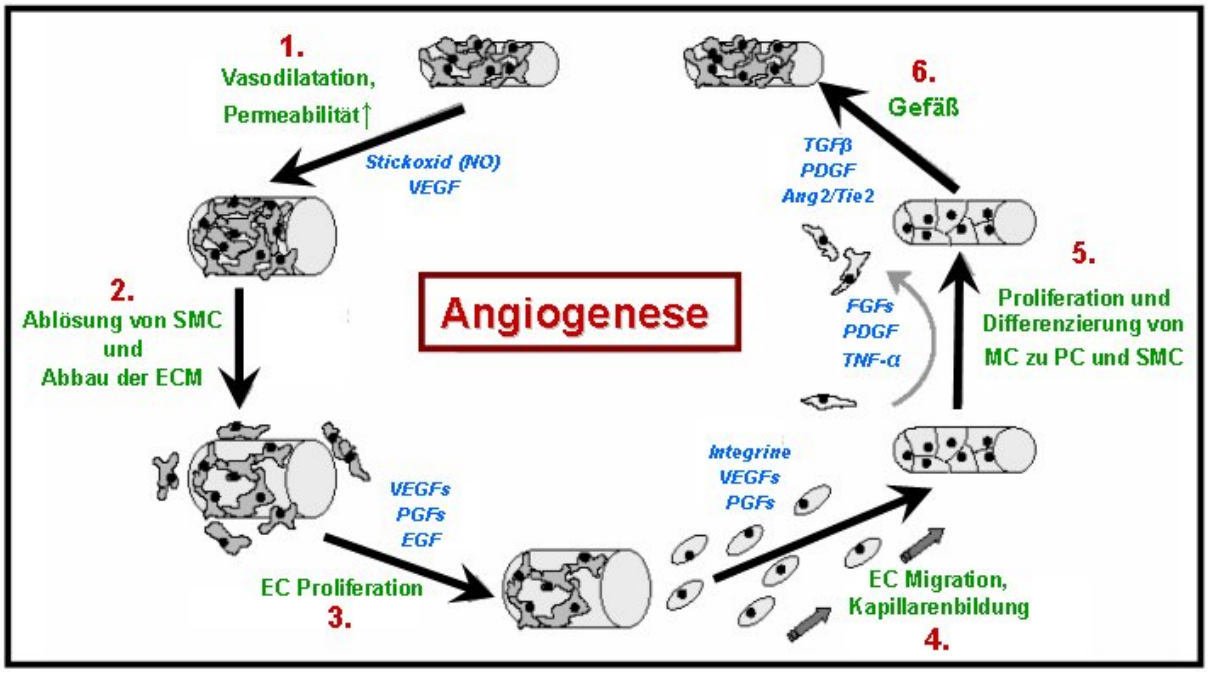


Abb. 1.1: Die Prozesse bei der Angiogenese
(1.) Die erste Phase der Angiogenese ist durch die Erweiterung der Gefäße und eine erhöhte Gefäßpermeabilität mit der Ausscheidung von hochmolekularen Plasmaproteinen wie z.B. Fibrinogen gekennzeichnet. (2.) Dann lösen sich die vaskulären glatten Muskelzellen (SMC) ab, die Gefäßwände werden instabil und die extrazelluläre Matrix (ECM) wird abgebaut. (3.) Proliferierende Endothelzellen (EC) können daraufhin durch chemotaktische Bewegung in die untervaskularisierten Gebiete einwandern und mit der Bildung neuer Kapillare beginnen (4.). Die Endothelzellen sammeln sich nun und bilden fertige, röhrenförmige Strukturen aus. (5.) Abschließend erfolgt die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Zellen (MC) zu neuen glatten Muskelzellen (SMC) oder Perizyten (PC), die die Endothelzellen umschließen und die Blutgefäßneubildung abschließen (6.). Die an den jeweiligen Schritten beteiligten Faktoren oder Stoffe sind in kursiver Schriftweise angegeben. Abkürzungen sind in Tab. 1.1 angegeben. Das Schema wurde von J.W. Distler übernommen und wird in einer modifizierten Form dargestellt (Distler et al., 2003).

1.2.3 Die Regulation der Angiogenese

Der Vorgang der Angiogenese findet im adulten Organismus nur noch beschränkt auf wenige physiologische Situationen statt und spielt bei der Entstehung zahlreicher Erkrankungen eine zentrale Rolle. Dem Ruhezustand des vaskulären Endothels liegt ein ausgewogenes Gleichgewicht an pro- und anti-angiogenen Faktoren zugrunde (Iruela-Arispe and Dvorak, 1997). Dabei spielen neben direkt angiogen wirkenden Proteinen, auch solche der extrazellulären Matrix, Adhäsionsproteine und deren Rezeptoren sowie proteolytische Enzyme eine Rolle. Im Ruhezustand sind entweder anti-angiogene Faktoren vorherrschend oder pro-angiogene kommen in zu geringen Mengen vor (Distler et al., 2003). Eine Verschiebung der Balance zugunsten pro-angiogener Faktoren führt zur Aktivierung des Endothels. Unter pro-angiogenen Faktoren versteht man Proteine, die während der Angiogenese präsent und an den Abläufen beteiligt sind. Darüber hinaus bewirkt eine Inhibierung dieser Faktoren oder der entsprechenden Rezeptoren eine Hemmung der Angiogenese (Folkman and Ingber, 1992). Im

Gegensatz dazu bezeichnen anti-angiogene Faktoren Proteine oder Substanzen, die die Aktivierung der Endothelzellen direkt inhibieren oder zur Hemmung oder Neutralisation pro-angiogener Faktoren führen. In den letzten Jahren wurden zahlreiche anti- als auch pro-angiogene Faktoren identifiziert (Tab. 1.1 und Tab. 1.2) (Distler et al., 2003). Zur Aufklärung der Wirkungsmechanismen wurden mittlerweile eine Reihe an *in vitro*- und *in vivo*-Modellsystemen etabliert. (Auerbach et al., 2003). Neben verschiedenen Mikroskopierverfahren stellen Proliferations-, Migrations- und der Tube Formations-Assays hilfreiche Werkzeuge bei der Testung neuer angiogener Faktoren dar (Auerbach et al., 2000).

Tab. 1.1: Zusammenfassung bekannter pro-angiogener Faktoren
Tabelle wurde nach Angaben von J.W. Distler modifiziert (Distler et al., 2003).

Pro-angiogene Faktoren	
Faktor	**Biologische Funktion**
VEGF-Familie	Permeabilität ↑, Plasminogen-Aktivatoren ↑, EC Apoptose ↓, interstitielle Kollagenasen ↑, EC Proliferation und Migration, pro-angiogen *in vivo*
FGF-Familie	Plasminogen-Aktivatoren ↑, $\alpha_v\beta_3$ Integrin und andere Adhäsionsmoleküle ↑, EC Proliferation und Migration, pro-angiogen *in vivo*
Angiopoietin 1	EC Sprossung, Gefäßstabilisierung
Angiopoietin 2	EC Proliferation und Migration, EC Sprossung, nur in Gegenwart von VEGF
PDGF-BB	Sehnenbildung *in vitro*, Proliferation von SMCs und PCs, Gefäßstabilisierung
TGF-β	Röhrenbildung *in vitro* (geringe Dosis), Gefäßstabilisierung, pro-angiogen *in vivo* in inflammatorischer Umgebung
TNF-α	EC Migration, Röhrenbildung *in vitro*, pro-angiogen *in vivo*
EGF	EC Proliferation, pro-angiogen *in vivo*
CSFs	EC Proliferation und Migration
Angiogenin	EC Proliferation
Angiotropin	EC Migration, Röhrenbildung, pro-angiogen *in vivo*
CXC-Chemokine	EC Proliferation und Migration, pro-angiogen *in vivo*
IGF-1	EC Proliferation, Apoptose ↓, Induktion von VEGF, Plasminogen-Aktivatoren ↑
HGF	Migration und Proliferation von EC und SMC, Angiogenese *in vivo*
PECAM-1	EC Aggregation, Röhrenbildung, EC Migration, Gefäßstabilisierung, essentiell für FGF induzierte Angiogenese
Integrine	EC Anheftung, EC Migration, Apoptose ↓, essentiell für FGF induzierte Angiogenese
VE-Cadherin	Gefäßstabilisierung, EC Apoptose ↓, essentiell für Angiogenese *in vivo*
MMPs	ECM Degradation
Erythropoietin	EC Proliferation, pro-angiogen *in vivo*
NO	Permeabilität ↑, EC Proliferation, FGF Freisetzung

Ang (Angiopoietin 2); CSFs (Colony Stimulating Factors); EC (Endothelial Cell); ECM (Extracellular Matrix); EGF (Epidermal Growth Factor); FGF (Fibroblast Growth Factor); HGF (Hepatocyte Growth Factor); IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1); MC (Mesenchymal Cell); MMPs (Matrix Metalloproteinases); NO (Nitric Oxide); PC (Pericyte); PDGF (Platelet Growth Factor); PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1); SMC (Smooth Muscle Cell); TGF-β (Transforming Growth Factor β); TNF-α (Tumor Necrosis Factor α); TSP (Thrombospondin); VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Tab. 1.2: Zusammenfassung bekannter anti-angiogener Faktoren
Tabelle wurde nach Angaben von J.W. Distler modifiziert (Distler et al., 2003).

Anti-angiogene Faktoren	
Faktor	**Biologische Funktion**
Angiostatin	EC Proliferation ↓, EC Migration ↓, Apoptose ↑,Röhrenbildung ↓, anti-angiogen *in vivo*
Endostatin	EC Proliferation ↓, EC Migration ↓ (?), Apoptose ↑ (?), Inhibition von MMPs, anti-angiogen *in vivo*
Angiopoetin 2	Gefäß-Destabilisierung durch Antagonisierung von Angiopoietin 1 Signalwirkung
TGF-β	EC Proliferation ↓, EC Migration ↓, Plasminogen-Aktivatoren ↓, EC Apoptose ↑, TIMPs↑
TNF-α	Inhibition der FGF vermittelten EC-Proliferation *in vitro*, EC Apoptose ↑
CXC Chemokine (ohne ELR Motif)	Inhibition von FGF und $VEGF_{165}$ an ihre Rezeptoren, anti-angiogen *in vivo*
TSP-1, TSP-2	EC Migration ↓, Apoptose ↑, anti-angiogen *in vivo*
MMPs	erzeugt Angiostatin
PEDF	EC Proliferation ↓, EC Migration ↓, anti-angiogen *in vivo*

EC (Endothelial Cell); FGF (Fibroblast Growth Factor); MMPs (Matrix Metalloproteinases); PEDF (Pigment Epirghelium Derived Factor); TGF-β (Transforming Growth Factor β); TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases); TNF-α (Tumor Necrosis Factor α); TSP (Thrombospondin); VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

1.2.3.1 Die wichtigsten Stimulatoren der Angiogenese

Pro-angiogene Faktoren lassen sich in drei verschiedene Klassen einteilen (Distler et al., 2003; Klagsbrun and Moses, 1999). Die erste Gruppe umfasst Proteine, die eine hohe Spezifität besitzen und fast ausschließlich auf Endothelzellen wirken. Hierzu zählen die Vertreter der VEGF- und Angiopoietin-Familien. Eine weitere Gruppe setzt sich aus Stimulatoren zusammen, die keine Endothelzellspezifität besitzen und auch auf andere Zellen wirken können. Der Prototyp dieser Familie ist bFGF, einer der am besten charakterisierten pro-angiogenen Faktoren (Shing et al., 1984). Darüber hinaus zählen zu dieser Gruppe einige Chemokine, Zytokine und Enzyme mit einer pro-angiogenen Wirkung (Rosenkilde and Schwartz, 2004). Die dritte Gruppe umfasst Faktoren, die indirekt die Angiogenese fördern. Hierzu zählen überwiegend Proteine, die Endothel- und Tumorzellen oder Makrophagen und Granulozyten zur Freisetzung direkt wirkender Faktoren anregen. Prominenteste Vertreter dieser Gruppe sind TGF-β und TNF-α. Im Folgenden werden aus jeder der drei Gruppen einzelne Vertreter vorgestellt.

VEGF-Familie

VEGF gehört zur VEGF-Familie, die aus insgesamt sieben Vertretern besteht. Dazu werden neben VEGF (VEGF-A) die Proteine VEGF-B bis VEGF-E und der Placenta Growth Factor (PIGF) gezählt (Veikkola and Alitalo, 1999). Unter den Angiogenese-Stimulatoren ist VEGF am besten charakterisiert und wahrscheinlich der wichtigste Faktor. Der Ausfall bereits eines VEGF-Allels hat schwere Fehlbildungen bei der Entwicklung des primären vaskulären Systems zur Folge und ist embryonal letal (Harry and Paleolog, 2003). Durch alternatives Spleißen des VEGF-Gens entstehen sechs verschiedene Isoformen ($VEGF_{121}$ - $VEGF_{206}$). Den ein-

zelnen Isoformen werden unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen zugeschrieben (Houck et al., 1992). (Robinson and Stringer, 2001) $VEGF_{165}$ ist dabei die vorrangig von den Zellen produzierte und sezernierte Isoform (Park et al., 1993). Die Expression von VEGF kann entweder durch verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, EGF und TGF-β) oder Zytokine (z.B. IL-1β und TNF-α) (Mantovani et al., 1992), aber auch durch Hypoglykämie und Hypoxie induziert werden (Stein et al., 1995). Die Wirkung von VEGF ist sehr vielfältig und hängt maßgeblich von der Isoform, der Proteinkonzentration und dem Zielrezeptor ab. Über seine mitogene Wirkung auf Endothelzellen übt VEGF einen direkten angiogenen Effekt aus. Neben der Stimulation der Angiogenese fungiert VEGF auch als Überlebensfaktor für das ruhende Endothel (Kasahara et al., 2000). Die Funktionen von VEGF werden über zwei hochaffine VEGF-Rezeptoren, dem VEGFR-1 (flt-1) und VEGFR-2 (flk-1/KDR) vermittelt (Terman et al., 1992). Ein weiterer VEGF-Rezeptor ist VEGFR-3 (flt-4), diesen bindet VEGF nicht. Der Aufbau der drei VEGF-Rezeptoren ist ähnlich. Sie besitzen intrazellulär stets eine Tyrosin-Kinase. Nach der Ligandenbindung dimerisieren die Rezeptoren und das Signal wird durch Autophosphorylierung der Kinasen ins Zellinnere übermittelt (Plate and Warnke, 1997). VEGFR-1 und VEGFR-2 werden auch auf nicht endothelialen Zellen wie beispielsweise Monozyten (Barleon et al., 1996) und Osteoklasten (Niida et al., 1999) exprimiert. Obwohl die über VEGFR-1 vermittelte Signaltransduktion keinen direkten Einfluss auf die Proliferation und Migration von Endothelzellen hat (Shibuya, 1995) bindet VEGF mit einer etwa 10-fach stärkeren Affinität an diesen als an VEGFR-2. VEGFR-1 übernimmt hierbei vermutlich eine regulatorische Rolle, indem es freies VEGF bindet und somit eine übermäßige Aktivierung von VEGFR-2 verhindert (Fong et al., 1995). Ein weiterer VEGF-Rezeptor ist Neuropilin-1. Dieser wird ebenfalls in Endothelzellen exprimiert und bindet spezifisch die Isoform $VEGF_{165}$. Über Neutropilin-1 werden chemotaktische Abläufe bei der Angiogenese vermittelt (Soker et al., 1998) und seine Abwesenheit hat ebenfalls letale Folgen (Kawasaki et al., 1999). Ebenso wie VEGF übernehmen auch die anderen Mitglieder der VEGF-Familie wichtige Funktionen bei der Regulation der Angiogenese. Die Wirkung der Einzelnen ist im Vergleich zu VEGF eher von untergeordneter Bedeutung und ein Ausfall kann meist problemlos durch andere Proteine kompensiert werden (Paavonen et al., 2002).

Endothelzellunspezifische Angiogenesestimulatoren

Die Gruppe der endothelzellunspezifischen Angiogenesestimulatoren umfasst bislang 22 Mitglieder (FGF-1 - FGF-22). Innerhalb der Vertebraten weisen diese Proteine eine hohe Aminosäurehomologie (13 bis 73 %) und ein Molekulargewicht zwischen 17 und 34 kDa auf. Die wichtigsten Vertreter sind aFGF (FGF-1) und bFGF (FGF-2) (Ornitz and Itoh, 2001).

Beide zählen zu den ersten Wachstumsfaktoren, denen ein pro-angiogener Effekt nachgewiesen werden konnte. Die Sekretion beider Faktoren kann durch verschiedene Zellen und die Bindung an alle der vier FGF-Rezeptoren (FGFR1 - FGFR4) erfolgen. Zur Aktivierung der FGF Rezeptoren (FGFR1 - FGFR4) benötigen die Faktoren Heparansulfate (Shing et al., 1984). Auf Endothelzellen, Fibroblasten und eine Vielzahl anderer Zelltypen wirken aFGF und bFGF chemotaktisch und mitogen (Gospodarowicz et al., 1989). Des Weiteren kann bFGF über die Induktion von VEGF, dem Plasminogen Aktivator Protein (Gualandris and Presta, 1995) oder verschiedener Adhäsionsmoleküle auch indirekt pro-angiogen wirken (Eliceiri, 2001). Die Tatsache, dass bei aFGF- und bei bFGF-Knock-out-Mäusen keine Abnormalitäten bei der Gefäßentwicklung auftreten, belegt ihre im Vergleich zu VEGF entbehrliche Funktion bei der Bildung des primären Systems. Generell liegen im adulten Organismus die Funktionen der Proteine der FGF-Familie hauptsächlich im Bereich der Homöostase und Reparatur von Geweben bei Verletzungen (Miller et al., 2000). Eine unkontrollierte Erhöhung der Expression kann hingegen zur Entstehung von Tumoren beitragen oder vor allem in der Embryonalentwicklung zu Knochenmissbildungen führen. Manche Mitglieder der FGF-Familie spielen zudem eine wichtige Rolle bei der neuronalen Signaltransduktion im peripheren und zentralen Nervensystem.

Indirekte Angiogenesestimulatoren

Aus der dritten Gruppe der Angiogenese-Stimulatoren, die meist indirekt angiogen wirkende Faktoren umfasst, sind am besten TNF-α und TGF-β charakterisiert. TNF-α ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das durch Monozyten, Astrozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen sezerniert wird. In seiner Wirkungsweise verhält es sich ähnlich wie TGF-β. Der pro-angiogene Effekt von TNF-α kann überwiegend mit der Induktion von VEGF, einschließlich der dazugehörigen Rezeptoren, IL-8 und bFGF erklärt werden (Pober, 1987).

Die durch TGF-β vermittelte Angiogenese erfolgt dabei nicht direkt durch Effekte auf Endothelzellen, sondern indirekt über die Rekrutierung inflammatorischer Zellen, die dann wiederum pro-angiogene Zytokine freisetzen (Pepper, 1997b). Die Wirkung von TGF-β wird u.a. durch die Induktion von TNF-α, bFGF, PDGF sowie VEGF vermittelt (Pepper, 1997b). Beide Faktoren haben auf Endothelzellen in einer geringen Konzentration einen proliferativen Effekt und fördern die Bildung von Gefäßröhren. Höhere Konzentrationen dagegen haben einen gegenteiligen Effekt und bewirken eine Hemmung derselben Prozesse.

1.2.3.2 Die wichtigsten Inhibitoren der Angiogenese

Einhergehend mit der Identifizierung pro-angiogener Faktoren, konnten in den letzten Jahren auch eine Vielzahl anti-angiogener Substanzen und Proteine identifiziert werden (Distler et al., 2003; Iruela-Arispe and Dvorak, 1997). Inhibitorische Effekte können dabei auf verschiedene Weisen erzielt werden und beruhen u.a. auf der Hemmung der Migration, Proliferation und der Proteaseaktivität von Endothelzellen, sowie der Induktion von Apoptose (Cao, 2001). Die bekanntesten Beispiele für endogene Inhibitoren sind die Proteine Angiostatin, Endostatin, Thrombospondin-1, sowie Interferon-α und verschiedene Metalloproteasen- und Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (Tab.1.2). Die anti-angiogene Wirkung von Angiostatin, das durch die Spaltung von Plasminogen entsteht, kommt beispielsweise durch einen kompetitiven Wirkungsmechanismus zustande. Die Grundlage hierfür ist, dass zwischen Angiostatin und dem pro-angiogenen Faktor Hepatocyte Growth Factor (HGF) eine Homologie besteht, wodurch Angiostatin ebenfalls an den HGF-Rezeptor binden kann. Im Gegensatz zu HGF, ist Angiostatin aber nicht in der Lage, die Signalkaskade zu aktivieren (Walter and Sane, 1999). Auf diese Weise kann die Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen unterbunden werden (O'Reilly et al., 1994). Des Weiteren wirkt Angiostatin hemmend auf die Migration von Endothelzellen (Tarui et al., 2002) und die Funktion von Plasminogen. Letzteres führt dazu, dass die Basalmembran nicht mehr degradiert wird (Stack et al., 1999). Schließlich wurde gezeigt, dass Angiostatin Apoptose in Endothelzellen auslösen kann (Claesson-Welsh et al., 1998). Hauptsächlich durch die Induktion von Apoptose in Endothelzellen, ist die anti-angiogene Wirkung von Endostatin zu erklären (Dixelius et al., 2000). Bei diesem Protein handelt es sich ebenfalls um ein Spaltprodukt, das Vorläuferprotein ist Kollagen Typ XVIII (O'Reilly et al., 1997).

1.2.4 Klinische Bedeutung der Angiogenese

Die Blutgefäßneubildung findet nach der Embryogenese nur noch im Rahmen weniger physiologischer Vorgänge statt und ist sowohl lokal, als auch temporär reguliert (Cines et al., 1998). Unter normalen physiologischen Bedingungen liegt ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren vor, so dass das Endothel im Ruhezustand gehalten wird. Eine Störung dieses Gleichgewichts, infolgedessen es zu einer verminderten oder übersteigerten Gefäßneubildung kommt, ist die Ursache zahlreicher Erkrankungen. Daher gilt heutzutage die Beeinflussung der Angiogenese als aussichtsreicher Ansatz bei der Behandlung einer Vielzahl an Erkrankungen, die im Zusammenhang mit einer unkontrollierten Angiogenese stehen (Pepper, 1997a). Anfangs wurde dieser Ansatz vor allem als eine neuartige Strategie zur Be-

handlung von Tumoren durch die Arbeiten von Judah Folkman et al. vorangetrieben. Im Jahre 1971 stellte Folkman die bahnbrechende Hypothese auf, dass das Wachstum aller Tumoren abhängig von der Bildung neuer Blutgefäße sei (Folkman, 1971). Diese und folgende Publikationen legten den Grundstein für den Beginn intensiver Forschungen auf dem Gebiet der Angiogenese. Nachfolgend wurde im Labor von Folkman das erste die Angiogenese stimulierende Protein aus einem Tumor (TAF) aufgereinigt, der erste endogene Angiogeneseinhibitor (Endostatin) identifiziert und die klinische Erforschung der anti-angiogenen Tumortherapie gestartet (Folkman, 1974). Die Forschungsarbeiten brachten verschiedene Strategien zur Inhibierung der Tumor induzierten Angiogenese hervor (Folkman, 2002). Hauptangriffspunkt ist entweder die Inhibierung der Sekretion pro-angiogener Faktoren oder die Neutralisation nach deren Freisetzung. Überdies stellt eine direkte Aktivitätshemmung der gefäßbildenden Endothelzellen eine aussichtsreiche Taktik dar. Inzwischen ist die Inhibierung der Angiogenese ein anerkannter Bestandteil zahlreicher Formen der Krebsbehandlung und wird im Zusammenspiel mit gängigen Zytostatika angewendet. Darüber hinaus lässt sich die Wirksamkeit vieler effektiver Chemotherapeutika wie beispielsweise Bleomycin, Cyclophosphamid und Doxorubicin, teilweise durch deren anti-angiogene Wirkung erklären (Teicher et al., 1992). Im Gegensatz zu den konventionellen Behandlungsmethoden, bei denen neoplastisches Gewebe chirurgisch entfernt oder durch Chemotherapeutika und Bestrahlung abgetötet wird, erfolgt durch die Angiogenese-Inhibierung keine direkte Schädigung der Tumorzellen. Vielmehr wird auf diese Weise die Nähr- und Sauerstoffversorgung des Tumors abgeschnitten, wodurch sein weiteres Wachstum und eine Metastasierung reduziert werden kann. Durch derartige therapeutische Eingriffe konnte das Wachstum verschiedener Tumorarten nachweislich reduziert, gestoppt und eine Metastasierung verhindert werden (Folkman, 1974). Die Anti-Angiogenese-Therapie stellt daher eine wirksame Ergänzung zu den bisherigen Therapienmöglichkeiten bei der Tumorbehandlung dar. Vorläufiger Höhepunkt der Entwicklungen der letzten Jahre war am 27. Februar 2004 die Zulassung des ersten Anti-Angiogenese-Medikamentes Avastin zur Krebsbehandlung durch die US-amerikanische Gesundheitsbehörde FDA (Food and Drug Administration).

Im Gegensatz zur Inhibition, wird in ischämischen Geweben eine gezielte Induktion der Angiogenese angestrebt, um eine ausreichende Vaskularisierung zu erzielen (Losordo et al., 1999). Von besonderer Bedeutung ist eine Neovaskularisierung bei unterversorgten Gewebs- oder Organregionen, die durch Durchblutungsstörungen oder arterielle Verschlüsse entstanden sind. Speziell beim Herzmuskel kann eine Verminderung der Nähr- und Sauerstoffversorgung fatale Folgen haben und einen Herzinfarkt verursachen (Rosengart et al., 1999). Ein

weiteres Beispiel ist die so genannte periphere Verschlusskrankheit (pAVK), bei der es vorwiegend zu Durchblutungsstörungen der Extremitäten kommt (Baumgartner and Isner, 1998). Etwa 5 % aller Menschen im Alter zwischen 44 und 74 Jahren erkranken daran, wobei das Risiko mit steigendem Alter deutlich zunimmt. Eine Anzahl von 35.000 notwendigen Beinamputationen pro Jahr verdeutlicht die drastischen Folgen dieser Krankheit. Die gezielte Stimulation der Gefäßneubildung verspricht die existierenden Therapiemöglichkeiten deutlich zu verbessern (Engelmann and Nikol, 2000). Vor allem in Fällen, in denen ein gefäßchirurgischer Eingriff nicht durchführbar ist, wäre der Einsatz pro-angiogener Substanzen oder Faktoren hilfreich (Isner and Rosenfield, 1993). Die Entwicklung sowohl neuer pro-, als auch anti-angiogener Medikamente gewinnt daher zunehmend an Bedeutung.

1.2.4.1 Endothelzellen als therapeutisches Angriffziel

Aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Blutgefäßbildung stellen Endothelzellen das bevorzugte Angriffsziel bei therapeutischen Interventionen der Angiogenese dar (Hormia and Virtanen, 1986). Obgleich das Endothel aus einer einfachen Zellschicht aufgebaut ist, stellt es eines der größten menschliche Organe dar und ist zudem systemisch verbreitet. Insgesamt umfasst das röhrenartige System mehr als 10^{12} Endothelzellen und bildet eine gewaltige Grenzfläche zwischen dem Blut und den Geweben aus. Angesichts der immensen Verbreitungsgröße ist eine gezielte pro- oder anti-angiogene Therapie der betroffenen Region essentiell. Ein spezifischer Eingriff kann dabei vor allem durch die Tatsache erreicht werden, dass sich an angiogenen Prozessen beteiligte Endothelzellen von reifen, ruhenden Zellen phänotypisch unterscheiden. Besonders dem Vorgang der Endothelzellproliferation, der für ausreichendes Zellmaterial bei der Gefäßneubildung sorgt, kommt hierbei eine zentrale Rolle zu. In einer gesunden Population muriner Endothelzellen befinden sich durchschnittlich 0,2 % der Zellen augenblicklich im Zellzyklus, wohingegen es in einem Tumormodell (Xenograft) bis zu 9 % der Zellen sind (Denekamp, 1986). Bei humanen Tumoren sind die Teilungsraten der Endothelzellen zwar niedriger, aber gegenüber einer normalen Endothelzellkultur immer noch etwa doppelt so hoch und dadurch ausreichend für die Eröffnung eines therapeutischen Fensters. Ein weiterer Grund, aktivierte Endothelzellen als Angriffsziel auszuwählen, ist die Tatsache, dass angiogene Prozesse im adulten Organismus nur noch im Rahmen weniger physiologischer Situationen ablaufen (Jaffe et al., 1973). Eine spezifische Hemmung der Endothelzellproliferation dürfte daher kaum mit physiologischen Vorgängen interferieren und ließe im Gegensatz zu herkömmlichen Zytostatika keine unerwünschten Nebenwirkungen erwarten. Nach Abschluss der Embryogenese befinden sich Endothelzellen größtenteils im

Ruhezustand, währenddessen sie verschiedene protektive Gene exprimieren. Durch diese wird unter anderem die Synthese und Ausschüttung proinflammatorischer Proteine, sowie die Apoptose verhindert (Bach et al., 1997). Ferner weist ein an angiogenen Prozessen beteiligtes Endothel ausgeprägte Unterschiede betreffend des Basalmembranaufbaus und der Permeabilität auf. Auch diese Merkmale ermöglichen einen gerichteten Angriff auf Endothelzellen, die aktiv an der Angiogenese beteiligt sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass sämtliche Endothelzellen Bestandteil des vaskulären Systems sind und daher in direktem Kontakt mit dem zirkulierenden Blutstrom stehen. Die Zellen sind somit leicht zugänglich für intravenös applizierte Medikamente. Darüber hinaus sind bei bisherigen Anwendungen angiogener Anti-Krebs-Therapien keine Arzneimittelresistenzen aufgetreten. Grund hierfür ist vermutlich, dass es sich bei den am Tumorendothel beteiligten Zellen, im Gegensatz zu den Tumorzellen selbst, um genetisch stabile Zellen handelt. Wie andere diploide Zellen, zeigen diese kaum Neigung zur Resistenzentwicklung (Boehm et al., 1997).

1.2.5 Spezielle Relevanz der Tumorangiogenese

In der medizinischen Forschung kommt der pathologischen Angiogenese die größte Bedeutung bei der Tumorprogression zu (Tumorangiogenese). Bei heranwachsenden Tumoren können zwei Phasen, die prävaskuläre und die vaskuläre Phase, unterschieden werden (Folkman, 2002). In der prävaskulären Phase findet ein von der Angiogenese unabhängiges Tumorwachstum statt, und die Nähr- und Sauerstoffversorgung kann ausschließlich durch Diffusion erfolgen. Nachdem der Tumor eine kritische Größe von ca. 2 - 3 mm Durchmesser erreicht hat, müssen für eine weitere Größenzunahme zunächst neue Blutgefäße gebildet werden (Denekamp, 1993). Maligne Zellklone durchlaufen an dieser Stelle den so genannten angiogenen „Switch“. Von diesem Zeitpunkt an sind die Tumorzellen in der Lage, Angiogenese zu induzieren (Bergers and Benjamin, 2003). Mit dem Übergang in die vaskuläre Phase geht eine Verschiebung des Nettogleichgewichtes zugunsten pro-angiogener Faktoren einher (Holmgren et al., 1995). Eine Verlagerung des Gleichgewichts kann durch eine gesteigerte Sekretion pro-angiogener Faktoren oder eine verminderte Expression anti-angiogener Proteine zustande kommen (Iruela-Arispe and Dvorak, 1997). Der Wechsel in die vaskuläre Phase ist endgültig nach dem Auftreten einer erhöhten VEGF-Expression vollzogen. Die Tumorprogression kann fortan weiterschreiten, da aufgrund der Blutgefäßneubildung die weitere Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des Tumors sichergestellt ist (Abb. 1.2).

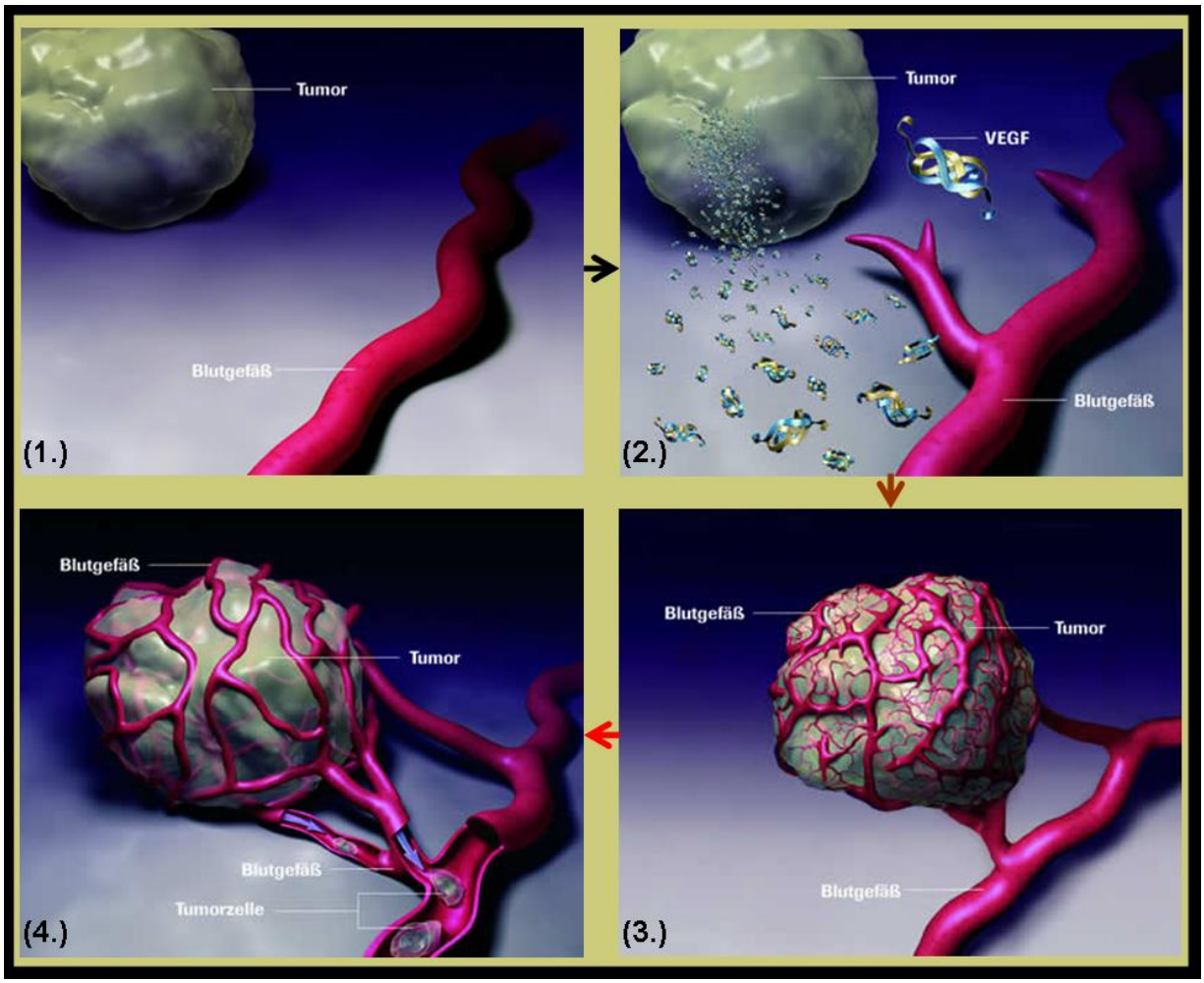


Abb. 1.2: Die Prozesse bei der Tumorangiogenese
(1.) Der Tumor hat eine kritische Größe von ca. 2 - 3 mm Durchmesser erreicht. Entweder stagniert das Wachstum oder der Tumor geht in die vaskuläre Phase über (2.), indem pro-angiogene Faktoren wie z.B. VEGF sezerniert werden. (3.) Daraufhin kommt es zu einer zum Tumor und Stimulus hin gerichteten Blutgefäßneubildung bis der Tumor schließlich ausreichend mit Gefäßen versorgt ist. (4.) Durch den Anschluss an das vaskuläre System können im weiteren Verlauf Tumorzellen in den Blutkreislauf gelangen und zu einer Bildung von Metastasen führen. (Abbildung von www.roche.com)

Neben dem nutriven Effekt, kommt es durch die Stimulation von Endothelzellen, die im aktivierten Zustand verschiedene Wachstumsfaktoren produzieren, auch zu einem parakrinen stimulierenden Effekt auf die Tumorzellproliferation (Rak et al., 1995). Bezeichnend für die vaskuläre Phase ist neben der Entstehung neuer Blutgefäße und dem exponentiellen Tumorwachstum auch die Tumorinvasion in das umliegende Gewebe sowie eine Metastasenbildung (Folkman, 1995). Die Tumor-induzierte Blutgefäßneubildung erfolgt durch Angiogenese und Intussuszeption (Abschnürung) aus bereits vorhandenen Gefäßen. In den letzten Jahren wurden jedoch vermehrt Hinweise gefunden, dass auch zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) unterstützend am Aufbau beteiligt sind. Diese Zellen können im adulten Stadium im peripheren Blut nachgewiesen werden, stammen aus dem Knochenmark und besitzen ähnliche Eigenschaften wie embryonale Angioblasten. Weiter besitzen diese Zellen das Potential

zu reifen Endothelzellen zu differenzieren (Hristov and Weber, 2004). Gegenüber physiologisch entstandenen Gefäßen zeigen solche, die im Rahmen einer Tumorangiogenese gebildet werden, einige Anomalien. Beispielsweise sind Tumorgefäße oftmals nicht aus homogenen Endothelzellschichten aufgebaut, sondern enthalten auch vereinzelt Tumorzellen. Überdies weisen Tumorgefäße eine eingeschränkte Stabilisierung durch eine teilweise unvollständige Basalmembran und Perizytenschicht auf. Insgesamt ist das Tumorendothel durch einen konfusen, brüchigen Aufbau und einen geringen Differenzierungsgrad gekennzeichnet (McDonald and Foss, 2000). In Folge dessen sind die Tumorgefäße häufig undicht und es kommt zu einem diffusen Blutfluss (Jain, 1988). Weiter führt die Tumorangiogenese zu einer erhöhten Gefäßdichte gegenüber Normalgeweben. Eine verschiedenartige Ausprägung und Dichte kann bei manchen Tumorarten mit einer Krankheitsprognose korreliert werden (Bochner et al., 1995). Überdies können auch gesteigerte Konzentrationen von pro-angiogenen Faktoren, wie beispielsweise VEGF und bFGF, als Marker für eine Prognose herangezogen werden (Granato et al., 2004). Meist sprechen die hohe Gefäßdichte und gesteigerte Konzentrationen an pro-angiogenen Faktoren für eine schlechtere Prognose des weiteren Krankheitsverlaufes (Lissbrant et al., 1997).

1.2.5.1 Anti-Angiogenese-Therapie maligner Tumoren

Die Hemmung der Angiogenese soll die Nähr- und Sauerstoffversorgung des Tumors unterbrechen, um ein weiteres Wachstum sowie die Metastasenbildung zu unterbinden (Folkman, 1971). In zahlreichen Tierversuchen konnten durch körpereigene, aber auch durch synthetische Inhibitoren, eine erfolgreiche Hemmung der Blutgefäßbildung gezeigt werden. Dabei wurden Rückbildungen der Tumoren oder deren Absterben erreicht. Ob Inhibitoren auch die gleiche Wirkung im Menschen entfalten können, ist bisher nicht geklärt und wird derzeit durch klinische Studien geprüft (Cao, 2004; Carmeliet, 2004). Diese Studien umfassen vorwiegend Patienten, die an Brust-, Prostata-, Gehirn- oder Dickdarmkrebs leiden, aber zunehmend auch solche, die von weiteren Krebsarten betroffen sind (http://www.cancer.gov-/clinicaltrials/digestpage/angiogenesis-inhibitors).

1.2.5.2 Studien zu Angiogenese-Inhibitoren zur humanen Tumorbehandlung

Die Idee das Tumorwachstum durch eine Hemmung der Angiogenese zu bekämpfen wurde durch genetische Studien an Knock-out-Mäusen und weitere Tierversuche bestärkt. Beispielsweise wurden Angiogenese-defizienten Mäusen Brustkrebszellen injiziert und das Wachstumsverhalten des Tumors analysiert (Benezra et al., 2001). Im Vergleich zu normalen Mäusen, die nach ein paar Wochen an Krebs starben, fand bei Angiogenese-Knock-out Mäusen

kaum Tumorwachstum statt. Nach einigen Wochen bildete sich der Tumor sogar zurück und die Tiere blieben gesund (Alani et al., 2004). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich nach der Injektion von Lungenkrebszellen. Hierbei wuchsen in Angiogenese-defizienten Mäusen zwar Tumore heran, im Vergleich mit normalen Mäusen war das Wachstum jedoch verlangsamt und eine Metastasenbildung blieb aus (Lyden et al., 1999). Der Gedanke, das Tumorwachstum auch beim Mensch durch eine Inhibition der Angiogenese zu hemmen, wurde neben Tierversuchen auch durch Auffälligkeiten bei Down-Syndrom-Patienten bestärkt. Aufgrund einer Genommutation besitzen diese Menschen ein drittes Chromosom 21 (Trisomie 21). Einhergehend mit dieser genetischen Erkrankung wurde auffällig selten ein gleichzeitiges Auftreten von Tumoren gefunden (Zorick et al., 2001). Die Ursache hierfür liegt darin, dass auf dem Chromosom 21 mehrere Angiogenese-Inhibitoren kodiert sind. Aufgrund weiterer Genkopien von Inhibitoren kann durch auftretende Gen-Dosis Effekte die Angiogenese unterbunden werden. Die größte Bedeutung kommt hierbei wahrscheinlich den Genen DSCR-1 und Endostatin zu. DSCR-1, das seinen Namen aufgrund der Lokalisierung innerhalb der so genannten Down-Syndrom kritischen Region (Down Syndrom Critical Region) auf dem Chromosom 21 erhalten hat, ist ein Inhibitor von Calcineurin (Klee et al., 1998). Calcineurin, eine Serin/Threonin-Phosphatase, wird durch den intrazellulären Kalziumspiegel reguliert. Diese Signalwirkung spielt unter anderem bei der Aktivierung von T-Zellen und Endothelzellen eine Rolle. Die Überexpression von DSCR-1 führt auf diese Weise zu einer Expressionsverminderung verschiedener pro-angiogener Gene durch T-Zellen und Endothelzellen. Weiter wird vermutet, dass DSCR-1 eine Schlüsselrolle bei der negativen Feedback Regulation von VEGF und Thrombin zukommt (Minami et al., 2004). Weitere Studien haben gezeigt, dass Down-Syndrom-Patienten gegenüber gesunden Personen aufgrund der erhöhten Gen-Dosis von Endostatin eine signifikante Erhöhung dieses anti-angiogenen Faktors im Serum aufweisen. Dies könnte ebenfalls erklären, warum bei Down-Syndrom-Patienten relativ selten das Vorkommen verschiedener solider Tumoren zu finden ist (Zorick et al., 2001). Gleichzeitig weisen diese Ergebnisse Endostatin als potenter Inhibitor der Tumor-induzierten Angiogenese aus. Um die Erfolgsaussichten anti-angiogener Strategien bei der Behandlung menschlicher Tumoren zu prüfen, werden derzeit verschiedene Angiogenese-Inhibitoren an zahlreichen Krebspatienten getestet.

Die Inhibitoren lassen sich nach ihrem Angriffsziel in unterschiedliche Gruppen einteilen:
(1) Inhibierung von endothelialen Wachstumsfaktoren
(2) Inhibition von Proteasen, die für den Abbau der Basalmembran benötigt werden
(3) Unterbrechung bestimmter intrazellulärer Signalkaskaden in aktivierten Endothelzellen
(4) Gezielte Apoptoseinduktion von Endothelzellen oder Inhibierung von Überlebenssignalen
(5) Inhibierung von endothelialen Vorläuferzellen (EPC)
(6) Inhibierung der Adhäsion von Endothelzellen an die extrazelluläre Matrix (ECM)

Im Folgenden werden kurz einige ausgewählte natürliche und synthetische Inhibitoren vorgestellt (Cao, 2004; Osada and Kakeya, 2004; Rosen, 2000).
Zur **ersten Gruppe** von Inhibitoren, die direkt das Wachstum von Endothelzellen hemmen, gehört unter anderem das Endostatin. Dies ist ein endogen vorkommender anti-angiogener Faktor, der durch Spaltung des Kollagen Typ XVIII Proteins entsteht. Endostatin bewirkt die Apoptose von Endothelzellen und konnte in Tiermodellen nachweislich das Tumorwachstum hemmen (Dixelius et al., 2000). Des Weiteren kann eine gezielte Apoptose von Endothelzellen auch durch die Gabe von Mikrotubuli-depolymerisierenden Combretastatin A4 erreicht werden (West and Price, 2004). Ein drittes Beispiel für ein direkt anti-angiogen wirkendes Agens ist Thalidomid. Dieser, ursprünglich unter dem Namen Contergan als Sedativum verabreichte Wirkstoff, wurde 1961 wegen teratogener Nebenwirkungen vom Markt genommen. Derzeit erfährt Thalidomid ein erstaunliches Comeback als Medikament zur Behandlung von soliden Tumoren sowie hämatologischen Neoplasien (Harousseau et al., 2004; Sleijfer et al., 2004). Auch wenn der genaue Wirkungsmechanismus noch nicht geklärt werden konnte, ließen sich jedoch zahlreiche anti-angiogene Wirkungen belegen. Unter anderem hemmt Thalidomid die Angiogenese durch eine Blockierung von bFGF, VEGF und TNF-α (Dietzfelbinger, 2001). Im Fall von TNF-α steht dies in einem Zusammenhang mit einer vermehrten TNF-α-mRNA-Degradation. Weiter konnte eine Beeinflussung der Expression von Adhäsionsproteinen auf der Zelloberfläche gefunden werden. Diese Proteine sind für Interaktionen zwischen Tumor- und den umliegenden Zellen verantwortlich. Zudem kommen verschiedene immunmodulatorische Effekte auf die beiden anti-angiogen wirkenden Zytokine IL-8 und INF-γ hinzu.

Zu der **zweiten Gruppe** von Angiogenese-Inhibitoren werden diejenigen Stoffe gerechnet, die gegen die initial von den Endothelzellen gebildeten Metalloproteasen (MMP) gerichtet sind. Diese Proteasen bauen die extrazelluläre Matrix (ECM) ab, wodurch die Endothelzellmigration in umgebendes Gewebe ermöglicht wird. Verschiedene synthetische als auch natür-

lich vorkommende Moleküle werden derzeit getestet und könnten ebenfalls eine erfolgreiche Hemmung der Angiogenese bewirken. Beispiele für synthetische Stoffe sind Marimistat (Jones et al., 1999) und COL-3 (Hidalgo and Eckhardt, 2001).

Angiogenese-Inhibitoren, die darauf abzielen, die angiogene Signalkaskade zu hemmen, sind in der **dritten Gruppe** zusammengefasst. Dazu zählen unter anderem Anti-VEGF-Antikörper. Avastin (Bevacizumab, rhuMAb-VEGF) ist hierbei das erste Medikament, das für eine Anti-Angiogenese-Therapie bei Krebs zugelassen wurde. Am 27. Februar 2004 konnte Roche bekannt geben, dass die US-amerikanische Gesundheitsbehörde FDA (Food and Drug Administration) der US-Firma Genentech, die Zulassung für Avastin erteilt hat. Die ungewöhnlich schnelle Prüfung und Zulassung, durch ein beschleunigtes Verfahren seitens der FDA, ist ein Zeichen des Stellenwertes dieses Therapieansatzes. Die Tests mit Avastin erfolgten in Kombination mit einer Chemotherapie (5-Fluorouracil) bei bisher unbehandelten Patienten, die an metastasierenden Dick- oder Enddarmkrebs leiden. Der Zulassungsbescheid wurde nach einer Phase-III-Studie erteilt, in der an über 900 Patienten gezeigt wurde, dass sich die Lebenserwartungen durch die Kombinationstherapie mit Avastin um durchschnittlich 5 Monate verlängerten (Reddy, 2005). Der Wirkstoff Bevacizumab ist ein monoklonaler Anti-VEGF-Antikörper und verhindert durch eine gezielte Bindung des Wachstumsfaktors, das Andocken an dessen Rezeptor. Auf diese Weise wird eine Vaskularisierung des Tumors unterbunden, neu gebildete Gefäße verkümmern und sowohl das Tumorwachstum als auch eine Metastasierung können inhibiert werden (Ferrara et al., 2004). Am 10. Februar 2005 folgte schließlich die Zulassung von Avastin durch die europäische Zulassungsbehörde (EMEA) zur Erstlinienbehandlung von Patienten mit progressiven Dickdarm- und Enddarmkrebs. Darmkrebs ist in Deutschland die zweithäufigste Tumorart, wobei von jährlich ca. 66.000 erkrankten Menschen etwa die Hälfte an den Folgen stirbt. Mit jährlich 1,2 Millionen Neuerkrankungen ist Lungenkrebs weltweit die häufigste Krebsart, alle 30 Sekunden stirbt ein Mensch an den Folgen dieser Erkrankung (Thanos et al., 2004). Aufgrund der guten Verträglichkeit und der Therapieerfolge wird die Kombinationstherapie mit Avastin derzeit auch bei einer Reihe anderer Tumorerkrankungen getestet. Aktuelle Studien haben kürzlich die hohe Wirksamkeit von Avastin beim Darmkrebs belegt (Midgley and Kerr, 2005). Zudem wurden vergleichbare Erfolge auch bei der Behandlung von Brust- und Lungenkrebs erhalten. Bei einer Phase-II/III-Studie konnte bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC) sowohl das progressionsfreie Überleben von 4,5 auf 6,4 Monate als auch die durchschnittliche Überlebenszeit von 10,2 auf 12,5 Monate verlängert werden (Kerr, 2005). Ferner zeigten sich auch

erfolgsversprechende Resultate bei Patienten mit metastasierenden Mammakarzinomen. Durch die Gabe von Avastin konnte die Ansprechrate der Chemotherapie erhöht und bei gleichzeitiger Verabreichung von Paclitaxel das progressionsfreie Überleben von durchschnittlich 6 auf 12 Monate verlängert werden.

Alternativ zu einer durch Antikörper vermittelten Hemmung von VEGF werden bei der Behandlung der altersbedingten Makuladedegeneration (AMD) seit neustem so genannte Aptamere eingesetzt. AMD ist eine Sehstörung, die durch eine Gefäßwucherung unter der Netzhaut (choriodale Neovaskularisation) verursacht wird. Diese Art der Sehschwäche nimmt im Alter zu und kann bei 35 % der über 75-jährigen diagnostiziert werden. Da nur das zentrale Schärfesehen betroffen ist, kommt es zwar auch im Endstadium nicht zu einer Erblindung, dennoch geht es mit einer Behinderung einher, die den Betroffenen das Lesen oder Autofahren unmöglich machen. Bisherige Behandlungen erfolgten durch Lasertherapien oder Operationen, bis Anfang 2005 durch die FDA das Medikament Macugen zugelassen wurde. Der Wirkstoff ist das Aptamer Pegaptanib. Dieses Aptamer ist ein künstliches Molekül, das strukturell exakt zu VEGF passt und dadurch die Bindung an den VEGF-Rezeptor verhindert (Gragoudas et al., 2004). Diese Therapieform weist ähnliche Erfolge wie die Laserbehandlung auf und eröffnet neue Möglichkeiten für eine Kombinationstherapie bei der Behandlung der AMD (Ferris, III, 2004). Überdies kam zu den bisherigen Therapiemöglichkeiten ebenfalls Anfang 2005 eine neuartige photodynamische Therapie hinzu. Bei dieser Behandlung wird das photosensibilisierende Medikament Visudyne (Verteporfin, Novartis) dem Patienten ins Auge injiziert, wonach sich das Verteporfin vorwiegend in den Bereichen der Gefäßwucherungen anlagert. Auf diese Weise zerstört eine anschließende Bestrahlung die Gefäße nicht, sondern führt vielmehr zu einem gezielten Gefäßverschluss. Dadurch kommt keine Narbenbildung zustande, welche bei herkömmlichen Laserbehandlungen die Netzhaut teilweise stark belastet.

Überdies werden zu der dritten Gruppe auch das endogen vorkommende Protein TNF-α gerechnet. Dieser Faktor hemmt die bFGF- und VEGF-Produktion und verhindert somit im Vorfeld die Aktivierung der angiogenen Signalkaskade (Distler et al., 2003). Eine weitere Substanz, die derzeit untersucht wird, wird unter der Bezeichnung SU006668 geführt. Dabei handelt es sich um einen Tyrosin-Kinase-Inhibitor (Hoekman, 2001). Die anti-angiogene Wirkung beruht hierbei auf der Inhibierung von Kinasen, die innerhalb der Signalwege der Rezeptoren flk-1/KDR, PDGRF-β und FGFR1 eine Rolle spielen (Machida et al., 2005).

Neben den bisher aufgezählten Angiogenese-Inhibitoren gibt es noch andere, die entweder über einen unspezifischen oder bisher nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus die Angi-

ogenese hemmen. Ein Beispiel hierfür ist CAI (Carboxyamid-Triazol). Dieser Stoff hemmt die Aufnahme von Kalziumionen in die Zelle und moduliert gleichzeitig verschiedene zelluläre Signaltransduktionskaskaden (Alessandro et al., 1996). Dadurch werden zahlreiche Endothelzellfunktionen wie Adhäsion, Migration, Expression von Proteasen und Gefäßbildung gehemmt. Diese Daten lassen vermuten, dass verschiedene angiogene Prozesse durch den Kalziumspiegel in der Zelle kontrolliert werden. CAI wird derzeit in klinischen Studien getestet (Figg et al., 2002). Auch wenn in den letzten Jahren viele grundlegende Mechanismen geklärt wurden und viele bei der Angiogenese beteiligten Faktoren gefunden werden konnten, bleibt noch vieles ungeklärt. Weil die bisherigen klinischen Studien erst wenige Jahre laufen, ist es schwer abzuschätzen, ob eine anti-angiogene-Langzeit-Krebstherapie zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann. Weiter muss geklärt werden, wie lange die Behandlung tatsächlich erfolgen soll und ob es Tumoren gelingen kann alternative Wege zu einer ausreichenden Vaskularisierung zu schaffen. Zudem muss untersucht werden, inwieweit diese Therapieform mit der physiologisch stattfindenden Angiogenese, wie beispielsweise den Wundheilungsprozessen, dem Ovulationszyklus der Frau oder dem Wachstum von Kindern interferiert (Schweigerer, 1995). Zur Beantwortung dieser Fragen laufen derzeit zahlreiche klinische Studien. Bisherige Daten belegen, dass die therapeutische Angiogenese-Inhibition ein viel versprechendes Erfolgskonzept zur Behandlung verschiedener Krebsarten und anderer Erkrankungen ist. Dennoch oder gerade deswegen müssen in Zukunft noch etliche offene Fragen zu dem Mechanismus der Angiogenese und den daran beteiligten Proteinen geklärt werden (Kieran and Billett, 2001). Die Suche nach bislang unbekannten pro- und anti-angiogenen Faktoren für eine bessere und direkt krankheitsursächliche Therapie ist daher von grundlegender Bedeutung.

1.3 Identifizierung neuer pro-angiogener Faktoren

Die Suche nach bisher unbekannten pro-angiogenen Faktoren kann auf verschiedene Arten erfolgen. Dabei können verschiedene bioinformatische und biochemische Ansätze verfolgt werden, die Methoden wie Expressionsanalysen und Expressionsklonierungen mit einschließen. In den ersten Jahren basierte die Suche überwiegend auf Proteinaufreinigungen aus Mediumüberständen von Tumoren, die eine pro-angiogene Wirkung besitzen (Folkman, 1971). Durch anschließende Proteinsequenzierung wurde die Identität der Faktoren dann ermittelt. Diese Vorgehensweise war in früheren Jahren vor allem durch die noch fehlende Verfügbarkeit der Humangenomsequenz eingeschränkt. Neuere Suchmethoden bestanden größtenteils aus bioinformatischen Voraussagen (Clark et al., 2003). Basierend auf computergestützten

Sequenzvergleichen können Signalsequenzen in Proteinen vorhergesagt werden und somit Hinweise auf eine Sekretion ergeben. Diese Vorgehensweise birgt jedoch die Gefahr falsch positive oder falsch negative Ergebnisse aufgrund von theoretischen Signalsequenzvorhersagen zu erhalten. Andererseits werden Proteine, deren Sekretion unabhängig oder über bisher unbekannte Signalsequenzen erfolgt, nicht identifiziert. Alternative Analysen basieren auf Expressionsstudien von cDNAs, die auf Pool- bzw. Sammel-Transfektionen beruhen. Diese weisen jedoch anderweitige Grenzen auf. Aufgrund potentiell entgegen gerichteter Effekte von verschiedenen cDNAs können bei der Testung Neutralisationseffekte auftreten, wodurch potentiell pro-angiogene Proteine nicht gefunden werden. Ein weiterer Punkt ist, dass bei Sammel-Testungen die Proteinmengen der exprimierten cDNAs eventuell zu gering sein könnten, was einen Sensitivitätsverlust zur Folge hätte.

Um die beschriebenen Probleme und potentiellen Fehlerquellen zu minimieren, basierte der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Screen daher auf der individuellen Testung einzelner cDNA-Expressionsplasmide. Der große Vorteil einer individuellen Testung liegt dabei auf der Hand. Ein erhaltener Phänotyp kann direkt einer überexprimierten cDNA zugeordnet werden, gegenteilige Effekte verschiedener cDNAs können nicht auftreten und die exprimierten Proteinmengen sind wahrscheinlich ausreichend (Leung et al., 1989).

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines vollautomatisierten Hochdurchsatz-Screen-Protokolls zur Identifizierung von cDNAs mit einem pro-angiogenen Effekt. Um eine möglichst hohe Anzahl an cDNAs testen zu können, sollten sämtliche Versuche in 96 Well-Platten erfolgen. Damit der Screen auf einer gezielten Identifizierung von cDNAs basierte, die nach der Expression zur Bildung und Sekretion endothelialer Proliferationsfaktoren führen, sollte die cDNA-Expression in einer Zelllinie stattfinden und anschließend die Medienüberstände auf endotheliale Zellen getestet werden. Des Weiteren sollte der Versuchsablauf reproduzierbar sein und der Zeit- sowie Kostenaufwand möglichst gering gehalten werden. Der Vorteil löslicher Faktoren ist ihr hohes therapeutisches Potential und die Möglichkeit gegenüber intrazellulären Proteinen, vergleichsweise einfach nach potentiellen Inhibitoren suchen zu können. Studien mit Avastin, einem Anti-VEGF-Antikörper, unterstreichen die Erfolgsaussichten bei der Hemmung von löslichen pro-angiogenen Faktoren (Willett et al., 2004).
Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein ausgewählter Hit charakterisiert werden, Fragen zu einem möglichen Wirkungsmechanismus beantwortet und Strategien für eine potentielle Hemmung des gefundenen pro-angiogenen Effekts erarbeitet werden.

3 Material

3.1 Chemikalien und andere Materialien

Ammoniak (NH_4)	Roth
Ampicillin	Serva
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
CHAPS	Sigma-Aldrich
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Biomol
ECL-Reagenz (SuperSignal®)	Pierce
Essigsäure (100 %)	Roth
Ethanol (99,7 %)	Roth
Ethidiumbromid (Etbr)	Biomol
Falcon Reaktionsgefäße (15 ml/50 ml)	TPP
Formaldehydlösung (37 %)	Sigma-Aldrich
Glycerol anhydrous, minimum 99 %	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth
Hyperfilm™ ECL™	Amersham Pharmacia Biotech
Imidazol	Fluka
Isopropanol	Roth
Magermilchpulver (Frema Reform)	DE-VAU-GE Gesundkostwerk GmbH
Magnesiumchlorid	Fluka
Mercaptoethanol (2-)	Sigma-Aldrich
Methanol (99,8 %)	Roth
Natriumacetat	Fluka
Natriumazid (NaN_3)	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na_2HPO_4)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Ni Sepharose™ High Performance	Amersham Biosciences
Nitrocellulose Transfer-Membran	Protean® Schleicher & Schnell
NUNC-Immuno™ Plate-MaxiSorp™ Surface	NUNC Brand Products
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab
Poly-Prep® Chromatography Columns (10 ml)	Bio-Rad
Ponceau S	Roth
ProGel-Tris-Glycin-Gel 4-20 %, 1 mm, 10, 12 & 15 Bahn	Anamed
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (EDTA-free)	Roche
Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow, 5 ml	Amersham Pharmacia Biotech
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Pierce

Salzsäure, rauchend (37 %)	Roth
TMB - Liquid substrate system for ELISA	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure	Roth
Tris	Roth
Triton X 100	Roche
Tween-20	Sigma-Aldrich
Western Blue® - Substrate for Alkaline Phosphatase	Promega
Whatman-Filter-Papier (3 MM)	Whatman international LTD

3.2 Transfektionsreagenzien

FuGENE 6 Transfection Reagent - Roche
GenePorter™ Transfection Reagent - Peqlab
Lipofectamine 2000 - Invitrogen
Lipofectin® Reagent - Invitrogen
Metafectene - Biontex

3.3 Kommerzielle Kits

Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
Elongase® Amplification System	Invitrogen
EPO ELISA	Roche
Expand Long Template PCR System	Roche
Luciferase® Assay System	Promega
Nucleobond AX	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel
Promo Kine - Human VEGF ELISA Kit	PromoCell GmbH
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick® Nucleotide Removal Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Rapid DNA Ligation Kit	Roche

3.4 Färbelösungen

Coomassie-Lösung:
0,1 g Coomassie Blue
50 % Ethanol (p.A.)
5 % Essigsäure
ad 500 ml ddH_2O

Entfärber für Coomassie:
50 % Ethanol (p.A.)
5 % Essigsäure
ad 500 ml ddH_2O

Ponceau S-Lösung:
0,5 g Ponceau S + 1 ml Essigsäure (100 %) ad 100 ml ddH_2O
Entfärben mit ddH_2O

3.5 Geräte

ÄKTA FPLC	Amersham Pharmacia Biotech
AvAnti™ J-30 I Centrifuge	Beckman
AxioCam MRc (Mikroskop)	Zeiss
BioMate™ - Photometer	Thermo Spectronic
Brutschrank (ohne CO_2)	Heraeus
CASY®-Zellzählgerät	Schärfe System
CO_2 Inkubator (MCO-17AIC)	Sanyo
Eismaschine AF 100	Scotsman
Electrophoresis Power Supply EPS 300 (Protein)	Amersham Pharmacia Biotech
Electrophoresis Power Supply EPS 600 (DNA)	Amersham Pharmacia Biotech
Feinwaage	Satorius
Fluoroskan Ascent FL	Labsystems
Heizblock - HBT 130	HLC
High Efficiency Cell Transfection (HECTRA)	Grohmann
High Efficiency Colony Picker (HECOP)	Genetix
High Efficiency DNA Isolation Station (HEDIS)	Grohmann
High Efficiency Readout Station (HEROS)	Beckmann
Innova™ 4200 - Incubation Shaker	New Brunswick Scientific
Kühltischzentrifuge - Centrifuge 5417R	Eppendorf
Laborwaage	Kern
Lumi Imager F1™	Boehringer Mannheim
Megafuge 1.0	Heraeus
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Multi Temp III	Amersham Pharmacia Biotech
NeoLab-Mikro-Zentrifuge	NeoLab
OPTImax Microplate Reader (ELISA)	Molecular Devices
Optimax Typ TR (Entwicklermaschine)	MS Laborgeräte
PCR-Maschine (T3 Thermocycler)	Biometra®
pH-Meter	InoLab
Power Pac 300 (für Trans-Blot® SD)	Bio-Rad
REAX top - Vortexer	Heidolph
Sigma 4K 15C - Laborzentrifuge	Laboratory Centrifuges
Sterilwerkbank (Zellkultur)	BDK
Thermomixer Compact	Eppendorf
Tischzentrifuge - 5415 D	Eppendorf
Trans-Blot® SD (Semi Dry)	Bio-Rad
Transilluminator white/ultraviolet	Ultra-Violet-Products
UV-Lampe - HBO50	Zeiss
Varifuge 3.0R	Heraeus

3.6 Kulturmedien und Platten

3.6.1 Medium für HEK 293- und HeLa-Zellen

Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
+ 5 % FCS (HEK) bzw. 10 % FCS (HeLa)	Gibco
+ 2 mM Glutamin	Gibco
+ 100 units/ml Penicillin G	Gibco
+ 100 µg/ml Streptomycin	Gibco
+ 1 mM Natriumpyruvat	Sigma

3.6.2 Medium für HUVECs und HMVECs

Endothelial Cell Basal Medium (EBM®)	Clonetics
+ 10 ng/ml hEGF	Clonetics
+ 1 µg/ml Hydrocortison	Clonetics
+ 3 µg/ml BBE	Clonetics
+ 2 % (HUVECs) bzw. 5 % (HMVECs) FBS	Clonetics
+ 50 µg/ml Gentamicin	Clonetics
+ 50 ng/ml Amphothericin B	Clonetics

3.6.3 Medium für NHDF

Fibroblast Basal Medium (FBM®)	Clonetics
+ 1 ng/ml hFGF	Clonetics
+ 5 µg/ml Insulin	Clonetics
+ 2 % FBS	Clonetics
+ 50 µg/ml Gentamicin	Clonetics
+ 50 ng/ml Amphotericin B	Clonetics

3.6.4 Sonstige Materialien für Zellkultur

AlamarBlue™	Biosource international
Albumin, Bovine (Fraction V Powder)	Sigma-Aldrich
Amphotericin B	PromoCell GmbH
$CaCl_2$ Dihydrat	Roth
CASY®-Cups mit Deckel; CASY®-Ton-Messlösung	Schärfe Systems
Cell Culture Insert, 3 µm and 8 µm Porengröße	Falcon
Chloroquin	Sigma-Aldrich
Collagen (Type I; From Rat Tail)	Sigma-Aldrich
Cryo-Röhrchen 2 ml, freistehend	Roth
DAPI	Sigma-Aldrich
DMSO (für Molekularbiolgie)	Roth
ER-Tracker™ Blue-White DPX	Molecular Probes
Falcon Companion TC Plate	Falcon

Gelatine (2 %-Solution,Type B: From Bovine Skin)	Sigma-Aldrich
Gentamicin	PromoCell GmbH
HEPES	Roth
Nystatin (5.000 unit/mg)	Sigma-Aldrich
Puromycin	Clontech
Trypsin-EDTA (10 x)	Gibco BRL Life Technologies
Zellkultur 6-, 12- und 96 Wells (Nunclon Surface)	NUNC Brand Products
Zellkulturflaschen (75 cm^3)	TPP
Zellkulturschalen (10 cm) Nunclon Surface	NUNC Brand Products
ZelluTrans - Dialyseschlauch (reg. Zellulose)	Roth

3.7 Nukleinsäuren

3.7.1 PCR-Primer

Sämtliche Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, München) bezogen:

 # SEP-aa167-NotI_rev 5` -GCGGCCGCATCTGGGGCTGAGCGTCTGC- 3`
 # SEP-aa167-Stop_rev 5` -CTATCTGGGGCTGAGCGTCTGCAGGGC- 3`
 # SEP-aa236-NotI_rev 5` -GCGGCCGCACCTGGGGGTGGAACGGGCC- 3`
 # SEP-aa236-Stop_rev 5` -CTACCTGGGGGTGGAACGGGCCAGGGGC- 3`
 # SEP-aa510-NotI_rev 5` -GCGGCCGCACCTGTGGCATGGCACCTCCC- 3`
 # SEP-aa510-Stop_rev 5` -CTACCTGTGGCATGGCACCTCCCTCTCC- 3`
 # SEP-Start_for 5` -GCAGCAATGCCGTTTGCTGAAG- 3`
 # SEP-aa37 (+) ATG_for 5` -GCAGCAATGAGAGACCAGGATCGACTGCGGGCC- 3`
 # SEP-aa37 (-) ATG_for 5` -AGAGACCAGGATCGACTGCGG- 3`
 # SEP-full (+) Stop_rev 5` -TCACTAGTGCAGACGCCGCCG- 3`
 # SEP-full (-) Stop_rev 5` -GTGCAGACGCCGCCGGTACAGC- 3`
 # SEP1-510-GFP-del-ATG_for 5`-CCACAGGTGCGGCGGCGTGGTGAGCAAGGGC- 3`
 # SEP1-510-GFP-del-ATG_rev 5` -GCCCTTGCTCACCACGCCGCCGCACCTGTGG- 3`
 # SEP-GFP-del ATG_for 5` -GTCTGCACTGCGGCGGCGTGGTGAGCAAGGGC- 3`
 # SEP-GFP-del ATG_rev 5` -GCCCTTGCTCACCACGCCGCCGCAGTGCAGAC- 3`
 # SEP-aa283 (+) ATG_for 5` -GCAGCAATGTCCAGTGGGGCAGAGGCACC- 3`
 # SEP-aa283 (-) ATG_for 5` -TCCAGTGGGGCAGAGGCACC- 3`
 # SEP-aa373 (+) Stop_rev 5` -CTACTAGCTGCTCCCGTCAGTGGG- 3`
 # SEP-aa373 (-) Stop_rev 5` -GCTGCTCCCGTCAGTGGG- 3`

3.7.2 Plasmide

- pCMV-SPORT 6 (Invitrogen)
- pcDNA3.1/V5-His-TOPO® (Invitrogen)
- pCR3.1 (Invitrogen)
- pSecTag/FRT/V5-His TOPO® (Invitrogen)
- pcDNA3.1(+) (Invitrogen)
- pPUR (Clontech)
- pSRE-SEAP (Clontech)

3.7.3 cDNA-Kollektionen

- MGC (Mammalian Gene Collection) - Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD), Berlin
- OriA/B und OriC - OriGene Technologies Inc, Rockville

3.8 Organismen

3.8.1 Bakterienstämme

- E. coli DH5α (Invitrogen):
  F$^-$Φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(rk$^-$, mk$^+$) *pho*A *sup*E44 *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 λ-
- TOP10 cells (Invitrogen) (Grant et al., 1990):
  F$^-$mcrA Δ(*mrr-hsd*/RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *deo*R *ara*D139 Δ(*ara-leu*) 7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G

3.8.2 Zellkulturlinien

- CHO (85050302) - ECACC (European Collection of Cell Cultures)
- COS-7- DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
- HEK 293 - DSMZ
- HeLa - DSMZ
- HMVEC-d - Dermal Microvascular Endothelial Cells, Neonatal - Clonetics
- HUVEC-p - Umbilical Vein Endothelial Cells, Pooled - Clonetics
- HUVEC-p - Umbilical Vein Endothelial Cells, Pooled - PromoCell GmbH
- NHDF - Dermal Fibroblasts, Neonatal - Clonetics

3.9 Proteine und Peptide

3.9.1 Antikörper / Antiseren

Primäre Antikörper			
Antikörper (Ak)	**Firma**	**Art / Antigen**	**Verdünnung**
Anti-V5	Invitrogen	Monoklonaler Maus / V5	1:5.000
SA3090	Eurogentec	Polyklones Kaninchenserum / SEP-Protein	1:2.000
A125	Eurogentec	Affinitätsgereinigter Kaninchen AK / SEP-Protein	1:5.000
A126	Eurogentec	Affinitätsgereinigter Kaninchen AK / SEP-Protein	1:5.000
Anti-Hu-Golgin-97	Molecular Probes	Monoklonaler Maus Ak / humanes Golgin-97	1:50
Sekundäre Antikörper			
Antikörper (Ak)	**Firma**	**Art**	**Verdünnung**
Cy™3-konjugiert	Dianova	Monoklonaler Ziege / Maus-IgG	1:50
PO-konjugiert	Dianova	Monoklonaler Ziege / Maus-IgG	1:10.000
PO-konjugiert	Dianova	Monoklonaler Ziege / Kaninchen-IgG	1:10.000
AP-konjugiert	Promega	Monoklonaler Ziege / Maus-IgG	1:7.500
AP-konjugiert	Promega	Monoklonaler Ziege / Kaninchen-IgG	1:7.500

3.9.2 Enzyme

Sämtliche Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen

3.9.3 Rekombinante Wachstumsfaktoren

Humanes VEGF-A (165) (aus E. coli- und Insekten-Zellen) - Reliatech GmbH, Braunschweig
Humanes PDGF-BB (aus E. coli) - Strathmann Biotech GmbH
Humanes aFGF (aus E. coli) - Reliatech GmbH, Braunschweig
Humanes bFGF (aus E. coli) - Reliatech GmbH, Braunschweig

3.9.4 Synthetische Peptide

SEP-Peptide wurden bei der Firma Metabion (Planegg) synthetisiert.

Sequenzen:

Peptidgemisch „Wobble“ - besteht aus folgenden vier Einzelpeptiden:

1. LPSKLPT, 2. LPSKVPT, 3. VPSKLPT und 4. VPSKVPT

Peptid „Dimer“ - APSKLPINSTRAGMVPSKVPT

Der HPLC bestimmte Reinheitsgrad lag über 70 %. Die Peptide wurden in 0,1 % TFA gelöst.

3.10 Puffer und Lösungen

Sämtliche Puffer wurden nach „Current Protocols in Molecular Biology Vol. 1 - 4“ (2001) angesetzt.

Western Block-Lösung 5 g Milchpulver ad 100 ml TBST	**EtBr-Stocklösung** 10 mg/ml ddH_2O Konzentration in Agarosegel: 0,5 µg/ml
10 x PBS (Autoklavieren) 80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid 11,5 g Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 2 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1 l ddH_2O	**SDS-Probenpuffer (5 x)** 200 mM Tris/HCl, pH 6,8 10 % SDS 50 % Glycerol 500 mM DTT 0,5 % Bromphenolblau
10 x TBS (Autoklavieren) 100 ml 1 M Tris pH 8 300 ml 5 M NaCl ad 1 l ddH_2O	**TBST** 100 ml 10 x TBS 20 ml 10 % Tween 20 (0,2 %) ad 1 l ddH_2O
1 M Tris pH 8,0 (Autoklavieren) 121,1 g Tris in 800 ml ddH_2O lösen pH 8,0 mit 42 ml rauchender HCl einstellen	**1,5 M Tris pH 8,8 (Autoklavieren)** 181,65 g in 800 ml ddH_2O lösen pH 8,8 mit ca. 40 ml rauchender HCl einstellen ad 1 l ddH_2O

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer (Laemmli 1970)	**Western Transfer-Puffer**
30,28 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS oder 100 ml 10 %-Lösung 100 mg NaN_3 ad 1 l ddH_2O, pH 8,3	5,82 g Tris 2,93 g Glycin 3,75 ml 10 % SDS 200 ml 100 % Methanol ad 1 l ddH_2O
50 x TAE-Puffer	**6 x DNA-Probenpuffer für Agarosegel**
242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1 l ddH_2O	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 30 % Glyerin in ddH_2O
2 x HBS	**Zell-Lysepuffer (2 % Triton X 100)**
16,4 g NaCl 11,9 g HEPES 0,25 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O pH 7,05 mit NaOH einstellen ad 1 l ddH_2O	20 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 2 % Triton X 100 in Protease-Inh.-H_2O (1 Tabl./25 ml)
5 x LB	**SOC-I-Medium (Autoklavieren)**
10 g/l Pepton aus Casein 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl autoklavieren und dann 20 mg/ml Ampicillin	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl 0,25 M KCl, 2 M $MgCl_2$ und 1 M Glukose pH 7,0 einstellen mit NaOH ad 1 l ddH_2O
Imag A (Wash)	**Imag B (Elution)**
50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 30 mM Imidazol pH 8,0 mit NaOH einstellen ad 1 l ddH_2O	50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 500 mM Imidazol pH 8,0 mit NaOH einstellen ad 1 l ddH_2O
P1	**P3**
50 mM Tris pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 0,1 mg/ml RNase A (Qiagen)	3 M KAc pH 5,5
	P4
	2,5 % SDS in Isopropanol
P2	**TE (Autoklavieren)**
200 mM NaCl 1 % SDS	10 mM Tris-HCl pH 7,4 1 mM EDTA pH 8,0
Puffer für SEP-ELISA:	
Coating Buffer (0,1 M Carbonate Buffer, pH 9)	**Assay diluent Buffer**
8,4 g $NaHCO_3$ 3,56 g Na_2CO_3 pH 9,5 mit NaOH einstellen ad 1 l ddH_2O	10 % FCS in 1 x PBS
Stop Solution	**ELISA wash Buffer**
2 N HCl	0,05 % Tween 20 in 1 x PBS

4 Methoden

4.1 Proteine

4.1.1 Anreicherung und Aufreinigung von Proteinen

4.1.1.1 Markierung von Proteinen mit einem V5-His-Fusionsprotein

Sämtliche Proteinmarkierungen wurden mit dem pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Expression Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Klonierungen der PCR-Produkte in die TOPO-Vektoren erfolgt durch eine Topoisomerase. Auf diese Weise wird der eingebrachten DNA-Sequenz N-terminal eine CMV-Promotor-Sequenz vorgeschaltet und C-terminal die Sequenz für ein V5/His-Fusionspeptid angehängt. Diese ermöglicht den Nachweis der exprimierten Fusionspeptide durch einen kommerziell erhältlichen Anti-V5-Antikörper (Invitrogen). Zusätzlich befindet sich am C-Terminus eine Poly-Histidinsequenz (6 x), die beispielsweise für die Aufreinigung über Nickel-Agarose genutzt wurde (4.1.1.2).

4.1.1.2 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie Histidin-markierter Proteine

Mit Hilfe der Nickel-Agarose können His-Fusionsproteine spezifisch aufgereinigt werden. Diese besteht aus 6 % Agarose-beads, an die eine chelatbildende Gruppe immobilisiert wurde, welche mit Ni^{2+}-Ionen geladen ist und selektiv Histidine binden kann. Die Bindung erfolgt unter nativen Bedingungen, bei denen das His-Fusionsprotein funktionell aktiv bleibt. Die Elution erfolgt mit Imidazol, einem His-Analogon.

Die HEK 293-Überstände werden 48 h nach der Transfektion gewonnen. Um Zelltrümmer und tote Zellen zu entfernen, werden die Überstände für 10 min bei 2.500 rpm zentrifugiert. Die Nickel-Agarose wird vor ihrem Einsatz gewaschen, da sie in 20 % Ethanol aufbewahrt wird. Dabei wird das 5-fache Volumen an PBS zugegeben, die Lösung gemischt, 5 sec bei 1.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem dritten Waschschritt wird das Gelbett dem gleichen Volumen PBS versetzt und dieses Gemisch in ein 50 ml Falcon überführt. Zur Aufreinigung größerer Proteinmengen werden auf 200 µl Nickel-Agarose 25 ml Überstand zugesetzt und anschließend für 3 h auf einem Schüttler bei 4° C inkubiert. Danach werden die Ansätze auf Plastiksäulen (Poly Prep, 10 ml) gegeben und der Durchlauf aufgefangen, da dieser zur Kontrolle der Aufreinigungseffizienz dient. Nachdem die komplette Probe durchgelaufen ist und sich die Agarose vollständig abgesetzt hat, folgen 3 Waschschritte mit 2 ml Imag A. Die Elution der gebundenen Proteine wird dann mit 2 ml Imag B erreicht. Zur Entfernung des Imidazols müssen die Eluate dialysiert werden (4.1.2).

Vor einem Proliferationsversuch (4.4.6) erfolgt die Dialyse in PBS, vor einer Anionenaustauschchromatographie (4.1.1.4) in einem Niedrig-Salzpuffer (20 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8 und 10 % Glycerol). Zur längeren Aufbewahrung werden die Eluate auf Trockeneis schockgefroren und bei - 20° C gelagert.

4.1.1.3 Abreicherung von V5-Fusionsprotein mittels Immunpräzipitation

Die Abreicherung (Depletion) von V5-Fusionsproteinen aus Überständen wurde mit Hilfe eines murinen Anti-V5-Antikörpers (Invitrogen) und Protein-G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Diese Sepharose besitzt eine hohe Affinität für Immunglobuline aus der Maus und lässt sich leicht sedimentieren.

Zu Beginn werden 0,45 µl Antikörperlösung (1:1.000) zu 450 µl Überstand gegeben und der Ansatz für 3 h auf einem Schüttler bei 4° C inkubiert. Anschließend werden gebildete Protein-Antikörperkomplexe an die Protein-G-Sepharose gebunden. Für 450 µl Überstand werden 50 µl Gelbett eingesetzt. Da die Sepharose in einer Suspension in 20 %-igem Ethanol aufbewahrt wird, muss zuvor ein Waschschritt erfolgen. Dabei wird das 2-fache Volumen (100 µl) von dem gewünschten Gelbettvolumen (50 µl) entnommen und 1 ml PBS zugegeben. Nach dem Mischen wird bei 10.000 rpm für 30 sec zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Nach 3-facher Wiederholung wird die Sepharose zu der Protein-/Antikörper-Lösung gegeben und für 3 h auf einem Schüttler inkubiert. Danach erfolgt eine 1-minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm und die vorsichtige Gewinnung des Überstandes. Dieser kann nachfolgend für einen Proliferationsversuch (4.4.6) oder eine Westernblot-Analyse verwendet werden (4.1.3.2). Das Sediment wird dagegen 3 x mit 1 ml PBS gewaschen, mit 150 µl 1 x SDS-Probenpuffer (3.10) versetzt, 5 min auf 95° C erhitzt und dient im Westernblot zur Bestimmung der Abreicherungseffizienz.

4.1.1.4 Aufreinigung mit Anionenaustauschchromatographie (ÄKTA)

Bei dieser Methode werden Proteine aufgrund unterschiedlicher elektrostatischer Wechselwirkungen mit einer geladenen Matrix, die kovalent geladene Gruppen enthält, aufgetrennt. Hierbei sind vor allem der isoelektrische Punkt und die Oberflächenladung des Proteins entscheidend. Aber auch das Ionenaustauscher-Material, der pH-Wert und die Ionenstärke der verwendeten Puffer spielen eine Rolle. Bei einem Anionenaustauscher werden Proteine im pH-Bereich oberhalb ihres isoelektrischen Punktes reversibel gebunden. Eine Erhöhung der Ionenstärke bzw. der Salzkonzentration verstärkt die Konkurrenz um die Bindungsstellen des Ionenaustauschermaterials und vermindert gleichzeitig die Bindungskräfte der absorbierten Proteine. Dieser Effekt dient daher zur Elution gebundener Moleküle.

Die Durchführung erfolgt mit der ÄKTA-FLPC, dem Fraktionssammler Frac 900 und fertig gepackten Säulen (HiTrap Q FF, 1 ml) der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Vor dem Lauf werden sämtliche Puffer steril filtriert und entgast. Die proteinhaltige Lösung stammt aus einer vorherigen NTA-Agarose-Aufreinigung (4.1.1.2) und wird vor dem Auftrag auf die Säule bei 4° C für 10 min mit 14.000 rpm zentrifugiert. Der Anschluss der Schläuche an die Säule und die Puffer erfolgt frei von Luftblasen. Anschließend wird das Säulenmaterial mit 3 ml Puffer A (10 mM Tris, pH 7,4) äquilibriert. Dieser und nachfolgende Schritte werden mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem Maximaldruck von 0,5 MPa durchgeführt. Nach dem Probenauftrag werden ungebundene Proteine mit 5 ml Puffer A von der Säule gewaschen. Daran schließt sich die Elution gebundener Proteine durch einen linearen Salz-Gradienten von 0 bis 40 % (w/v) Puffer B (10 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7,5) an. Die ersten beiden gesammelten Fraktionen haben ein Volumen von 1 ml, die restlichen von 500 µl. Die Eluate können nach dem Zusatz von Penicillin/Streptomycin-Lösung (1:100) bei 4° C gelagert werden. Zur Regenerierung wird die Säule mit 5 ml 1 M NaCl gewaschen. Vor erneuter Benutzung müssen diese gründlich mit ddH_2O, 20 % Ethanol und wieder mit ddH_2O gewaschen und erneut äquilibriert werden. Die Lagerung der Säule erfolgt in 20 % Ethanol bei 4° C.

4.1.2 Dialyse

Die Dialyse einer Lösung ist erforderlich, um ein Protein in einen gewünschten, definierten Puffer zu überführen. Sie wird beispielsweise nach einer Nickel-Säule (4.1.1.2) durchgeführt, um das Imidazol zu entfernen und das Protein für einen nachfolgenden Versuch in einen physiologischen Puffer zu überführen. Die Auswahl des Puffers hängt dabei von der sich anschließenden Analysemethode ab. Zur Dialyse werden die Proben in Dialyseschläuche (Roth) mit einem Ausschlussvolumen von 3 - 4 kDa überführt und gegen den ausgewählten Puffer dialysiert. Die Dialyse erfolgt bei 4° C, zuerst für 4 h in 2 l Puffer und anschließend über Nacht in frischem Puffer. Die Schläuche werden hierzu in das Gefäß gehängt und der Puffer mit einem Magnetrührer leicht bewegt.

4.1.3 Analysemethoden

4.1.3.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Elektrophorese wandern Proteine in einem elektrischen Feld. Bei der SDS-PAGE sorgt eine Vorbehandlung des Proteingemisches dafür, dass für die Wanderungsgeschwindigkeit nur die Masse ausschlaggebend ist. Durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert und die entfalteten Peptid-Ketten mit einer negativen Ladung

versehen. Proteine kleinerer Masse laufen schneller in dem quervernetzten Polyacrylamid-Gel und können so von Proteinen größerer Masse getrennt werden. Anhand eines Markers mit bekanntem Molekulargewicht kann über die zurückgelegte Laufstrecke im Gel das Molekulargewicht annähernd bestimmt werden.

Probenvorbereitung und Elektrophoresebedingungen:

Die Durchführung erfolgte mit fertigen Gradientengelen (4 - 20 %, Anamed) in „Novex Mini Cell" Gel-Laufkammern (Invitrogen). Die proteinhaltigen Proben werden mit 6 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min auf 95° C erhitzt und anschließend in die zuvor ausgespülten Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese dauert bei 120 - 180 V (400 mA) ca. 60 - 90 min. Nach dem Lauf werden die Gele mit den aufgetrennten Proteinen entweder für eine Westernblot-Analyse (4.1.3.2.) oder eine Coomassie-Proteinfärbung verwendet (4.1.3.5).

4.1.3.2 Westernblot-Analyse

Eine Westernblot-Analyse dient zum spezifischen Proteinnachweis mit Hilfe von Antikörpern. Die Proteine werden zuvor auf einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (4.1.3.1) und somit im denaturierten Zustand nachgewiesen. Die erhaltenen Proteinbanden werden durch transversale Elektrophorese, d.h. durch Anlegen einer Spannung senkrecht zur Ebene des Gels, auf eine Transfer-Membran (Nitrocellulose-Membran) übertragen. Auf dieser erfolgt schließlich die Nachweisreaktion.

Durchführung:

Nach der SDS-PAGE (4.1.3.1) werden das Gel und die Membran für 5 min in Transfer-Puffer äquilibriert. Danach werden auf die Anode des Trans-Blot SD Semi-Dry-Gerätes (BioRad) zwei mit Transfer-Puffer befeuchtete Whatmann Filter (3 MM), die Membran, das Gel und zwei weitere feuchte Whatmann Filter (3 MM) aufgelegt und die Apparatur mit dem Kathodendeckel geschlossen. Der Transfer erfolgt für 1 h bei 15 V. Im Anschluss daran werden die Markerbanden auf der Membran markiert und eine Ponceau S-Proteinfärbung durchgeführt. Hierfür wird für 5 min mit Ponceau S-Lösung inkubiert und dann mit Wasser wieder entfärbt, bis Banden zu erkennen sind. Zur Dokumentation kann ein Bild mit dem Lumi Imager (Boehringer) gemacht werden. Anschließend wird die Membran mit TBST vollständig entfärbt und freie Proteinbindestellen der Membranen durch Inkubation mit einer Blocklösung (5 % Milchpulver in TBST) abgesättigt (mindestens 30 min oder bei 4° C über Nacht). Danach folgt eine Inkubation mit dem 1. Antikörper, der entsprechend seiner Arbeitsverdünnung in die Blocklösung pipettiert wird. Die Inkubation dauert entweder 1 h bei Raumtemperatur oder läuft über eine Nacht bei 4° C. Danach wird die Membran 3 x 15 min mit TBST gewaschen

und weitere 1,5 h mit dem 2. Antikörper inkubiert. Je nach gewünschter Nachweismethode ist an diesen entweder Alkalische Phosphatase oder Peroxidase gekoppelt. Vor dem Nachweis wird die Membran 3 x 15 min in TBST und 1 x 10 min in TBS gewaschen. Die Proteinbanden werden in Abhängigkeit von dem 2. Antikörper mittels zwei verschiedener Nachweisreaktionen detektiert:

1.) Peroxidase - Enhanced Chemiluminescence-Nachweisreaktion (ECL)

Hierbei werden je 1,5 ml ECL1- mit ECL2-Reagenz gemischt und auf die Membranoberseite aufgetropft. Nach 5 min wird die Lösung von der Membran entfernt und die Membran in Folie eingepackt. Durch Auflegen eines Röntgenfilms (Amersham) in der Dunkelkammer und Entwicklung des Films werden Signale sichtbar. Je nach Intensität muss der Film zwischen 10 sec bis 2 h aufgelegt werden.

2.) Alkalische Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase wird durch Zugabe einer fertigen Reaktionslösung (Western Blue® - Substrate) auf der Membran sichtbar gemacht. Dazu werden 3 ml des Substrates gleichmäßig auf der Membran verteilt und so lange inkubiert, bis Banden sichtbar werden. Anschließend wird die Reaktion durch Waschen mit TBS gestoppt. Nach dem Trocknen der Membran wird mit dem Lumi Imager (Boehringer) eine Aufnahme gemacht.

4.1.3.3 Antikörperstrip von Membranen

Soll eine Membran in weitere Westernblots eingesetzt werden, müssen gebundenen Antikörper zuvor entfernt werden. Hierzu wird die Membran 3 x 10 min in TBST (oder über Nacht bei 4° C) gewaschen und danach 15 min in Westernblot Stripping Buffer (Pierce) geschüttelt. Vor der Antikörperzugabe erfolgen 3 Waschschritte (TBST) und eine Blockierung der Membran.

4.1.3.4 hSEP-V5-Sandwich-ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Der Enzym-gekoppelte Immunnachweis (ELISA) ist eine Methode zum Nachweis nativer Proteine. In dieser Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt, bei dem SEP-V5-Fusionsproteine zwischen zwei Antikörpern gebunden werden. Zur Detektion diente der Einsatz eines dritten Antikörpers, an den das Enzym Peroxidase gekoppelt ist. Die Puffer sind im Abschnitt 3.10 zu finden. Zu Beginn werden die 96 Wells (NUNC-Immuno™Plate) mit V5-Antikörper Lösung (2 µg/ml in 100 µl Coating-Buffer) befüllt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wird der Puffer abgesaugt und die Wells mit je 300 µl Wash-Buffer 3 x gewaschen. Dies geschieht durch Abkippen der Lösung in ein Waschbecken und Ausklopfen der restlichen Flüssigkeit auf Zewa-Papier. Danach werden je Well 200 µl Assay-

Diluent-Buffer zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (600 rpm) inkubiert. Auf diese Weise werden freie unspezifische Bindungsstellen blockiert. Im Anschluss daran erfolgen 3 Waschschritte wie zuvor. Nach dem letzten Waschschritt werden je 100 µl HEK 293-Überstand in die Wells pipettiert und dann für 2 h auf einem Schüttler (300 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5 weiteren Waschschritten erfolgt die Zugabe von 100 µl Assay-Diluent-Buffer, dem zuvor Anti-SEP-Antikörperlösung (SA3090) 1:1.000 zugesetzt wurde. Die Inkubation mit diesem dauert 1 h bei Raumtemperatur (300 rpm). Nach 5 erneuten Waschschritten wird für 30 min mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen IgG-Antikörper (1:5.000 in Assay-Diluent-Buffer) inkubiert. Danach folgen 7 Waschschritte, wobei zwischen jedem Schritt die Platte für 1 - 2 min im Puffer inkubiert wird. Im Anschluss daran werden je 100 µl TMB-Substrat pipettiert und ein Farbumschlag zu blau abgewartet. Ist eine Blaufärbung deutlich erkennbar, wird die Reaktion durch Zugabe von je 50 µl 2 N HCl gestoppt. Hierdurch erfolgt ein Farbumschlag zu gelb, der abschließend mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann. Je Ansatz werden 4-fach Bestimmungen durchgeführt. Zur Bestimmung von Hintergrundsignalen dienen Ansätze, bei denen nur TMB-Substrat und Stop-Lösung zugegeben werden. Diese Werte werden von den Übrigen vor der Auswertung abgezogen. Als Negativkontrolle werden neben SEP-, auch Leervektor-Überstände getestet.

4.1.3.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die Proteingele werden nach der Auftrennung in Coomassie-Färbelösung gegeben und 30 min auf dem Schüttler unter dem Abzug inkubiert. Anschließend wird die Färbe- durch Entfärbelösung ersetzt. Diese wird mehrmals gewechselt, bis Proteinbanden zum Vorschein kommen.

4.2 DNA

4.2.1 Analysemethoden

4.2.1.1 Agarosegelelektrophorese

Durch eine Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente aufgetrennt werden. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei hauptsächlich von ihrer Größe, der Stromstärke und der Agarosekonzentration ab. Mit Ethidiumbromid lässt sich die DNA im Gel anfärben, dieses interkaliert in die DNA und kann im UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Je nach Fragmentgröße wurde ein 1 - 2 %-iges Agarosegel (peqGOLD Universal) (Plasmid-

DNA: 1 %, PCR-Fragment: 2 %) verwendet. Dazu werden 1 - 2 g Agarose in 100 ml 1 x TAE durch Erhitzen gelöst. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) wird die Lösung gemischt, in eine Elektrophoresekammer gegossen und ein Kamm zur Erzeugung der Geltaschen eingesetzt. Nach Erstarren wird das Gel in eine Elektrophoreseapparatur überführt und mit 1 x TAE überschichtet. Die DNA-Proben werden mit DNA-Probepuffer (6 x) versetzt und in die Gel-taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung zwischen 80 V und 150 V (Electrophoresis Power Supply EPS 600, Amersham PB). Anschließend können die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Anhand eines Größenstandards (Roche) sind die DNA-Fragmentgrößen abschätzbar.

4.2.1.2 Bestimmung der Konzentration

Die DNA-Konzentrationbestimmung erfolgt durch eine photometrische Messung (Thermo Spectronic) bei einer optischen Dichte (OD) von 260 nm (OD_{260}). Durch Quotientenbildung von OD_{260}/OD_{280} wird außerdem der Reinheitsgrad der DNA-Lösung ermittelt. Die OD_{280} stellt ein Maß für den Proteingehalt bzw. Verunreinigungen dar. Der Wert für DNA sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Eine OD von 1 entspricht 50 µg doppelsträngiger DNA/ml. Die DNA-Konzentration errechnet sich nach folgender Formel:

OD_{260} x Verdünnungsfaktor x 50 µg/ml = (n) µg DNA/ml

Zur Messung wurden 1:20 Verdünnungen hergestellt. Als Verdünnungsmittel sowie als Referenz dient ddH_2O. Die Messung erfolgt in Quarzküvetten.

4.2.2 Klonierungstechniken

Sämtliche Klonierungsarbeiten wurden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (4.2.2.3), PCR (4.2.2.1) und dem TOPO-Kloning-Kit (4.1.1.1) (Invitrogen) durchgeführt. Dabei wurde der Expressionsvektor mit Restriktionsenzymen linearisiert und mit einem entsprechend geschnittenen PCR-Produkt oder Genfragment zur Ligation (4.2.2.4) gebracht.

4.2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der PCR wird mittels eines Systems aufeinander folgender DNA-Synthesen ein DNA-Abschnitt amplifiziert. Dazu werden zwei Oligonukleotide (Primer) benötigt, die die zu amplifizierende Sequenz eingrenzen und mit je einem der DNA-Stränge hybridisieren (Mullis, 1990). Sämtliche PCRs im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem Elongase Amplification System (Invitrogen) durchgeführt. Ein Standardansatz hat ein Endvolumen von 50 µl.

50 µl Ansatz:	**Reaktionspuffer**	**dNTP`s**	**Elongase**	**ddH_2O**	**Template**	**Je Primer**
Stockkonzentration	10 x	[2,5 mM]	[5 u/µl]		[x µg/µl]	[100 pmol]
Endkonzentration	1 x	25 mM	1 u	ad 50 µl	1 - 20 ng	100 pmol

PCR-Programm:

Schritt	**1.**	**2.**	**3.**	**4.**	**5.**	**6.**
Reaktion	Initiale DNA-Denaturierung	DNA-Denaturierung	Primer-Anlagerung	Amplifikation	Wiederholung der Schritte 2. - 4. (20 x)	Abschließende Amplifikation
Temperatur	94° C	94° C	*TM	68° C		94° C
Zeit	5 min	45 sec	45 sec	**min		45 sec

* TM steht für Schmelztemperatur, diese ist abhängig von der Primersequenz.

** Dauer ist abhängig von der Länge der DNA-Sequenz (ca. 1 kb/min)

Anschließend wird das Produkt durch eine Agarosegelelektrophorese (4.2.1.1) analysiert.

4.2.2.2 Punktmutagenese mittels „Quik-Change Site Directed Mutagenesis Kit“

Zur Klonierung der GFP-Fusions-Konstrukte wurde in der cDNA-Sequenz des GFPs ein Startcodon (ATG) entfernt. Dies erfolgte mit Hilfe eines Basenaustausches durch das „Quik-Change Site Directed Mutagenesis Kit“ nach den Herstellerangaben (Stratagene).

4.2.2.3 Restriktion von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Sämtliche Klonierungen wurden mit Restriktionsenzymen der Firma MBI Fermentas durchgeführt. Die Auswahl der Puffer- und Temperaturbedingungen erfolgte in Abhängigkeit von den verwendeten Enzymen nach Herstellerangaben. Der Verdau von 1 µg DNA wurde in einem 20 µl Ansatz durchgeführt und hatte folgende Zusammensetzung:

DNA (x µg/µl)	**Puffer (10 x)**	**Enzym 1 (x u/µl)**	**Enzym 2 (x u/µl)**	**ddH_2O**
(n) µl Plasmid oder PCR-Fragment (1 µg)	2 µl (1 x)	(n) µl (1 u)	(n) µl (1 u)	ad 20 µl

Zum Mischen wird der Ansatz mit einer Pipette 5 x aufgezogen. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37° C werden die DNA-Fragmente über ein Agarosegel aufgereinigt (4.2.2.8).

4.2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten (Rapid-Ligation-Kit, Roche)

Durch eine Ligasereaktion werden die zuvor geschnittenen (4.2.2.3) und gereinigten DNA-Fragmente (4.2.2.8) kovalent miteinander verknüpft. Die Ligation erfolgte mit Hilfe des Rapid-Ligation-Kits (Roche). Ein Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

Vektor-DNA (Plasmid)	**Insert-DNA (PCR-Fragment)**	**ddH_2O**	**Ligasepuffer (10 x)**	**Ligase (1 u/µl)**
0,05 - 0,1 pmol	0,1 - 0,5 pmol	ad 10 µl	1µl (1 x)	1 u

Die Mengen der geschnittenen DNA-Fragmente können über ein Agarosegel durch den Vergleich mit einem Standard-Größenmarker abgeschätzt werden. Der Ansatz wird für 5 - 30 min

bei 21° C inkubiert. Als Negativkontrolle dient ein Ligationsansatz mit geschnittenem Vektor ohne Insert. In die Transformation von E. coli-Zellen (4.3.1) wurden je 2 µl eingesetzt.

4.2.2.5 Plasmidpräparation aus einer Mini-Kultur (NucleoSpin® Plasmid)

Eine Plasmidpräparation aus einer Mini-Bakterien-Kultur wurde durchgeführt, um den Erfolg einer Klonierung zu überprüfen, oder um kleine Mengen (25 - 50 µg) an Plasmid-DNA zu gewinnen. Hierzu werden je 3 ml Kultur (LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin) angeimpft und über Nacht bei 37° C geschüttelt. Das Animpfen erfolgt entweder mit Bakterienkolonien von einer Agarplatte (4.3.1) oder mit bekannten Stock-Bakteriensuspensionen. Am nächsten Tag werden je 1,8 ml der Bakteriensuspension in ein 2 ml Eppendorf Gefäß überführt und 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Für die Plasmid-Präparation wurde ein Kit (NucleoSpin® Plasmid, Macherey-Nagel) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Ausbeute an Plasmid-DNA liegt zwischen 25 - 50 µg. Der Reinheitsgrad ist ausreichend für eine Transfektion (4.4.4).

4.2.2.6 Plasmidpräparation aus einer Maxi-Kultur (Nucleobond AX)

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde eine Bakterien-Kultur von 250 ml Medium verwendet. Zum Animpfen werden entweder eine Mini-Kultur (4.2.2.5) oder eine Glycerol-Stock-Bakteriensuspension verwendet, von der bekannt ist, dass sie das gewünschte Plasmid trägt. Die Plasmid-Präparation erfolgt mit einem Kit (Nucleobond AX, Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben, wodurch 0,25 - 1 mg DNA gewonnen werden.

4.2.2.7 Ethanol-Präzipitation von DNA

Durch eine Ethanol-Präzipitation kann DNA selektiv aus einer Lösung angereichert und in einer anderen aufgenommen werden. Der DNA-haltigen Lösung wird dazu das 2,5-fache ihres Volumens an Ethanol und Natriumacetat in einer Endkonzentration von 0,3 M zugegeben. Die Fällung erfolgt für 30 min im Eisbad. Anschließend wird das Präzipitat für 15 min bei 13.000 rpm sedimentiert. Zur Entfernung störender Salze werden zwei Waschschritte mit kaltem Ethanol (70 %) vorgenommen, das Pellet getrocknet und in definiertem Puffer gelöst.

4.2.2.8 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Je nach Größe der DNA-Fragmente wird ein 1 - 2 %-iges Agarosegel (4.2.1.1) verwendet. Die Elektrophoresedauer wird durch die Größendifferenz der zu trennenden DNA-Fragmente bestimmt. Nach dem Gellauf werden die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und ihr Gewicht bestimmt. Die weiteren Schritte erfolgen mit dem Gel Extraction Kit (QIAquick) nach Herstellerangaben.

4.3 Bakterien

4.3.1 Transformation von kompetenten Bakterienzellen

Für die Transformation wurden die kompetenten E. coli-Zellen des TOPO-Kloning-Kits (Invitrogen) TOP10 (Grant et al., 1990) verwendet. Das Auftauen der Zellen erfolgt auf Eis. Anschließend werden je 25 µl Zellsuspension zu 2 µl Ligationsansatz (4.2.2.4) gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgt der Hitzeschock für 1 min bei 42° C und 5 min Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 250 µl SOC-I-Medium wird die Bakteriensuspension für 1 h in einem Thermoschüttler (300 rpm) bei 37° C inkubiert. Zum Ausplattieren werden die Bakterien für 5 min bei 3.000 rpm sedimentiert und danach 150 µl Überstand auf eine Hälfte einer Standard I Amp-Agarplatte ausgestrichen. Das Pellet wird im restlichen Medium resuspendiert und auf der anderen Hälfte der Agarplatte verteilt. Die Platten werden dann über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag können gewachsene Bakterienkolonien zum Animpfen einer Minikultur (4.2.2.5) gepickt werden.

4.4 Zellkultur

4.4.1 Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen

Vor Entnahme der Zellen aus Flüssigstickstoff wird eine neue Zellkulturflasche mit 12 ml Wachstumsmedium befüllt und für 30 min im 37° C Brutschrank inkubiert. Zum Auftauen wird das gefrorene Cryo-Röhrchen für 1 min in ein 37° C Wasserbad gehalten und dann 1 ml des vorgewärmten Mediums zugegeben. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wird die Suspension gemischt und in die vorbereitete Flasche überführt. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt und das Anwachsen der Zellen mikroskopisch kontrolliert.
Zum Einfrieren werden die Zellen trypsiniert (4.4.3), in 10 ml DMEM (10 % FCS) aufgenommen und 2 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 3 ml Einfriermedium (10 % DMSO, 10 % FCS und 80 % Wachstumsmedium) vorsichtig resuspendiert und nach der Zellzahlbestimmung in 2 ml Cryo-Röhrchen aliquotiert. Die jeweils aliquotierten Zellzahlen sind abhängig von der Zellart und richten sich nach den Angaben der Vertreiberfirma. Durch die Verwendung von Cryo-Boxen (mit Isopropanol) wird dafür gesorgt, dass die Zellsuspension langsam auf - 80° C abkühlt. Für längerfristige Lagerungen werden die Zellen nach 6 h in Flüssigstickstoff überführt.

4.4.2 Beschichtung der Zellkulturgefäße von HUVECs

Zur Kultivierung der HUVECs (Cambrex) müssen die Zellkulturgefäße zuvor mit Gelatine beschichtet werden. Hierzu wird eine 2 %-ige Stocklösung (Sigma) mit sterilem ddH_2O 1:10 verdünnt, der Gefäßboden überschichtet und für 30 min bei 37° C inkubiert. Nach Absaugen der Lösung können die Gefäße direkt verwendet oder 1 Woche bei 4° C aufbewahrt werden.

4.4.3 Passagieren von Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in wassergesättigter Atmosphäre, 5 % CO_2 und 37° C in einem Brutschrank. Alle verwendeten Zellen wachsen adhärent und werden 1 - 2 mal pro Woche umgesetzt. Abhängig von der Zellart, der Dauer bis zum nächsten Passagieren und der Zellkulturflaschengröße werden verschiedene Zellzahlen ausgesät. Je nach Zellart variieren die Protokolle in den Medien (3.6), der Dauer der Trypsinierung und den Zellaussaatdichten. Zunächst wird die allgemeine Vorgehensweise beschrieben und in den anschließenden Abschnitten (4.4.3.1 bis 4.4.3.4) zellartspezifische Besonderheiten angemerkt.
Zuerst wird das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 8 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen werden 2 ml 1 x Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco) zugegeben, durch Schwenken die Lösung gleichmäßig verteilt und das Ablösen der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wird durch Zugabe von 8 ml DMEM (10 % FCS, bei HEK 293-Zellen 50 % FCS) die Trypsinierung gestoppt und die Zellen vorsichtig vom Flaschenboden abgespült. Nach Überführung in ein 15 ml Falcon wird für 2 min bei 1.000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in 3 - 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Zur Zellzahlbestimmung werden 10 ml Casyton-Lösung (Schärfe System) in ein Casy-Röhrchen vorgelegt und 100 µl der Zellsuspension hinzu pipettiert. Die Messung erfolgt mit dem CASY®-Zellzählgerät.

4.4.3.1 Passagieren von HEK 293-Zellen

Bei HEK 293-Zellen (Graham et al., 1977) ist zu beachten, dass diese sich bereits nach 60 - 90 sec vollständig lösen. Umgehend danach müssen die Zellen in 50 %-igem DMEM aufgenommen werden, um Zellschädigungen durch eine zu lange Trypsinwirkung zu vermeiden. In Abhängigkeit von dem neuen Gefäß und der folgenden Kultivierungsdauer werden verschiedene Zellzahlen ausgesät. In eine T75-Flasche werden für 1 Tag $6*10^6$, für 2 Tage $2{,}2*10^6$, für 3 Tage $1{,}1*10^6$ und für 4 Tage $0{,}8*10^6$ Zellen zugegeben. In eine T225-Flasche sind es $2*10^7$ Zellen für einen Tag, $6{,}5*10^6$ für 2 Tage und $3{,}5*10^6$ für 3 Tage.

4.4.3.2 Passagieren von HeLa-, MS1- und bEnd3-Zellen

Das Umsetzen der HeLa- (Scherer et al., 1953), bEnd3- (Montesano et al., 1990) und MS1-Zellen (Arbiser et al., 1997) erfolgt im Wesentlichen wie bei den HEK 293-Zellen (4.4.3.1). Unterschiede sind, dass die Trypsinierung 3 - 6 min dauert und die Zellen nicht gezählt, sondern anteilig auf neue Flaschen verteilt werden. Alle drei Zelllinien werden stets in T75-Flaschen kultiviert und die Zellen für 3 Tage 1:4 - 1:6 und für 4 Tage 1:10 verdünnt.

4.4.3.3 Passagieren von primären Endothelzellen - HUVECs und HMVECs

Bei primären Endothelzellen, den HUVECs (Watson et al., 1995) und HMVECs (Carley et al., 1992) der Firma Cambrex müssen die Zellkulturgefäße zuvor mit Gelatine beschichtet werden (4.4.2). Die Dauer der Trypsinierung variiert bei diesen Zellen stark und beträgt zwischen 2 - 6 min. Zur Vermeidung einer zu langen und dadurch schädlichen Trypsinbehandlung ist eine fortwährende mikroskopische Kontrolle wichtig. Dieser Schritt kann alternativ auch bei 37° C erfolgen, dann dauert das Ablösen ca. 1 - 2 min. Die Haltung erfolgt in T75-Flaschen und für 2 Tage werden $1{,}2*10^6$ Zellen, für 3 Tage $0{,}9*10^6$, für 4 Tage $0{,}5*10^6$ und für 5 Tage $0{,}4*10^6$ in eine Flasche gegeben. Alle 2 Tage erfolgt ein Mediumwechsel.

4.4.3.4 Passagieren von primären Fibroblastenzellen - NHDF

Primäre Fibroblasten wurden in T25-Flaschen kultiviert. Wie bei den Endothelzellen (4.4.3.3) erfolgt während der Trypsinierung eine fortwährende mikroskopische Kontrolle. Die Dauer bis zum Lösen variiert zwischen 2 - 6 min (Shipley et al., 1989). Zum Umsetzen werden die Zellen verdünnt in Flaschen ausgesät. Erfolgt die Haltung für 2 Tage, werden ein 1/3 der trypsinierten Zellen in eine T25-Flasche gegeben, bei 3 Tagen ist es 1/6 und bei 4 Tagen 1/10.

4.4.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Je nach Zelltyp werden verschiedene Reagenzien und Protokolle angewendet.

4.4.4.1 Transfektion von HEK 293-Zellen

Die Transfektion von HEK 293-Zellen erfolgte mit der Kalziumphosphat-Präzipitations-Methode. Hierzu werden 24 h vor der Durchführung $2{,}1*10^4$ Zellen in 100 µl Medium je 96 Well einer Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Herstellung der DNA-Präzipitate wird in 96 Well-Spitzbodenplatten vorgenommen, wobei ein 7-facher Ansatz gemacht wird. Zunächst wird die DNA mit ddH_2O auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl verdünnt und je Well 25 µl vorgelegt. Anschließend folgt die Zugabe von 35 µl HBS (2 x), 10 µl $CaCl_2$ (0,67 M) und Mischen der Lösung durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Mehrkanalpipette. 20 min dar-

auf werden 10 µl der Ansätze zu den Zellen gegeben und weitere 4 h darauf das Medium gewechselt. Erfolgt anschließend ein Proliferationsversuch (4.4.6) wird das Medium durch ein 1,5 %-iges DMEM-Mangelmedium ersetzt. Bei der Durchführung in 6 Well-Platten werden je Well $1*10^6$ Zellen in 2 ml Medium ausgesät und die Transfektionsansätze in Eppendorf Gefäßen hergestellt. Je Well werden 15 µl DNA (0,1 µg/µl) vorgelegt, dazu 95 µl ddH_2O und 12,5 µl $CaCl_2$ (2,5 M) gegeben. Unter leichtem Vortexen werden 125 µl HBS (2 x) hinzugetropft und anschließend 15 min inkubiert. In der Zwischenzeit wird je Well ein Gemisch aus 30 µl Chloroquin (2 mM), 90 µl Serum (FCS) und 90 µl serumfreies DMEM gegeben. 4 h nach Zugabe von je 250 µl der Transfektionsansätze erfolgt ein Mediumwechsel.

4.4.4.2 Transfektion von HeLa-Zellen

Die Transfektion von HeLa-Zellen erfolgte mit FuGENE 6 Reagenz (Roche) und wurde im 6 Well-Format durchgeführt. Nach Aussaat von 500.000 Zellen/Well in 2 ml Medium kann am nächsten Tag transfiziert werden. Hierzu wird das FuGENE 6 Reagenz für 15 min bei Raumtemperatur erwärmt. Währenddessen wird je Ansatz 1 µg DNA in ein Eppendorf Gefäß gegeben und bis zu einem Volumen von 10 µl mit serumfreien DMEM aufgefüllt. In ein zweites Gefäß werden 87 µl serumfreies DMEM pipettiert und, ohne den Rand zu berühren zusätzlich 3 µl des FuGENE 6 Reagenz. Nach Vortexen beider Lösungen werden diese vereinigt, erneut gemischt und 15 min darauf vorsichtig zu den Zellen getropft. Nach 4 h Inkubation werden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und 2 ml frisches Kulturmedium zugegeben.

4.4.4.3 Transfektion von MS1- und bEnd3-Zellen

Die Transfektion von MS1- und bEnd3-Zellen wurde mit dem GenePorter (Peqlab) Reagenz durchgeführt. Das Protokoll bei den Zellen unterscheidet sich mit Ausnahme der Zellaussaatdichten nicht. Die Durchführung erfolgt in 12 Well-Platten. Hierzu werden am Tag vor der Transfektion je 55.000 MS1- bzw. 40.000 bEnd3-Zellen pro Well in 250 µl Medium ausgesät. Je Ansatz wurde 1 µg Plasmid-DNA in ein Eppendorf Gefäß vorgelegt und mit serumfreien DMEM-Medium auf 250 µl aufgefüllt. In ein weiteres Gefäß werden 245 µl desselben Mediums und 5 µl GenePorter gegeben. Nach Vortexen beider Lösungen werden diese vermischt und anschließend 25 min inkubiert. Schließlich wird das Kulturmedium der Zellen durch den fertigen Transfektionsansatz ersetzt. Ein Mediumwechsel erfolgt nach 3 h.

4.4.4.4 Erzeugung von stabilen Reportergen-Zelllinien

Mit Hilfe eines Puromycin-Resistenz-Gens wurden stabile Reportergen-Zelllinien erzeugt. Hierfür wird die SRE-Luziferase-Sequenz in den Vektor pPur (Clontech) umkloniert, der das

Resistenz-Gen konstitutiv exprimiert. Die Transfektion erfolgt in 12 Well-Platten (4.4.4.3). 2 Tage darauf werden die Zellen trypsiniert und auf 96 Well-Platten ausgesät. Je Zelllinie werden 2 Platten mit einer Zellsuspensionen befüllt, wobei diese zuvor so verdünnt werden, dass rechnerisch auf jedes vierte Well eine Zelle kommt. Die Selektion nach Zellen, die die transfizierte DNA stabil integriert haben, wird am nächsten Tag begonnen. In den folgenden Tagen werden die Wells fortwährend unter dem Mikroskop beobachtet. Dabei erfolgt eine Markierung derer, die nur eine Zelle enthalten, damit nur Einzel- und keine Mischklone expandiert werden. MS1-Zellklone werden mit 2 µg/ml Puromycin und bei den bEnd3-Zellen mit 3 µg/ml selektioniert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80 - 90 % werden die Zellklone in das nächstgrößere Plattenformat umgesetzt, bis schließlich genügend Zellen für eine T25-Flasche vorhanden sind. Ab diesem Zeitpunkt wird die Selektion ausgesetzt und es erfolgt die Testung (4.4.4.5).

4.4.4.5 Luziferase-Reportergenversuche

Die Durchführung der Luziferase-Reportergenversuche erfolgte mit Hilfe zweier Assay Systeme von Promega. Bei der Testung im transienten Reportergen-Assay wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System verwendet. Zur Testung der stabilen SRE-Luziferase-Reportergen-Zelllinien wurde das Luciferase Assay System benutzt.

Dual-Luciferase® Reporter Assay System:

Die Bezeichnung “dualer Reporter” rührt von der gleichzeitigen Expression und Messung zweier unterschiedlicher Luziferasen in einem Assay System her. Als eigentlicher Reporter für die Bestimmung proliferativer Aktivität diente der Vektor pPur-SRE-luc. Dieser kodiert für die Firefly-Luziferase, wohingegen der zweite Vektor (pRL-CMV) konstitutiv die Renilla-Luziferase kodiert. Die unterschiedlichen Substratanforderungen dieser beiden Luziferasen ermöglicht es, beide Enzymaktivitäten nach einer Umpufferung in einem Gefäß zu messen. Der pRL-CMV Vektor stammt von Promega und dient zur Standardisierung der Transfektionseffizienzen und zur Ermittlung der relativen Transkriptionsaktivität. Hierzu wird nach den Messungen das Verhältnis von Firefly- zu Renilla-Luziferase gebildet. Die Durchführung transienter Reportergen-Versuche erfolgt mit MS1- und bEnd3-Zellen jeweils im 12 Well-Platten. Je Well werden 900 ng pPur-SRE-Luc und 100 ng pRL-CMV transfiziert (4.4.4.3). Beim Mediumwechsel nach der Transfektion wird statt dem Komplettmedium ein DMEM-Mangelmedium (0,1 % Serum) zugegeben und die Zellen anschließend für 48 h inkubiert. Am Morgen des Messtages wird das Medium durch verschieden serumhaltige Medien oder serumfreies DMEM-Mangelmedium mit oder ohne rekombinante Wachstumsfaktoren

(je 10 - 50 ng/ml VEGF oder bFGF) ersetzt. Nach einer Inkubation von 3 - 8 h wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 250 µl PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Lyse der Zellen durch Zugabe von 100 µl PLB und einer 30-minütigen Inkubation. Für die Lumineszenz-Messung werden dann je Ansatz 25 µl in 96 Well-Messplatten (White combiplate 12, Labsystems) pipettiert. Bei den verwendeten Puffermengen gelten Angaben von Promega als Richtlinie. Die Dauer der Messung pro Probe wird von 2 auf 10 sec erhöht und erfolgt mit dem Fluoroskan Ascent FL (Labsystems).

Luciferase Assay System:

Die Durchführung dieses Assay Systems erfolgt zur Testung der stabilen Reportergen-Zelllinien (4.4.4.4). Die Testung der MS1- und bEnd3-Klone lief dabei nach demselben Protokoll ab. Hierbei werden je 2.000 - 3.000 Zellen/Well in 96 Well-Platten ausgesät und am Tag darauf das Medium gegen serumfreies DMEM-Mangelmedium ausgetauscht. Die Hungerphase kann hierbei zwischen 48 und 72 h dauern. Die Induktion der Firefly-Luziferase erfolgt wie zuvor durch Zugabe verschiedener Medien mit und ohne Serum bzw. rekombinanten Wachstumsfaktoren. Die Lyse und Messung wird ebenfalls wie bei dem dualen Reportergen-Assay durchgeführt. Der einzige Unterschied besteht in der Lyse der Zellen mit je 50 µl PLB.

4.4.4.6 Lokalisationsstudien von hSEP mit GFP-Fusionsprotein

Die Lokalisierung von SEP1-510 und SEP wurde mit Hilfe einer GFP-Fusion an jeweils dem C-terminalen Enden der beiden Konstrukte untersucht (4.2.2.2). Hierzu werden sowohl HEK 293- als auch HeLa-Zellen mit den beiden Konstrukten transfiziert (4.4.4.1 und 4.4.4.2). Die Aussaat der Zellen erfolgt dabei in 6 Well-Platten, auf deren Boden je Well 2 quadratische Glasplättchen (15 mm) liegen, um anschließende Färbungen besser durchführen zu können (4.4.4.8 - 4.4.4.10). Die Transfektion erfolgt mit je 1 µg DNA pro Well und die Zellen werden entweder lebend gefärbt und direkt fixiert oder zunächst fixiert und anschließend angefärbt.

4.4.4.7 Fixierung von Zellen für Immunfluoreszenzfärbungen

Die Fixierung der Zellen erfolgt, mit Ausnahme der Golgi-Färbung (4.4.4.10), nach der Anfärbung der Proteine oder Kompartimenten. Zu Beginn wird das Medium abgenommen, die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und die Glasplättchen in 12 Well-Platten überführt. Danach werden je 250 µl einer 2 %-igen Formaldehydlösung zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend werden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und dann mit 0,1 % Triton X 100 (in PBS) permeabilisiert. Es folgen 3 weitere Waschschritte mit PBS. Danach werden die Glasplättchen getrocknet, auf Objektträger in einem Tropfen (ca. 25 µl) 10 %-iger Glycerinlösung aufgelegt und mit Nagellack versiegelt.

4.4.4.8 ER-Färbung mit ER-Tracker

Die ER-Färbung erfolgt mittels ER-Tracker™ Blue-White DPX (Molecular Probes). Die Färbung erfolgt dabei durch Zugabe des Farbstoffs ins Wachstumsmedium der lebenden Zellen. Hierzu wird von der 1 mM Stocklösung so viel direkt ins Medium zugegeben, dass eine Endkonzentration von 100 nM vorliegt. Eine Verdünnung kann in PBS erfolgen. Nach Zugabe werden die Platten für 30 - 60 min bei 37° C inkubiert. Anschließend können die Zellen entweder direkt im DAPI-Filter mikroskopiert oder vorher fixiert werden (4.4.4.7.).

4.4.4.9 Hoechst-33342-Färbung von Zellkernen

In der eingesetzten Konzentration dient Hoechst-33342 (Intergen) als Vitalfarbstoff und führt zu keiner Beeinträchtigung der Zellen. Für die Färbung der Zellkerne wird die Hoechst-33342-Stammlösung (1 mg/ml) 1:1.000 in PBS verdünnt (1 µg/ml) und dem Wachstumsmedium so zugesetzt, dass eine Endkonzentration von 10 µg/ml erhalten wird. Nach einer Inkubation von 10 - 30 min werden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und können dann entweder sofort oder nach zuvoriger Fixierung mikroskopiert (DAPI-Filter) werden.

4.4.4.10 Golgi-Färbung mittels Anti-Golgin-97-Antikörper

Nach der Fixierung werden die Glasplättchen zunächst 2 x mit PBS gewaschen und schließlich mindestens 15 min mit 50 % FCS in FBS blockiert. Es folgt die Inkubation mit dem 1. Antikörper Anti-Golgin-97 (Molecular Probes) mit einer Endkonzentration von 2 µg/ml in 10 % FCS/PBST-Lösung für 3 h. Die Glasplättchen werden danach 3 x 5 min mit 10 % FCS/PBST-Lösung gewaschen und anschließend für 45 min mit dem 2. Antikörper (Cy™3-konjungierter Ziege-Anti-Maus, Dianova) in einer Konzentration von 14 µg/ml inkubiert. Es folgen 3 Waschschritte mit PBST und 1 x mit PBS. Schließlich werden die Glasplättchen wie nach der Fixierung eingedeckelt und versiegelt (4.4.4.7). Die Mikroskopie erfolgt bei einer Anregungswellenlänge von 543 nm und einer 1.000-fachen Vergrößerung.

4.4.5 Gewinnung von zytosolischen Zelllysaten

Die Präparation zytosolischer Lysate von transfizierten HEK 293-Zellen erfolgt, um einen Expressionsnachweis für ein Protein durchführen zu können (4.1.4.2). Dazu werden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, danach mit Lysepuffer (4° C) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Kerne 10 min bei 14.000 rpm und 4° C sedimentiert. Das zytosolische Lysat wird durch vorsichtiges Abnehmen des Überstandes erhalten.

4.4.6 Proliferationsversuch mit AlamarBlue

Eine Möglichkeit das Proliferationsverhalten einer Kultur zu bestimmen, basiert auf der Messung der Zellvitälität. Die Vitalität wird dabei durch einen AlamarBlue-Assay (Biosource) bestimmt. AlamarBlue hat keine toxische Wirkung auf Zellen und wird von ihnen so umgesetzt, dass anschließend sowohl eine fluorometrische als auch eine kolorimetrische Messung erfolgen kann (Fluoroskan Ascent FL Reader, Labsystems). Eine Zunahme der Zellzahlen spiegelt sich in den Ergebnissen durch eine Erhöhung der Messwerte gegenüber den Kontrollen wieder. Durch die Proliferationsversuche wird das Wachstumsverhalten der HUVECs nach Zugabe gereinigter rekombinanter Proteine oder verschiedener HEK 293-Überstände untersucht. Die Durchführung erfolgt dabei jeweils nach dem gleichen Prinzip. Zunächst erfolgt die Aussaat von je 2.800 Zellen HUVECs pro 96 Well in 100 µl Komplettmedium (3.6). Am Tag darauf wird das Medium entfernt, die Zellen mit 100 µl PBS gewaschen und anschließend 75 µl frisches HUVEC-Mangelmedium (EBM-Basal, 1 % FBS, 1 µg/ml Hydrocortison, 50 µg/ml Gentamicin und 0,05 µg/ml Amphothericin B) zugegeben. Daraufhin werden entweder 25 µl HEK 293-Überstand oder 25 µl HUVEC-Mangelmedium mit gelösten rekombinanten Proteinen dazugegeben. Es folgt eine Inkubation von 5 Tagen. Zur Durchführung des AlamarBlue-Assays werden je Well 10 µl AlamarBlue-Lösung zugegeben, 3 - 6 h bei 37° C inkubiert und anschließend die Platten im Fluoroskan Ascent FL (Labsystems) bei 530 nm/590 nm gemessen. Zur Auswertung wird der Messwert der zu analysierenden Probe durch den Messwert der entsprechenden Negativkontrolle geteilt und dadurch der Stimulationsindex berechnet. Bei der Testung von Überständen ist die Negativkontrolle der Leervektor-Überstand, bei gereinigten rekombinanten Proteinen ist dies jeweils der Puffer, indem die Proteine gelöst vorlagen.

4.4.7 Migrationsversuch mit HUVECs

Endothelzellen besitzen die Fähigkeit in Richtung eines angiogenen Stimulus zu wandern, dies wird als Migration bezeichnet. Im Laborversuch lässt sich dieser Vorgang mit Hilfe einer Boyden-Kammer untersuchen (Terranova et al., 1985). Das Test-Prinzip besteht aus einer oberen und einer unteren Kammer, die durch einen Membranfilter getrennt sind. Die Aussaat der Zellen erfolgt in die obere Kammer, während in den Gefäßboden die chemotaktische Lösung gegeben wird. Im Anschluss an eine Inkubation wird die stattgefundene Migration durch Auszählen der auf die Unterseite des Filters gewanderten Zellen detektiert.

Zur Vorbereitung des Migrationsassays werden Migrationskammern (Falcon) mit einer Porengröße von 8 µm in 24 Well-Platten (Falcon) gehängt und diese mit Collagenlösung

(Sigma, 0,6 mg/ml in 0,1 N Essigsäure gelöst) beschichtet. Hierzu wird in die Inserts 100 µl und in die Wells je 400 µl Lösung gegeben und die Platten über Nacht bei 4° C inkubiert. Ebenfalls am Tag vor der Durchführung wird bei einer fast konfluenten T75-Flasche mit HUVECs (Cambrex) das Komplettmedium durch Hungermedium (Basalmedium mit 0,5 % FBS, 1 µg/ml Hydrocortision, 50 µg/ml Gentamicin und 50 ng/ml Amphothericin B) ersetzt. Am nächsten Tag wird die Collagen-Lösung entfernt und Inserts und Wells mit sterilem 1 x PBS gewaschen. Danach wird in die Wells 500 µl BSA-Hungermedium inklusive dem zu testenden Protein gegeben. Das Medium entspricht dem Hungermedium mit der Ausnahme, dass anstelle von 0,5 % FBS hier 0,1 % BSA enthalten ist. Zur Testung von HEK 293-Überständen werden je 100 µl und 400 µl des 0,1 %-iges-BSA-Hungermedium in die Wells gegeben. Die Zugabe von 40 ng/ml rekombinanten VEGF zu dem BSA-Hungermedium dient als Positiv-, Zugabe von PBS als Negativkontrolle. Vor der Zellaussaat werden die Platten für 30 min in einen 37° C Zellkulturbrutschrank gestellt. Währenddessen erfolgt die Trypsinierung der HUVECs (4.4.3.3). Zur Zellzahlbestimmung wird das Zellpellet in BSA-Mangelmedium resuspendiert. Nach Aussaat von je 70.000 Zellen pro Insert in 100 µl BSA-Mangelmedium, werden die Platten für 6 h bei 37° C in den Brutschrank gestellt. Im Anschluss daran wird das Medium abgesaugt und Inserts sowie Wells mit 1 x PBS gewaschen. Zum Fixieren der Zellen wird für 10 min 500 µl Formaldehyd-Lösung (3,7 % in H_2O) zugegeben und danach 4 Waschschritte mit je 500 µl PBS durchgeführt. Ab dem zweiten Waschen werden außerdem auf der Oberseite der Insert-Membran die Zellen mit einem Wattestäbchen vorsichtig entfernt. Nach Überführung der Inserts in neue Wells folgt eine 5-minütige Inkubation mit 0,1 % Triton X 100 Lösung und 3 Waschschritte mit 1 x PBS. Um die Zellen auf der Unterseite der Membran sichtbar zu machen, wird eine Kernfärbung mit DAPI (Sigma-Aldrich) vorgenommen. Hierzu werden die Inserts in neue 24 Well-Platten gehängt, je 500 µl Färbe-Lösung (20 µg/ml DAPI in PBS) in die Wells pipettiert und die Platten für 10 min abgedeckt gelagert. Nach 3 PBS-Waschschritten werden die Inserts getrocknet und zur Auszählung gefärbter Zellen eine Fluoreszenzmikroskopie (Anregung bei 360 nm) vorgenommen. Je Insert werden bei einer 400-fachen Vergrößerung je 5 Aufnahmen gemacht.

4.4.8 Mycoplasmen-Test von Zellkulturen

Um eine Beeinträchtigung der Zellkulturexperimente durch Mycoplasmen-Kontaminationen auszuschließen, wurden die verwendeten Kulturen regelmäßig getestet. Der Nachweis erfolgt dabei über eine DNA-Färbung mittels DAPI (Xia et al., 1997). Auf diese Weise lassen sich

Mycoplasmen bei einer Fluoreszenzmikroskopie (365 nm) an der Färbung der Zellkernmembran (blau) erkennen. Für den Test werden die Zellen in eine 6 Well-Platte ausgesät, am nächsten Tag mit PBS gewaschen und mit DAPI-Methanol-Lösung (0,1 µg/ml) für 30 min bei 37° C inkubiert. Nach einem erneuten PBS-Waschschritt können die Zellen mikroskopiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit traten keine derartigen Kontaminationen auf.

4.5 Die Roboter-Plattform der Xantos Biomedicine AG

4.5.1 Das Screening-System

Der Hochdurchsatz-Screen wurde durch die Roboter-Plattform der Xantos Biomedicine AG ermöglicht. Die Arbeitsschritte werden dabei mit 4 unterschiedlichen Robotern durchgeführt, die in den folgenden Abschnitten kurz vorgestellt werden. Die Durchführung des Screens erfolgte durch die Abteilung „Robotics und Screening“ der Xantos AG.

4.5.1.1 Picken von Bakterienkolonien: High Efficiency Colony Picker (HECOP)

Die getesteten cDNA-Expressionsplasmide stammen aus den Klonkollektionen MGC, RZPD und OriGene (3.7.3). Diese sind E. coli-Klone, die jeweils den kompletten offenen Leserahmen (ORF) eines Gens in einem Expressionsvektor enthalten. Die Lagerung der Bakterienstocks erfolgt in 384 Well-Platten in einer 21 %-igen LB/Glycerin-Lösung bei - 80° C. Für die Durchführung der DNA-Präparation (4.5.1.2) werden mit einer solchen Platte jeweils vier 96 Well-Platten mit Hilfe des Picking-Roboters angeimpft. Die E. coli-Zellen werden hierbei mit je 1,5 ml LB-Medium (100 ng/ml Ampicillin) in einem Schüttelinkubator (280 rpm) über Nacht kultiviert.

4.5.1.2 Präparation von cDNAs: High Efficiency DNA Isolation Station (HEDIS)

Zur Präparation der DNAs werden die Übernachtkulturen (4.5.1.1) für 5 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes, werden die Bakterienpellets durch Zugabe von 170 µl Puffer 1 (P1) und 5 min Inkubation bei 1.000 rpm gelöst. Danach wird zu jedem Well 170 µl Puffer 2 (P2) pipettiert, 10 sec bei 300 rpm geschüttelt und die Platten für 5 min stehengelassen. Im Anschluss daran werden der Lysepuffer (P2) durch Hinzufügen von 170 µl Puffer 3 (P3) neutralisiert, die Platten 30 sec bei 1.000 rpm geschüttelt und 5 min bei 4° C inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 3.500 rpm werden die Überstände in neue 96 Well-Platten überführt, jeweils 120 µl Puffer 4 (P4) zugegeben und nochmals für 20 min bei 4° C inkubiert. Danach wird 10 min bei 3.500 rpm zentrifugiert, die Überstände in eine neue 96 Well-Platte transferiert und 150 µl Silika-Lösung (50 mg/ml in ddH_2O, 30 min gerührt)

hinzugefügt. Nach 5 min bei 850 rpm schließt sich eine weitere Zentrifugation von 5 min bei 250 rpm an, wodurch die gebildeten DNA-Silika-Komplexe sedimentiert werden. Hiernach werden die Überstände abgesaugt, 400 µl Aceton zugegeben, 5 min Inkubation bei 850 rpm und erneut bei 250 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Überstände hiervon werden verworfen und die Platten zum Trocknen auf eine 85° C warme Heizplatte gestellt. Durch anschließende Beifügung von 130 µl vorgewärmtem (60° C) HEPES-Puffer und 7 min Schütteln bei 1.100 rpm wird die DNA freigesetzt. Danach erfolgt durch 5-minütige Zentrifugation bei 250 rpm die Sedimentation des Silikas. Schließlich werden 110 µl (20 µl verbleiben, um kein Silika zu verschleppen) des DNA-haltigen Überstandes in eine neue 96 Well-Platte transferiert und bei 4° C gelagert. Für eine längere Aufbewahrung werden die Platten bei - 20° C gelagert. Die Ausbeute an DNA liegt durchschnittlich zwischen 20 - 30 ng/µl.

4.5.1.3 Transfektion von Zelllinien: High Efficiency Cell Transfection (HECTRA)

Bevor die von der HEDIS (4.5.1.2) präparierten cDNA-Expressionsplasmide in HEK 293-Zellen transfiziert werden, erfolgt eine Stichprobenkontrolle der DNA-Konzentrationen. Hierzu werden je 5 µl der isolierten DNA auf ein 1 %-iges Agarose Gel (4.2.1.1) geladen. Die Elektrophorese wird für 45 min bei 150 V durchgeführt. Zum Vergleich werden auf dasselbe Gel fünf verschiedene Referenz-DNAs aufgetragen, die die gewünschte DNA-Konzentration aufweisen. Entsprechen sich die Proben, werden die DNA-Platten für die Transfektion verwendet, andernfalls werden die Stichproben erweitert und gegebenenfalls die DNA-Platten der Präparation verworfen. Alle Schritte bei der Transfektion werden mit dem Transfektions-Roboter HECTRA im 96 Well-Format durchgeführt. Die Herstellung eines Transfektionsansatzes erfolgt in einem 8-fachen Ansatz. Am Tag vor der Transfektion werden je 96 Well 22.000 HEK 293-Zellen ausgesät und über Nacht bei 37° C inkubiert. Für die Transfektion werden je Ansatz zunächst je 27 µl DNA aus den HEDIS-präparierten DNA-Platten (4.5.1.2) mit dem 96-Kopfdispensor in eine 96 Well-Spitzbodenplatte (F-Platte) transferiert. Danach folgt die Zugabe von 10 µl $CaCl_2$ (0,67 M), 5 sec Schütteln bei 300 rpm, das Beifügen von 35 µl HBS (2 x) und Mischen für 5 sec bei 300 rpm. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur, werden 10 µl Chloroquin (2 mM) zugesetzt und 5 sec bei 300 rpm inkubiert. Anschließend werden je 11 µl des Transfektionsansatzes auf die Zellen pipettiert und die Platten für 4 h bei 37° C im Brutschrank gehalten. Bei der Durchführung eines Proliferationsversuchs (4.4.6) wird das Medium durch ein 1,5 %-iges DMEM-Mangelmedium (100 µl) ersetzt. 2 Tage darauf erfolgt der Transfer der Überstände durch einen weiteren Roboter (HEROS) (4.5.1.4).

4.5.1.4 Auslesung der Versuchsergebnisse: High Efficiency Readout Station (HEROS)

Durch den Readout-Roboters (HEROS) erfolgte neben der Messung der HUVEC-Platten auch die Aussaat sämtlicher Zellkulturplatten und der Transfer der HEK 293-Überstände auf die HUVECs. Am Tag vor der Transfektion werden zunächst die HEK 293-Zellen ausgesät. Um eine gleichmäßige Behandlung der Zellen zu erhalten, wird die Aussaat von 100 der 96 Well-Platten pro Screen-Lauf in 3 Arbeitsschritten vorgenommen. Das Splitten der Zellen erfolgt wie beim Passagieren (4.4.3.1), und die Zellaussaatdichte beträgt 22.000 Zellen pro Well. Die Aussaat der HUVECs (4.4.3.3) erfolgt am Tag vor dem Überstands-Transfer. Hier werden pro Well 2.800 Zellen gegeben. Vor dem Übertrag wird dann zunächst das Medium bei den HUVECs gewechselt. Dies erfolgt durch Abnahme von 90 µl des Mediums, Waschen der Spitzen im Waschtisch mit PBS und der Zugabe von 200 µl frischen PBS auf die Zellen. Umgehend werden 200 µl von den Zellen entnommen, die Spitzen erneut gewaschen und dann je Well 75 µl frisches HUVEC-Mangelmedium (4.4.6) zugegeben. Nach dem Mediumwechsel bei allen HUVEC-Platten, beginnt der Überstands-Transfer. Hierzu werden zunächst vom HEROS je eine cDNAs-exprimierende HEK 293-Zell- und eine HUVEC-Zellplatte aus dem Brutschrank auf die Pipettierstation gestellt. Dann werden von den HEK 293-Zellen je Well 25 µl Überstand entnommen und das Medium auf die HUVEC-Platte gegeben. Die Pipettenspitzen werden mit PBS gewaschen und die Zellplatten zurück in den Brutschrank gebracht. Nach einer Inkubation von 5 Tagen erfolgt eine Messung der HUVEC-Platten im AlamarBlue-Assay. Hierzu wird zunächst eine AlamarBlue-Lösung herstellt. Je zu messendem Well, werden 11µl AlamarBlue und 9 µl des HUVEC-Basalmediums (EBM®, Clonetics) gemischt und ohne einen Mediumwechsel zu den HUVECs gegeben. Nach einer Inkubation von 4 h im Brutschrank erfolgt das Auslesen im Fluoreszenz-Reader bei 530 nm/590 nm. Um Kontaminationen als Ursache für einen Hit ausschließen zu können, werden alle positiven Wells manuell am Mikroskop auf Verkeimungen überprüft.

4.6 Online Datenbanken und Programme

Basierend auf DNA- und Protein-Sequenzdaten wurden bioinformatische Analysen (*in silico*) auf verschiedenen WorldWideWeb-Servern sowie mit unterschiedlichen Computerprogrammen durchgeführt.

NCI (National Cancer Institute): http://www.nci.nih.gov/

The CANCER GENOME ANATOMY PROJECT (CGAP)

➔ *in silico* Expressionsanalysen mit EST-Datenbanken

http://cgap.nci.nih.gov/

NCBI (National Center for Biotechnology Information):

➔ Literatursuche mit Pubmed:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi

➔ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) DNA- und Proteinsequenzvergleiche:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

➔ Genomorganisation:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html

ExPASy Proteomics tools: http://us.expasy.org/tools/

➔ Berechnung von pI und MW (Compute pI/Mw):
http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html

➔ Vorhersage von Primärstrukturen, so genannter coiled-coil-Regionen („Coils“):
http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html

➔ Vorhersage von Sekundärstrukturen (SOPM (Self-optimized Prediction Method)):
http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html

➔ Vorhersage potentieller Proteinmodifikationsstellen I (Proscan Prositescan):
http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html

➔ Vorhersage potentieller Proteinmodifikationsstellen II (SMART (Simple Modular Architecture Research Tool)):
http://smart.embl-heidelberg.de/

➔ Vorhersage von Transmembrandomänen, hydrophober Regionen (TMpred):
http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

Alignment (Abgleich) von DNA- und Proteinsequenzen:
Clone Manager 6, Align Plus 4, Version 4.10

Erstellen des Literaturverzeichnisses:
Reference Manager Professional Network Edition Version 9.5N (ISI ResearchSoft)

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung eines Hochdurchsatz-Screen-Systems

Mit Hilfe eines vollautomatisierten Hochdurchsatz-Screens wurden sezernierte Proteine identifiziert, die einen pro-angiogenen Effekt bewirken.

5.1.1 Das Screen-Prinzip

Die Durchführung aller Zellkulturversuche im Screen erfolgte in Mikrotiterplatten mit 96 Wells. Das Prinzip dabei war, dass konditionierte Medienüberstände (Überstände), die durch die Expression verschiedener cDNA-Expressionsplasmide generiert wurden, auf endothelialen Zellen getestet wurden (Abb. 5.1).

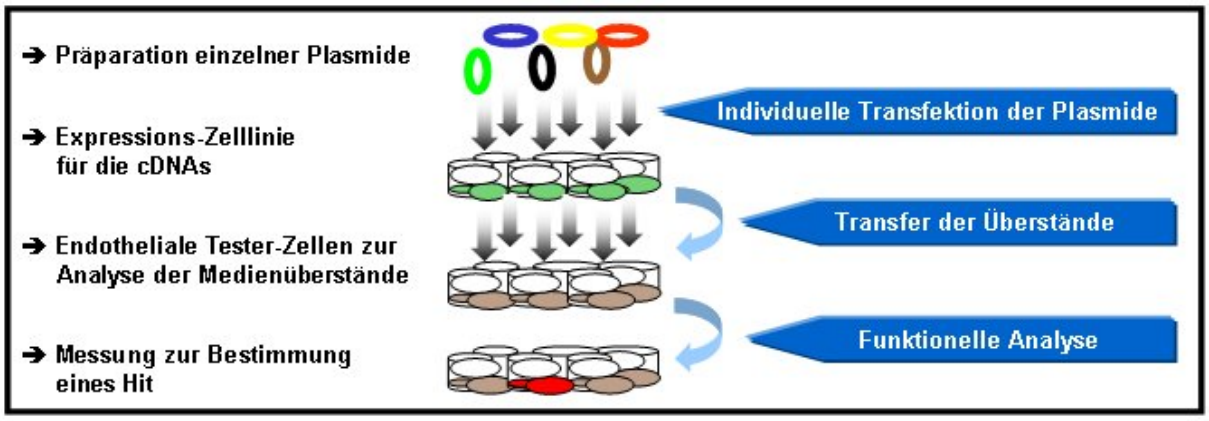


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des Screen-Ablaufs

Zu diesem Zweck wurden einzelne cDNA-Expressionsplasmide aus Bakterienkulturen präpariert und die gewonnenen cDNAs individuell in eine Zelllinie transfiziert. Nach einer definierten Expressionsdauer erfolgte der Transfer der Überstände auf Tester-Zellen und nach einer erneuten Inkubation die Ermittlung der Proliferationsraten. Überstieg ein Messwert einen definierten Schwellenwert, wurde die entsprechende cDNA als positives Signal (Hit) gewertet. Die durch den Screen identifizierten Hits wurden nach einem einheitlichen Schema weiter bearbeitet (Abb. 5.2).

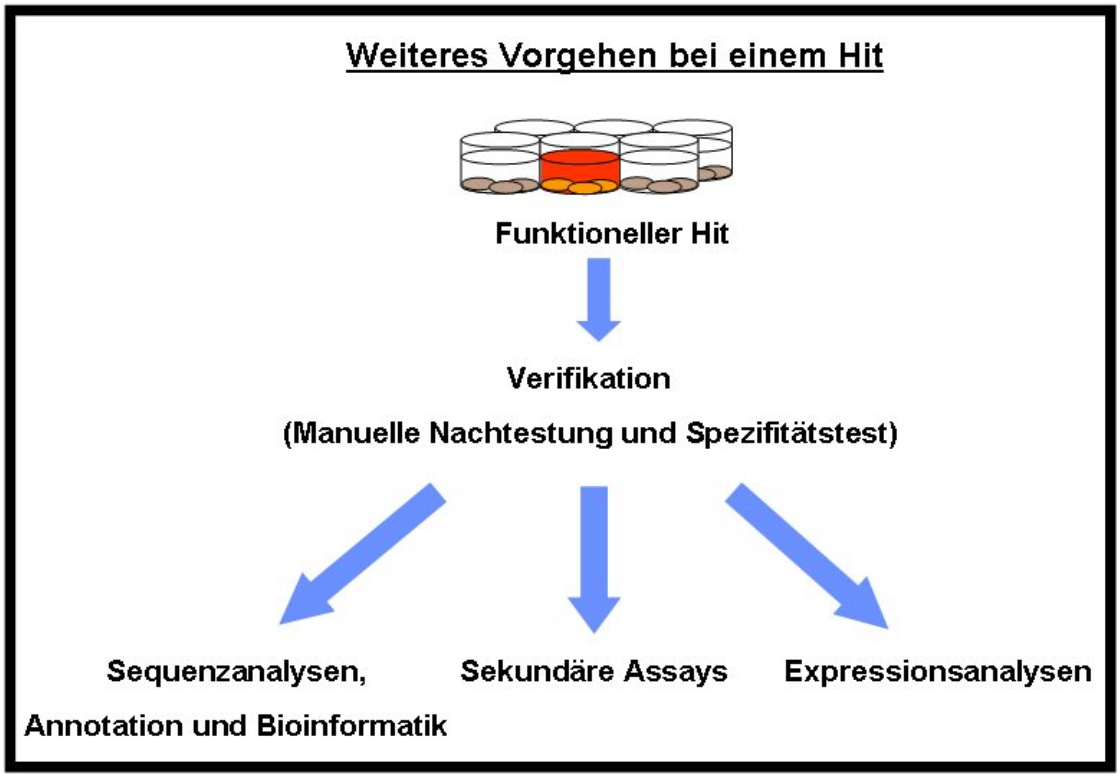


Abb. 5.2: Schematische Darstellung für den Ablauf nach der Identifizierung eines Hits

Der Identifizierung im Screen folgte die Bestätigung durch manuelle Proliferationsversuche. Zur Überprüfung, ob ein Hit eine Spezifität für Endothelzellen aufweist, wurden die entsprechenden Überstände außerdem in einem Proliferationsversuch mit nicht endothelialen Zellen getestet. Hierbei wurden primäre humane Fibroblasten (NHDF) (Shipley et al., 1989) verwendet, da bei anderen Zelllinien, wie beispielsweise Keratinozyten oder Epidermiszellen, selbst mit bekannten Wachstumsfaktoren keine Stimulation der Zellproliferation erreicht werden konnte (Daten nicht gezeigt). Weiter wurden die cDNA-Inserts der Hits-Expressionsplasmide vollständig sequenziert. Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden dann mit den Datenbanken des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) abgeglichen und bioinformatisch analysiert.

5.2 Entwicklung des Screen-Protokolls

Zur Etablierung des Screen-Protokolls wurde zuerst nach geeigneten Zellen gesucht. Dabei wurde eine Zelllinie ausgewählt, die eine effiziente Expression der cDNA-kodierten Proteine gewährleistete (5.2.1). Zudem erfolgte die Bestimmung endothelialer Tester-Zellen, die der Messung pro-angiogener Effekte diente (5.2.3). Die Protokolle wurden durch manuelle Versuche etabliert und anschließend auf die Roboter-Plattform übertragen (5.2.11). Die folgende Abbildung zeigt eine Zusammenfassung der einzelnen Arbeitsschritte.

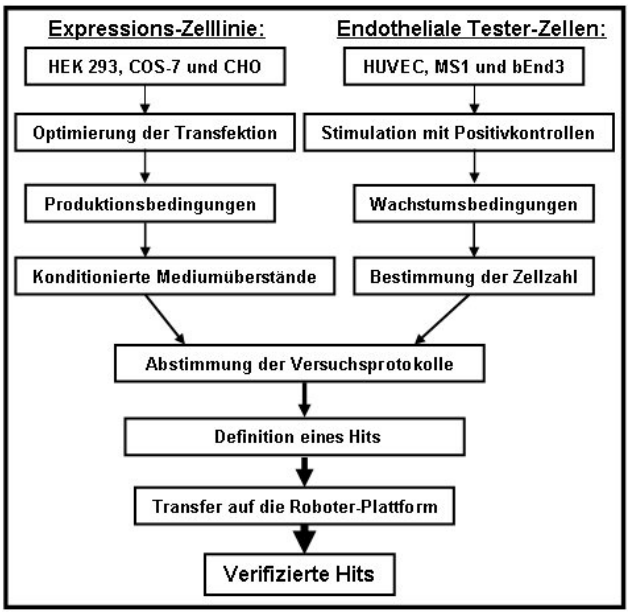
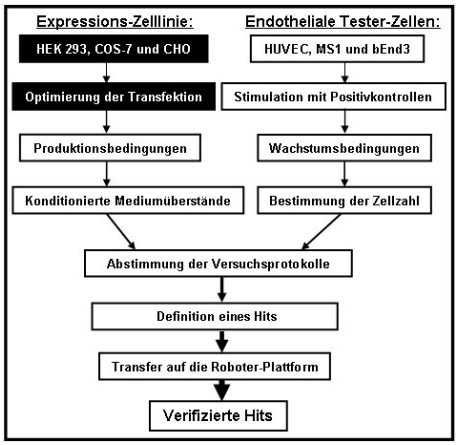


Abb. 5.3: Überblick über die einzelnen Arbeiten zur Etablierung des Screen-Protokolls

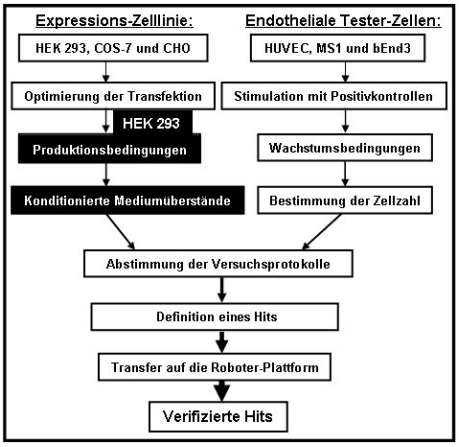
Dieses Schema (Abb. 5.3) dient als Orientierungshilfe über den Entwicklungsstand des Screen-Protokolls. Der jeweils besprochene Arbeitsschritt wird schwarz hervorgehoben.

5.2.1 Auswahl der cDNA-Expressions-Zelllinie



Für die cDNA-Expression musste eine Zelllinie gefunden werden, die sich reproduzierbar und kostengünstig mit dem Transfektions-Roboter (HECTRA) transfizieren lässt. Mit CHO- (Puck, 1979), COS-7- (Gluzman, 1981) und HEK 293-Zellen (Graham et al., 1977) wurden drei gängige Zelllinien auf ihre Transfizierbarkeit getestet. Dies erfolgte mit Hilfe eines cDNA-Expressionsplasmids, welches das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) kodierte (Chalfie et al., 1994). Zur Quantifizierung der produzierten Proteinmengen wurden 48 h nach der Transfektion die Signalintensitäten des GFP-Proteins mit einem Fluoreszenz-Messgerät (Labsystems) erfaßt. Bei den HEK 293-Zellen wurden die höchsten Werte gemessen und somit die besten Transfektionseffizienzen. Eine optische Auszählung grün leuchtender Zellen ergab eine Effizienz von ca. 90 %. Dieses Resultat wurde mit der Kalziumphosphat-Methode sowohl manuell als auch mit dem HECTRA erreicht. Bei den CHO- und COS-7-Zellen konnten in manuellen Tests mit Metafectene (Biontex) zwar ähnliche Ergebnisse erzielt werden, bei der Durchführung mit dem HECTRA jedoch nicht. Daher wurden die HEK 293-Zellen zur cDNA-Expression ausgewählt.

5.2.2 Erzeugung konditionierter HEK 293-Überstände



Eine weitere Bedingung an die Expressions-Zelllinie war, dass die cDNA-Expression eines endothelialen Wachstumsfaktors zu einem konditionierten Überstand führt, nach dessen Transfer auf endotheliale Tester-Zellen eine Proliferationssteigerung messbar ist. Die Protokolletablierung wurde daher mit einem humanen VEGF-cDNA-Expressionsplasmid durchgeführt. Nach der Expression von VEGF in HEK 293-Zellen wurde bereits gezeigt, dass es zur Sekretion eines aktiven endothelialen Proliferationsfaktors ins Medium kommt (Leung et al., 1989). Zur Quantifizierung der Proteinmengen wurde ein VEGF-ELISA durchgeführt (Abb.5.4).

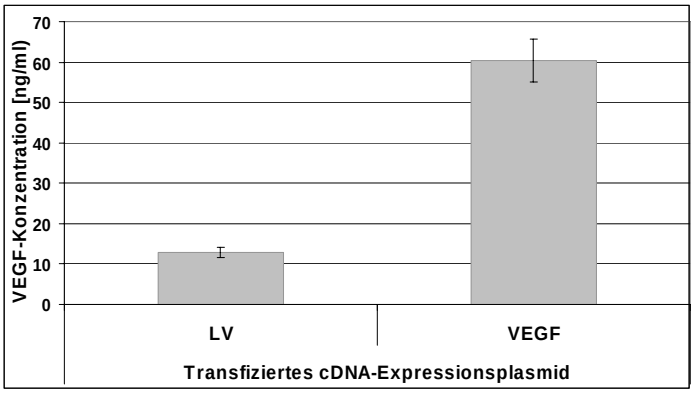


Abb. 5.4: VEGF-Nachweis im Überstand transfizierter HEK 293-Zellen
Der ELISA erfolgte mit dem PromoKine Kit (PromoCell) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die HEK 293-Zellen wurden nach der Transfektion in 1,5 %-igem DMEM-Mangelmedium kultiviert, 48 h darauf je 96 Well 10 µl Überstand entnommen und in die Bestimmung eingesetzt. Die VEGF-Konzentration ist in ng/ml angegeben.

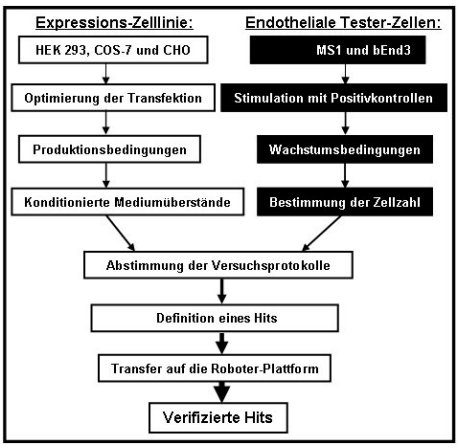
Mittels ELISA wurden 48 h nach der Transfektion des VEGF-cDNA-Expressionsplasmids VEGF-Konzentrationen von ca. 60 ng/ml im Überstand gemessen. Dies entsprach einer ca. 6-fachen Erhöhung gegenüber der Leervektorkontrolle. Diese Konzentration ist ausreichend für die Messung eines physiologischen Effekts von VEGF (Yoshida et al., 1996).

5.2.3 Auswahl der Tester-Zellen

Im nächsten Schritt wurden endotheliale Tester-Zellen ausgewählt, die zum Nachweis proliferativer Stimuli geeignet sind. Die Quantifizierung eines solchen Effekts erfolgte dabei zum einen durch eine Zellzahlbestimmung und zum anderen mittels eines Reportergen-Versuchs, mit dem die Aktivierung mitogener Gene gemessen wird. Zur Auswahl standen sowohl endotheliale Zelllinien als auch primäre Endothelzellen. Für eine Zelllinie spricht, dass es sich um robuste Zellen mit einfacher Handhabung handelt, die in herkömmlichem Medium kultiviert und nahezu beliebig expandiert werden können. Weiter haben diese mit 18 - 24 h gegenüber Primärzellen (42 - 66 h) relativ kurze Verdopplungszeiten, wodurch eine schnelle Mess-

barkeit eines proliferativen Effekts zu erwarten war. Darüber hinaus können mit ihnen stabile Reportergen-Zelllinien generiert werden. Der Vorteil von Primärkulturen ist hingegen der Erhalt wesentlicher endothelialer Wachstumseigenschaften, weil diese weder transformiert noch immortalisiert sind. Die ausgewählten Primärzellen HUVECs sind human, die Zelllinien MS1- und bEnd3-Zellen sind dagegen murinen Ursprungs. Nachteile der Primärzellen sind ihre schwierige Handhabung, die Notwendigkeit eines teuren Spezialmediums und eine nur begrenzte Verwendbarkeit von 7 Passagen.

5.2.4 Verwendung endothelialer Zelllinien im Proliferationsversuch



Die MS1- (Arbiser et al., 1997) und bEnd3-Zellen (Montesano et al., 1990) wurden zunächst auf ihre Eignung für einen Proliferationsversuch überprüft. Das erste Ziel war, ein möglichst minimal serumhaltiges Mangelmedium zu definieren, in dessen Gegenwart die Zellen weder absterben noch proliferieren. Hierzu erfolgte die Inkubation in unterschiedlich serumhaltigen Mangelmedien und danach eine Zellzahlbestimmung mittels eines AlamarBlue-Assays. Dieser ermittelt die Zellzahl indirekt anhand einer Messung der metabolischen Aktivität. Beide Zelllinien zeigten keine signifikanten Unterschiede. Abb. 5.5 zeigt das Ergebnis für bEnd3-Zellen.

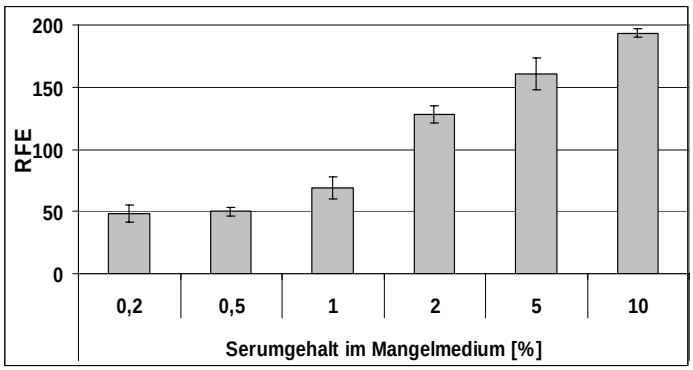


Abb. 5.5: Untersuchung verschiedener bEnd3-Mangelmedien
Die Zellaussaat erfolgte in einem Komplettmedium. 24 h darauf wurde dieses durch unterschiedlich serumhaltige DMEM-Mangelmedien (0,2 % - 10 %) ersetzt. 5 Tage später folgte die Messung im AlamarBlue-Assay. Die Messwerte wurden in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) angegeben und Standardabweichungen ausgehend von der Grundgesamtheit berechnet.

Nach Inkubation mit 10 %-igen gegenüber 0,2 %-igen Mangelmedium wurde eine 4-fach größere Zellzahl ermittelt. Lichtmikroskopisch zeigten sich mit zunehmendem Serumgehalt höhere Zelldichten. Eine Abschätzung ergab bei 0,2 % und 0,5 % Serum eine Konfluenz von ca. 30 % und bei 1 % ca. 60 %. Ab 2 % Serum waren die Zellen dicht gewachsen. Im nächsten Schritt wurde getestet, ob die Zugabe rekombinanter Wachstumsfaktoren zum Mangelmedium eine Zellzahlsteigerung bewirkt. Ausgehend von einer VEGF-Konzentration über 60 ng/ml, die nach Expression einer VEGF-cDNA in Überständen erreicht wird (Abb. 5.4),

wurden verschiedene Mengen rekombinanter Faktoren zu unterschiedlich serumhaltigen Mangelmedien beigesetzt. Die Inkubation und Messung erfolgte wie zuvor. Dabei diente VEGF und bFGF als Positivkontrolle und PBS, in dem die Faktoren gelöst vorlagen, als Negativkontrolle. Bei unabhängigen Versuchen wurden zwar serumabhängige Zellzahlsteigerungen erreicht, im Gegensatz dazu konnte durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren kein zusätzlicher Effekt nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für die Suche nach neuen Wachstumsfaktoren ist der Assay mit diesen Zellen daher ungeeignet.

5.2.5 Testung endothelialer Zelllinien im transienten Reportergen-Assay

Die Durchführung der Reportergen-Versuche erfolgte mit einem induzierbaren Reportergen-Konstrukt. Bei diesem steht das Firefly-Luziferasegen (Brasier and Ron, 1992) unter der Kontrolle eines im Promotorbereich befindlichen „Serum Response Element“ (SRE) (Treisman, 1992). SRE ist ein wichtiges regulatorisches Transkriptionselement im c-fos Promotor, welches die Aktivierung von Proliferationsgenen kontrolliert. Der Einsatz dieses Reportergen-Konstrukts ermöglicht die Messung früher mitogener Effekte während der Aktivierung von Proliferation, noch bevor eine Zellteilung stattfindet. Die Untersuchungen fanden mit beiden Zelllinien zunächst in transienten Expressionsversuchen statt. Ein Abgleich der Transfektionseffizienz erfolgte durch gleichzeitige Transfektion eines konstitutiv aktiven Renilla-Luziferase-cDNA-Expressionsplasmids. Die Stimulationsversuche wurden prinzipiell ähnlich wie zuvor die Proliferationsversuche (5.1.4) durchgeführt. Die Zugabe verschiedener Konzentrationen rekombinanter Wachstumsfaktoren erfolgte ebenfalls in Gegenwart von Mangelmedien mit unterschiedlichem Serumgehalt. Die Test-Messung wurde hierbei bereits 2 Tage nach der Transfektion vorgenommen und bestand aus einer Aktivitäts-Messung beider Luziferasen.
Bei den bEnd3-Zellen wurde durch Zugabe von 10 % gegenüber 0,2 % Serum eine 2,5-fache Steigerung der Reportergen-Aktivität ermittelt, bei den MS1-Zellen ergab sich eine 1,6-fache Steigerung. Die Wachstumsfaktorzugabe zeigte jedoch wiederum keine Wirkung, weshalb auch dieser Assay als ungeeignet ausschied.

5.2.6 Erzeugung und Analyse stabiler SRE-Luziferase-Reportergen-Zelllinien

Aufgrund ausbleibender Reportergenaktivierung durch rekombinante Faktoren in transienten Versuchen, wurden mit den MS1- und bEnd3-Zellen stabile Reportergen-Zelllinien generiert. Da dann der Transfektionsschritt wegfällt, wird ein stabileres Zellkultursystem erreicht, während eine Transfektion zu Zellschädigungen und Messwertschwankungen führt. Für beide Zelllinien wurden je 15 stabile SRE-Luziferase-Reportergen-Klone erzeugt, expandiert und

analysiert. Die Testung erfolgte wie zuvor mit verschiedenen Mangelmedien und anschließend mit rekombinanten Faktoren. Da die erhaltenen Zell-Klone widerstandsfähiger waren, konnte ihre Kultivierung in serumfreien Mangelmedium stattfinden und die Inkubationsdauer auf 72 h verlängert werden. Zum Nachweis der exprimierenden Klone erfolgte die Induktion mit 10 % Serum (Daten nicht gezeigt). Hierbei wurden 6 MS1- und 5 bEnd3-Klone mit Luziferase-Aktivitäten über dem Hintergrund bestimmt. Die beste Induktion bei den MS1-Klonen lag bei einer 1,5-fachen Messwertsteigerung, bei den bEnd3-Klonen betrug diese 5,4-fach. Da die Induktionen der MS1-Klone schlechter waren als bei den transienten Versuchen (5.2.5), wurden Versuche mit rekombinanten Faktoren lediglich mit den bEnd3-Klonen durchgeführt.

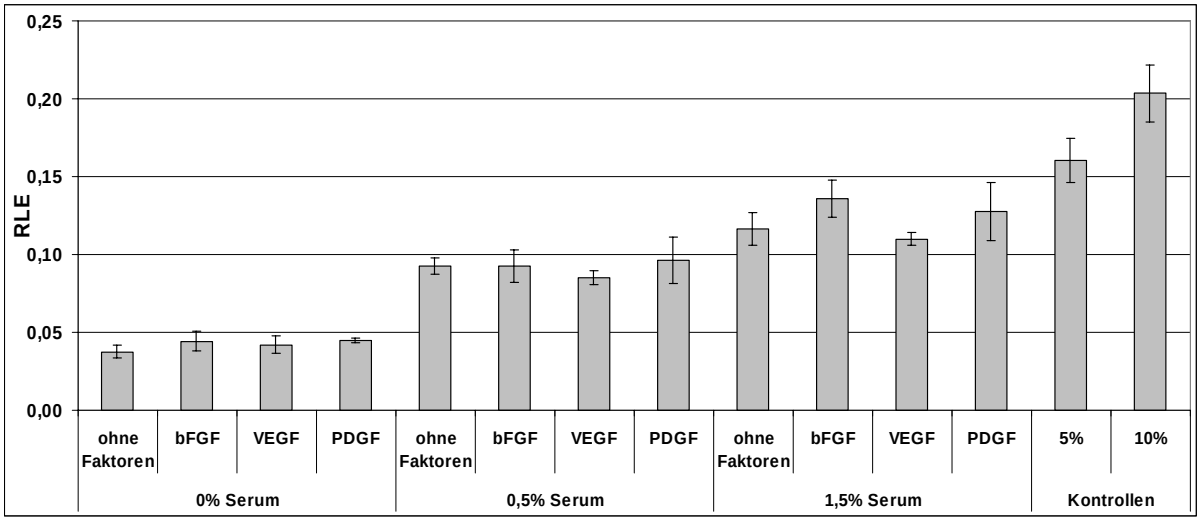
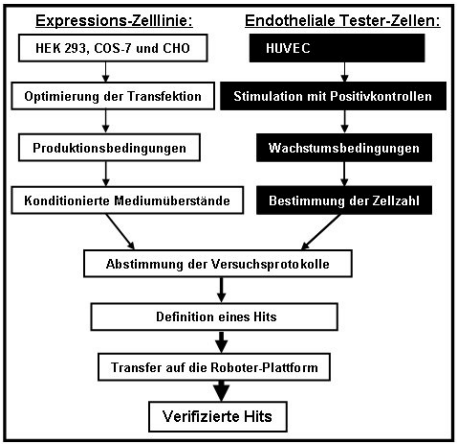


Abb. 5.6: Testung eines stabilen bEnd3-Luziferase-Reportergen-Klons (Klon1)
Die Zellen wurden für 66 h bei 0,5 % Serum kultiviert und anschließend für 18 h durch verschieden serumhaltige Mangelmedien induziert. Die Wachstumsfaktoren wurden in einer Konzentration von 50 ng/ml zugesetzt. Als Negativkontrolle diente jeweils die entsprechende Menge PBS (ohne Faktoren). Die Messung erfolgte im Lumineszenz-Reader. Die Messwerte sind in relativen Lumineszenzeinheiten (RLE) angegeben.

In Abb. 5.6 sind die Ergebnisse des bEnd3-Klon 1 dargestellt. Nach Zugabe von 10 % Serum konnten ca. 5,4-fach höhere Messerwerte als bei der Kontrolle ohne Serum (ohne Faktoren) erhalten werden. Die Ergänzung des Mangelmediums mit rekombinanten Faktoren bewirkte dagegen nur eine Induktion um das 1,2-fache durch bFGF und PDGF und das 1,1-fache bei VEGF. Diese Ergebnisse konnten aber weder gesteigert noch stetig reproduziert werden. Aufgrund insgesamt mangelnder Stimulierbarkeit durch endotheliale Wachstumsfaktoren bewiesen sich MS1- und bEnd3-Zellen für den Einsatz im Screen als ungeeignet.

5.2.7 Etablierung eines Proliferationsversuchs mit primären Endothelzellen



Als primäre Endothelzellen wurden humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs) ausgewählt. Die Protokolletablierung verlief analog zu den endothelialen Zelllinien (5.2.4). Die Wachstumsmedien der endothelialen Zelllinien und der HUVECs unterscheiden sich im Basalmedium und den einzelnen zugesetzten Komponenten. HUVECs benötigen ein teures Spezial-Basalmedium, welches anstelle von Penicillin/Streptomycin Gentamicin/Amphothericin B enthält, sowie den humanen epidermalen Wachstumsfaktor (hEGF) (Carpenter and Cohen, 1976), Rinderhirnextrakt (BBE) und Hydrocortison. Neben dem Serumgehalt wurde auch die BBE-Konzentration variiert. Da sich kein Einfluss auf das Wachstumsverhalten der HUVECs ausmachen ließ (Daten nicht gezeigt), wurde anschließend völlig auf BBE verzichtet. Außerdem wurde auch auf hEGF im Mangelmedium verzichtet. Für diesen epithelzellspezifischen Wachstumsfaktor wurde durch einen Proliferationsversuch gezeigt, dass er in diesem Assay keinen Einfluss auf die Stimulierbarkeit der HUVECs hat. Zur Definition eines geeigneten HUVEC-Mangelmediums wurden verschiedene Serumkonzentrationen getestet (Abb. 5.7).

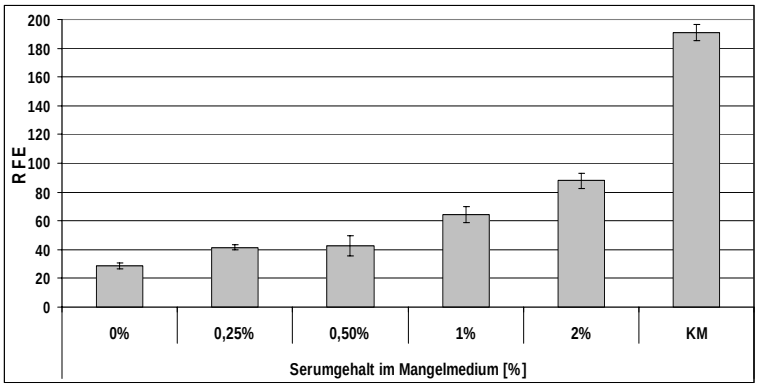


Abb. 5.7: Test verschieden serumhaltiger HUVEC-Mangelmedien
Die Aussaat von 3.000 Zellen/Well erfolgte im Komplettmedium. 24 h darauf wurde dieses durch verschieden serumhaltige Mangelmedien (0 - 2 % Serum) ersetzt. Als Kontrolle diente Komplettmedium (KM). Die Zellzahlbestimmung erfolgte 5 Tage nach Zugabe durch AlamarBlue-Assay. Die Messwerte sind in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) angegeben.

Erwartungsgemäß wurden bei geringerem Serumgehalt auch kleinere Messwerte erhalten. Die Signale reduzierten sich hierbei im 2 %-igen Medium auf 46 % und im serumfreien Medium auf 15 % gegenüber den Werten beim Komplettmedium (KM). Ferner wurde bei einer Lichtmikroskopie die Beobachtung gemacht, dass ab einem Serumgehalt ≤ 0,5 % zunehmend kugelige bzw. tote Zellen zu sehen waren. Im nächsten Schritt erfolgte die Stimulation durch rekombinante Faktoren in Gegenwart verschiedener Mangelmedien (Abb. 5.8).

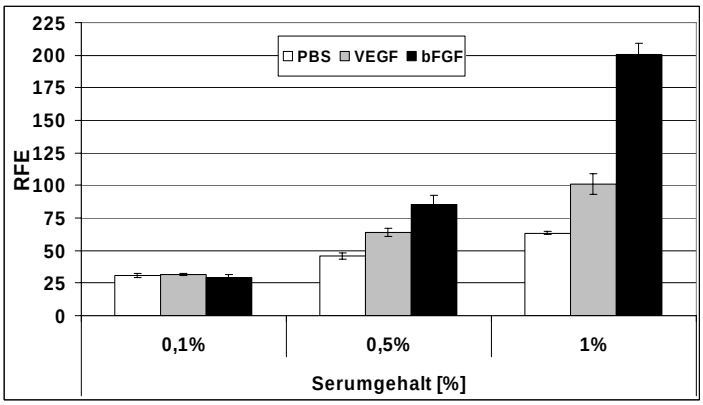


Abb. 5.8: Stimulation von HUVECs durch rekombinante Faktoren
Die Durchführung erfolgte in Gegenwart verschiedener Mangelmedien (mit 0,1 %, 0,5 % und 1 % Serum) und wurde mit je 50 ng/ml bFGF (schwarz) oder VEGF (grau) erreicht. Als Negativkontrolle diente PBS. Die Zellzahlen wurden 5 Tage nach Zugabe durch AlamarBlue-Assay bestimmt. Die Messwerte sind in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) angegeben.

In Gegenwart von 1 % Serum wurden durch VEGF eine um 2-fach und durch bFGF um 3,2-fach höhere Zellzahl gegenüber der PBS-Kontrolle ermittelt. In 0,5 % Serum waren die Steigerungen mit den Faktoren bereits deutlich geringer, und bei 0,1 % Serum war kein Unterschied mehr gegenüber der PBS-Kontrolle zu sehen. Zur Beurteilung der Spanne des Konzentrationsbereiches, in dem proliferative Effekte durch rekombinante Faktoren erhalten werden können, wurde am Beispiel VEGF eine Verdünnungsreihe getestet (Abb. 5.9).

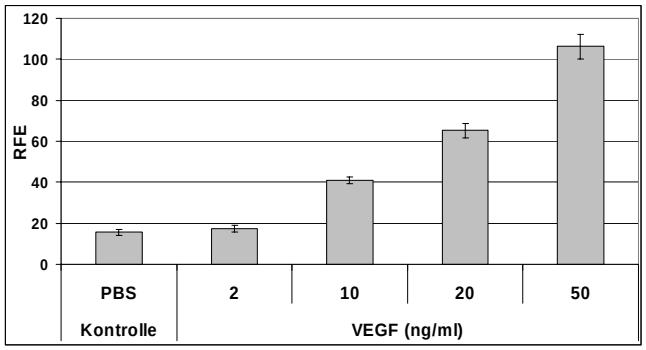


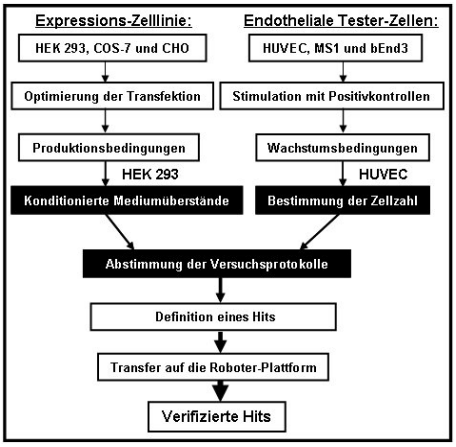
Abb. 5.9: Vergleich verschiedener VEGF-Konzentrationen im HUVEC-Mangelmedium (1 % FBS)
PBS diente als Negativkontrolle, da VEGF in diesem gelöst vorlag. Die Zellzahlbestimmung erfolgte 5 Tage nach Zugabe durch den AlamarBlue-Assay. Die Messwerte sind in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) angegeben**.**

Mit zunehmender VEGF-Konzentration wurden höhere Stimulationen erhalten, wobei mit 10 bis 50 ng/ml VEGF reproduzierbar eine 2 - 6-fache Steigerung erreicht wurde. Da ebensolche Konzentrationen nach Expression einer VEGF-cDNA in Überständen von HEK 293-Zellen ermittelt wurden (5.1.2), bestätigten sich HUVECs als geeignete Tester-Zellen für den Screen.

5.2.8 Evaluierung des Screen-Protokolls mit HUVECs als Tester-Zellen und HEK 293-Zellen als Expressions-Zelllinie

Zunächst wurde das Screen-Protokoll weiter mit manuellen Versuchen entwickelt. Dabei galt es, die Protokolle unter Einbeziehung der ausgewählten Zellen anhand von Parametern wie beispielsweise Medienzusammensetzungen, Aussaatdichten und Inkubationszeiten der Zellen zu optimieren.

5.2.8.1 Proteinproduktion der HEK 293-Zellen in DMEM- und HUVEC-Medium



Nachdem HUVECs durch kommerzielles rekombinantes VEGF stimuliert werden konnten, wurde getestet, ob in HEK 293-Zellen produziertes VEGF ebenfalls funktionell ist. Da HUVECs nicht wie HEK 293-Zellen in DMEM kultiviert werden, wurde zunächst überprüft, ob sie in Gegenwart von DMEM stimuliert werden können. Hierzu wurden HUVECs in Gegenwart von 1 %-igem DMEM-Mangelmedium durch kommerzielles rekombinantes VEGF stimuliert. Gegenüber der 6-fachen Steigerung zuvor (Abb. 5.9), wurden mit 50 ng/ml VEGF lediglich eine 1,4-fache Steigerung erzielt. Daher wurde überprüft, ob HEK 293-Zellen nach der Transfektion anstelle von DMEM- auch in HUVEC-Mangelmedium kultiviert werden können. Zudem wurde im DMEM-Mangelmedium Penicillin gegen Gentamicin und Streptomycin gegen Amphotericin B ausgetauscht. Dies geschah, weil Tests zeigten, dass die Zugabe von Penicillin und Streptomycin zu HUVECs ein vermehrtes Absterben zur Folge hat. Außerdem wurde kontrolliert, ob HUVEC- oder DMEM-Mangelmedium sich unterschiedlich auf die Transfizierbarkeit der HEK 293-Zellen auswirkt. Dazu erfolgten Versuche mit einem GFP-cDNA-Expressionsplasmid. 48 h nach Transfektion wurden die Signalintensitäten des GFP-Proteins gemessen, wobei sich in beiden Medien vergleichbare Intensitäten ergaben. Die Transfektionseffizienzen lagen bei ca. 80 % und waren nur geringfügig schlechter als im herkömmlichem HEK 293-Medium (90 %) (5.2.1). Außerdem wurden von beiden Medien verschiedene Überstandsmengen auf HUVECs transferiert.

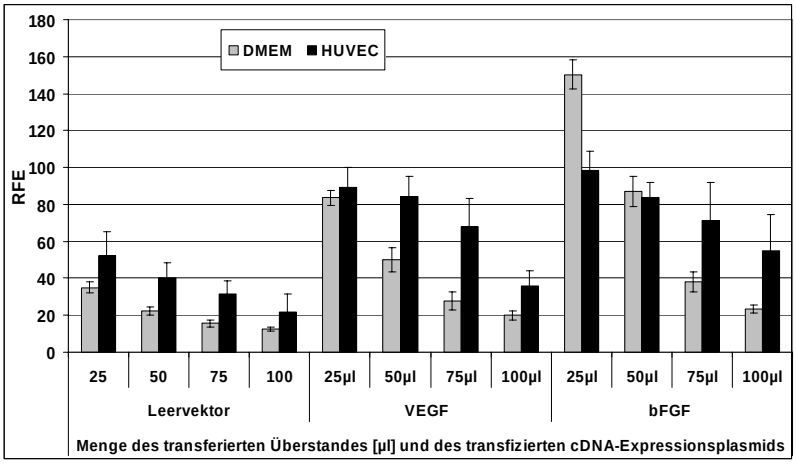


Abb. 5.10: Proteinproduktion mit HEK 293-Zellen in verschiedenen Mangelmedien
Die Proteinproduktion in HEK 293-Zellen erfolgte für 48 h in DMEM- (grau) oder HUVEC-Mangelmedium (schwarz). 24 h nach Aussaat der HUVECs wurde das Medium entfernt und durch 4 verschiedene Mengen Überstand mit HUVEC-Mangelmedium ad 100 µl ersetzt. Als Positivkontrollen dienten Überstände von VEGF oder bFGF, als Negativkontrolle Leervektor-Überstände. Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach 5 Tagen im AlamarBlue-Assay. Die Messwerte sind in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) angegeben.

Dabei konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart beider Medien aktives VEGF und bFGF produziert wurde und durch Erhöhung der Menge des transferierten Überstandes zunehmend

geringere Messwerten erhalten werden. Dies trat unabhängig von der exprimierten cDNA und dem verwendetem Mangelmedium auf. Die besten Stimulationen wurden nach dem Transfer von 25 µl Überstand und Produktion in DMEM-Mangelmedium erreicht. Hierbei wurde mit VEGF eine 2,4-fache und mit bFGF eine 4,3-fache Stimulation erzielt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden HEK 293-Zellen fortan nach der Transfektion in 1,5 %-igen DMEM-Mangelmedium kultiviert und nach 48 h je 25 µl Überstand auf HUVECs in 75 µl HUVEC-Mangelmedium transferiert.

5.2.8.2 Zellaussaat von HUVECs und HEK 293-Zellen

Die Aussaat und Transfektion der HEK 293-Zellen wurde mit der Kalzium-Phosphat-Methode durchgeführt (Grimm and Kachel, 2002). Mit einer Aussaatdichte von 21.000 Zellen pro 96 Well wurden reproduzierbare Transfektionseffizienzen zwischen 80 - 90 % erreicht. Von den HUVECs wurden 3.000 Zellen pro 96 Well ausgesät. 24 h nach Aussaat waren die Zellen zu ca. 20 % konfluent. Bei einer Lichtmikroskopie wurden keine morphologischen Auffälligkeiten beobachtet.

5.2.8.3 Positionseffekte bei 96 Well-Platten

Bei AlamarBlue-Assay Messungen zeigte sich die Auffälligkeit, dass die Messwerte der äußeren Wells generell niedriger waren als die der inneren Wells einer 96-er Platte (Abb. 5.11).

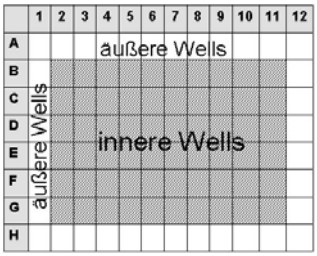
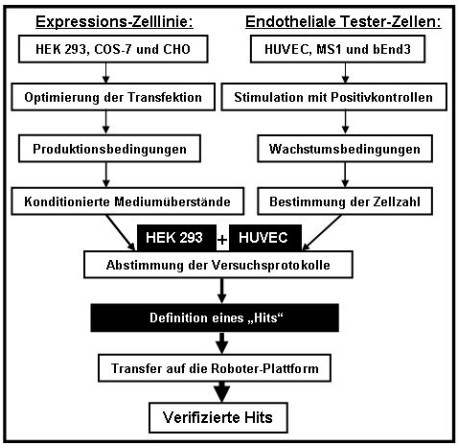


Abb. 5.11: Aufteilung in 36 äußere und 60 innere Wells einer Platte

Durch einen Proliferationsversuch wurde dieser Positionseffekt quantifiziert. Hierzu wurden HUVECs in einer 96 Well-Platte ausgesät und 5 Tage darauf die Zellzahlen durch AlamarBlue-Messung bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden von den 36 äußeren, den 60 inneren und der Gesamtheit aller 96 Wells berechnet. Ein Ergebnisvergleich zeigte, dass die Messwerte innerhalb der Gruppe mit den äußeren oder inneren Wells homogener waren, als die der gesamten Platte. Die Mittelwerte der inneren Wells waren durchschnittlich 12,5 % höher als die der äußeren. Die zugehörigen Standardabweichungen hingegen waren mit 4,26 und 4,30 für beide Gruppen nahezu identisch. Bei der Betrachung aller Wells der Platte ergab sich mit 6,99 eine deutlich höhere Standardabweichung. Weil die Standardabweichung für die Definition eines Hits eine wesentliche Rolle spielt (5.2.9),

machten diese Kalkulationen eine getrennte Auswertung der äußeren und inneren Wells erforderlich. Der Effekt lässt sich durch erhöhte Verdunstungsraten in den äußeren Wells erklären. Am Tag der Messung war zu sehen, dass die Mediummengen in den äußeren Wells geringer waren. Geänderte Pufferbedingungen führen hier vermutlich zu einem schlechteren Zellwachstum.

5.2.9 Definition eines Hits



Die Definition eines Hits erfolgte bei den Etablierungsarbeiten und dem Screen unterschiedlich. Bei den Etablierungsarbeiten wurden die Messwerte der Positiv- mit den Negativkontrollen verglichen. Hierzu wurden zunächst die Mittelwerte und Standardabweichungen der AlamarBlue-Assay Messwerte berechnet und anschließend mit den Werten der Negativkontrollen ein Schwellenwert kalkuliert. Dieser errechnete sich durch Addition eines Vielfachen der Standardabweichung zum Mittelwert. Der Wert des Vielfachen musste dabei die Bedingung erfüllen, dass durch den Schwellenwert keine Positivkontrolle als negativ und keine Negativkontrolle als positiv (Hit) gewertet wurde. Im Folgenden wurden Messwerte, deren Mittelwert den berechneten Schwellenwert überstieg, als positives Signal bzw. als Hit definiert. Beim Screen werden die HEK 293-Zellplatten komplett mit cDNA-Expressionsplasmiden der Kollektionssammlungen transfiziert und enthalten daher keine internen Negativkontrollen. Wegen des Positionseffektes (5.2.8.3) erfolgte die Auswertung der HUVEC-Platten geteilt in zwei Gruppen, die 36 äußeren und 60 inneren Wells. Ein Hit definierte sich dadurch, dass ein Messwert den Mittelwert seiner zugehörigen Gruppe um mindestens die 2,5-fache Standardabweichung übersteigt. Eine weitere Bedingung an einen Hit war, dass dasselbe cDNA-Expressionsplasmid in einer unabhängigen Testung der gleichen Kollektionsplatte ebenfalls bestätigt wurde. Überdies erfolgte eine visuelle Kontrolle jeder Platte. Damit wurde sichergestellt, dass es sich nicht um ein falsch positives Signal durch eine bakterielle oder HEK 293-Zellen Kontamination handelte. In diesem Fall wurde ein Hit als falsch positiv deklariert und von der weiteren Bearbeitung ausgeschlossen.

5.2.10 Statistische Signifikanz - Wiederfindungsrate und falsch Positive/Negative

Für den Erfolg des Screens war ein reproduzierbarer und stabiler Versuchsaufbau wichtig. Dies gewährleistete hohe Trefferquoten und reduzierte die Anzahl falsch positiver oder nega-

tiver Hits. Falsch Positive waren bei den manuellen Etablierungsarbeiten Negativkontrollen, die durch hohe Messwertschwankungen als Hit definiert wurden. Beim Screen hingegen waren es in der Regel Messwerterhöhungen, die durch Kontaminationen verursacht wurden. Bei falsch Negativen wurde eine Positivkontrolle nicht als Hit identifiziert. Die Tauglichkeit der Hit-Definition (5.2.9) wurde bei den manuellen Etablierungsarbeiten zu drei Zeitpunkten überprüft. Hierzu wurden bei drei Proliferationsversuchen jeweils die Wiederfindungsraten der Positivkontrollen und falsch negativen Ergebnisse bestimmt. Die erste Erfassung erfolgte bei der Stimulation von HUVECs durch kommerzielle rekombinante Wachstumsfaktoren (5.2.7, Abb. 5.9). Danach wurde ein Proliferationsversuch herangezogen, bei dem HEK 293-Überstände getestet wurden (5.2.8.1, Abb. 5.10). Schließlich flossen Ergebnisse eines Experimentes ein, bei dem Aussaat und Mediumwechsel der HUVECs mit dem Roboter (HEROS) getätigt wurden. Anstelle von HEK 293-Überständen wurden in diesem Fall HUVEC-Mangelmedien mit oder ohne rekombinante (rek.) Wachstumsfaktoren (15 ng/ml) auf die HUVECs transferiert. Tab. 5.1 fasst die Ergebnisse zusammen und zeigt die Statistik des Screens.

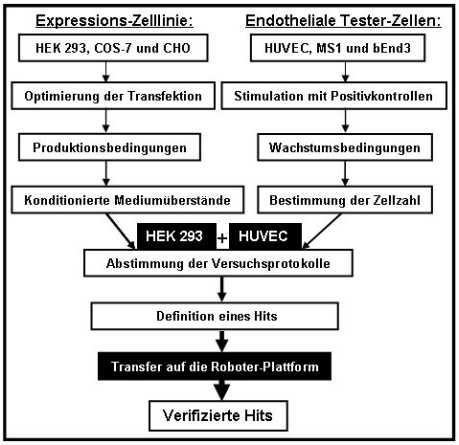
Tab. 5.1: Bestimmung der Wiederfindungsraten von Positivkontrollen zu drei Stadien der Assay-Etablierung und dem Screen
Bei der Durchführung mit Robotern wurden falsch negative Werte nicht erhoben.

	1. manuelle Testung mit rek. Faktoren	**2. manuelle Transfektion & Übertrag**	**3. Roboter-Aussaat und Übertrag mit rek. Faktoren**	**4. Screen 34.596 cDNAs (Origene/MGC)**
Falsch positiv	0 %	ca. 1 %	ca. 1 %	< 1,6 %
Falsch negativ	0 %	ca. 1 %	nicht erhoben	nicht erhoben
Positivkontrollen - Wiederfindungsrate	100 %	100 %	ca. 95 %	> 94 %
VEGF-Wiederfindungsrate	100 %	ca. 98 %	100 %	*nicht erhoben
bFGF-Wiederfindungsrate	100 %	100 %	100 %	*nicht erhoben
aFGF-Wiederfindungsrate	nicht erhoben	nicht erhoben	ca. 82 %	*nicht erhoben

* Positivkontrollen wurden in ihrer Gesamtheit betrachtet und nicht getrennt nach einzelnen Wachstumsfaktoren aufgeführt.

Tab. 5.1 ist zu entnehmen, dass mit zunehmender Automatisierung der Versuche, der prozentuale Anteil falsch positiver Ergebnisse zu- und die Wiederfindungsrate etwas abnimmt. Im vollautomatisierten Screen wurden ca. 2 % falsch Positive bestimmt und eine Wiederfindungsrate von ca. 92 % der Positivkontrollen erzielt. Die Statistik für den Screen wurde anhand der Ergebnisse von vier Kontrollplatten (5.2.11.3, Abb. 5.15) erstellt.

5.2.11 Transfer des Proliferationsversuchs auf die Roboter-Plattform



In manuellen Experimenten wurde die Funktionalität des Proliferationsversuchs mit HUVECs und HEK 293-Überständen gezeigt. Im nächsten Schritt erfolgte der Transfer der Versuche auf die Roboter-Plattform. Da die Arbeitsflächen der Roboter nicht mit Sterilwerkbänken ausgestattet waren, bestand eine erhöhte Kontaminationsgefahr. Aus diesem Grund wurden vorab Sterilitätstests durchgeführt. Bei diesen wurden 96 Well-Platten mit Mangelmedium (5.2.8.1) befüllt und für 1 h ohne Deckel in verschiedenen Arbeitsbereichen der Roboter aufgestellt und anschließend für 2 Tage bei 37° C inkubiert. Dabei wurde eine Vielzahl vorwiegend bakterieller Kontaminationen festgestellt. Entsprechende Befunde wurden ebenfalls bei ersten Testläufen mit den Robotern erhalten. Möglichkeiten die Kontaminationsgefahr zu reduzieren, stellen die Verkürzung der Inkubationszeiten (5.2.11.1) oder die Erhöhung der Antibiotika- und Mykotikakonzentrationen in den Medien dar (5.2.11.2). Weiter wurden anfänglich beim Überstands-Transfer HEK 293-Zellen auf HUVECs verschleppt. Dieses Problem ließ sich durch Reduzierung der Eintauchtiefen der 96-Kopf-Dispensoren eliminieren.

5.2.11.1 Testung verschiedener Inkubationszeiten der HUVECs

Die bei Robotertestläufen auftretenden Kontaminationen wurden größtenteils bei HUVECs beobachtet. Grund hierfür ist das besonders nährstoffreiche Endothelzellmedium und die lange Inkubationsdauer von 5 Tagen während des Proliferationsversuchs. Mit zunehmender Zeit stieg die Kontaminationshäufigkeit stark an, nach 3 - 4 Tagen waren 30 - 50 % und nach 5 Tagen 50 - 80 % der Wells betroffen. Es wurde daher überprüft, ob eine Verkürzung der Inkubationsdauer die zuvor erreichten Stimulationen verringerte (Abb. 5.12).

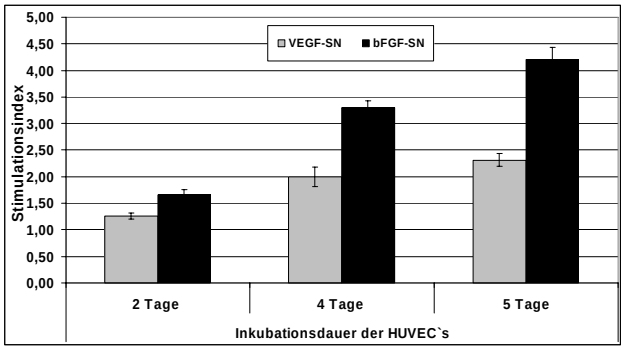


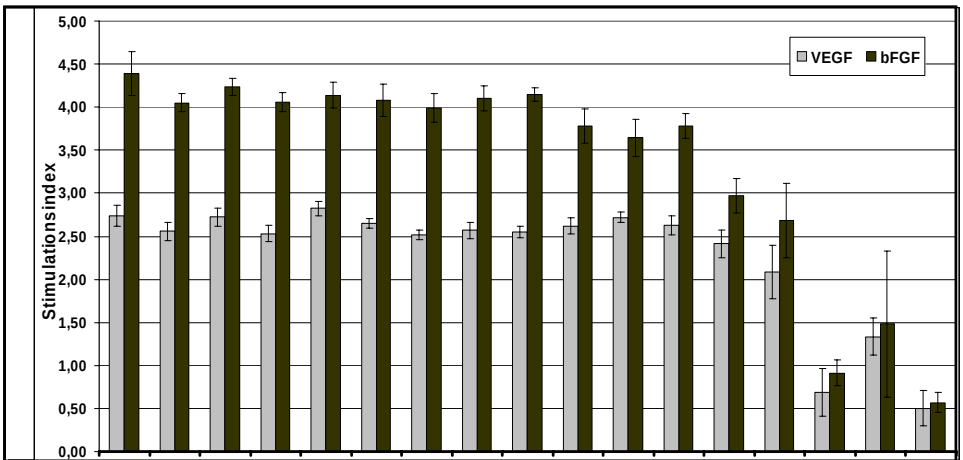
Abb. 5.12: Vergleich verschiedener Inkubationsdauern der HUVECs nach Transfer von HEK 293-Überständen (SN)
Dabei dienten VEGF- und bFGF-Überstände als Positiv- und Leervektor als Negativkontrolle. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte nach 2, 4 und 5 Tagen durch AlamarBlue-Assay. Der Stimulationsindex wurde durch Division der Messwerte mit denen der entsprechenden Leervektor-Kontrolle ermittelt.

Insgesamt fielen die Stimulationen mit zunehmender Reduzierung der Inkubationsdauer geringer aus. Die besten Ergebnisse wurden nach 5 Tagen ermittelt und betrugen das 2,3-fache

durch VEGF und das 4,2-fache durch bFGF. Da bereits durch Verkürzung auf 4 Tage die Stimulationen um durchschnittlich 20 % abnahmen, wurde eine Veränderung nicht in Betracht gezogen.

5.2.11.2 Anpassung der Antibiotika- und Mykotikakonzentration in den Medien

Auch die Reinigung aller Arbeitsbereiche der Roboter mit 80 % Ethanol reduzierte die Kontaminationshäufigkeit nur auf 15 - 20 %, weshalb eine Erhöhung der Antibiotika- und Mykotikakonzentrationen in den verwendeten Medien erforderlich wurde. Die Durchführung im HUVEC-Mangelmedium war besonders kritisch, da hier am längsten inkubiert wird, und zudem die HUVECs empfindlich auf Veränderungen der Mediumzusammensetzung reagieren. Beispielsweise führt der Austausch des Antibiotikums Gentamicin gegen Penicillin zum Absterben der Zellen. Daher wurde die Konzentration von Gentamicin im HUVEC-Mangelmedium erhöht. Das Beifügen eines zusätzlichen Mykotikums (Nystatin) erwies sich dagegen als unproblematisch. Zunächst wurde getestet, welche Einflüsse die Erhöhung einzelner Zusätze auf die Stimulierbarkeit der HUVECs durch rekombinante Wachstumsfaktoren hatten. Dabei wurden geringere Stimulationen durch Gentamicin ab 200 µg/ml, bei Amphotericin B ab 1,25 µg/ml und bei Nystatin ab 30 µg/ml erhalten. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden im nächsten Schritt die Zusätze kombiniert (Abb. 5.13).



A [µg/ml]	0,5	0,75	0,5	0,75	0,75	1	1	1	1	1,25	1,25	1,25	1,5	1,5	0,75	1	1,5
G [µg/ml]	50	50	75	75	100	75	100	125	150	100	125	150	125	150	75	100	150
N [µg/ml]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20

Abb. 5.13: Stimulation von HUVECs in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Gentamicin (G), Amphotericin B (A) und Nystatin (N) im Mangelmedium
Die Stimulation erfolgte mit VEGF- und bFGF-Überständen, der Leevektor-Überstand diente als Negativkontrolle. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte nach 5 Tagen Inkubation im AlamarBlue-Assay. Der Stimulationsindex wurde durch die Division der Messwerte mit der entsprechenden Leervektor-Kontrolle ermittelt.

Dabei zeigte sich, dass die Konzentration von Gentamicin von 50 µg/ml auf 150 µg/ml und Amphotericin B von 0,5 µg/ml auf 1 µg/ml erhöht werden kann, ohne dass es zu Auswirkungen kommt. Der Zusatz von Nystatin führte bei Konzentrationen von 20 µg/ml zum Rück-

gang, ab 10 µg/ml war er ohne Einfluß. Diese Konzentrationen wurden fortan im Screen eingesetzt und bewirkten eine Reduzierung der Kontaminationsrate auf unter 0,1 %. Dem HUVEC-Aussaatmedium wurde 100 µg/ml Gentamicin, 0,5 µg/ml Amphotericin B und 10 µg/ml Nystatin zugesetzt. Bei den HEK 293-Zellen wurde nach der Transfektion Penicillin/Streptomycin gegen 150 µg/ml Gentamicin und 0,5 µg/ml Amphotericin B ausgetauscht.

5.2.11.3 Zeitliches Ablaufschema und Plattenanzahl eines „Screen-Laufes“

Abb. 5.14 zeigt das zeitliche Ablaufschema und grundlegende Protokolldetails.

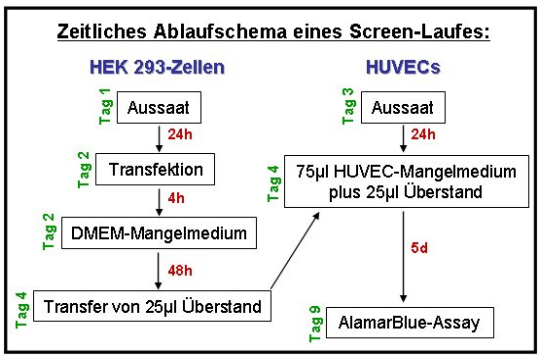


Abb. 5.14: Zeitliche Koordination der Arbeitschritte beim Screen
Die Aussaat der HEK 293-Zellen markierte den Start bzw. Tag 1 eines Screens. Die Bezeichnung „Lauf“ umfasst eine komplette Durchführung aller Arbeitsschritte. 24 h nach Aussaat der HEK 293-Zellen erfolgte die Transfektion und 2 Tage darauf der Transfer der Überstände auf HUVECs. 5 Tage später wurden die Zellzahlen mittels AlamarBlue-Assay bestimmt.

Die Durchführung eines Laufes dauert 9 Tage. Dabei werden je 54 cDNA-Kollektionsplatten sowie 2 manuell- und 4 roboterpräparierte Kontrollplatten in HEK 293-Zellen transfiziert. Die Kontrollplatten sind in 16-facher Ausführung mit H_2O und 5 verschiedenen cDNA-Expressionsplasmiden befüllt. H_2O, Leervektor (LV) und eine Transfektion-Kontrolle (TK) dienen als Negativ- und VEGF, bFGF und aFGF als Positivkontrolle. Die Anordnung einer Kontrollplatte ist in Abb. 5.15 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LV	LV	bFGF	bFGF	aFGF	aFGF	VEGF	VEGF	TK	TK	H_2O	H_2O
B	LV	LV	bFGF	bFGF	aFGF	aFGF	VEGF	VEGF	TK	TK	H_2O	H_2O
C	LV	LV	bFGF	bFGF	aFGF	aFGF	VEGF	VEGF	TK	TK	H_2O	H_2O
D	LV	LV	bFGF	bFGF	aFGF	aFGF	VEGF	VEGF	TK	TK	H_2O	H_2O
E	LV	LV	bFGF	bFGF	aFGF	aFGF	VEGF	VEGF	TK	TK	H_2O	H_2O
F	LV	LV	bFGF	bFGF	aFGF	aFGF	VEGF	VEGF	TK	TK	H_2O	H_2O
G	LV	LV	bFGF	bFGF	aFGF	aFGF	VEGF	VEGF	TK	TK	H_2O	H_2O
H	LV	LV	bFGF	bFGF	aFGF	aFGF	VEGF	VEGF	TK	TK	H_2O	H_2O

Abb. 5.15: Plattenbelegung einer HEDIS-Kontrollplatte beim Screen
Die Platten waren jeweils mit 5 verschiedenen Kontroll-cDNA-Expressionsplasmiden und H_20 befüllt. Die Anordnung erfolgte jeweils in zwei nebeneinander liegenden senkrechten Reihen und unterschied sich auf jeder Kontrollplatte.

Für eine von der Plattenposition unabhängige qualitative Beurteilung waren die Kontrollen auf jeder Platte unterschiedlich verteilt. Mit Hilfe der HEDIS-Kontrollplatten wurden je Lauf die Wiederfindungsraten der Positivkontrollen ermittelt (5.2.10). Die Platten wurden wie die Kollektionsplatten getrennt in die 36 äußeren und 60 inneren Wells ausgewertet (5.2.8.3). Zur Schwellenwertermittlung wurden alle Messwerte der Negativkontrollen zusammengefasst. Lag die Wiederfindungsrate unter 80 %, wurde der Lauf nicht ausgewertet.

5.3 Der Screen

Nach Transfer der Protokolle auf die Roboter-Plattform wurde der Screen von zwei Kollektionen mit insgesamt 34.596 cDNA-Expressionsplasmiden durchgeführt.

5.3.1 Anzahl und Qualität der verwendeten cDNA-Klone

Die cDNA-Kollektionssammlungen wurden von OriGene Technologies Inc. und dem deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) bezogen. Die Klonsammlung von OriGene umfasst 20.000 Expressionsplasmide, die jeweils komplette cDNA-Sequenzen kodieren. Die OriGene-Sammlung wurde durch Sequenzanalysen von 96 zufällig ausgewählten Expressionsplasmiden charakterisiert (Tab. 5.2). Beim Vergleich mit den Herstellerangaben zeigte sich bei zwei Plasmiden ein falsches cDNA-Insert. Dies entsprach einer Fehlerquote von ca. 2 %. Die durchschnittliche Insert-Größe wurde durch Restriktionsverdau ermittelt und betrug 2.800 Basenpaare. Die Sequenzen lagen für alle cDNAs vor und wurden mit der Datenbank des „National Center For Biotechnology Information“ (NCBI) abgeglichen.

Tab. 5.2: Charakterisierung der verwendeten cDNA-Expressionsplasmid-Kollektionen

	Einheit	RZPD (MGC)	OriGene
Anzahl der cDNA Klone		13.444 human 1.152 murin	20.000 human
Durchschnittliche Insert-Größe	**[bp]**	1.800	2.800
Anteil an 5`/3` Sequenzierungen	**[%]**	100	100
Komplette Sequenzierungen	**[%]**	48	100
Anteil der volle Länge Klone	**[%]**	83	100
Fehlerrate	**[%]**	ca. 8	ca. 2
Redundanz innerhalb der Kollektion	**[%]**	12	ca. 9
Redundanz bei beiden Kollektionen	**[%]**	19,4	
Anteil der Artefakte	**[n]**	3	0
Expressionsvektoren		pCMVSport6-XL	pCMV6-XL

Die Klonsammlung vom RZPD wurde im Rahmen des „Mammalian Gene Collection“ (MGC) Projektes (Strausberg et al., 1999) erzeugt und beinhaltet 13.444 humane und 1.152 murine cDNA-Expressionsplasmide. Zur Charakterisierung wurden von 58 zufällig ausgesuchten Klonen die cDNA-Inserts sequenziert. Dabei wiesen weniger als 5 % ein anderes, als das nach Herstellerangaben erwartete, cDNA-Insert auf. Bei 3 % wurden Artefakte gefunden, d.h. die Plasmide hatten entweder kein cDNA-Insert oder enthielten nichtfunktionelle Inserts. Die durchschnittlich ermittelte Insert-Größe betrug 1.800 Basenpaare. Der Anteil vollständig sequenzierter cDNA-Inserts lag bei 48 %. Bei den restlichen Klonen liegen nur die Ergebnisse der 5`/3`-Ansequenzierungen vor.

5.3.2 Screen nach sezernierten endothelialen Wachstumsfaktoren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte der Screen von 34.596 cDNA-Expressionsplasmiden nach sezernierten endothelialen Wachstumsfaktoren. Nach zwei unabhängigen Testungen und manueller Verifikation erwiesen sich 13 Klone bzw. 0,038 % als Hits (Abb. 5.16).

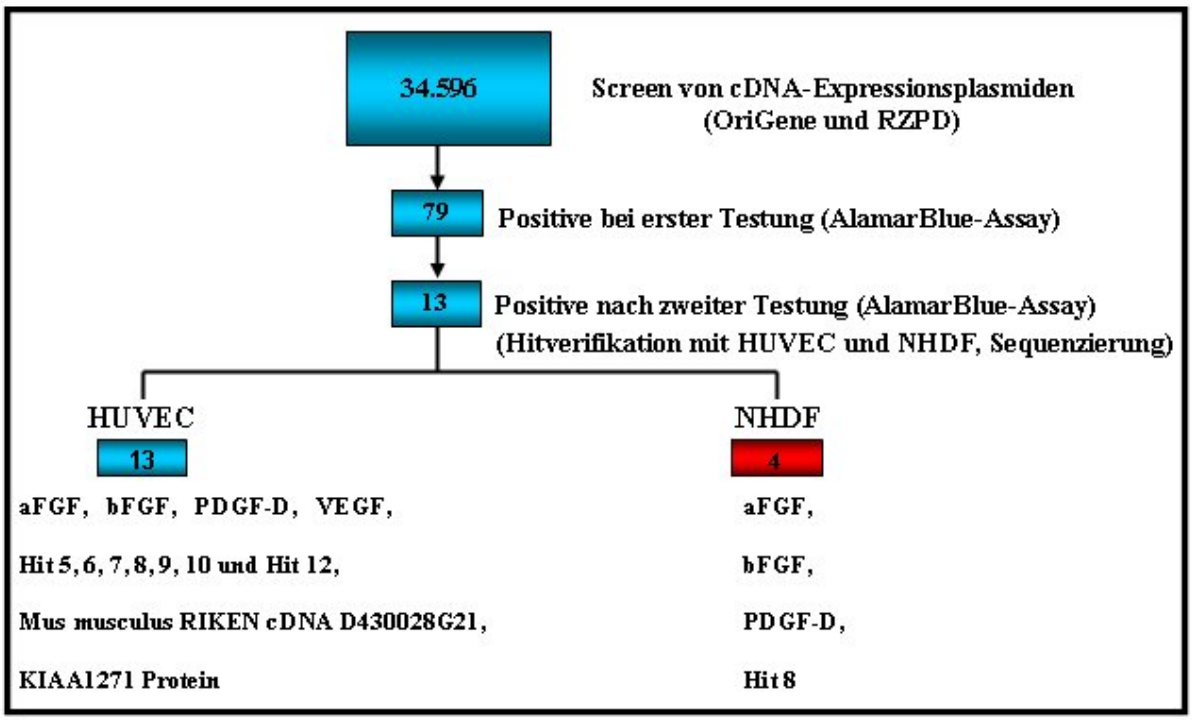


Abb. 5.16: Schematische Darstellung des Ablaufs beim Screen der 34.596 cDNA-Expressionsplasmide von OriGene und RZPD (Strausberg et al., 1999)
Nach dem ersten Screen wurden 79 Klone als positiv gewertet. Beim zweiten Durchlauf wurden 13 davon bestätigt. Alle positiven wurden durch manuelle Versuche verifiziert. Dabei bewirkten aFGF, bFGF, PDGF-D und Hit 8 auch auf primären humanen Fibroblasten (NHDF) eine proliferative Stimulation. 7 der 13 gefundenen Hits wurden zum Schutz eines laufenden Patentierungsverfahrens nicht mit vollem Namen, sondern lediglich mit der Bezeichnung „Hit“ aufgeführt. Die Nummerierung entspricht hierbei Tab.5.3.

Sämtliche verifizierten Hits wurden sequenziert und die Ergebnisse mit der Datenbank des NCBIs abgeglichen (Altschul et al., 1997). Die Resultate sind in Tab. 5.3 zusammengefasst.

Tab. 5.3: Überblick über die 13 im Screen identifizierten Hits
Dargestellt sind die zugehörigen Genbanknummern (NM_ oder XM_) bzw. die Xantos Biomedicine AG internen Nummern (XAN.) und eine kurze Klonbeschreibung.

1. Gene mit einer bereits bekannten Funktion in der Angiogenese		
Hit	**Datenbanknummer**	**Klonbeschreibung**
1	NM_033137	aFGF (acidic Fibroblast Growth Factor, FGF-1) (Jaye et al., 1986)
2	NM_002006	bFGF (basic Fibroblast Growth Factor, FGF-2) (Abraham et al., 1986)
3	NM_003376	VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Leung et al., 1989)
4	NM_025208	PDGF-D (Platelet Derived Growth Factor D) (Hamada et al., 2001)

2. Gene mit einer bereits bekannte Funktion, die bisher noch nicht in Zusammenhang mit Angiogenese gebracht wurden		
Hit	**Datenbanknummern**	**Klonbeschreibung**
5	XAN.625	Integrales Membranprotein Typ II
6	XAN.3438	Intrazelluläre Kinase, zytosolisches Protein
7	XAN.58573	Immun- und Entzündungs-Reaktionen, Intrazelluläres Adapterprotein
8	XAN.4895	Funktion bei Morphogenese, zytosolisches Protein
3. Bereits bekannte Gene, deren Funktion jedoch noch weitestgehend unklar ist		
Hit	**Datenbanknummern**	**Klonbeschreibung**
9	XAN.55483	Mehrere Zink Finger Domänen vorhergesagt, vermutlich nukleäres Protein
10	XAN.10692	Hypothetisches Protein - murine RZPD-Kollektion, Lokalisation unbekannt
11	XAN.59601	Bisher kein Protein beschrieben - humane RZPD-Kollektion
12	XAN.53341 NM_144888	Mus musculus RIKEN cDNA D430028G21 (Bonaldo et al., 1996)
13	XAN.53661 XM_045472 NM_020746	KIAA1271 Protein, mRNA (Strausberg et al., 1999) 16.07.2001 (Matsuda et al., 2003) ab 22.02.2004

Bei den Proteinen der Hits 1 - 4 handelt es sich um bereits beschriebene sezernierte endotheliale Wachstumsfaktoren. Für die Proteine der Hits 5 - 8 sind verschiedene Funktionen bekannt, jedoch keine Zusammenhänge zur Angiogenese. Nach Datenbankanalysen handelt es sich um vier zytosolische Proteine. Das Protein des Hits 9 hingegen ist vermutlich im Kern lokalisiert. Die Funktion ist größtenteils noch unbekannt. Die Hits 10 und 12 stammten aus der murinen Kollektion und kodieren für hypothetische Proteine unbekannter Funktion. Außerdem wurde von der Hit-cDNA 12 ein humanes Homolog (Hit 13) im Screen identifiziert. Der erste Eintrag der Hit-cDNA 12 in die NCBI-Datenbank erfolgte am 10.04.2003 und wurde am 23.09.2003 aktualisiert. Auch der Eintrag der Hit-cDNA 13 wurde zum Zeitpunkt der Identifizierung unter einer anderen NCBI-Datenbank-Nummer geführt und am 22.02.2004 durch einen neuen Eintrag ersetzt.

Im Anschluss an den Screen wurde eine weitere Charakterisierung der cDNA des Hits 13 vorgenommen. Auswahlkriterium hierfür war die Identifizierung einer Reihe homologer Proteine in anderen Säugern (5.4.1.1). Außerdem wurden nach Expression dieser cDNA die Überstände mit den stärksten Stimulationen nach den Positivkontrollen erhalten. Schließlich bewirkten weder das humane, noch das murine Protein eine Stimulation primärer humaner Fibroblasten (Shipley et al., 1989) (Abb. 5.17, rechts), was ein Hinweis auf eine Endothelzellspezifität lieferte.

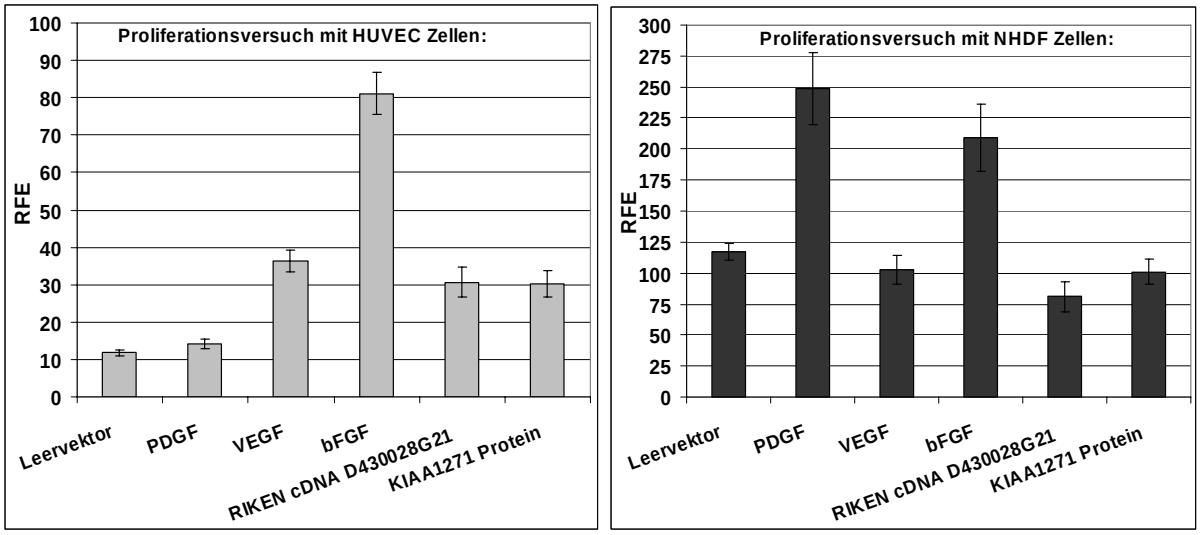


Abb. 5.17: Endothelzellspezifität ausgewählter Hits
Die Testung hierzu erfolgte über Proliferationsversuche, bei dem HEK 293-Überstände sowohl auf HUVECs (links), als auch auf primäre humane Fibroblasten (NHDFs) (rechts) transferiert wurden. Getestet wurden die Hits 12 (RIKEN cDNA D430028G21) und 13 (KIAA1271 Protein). Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte bei den HUVECs nach 5 Tagen und bei NHDFs nach 3 Tagen durch AlamarBlue-Assay. Die Messwerte sind in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) angegeben.

Aus den genannten Gründen wurde für eine weitere Charakterisierung die Hit cDNA 13 ausgewählt. Diese kodiert ein Protein mit bis dato unbekannter Funktion und trägt die Bezeichnung KIAA1271. Aufgrund der gefundenen Funktion wurde diesem Protein der Name hSEP (**h**uman **S**timulator of **E**ndothelial **P**roliferation) gegeben.

5.4 Charakterisierung von hSEP als Stimulator endothelialer Proliferation

5.4.1 Bioinformatische Analyse von hSEP

5.4.1.1 Homologe Proteine von hSEP

Im Screen wurde neben hSEP auch ein murines Homolog identifiziert. Durch Protein-Protein BLAST-Analysen in der Datenbank des NCBIs (Altschul et al., 1997) wurden zahlreiche homologe Sequenzen vergleichbarer oder geringerer Proteinlänge gefunden. Proteine mit E-Werten $\leq e^{-10}$ wurden gegen hSEP abgeglichen (Abb. 5.18).

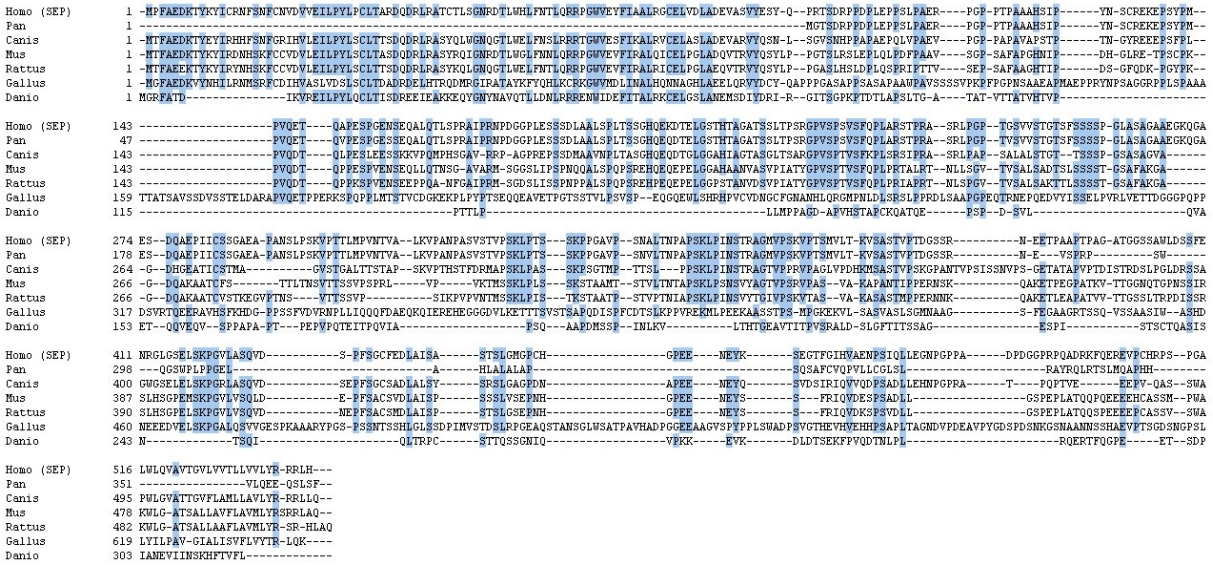


Abb. 5.18: Abgleich (Alignment) sechs verschiedener homologer Proteine gegen das humane SEP-Protein
Angegeben sind die Gattungsnamen aus denen die homologen Proteine stammen. Die markierten Aminosäuren zeigen eine Übereinstimmung mit dem hSEP-Protein an. Die Analyse wurde mit dem Programm CloneMangager 6 durchgeführt (Blosum 62).

Die größte Sequenzidentität wurde mit 55 % bei einem Protein (XP_525410) aus Schimpansen (Pan troglodytes, $6e^{-133}$) gefunden. Dabei stimmten 302 Aminosäuren (AS) von 360 AS mit dem hSEP überein. Bei einem Protein (XP_542912) aus dem Hund (Canis familiaris, $1e^{-100}$) betrug die Homologie 52 % bzw. 293 AS. In der Maus (Mus musculus, $4e^{-93}$) wurde ein Protein (NP_659137) mit einer Homologie von 274 Aminosäuren (AS) bzw. 50 % gefunden. Eine ähnliche Homologie von 48 % bzw. 266 AS ergab sich für ein Protein (AAH81869) aus der Wanderratte (Rattus norvegicus, $6e^{-90}$). Untereinander besaßen das Maus- und Rattenprotein eine Homologie von 79 %. Ein Protein (NP_001012911) des Bankivahuhnes (Gallus gallus, $7e^{-14}$) wies eine Homologie von 24 % bzw. 161 AS auf und bei einem Homolog (XP_691326) aus dem Zebrafisch (Danio rerio, $5e^{-11}$) betrug die Homologie 19 % bzw. 103 AS. Generell gilt, je niedriger der E-Wert, umso größer die Homologie zu

hSEP. Bei den BLAST-Analysen wurden überdies 5 humane homologe Proteinsequenzen gefunden. DNA-Sequenzen dieser Einträge beinhalteten jedoch weder Poly-A noch Stopcodon-Sequenzen. Ob es sich hierbei um Isoformen von hSEP oder unkomplette Sequenzierergebnisse handelte, ließ sich dadurch nicht beantworten.

5.4.1.2 Analyse der Primärsequenz von hSEP

Der offene Leserahmen des hSEP-Gens kodiert für ein 540 Aminosäuren langes Protein. Anhand der Primärsequenz konnte durch das Programm „Compute pI/Mw“ ein Molekulargewicht von 56,59 kDa und ein theoretischer isoelektrischer Punkt von 5,37 kalkuliert werden (Bjellqvist et al., 1993).

5.4.1.3 Analyse der Sekundärstruktur von hSEP

Aus der räumlichen Anordnung der Aminosäuren eines Proteins ergeben sich verschiedene mögliche Sekundärstrukturen. Für die Struktur des hSEP-Proteins wird mit Hilfe des Programms „Self-optimized Prediction Method“ (SOPM) (Combet et al., 2000) mit 66,5 % ein hoher Anteil an unstrukturierten und zufällig gewundenen Bereichen vorhergesagt. Der Anteil an Alpha Helices liegt bei 17 %, der für Beta-Faltblattstrukturen bei 5,7 % und der für ausgedehnte Einzelstrangabschnitte bei 10,8 %. Die Abb. 5.19 zeigt eine Übersicht der Verteilung einzelner Strukturabschnitte innerhalb des hSEP-Proteins.

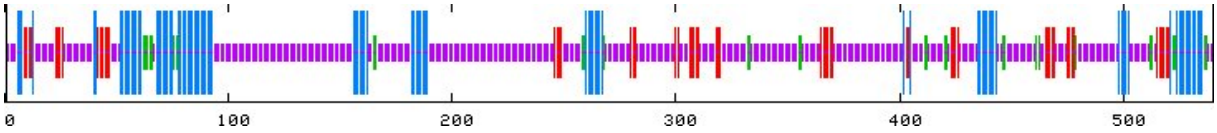


Abb. 5.19: Kalkulierte Struktureigenschaften des hSEP-Proteins
Die farbigen Bereiche markieren die potentiellen Strukturen, die mit Hilfe des SOPM Programmes vorhergesagt wurden. Blaue Bereiche markieren potentielle Alpha Helices, rote Bereiche bezeichnen ausgedehnte Einzelstrangabschnitte, violette unstrukturierte und zufällig gewundene und grüne Bereiche Beta-Faltblattstrukturen.

Weitere Analysen mit dem Programm COILS (Lupas et al., 1991) (Parry, 1982) erbrachten keine Hinweise auf die Ausbildung von so genannten „Coiled Coils“.

5.4.1.4 Signalsequenzen für eine posttranslative Modifikation

Modifikationen haben einen wesentlichen Einfluss auf die Bindungs- und Funktionseigenschaften eines Proteins. Die Information über Art und Häufigkeit ihres Vorkommens liegt in der Aminosäuresequenz und erfolgt nach der Translation. Durch einen Abgleich mit der Datendank von PROSITE (Bairoch et al., 1997; Combet et al., 2000) wurde für hSEP eine Vielzahl von verschiedenen Proteinmodifikationssignalen vorausgesagt (Abb. 5.20).

5.4.1.5 Vorhersage potentieller Transmembrandomänen und Signalpeptide

Die Hydrophobizität eines Proteinabschnittes lässt Vorhersagen zu, ob dieser theoretisch in eine Membran eingebettet sein kann. Mit Hilfe des Programm TMpred (K.Hofmann & W.Stoffel, 2004) wurde zwischen den Aminosäuren 517 und 535 eine potentielle Transmembrandomäne mit einer Score-Zahl von 2843 ermittelt. Signifikante Aussagen können ab Werten ≥ 500 getroffen werden. Mit einer Score-Zahl von 1897 wird ein entsprechender Bereich in dem murinen Homolog identifiziert (as 478 - as 496). In beiden Proteinen endet die potentielle Transmembrandomäne 5 bzw. 6 Aminosäuren vor dem C-terminalen Ende der Proteine. Auf Aminosäureebene beträgt die Sequenzübereinstimmung 45 %. Mit dem Programm „Simple Modular Architecture Research Tool“ (SMART) (Letunic et al., 2004; Schultz et al., 1998) werden beide Domänen bis auf einzelne Aminosäurepositionen bestätigt. Bei hSEP befindet sich diese zwischen den Aminosäuren 513 und 535 (Abb. 5.20) und bei dem murinen SEP-Protein zwischen Aminosäure 479 und 496. Aussagen bezüglich der Orientierung, mit der die Proteine in der Membran verankert sein könnten, konnten von beiden Programmen nicht getroffen werden.

5.4.1.6 Hypothese der hSEP-Struktur

Weiter wird hierbei ein N-terminales Signalpeptid für den Aminosäurebereich 1 - 17 postuliert und 4 Regionen innerhalb von hSEP definiert, die geringe Komplexitäten (Low Complexity) aufwiesen. Anhand dieser Informationen wurde ein hypothetisches Strukturmodell von hSEP abgeleitet (Abb. 5.20). Für 3 der 4 repetitiven Sequenzen („Low Complexity Region“) wird eine überdurchschnittlich hohe Konservierung gegenüber dem murinen SEP-Homolog festgestellt. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Sequenzabschnitte für die Struktur oder Funktion bedeutend sein könnten. Einer möglichen Membranständigkeit von hSEP aufgrund der postulierten Transmembrandomäne (Engelman et al., 1986) steht die Tatsache gegenüber, dass die stimulierende Wirkung von hSEP durch Transfer von Überständen identifiziert wurde. Die Aktivität muss somit durch ein lösliches Protein vermittelt werden. Die Frage, ob es sich dabei um prozessiertes, lösliches SEP (sSEP) und/oder um andere sekundäre Faktoren handelt, stand daher bei verschiedenen molekularbiologischen Analysen im Mittelpunkt.

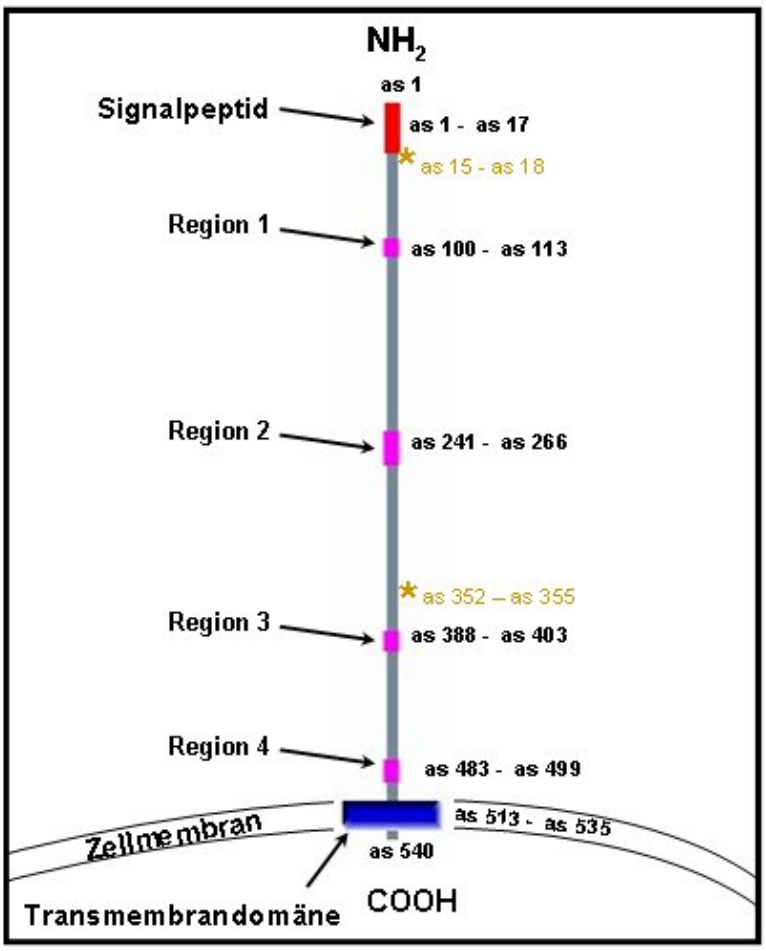


Abb. 5.20: Hypothetisches Strukturmodell von hSEP nach PROSITE, SMART und TMpred
Angegeben ist die komplette hSEP-Proteinsequenz von N- (NH_2) bis zum C-Terminus (COOH). Unter Angabe der Aminosäurepositionen (as) sind die vier vorhergesagten „Low Complexity" Regionen (Region 1 - 4), potentielle Sequenzen eines Signalpeptids und einer Transmembrandomäne, sowie zwei theoretische N-Glykosylierungsstellen (*) eingezeichnet. Nicht abgebildet wurden weitere von PROSITE theoretisch vorausgesagte Proteinmodifaktionsstellen. Demnach sind potentiell in der SEP Sequenz eine Tyrosinkinase, neun Proteinkinase C und neun Caseinkinase II Phosphorylierungsstellen sowie 16 N-Myristoylierungsstellen enthalten. Weil über die Orientierung der Membranverankerung keine Aussage getroffen werden konnte, wurde auf die Bezeichnung Membraninnen- und -außenseiten verzichtet.

5.4.1.7 Genomische Organisation des hSEP-Gens

Durch das Genom-BLAST-Programm des NCBI wurden Genlokalisierung und Exon-Intron-Organisation des hSEP-Gens analysiert (Cummings et al., 2002). Dabei erfolgte die Lokalisierung auf dem kurzen Arm des Chromosom 20p13. Die mRNA setzt sich aus 7 Exons zusammen, wobei Exon 1 das kürzeste (39 bp) und Exon 7 das längste (1645 bp) ist (Abb. 5.21).

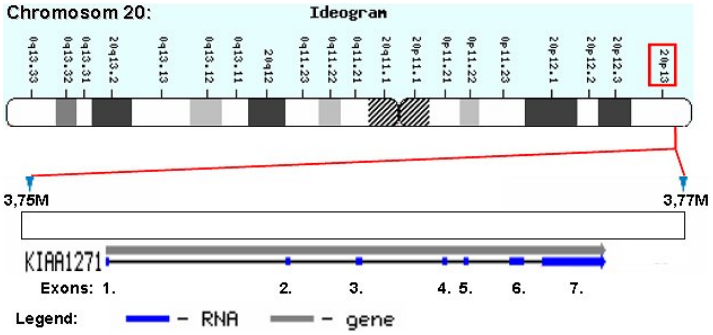


Abb. 5.21: Schematische Darstellung der Organisation des hSEP-Gens (KIAA1271)
Die Lokalisierung befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 20, Region 20p13 im Bereich (M) 3,75 - 3,77. Der graue Pfeil markiert den gesamten Genabschnitt. Außerdem sind Exons blau einzeichnet und nummeriert. Die Angaben stammen von Analysen mit dem Genom-BLAST Programm des NCBI (Cummings et al., 2002).

Das Gen des murinen Homolog zu hSEP liegt auf Chromosom 2 F22 F1 und besteht aus 16 Exons mit einer Größe von 11 bp - 533 bp.

5.4.1.8 Expressionsstudien von hSEP

Anhand von Sequenzierungen gewebsspezifischer cDNAs können Rückschlüsse gezogen werden, in welchen Geweben bestimmte Gene transkribiert werden. Die Sequenzdaten werden u.a. als so genannte „Expressed Sequence Tags" (ESTs) gesammelt (Schmitt et al., 1999). Im Rahmen des „Cancer Genome Anatomy Project" (CGAP) werden ESTs und cDNAs mit Sequenzüberlappungen zusammengefasst. Die Datenbank des National Cancer Institut (NCI) „UniGene build Hs.175+" (Lal et al., 1999) stellt diese Information für Expressionsanalysen einer cDNA bzw. eines Gens zur Verfügung. Dabei werden in 9 von 24 untersuchten Normalgeweben (Tab. 5.4) hSEP-Gen-Transkripte detektiert. Außerdem kann in 9 von 11 Tumorgeweben eine gesteigerte Expression von hSEP gegenüber entsprechenden Normalgeweben gefunden werden (Tab. 5.5).

Tab. 5.4: Zusammenfassung aller Gewebe, von denen ausreichend Sequenzen vorliegen
Die Daten stammen aus Datenbankanalysen von CGAP „UniGene build Hs.175+". Die Zugangsnummer von hSEP lautet Hs.528657. Die Tabellen wurden aus exportierten CGAP EST-Daten (08.02.2005) erstellt. Aufgelistet sind nur Gewebe, von denen insgesamt mindestens 5.000 Sequenzen vorliegen. Des Weiteren wurden Gewebe mit ≤ 1.000 Sequenzen nicht berücksichtigt. Die Normierung (Norm) der ESTs erfolgte auf 200.000 Sequenzen.

Gewebeherkunft	Normal		
	Sequenzen	ESTs	Norm
Lymphoretikulär Gewebe	33.135	4	24,1
Milz	19.897	2	20,1
Nervensystem	14.731	1	13,6
Bauchspeicheldrüse	94.820	5	10,5
Plazenta	209.290	7	6,7
Auge	80.064	2	5,0
Muskel	90.044	2	4,4
Leber	71.273	1	2,8
Niere	72.835	1	2,7
Gehirn	217.255	0	0
Lunge	108.061	0	0
Hoden	98.727	0	0

Gewebeherkunft	Normal		
	Sequenzen	ESTs	Norm
Lymphknoten	95.365	0	0
Prostata	62.064	0	0
Kopf und Nacken	48.478	0	0
Haut	47.410	0	0
Gebärmutter	34.842	0	0
Brustdrüse	24.832	0	0
Knochenmark	18.768	0	0
Magen	14.645	0	0
Eierstock	9.786	0	0
Dickdarm	9.713	0	0
Knochen	6536	0	0
Pankreas	6.378	0	0

Aufgrund großer Variationen bei den Stichprobenanzahlen (von 6.378 bis zu 217.255) aus den verschiedenen Geweben, können allerdings hierdurch nur grobe Aussagen und keine

quantitative Bewertungen über die Expressionsmengen gemacht werden. Den CGAP-Daten zufolge werden hSEP-Transkripte in ca. 38 % der Normalgeweben gefunden. Die höchsten Expressionsraten zeigen sich in lymphoretikulären Gewebe, Milz, Nervensystem, Bauchspeicheldrüse und Plazenta (Norm ≥ 5) (Tab. 5.4).

Im Gegensatz dazu werden in 9 von 11 Krebsgeweben bei der Bewertung der relativen Expression gegenüber Normalgeweben erhöhte Expressionsraten von hSEP ermittelt. Verminderte Raten wurden dagegen nur bei Krebsgeweben aus Plazenta und lymphoretikulären Geweben erhalten.

Tab. 5.5: Relative Expression von hSEP im Krebs- versus Normalgewebe
Die Daten stammen aus Datenbankanalysen von CGAP „UniGene build Hs.175+". Die Zugangsnummer von hSEP lautete Hs.528657. Zur Erstellung der Tabelle wurden die CGAP EST-Daten (08.02.2005) importiert, SAGE wurden ausgenommen. Weiter wurden Einträge nur herangezogen, wenn ≥ 5.000 Sequenzen sowohl aus Normal- als auch Tumorgewebe vorlagen und ≥ 3 ESTs in einem der Gewebe identifiziert wurden. Einzeleinträge mit ≤ 1.000 Sequenzen wurden nicht berücksichtigt. Die Normierung (Norm) der ESTs erfolgte auf 200.000 Sequenzen. Die grauen Felder markieren Expressionsnachweise in Normal-, die roten in Tumorgeweben. Die Gewebe sind absteigend nach ihrer relativen Expressionshäufigkeit von Krebs- versus Normalgewebe sortiert.

Gewebeherkunft	Normalgewebe			Krebsgewebe			Krebs- versus Normalgewebe
	Sequenzen	ESTs	Norm	Sequenzen	ESTs	Norm	
Hoden	98.727	0	0	41.650	3	14,4	> 14,4
Pankreas	6.378	0	0	83.760	5	11,9	> 11,9
Lymphknoten	95.365	0	0	51.187	3	11,7	> 11,7
Magen	14.645	0	0	107.123	5	9,3	> 9,3
Dickdarm	9.713	0	0	112.138	5	9	> 9,0
Haut	47.410	0	0	135.963	5	7,4	> 7,4
Muskel	90.044	2	4,4	34.636	5	28,9	6,6
Niere	72.835	1	2,7	76.633	5	13,0	4,8
Gehirn	217.255	0	0	176.347	3	3,4	> 3,4
Plazenta	209.290	7	6,7	43.296	1	4,6	-0,7
Lymphoretikulär Gewebe	33.135	4	24,1	80.736	7	17,3	-0,7

5.4.2 Biologische Aktivität von hSEP

Die transiente Expression der hSEP-cDNA (SEP) in HEK 293-Zellen führt zu einem konditionierten Überstand, der auf HUVECs eine stimulierende Wirkung hat. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Aktivität, auf die im Screen verwendeten HEK 293-Zellen oder HUVECs beschränkt ist, wurden weitere Proliferationsversuche mit sowohl alternativen Expressions-Zelllinien, als auch mit weiteren Tester-Zellen durchgeführt.

5.4.2.1 Aktivität von SEP in Überständen verschiedener Expressions-Zelllinien

Zur Überprüfung, ob die Expression von SEP generell zu einem konditionierten Überstand führt oder dieses Phänomen spezifisch für die HEK 293-Zellen ist, wurden alternative Expressions-Zelllinien getestet. Hierfür wurde ein Proliferationsversuch gemacht, bei dem neben den HEK 293- auch HeLa- (Scherer et al., 1953) und MCF-7-Zellen (Soule et al., 1973) als cDNA-Expressions-Zelllinien verwendet wurden (Abb. 5.22).

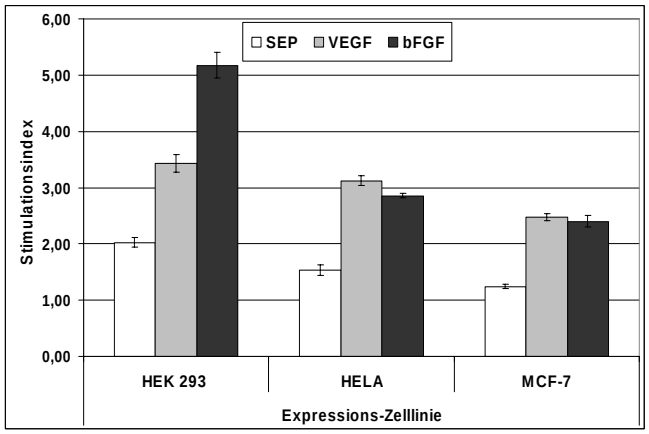


Abb. 5.22: Testung verschiedener Zelllinien zur SEP-Expression
Die Zelllinien wurden mit Leervektor-, SEP- (weiß), bFGF- (grau) und VEGF-cDNA-Expressionsplasmiden (schwarz) transfiziert, und die Überstände nach 48 h auf HUVECs transferiert. Die Expression mit HEK 293- und den HeLa-Zellen erfolgte in Medium mit 1,5 % Serum und die der MCF-7-Zellen in Medium mit 0,1 % Serum. 5 Tage nach dem Transfer folgte die Messung im AlamarBlue-Assay. Der Stimulationsindex wurde durch Division der Messwerte mit der Leervektor-Kontrolle ermittelt.

Hierbei zeigte sich, dass auch mit alternativen Zelllinien konditionierte, HUVECs stimulierende Überstände durch die Expression von SEP erhalten werden.

5.4.2.2 Aktivität von SEP auf verschiedenen Endothelzellen

Im Screen erfolgte die Identifizierung von SEP als Stimulator endothelialer Zellproliferation mit HUVECs der Firma PromoCell GmbH. Um zu testen, ob es sich hierbei um eine endothelzellspezifische Aktivität handelt, erfolgten weitere Proliferationsversuche mit alternativen endothelialen Primärkulturen (Abb. 5.23). Zum Einsatz kamen hierbei HUVECs (Watson et al., 1995) und (**H**uman **M**icro**v**ascular **E**ndothelial **C**ell) (HMVECs) (Carley et al., 1992) der Firma Cambrex Bio Science. Die Protokolle entsprachen dem Screenprotokoll.

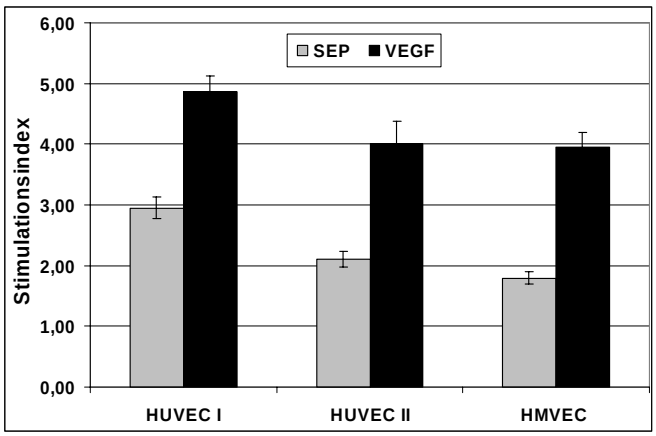


Abb. 5.23: Proliferationsversuch mit verschiedenen endothelialen Primärkulturen Die Stimulation erfolgte mit HEK 293-Überständen von VEGF und SEP. Diese wurden auf HMVECs, HUVECs (HUVEC I) der Firma Cambrex und HUVECs der Firma PromoCell (HUVEC II) transferiert. Als Negativkontrolle diente Leervektor-Überstand. Die Durchführung erfolgte nach dem Screenprotokoll. Nach dem AlamarBlue-Assay wurden die Stimulationsindexe durch Division der Messwerte mit der Leervektor-Kontrolle ermittelt.

Mit HUVECs der Firma Cambrex Bio Science werden mit einer 2,9-fachen durch SEP- und einer 4,9-fachen durch VEGF-Überstände die besten Stimulationen erzielt. Bei den alternativen Endothelzellen fielen die Stimulationen geringer aus. Daher wurden für weitere Experimente HUVECs der Firma Cambrex Bio Science verwendet. Für den Einsatz im Screen waren diese zuvor nicht geeignet, weil ihre Zellkulturgefäße mit Gelatine beschichtet werden müssen. Dies hätte weitere Arbeitsschritte und eine zusätzliche Kontaminationsgefahr bedeutet.

5.4.3 Erzeugung und Expression verschiedener SEP-Proteinfragmente

Nach Sequenzanalysen war zu erwarten, dass SEP aufgrund der potentiellen Transmembrandomäne (5.3.1.5) primär membranständig sein würde und nicht direkt sezerniert wird. Da die stimulierende Wirkung von SEP auf HUVECs durch transferierte HEK 293-Überstände nachgewiesen wurde, muss es sich auf jeden Fall um ein lösliches aktives Protein handeln. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre eine Prozessierung des SEP-Proteins, bei der eine löslich aktive Form freigesetzt wird. Um darüber eine Aussage machen zu können, wurden verschiedene molekularbiologische Analysen durchgeführt.

5.4.3.1 SEP als potentiell prozessierter, löslicher Faktor

Um zu überprüfen, ob SEP nach der Expression in HEK 293-Zellen in den Überstand sezerniert wird, wurden Westernblot-Analysen (Abb. 5.24) durchgeführt. Hierbei wurde außerdem ein verkürztes SEP-Konstrukt erzeugt, bei dem die potentielle Transmembrandomäne entfernt wurde (SEP1-510). Dieses Konstrukt diente der Überprüfung, ob durch die Deletion eine lösliche Form von SEP (sSEP) entsteht. Die Deletion wurde nach der Aminosäureposition 510 von SEP und somit in unmittelbarer Nähe der potentiellen Transmembrandomäne vorgenommen. An dieser Stelle wurde eine potentielle Arginin-C-Proteinase-Schnittstelle identifiziert (Keil, 1992). Zusätzlich wurden zwei weitere Konstrukte mit größeren C-terminalen Verkürzungen erzeugt. Die Schnittstellen dieser stellen ebenfalls potentielle Arginin-C-Proteinase-Schnittstellen dar. Eines umfasst den Bereich bis kurz vor der konservierten Region 2 nach Arginin 167 (SEP1-167), das andere enthält auch den weiter N-terminal gelegenen Bereich bis nach Arginin 236 (SEP1-236) (Abb. 5.20). Um die Proteine nachweisen zu können, wurde sowohl den verkürzten Konstrukten, als auch dem komplettem SEP-Protein ein C-terminales V5/His-Fusionsprotein angehängt (Southern et al., 1991). Dies ermöglicht die Detektion durch einen kommerziellen V5-Antikörper (Invitrogen) (Abb. 5.24). Um zu zeigen, dass die Fusion keinen Einfluss auf die Proteinfunktion hat, wurden alle Konstrukte auch jeweils ohne Fusionsprotein erstellt und in einem Proliferationsversuch getestet (Abb. 5.25).

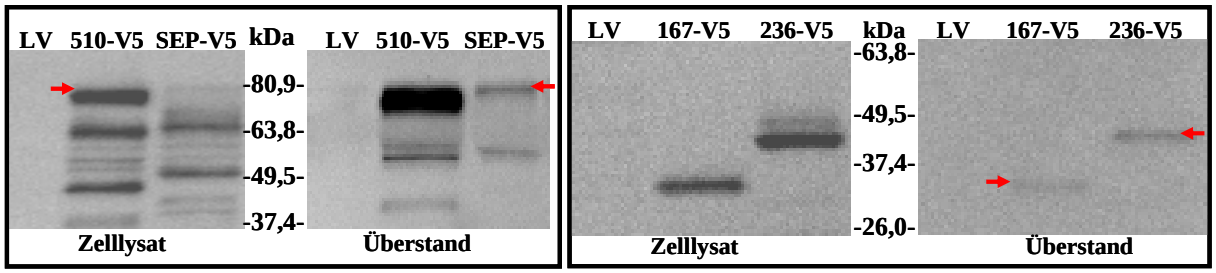


Abb. 5.24: Expressionsnachweis der SEP1-167- (167-V5), SEP1-236- (236-V5), SEP1-510- (510-V5) und SEP-V5/His-Fusionsproteine (SEP-V5) durch Westernblot-Analyse
Der Nachweis erfolgte 48 h nach der Transfektion im Zelllysat und Überstand der HEK 293-Zellen. Auf das Proteingel wurden je 7 µl der Zelllysate und 25 µl der Überstände aufgetragen. Der Leervektor (LV) diente als Negativkontrolle. Der Nachweis erfolgte auf einer Nylonmembran durch eine Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase. Der Proteinstandardmarker zeigt die Proteingrößen in Kilo Dalton (kDa) an.

Die Proben des Leervektors lieferten keine unspezifischen Proteinbanden. Die SEP-Konstrukte wurden jeweils im Zelllysat und Überstand nachgewiesen, wobei SEP1-510 in beiden Präparationen höhere Signalintensitäten als SEP ergab. Die Anzahl der erhaltenen Proteinbanden im Zelllysat war mit bis zu 8 Banden höher als im Überstand, dort waren maximal 4 Banden detektiert worden. Weil der Proteinnachweis über das C-terminale V5-Fusionsprotein erfolgte, handelte es sich entweder um N-terminal prozessierte oder modifizierte Proteinformen. Die jeweils größte Proteinbande stimmte in den Präparationen überein und lag für SEP bei ca. 77 kDa, für SEP1-510 bei ca. 72 kDa. Diese Werte standen jedoch in Diskrepanz mit den theoretisch vorhergesagten Größen. Hiernach wurde für SEP-V5 ein 59,0 kDa und für SEP1-510-V5 ein 55,8 kDa großes Protein erwartet. Weiter fielen bei der 77 kDa SEP-Bande Unterschiede in den Signalintensitäten auf. Im Überstand stellte diese Bande den Hauptanteil des Proteins dar, im Lysat indes war sie kaum sichtbar und gegenüber anderen Banden unterrepräsentiert. Bei SEP1-510 hingegen wurde jeweils bei der höchsten Proteinbande die größte Proteinmenge nachgewiesen. Hier unterschieden sich jedoch Anzahl und Intensität der übrigen Proteinabbaubanden. Die kürzeren SEP-Konstrukte SEP1-167 und SEP1-236 wurden im Zelllysat und im Überstand detektiert (Abb. 5.24). Hierbei wurde im Überstand deutlich weniger Protein als im Zelllysat nachgewiesen. Entgegen theoretischen 21,4 kDa für SEP1-167 und 28,4 kDa für SEP1-236 wurden durch einen Vergleich mit Standardmarker Proteingrößen von ca. 32,0 kDa bzw. 45,0 kDa ermittelt. Im Lysat von SEP1-236 wurde außerdem eine weitere Proteinbande detektiert. Bei dieser dürfte es sich um ein N-terminales Abbauprodukt handeln. Wäre eine Proteinmodifizierung die Ursache, so müsste auch SEP1-167 eine weitere Bande aufweisen. Beide Proteine unterscheiden sich nicht in der Anzahl ihrer potentiellen Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen (Abb. 5.20). Inwieweit die Anwesenheit der Konstrukte im Überstand, mit einer Stimulation von HUVECs korrelierte, wurde durch Proli-

ferationsversuche untersucht. Dabei erfolgte außerdem die Testung der Konstrukte ohne V5-Fusionsprotein (Abb. 5.25).

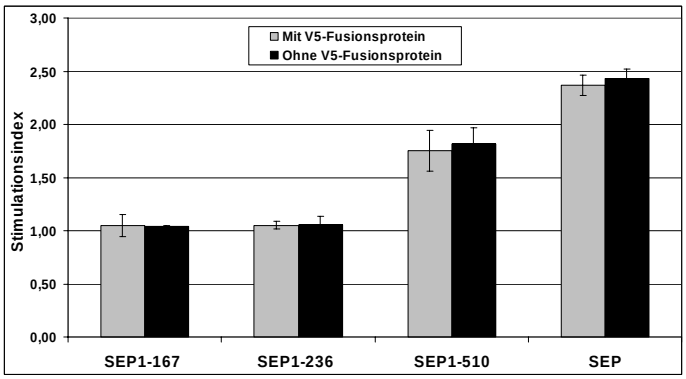


Abb. 5.25: Testung verschiedener SEP-Konstrukte im Proliferationsversuch
Nach Erzeugung der HEK 293-Überstände wurden diese auf HUVECs transferiert. Die Testung der SEP-Proteinfragmente erfolgte jeweils mit (grau) und ohne V5-Fusionsprotein (schwarz). Als Negativkontrolle diente der Leervektor. Die Messung erfolgte durch AlamarBlue-Assay 5 Tage nach Transfer. Der Stimulationsindex wurde durch Division der Messwerte mit der Leervektor-Kontrolle ermittelt.

Eine stimulierende Wirkung gegenüber der Leervektorkontrolle wurde nur für SEP1-510- und SEP-Überstände gefunden. Die C-terminale Fusion zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Funktionalität der Proteine. Die C-terminale Verkürzung hingegen bewirkt einen deutlichen Funktionsverlust. Die Entfernung der letzten 30 Aminosäuren (SEP1-510) führte gegenüber SEP zu einer durchschnittlichen Stimulationsverminderung auf 83 %. SEP1-167 und SEP1-237 zeigten keine Stimulation mehr (Abb. 5.25).

Zuvor wurde für SEP1-510 eine Aktivität von 83 % gegenüber SEP bestimmt. Dies fand jedoch ohne Berücksichtigung der Proteinmenge statt. Im Westernblot werden bei SEP1-510 deutlich stärkere Signale als bei SEP erhalten (Abb. 5.24). Um die spezifische Aktivität von SEP1-510 nach Proteinmengen normiert zu bestimmen, erfolgte zunächst mittels Westernblot eine Abschätzung der relativen Proteinmengen beider Konstrukte (Abb. 5.26).

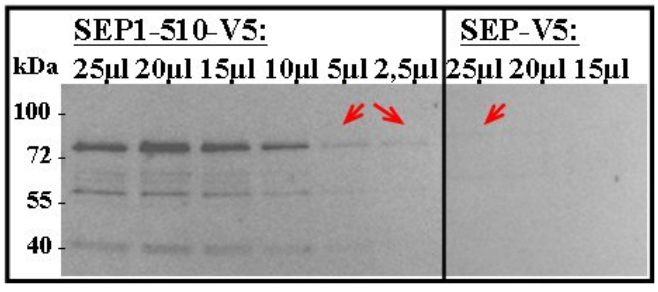


Abb. 5.26: Abschätzung relativer Proteinmengen von SEP1-510-V5 gegenüber SEP-V5
Es wurden verschiedene Mengen Überstand von SEP1-510-V5 und SEP-V5 auf ein Proteingel aufgetragen. Der Proteinnachweis erfolgte auf einer Nylonmembran durch V5-Westernblot. Detektiert wurde der Farbniederschlag einer Alkalischen Phosphatase Reaktion. Der Marker zeigt Proteingrößen in Kilo Dalton (kDa) an.

Eine Mengenabschätzung erfolgte mit Hilfe des Signals bei 25 µl SEP-Überstand. Die Signalintensität entspricht etwa einer Stärke zwischen 2,5 µl und 5 µl des Überstandes von SEP1-510. Für SEP1-510 wurde daher eine 5 - 10-fache größere Proteinmenge gegenüber SEP angenommen. Unter Einbeziehung dieses Mengenverhältnisses errechnet sich für SEP1-510 gegenüber SEP eine spezifische Aktivität von ca. 8 - 17 %.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob das potentielle N-terminale Signalpeptid (5.4.1.5) essentiell für die Prozessierung und Sekretion von SEP ist. Ausgehend von SEP1-510 wurde

ein weiteres Konstrukt erzeugt, bei dem zusätzlich die ersten 36 Aminosäuren, und somit das potentielle Signalpeptid entfernt wurde (SEP37-510). In Abb. 5.27 ist dieses Konstrukt und alle weiteren schematisch dargestellt.

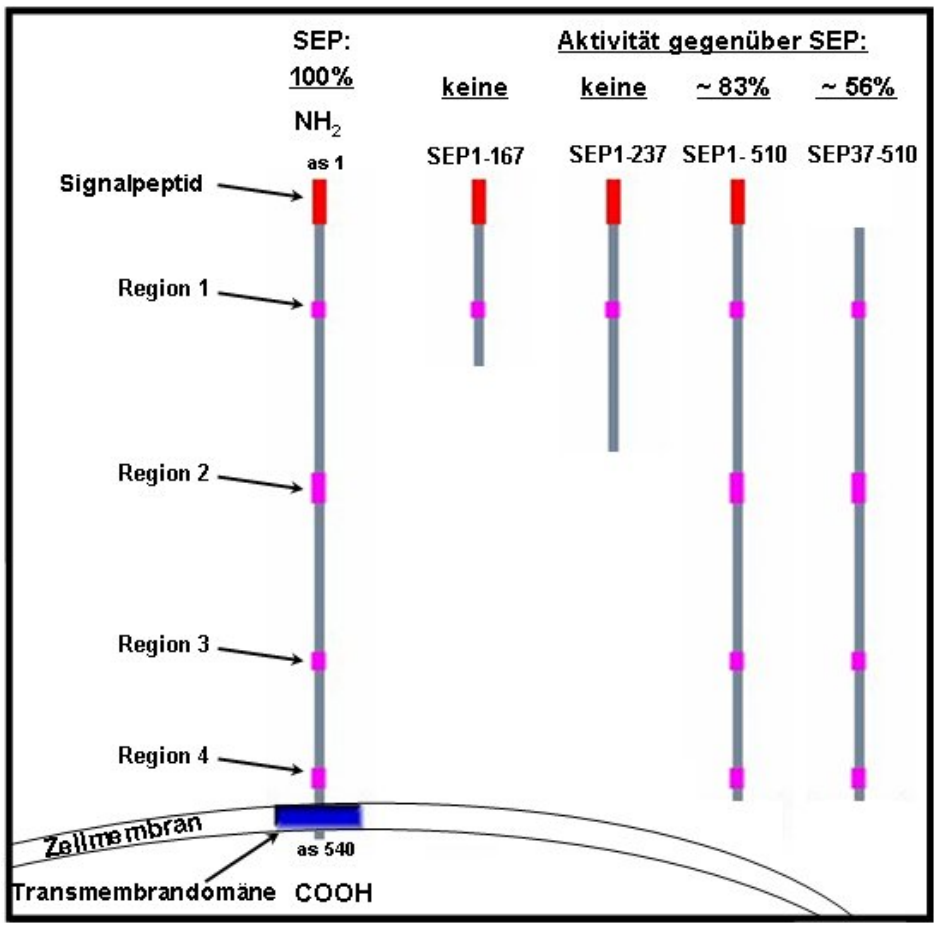


Abb. 5.27: Zusammenfassung aller SEP Konstrukte
Sämtliche bisher erzeugten und getesteten SEP-Konstrukte wurden hier schematisch dargestellt. Alle wurden sowohl mit als auch ohne V5-Fusionsprotein hergestellt und ihre Aktivität gegenüber SEP (100 %-Wert) bestimmt.

Für einen Westernblotnachweis wurde das SEP37-510-Konstrukt außerdem mit C-terminalem V5-Fusionspeptid hergestellt (Abb. 5.28).

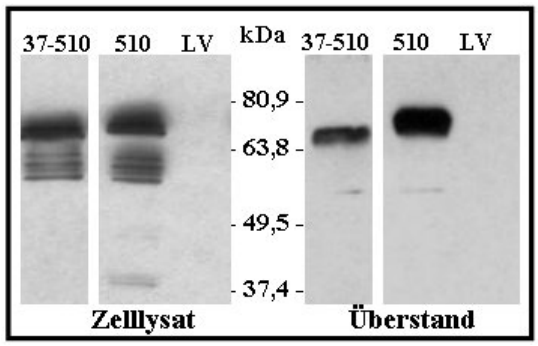


Abb. 5.28: Nachweis von SEP37-510-V5 (37-510) durch Westernblot-Analyse
Der Nachweis erfolgte 48 h nach der Transfektion im Zelllysat und Überstand der HEK 293-Zellen. Auf das Proteingel wurden 7 µl Zelllysat und 25 µl Überstand aufgetragen. Der Leervektor (LV) diente als Negativ- und SEP1-510-V5 (510) als Positivkontrolle. Der Nachweis erfolgte auf einer Nylonmembran durch Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase. Aus technischen Gründen musste die Membran geteilt werden. Der Proteinstandardmarker zeigt Proteingrößen in Kilo Dalton (kDa) an.

Beide Konstrukte wurden sowohl im Zelllysat als auch im Überstand mit annähernd gleicher Proteinbandenanzahl und Proteinmengen nachgewiesen. Im Zelllysat entsprach die größte auch stets der stärksten Bande. Überdies waren je 4 weitere schwache Abbaubanden zu sehen. Im Überstand hingegen werden nur zwei Banden detektiert, wovon eine der größten aus dem

Zelllysat entsprach. Die andere Bande ist wesentlich schwächer und liegt auf Höhe der geringsten Abbaubanden aus dem Lysat. Aufgrund der geringeren Proteinlänge zeigt sich die größte Proteinbande von SEP37-510 erwartungsgemäß unter der von SEP1-510. Die Banden geringerer Proteingröße liegen auf derselben Höhe, was für einen identischen Proteinabbau vom N-Terminus her spricht. SEP37-510 wurde ebenfalls auf stimulierende Aktivität untersucht (Abb. 5.29).

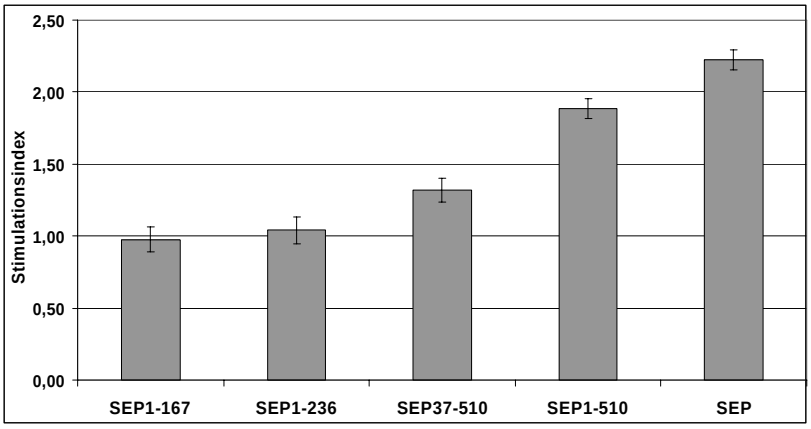


Abb. 5.29: Testung des N-terminal verkürzten SEP-Proteins (SEP37-510) im Proliferationsversuch
Zur Durchführung wurden HEK 293-Überstände gewonnen und auf HUVECs transferiert. Alle getesteten SEP-Konstrukte enthielten das V5-Fusionsprotein. Als Negativkontrolle diente der Leervektor. 5 Tage nach dem Überstands-Transfer wurden die Zellzahlen mittels AlamarBlue-Assay bestimmt. Der Stimulationsindex wurde durch Division der Messwerte mit der Leervektor-Kontrolle ermittelt.

Die N-terminale Verkürzung (SEP37-510) von SEP1-510 führt zur einer weiteren Aktivitätsverminderung auf 56 % gegenüber SEP. Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass mit zunehmender Verkürzung ein fortschreitender Aktivitätsverlust einhergeht.

5.4.3.2 Lokalisierung von SEP1-510 und SEP

Nachdem gezeigt werden konnte, dass SEP1-510 und SEP exprimiert und sezerniert werden, wurden Lokalisationsstudien durchgeführt. Hierfür wurde von beiden Proteinen je ein Konstrukt mit C-terminaler GFP-Fusion hergestellt. Für die neuen Konstrukte wurde zunächst durch Proliferationsversuche nachgewiesen, dass die Fusion keinen Einfluss auf die Funktionalität hat (Daten nicht gezeigt). Durch das GFP-Fusionsprotein konnten beide Konstrukte in anschließenden Fluoreszenzmikroskopien sichtbar gemacht werden. Um die Lokalisation zuordnen zu können, wurden zusätzlich Immunfluoreszenzfärbungen der Zellkerne, des Golgi-Apparates und des Endoplasmatischen Retikulums (ER) vorgenommen. Zum Ausschluss unspezifischer Antikörperbindungen und Färbungen wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. Hierzu wurden untransfizierte und mit Leervektor- oder GFP-cDNA-Expressionsplasmid transfizierte Zellen entsprechend angefärbt. Die Experimente erfolgten in HEK 293- und HeLa-Zellen (Scherer et al., 1953), wobei identische Resultate erhalten wurden. Bilder werden lediglich von HeLa-Zellen abgebildet, da diese etwa viermal größer als HEK 293-Zellen sind und bessere Aufnahmen ermöglichten (Abb. 5.30 A-C).

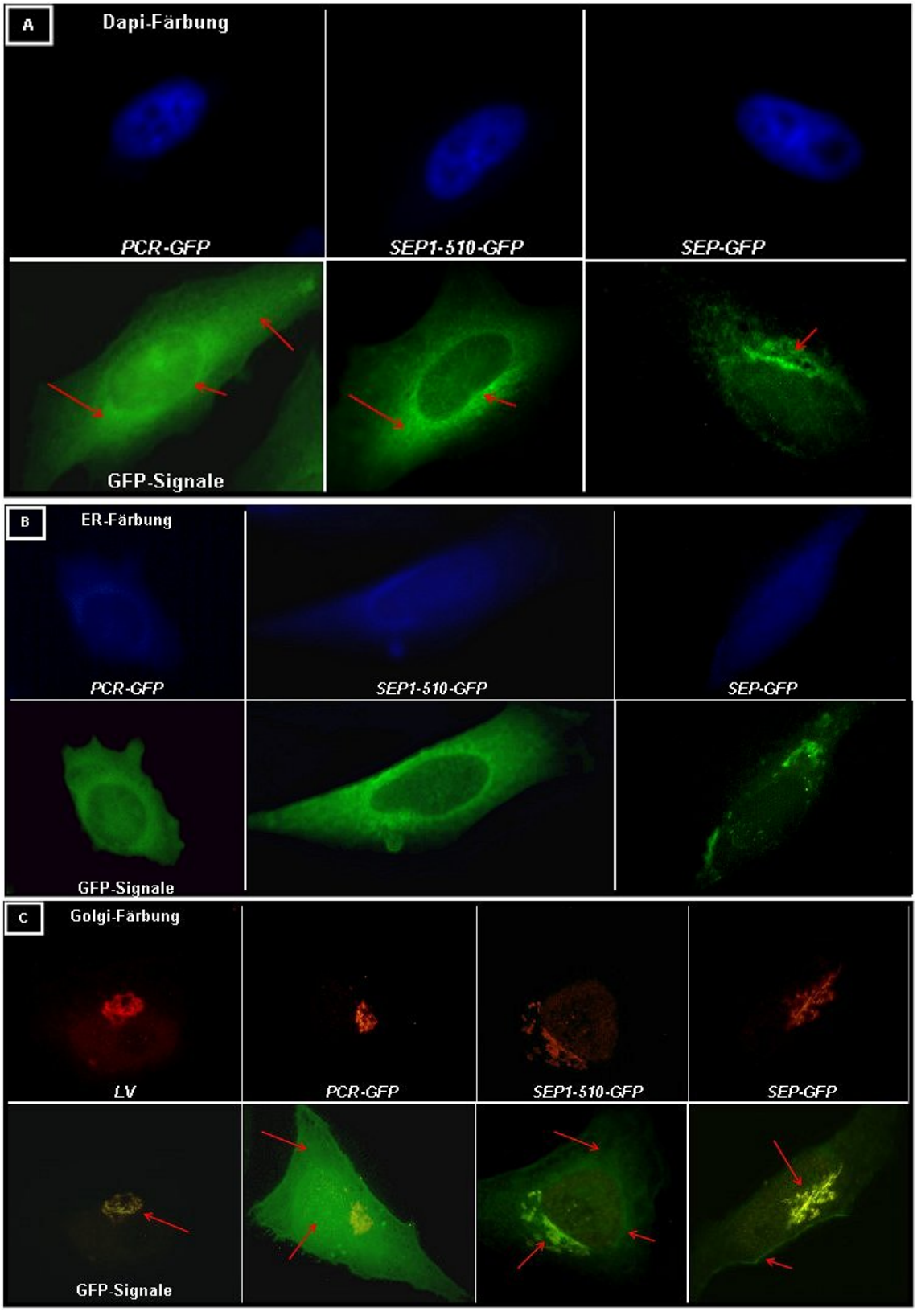


Abb. 5.30 A - C: Bestimmung der subzellulären Lokalisation mittels Immunfluoreszenzmikroskopie Abgebildet sind HeLa-Zellen, die entweder mit den beiden SEP-GFP-Konstrukten oder zur Kontrolle mit Leervektor- (LV) und dem zur Klonierung verwendeten GFP-cDNA-Expressionsplasmids (PCR-GFP) transfiziert wurden. Die Färbungen wurden 48 h nach der Transfektion durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (A), das ER mittels ER-Tracker (B) und der Golgi-Apparat mit einem Anti-hu-Golgin 97 und einem sekundären Cy3-konjugierten Antikörper (C) angefärbt. Die Mikroskopie erfolgte mit fixierten Zellen auf Glasobjektträgern bei 1.000-facher Vergrößerung (Öl). Die roten Pfeile heben die Verteilungen der jeweiligen Proteine hervor.

Abbildung 5.30 A verdeutlicht, dass beide exprimierten SEP-GFP-Fusionproteine nicht im Kern lokalisiert sind. Die grüne Fluoreszenz des PCR-GFP-Proteins war im Vergleich wesentlich stärker, hier war eine starke zytoplasmatische Färbung zu sehen. SEP1-510-GFP war ebenfalls im Zytoplasma zu finden, wies aber zudem kreisförmige Proteinansammlungen auf (Abb. 5.30 A, rote Pfeile). Bei SEP-GFP zeigt sich eine Konzentrierung an ausgeprägten Strukturen in Umgebung des Zellkerns (Abb. 5.30 A, roter Pfeil). Insgesamt waren bei SEP-GFP schwächere Signale als bei SEP1-510-GFP zu sehen. Die Lokalisierung betreffend, brachten die ER- und Golgi-Färbung weiteren Aufschluss. Hiernach konnte SEP vorwiegend dem Golgi-Apparat (Abb. 5.30 C) und vereinzelt dem ER (Abb. 5.30 B) zugeordnet werden. SEP1-510 zeigte hingegen eine ubiquitäre Verteilung und war teilweise im ER, selten im Golgi-Apparat und überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Effekte durch überstrahlende Färbungen wurden bei den Kontrollen lediglich bei der Golgi-Färbung mit Cy3-Antikörpern beobachtet. Deutlich ist dies beim Leervektor zu sehen, hier zeigt sich im GFP-Fluoreszenz-Kanal ein grün-gelbes Signal (Abb. 5.30 C). Insgesamt kann hiernach nur für SEP eine Golgi-Lokalisierung angenommen werden. Für PCR- und SEP1-510-GFP kann dies ausgeschlossen werden. Weitere Kontrollen, bei denen untransfizierte Zellen gefärbt oder transfizierte Zellen nur mit dem sekundären Cy3-Antikörper inkubiert wurden, bewiesen die Spezifität der Färbungen.

5.4.3.3 Abreicherung von SEP-Protein aus aktiven Überständen

Um zu klären, ob SEP der löslich aktive Faktor in den Überständen ist, wurde ein weiterer Ansatz verfolgt. Dabei wurde mit Hilfe eines V5-Antikörpers und Protein-G-Sepharose eine spezifische Abreicherung von SEP1-510- und SEP-V5-Protein aus aktiven Überständen vorgenommen. Nachdem die Abreicherungseffizienz mittels Westernblot (Abb. 5.31) überprüft worden war, wurden nach Proliferationsversuchen die Stimulationen von unbehandelten und behandelten Überständen verglichen (Abb. 5.31).

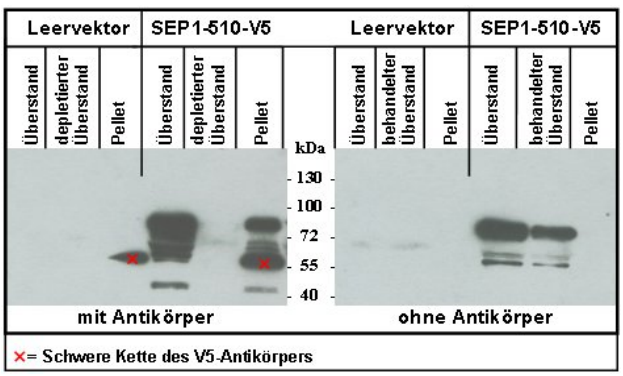


Abb. 5.31: Ermittlung der Abreicherungseffizienz von SEP1-510-V5-Überständen durch Westernblot-Analyse
Die Abreicherung erfolgte durch Inkubation der Überstände mit V5-Antikörper, einer weiteren Inkubation mit Protein-G-Sepharose und anschließend der Trennung der Überstände (depletierter bzw. behandelter Überstand) von der Protein-G-Sepharose (Pellet). Analysiert wurden je 1/80 der Fraktionen. Der Nachweis erfolgte mit V5-Antikörper und Phosphatasereaktion. Als Negativkontrolle dienten Leervektor-Überstände, die analog behandelt wurden und eine Kontrolle, bei der bis auf die Zugabe von V5-Antikörper die gleiche Prozedur (behandelter Überstand) ohne Antikörper erfolgte. Der Marker zeigt die Proteingrößen in Kilo Dalton (kDa) an.

Der Proteinnachweis zeigt, dass SEP1-510 fast vollständig an die Sepharose gebunden ist und im Überstand nur noch eine schwache Bande nach der Abreicherung zu sehen ist. Die gleiche Abreicherungsprozedur wurde außerdem mit SEP-V5-, Leervektor- und VEGF-Überständen durchgeführt. Ein Proteinnachweis von SEP-V5 konnte vermutlich aufgrund zu geringer Proteinmengen nicht erfolgen. VEGF wurde als Positivkontrolle für einen Überstand benutzt, der unabhängig von V5-Fusionsproteinen aktiv war.

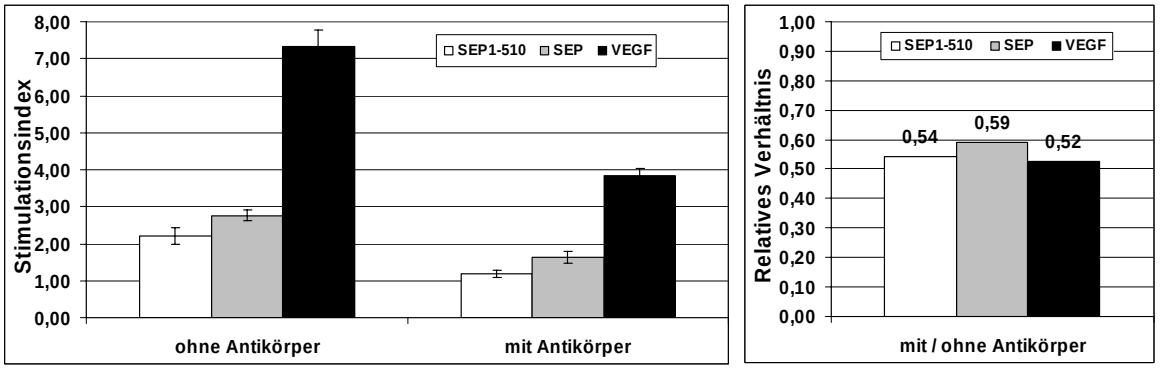


Abb. 5.32: Testung verschiedener Überstände nach Behandlung mit V5-Antikörper/Protein-G-Sepharose
Linke Abbildung: Im Proliferationsversuch wurden je 25 µl der unabgereicherten Überstände („ohne Antikörper“) und 25 µl der abgereicherten Überstände („mit Antikörper“) zu HUVECs gegeben. 5 Tage später erfolgte die Messung durch AlamarBlue-Assay. Der Stimulationsindex wurde durch Division der Messwerte mit der Leervektor-Kontrolle ermittelt.
Rechte Abbildung: Außerdem wurde der Quotient der Stimulationen von den Ansätzen „mit Antikörper“ und „ohne Antikörper“ ermittelt und als relatives Verhältnis dargestellt.

Die Abreicherung mit V5-Antikörper hatte im Vergleich zur Negativkontrolle bei allen getesteten Überständen ungefähr eine Halbierung der Stimulationen zur Folge. Da dies mit VEGF-Überstand ebenfalls beobachtet wird, ist von einem unspezifischen Effekt durch V5-Antikörper Zugabe auszugehen. Die Quotientenbildung der Stimulationen (Abb. 5.32, rechts) verdeutlicht die einheitliche Reduktion. Überdies erfolgte der Transfer verschiedener Mengen der abgereicherten Überstände auf HUVECs, aber auch hierbei konnte keine Korrelation zwischen Abreicherung von SEP1-510 und der Stimulation von HUVECs gezeigt werden.

5.4.4 Hemmung der stimulierenden Wirkung von SEP-Überständen

Ein wesentlicher Vorteil der Hemmung löslicher Proteine ist, dass inhibitorische Substanzen um zu wirken keine Zellmembranen überwinden müssen. Mögliche Strategien stellen hierbei u.a. der Einsatz spezifischer, neutralisierender Antikörper oder dominant negativer Wachstumsfaktormutanten dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hemmung aktiver SEP-Überstände durch zwei SEP-spezifische Antikörper untersucht (5.4.4.1). Eine mögliche Wirkung hierbei ist die Bindung an lösliches SEP-Protein, so dass die Andockung an einen potentiellen Rezeptor beispielsweise durch eine sterische Hinderung geblockt wird. Andererseits wurden

zwei Peptidgemische von repetitiven und besonders konservierten Sequenzbereichen synthetisch hergestellt und getestet. Durch Zugabe eines Peptid-Überschusses zu SEP-Überständen wäre ein kompetitiver Hemmeffekt denkbar (5.4.4.2). Die ausgewählten Peptidsequenzbereiche sind in Abb. 5.33 dargestellt.

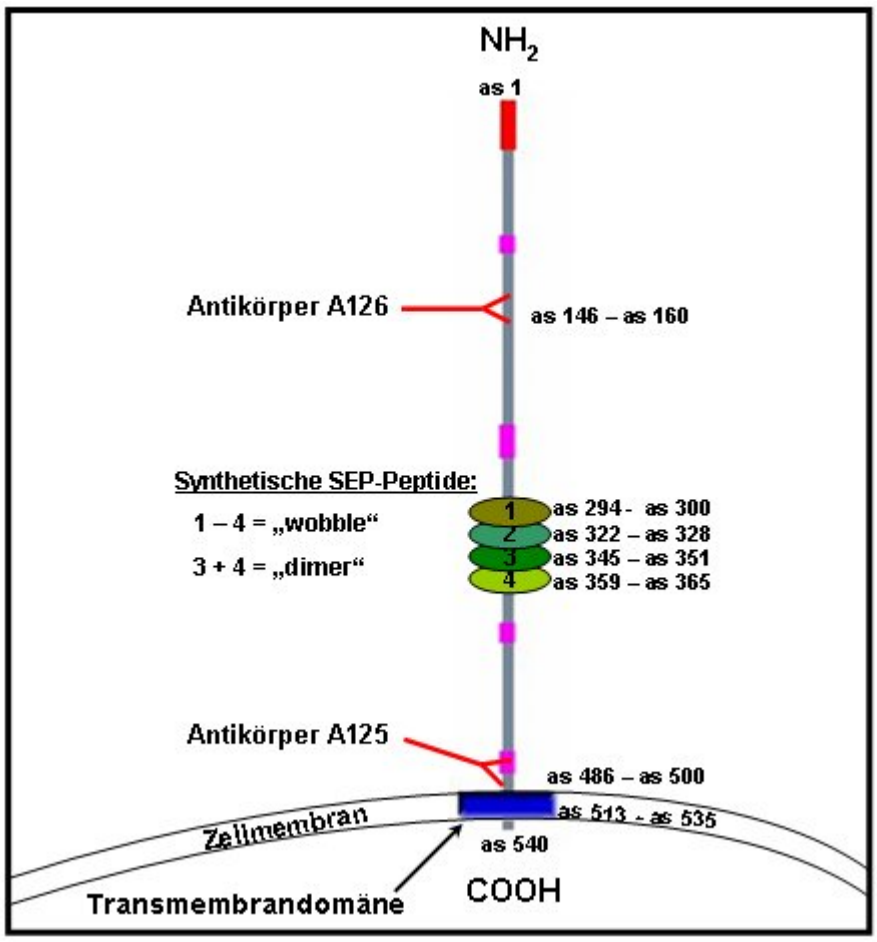


Abb. 5.33: Schematische Darstellung von SEP
Angegeben sind die zur Erzeugung zweier SEP-spezifischer Antikörper (A126 und A125) verwendeten Aminosäurebereiche und die für die Herstellung synthetischer SEP-Peptide. Das „wobble“-Peptid besteht aus einem Gemisch der Einzel-Peptide 1 - 4 und das „dimer“-Peptid aus dem Sequenzabschnitt von Peptid 3 und 4. Die Aminosäurepositionen (as) sind angegeben.

5.4.4.1 Generierung und Testung SEP-spezifischer Antikörper

Die Generierung zweier SEP-spezifischer Antikörper erfolgte durch die Firma Eurogentec (Belgien). Hierzu wurden 2 Kaninchen mit 2 unterschiedlichen SEP-Peptiden, die je 14 Aminosäuren lang waren, immunisiert (Abb. 5.33). Ein Peptid umfasste die Aminosäuren 146 - 160 (Antikörper A126), das andere die Aminosäuren 486 - 500 (Antikörper A125). Nach der Immunisierung wurde den Tieren monatlich 2 ml Serum entnommen und dieses durch Westernblot-Analyse auf Nachweis von SEP getestet. Hierfür wurde V5-markiertes SEP-Protein eingesetzt, um durch einen parallelen V5-Westernblot eine Positivkontrolle zu haben. Dabei lieferte das polyklonale Anti-SEP-Seren (SA3090) vergleichbare Proteinbanden wie der V5-Antikörper. Mit dem zweiten Serum (SA3091) ergaben sich hingegen nur unspezifische Banden (Abb. 5.34). Daher diente als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung der Antikörper A125 und A126 später das Serum SA3090. Die Affinitätschromatographie erfolgte mit

Hilfe der zur Immunisierung verwendeten Peptide. Anschließend wurden die polyklonalen Seren und die gereinigten Antikörper in einem Westernblot mit dem V5-Antikörper verglichen (Abb. 5.34).

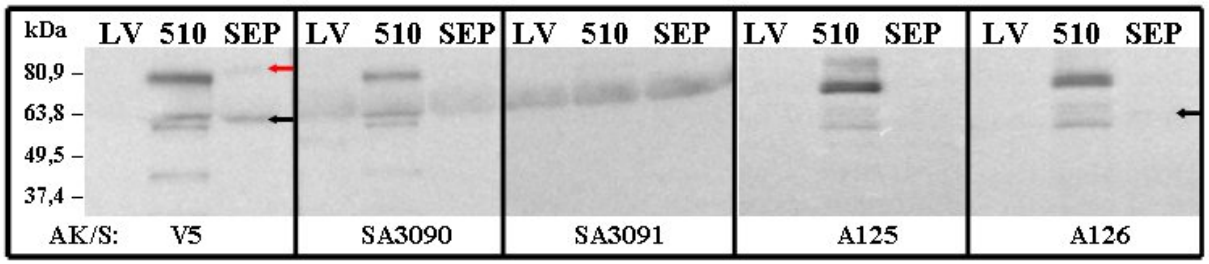


Abb. 5.34: Testung der polyklonalen Seren (S) und gereinigten Antikörper (AK) im Westernblot
Zur Durchführung wurden je 7 µl zytosolisches Lysat von HEK 293-Zellen, die mit Leervektor- (LV), SEP1-510-V5- (510) und SEP-V5-Expressionsplasmiden (SEP) transfiziert worden waren, auf ein Proteingel aufgetragen. Der Proteinnachweis erfolgte mit V5-Antikörper (1:7.500), den polyklonalen SEP-Seren SA3090 und SA3091 (1:2.000) und den gereinigten SEP-Antikörpern A125 und A126 (1:5.000). Als Sekundär-Antikörper wurde ein Anti-Kaninchen-Antikörper mit einer gekoppelten Alkalischen Phosphatase verwendet und der Nachweis durch einen Farbumschlag auf der Nylonmembran sichtbar gemacht. Der Proteinstandardmarker zeigt die Größen in Kilo Dalton (kDa) an. Die Pfeile markieren schwache Banden von SEP.

Mit dem polyklonalen Serum SA3090 wurden im Lysat von SEP1-510 entsprechende Proteinbanden wie mit dem V5-Antikörper detektiert. Bei Nachweis mit dem Serum zeigten sich schwächere Signale, beim Leervektor kamen unspezifische Hintergrundsignale hinzu und SEP-Protein lieferte keine Banden. Mit dem zweitem Serum (SA3091) wurden bei allen Proben nur Hintergrundsignale bei ca. 65 kDa erhalten. Mit den gereinigten Antikörpern zeigte sich im Lysat von SEP1-510 eine starke SEP-spezifische Bande bei ca. 79 kDa. Im Gegensatz zu SA3090 waren hier keine Hintergrundsignale zu sehen. Das erhaltene Bandenmuster wich gegenüber dem vom V5-Antikörper und SA3090 etwas ab. Hier war jeweils eine Bande besonders prominent und die weiteren wesentlich schwächer. Außerdem wurden keine Doppelbanden bei ca. 60 kDa erhalten. Diese zeigte sich charakteristisch bei Verwendung des V5-Antikörpers und SA3090. Im Lysat von SEP konnte außer mit V5-Antikörper nur mit Antikörper A126 eine schwache Bande bei ca. 60 kDa detektiert werden. Im Westernblot erfolgt der Nachweis von denaturiertem Protein (Abb. 5.34).

Daher wurde im nächsten Schritt mittels ELISA überprüft, ob sich das Serum SA3090 und die SEP-Antikörper ebenso zum Nachweis von nativem SEP eignen (Abb. 5.35). Dies war eine grundlegende Vorraussetzung, um die Antikörper für eine Neutralisation bzw. Hemmung von SEP-Überständen einsetzen zu können.

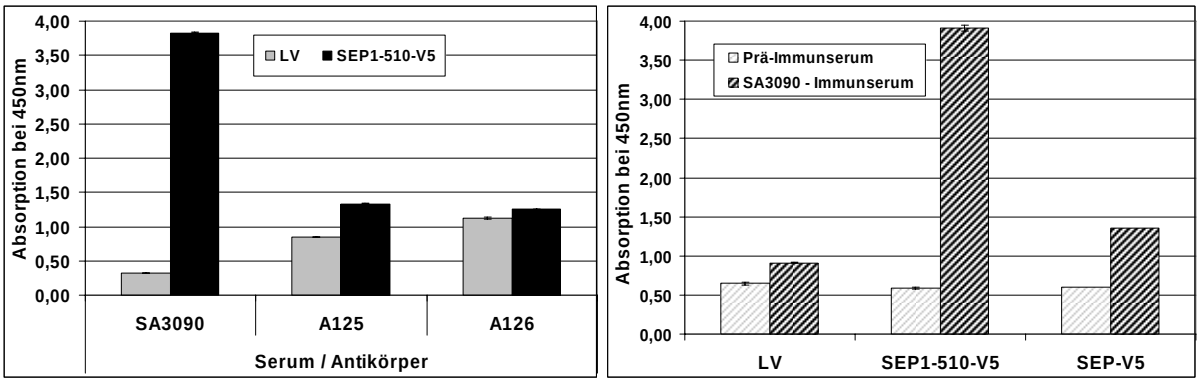


Abb. 5.35: Nachweis von nativen SEP1-510-V5-Fusionprotein im Überstand
Linke Abb.: Der Nachweis erfolgte durch einen ELISA. Dabei wurden die Platten mit V5-Antikörpern beschichtet und dann mit je 100 µl Leervektor- (LV) oder SEP1-510-V5-Überstand inkubiert. Danach wurden polyklonales Immunserum (SA3090, 1:2.000) und die aufgereinigten Antikörper (A125 und A126, je 1:5.000) zugegeben. Der Nachweis geschah mit einem Anti-Kaninchen-Antikörper, an den die Peroxidase gekoppelt war. Die Messung des Substratumsatzes wurde mit einem ELISA-Reader durchgeführt. Angegeben sind die Absorptionswerte bei 492 nm.
Rechte Abb.: Die Durchführung erfolgte wie zuvor, jedoch wurden zusätzlich SEP-V5-Überstände verwendet und anstelle der gereinigten Antikörper das Prä-Immunserum (1:2.000) getestet.

Der beste Nachweis von nativem SEP-Protein gelang mit dem Serum SA3090. Bei diesem waren die Messwerte der Negativkontrolle am niedrigsten und die von SEP1-510-Überständen am höchsten (Abb. 5.34, links). Dies entsprach einer 12-fachen Signalsteigerung durch SEP1-510. Die gereinigten SEP-Antikörper wiesen höhere Hintergrundsignale beim Leervektor auf und lieferten nur ca. 1/3 der Signale beim Überstand von SEP1-510 (Abb. 5.35, links). Ein weiterer ELISA belegt, dass das Prä-Immunserum des Kaninchens keine unspezifische Reaktion mit SEP-Protein eingeht. Überdies gelang mit dem Serum SA3090 der Nachweis von SEP-V5-Protein (Abb. 5.35, rechts). Die Signalsteigerung hier betrug jedoch nur etwa 1/3 der mit SEP1-510-V5-Protein erreichten.

Aufgrund dieser Resultate wurden Hemmversuche von SEP-Überständen mit dem Serum SA3090 durchgeführt. Hierzu wurden mehrere Proliferationsversuche mit verschiedenen HEK 293-Überständen durchgeführt, die vor dem Transfer auf HUVECs mit Serum inkubiert wurden. Dadurch sollten SEP-Proteine durch Bindung an SEP-Antikörper neutralisiert werden. Als Negativkontrolle wurden entsprechende Ansätze mit Prä-Immunserum pipettiert (Abb. 5.36).

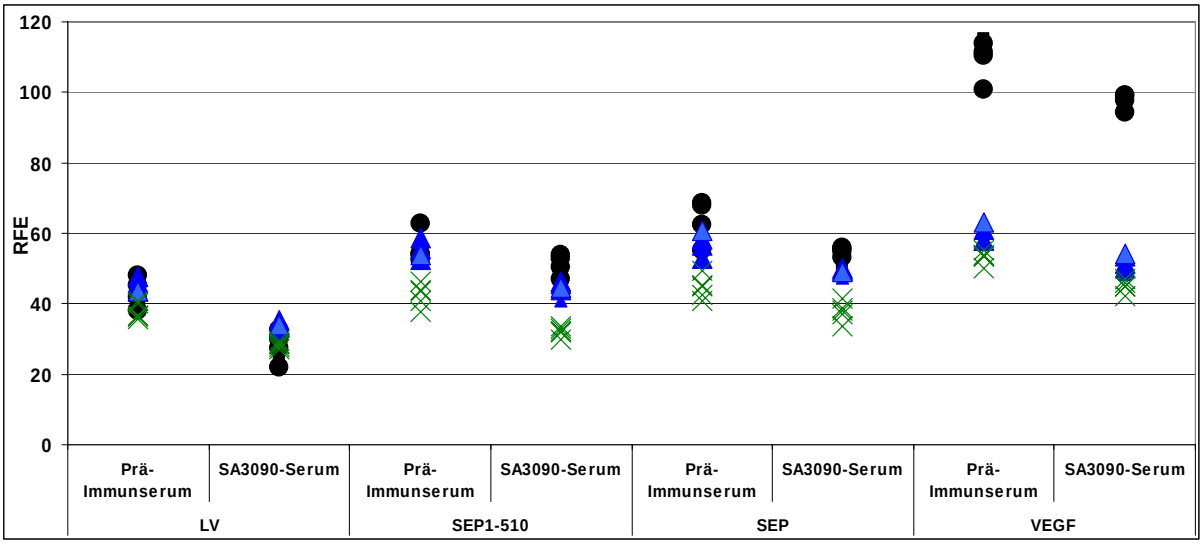


Abb. 5.36: Neutralisation verschiedener Überstände mit polyklonalen Anti-SEP-Serum (SA3090)
HEK 293-Überstände vom Leervektor (LV), SEP1-510, SEP und VEGF wurden vor dem Transfer auf HUVECs für 3 h mit SA3090 (1:50) inkubiert. Als Negativkontrolle diente das Prä-Immunserum (1:50). Nach Übertrag von je 25 µl und 5 Tagen Inkubation wurden die Zellzahlen mittels AlamarBlue-Assay bestimmt. Die Graphik zeigt drei unabhängige Tests, die jeweils durch ein Symbol gekennzeichnet sind (Kreis, Kreuz oder Dreieck).

Die Vorinkubation der Überstände mit SA3090 bewirkte in allen Fällen im Vergleich mit den jeweiligen Ansätzen mit Prä-Immunserum eine Verminderung der Zellzahlen. Dieser Effekt war gleichermaßen und unabhängig von der exprimierten cDNA bei allen Überständen zu sehen. Anschließende Experimente, bei denen verschiedene Serummengen und die gereinigten SEP-Antikörper (A125 und A126) getestet wurden, ergaben ein vergleichbares Ergebnis.

5.4.4.2 Hemmung mit synthetischen SEP-Peptiden

Ausgehend von der Hypothese, dass SEP ein löslicher Faktor ist, wird seine Funktion vermutlich über einen bisher unbekannten Rezeptor vermittelt. Eine Aktivitätshemmung von SEP wäre daher prinzipiell über einen kompetitiven Mechanismus möglich. Folglich wurden verschiedene kurze Peptide von SEP synthetisiert (Metabion, Planegg) und auf ihre Eignung für eine Hemmung aktiver Überstände getestet. Hierbei fiel die Wahl auf repetitive Sequenzabschnitte von SEP, die gegenüber dem homologen Protein aus Maus und Ratte einen hohen Konservierungsgrad aufwiesen (5.4.1.1). Diese Bereiche liegen im zentralen Bereich des SEP-Proteins (Abb. 5.33) und könnten eine wichtige Rolle bei der Rezeptorbindung und Funktion des Proteins spielen. Dabei wurde ein Peptidgemisch aus 4 verschiedenen und je 6 Aminosäure langen Einzelpeptiden („Wobble“-Peptid) und ein 21 Aminosäuren langes Peptid („Dimer“-Peptid) aus zwei dicht hintereinander liegenden repetitiven Sequenzabschnitten hergestellt. Die Testung der Peptide erfolgte durch Proliferationsversuche (Abb. 5.37).

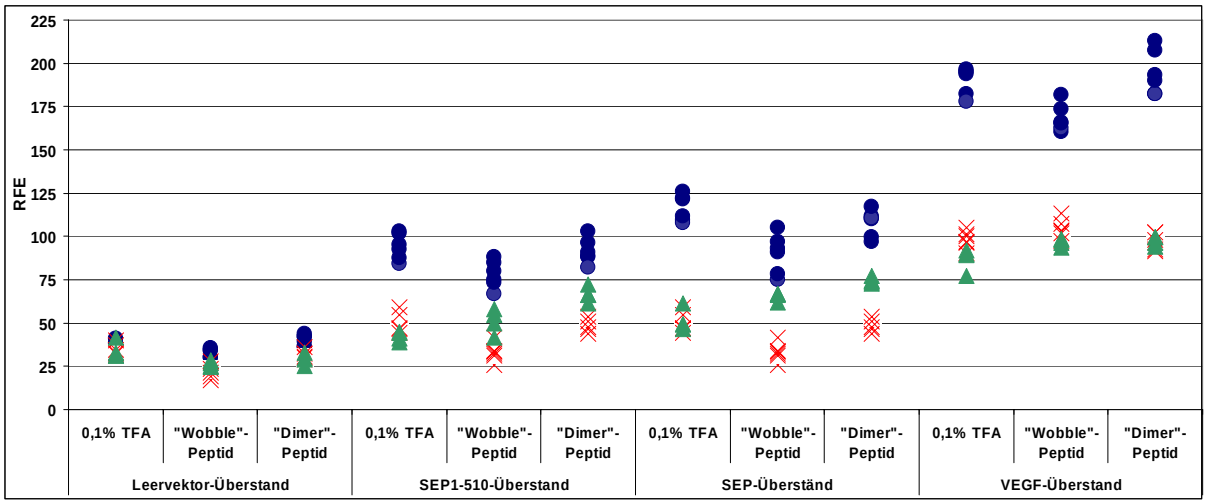


Abb. 5.37: Kompetitiver Hemmversuch verschiedener Überstände mit synthetischen SEP-Peptiden („Wobble“ und „Dimer“)
24 h nach der Aussaat wurden HUVECs für 6 h mit 75 µl HUVEC-Mangelmedium und je 34 µM (1 µl) von den synthetischen SEP-Peptiden kultiviert. Als Negativkontrolle diente 0,1 %-ige TFA-Lösung (1 µl), in der die Peptide gelöst vorlagen. Anschließend erfolgte der Transfer von je 25 µl Überstand. Nach 5 Tagen Inkubation wurden die Zellzahlen mittels AlamarBlue-Assay bestimmt. Die Graphik enthält die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten. Jedes ist durch ein Symbol (Kreis, Kreuz oder Dreieck) dargestellt.

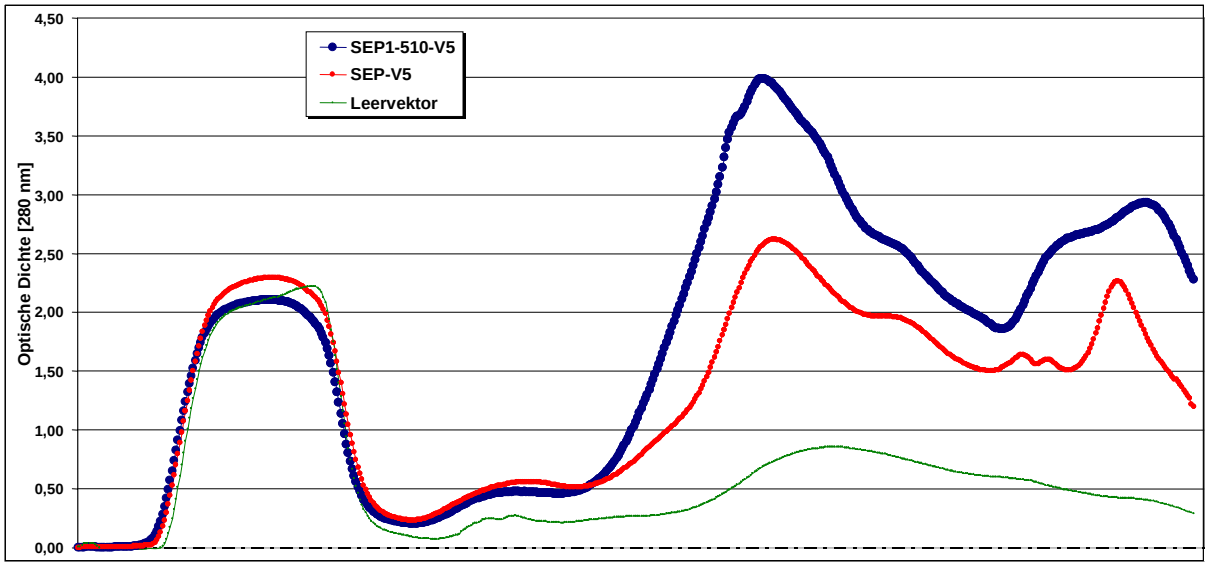
Die Zugabe des „Wobble“-Peptidgemisches führte im Vergleich zur Negativkontrolle (0,1 % TFA) bei zwei Versuchen zur einer Zellzahlverminderung (Abb. 5.37, Kreuze und Kreise). Dieser Effekt trat unabhängig von dem transferierten Überstand auf. Da hier teilweise starke Hemmeffekte beobachtet wurden, schlossen sich weitere Analysen an. Hierbei wurden die vier im Wobble-Peptidgemisches vorkommenden Einzelpeptide (Abb. 5.33) synthetisiert und getestet. Durch Zugabe des Einzelpeptides p3061 (Abb. 5.33, as 322 - 328) reduzierten sich die Zellzahlen auf durchschnittlich 80 % der Werte der Kontrolle mit 0,1 % TFA. Die anderen Einzelpeptide zeigten hingegen keine signifikante Auswirkung auf HUVECs. Aufgrund dieses Resultats erfolgte für weitere Hemmversuche die Klonierung von 4 SEP-Konstrukten. Diese umfassten die Aminosäuren 283 - 373 und repräsentierten somit den gesamten Bereich der repetitiven Peptidsequenzen. Die Klonierung erfolgte mit und ohne V5/His-Fusionsprotein (5.4.3.1) (Southern et al., 1991) und außerdem mit und ohne einem künstlichen Ig-Kappa-Leader. Letzterer sollte sicherstellen, dass trotz der starken N- und C-terminalen Verkürzungen die Peptide noch sezerniert werden (Coloma et al., 1992). Die Konstrukte wurden in HEK 293-Zellen exprimiert und die Sekretion aller 4 Konstrukte durch einen Westernblot bestätigt. In verschiedenen voneinander unabhängigen Proliferationsversuchen wurden verschiedene Überstandsmengen dieser Konstrukte mit Überständen von SEP, Leervektor oder VEGF gemischt und auf HUVECs getestet. Hierbei konnte jedoch kein Effekt auf die Stimulationen beobachtet werden.

5.4.5 Aufreinigung von SEP-Protein aus HEK 293-, E. coli- und Insekten-Zellen

Um klären zu können, ob die von SEP vermittelte Stimulation auf einem direkten Effekt auf HUVECs beruht, wurde SEP rekombinant hergestellt, aufgereinigt und getestet. Hierzu erfolgte die Expression von SEP1-510-V5/His-Fusionsprotein in HEK 293- (5.4.5.1), E. coli- (5.4.5.2) und SF-21-Insekten-Zellen (5.4.5.3). Die Proteinaufreinigung wurde stets über Nickel-NTA-Affinitätschromatographie vorgenommen. Die Proteingewinnung aus E. coli- und Insekten-Zellen wurde von der Gruppe von Frau Dr. Irene Boche (Xantos AG) durchgeführt.

5.4.5.1 Anionen-Austauschchromatographie von SEP aus HEK 293-Zellen

Für die Anionen-Austauschchromatographie wurde SEP in HEK 293-Zellen exprimiert und die Proben durch Nickel-NTA-Affinitätschromatographie gewonnen. Dabei zeigte sich eine Anreicherung von SEP in den Eluaten und eine Abreicherung in den Durchläufen (DL) der Nickelsäule (Abb. 5.39). Zur Entfernung des Imidazols aus dem Elutionspuffer wurden die NTA-Eluate vor der Anionen-Austauschchromatographie gegen einen Niedrig-Salzpuffer dialysiert. Bei der Auftrennung wurden je Probe 28 Fraktionen gesammelt und der Gesamtproteingehalt (OD 280 nm), die NaCl-Konzentration (mM) sowie die Anwesenheit von SEP-Protein (V5-Westernblot) als auch die proliferative Aktivität bestimmt (Abb. 5.38 - 5.40).



Fraktion	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	#21	#22	#23	#24	#25	#26	#27
NaCl [mM]	11	19	19	19	11	11	11	24	48	69	88	100	123	149	165	181	203	227	245	261	275	288	309	331	352	368	376

Abb. 5.38: Elutionsprofile der Anionen-Austauschchromatographie der Eluate von Leervektor, SEP1-510- und SEP-V5/His

Es wurden jeweils 2 ml dialysiertes Nickel-NTA-Eluate aufgetragen. Die Elution von der Matrix des Anionen-Austauschers erfolgte durch einen Salz-Gradienten (0 - 400 mM NaCl). Dieser erstreckte sich über ein Volumen von 10 ml. Von jedem Lauf wurden 27 Fraktionen gesammelt, wobei die ersten beiden ein Volumen von 1 ml hatten und die restlichen Fraktionen von 0,5 ml. Für jeden Lauf wurde ein Elutionsprofil erstellt, in dem die optische Dichte bei 280 nm, die Fraktionsnummer [#] und die NaCl-Konzentration [mM] der einzelnen Fraktionen angegeben wurde.

Die Fraktionen 1 und 2 wurden verworfen, da diese nur den Puffer des Schlauchvolumens enthielten, der durch den Probenauftrag rausgespült wurde. Die Fraktionen 3 - 6 stellten den Durchlauf der Proben dar und wurden daher vereinigt. Anhand steigender NaCl-Konzentrationen lässt sich der Start des Salz-Gradienten ab Fraktion 8 erkennen (Abb. 5.38). Die Messung der optischen Dichten bei 280 nm dient zur Bestimmung der Proteinmengen. Hierdurch zeigt sich, dass in den Fraktionen von SEP1-510 und SEP insgesamt höhere Proteinkonzentrationen vorlagen als beim Leervektor. Ferner waren bei SEP1-510 und SEP ähnliche Kurvenverläufe zu sehen, die jeweils zwei vergleichbare Protein-Peaks aufwiesen. Der erste lag übereinstimmend in Fraktion 16 (181 mM) und der zweite bei SEP in Fraktion 25 (352 mM) und bei SEP1-510 in Fraktion 26 (368 mM). Der Proteingehalt beim Leervektor ist insgesamt deutlich niedriger und lässt nur einen schwachen Protein-Peak in Fraktion 17 erkennen. Um nachzuweisen, welche Fraktionen SEP enthalten, wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt (Abb. 5.39). Als Negativkontrolle dienten die Fraktionen des Leervektors. Hierbei wurden keine Signale erhalten. Ebenfalls keine Banden wurden in den Proben von SEP-V5/His erhalten, was wiederum auf ein Detektionsproblem zurückzuführen ist.

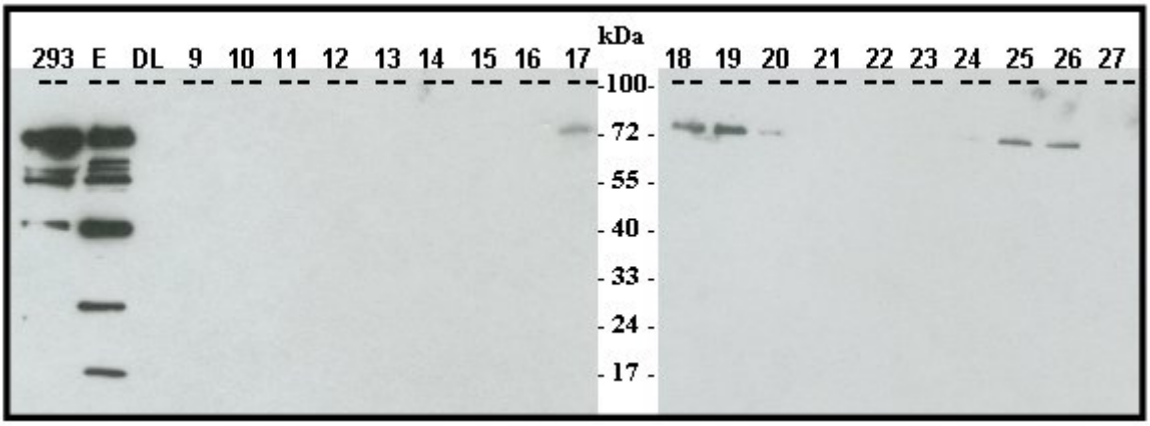


Abb. 5.39: Westernblot-Analyse der SEP1-510-V5-Fraktionen der Anionen-Austauschchromatographie
Von den Fraktionen 9 bis 27 wurden je 20 µl auf das Proteingel geladen. Als Kontrolle dienten 20 µl der Überstände direkt (293), 5 µl Nickelsäulen-Eluat (E) und 20 µl Durchlauf von der Nickel-NTA-Agarose-Aufreinigung (DL). Der Nachweis erfolgte auf einer Nylonmembran mit V5-Antikörper und einem sekundären Antikörper mit einer konjugierten Peroxidase. Der Proteinstandardmarker zeigt die Größen in Kilo Dalton (kDa) an.

Die Westernblot-Analyse bestätigt die Effizienz der Nickelsäulen-Aufreinigung von SEP1-510-V5/His und zeigt die Verteilung innerhalb des Gradienten an. Hierbei werden im Eluat (E) vergleichbare Proteinmengen wie im Überstand (293) nachgewiesen. Unter Berücksichtigung der auf das Gel aufgetragenen Volumina ergibt sich hieraus eine ca. 4-fache Anreicherung. Auffällig war, dass bei dem Eluat zwei weitere, deutlich niedermolekularere Proteinabbaubanden bei ca. 30 kDA und 17 kDa hinzukamen. SEP1-510 konnte in den Fraktionen 17 - 20 und 24 - 26 nachgewiesen werden. Hierbei wird stets eine Proteinbande knapp über

72 kDa detektiert. Die niedermolekularen Banden, wie sie zuvor im Eluat zu sehen waren, wurden in den Fraktionen nicht nachgewiesen. Anhand dieser Verteilung von SEP1-510 innerhalb der Fraktionen lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass es sich beim Protein-Peak in der Fraktion 16 (Abb. 5.38) nicht um SEP handeln kann. Für die Fraktion 26 zeigte sich hingegen durch den Westernblot eine Deckung. Ob hier jedoch außer SEP1-510 auch noch weitere Proteine enthalten sind, konnte aufgrund der beobachteten Diskrepanz bezüglich Fraktion 16 jedoch nicht geklärt werden. Alle Fraktionen wurden durch einen Proliferationsversuch weiter analysiert (Abb. 5.40).

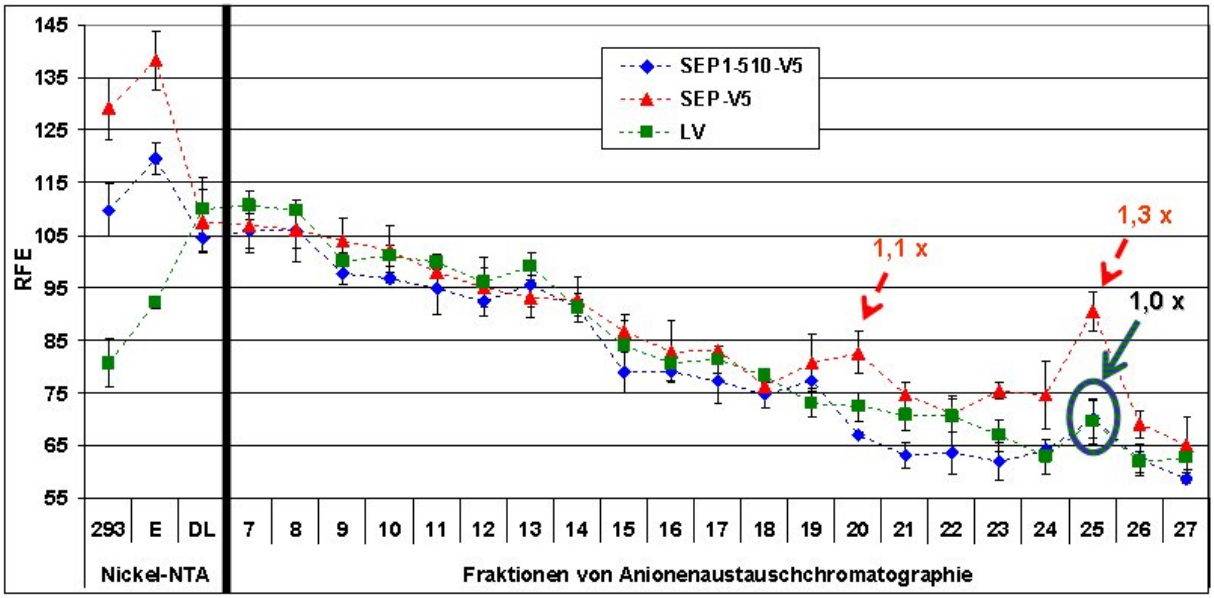


Abb. 5.40: Testung der SEP1-510-V5-Fraktionen im Proliferationsversuch
Von den Fraktionen wurden je 25 µl zu 75 µl HUVEC-Mangelmedium gegeben. Weiterhin erfolgte auch eine Testung der Proben der Nickelsäulen-Aufreinigung (Nickel-NTA). Von SEP1-510-V5/His (SEP1-510-V5), SEP-V5/His (SEP-V5) und Leervektor (LV) wurden je 25 µl der HEK 293-Überstände direkt (293), 10 µl dialysiertes Eluat (E) und 25 µl der Nickelsäulendurchläufe (DL) auf HUVECs übertragen. Die Messung erfolgten nach 5 Tagen durch den AlamarBlue-Assay. Die Messwerte sind in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) angeben. Zur besseren Übersicht wurden nur die Bereiche von 55 bis 145 RFE dargestellt.

Für die HEK 293-Überstände, dem Ausgangsmaterial der Nickel-NTA und Anionen-Austauschchromatographie, wurden mit SEP1-510-V5 eine 1,4-fache und mit SEP-V5 eine 1,6-fache Stimulation gegenüber der Leervektorkontrolle erreicht. Obwohl mit den Nickel-NTA-Eluaten insgesamt höhere Messwerte erhalten wurden, fielen die Stimulationen mit einer 1,3-fachen für SEP1-510-V5 und einer 1,5-fachen Erhöhung für SEP-V5 etwas geringer aus. Grund hierfür war, dass vor allem die Werte der Leervektorkontrolle höher lag als bei den Überständen (293) (Abb. 5.40). Die Zellzahlen nach Inkubation mit den Durchläufen (DL) der Nickel-NTA (DL) unterschieden sich bei allen drei Proben nicht. Bei der Analyse der Fraktionen konnte durch Abgleich der Messwerte von SEP1-510-V5, mit denen des Leervektors, in keiner Fraktion eine Stimulation ermittelt werden. Nach Fraktionierung von SEP-

V5 hingegen konnte in zwei Fraktionen eine Stimulation erhalten werden. Diese betrug bei der Fraktion 20 eine 1,1-fache und für Fraktion 25 eine 1,3-fache Erhöhung. Ob die Stimulation hierbei durch fraktioniertes SEP-V5-Protein vermittelt wird, kann wegen des fehlenden Proteinnachweises nicht beurteilt werden.

Insgesamt konnte keine Korrelation zwischen Proliferation und fraktioniertem SEP1-510 gefunden werden. Obwohl die Expression zu proliferativen Überständen führt, konnte durch diese Analyse nicht belegt werden, dass SEP direkt aktiv ist. Vielmehr deutet einiges darauf hin, dass SEP eher endogen oder autokrin wirkt, wodurch sekundär Proliferationsfaktoren freigesetzt werden. Dessen ungeachtet, gelang ausgehend von SEP-Überständen die Gewinnung einer aufgereinigten und fraktionierten Proteinlösung (Fraktion 25), die eine stimulierende Wirkung auf HUVECs zeigte.

5.4.5.2 Rekombinantes SEP1-510-Protein aus E. coli-Inclusionbodies

Die Expression von SEP1-510-V5/His-Protein in E. coli-Zellen (Arakawa et al., 2002) und anschließende Nickel-NTA-Aufreinigung aus Inclusionbodies (Panda, 2003) erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Dr. Irene Boche (Xantos AG). Nach der Dialyse (PBS) des NTA-Eluates wurde zur Bestimmung des Reinheitsgrades eine Probe auf ein Proteingel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Daran schlossen sich eine Westernblot-Analyse zum Nachweis von SEP und eine unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie an (Abb. 5.41).

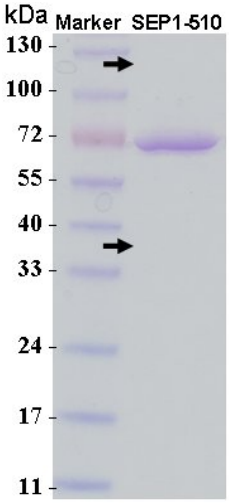


Abb. 5.41: Überprüfung des Reinheitsgrades von rekombinanten SEP1-510-V5/His-Protein
Die Aufreinigung erfolgte aus den Inclusionbodies von E. coli-Zellen durch Nickel-NTA-Affinitätschromatographie. Auf das Proteingel wurden 2 µg SEP1-510-Protein aufgetragen und das Gel nach der Elektrophorese mit Coomassie gefärbt. An den mit Pfeilen markierte Stellen sind im Original schwache Verunreinigungen zu sehen gewesen. Der Proteinstandardmarker zeigt die Proteingrößen in Kilo Dalton (kDa) an.

Durch Coomassie-Färbung wird im Wesentlichen nur eine starke Proteinbande bei ca. 72 kDa sichtbar. Dass es sich hierbei um SEP1-510-V5/His handelt, bestätigt ein Anti-His-Westernblot (Daten nicht gezeigt). Die beiden schwarzen Pfeile markieren Positionen, an denen im Original schwache Verunreinigungen zu erkennen waren. Eine stimulierende Wirkung des gereinigten SEP1-510-Proteins auf HUVECs konnte durch Proliferationsversuche auch nach Testung verschiedener Konzentrationen nicht ermittelt werden (Abb. 5.42).

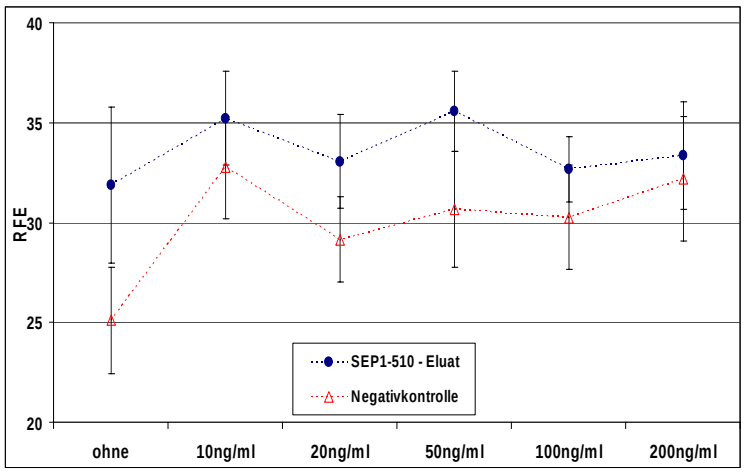


Abb. 5.42: Testung von rekombinanten SEP1-510-Protein aus E. coli-Inclusionbodies
Die Aufreinigung erfolgte über Nickel-NTA. Die Zugabe 6 verschiedener Proteinkonzentrationen zu 75 µl HUVEC-Mangelmedium erfolgte in 25 µl Volumen, wobei mit serumfreien DMEM verdünnt wurde. Der Bindungs-Puffer der Nickel-NTA-Aufreinigung diente als Negativkontrolle. Die Messung erfolgte 5 Tage später durch AlamarBlue-Assay. Die Messwerte sind in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) im Bereich 20 - 40 RFE angeben.

5.4.5.3 Rekombinantes SEP1-510 aus Überständen infizierter Insekten-Zellen

Des Weiteren wurde rekombinantes SEP1-510-V5/His-Protein von Baculo-Virus infizierten Insekten-Zellen (SF-21) (Law and Wells, 1989; Wickham et al., 1992) durch die Gruppe von Dr. Irene Boche hergestellt. Die Aufreinigung erfolgte durch Nickel-NTA aus Insektenzellüberständen. Durch Coomassie-Färbung und His-Westernblot-Analyse wurde ein vergleichbarer Reinheitsgrad wie bei dem Protein aus E. coli-Zellen nachgewiesen (Abb. 5.41). Bei den anschließenden Proliferationsversuchen wurden neben SEP1-510 drei weitere Eluate der Nickel-NTA-Aufreinigung als Kontrolle verwendet. Diese stammten von uninfizierten und zwei infizierten Insekten-Zellen (Abb. 5.43). Letztere exprimierten ein sezerniertes Protein, welches an sich keine Stimulation von HUVECs bewirkt und eine zytosolische Kinase, durch deren Expression kein Protein im Überstand zu erwarten war.

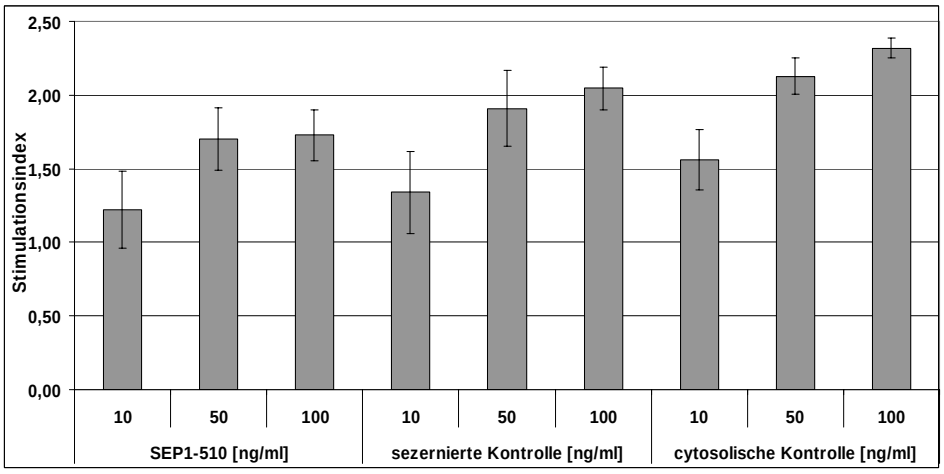


Abb. 5.43: Testung von SEP1-510-Protein aus Insekten-Zellen (SF-21) im Proliferationsversuch
Die Zugabe drei verschiedener Proteinmengen zu 75 µl frischem HUVEC-Mangelmedium erfolgte in 25 µl Volumen. Dabei wurde mit serumfreien DMEM-Medium aufgefüllt. Als Negativkontrolle dienten Eluate einer Aufreinigung von uninfizierten Insektenzellüberständen und ein Eluat eines sezernierten, aber auf HUVECs inaktiven Proteins und ein Eluat eines zytosolischen Proteins. 5 Tage nach Übertrag wurden die HUVEC-Zellzahlen mittels AlamarBlue-Assay bestimmt. Der Stimulationsindex wurde durch Division der Messwerte mit der Negativkontrolle ermittelt.

Rekombinantes SEP1-510-Protein bewirkte eine 1,7-fache Stimulation gegenüber dem Eluat von uninfizierten Insektenzellüberständen. Unerwartet war hingegen, dass durch die Eluate der beiden anderen rekombinanten Proteine vergleichbare oder teilweise größere Stimulationen erhalten wurden. Nach diesen Ergebnissen ließ sich keine gesicherte Aussage darüber machen, ob die Stimulation von rekombinanten SEP-Protein oder anderen Proteinen ausgeht.

5.4.6 Funktionsanalyse von SEP durch Migrationsversuch

Die Fähigkeit zur Migration ist eine wichtige Eigenschaft von Endothelzellen und stellt neben Proliferation und Differenzierung eine grundlegende Vorrausetzung für die Bildung neuer Gefäße dar (Carmeliet, 2000). Im Anschluss an eine erfolgreiche Protokolletablierung mit rekombinanten VEGF und bFGF (Azizkhan et al., 1980) wurde ein Migrationsversuch mit SEP-Protein aus HEK 293- und Insekten-Zellen-Überständen durchgeführt (Abb. 5.44).

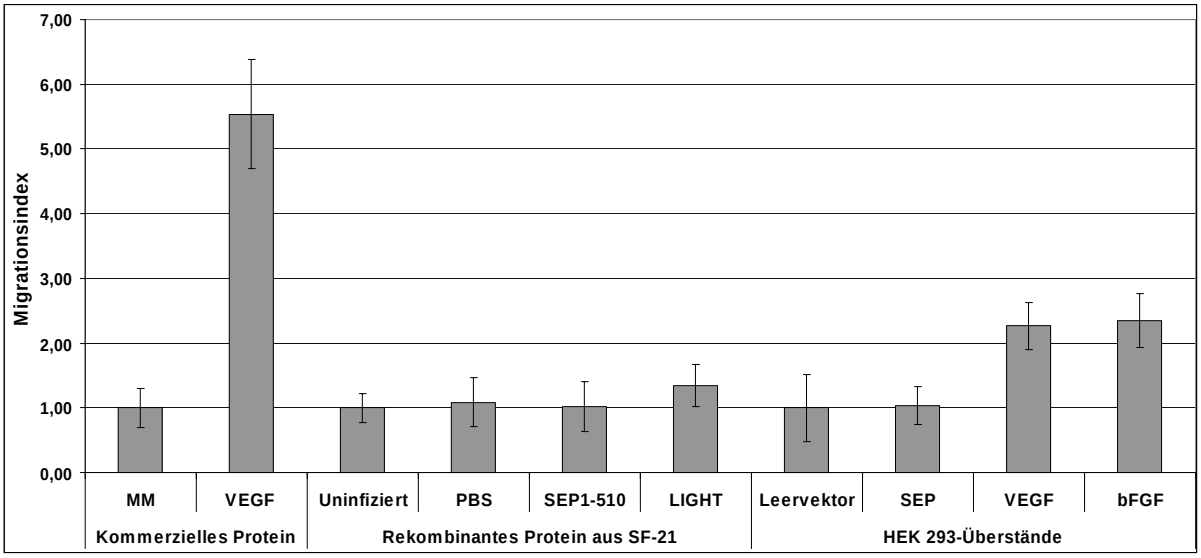


Abb. 5.44: Migrationsversuch mit rekombinantem SEP1-510-Protein aus Insekten-Zellen- (SF-21) und SEP aus HEK 293-Überständen

Die Durchführung erfolgt mit 8 µm Inserts (Falcon). Es wurden je Ansatz doppelt Bestimmungen erhoben. Dabei wurden von je von fünf Gesichtsfeldern im Mikroskop bei einer 400-fachen Vergrößerung Bilder gemacht und anschließend die Zellen gezählt. Der Migrationsindex wurde durch Division mit der jeweiligen Negativkontrolle errechnet. Bei kommerziellem VEGF (40 ng/ml) war dies 0,1 %-iges BSA-Mangelmedium (MM) mit PBS, bei den rekombinanten Proteinen aus Insekten-Zellen (SF-21) das Eluat von uninfizierten SF-21 und bei HEK 293-Überständen der Leervektor-Überstand.

Durch die Kontrollen VEGF und bFGF wurde die Funktionsfähigkeit dieses Versuches bestätigt. Dies galt sowohl für kommerzielles als auch für das in HEK 293-Zellen produzierte, rekombinante Protein. Dagegen zeigten beide SEP-Proteine keine Stimulation der Migration.

6 Diskussion

Ziel des Screens war die Identifizierung von cDNAs, deren Expression konditionierte Medienüberstände erzeugen, welche Endothelzellen stimulieren können. Bei der Bildung neuer Blutgefäße spielt die Proliferation von Endothelzellen eine zentrale Bedeutung. Aus diesem Grund wurde ein Proliferationsversuch mit Endothelzellen als Messmethode für einen pro-angiogenen Effekt ausgewählt. Da das Hauptinteresse sezernierten Proteinen galt, wurden die cDNAs in einer Zelllinie exprimiert und anschließend die konditionierten Überstände auf Tester-Zellen transferiert und getestet. Das etablierte Screen-Protokoll erwies sich insgesamt als funktionell und stabil. Aus den cDNA-Kollektionen wurden sämtliche zur Etablierung des Systems verwendeten cDNAs wieder gefunden und überdies vier bekannte und fünf unbekannte Gene identifiziert, für die bislang kein Bezug zur Angiogenese bekannt war. Angiogenese spielt sowohl in physiologischen als auch in pathophysiologischen Situationen eine Rolle (Cines et al., 1998). Die Identifizierung neuer endothelialer Wachstumsfaktoren könnte daher neue Ansatzpunkte zur Behandlung von Erkrankungen eröffnen, für die eine aberrante Angiogenese verursachend ist (Folkman, 1995). Der wesentliche Vorteil von löslichen Faktoren ist das therapeutische Potential und die Möglichkeit zu der direkten Suche nach einem Inhibitor. Eine Hemmung von Proteinen, die im Blut zirkulieren ist einfacher als bei intrazellulären Proteinen, da hier u.a. keine Zellmembranen von dem Wirkstoff überwunden werden müssen. Außerdem dürfte auch hier, wie bereits bei zahlreichen Krebstherapien, die Zukunft in der Kombination verschiedener Wirksubstanzen liegen.

6.1 Das Screen-System

Bei der Entwicklung des Screen-Protokolls diente die Proliferation von Endothelzellen zur Bestimmung eines pro-angiogenen Effekts. Hierzu wurde ein Proliferationsversuch durch manuelle Vorarbeiten an die ausgewählten Zellen angepasst und anschließend auf die Roboter-Plattform übertragen. Die Durchführung des Proliferationsversuchs bewies sich sowohl bei der Etablierung als auch beim Screen als geeignet und für den Hochdurchsatz tauglich. Dies zeichnete sich durch hohe Wiederfindungsraten (> 94 %) und die niedrige Anzahl falsch Positiver (< 1,6 %) aus (vgl. 5.2.10, Tab. 5.1., 4. Screen).

6.1.1 Etablierung eines Proliferationsversuchs zum Nachweis von Angiogenese

Die Auswahl der Tester-Zellen war an eine Reihe von Bedingungen geknüpft. Die Zellen sollten endothelialen Ursprungs sein, repräsentativ für Angiogenese und eine hohe Sensitivität

gewährleisten. Zu Beginn wurden mit bEnd3-Zellen (Montesano et al., 1990) und MS1-Zellen (Arbiser et al., 1997) zwei murine endotheliale Zelllinien getestet. Zur Quantifizierung eines proliferativen Effekts einer exprimierten cDNA wurden zwei verschiedene Prinzipien verfolgt. Einerseits wurde ein Proliferationsversuch durchgeführt, bei dem die Auswertung durch eine Zellzahlbestimmung mittels AlamarBlue-Assays erfolgte (Ahmed et al., 1994). Hierbei konnte ein Proliferationsversuch etabliert werden, bei dem eine serumabhängige Zellzahlsteigerung gelang. Im Gegensatz dazu wurde aber kein Effekt durch rekombinante Wachstumsfaktoren erhalten, weshalb dieser Assay für die Identifizierung unbekannter Proliferationsfaktoren ausschied (vgl. 5.2.2.4). Andererseits wurden Reportergenversuche durchgeführt, bei denen die Aktivitätsbestimmung eines transient oder stabil exprimierten SRE-Luziferase-Reportergens als Messmethode herangezogen wurde (Treisman, 1992). Jedoch konnte kein Effekt in Abhängigkeit von rekombinanten Faktoren ermittelt werden (vgl. 5.2.2.5 - 5.2.2.6). Insgesamt erwiesen sich daher diese beiden Zelllinien als ungeeignet für den Screen.

Parallel erfolgte die Testung primärer Endothelzellen. Primärkulturen waren aufgrund wesentlich aufwendigerer Kultivierungsbedingungen und höherer Kosten für spezielles Medium zunächst nicht die erste Wahl gewesen. Zudem ist die Bereitstellung ausreichender Zellmengen wegen der doppelt so langen Teilungsraten schwieriger und eine Kultivierung kann stets nur für etwa 5 - 7 Passagen erfolgen. Das macht ein häufiges Auftauen von Zellen nötig und birgt daher die Gefahr, in Abhängigkeit von verschiedenen Zell-Chargen, Messwertschwankungen zu erhalten. Der Vorteil von Primärkulturen ist, dass diese nicht transformiert sind und daher die wesentlichen endothelialen Wachstumseigenschaften beibehalten. Überdies sind die getesteten Zellen humanen Ursprungs. Die Festlegung auf HUVECs (PromoCell GmbH) als endotheliale Tester-Zellen erfolgte durch manuelle Vorversuche. HUVECs sind primäre Endothelzellen, die aus der Nabelschnur-Vene von Neugeborenen gewonnen werden. Bei Etablierungsarbeiten gelang es neben der Stimulation mit Serum auch durch die Zugabe der endothelialen Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF eine reproduzierbare Proliferationsstimulation zu erhalten (vgl. 5.2.2.7). Ebenfalls getestete mikrovasuläre Endothelzellen HMVECs zeigten zwar ähnliche Resultate, wiesen aber im Vergleich zu HUVECs durchweg geringere Stimulationen auf (vgl. 5.4.2.2).

Da sich HUVECs und HMVECs bezüglich ihrer immunologischen und metabolischen Eigenschaften geringfügig unterscheiden, wäre es möglich, mit diesen Zellen etwas abweichende Hits durch den Screen zu erhalten (Kumar et al., 1987). Unterschiede bestehen beispielsweise bei der Antwort auf das pro-angiogene Chemokin Interleukin 8 (IL-8) (Salcedo et al., 2000). Ursache hierfür sind unterschiedliche Expressionslevel der IL-8-Rezeptoren CXCR1 - 4.

HUVECs weisen im Vergleich zu HMVECs nur geringe mRNA-Mengen dieser Rezeptoren auf und reagieren daher vergleichsweise schwach auf die Zugabe von IL-8 (Salcedo et al., 2000). Zudem unterscheiden sich diese Zellen hinsichtlich der intrazellulären Signaltransduktion bei der durch VEGF vermittelten Aktivierung der MAP-Kinasen. Dieser Prozess läuft bei HUVECs vorwiegend über die Proteinkinase C (PKC), bei HMVECs dagegen überwiegend über Ras ab (Yashima et al., 2001). Eine zweite Screen-Kampagne mit HMVECs wäre daher für die Generierung zusätzlicher Hits durchaus sinnvoll.
Überdies lag der Schwerpunkt des Interesses hauptsächlich auf der Tumorangiogenese. Einige Hinweise sprechen dafür, dass in der Umgebung eines Tumors neu gebildete Endothelzellen im Bezug auf die exprimierten Gene und Rezeptoren eher EPCs als HUVECs oder HMVECs entsprechen (Bagley et al., 2003). Tumore sezernieren Faktoren, die zur Rekrutierung von im Blut zirkulierenden EPCs führen und diese dadurch am Aufbau der Gefäße beteiligt werden (Hristov and Weber, 2004). Für eine gezielte Suche nach weiteren unbekannten Faktoren, die bei der Tumorangiogenese eine Rolle spielen, wären es daher sinnvoll, EPCs als Tester-Zellen auszuprobieren und gegebenenfalls zu verwenden.
Allgemein gesehen stellen *in vitro* Modelle mit Zellkulturen nur annähernd die Situation *in vivo* bzw. *in situ* dar. Forschungsergebnisse belegen, dass in einem Organismus weitere Faktoren bei der Stimulation von Endothelzellen, wie beispielsweise Zell-Zellkontakte ein Rolle spielen (Unger et al., 2004). Weiter weisen Endothelzellen keinen stabilen Phänotyp auf und können als isolierte Primärzellen unter Umständen ihre charakteristischen Eigenschaften verlieren (Borsum et al., 1982). Dennoch haben die vergangenen Jahre gezeigt, dass mit Hilfe verschiedener *in vitro*-, *in vivo*- und *in situ*-Modelle zahlreiche an der Angiogenese beteiligte Faktoren identifiziert werden konnten.

Entscheidend bei der Auswahl der cDNA-Expressions-Zelllinie war neben der Handhabung durch die Roboter auch, dass die Zellen eine ordnungsgemäße Faltung und Modifizierung der exprimierten Proteine gewährleisten. Daher wurden Säuger-Zelllinien getestet, von denen funktionsfähige exprimierte Proteine und keine spezies-bedingten Unterschiede bei der Protein-Modifikation zu erwarten sind (Bendig, 1988). In E. coli-Zellen (Thomas et al., 1997) beispielsweise findet keine Glykosylierung und in Hefe-Zellen (Moir and Mao, 1990) eine im Vergleich zu Säuger-Zellen abweichende Glykosylierung statt. Gerade dieser Modifikationsart kommt eine wichtige Funktion bei sezernierten Proteinen zu (Helenius and Aebi, 2001). Überdies treten bei E. coli-, Hefe- und Säuger-Zellen diverse Unterschiede bezüglich der

Proteinfaltung auf. Dies ist ebenfalls wichtig für die Funktion von Proteinen (Ellgaard and Helenius, 2003).

Für den Screen wurden schließlich HEK 293-Zellen als cDNA-Expressions-Zelllinie gewählt. Diese Zellen bewährten sich am Besten bezüglich der Handhabung durch die Roboter und ließen sich zudem kostengünstig mit der Kalziumphosphat-Methode transfizieren. Überdies wurde mit einer reproduzierbaren Transfektionseffizienz von ca. 90 % insgesamt das beste Ergebnis im Vergleich mit den anderen Zellen erzielt.

Nach der Identifizierung im Screen wurden die Hit-cDNAs in weiteren Säuger-Zelllinien wie beispielsweise HeLa-, PC-3 und MCF-7-Zellen exprimiert und die Überstände in einem Proliferationsversuch mit HUVECs getestet. Dabei zeigte sich, dass abgesehen von ein paar wenigen Ausnahmen, die meisten cDNAs nicht nur nach der Expression in HEK 293-Zellen, sondern auch nach der Expression in anderen Säuger-Zellen zur Bildung HUVECs stimulierender Überstände führten (Daten nicht gezeigt). In einzelnen Fällen konnten jedoch nach der Expression in manchen Zelllinien keine HUVECs stimulierenden Überstände erhalten werden. Grund hierfür ist vermutlich, dass der Bildung aktiver Überstände prinzipiell unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen können. Hierbei kommen zwei Möglichkeiten in Betracht. Erstens, die exprimierten Proteine werden von den Säuger-Zellen unmittelbar sezerniert und bewirken wie beispielsweise VEGF direkt die Stimulation von HUVECs. Zweitens kann die Bildung HUVECs stimulierender Überstände auch dadurch zustande kommen, dass die cDNA-Expression in den Säuger-Zellen zur Produktion und Sekretion pro-angiogener Faktoren führt. Da die Induktion sezernierter Proteine in Abhängigkeit von verschiedenen Signaltransduktionen erfolgen kann, sind hierbei in unterschiedlichen Zellen durchaus Differenzen zu erwarten.

6.1.2 Technische Durchführung des Screens

Weil Vorversuche zeigten, dass sich HUVECs in Gegenwart des HEK 293-DMEM-Mediums kaum stimulieren lassen, wurde anfangs getestet, ob die Kultivierung der HEK 293-Zellen nach der Transfektion in HUVEC-Mangelmedium erfolgen kann. Die Adaption jedoch konnte umgangen werden, indem statt des kompletten HEK 293-Überstandes eines Wells (100 µl) nur 25 µl auf HUVECs transferiert wurden. In Gegenwart dieser DMEM-Menge ließen sich HUVECs sowohl durch kommerzielles rekombinantes VEGF als auch durch VEGF-Überstände reproduzierbar stimulieren. Auffällig war jedoch, dass nach Transfer dieser DMEM-Menge zwar deutlich bessere Stimulationen als nach der Protein-Expression in HUVEC-Medium erhalten wurden. Die Messwerte an sich fielen aber insgesamt geringer aus (vgl. 5.2.8.1, Abb.5.10). Die Ursache dafür, dass in Gegenwart von DMEM-Medium höhere Stimulations-

raten erhalten wurden, lag in der Berechnungsmethode bzw. an den Werten des Referenzwertes. Der hierbei herangezogene Messwert des Leervektor-Überstandes fiel im Vergleich zu den VEGF-Überständen im DMEM-Medium deutlich geringer aus, als es im HUVEC-Medium der Fall war. Dadurch errechneten sich entsprechend höhere Stimulationen beim DMEM-Medium. Zusätzlich war auffällig, dass nach dem Transfer größerer Überstandsmengen als 25 µl die Stimulationen durch VEGF-Überstände (DMEM-Medium) abnahmen. Größere Überstandsmengen entsprechen gleichzeitig höheren VEGF-Konzentrationen auf den HUVECs. Nach dem Wissen um die VEGF-Konzentrationen im Überstand wären bessere Stimulationen zu erwarten gewesen (vgl. 5.2.2). Demzufolge betrug die VEGF-Konzentration nach dem Transfer von 25 µl Überstand ca. 15 ng/ml. Versuche mit rekombinantem VEGF zeigten, dass bei 15 ng/ml nur etwa halb so hohe Stimulationen erreicht werden, wie man sie durch den Einsatz von 60 ng/ml erhält. Daher ist davon auszugehen, dass die transferierten Überstände bzw. das DMEM-Medium ab einer bestimmten Menge einen hemmenden Effekt auf HUVECs ausübt. Zudem wäre auch denkbar, dass die Adaptionszeit der HUVECs an das veränderte Medium zu kurz war und sich dadurch der Hemmeffekt erklärt. Generell haben sich HUVECs als Primärzellen gegenüber Zelllinien als vergleichsweise sensibel gegenüber Veränderungen der Kultivierungsbedingungen gezeigt.

Ein weiterer Punkt, der zu einer Steigerung der erhaltenen Stimulationen beitrug, war die Reduktion des Serumgehaltes in den Medien. Der Serumgehalt sollte insgesamt möglichst niedrig gehalten werden, da Vorversuche zeigten, dass bereits geringe Serummengen ausreichen, um eine Proliferation zu bewirken. Wenn beispielsweise beim Transfer der Überstände größere Serummengen auf HUVECs gebracht werden, würden die Effekte einzelner Faktoren nicht signifikant zum Vorschein kommen. Wirkungen von potentiell schwächeren Faktoren könnten daher aufgrund des Serumeffektes nicht gefunden werden. Andererseits besteht bei einer geringen Serumkonzentration die Gefahr, unbekannte Faktoren, die für ihre Wirkung auf die Anwesenheit im Serum befindlicher Ko-Faktoren angewiesen sind, nicht identifizieren zu können. Dieses Risiko wurde jedoch in Kauf genommen, da vorrangig starke und einzeln wirkende Faktoren identifiziert werden sollten.

Das wesentliche Problem beim Assay-Transfer auf die Roboter-Plattform lag darin, dass im Gegensatz zu den manuellen Arbeiten einige Abläufe unter unsterilen Bedingungen erfolgen. Weil bei den ersten Testläufen mit den Robotern zahlreiche bakterielle Kontaminationen auftraten, war eine Erhöhung der Antibiotika-Konzentrationen in den Medien unumgänglich. Durch Testung verschiedener Konzentrationen der Zusätze wurden geeignete Medien definiert, bei denen die Anzahl bakterieller Kontaminationen unter 1 ‰ gehalten wurde und

gleichzeitig kein Effekt auf die Stimulierbarkeit der HUVECs auftrat (vgl. 5.2.11.2). Da diese Arbeiten mit den hochpotenten Faktoren bFGF und VEGF durchgeführt wurden, musste allerdings das Risiko in Kauf genommen werden, potentiell schwächere Faktoren in den neu definierten Medien nicht zu finden.

Damit eine cDNA als Hit galt, musste diese in zwei voneinander unabhängigen Screens identifiziert werden, weshalb sämtliche cDNAs doppelt getestet wurden. Dabei bestand jedoch die Gefahr einen potentiellen Hit nicht zu finden, wenn in einer der beiden Screens eine Kontamination auftrat. Die betreffende cDNA wurde dadurch von der weiteren Bewertung ausgeschlossen. Andererseits wäre ansonsten die Anzahl falsch Positiver um ein Vielfaches höher gewesen. Überdies kann auch ein fehlerhafter Schwellenwert zu falsch positiven oder falsch negativen Hits führen. Ein solcher Fall tritt ein, wenn sich auf einer Platte ein starker Hit oder eine Kontamination befindet, in Folge dessen sich der Mittelwert der Platte und die Standardabweichung erhöhen. Die Chancen einen schwachen Hit auf der betreffenden Platte zu finden, sind durch den erhöhten Schwellenwert deutlich geringer.

Des Weiteren kann bei der Testung nur einer Proteinkonzentration der exprimierten cDNA nicht davon ausgegangen werden, dass durch diese Menge ein wirksamer Konzentrationsbereich für eine HUVEC-Stimulation erreicht wird. Dabei ist sowohl denkbar, zu niedrige oder zu hohe Proteinkonzentrationen für einen messbaren proliferativen Effekt zu erhalten. Bekannte Wachstumsfaktoren zeigen eine klassische Dosis-Wirkungsbeziehung. Unter einem gewissen Schwellenwert werden keine Wirkungen erzielt und beim Überschreiten eines Konzentrationsoptimums können gegenläufige Effekte auftreten. Unter den gegebenen Screen-Bedingungen war daher zu erwarten, dass vorwiegend Gene identifiziert werden, die in ähnlicher Konzentration wie VEGF und bFGF wirken und zudem vergleichbare Kinetiken in der Aktivität aufweisen. Die Gefahr auf diese Weise potentielle Hits zu verlieren, wurde durch Festlegung eines geringen Schwellenwertes und eine Nachtestung reduziert. Für zukünftige Screen-Kampagnen wäre es sinnvoll, die Protokolle auch für die Testung anderer Überstandsmengen anzupassen, um so eventuell zusätzliche Hits identifizieren zu können.

Mit Hilfe von Screen-Kontrollplatten wurden die Positivkontrollen mit einer durchschnittlichen Wiederfindungsraten von über 94 % identifiziert. Die Anzahl falsch positiver Hits lag unter 1,6 % (vgl. Tab. 5.1). Verglichen mit den Ergebnissen bei den manuellen Testungen waren diese Werte nur geringfügig schlechter und bestätigten die gute Qualität des Screens.

6.2 Identifizierung verschiedener Hits

In zwei voneinander unabhängigen Screen-Kampagnen wurden jeweils 34.596 cDNA-Expressionsplasmide einzeln getestet. Von dabei 79 gefundenen Hits, konnten 13 durch die Nachtestungen bestätigt werden. Für 9 dieser Gene war bisher kein Zusammenhang mit der Angiogenese bekannt. Wenn man bedenkt, wie wenige angiogene Proteine bisher identifiziert wurden (vgl. Tab. 1.1), war dieser Screen-Ansatz sehr erfolgreich.

Obwohl der Screen auf die gezielte Suche nach sezernierten Proteinen ausgerichtet war, wurden im Verlauf auch cDNAs identifiziert, die ein zytosolisch, nukleär oder membranständig lokalisiertes Protein kodieren. Diese Proteine werden sehr wahrscheinlich nicht in den Überstand sezerniert. Vielmehr führt die Expression dieser cDNAs vermutlich dazu, dass die HEK 293-Zellen Proliferationsfaktoren bilden und in den Überstand sezernieren. Bei 4 der 13 verifizierten Hits handelt es sich um bekannte pro-angiogene Faktoren, die teilweise auch zur Protokolletablierung verwendet wurden. Bei diesen handelt es sich ausschließlich um sezernierte Faktoren. Hierbei wurden insgesamt alle 13, in den Kollektionssammlungen vorkommende cDNA-Expressionsplasmide von bFGF, VEGF, aFGF und PDGF, als Hit gefunden. Von den 9 weiteren Hits stellen 5 bereits beschriebene Proteine dar, für die entweder eine zytosolische oder nukleäre Lokalisierung beschrieben wurde. Für 4 Proteine ist bisher sowohl die Zelllokalisation als auch die Funktion vollends unbekannt. Gerade diese stellen interessante Kandidaten für eine weitere Charakterisierung dar.

6.2.1 Identifizierung zytosolischer Proteine als Hit

Durch den Screen wurden neben bekannten sezernierten Faktoren auch Proteine identifiziert, die nicht sezerniert werden, deren Expression aber dennoch zu HUVEC stimulierenden Überständen führt. Beispielsweise wurde eine intrazelluläre Kinase als Hit identifiziert. Die Expression dieses Proteins muss daher die Bildung und Sekretion anderer pro-angiogener Faktoren bewirken. Bei den bislang unbekannten Proteinen kam für die Beurteilung einer möglichen Wirkungsweise erschwerend hinzu, dass keine Informationen über ihre zelluläre Lokalisierung vorlagen. Daher war es zunächst wichtig, die Sekretion des betreffenden Proteins zu belegen bzw. die subzelluläre Lokalisation zu bestimmen. Konnte dies mittels bioinformatischer Prognosen nicht eindeutig vorhergesagt werden, erfolgte ein Proteinnachweis durch Westernblot-Analysen. Allerdings reicht der Nachweis, dass ein Protein sezerniert wird, allein nicht aus, um mit Sicherheit sagen zu können, dass dieses gleichzeitig der löslich aktive Faktor ist, der die HUVECs direkt stimuliert. Auch in diesem Fall wäre eine Bildung sekundärer löslicher Proliferationsfaktoren möglich, die entweder durch einen auto- oder parakrinen

Mechanismus auf die HEK 293-Zellen erfolgen könnte. Generell muss die Sekretion des exprimierten Proteins nicht unbedingt in einem direkten Zusammenhang mit der Stimulation der HUVECs stehen. Sämtliche cDNAs werden mit Hilfe eines CMV-Promoters exprimiert, wodurch hohe Expressionsraten erhalten werden (Rotondaro et al., 1996). In Abhängigkeit von dem exprimierten Protein kann es dabei zu einer intrazellulären Überladung kommen. Dies kann die Zellen mehr oder weniger schädigen, in Folge dessen Anti-Stress-Gene aktiviert werden. Bekannte Stress-Proteine sind VEGF und verschiedene Zytokine wie beispielsweise IL-8 und RANTES (Seematter et al., 2004). Für viele dieser Proteine ist ein direkter oder indirekter pro-angiogener Effekt bekannt, wodurch sich die Aktivität der entsprechenden Überstände erklären würde. Dass diese Problematik nicht das gesamte Screen-System in Frage stellt, liegt im Wesentlichen daran, dass die Überexpressions-Effekte bei allen exprimierten cDNAs auftreten und somit in gewissem Maße auch als Hintergrundsignal betrachtet werden können. Ein endgültiger Beweis dafür, dass es sich bei einer identifizierten cDNA tatsächlich um den löslich aktiven Faktor in den Überständen handelt, muss letztendlich durch Experimente mit rekombinant produziertem und aufgereinigtem Protein erbracht werden.

6.3 Charakterisierung von hSEP

Für eine Charakterisierung wurde ein bislang unbekanntes Gen ausgewählt, wobei die Wahl auf das Gen mit der Datenbanknummer NM_020746 fiel. Es kodiert ein 56,6 kDa großes Protein, das aufgrund erster Funktionshinweise den Namen hSEP (**h**uman **S**timulator of **E**ndothelial **P**roliferation) erhielt. Neben den bekannten endothelialen Wachstumsfaktoren konnte mit dem Überstand von hSEP die beste Stimulation von HUVECs erreicht werden. Überdies wurde im Screen ein murines Homolog ebenfalls als Hit identifiziert und durch bioinformatorische BLAST-Analysen eine Reihe weiterer homologer Proteine in anderen Wirbeltieren gefunden (vgl. 5.4.1.1). Bezüglich der Lokalisierung und Funktion lag zum Zeitpunkt der Identifizierung im Screen weder von SEP noch von den homologen Proteinen eine Information vor.

Die Expression von SEP-cDNA in HEK 293-, sowie in anderen Säugetierzellen, führt zu konditionierten Überständen, die HUVECs in einem Proliferationsversuch stimulieren. Die Stimulationsintensitäten der SEP-Überstände liegen durchschnittlich bei einer Verdopplung bzw. einer 100 %-igen Zellzahlsteigerung gegenüber der Leervektor-Kontrolle. SEP erreicht im Mittel ca. 80 % der Aktivität von VEGF und ca. 50 % der von bFGF. Im Gegensatz zu VEGF und bFGF handelt es sich bei SEP wahrscheinlich nicht um einen klassischen Wachstumsfaktor. Dagegen spricht einerseits die vergleichsweise große Proteingröße von 56,6 kDa ge-

genüber den Proteinen der VEGF- (34 - 42 kDa) (Senger et al., 1993) und bFGF-Familien (17 kDa - 34 kDa) (Ornitz and Itoh, 2001). Andererseits ist das Vorhandensein einer potentiellen Transmembrandomäne im C-Terminus von SEP (aa 513 - 535) ungewöhnlich. Überdies legen bioinformatische Analysen auch eine hypothetische Signalpeptidsequenz nahe. Diese umfasst die 17 N-terminalen Aminosäuren von SEP und ist durch mehrere hydrophobe Aminosäuren gekennzeichnet. N-terminale Signalpeptide binden während der Proteinsynthese an einen RNA/Protein-Komplex (SRP) (Walter and Johnson, 1994) und führen zur Anlagerung des aktiven Ribosoms an das Endoplasmatische Reticulum (ER) (Walter et al., 1984). Die Fertigstellung der Peptidkette erfolgt dann ins Lumen des ERs. Nach der Synthese gelangt das Protein zum Golgi-Komplex und von dort zum seinem endgültigen Bestimmungsort (Dalbey and Von Heijne, 1992). Proteine, die auf diese Weise synthetisiert werden, durchlaufen den klassischen Sekretions-Signalweg. Auf diese Weise werden sezernierte Proteine, aber auch solche des ERs, des Golgis und der Lysomen, sowie zahlreiche Plasmamembranproteine synthetisiert (Hong, 1998). Folglich kann bei SEP allein aufgrund des vorhergesagten potentiellen Signalpeptids nicht sicher von einer Sekretion in das extrazelluläre Milieu ausgegangen werden. Es war zunächst wichtig zu klären, ob SEP von den HEK 293-Zellen sezerniert wird und ob die stimulierende Aktivität der Überstände lediglich mit der Anwesenheit von SEP korreliert. Der Nachweis von SEP in den Überständen erfolgte denaturiert durch Westernblot-Analysen und nativ mittels ELISA. Für diese Immunnachweisreaktionen wurde an SEP ein C-terminales V5/His-Peptid fusioniert (Southern et al., 1991). Da Proliferationsversuche belegten, dass das Fusionspeptid keinen Einfluss auf die SEP vermittelte Stimulation hat, wurden die weiteren Experimente mit dem Fusions-Konstrukt gemacht. Dadurch konnte stets die Expression und Anwesenheit von SEP überprüft werden. Allerdings ließen sich nach der Expression von SEP in HEK 293-Zellen im Überstand meist nur schwache oder keine Proteinbanden nachweisen. Im Gegensatz dazu werden im Zelllysat durchweg stärkere Signalintensitäten erhalten, wobei durchschnittlich 5 - 10 x größere Proteinmengen detektiert wurden. Das Auftreten dieser Differenz kann verschiedene Gründe haben. Eine mögliche Ursache liegt eventuell in der unterschiedlichen Probenaufbereitung. Zwar werden beide Fraktionen vor der Gelelektrophorese im gleichen Probenpuffer aufgenommen, das Zelllysat wird jedoch zuvor unter Verwendung eines weiteren Denaturierungspuffers gewonnen. Einerseits unterscheiden sich die Denaturierungsbedingungen der beiden SEP-Fraktionen und dadurch wahrscheinlich die Antikörperzugänglichkeiten. Andererseits wäre es auch denkbar, dass im Zelllysat durch eine rasche Denaturierung der Proteasen ein Proteinabbau von SEP verhindert wird, wohingegen die Proteine im Überstand abgebaut werden. Zudem ist

das Zellinnere nicht nur Syntheseort von Proteinen, sondern kann auch der Speicherung dienen. Je nachdem wie schnell und durch welchen Mechanismus ein Protein von den Zellen sezerniert wird, lassen sich die größeren Mengen im Lysat auch auf diese Weise erklären.

Eine wesentliche Auffälligkeit zeigte sich bei Experimenten, die dazu dienten die Anwesenheit von SEP im Überstand mit der Stimulation von HUVECs zu korrelieren. In voneinander unabhängigen Proliferationsversuchen wurden durch SEP-Überstände konstant 2-fache Stimulationen gegenüber der Kontrolle erhalten. Die jeweils bestimmten Proteinmengen von SEP im Überstand wiesen hingegen deutliche Schwankungen auf. So wurden in Proliferationsversuchen, bei denen verschiedene SEP-Überstände mit unterschiedlichen SEP-Proteinmengen getestet wurden, trotzdem gleiche Stimulationen erhalten. Die Aktivität der SEP-Überstände konnte also nicht direkt mit den erhaltenen Proteinmengen von SEP korreliert werden.
Insgesamt konnte nach diesen Resultaten keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Sekretion von SEP direkt im Zusammenhang mit der Stimulation von HUVECs steht und ob der Effekt von SEP direkt auf HUVECs ausgeübt wird. Weiter legen die Ergebnisse nahe, dass es sich bei SEP um eine spezifische Sekretion handeln dürfte. Eine unspezifische Sekretion von SEP, wie beispielsweise durch die Freisetzung aus zerstörten oder absterbenden Zellen, wurde durch einen Anti-GAPDH-Westernblot ausgeschlossen. Bei der GAPDH handelt es sich um ein zytosolisches Haushaltsprotein, das bei einer unspezifischen Lyse ebenfalls in den Überständen zu erwarten wäre. Dieses Protein wurde jedoch nur im Lysat, nicht aber in den Überständen nachgewiesen. Dadurch ist bei SEP nicht von einer unspezifischen Sekretion auszugehen.

6.3.1 Lokalisierung von SEP

Eine alternative Strategie, um Hinweise für eine Sekretion von SEP zu erhalten, wurde durch Lokalisierungsstudien verfolgt. Hierbei wurden jedoch insgesamt nur bedingt aussagekräftige Ergebnisse erhalten, da Experimente mit entsprechenden Kontrollen von bekanntermaßen sezernierten Faktoren, wie beispielsweise die Immunfluoreszenzfärbung von VEGF, nicht gelang. Zur Durchführung dieser Arbeiten wurde ein neues Konstrukt generiert, in dem SEP C-terminal mit GFP fusioniert wurde (Chalfie et al., 1994). Durch dieses Fusionspeptid kann die Expression und Lokalisierung von SEP, ohne aufwendige Färbungen, direkt durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Wie zuvor, konnte auch für dieses Konstrukt durch einen Proliferationsversuch gezeigt werden, dass es wie SEP zur Stimulation von HUVECs

führt. Überdies kann es in vergleichbaren Mengen im Überstand nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte hierbei mittels eines polyklonalen Kaninchenserums gegen SEP (SA3090). Der Grund dafür, dass die Lokalisierungsstudien dennoch mit dem GFP-Fusions-Konstrukt durchgeführt wurden, lag darin, dass im Westernblot mit SA3090 unspezifische Proteinbanden erhalten werden. Dadurch sollte die Gefahr unspezifischer Signale ausgeschlossen werden. Immunfluoreszenz-Experimente wurden sowohl in HEK 293- als auch HeLa-Zellen gemacht, wobei in beiden Fällen das Fusionsprotein nachgewiesen werden konnte. Um bei der Fluoreszenzmikroskopie die gefundenen GFP-Signale zuordnen zu können, wurden parallele Anfärbungen des Zellkernes, des ERs und Golgis vorgenommen. Durch einen Vergleich der Signale konnte für SEP mit großer Wahrscheinlichkeit eine Golgi-Lokalisierung bestimmt werden (vgl. 5.4.3.2, Abb. 5. 30 C). Auch wenn eine Lokalisierung im Golgi nicht zwangsläufig bedeutet, dass SEP sezerniert wird, ist dies dennoch ein Hinweis darauf, dass die Sekretion von SEP über den klassischen Weg erfolgt. Aufgrund der potentiellen Transmembrandomäne könnte SEP auch im Lumen oder der Membran des Golgis lokalisiert sein (Hong, 1998).

6.3.2 Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen von SEP

Bioinformatische Analysen von SEP ergaben zwischen den Aminosäuren 517 - 535 eine potentielle Transmembrandomäne (vgl. 5.4.1.5). Die Existenz dieser hypothetischen Membranverankerung steht zwar nicht direkt im Widerspruch mit einer Serzernierung von SEP, hat aber Konsequenzen für die Erklärung einer möglichen Wirkungsweise von SEP. Drei denkbare Erklärungsansätze sind hierbei:

(1) Die vorhergesagte Transmembrandomäne ist funktionslos und SEP wird direkt sezerniert
(2) SEP ist primär membranständig und kommt zudem als lösliche Form vor, die durch eine Prozessierung erhalten wird (sSEP)
(3) SEP wird über (1) oder (2) in den Überstand sezerniert und bewirkt die Stimulation von Endothelzellen nicht direkt, sondern indirekt über die Induktion eines oder mehrerer pro-angiogener Faktoren, die dann in den Überstand sezerniert werden

Bei bioinformatischen Analysen handelt es sich um theoretische Vorrausagen, die durchaus mit Fehlern belastet sein können. Es ist also erstens (1) nicht gesagt, dass die vorhergesagte Transmembrandomäne auch tatsächlich *in vivo* zu einer Membranverankerung von SEP führt. Der zweite Erklärungsansatz (2) beruht auf Beispielen aus der Literatur, in denen primär membranständige Proteine beschrieben werden, die ihren angiogenen Effekt erst durch eine prozessierte lösliche Form bewirken. Dazu zählen u.a. bFGF und VEGF. bFGF liegt zunächst

assoziiert mit der extrazellulären Matrix und den Heparansulfat-Proteoglykanen der Zelloberfläche vor und wird auf der Basalmembran präsentiert (Folkman et al., 1988). Eine lösliche aktive Form von bFGF entsteht dann durch Prozessierung mittels Heparanasen oder Proteasen (Ishai-Michaeli et al., 1990). Weiter kann es sich bei freigesetzten Proteinfragmenten auch um lösliche Formen von Rezeptoren oder Adhäsionsmolekülen handeln. Beispiele hierfür sind der IL-4-Rezeptor (Fanslow et al., 1990) und die Adhäsionsproteine ICAM-1 und E-Selectin (Fassbender et al., 1998). Die Wirkung löslicher angiogener Proteine kann entweder direkt über eine spezifische Rezeptorbindung auf Endothelzellen erfolgen oder indirekt dadurch, dass Endothelzellen oder andere Zielzellen zur Produktion und Sekretion angiogener Proteine angeregt werden (Distler et al., 2003).

Aber auch bei anti-angiogen wirkenden Proteinen ist das Vorkommen inaktiver Vorläuferproteine bekannt (Distler et al., 2003). Prominente Beispiele sind das Angiostatin, das als internes Fragment durch die Proteolyse von Plasminogen entsteht und das aus dem Kollagen Typ XVIII gebildete Endostatin (O'Reilly et al., 1997; O'Reilly et al., 1994).

Insgesamt stellt das Prinzip von Vorläuferproteinen einen weit verbreiteten und effektiven Mechanismus zur Kontrolle der Proteinverfügbarkeit dar (Taipale and Keski-Oja, 1997). Es ist daher denkbar, dass SEP ebenso primär membranständig in der Zelle vorliegt und durch eine Prozessierung eine löslich aktive Form (sSEP) gebildet wird.

Bei der dritten Erklärungsmöglichkeit (3) wird angenommen, dass die Stimulation der HUVECs indirekt erfolgt, indem SEP die Expressions-Zellen zur Produktion und Sekretion löslicher pro-angiogener Faktoren anregt. Diese Induktion könnte entweder durch eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege oder durch freigesetzte Proteine erfolgen. Verschiedene Zytokine kämen hierbei in Frage. Von diesen ist bekannt, dass sie über auto- oder parakrine Mechanismen auf die Expressions-Zelllinie oder die Endothelzellen wirken können, in Folge dessen dann entweder weitere pro-angiogene Faktoren induziert werden oder der angiogene Effekt direkt auf die Endothelzellen ausgeübt wird (Mantovani et al., 1992).

Insgesamt liegen diesen 3 Erklärungsansätzen verschiedene Prinzipien zugrunde, bei denen die Sekretion von SEP unterschiedliche Rollen spielt. Aus diesem Grund wurde durch biochemische und molekularbiologische Analysen nachfolgend die Bedeutung der Sekretion und Golgi-Lokalisierung von SEP im Zusammenhang mit der Aktivität untersucht. Hierzu wurde überprüft, ob die bioinformatisch vorhergesagte potentielle C-terminale Transmembrandomäne und das N-terminale Signalpeptid tatsächlich von Bedeutung für die Lokalisierung bzw. die Funktion von SEP sind. Hierzu wurden weitere Konstrukte von SEP mit unterschiedlich großen Peptid-Deletionen generiert. Zur Analyse des Signalpeptids wurden die ersten

36 Aminosäuren deletiert (SEP37-510 bzw. SEP37-540) und für die Untersuchung der potentiellen Transmembrandomäne die Aminosäuren nach dem Arginin 509 (SEP1-510). Alle Konstrukte wurden durch Proliferationsversuche, Lokalisationsstudien und Westernblot-Analysen charakterisiert.

Die wesentlichsten Auswirkungen zeigte die Deletion der potentiellen Transmembrandomäne (SEP1-510). Dies betraf sowohl die Lokalisierung als auch die Sekretion und Funktion der C-terminal verkürzten Konstrukte. Durch Westernblot-Analysen von HEK 293-Überständen wurde gezeigt, dass die Konstrukte ohne die potentielle Transmembrandomäne im Vergleich zu SEP in 5 - 10 x größeren Mengen in den Überstand sezerniert werden (vgl. 5.4.3.1). Die Deletion des N-terminalen Signalpeptids hatte hingegen keinen Einfluss auf die Sekretion. SEP und SEP37-540 wurden in vergleichbaren Mengen sezerniert und konnten insgesamt in nur geringen Proteinmengen im Überstand detektiert werden. Betreffend der Lokalisierung wurde nach der Deletion der potentiellen Transmembrandomäne von SEP nunmehr eine überwiegend diffuse intrazelluläre Verteilung gefunden (vgl. 5.4.3.2). Färbungen des ERs waren nur noch vereinzelt, die des Golgis hingegen überhaupt nicht mehr zu sehen. Auch hier hatte im Gegensatz zur Entfernung des C-Terminus die Deletion des N-Terminus keine Auswirkung auf die Lokalisierung. Anders verhält es sich mit der Aktivität der verschiedenen Konstrukte. Hierbei wurden sowohl durch eine C- als auch eine N-terminale Deletion ein Funktionsverlust bzw. geringere Stimulationen erhalten. Nach Abschluss der Testung verschiedener SEP-Konstrukte konnten zwei wesentliche Aussagen getroffen werden:
Erstens hat die Deletion des potentiellen N-terminalen Signalpeptids keine Auswirkung auf die Lokalisierung und Sekretion von SEP. Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Sequenz keine essentielle Rolle bei der Translokation zum ER spielt. Diese Funktion muss vielmehr über eine andere Sequenz erfolgen. Hierbei kommt u.a. auch die potentielle Transmembrandomäne in Frage, da es nach ihrer Entfernung zu einer Delokalisierung von SEP kommt. Die Transmembrandomäne besteht wie das potentielle N-terminale Signalpeptid aus einer Reihe hydrophober Aminosäuren und kann ebenfalls als ER-Translokationssignal von Proteinen dienen (Lecomte et al., 2003). Proteine mit einer Transmembrandomäne werden während oder nach der Proteinsynthese in die ER-Membran verankert, wo sie entweder verweilen oder weitere Reifungsschritte durchlaufen und von dort aus zu ihrem endgültigen Bestimmungsort transportiert werden (Mothes et al., 1997). Membranproteine ohne Signalsequenz können entweder eine Typ I Orientierung (C-Terminus im Zytosol) oder eine Typ II Orientierung besitzen (N-Terminus im Zytosol) (Lecomte et al., 2003). Die Orientierung wird

dabei außerdem durch die Ladung der die Transmembrandomäne umgebenden Aminosäuren bestimmt. Die Sequenzen mit dem größeren Anteil an positiven Aminosäuren befinden sich meist im Zytosol. Bei SEP liegt mit 3 Argininen und 1 Histidin das Schwergewicht auf der C-terminalen Seite der Transmembrandomäne. Dies legt nahe, dass SEP ein Typ I Membranprotein sein könnte (Lecomte et al., 2003).
Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass die Translokation von SEP zum ER und die Sekretion über eine bisher unbekannte Signalsequenz erfolgt, die durch die bioinformatischen Analysen nicht vorhergesagt wurde. Für eine Überprüfung dieser Vermutungen wären weitere Analysen wie beispielsweise FACS-Färbungen oder Immunfluoreszenzen mit Konfokalmikroskopie nötig. Zumindest spricht die gefundene ER- bzw. Golgi-Lokalisierung dafür, dass es sich bei SEP um ein zum klassischen Sekretionsweg zugehöriges Protein handeln könnte. Nach der Immunfluoreszenz zu urteilen, scheint eine Membranverankerung von SEP wahrscheinlicher zu sein als eine Lokalisierung im Lumen dieser beiden Kompartimente.

Dass die Delokalisierung von SEP1-510 nicht im Widerspruch mit der gleichzeitig gesteigerten Sekretion steht, lässt sich durch verschiedene Gründe erklären. Normalerweise wäre davon auszugehen, dass die mangelnde ER-Translokation zu einer verminderten Sekretion von SEP1-510 führt, da keine Sekretion über den klassischen Sekretionsweg erfolgen könnte. Es wäre jedoch auch denkbar, dass die potentielle Transmembrandomäne nicht essentiell für die ER-Translokation ist, sondern anderen, weiter in der Proteinmitte gelegene Sequenzen diese Funktion zukommt. Dort befinden sich weitere hydrophobe Aminosäurebereiche, die bei den bioinformatischen Vorhersagen eine geringe Wahrscheinlichkeit für eine potentielle Domäne liefern. Die vorwiegende zytoplasmatische Lokalisierung muss auch nicht bedeuten, dass SEP1-510 nicht mehr zum ER gelangt, sondern kann aussagen, dass es rasch wieder aus dem ER entfernt wird. Mögliche Ursache hierfür könnte eine unkorrekte Faltung oder Struktur sein. Eukaryotische Zellen verfügen über komplexe Degradationsmechanismen, durch die fehlgefaltete Protein vom ER ins Zytosol überführt und dort durch das Proteasom abgebaut werden (Plemper and Wolf, 1999). Dies könnte sowohl die gefundene zytoplasmatische Färbung als auch die gesteigerte Sekretion von SEP1-510 erklären. Die bessere Sekretion könnte durch die fehlende Membranverankerung begründet sein und die Abnahme der Aktivität durch fehlerhaft gefaltetes Protein.

6.3.3 Spezifität der Aktivität von SEP

In Proliferationsversuchen mit SEP1-510 wird mit 83 % der Aktivität von SEP scheinbar nur eine geringe Reduzierung der HUVEC-Stimulation erhalten. Nach Einbezug der Tatsache, dass SEP1-510 in 5 - 10 x höheren Konzentrationen auf den HUVECs vorliegt, errechnet sich eine spezifische Aktivität von nur 8 - 17 %. Dies entspricht einem drastischen Funktionsverlust und ist ein Indiz dafür, dass es sich bei SEP1-510 mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um eine natürlich vorkommende löslich aktive Form von SEP handelt. Ansonsten wäre eine höhere Aktivität von SEP1-510 oder zumindest kein Aktivitätsverlust zu erwarten gewesen. Dass die Signale aufgrund zu hoher Konzentrationen von SEP1-510 zurückgingen, wurde durch verschiedene Verdünnungen ausgeschlossen. Diese Beobachtung wird bei vielen bekannten Faktoren gemacht. Beispielsweile bewirken TNF-α und TGF-β in geringen Konzentrationen einen pro-angiogenen Effekt, wohingegen nach Überschreiten eines Konzentrationsoptimums ein anti-angiogener Effekt von ihnen bewirkt wird (Distler et al., 2003). Vergleichbare Tests mit rekombinantem SEP-Protein konnten nicht durchgeführt werden, da die Proben von SEP nicht rein und konzentriert genug hierfür waren. Mit SEP-Überständen wurde keine SEP-Konzentration identifiziert, bei der sich ein anti-angiogener Effekt zeigte. Die Durchführung des Proliferationsversuchs mit HEK 293-Überständen wies jedoch mit 25 µl Überstand eine Obergrenze auf. Beim Transfer größerer Mengen auf HUVECs wird vermutlich durch das DMEM-Medium ein inhibierender Effekt erhalten. Experimente mit rekombinantem SEP-Protein aus Insekten-Zellen, bei denen große Menge sauberes Protein erhalten wurde, führten in keinem Fall zu einer Stimulation von HUVECs.

6.3.4 Produktion von rekombinantem SEP in verschiedenen Systemen

Aufgrund der Entdeckung, dass die Expression von SEP die Bildung anderer pro-angiogener Faktoren induziert, wurde überprüft, ob SEP direkt bzw. alleine eine Wirkung auf HUVECs besitzt. Zu diesem Zweck wurde V5/His-Peptid-markiertes SEP und SEP1-510 in größeren Mengen exprimiert und durch verschiedene Methoden angereichert und aufgereinigt. Die Expression erfolgte zusätzlich zu HEK 293- auch in E. coli- und Insekten-Zellen. Besonders durch die letzten beiden Expressions-Systeme wurden saubere Proben von SEP1-510 gewonnen. Die Expression von vollständigem SEP gelang hingegen in diesen Zellen nicht. Gründe hierfür könnten im Zusammenhang mit der potentiellen Transmembrandomäne stehen. Möglicherweise verhindert diese sowohl in E. coli- als auch in Insekten-Zellen die Freisetzung des SEP-Proteins. In HEK 293-Zellen, einer Säuger-Zelllinie könnte SEP durch spezielle Proteasen freigesetzt werden, welche in E. coli- und den SF-21-Insekten-Zellen nicht vorkommen.

SEP1-510 ließ sich hingegen nach der Expression relativ sauber in Proteinmengen bis zu mehreren Milligramm aufreinigen und nachweisen (vgl. 5.4.5.2 und 5.4.5.3). Dennoch führte die Zugabe dieser Proben zu keiner spezifischen Stimulation von HUVECs. Zwar wurde mit SEP1-510 aus Insekten-Zellen eine Stimulation gemessen, diese trat jedoch auch bei Negativkontrollen auf. Die Infektion der Insekten-Zellen mit dem Baculo-Virus scheint per se zu einer Induktion weiterer Proteine zu führen, die dann unspezifisch bei der Aufreinigung von SEP1-510 mit angereichert werden. Denkbar wäre, dass es sich bei den induzierten Proteinen in Insekten-Zellen um Histidin reiche Proteine handelt. Histidine kommen gehäuft in immunregulatorischen Proteinen vor und für zahlreiche solcher Proteine ist ein pro-angiogener Effekt bekannt (Mantovani et al., 1992).

Um speziesspezifische Unterschiede bei der Proteinproduktion durch das Expressionssystem ausschließen zu können, wurde bei einem weiteren Aufreinigungsschritt mittels Anionen-Austauschchromatographie rekombinantes SEP aus HEK 293-Überständen verwendet. Die Durchführung erfolgte dabei mit Proben, die zuvor über NTA-Agarose aufgereinigt wurden. Der Gradient sollte dazu dienen, möglichst saubere Fraktionen mit SEP zu erhalten, um eine direkte Wirkung von SEP nachweisen zu können oder eine Trennung von Aktivität und SEP zu erreichen. Die Durchführung der Anionen-Austauschchromatographie erfolgte mit SEP1-510- und SEP-V5/His-Fusionsprotein und Leervektor als Negativkontrolle. Die anschließenden Analysen zeigten, dass die Kurven der Gesamtproteinmengen von SEP1-510 und SEP einen übereinstimmenden Protein-Peak in der Fraktion 16 aufwiesen und einen weiteren, nicht identischen Peak in der Fraktion 25 (SEP) bzw. Fraktion 26 (SEP1-510). Im Gegensatz zu diesen Peaks ließ sich SEP1-510 in den Fraktionen 17 - 20, 25 und 26 nachweisen (vgl. 5.4.5.1, Abb. 5.39). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Peak in Fraktion 16 nicht SEP1-510-Protein repräsentieren kann. Insgesamt kann dadurch keine Aussage getroffen werden, ob die anderen Protein-Peak-Fraktionen tatsächlich SEP1-510-Protein widerspiegeln oder Kontaminationen durch andere Proteine sind. Gleiches gilt für SEP; aufgrund vermutlicher Detektionsprobleme konnte SEP in keiner Fraktion nachwiesen werden.
Mit der Fraktion 25 konnte zwar eine SEP1-510-haltige Fraktion ausgemacht werden, die eine Aktivität aufwies. Ob dies in einem direkten Zusammenhang steht, kann allerdings aufgrund vermeintlicher Kontaminationen mit anderen Proteinen nicht beurteilt werden. Gegen eine direkte Aktivität von SEP1-510 spricht, dass die Aktivität im Wesentlichen auf die Fraktion 25 beschränkt ist, in der Fraktion 26 aber ähnliche Proteinmengen von SEP1-510 nachge-

wiesen wurden. Bei einer direkten Aktivität von SEP1-510 wäre auch von dieser Fraktion eine Aktivität zu erwarten gewesen.

6.3.5 Hemmung der spezifischen Aktivität von SEP

In weiterführenden Experimenten wurden mehrere verschiedene Strategien verfolgt, um weitere Indizien für oder gegen eine direkte Wirkung von SEP auf HUVECs zu erlangen. Das Grundprinzip bestand darin, auf Aktivität getestete SEP HEK 293-Überstände auf unterschiedliche Weise gezielt zu inhibieren, um dadurch Rückschlüsse auf die Wirkungsweise von SEP machen zu können. Bei dieser Fragestellung wurde versucht, die Anwesenheit von SEP und die Aktivität der Überstände zu trennen. Dabei wurden drei verschiedene Möglichkeiten zur Inhibition von SEP angewendet:

Erstens wurde aus den Überständen, durch eine Immunfällung mit V5-Antikörper und Protein-G-Sepharose, SEP-V5/His-Fusionprotein vollständig abgereichert (vgl. 5.4.3.3).

Zweitens wurden die Überstände mit zwei verschiedenen SEP-spezifischen Antikörpern sowie einem polyklonalen Anti-SEP-Kaninchen Serum vorinkubiert, um auf diese Weise freies SEP-Protein zu binden und somit eine potentielle Rezeptorbindung von SEP zu inhibieren (vgl. 5.4.4.1).

Drittens erfolgte die Inkubation der Überstände mit verschiedenen, synthetisch erzeugten kurzen SEP-Peptidsequenzen, um eine potentielle Rezeptorbindung durch einen kompetitiven Mechanismus zu hemmen (vgl. 5.4.4.2).

Bei dem **ersten Ansatz** konnte eine vollständige Abreicherung des SEP1-510-V5/His-Protein aus den HEK 293-Überständen erreicht werden. Dennoch blieb die Aktivität im nunmehr SEP1-510 freien Überstand erhalten bzw. ging im gleichen Maße zurück, wie es bei VEGF- und Leervektor-Überständen ebenfalls beobachtet werden konnte. Da sowohl die Aufreinigung als auch der Proteinnachweis über das C-terminale V5/His-Fusionpeptid erfolgte, muss dieses Ergebnis jedoch unter Vorbehalt betrachtet werden. Diese Aussage gilt nur für C-terminal unprozessiertes SEP-Protein. Theoretisch ist es möglich, dass im Überstand eine C-terminal prozessierte Form von SEP vorkommt, die aufgrund des fehlenden V5/His-Fusionspeptid nicht abgereichert werden konnte und die Aktivität nach der Abreicherung bewirkt. Um dies ausschließen zu können, müssten weitere Immunfällungen mit SEP spezifischen Antikörpern erfolgen. Die Antikörper sollten dabei möglichst große Bereiche von SEP abdecken, um nicht erneut in Gefahr zu geraten, teilprozessierte SEP-Fragmente unzugänglich für die Abreicherungsprozedur zu machen.

Durch den **zweiten Ansatz**, bei dem eine Vorinkubation der Überstände mit zwei verschiedenen SEP-spezifischen Antikörpern und einem polyklonalem Anti-SEP-Kaninchen-Serum erfolgte, konnte ebenfalls keine spezifische Hemmung erreicht werden. Zwar bewirkt die Inkubation mit dem Anti-SEP-Serum gegenüber Prä-Immunserum eine Verminderung der Zellzahlen, dieser Effekt wird aber gleichermaßen auch bei Überständen von VEGF und dem Leervektor erhalten. Daher handelt es sich vermutlich um toxische Effekte des polyklonalen Serums auf HUVECs. Da quantitative PCR-Analysen (Dr. Matthias Klein) belegen, dass SEP in HUVECs exprimiert wird, besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Hemmung durch Inhibition des endogen exprimierten SEP-Proteins zurückgeführt werden kann.
Gegen diese Hypothese spricht jedoch die Tatsache, dass die Zellzahlen bei Leervektor-, VEGF- und SEP-Überständen in gleichem Maße zurückgingen. Zumindest bei Leervektorgegenüber SEP-Überständen wäre ein stärkerer Rückgang zu erwarten gewesen, da beim Leervektor von einem deutlich höheren Antikörper-Überschuss als bei SEP auszugehen ist. Um die potentielle Rolle von endogenem SEP besser beurteilen zu können, müssten in weiteren Experimenten eine Dosis-Wirkungsbeziehung der Überstände ermittelt und weitere q-PCR-Analysen durchgeführt werden. Dabei sollte die endogene SEP Expression der HUVECs auch nach der Zugabe der verschiedenen Überstände kontrolliert werden. Hierdurch könnten Rückschlüsse erhalten werden, ob es beispielsweise durch die Zugabe von SEP-Überständen zu einer Induktion von endogenen SEP kommt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden drei weitere SEP spezifische Antikörper in Ratten (Eurogentec) und außerdem fünfzehn Fabs in Kaninchen (Morphosys) erzeugt. Die Testungen erfolgten durch Frau Dr. Irene Boche (Xantos Biomedicine AG) und führten ebenfalls zu keiner inhibitorischen Wirkung aktiver SEP-Überstände.
Schließlich wurde in einem **dritten Ansatz** versucht, die proliferative Aktivität der SEP-Überstände durch verschiedene synthetische SEP-Peptide (Metabion) zu inhibieren. Die Peptide umfassten kurze Sequenzausschnitte des SEP-Proteins und waren zwischen 6 und 20 Aminosäuren lang. Bei den ausgewählten Peptidsequenzen handelte es sich um vier repetitive Sequenzabschnitte, die inmitten von SEP liegen und eine hohe Konservierung gegenüber dem murinen Homolog aufweisen. Konservierte Sequenzbereiche oder Domänen können ein Hinweis auf eine wichtige funktionelle Bedeutung sein. Ausgehend von der Annahme, dass SEP ein löslicher Faktor ist, ist es daher möglich, dass diesen Regionen eine Bedeutung bei der Bindung eines Rezeptors zukommt. Ein entsprechendes Peptid würde hierbei ebenfalls an den zugehörigen Rezeptor binden, im Gegensatz zu dem vollständigen Protein aber keine Aktivierung des Rezeptors herbeiführen. Die Zugabe der Peptide zeigte jedoch keinen signifikanten,

spezifischen Hemmeffekt auf die SEP vermittelte Stimulation der HUVECs (vgl. 5.4.4.2). Wie zuvor bei den Antikörper-Hemmversuchen trat die Inhibierung der HUVEC-Stimulation unabhängig von dem transferierten Überstand auf. Auch hier könnte eine mögliche Erklärung das Vorkommen von endogenem SEP-Protein sein.
Insgesamt lieferten weder die rekombinant produzierten Proteine von SEP noch die verschiedenen Inhibitionsansätze einen Hinweis dafür, dass die Stimulation der HUVECs direkt von SEP vermittelt wird. Hierzu hätten vor allem durch die Abreicherung spezifische Auswirkungen auf die Stimulation erhalten werden müssen. Vielmehr gelang bei einigen Versuchen die Trennung der Aktivität und Anwesenheit von SEP, was ebenfalls darauf hin deutet, dass die Stimulation der HUVECs unabhängig von der Anwesenheit von SEP erfolgt und somit von anderen Proteinen bewirkt werden muss.

6.3.6 Alternative Wirkmechanismen der SEP vermittelten Aktivität

Die vorherigen Analysen ergaben unterschiedliche Hinweise auf einen potentiellen Wirkungsmechanismus von SEP. Beispielsweise ist die geringe spezifische Aktivität von SEP1-510 ein Indiz dafür, dass dieses Konstrukt nicht eine natürlich vorkommende, löslich aktive Form von SEP ist. Die gefundene Restaktivität könnte sich durch ein nur geringes Abweichen von einer vorkommenden löslichen Form von SEP erklären lassen. Dies könnte Einfluss auf die Proteinfaltung und -struktur haben, wodurch nur noch schwache Bindungen mit einem Rezeptor eingegangen werden können. Für den Fall, dass SEP seine Funktion membrangebunden vermittelt, wären gestörte Bindungseigenschaften mit einem potentiellen Ko-Faktor eine denkbare Erklärung für die geringere spezifische Aktivität von SEP1-510.
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nicht endgültig beantwortet werden, ob die Aktivität von einer löslichen oder membrangebundenen Form von SEP ausgeht. Weiter ist unklar, ob SEP eine direkte Wirkung auf HUVECs besitzt oder indirekt durch die Induktion anderer pro-angiogener Faktoren die HUVEC-Stimulation bewirkt.

6.3.6.1 Induktion verschiedener pro-angiogener sezernierter Faktoren

Um zu prüfen, ob die Expression von SEP in HEK 293-Zellen zur Induktion von pro-angiogenen sezernierten Faktoren führt, wurden zwei verschiedene Prinzipien verfolgt.
Erstens wurde mittels ELISA-Analysen Überstände von SEP exprimierenden Zellen gezielt auf die Anwesenheit bekannter endothelialer Wachstumsfaktoren untersucht.
Zweitens wurden nach der Expression von SEP durch CHIP-Analysen Genexpressionsmuster von HEK 293-Zellen erstellt. Überdies wurden von den identifizierten pro-angiogenen Genen einzelne ausgewählt und deren Hochregulation durch qPCR bestätigt.

Die Analyseergebnisse belegen, dass es durch die Expression von SEP, nicht zur Induktion der pro-angiogenen Faktoren bFGF (Abraham et al., 1986) und Erythropoietin (Ribatti et al., 2003b) kommt. Dies galt sowohl auf Protein- (durch ELISA) als auch auf Genexpressionsebene (CHIP-Analysen). Etwas unklarer ist die Situation für VEGF. Hierbei lieferten ELISA-Analysen teilweise Belege für die Anwesenheit von VEGF, die jedoch weder durch CHIP-, noch durch qPCR-Analysen bestätigt wurden. In einigen ELISAs konnten in SEP-Überständen vergleichbare Mengen VEGF nachgewiesen werden, wie sie auch nach der Expression einer VEGF-cDNA erhalten werden. Bei der Etablierung des Screen-Protokolls wurde zuvor gezeigt, dass die erhaltenen VEGF-Konzentrationen ausreichen, um reproduzierbar HUVECs zu stimulieren. Ob und in welchem Maße VEGF in den SEP-Überständen für die Stimulation der HUVECs verantwortlich ist, kann durch die Experimente nicht beurteilt werden. Ein möglicher Ansatz wäre hierbei eine gezielte Abreicherung von VEGF aus den SEP-Überständen. Anschließend kann dann durch einen Proliferationsversuch getestet werden, ob und in welchem Umfang die proliferative Aktivität durch die Entfernung von VEGF abnimmt. Nach dem derzeitigen Wissensstand wäre es sowohl denkbar, dass SEP unabhängig von VEGF wirkt, aber auch dass VEGF alleine für den Phänotyp auf HUVECs verantwortlich ist oder diesen im Zusammenspiel mit SEP bewirkt. In anbetracht der angiogenen Potenz von VEGF, dürfte der Anwesenheit von SEP insgesamt nur eine untergeordnete Rolle zukommen.

Weiterführende Hinweise zum Zusammenhang zwischen der VEGF- und SEP-Expression wurden sowohl durch interne als auch externe Analysen erhalten. Hierbei konnte in einem internen Kobaltchlorid-Hypoxia-Modell mittels qPCR-Analysen gezeigt werden, dass unter hypoxischen Bedingungen eine Ko-Expression von SEP und VEGF stattfindet (Angelika Waldschmidt und Dr. Christian Korherr). Solche physiologischen Zustände werden häufig auch in Tumorgeweben gefunden (Coleman et al., 2002). Weitere externe qPCR-Analysen (Cytomics) haben zudem gezeigt, dass SEP in einem hohen Prozentsatz in soliden Tumoren hochreguliert ist. Der Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF und dem Vaskularisierungsgrad bzw. dem Übergang von hyperplastischem zu neoplastischem Tumorwachstum, ist bereits seit Jahren bekannt (Folkman, 1971). Diese Daten sprechen für eine mögliche Bedeutung von SEP bei der Tumorangiogenese. Die Hochregulation unter hypoxischen Bedingungen lässt sich durch ein im Promotorbereich von SEP befindliches HIF-1 response element erklären. Über HIF-1 α wird unter anderen auch die Expression von VEGF unter hypoxischen Bedingungen induziert (Josko and Mazurek, 2004). Dies ist wiederum ein Beleg für eine Ko-Regulation von SEP und VEGF. Interessanterweise wird unter physiologischen Bedingungen zwar häufig eine Ko-Expression von VEGF und SEP gefunden, die relativen

Expressionsniveaus können sich dabei allerdings signifikant unterscheiden. Beispielsweise werden sowohl SEP als auch VEGF in der Plazenta und dem Uterus exprimiert. In der Plazenta wird SEP jedoch im Vergleich zu VEGF vergleichsweise stark exprimiert, im Uterus ist es entgegengesetzt. Beide Proteine besitzen sozusagen eine definierte Spezifität und könnten sich daher Aufgaben bei der Bildung von Blutgefäßen teilen. Die Konsequenz ist beispielsweise, dass beide Faktoren bei der Vaskulogenese während der Schwangerschaft benötigt werden.

Weiterhin konnte durch histologische Färbungen verschiedener Tumor-Zellen gezeigt werden, dass die Expression von SEP im Vergleich zu VEGF auf Tumor-Zellen beschränkt ist. VEGF kann dagegen auch in den umliegenden Stroma-Zellen nachgewiesen werden. Diese Tatsache stellt bei der Anti-VEGF-Therapie von Tumoren ein Problem dar, da durch die Inhibierung von VEGF nicht nur Tumorzellen, sondern auch gesunde Zellen betroffen werden (Tse et al., 2004). Die Suche nach bisher unbekannten angiogenen Faktoren und die Identifizierung von SEP gewinnen aus diesem Grund zusätzlich an Bedeutung, um eine höhere Spezifität bei der Behandlung von Tumoren erreichen zu können. Überdies konnte bisher noch nicht ausreichend geklärt werden, ob SEP und VEGF nur ko-reguliert sind oder ob SEP VEGF direkt induzieren kann. Sollte letzteres der Fall sein könnte durch eine gezielte Inhibierung von SEP gleichzeitig auch eine Hemmung von VEGF auf diese Weise erreicht werden. Wie effizient diese Hemmung ausfallen dürfte, muss durch weitere Experimente gezeigt werden. Überdies wäre auch eine Kombinationstherapie durch Inhibierung von VEGF und SEP denkbar. Neben einer Anti-SEP-Therapie könnte die gefundene, auf Tumorzellen beschränkte spezifische Expression von SEP, auch als eine Art Tumorzellenmarker dienen. Nach Klärung des genauen Wirkungsmechanismus von SEP würde sich dadurch eine Reihe weiterer Strategien für eine gezielte Zerstörung von Tumorzellen ergeben.

Neben einem direkten Effekt von SEP auf HUVECs, wäre es auch denkbar, dass die Bildung aktiver Überstände bzw. die Induktion von pro-angiogenen Faktoren über einen SEP unabhängigen Mechanismus erfolgt. Beispielsweise könnte die Überexpression von SEP eine Überladung des ERs bewirken, wodurch eine regelgerechte Weiterverarbeitung undurchführbar wird. Dadurch kann es zu einer ER Stressreaktion kommen, in Folge dessen u.a. Gene wie NF-κ B (Pahl and Baeuerle, 1997), p38 MAP- und c-Jun-Kinase (Yamamoto et al., 2003) aktiviert werden. Daraus resultiert wiederum die Induktion verschiedener protektiver und

proliferativer Gene, die dann die HUVEC-Stimulation erklären könnten (Yamamoto et al., 2003).
Nach der Expression der SEP-cDNA in HEK 293-Zellen kommt es nachweislich zur Induktion von NF-κB (Matsuda et al., 2003). Weitere Daten belegen, dass die Aktivierung von NF-κB allein nicht ausreichend sein kann, um die HUVEC-Stimulation zu erklären. Grund hierfür ist die Tatsache, dass für eine Vielzahl von Genen eine NF-κB Aktivierung nachgewiesen werden konnte, diese Gene aber nicht im Angiogenese-Screen gefunden wurden. Hierzu zählen u.a. die Adapterproteine TRAF und FADD sowie Filamin und Caspase 8 (Matsuda et al., 2003). Ein weiteres Beispiel ist TNF-α. Dieses Gen diente bei einem NF-κB-Reportergen-Assay als Positivkontrolle. Die erhaltenen Überstände führten dagegen nachweislich nicht zur Stimulation von HUVECs. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Aktivierung von NF-κB als Folge einer durch SEP vermittelten Aktivierung proliferativer Gene auftritt. So belegen die CHIP-Daten, dass es in den HEK 293-Zellen durch die Überexpression von SEP zu einer Hochregulation von IL-8 kommt. IL-8 wiederum kann unter anderen durch NF-κB aktiviert werden. Weitere Daten beweisen auch, dass die Expression von IL-8, vergleichbar zu TNF-α, eine Aktivierung von NF-κB bewirkt (Manna and Ramesh, 2005).

Neben VEGF konnten zwei weitere bekannte und lösliche pro-angiogene Faktoren durch CHIP-Analysen identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die immunregulatorischen Zytokine IL-8 (Koch et al., 1992) und RANTES (Schall et al., 1988). Die Expression beider Faktoren konnte durch interne qPCR-Analysen bestätigt werden (Christine Rottenberger und Dr. Christian Korherr). Dabei zeigte sich stets eine Korrelation zu der Stimulation von HUVECs. Um zu überprüfen, ob unter den Assay-Bedingungen eine Stimulation der HUVECs durch einen der beiden Faktoren alleine erhalten wird, wurden die cDNAs von IL-8 und RANTES ebenfalls in HEK 293-Zellen exprimiert und die Überstände auf HUVECs transferiert. Hierdurch konnte jedoch keine Stimulation der HUVECs erzielt werden. Möglicherweise liegt der Grund darin, dass die Überstände von IL-8 und RANTES einzeln getestet wurden, im Überstand von SEP dagegen beide Faktoren gleichzeitig vorliegen. Da bei immunmodulatorischen Prozessen in der Regel eine Reihe weiterer Faktoren vorliegen, ist hierbei denkbar, dass beide Faktoren jeweils andere Proteine für eine Wirkung auf HUVECs benötigen. Betreffend IL-8 ist beispielsweise bekannt, dass HUVECs nur in sehr geringen Mengen IL-8-Rezeptoren exprimieren, was die ausbleibende Stimulation erklären würde. Die Expression der IL-8-Rezeptoren kann sowohl durch bFGF als auch durch VEGF hochreguliert werden (Salcedo et al., 1999), was dann wiederum den Effekt der SEP-Überstände erklären

würde, da in diesen VEGF vorkommt. Folglich ist es nicht auszuschließen, dass IL-8 in SEP-Überständen eine Funktion bei der Stimulation der HUVECs zukommt.
Nach den vorliegenden Ergebnissen bleibt offen, ob SEP als lösliches Protein direkt auf die HUVECs wirkt oder ob seine Wirkung indirekt durch die Induktion pro-angiogener Faktoren vermittelt wird. Aufgrund der gefundenen Induktion von VEGF, IL-8 und RANTES, ist es unwahrscheinlich, dass SEP seine Wirkung alleine ausübt. Die Vielzahl dieser pro-angiogenen Faktoren in den Überständen von SEP lässt daher eine synergistische Wirkung dieser untereinander oder zusammen mit SEP vermuten. Die Anwesenheit bekannter pro-angiogener Faktoren in den SEP-Überständen könnte aber auch bedeuten, dass die Aktivität der SEP-Überstände völlig unabhängig von einer Sekretion von SEP ist. Daher wäre es auch möglich, dass die Wirkung von SEP rein durch eine intrazelluläre Induktion der genannten pro-angiogenen Faktoren vermittelt wird. Hierfür spricht u.a. die Tatsache, dass es nicht gelungen ist, aktives SEP-Protein rekombinant herzustellen. Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit die Wirkungsweise nicht geklärt werden konnte, bleibt SEP ein interessanter Kandidat für weitere Analysen.

6.3.7 Physiologische Rolle von SEP

EST-Expressionsdaten zu Folge wird SEP in 9 von 24 Normalgeweben (ca. 38 %) und in 9 von 11 (ca. 82 %) Tumorgeweben exprimiert. Auch wenn hierbei wegen der großen Unterschiede bei der Stichprobenzahl keine quantitativen Aussagen getroffen werden können, zeichnet sich dennoch ab, dass SEP seltener in Normalgeweben als in Tumorgeweben exprimiert wird (vgl. 5.4.1.8). Dies deutet daraufhin, dass SEP eine wichtige Bedeutung bei der Tumorangiogenese zukommt. Angiogenese kommt in Normalgeweben nur auf wenige physiologische Situationen beschränkt vor, wohingegen in Tumoren eine deutliche Zunahme der Blutgefäßbildung beobachtet werden kann. Dies könnte die Hochregulation von SEP in Tumoren erklären. Die erhöhten Expressionsraten von SEP in anderen Normalgeweben könnten dadurch begründet sein, dass SEP wie auch VEGF, nicht nur bei Bildung neuer Blutgefäße eine Bedeutung zukommt, sondern auch bei der Erhaltung. Beispielsweise ist bekannt, dass VEGF in Abhängigkeit von der vorliegenden Faktorkonzentration unterschiedliche Wirkungen auf Endothelzellen ausübt. In geringen Mengen dient VEGF als Überlebensfaktor und verhindert u.a. die Apoptose (Gerber et al., 1998). Eine gleichartige Funktion wäre durchaus auch für SEP denkbar. Ob SEP als Proliferations- oder Überlebensfaktor für Endothelzellen dient, konnte anhand der Proliferationsversuche nicht beurteilt werden. Die Bestimmung der Zellzahlen am Ende des Assay erfolgte ohne Berücksichtigung der ausgesäten Zellzahlen. Eine

Möglichkeit zur Überprüfung, ob die Stimulation der HUVECs durch SEP die Folge eines gesteigerten Zell-Überlebens oder einer Proliferation ist, könnte beispielsweise durch einen Zellteilungsnachweis erfolgen. Bekannte Methoden hierzu wären u.a. der Thymidine-Incorporation-Assay oder der Brom-Iodid-Assay. Da bisher kein sauberes rekombinantes aktives SEP-Protein erhalten werden konnte, hätten diese Tests mit Überständen erfolgen müssen. Dies hätte jedoch die Zuordnung des Befundes für SEP aufgrund der Anwesenheit verschiedener pro-angiogener Faktoren in den Überständen unmöglich gemacht.

Weitere Hinweise auf eine mögliche Bedeutung von SEP bei der Angiogenese ergaben sich aus der Suche nach homologen Proteinen zu SEP (vgl. 5.4.1.1). Bei einer Reihe von Säugetieren konnten homologe Proteine zu SEP gefunden werden. Mit einem Homolog im Schimpansen wurde im November 2004 eine Proteinsequenz identifiziert, der zwar N- und C-terminale Sequenzen von hSEP fehlen, ansonsten aber zu 99 % mit hSEP übereinstimmen (XM_525410). Grund für die Deletionen sind aufgrund der zugehörigen DNA-Sequenzen wahrscheinlich unvollständige Sequenzierergebnisse. Zuletzt wurde im Mai 2005 ein Homolog im Hund (XP_542912) gefunden.

6.3.8 Aussichten für weitere Versuche

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer pro-angiogener Faktoren, die unter den Screen-Bedingungen durch die Stimulation von HUVECs identifiziert werden sollten. Durch den Screen wurden insgesamt 13 verschiedene Gene identifiziert, von denen 9 bisher nicht in Zusammenhang mit Angiogenese gebracht wurden. Aufgrund verschiedener Umstände stellte sich das Gen von SEP als interessantester Kandidat für eine Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit dar. Dennoch ergaben auch die 8 weiteren Gene verschiedene Ansatzpunkte, die weitere Analysen folgen lassen. Die Strategien sind hierbei recht unterschiedlich, da es sich zum einen um zytosolisch lokalisierte Proteine handelt und zum anderen um bislang völlig unbekannte Gene. Bei den zytosolisch lokalisierten Genen besteht das Hauptziel in der Klärung der Frage, durch welche löslichen Faktoren die Stimulation der HUVECs erfolgt. Dabei können vergleichbar zu SEP verschiedene Expressions-Analysen sowohl auf Protein- als auch auf Gen-Ebene vorgenommen werden. Des Weiteren besteht bei Genen, deren Funktionen bereits beschrieben wurden, die Möglichkeit, die Wirkungsmechanismen aufzuklären und zudem einen Zusammenhang mit Krankheiten zu suchen, bei denen eine aberrante Angiogenese eine Rolle spielt.

Bezüglich SEP sind nach Abschluss der experimentellen Arbeiten eine Reihe von Fragen offen geblieben. So konnte beispielsweise durch keines der verwendeten Expressions-Systeme

sauberes und gleichzeitig aktives rekombinantes Protein hergestellt werden. Die geringe spezifische Aktivität von SEP1-510 lässt in diesem Zusammenhang darauf schließen, dass es sich hierbei nicht um ein natürlich vorkommendes Fragment von SEP handelt. Daher wäre die Erzeugung weiterer Fragmente ein denkbarer Ansatz, um ein aktiveres lösliches Fragment von SEP zu erzeugen. Sollte dies gelingen, wäre eine weitere Vorgehensweise u.a. die gezielte Generierung spezifischer Antikörper, um das aktive SEP-Fragment hemmen zu können. Überdies könnten erneute Fraktionierungen von SEP aus HEK 293-Überständen weitere Aufschlüsse bringen. Die Anionen-Austauschchromatographie (vgl. 5.4.5.1) lieferte mit der Fraktion 25 eine Probe, die aus aktiven SEP-Überständen erhalten wurde. Es gelang somit eine Fraktion zu isolieren, die relativ sauber und zudem aktiv ist. Es würde sich daher auf jeden Fall lohnen eine weitere Analyse von der Fraktion 25 entsprechenden Fraktionen vorzunehmen. Dabei sollte geklärt werden, welche Proteine hierin tatsächlich enthalten sind. Denkbare Ansätze wären die Durchführung einer massenspektrometrischen Untersuchung sowie weitere Proteinnachweisverfahren bekannter pro-angiogener Faktoren. Geht man von einem intrazellulären Wirkungsmechanismus bei SEP aus, kommen verschiedene SEP-Knock-out-Strategien in Betracht.

7 Literaturübersicht

Abraham,J.A., Whang,J.L., Tumolo,A., Mergia,A., Friedman,J., Gospodarowicz,D., and Fiddes,J.C. (1986). Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. EMBO J *5 (10)*, 2523-2528.

Ahmed,S.A., Gogal,R.M., Jr., and Walsh,J.E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. J Immunol. Methods *170 (2)*, 211-224.

Aird,W.C., Edelberg,J.M., Weiler-Guettler,H., Simmons,W.W., Smith,T.W., and Rosenberg,R.D. (1997). Vascular bed-specific expression of an endothelial cell gene is programmed by the tissue microenvironment. J Cell Biol *138 (5)*, 1117-1124.

Alani,R.M., Silverthorn,C.F., and Orosz,K. (2004). Tumor angiogenesis in mice and men. Cancer Biol Ther. *3 (6)*, 498-500.

Alessandro,R., Masiero,L., Liotta,L.A., and Kohn,E.C. (1996). The role of calcium in the regulation of invasion and angiogenesis. In Vivo *10 (2)*, 153-160.

Altschul,S.F., Madden,T.L., Schaffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W., and Lipman,D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res *25 (17)*, 3389-3402.

Arakawa,T., Li,T., and Narhi,L.O. (2002). Recombinant production of native proteins from Escherichia coli. Pharm. Biotechnol. *13*, 27-60.

Arbiser,J.L., Moses,M.A., Fernandez,C.A., Ghiso,N., Cao,Y., Klauber,N., Frank,D., Brownlee,M., Flynn,E., Parangi,S., Byers,H.R., and Folkman,J. (1997). Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *94 (3)*, 861-866.

Asahara,T., Masuda,H., Takahashi,T., Kalka,C., Pastore,C., Silver,M., Kearne,M., Magner,M., and Isner,J.M. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circ. Res *85 (3)*, 221-228.

Auerbach,R., Akhtar,N., Lewis,R.L., and Shinners,B.L. (2000). Angiogenesis assays: problems and pitfalls. Cancer Metastasis Rev. *19 (1-2)*, 167-172.

Auerbach,R., Lewis,R., Shinners,B., Kubai,L., and Akhtar,N. (2003). Angiogenesis assays: a critical overview. Clin Chem *49 (1)*, 32-40.

Azizkhan,R.G., Azizkhan,J.C., Zetter,B.R., and Folkman,J. (1980). Mast cell heparin stimulates migration of capillary endothelial cells in vitro. J Exp Med. *152 (4)*, 931-944.

Bach,F.H., Ferran,C., Hechenleitner,P., Mark,W., Koyamada,N., Miyatake,T., Winkler,H., Badrichani,A., Candinas,D., and Hancock,W.W. (1997). Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. Nat. Med. *3 (2)*, 196-204.

Bagley,R.G., Walter-Yohrling,J., Cao,X., Weber,W., Simons,B., Cook,B.P., Chartrand,S.D., Wang,C., Madden,S.L., and Teicher,B.A. (2003). Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells. Cancer Res *63 (18)*, 5866-5873.

Bairoch,A., Bucher,P., and Hofmann,K. (1997). The PROSITE database, its status in 1997. Nucleic Acids Res *25 (1)*, 217-221.

Barleon,B., Sozzani,S., Zhou,D., Weich,H.A., Mantovani,A., and Marme,D. (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. Blood *87 (8)*, 3336-3343.

Baumgartner,I. and Isner,J.M. (1998). Stimulation of peripheral angiogenesis by vascular endothelial growth factor (VEGF). Vasa *27 (4)*, 201-206.

Bendig,M.M. (1988). The production of foreign proteins in mammalian cells. Genet. Eng *(7)*, 91-127.

Benezra,R., Rafii,S., and Lyden,D. (2001). The Id proteins and angiogenesis. Oncogene *20 (58)*, 8334-8341.

Bergers,G. and Benjamin,L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat. Rev. Cancer *3 (6)*, 401-410.

Bjellqvist,B., Hughes,G.J., Pasquali,C., Paquet,N., Ravier,F., Sanchez,J.C., Frutiger,S., and Hochstrasser,D. (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. Electrophoresis *14 (10)*, 1023-1031.

Bochner,B.H., Cote,R.J., Weidner,N., Groshen,S., Chen,S.C., Skinner,D.G., and Nichols,P.W. (1995). Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. J Natl. Cancer Inst. *87 (21)*, 1603-1612.

Boehm,T., Folkman,J., Browder,T., and O'Reilly,M.S. (1997). Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. Nature *390*, 404-407.

Bonaldo,M.F., Lennon,G., and Soares,M.B. (1996). Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. Genome Res *6 (9)*, 791-806.

Borsum,T., Hagen,I., Henriksen,T., and Carlander,B. (1982). Alterations in the protein composition and surface structure of human endothelial cells during growth in primary culture. Atherosclerosis *44 (3)* , 367-378.

Brasier,A.R. and Ron,D. (1992). Luciferase reporter gene assay in mammalian cells. Methods Enzymol. *216*, 386-397.

Cao,Y. (2001). Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. Int J Biochem Cell Biol *33 (4)*, 357-369.

Cao,Y. (2004). Antiangiogenic cancer therapy. Semin. Cancer Biol *14 (2)*, 139-145.

Carley,W.W., Niedbala,M.J., and Gerritsen,M.E. (1992). Isolation, cultivation, and partial characterization of microvascular endothelium derived from human lung. Am. J Respir Cell Mol Biol *7 (6)*, 620-630.

Carmeliet,P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat. Med. *6 (4)*, 389-395.

Carmeliet,P. (2004). Manipulating angiogenesis in medicine. J Intern. Med. *255 (5)*, 538-561.

Carpenter,G. and Cohen,S. (1976). Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblasts. J Cell Physiol *88 (2)*, 227-237.

Chalfie,M., Tu,Y., Euskirchen,G., Ward,W.W., and Prasher,D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science *263 (5148)*, 802-805.

Chavakis,E. and Dimmeler,S. (2002). Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol *22 (6)*, 887-893.

Cines,D.B., Pollak,E.S., Buck,C.A., Loscalzo,J., Zimmerman,G.A., McEver,R.P., Pober,J.S., Wick,T.M., Konkle,B.A., Schwartz,B.S., Barnathan,E.S., McCrae,K.R., Hug,B.A., Schmidt,A.M., and Stern,D.M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood *91*, 3527-3561.

Claesson-Welsh,L., Welsh,M., Ito,N., Anand-Apte,B., Soker,S., Zetter,B., O'Reilly,M., and Folkman,J. (1998). Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *95*, 5579-5583.

Clark,H.F., Gurney,A.L., Abaya,E., Baker,K., Baldwin,D., Brush,J., Chen,J., Chow,B., Chui,C., Crowley,C., Currell,B., Deuel,B., Dowd,P., Eaton,D., Foster,J., Grimaldi,C., Gu,Q., Hass,P.E., Heldens,S., Huang,A., Kim,H.S., Klimowski,L., Jin,Y., Johnson,S., Lee,J., Lewis,L., Liao,D., Mark,M., Robbie,E., Sanchez,C., Schoenfeld,J., Seshagiri,S., Simmons,L., Singh,J., Smith,V., Stinson,J., Vagts,A., Vandlen,R., Watanabe,C., Wieand,D., Woods,K., Xie,M.H., Yansura,D., Yi,S., Yu,G., Yuan,J., Zhang,M., Zhang,Z., Goddard,A., Wood,W.I., Godowski,P., and Gray,A. (2003). The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment. Genome Res *13 (10)*, 2265-2270.

Coleman,C.N., Mitchell,J.B., and Camphausen,K. (2002). Tumor hypoxia: chicken, egg, or a piece of the farm? J Clin Oncol. *20 (3)*, 610-615.

Coloma,M.J., Hastings,A., Wims,L.A., and Morrison,S.L. (1992). Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction. J Immunol. Methods *152 (1)*, 89-104.

Combet,C., Blanchet,C., Geourjon,C., and Deleage,G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. Trends Biochem Sci. *25 (3)*, 147-150.

Cummings,L., Riley,L., Black,L., Souvorov,A., Resenchuk,S., Dondoshansky,I., and Tatusova,T. (2002). Genomic BLAST: custom-defined virtual databases for complete and unfinished genomes. FEMS Microbiol. Lett. *216 (2)*, 133-138.

Dalbey,R.E. and Von Heijne,G. (1992). Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes--a new protease family. Trends Biochem Sci. *17 (11)*, 474-478.

Denekamp,J. (1986). Cell kinetics and radiation biology. Int J Radiat. Biol Relat Stud. Phys Chem Med. *49 (2)*, 357-380.

Denekamp,J. (1993). Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. Br J Radiol. *66 (783)*, 181-196.

Dietzfelbinger,H. (2001). Thalidomid und andere Therapieansätze. Manual Multiple Myelom 126-132.

Distler,J.H., Hirth,A., Kurowska-Stolarska,M., Gay,R.E., Gay,S., and Distler,O. (2003). Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. Q. J Nucl. Med. *47 (3)*, 149-161.

Dixelius,J., Larsson,H., Sasaki,T., Holmqvist,K., Lu,L., Engstrom,A., Timpl,R., Welsh,M., and Claesson-Welsh,L. (2000). Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. Blood *95 (11)*, 3403-3411.

Djonov,V., Andres,A.C., and Ziemiecki,A. (2001). Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. Microsc. Res Tech. *52 (2)*, 182-189.

Eliceiri,B.P. (2001). Integrin and growth factor receptor crosstalk. Circ. Res *89 (12)*, 1104-1110.

Ellgaard,L. and Helenius,A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. Nat. Rev. Mol Cell Biol *4 (3)*, 181-191.

Engelman,D.M., Steitz,T.A., and Goldman,A. (1986). Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. Annu. Rev. Biophys Biophys Chem *15*, 321-353.

Engelmann,M.G. and Nikol,S. (2000). [Therapeutic neoangiogenesis of peripheral arteries] Therapeutische Neoangiogenese peripherer Arterien. Herz *25 (6)*, 600-610.

Fanslow,W.C., Clifford,K., VandenBos,T., Teel,A., Armitage,R.J., and Beckmann,M.P. (1990). A soluble form of the interleukin 4 receptor in biological fluids. Cytokine *2 (6)*, 398-401.

Fassbender,K., Kaptur,S., Becker,P., Groschl,J., and Hennerici,M. (1998). Adhesion molecules in tissue injury: kinetics of expression and shedding and association with cytokine release in humans. Clin Immunol. Immunopathol. *89 (1)*, 54-60.

Ferrara,N., Hillan,K.J., Gerber,H.P., and Novotny,W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. Nat. Rev. Drug Discov. *3 (5)*, 391-400.

Ferris,F.L., III (2004). A new treatment for ocular neovascularization. N. Engl. J Med. *351 (27)*, 2863-2865.

Figg,W.D., Kruger,E.A., Price,D.K., Kim,S., and Dahut,W.D. (2002). Inhibition of angiogenesis: treatment options for patients with metastatic prostate cancer. Invest New Drugs *20 (2)*, 183-194.

Fishman,A.P. (1982). Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. Ann. N. Y. Acad. Sci. *401*, 1-8.

Flamme,I., Breier,G., and Risau,W. (1995). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. Dev Biol *169 (2)*, 699-712.

Folkman,J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N. Engl. J Med. *285 (21)*, 1182-1186.

Folkman,J. (1974). Tumor angiogensis: role in regulation of tumor growth. Symp. Soc. Dev Biol *30 (0)*, 43-52.

Folkman,J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat. Med. *1 (1)*, 27-31.

Folkman,J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin. Oncol. *29 (6 Suppl 16)*, 15-18.

Folkman,J. and Ingber,D. (1992). Inhibition of angiogenesis. Semin. Cancer Biol *3 (2)*, 89-96.

Folkman,J., Klagsbrun,M., Sasse,J., Wadzinski,M., Ingber,D., and Vlodavsky,I. (1988). A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. Am. J Pathol. *130 (2)*, 393-400.

Fong,G.H., Rossant,J., Gertsenstein,M., and Breitman,M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. Nature *376 (6535)*, 66-70.

Gerber,H.P., McMurtrey,A., Kowalski,J., Yan,M., Keyt,B.A., Dixit,V., and Ferrara,N. (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. J Biol Chem *273 (46)*, 30336-30343.

Gluzman,Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. Cell *23*, 175-182.

Goldstein,G.W., Betz,A.L., Bowman,P.D., and Dorovini-Zis,K. (1986). In vitro studies of the blood-brain barrier using isolated brain capillaries and cultured endothelial cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. *481*, 202-213.

Gospodarowicz,D., Abraham,J.A., and Schilling,J. (1989). Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *86 (19)*, 7311-7315.

Gragoudas,E.S., Adamis,A.P., Cunningham,E.T., Jr., Feinsod,M., and Guyer,D.R. (2004). Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. N. Engl. J Med. *351 (27)*, 2805-2816.

Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C., and Nairn,R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen. Virol. *36 (1)*, 59-74.

Granato,A.M., Nanni,O., Falcini,F., Folli,S., Mosconi,G., De Paola,F., Medri,L., Amadori,D., and Volpi,A. (2004). Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients and healthy women: useful as diagnostic tools? Breast Cancer Res *6 (1)*, R38-R45.

Grant,S.G., Jessee,J., Bloom,F.R., and Hanahan,D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *87 (12)*, 4645-4649.

Griendling,K.K. and Alexander,R.W. (1996). Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. FASEB J *10 (2)* , 283-292.

Griffioen,A.W. and Molema,G. (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. Pharmacol. Rev. *52 (2)*, 237-268.

Grimm,S. and Kachel,V. (2002). Robotic high-throughput assay for isolating apoptosis-inducing genes. Biotechniques *32 (3)*, 670-677.

Gualandris,A. and Presta,M. (1995). Transcriptional and posttranscriptional regulation of urokinase-type plasminogen activator expression in endothelial cells by basic fibroblast growth factor. J Cell Physiol *162 (3)*, 400-409.

Hamada,T., Ui-Tei,K., Imaki,J., and Miyata,Y. (2001). Molecular cloning of SCDGF-B, a novel growth factor homologous to SCDGF/PDGF-C/fallotein. Biochem Biophys Res Commun. *280 (3)*, 733-737.

Harousseau,J.L., Shaughnessy,J., Jr., and Richardson,P. (2004). Multiple myeloma. Hematology. (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.) 237-256.

Harry,L.E. and Paleolog,E.M. (2003). From the cradle to the clinic: VEGF in developmental, physiological, and pathological angiogenesis. Birth Defects Res C. Embryo. Today *69 (4)*, 363-374.

Helenius,A. and Aebi,M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. Science *291 (5512)*, 2364-2369.

Hidalgo,M. and Eckhardt,S.G. (2001). Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. J Natl. Cancer Inst. *93 (3)*, 178-193.

Hoekman,K. (2001). SU6668, a multitargeted angiogenesis inhibitor. Cancer J *7 (Suppl 3)*, 134-138.

Holmgren,L., O'Reilly,M.S., and Folkman,J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nat. Med. *1 (2)*, 149-153.

Hong,W. (1998). Protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. J Cell Sci. *111 (Pt 19)*, 2831-2839.

Hormia,M. and Virtanen,I. (1986). Endothelium--an organized monolayer of highly specialized cells. Med. Biol *64 (5)*, 247-266.

Houck,K.A., Leung,D.W., Rowland,A.M., Winer,J., and Ferrara,N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. J Biol Chem *267 (36)*, 26031-26037.

Hristov,M. and Weber,C. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. J Cell Mol Med. *8 (4)*, 498-508.

Hunt,T.K., Knighton,D.R., Thakral,K.K., Goodson,W.H., III, and Andrews,W.S. (1984). Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. Surgery *96 (1)*, 48-54.

Iruela-Arispe,M.L. and Dvorak,H.F. (1997). Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. Thromb. Haemost. *78 (1)*, 672-677.

Ishai-Michaeli,R., Eldor,A., and Vlodavsky,I. (1990). Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix. Cell Regul. *1 (11)*, 833-842.

Isner,J.M. and Rosenfield,K. (1993). Redefining the treatment of peripheral artery disease. Role of percutaneous revascularization. Circulation *88 (4 Pt 1)*, 1534-1557.

Jaffe,E.A., Nachman,R.L., Becker,C.G., and Minick,C.R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest *52 (11)*, 2745-2756.

Jagla,A. and Schrezenmeir,J. (2001). Postprandial triglycerides and endothelial function. Exp Clin Endocrinol. Diabetes *109 (4)*, S533-S547.

Jain,R.K. (1988). Determinants of tumor blood flow: a review. Cancer Res *48 (10)*, 2641-2658.

Jaye,M., Howk,R., Burgess,W., Ricca,G.A., Chiu,I.M., Ravera,M.W., O'Brien,S.J., Modi,W.S., Maciag,T., and Drohan,W.N. (1986). Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. Science *233 (4763)*, 541-545.

Jones,L., Ghaneh,P., Humphreys,M., and Neoptolemos,J.P. (1999). The matrix metalloproteinases and their inhibitors in the treatment of pancreatic cancer. Ann. N. Y. Acad. Sci. *880*, 288-307.

Josko,J. and Mazurek,M. (2004). Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. Med. Sci. Monit. *10 (4)*, RA89-RA98.

Journet,A.M., Saffaripour,S., Cramer,E.M., Tenza,D., and Wagner,D.D. (1993). von Willebrand factor storage requires intact prosequence cleavage site. Eur. J Cell Biol *60 (1)*, 31-41.

K.Hofmann & W.Stoffel (2004). TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. Biol. Chem. Hoppe-Seyler *374*, 166.

Kakizawa,H., Itoh,M., Itoh,Y., Imamura,S., Ishiwata,Y., Matsumoto,T., Yamamoto,K., Kato,T., Ono,Y., Nagata,M., Hayakawa,N., Suzuki,A., Goto,Y., and Oda,N. (2004). The relationship between glycemic control and plasma vascular endothelial growth factor and endothelin-1 concentration in diabetic patients. Metabolism *53 (5)*, 550-555.

Kasahara,Y., Tuder,R.M., Taraseviciene-Stewart,L., Le Cras,T.D., Abman,S., Hirth,P.K., Waltenberger,J., and Voelkel,N.F. (2000). Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. J Clin Invest *106 (11)*, 1311-1319.

Kawasaki,T., Kitsukawa,T., Bekku,Y., Matsuda,Y., Sanbo,M., Yagi,T., and Fujisawa,H. (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. Development *126 (21)*, 4895-4902.

Keil,B. (1992). Specificity of proteolysis. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York pp. 335.

Kerr,C. (2005). Bevacizumab and chemotherapy improves survival in NSCLC. Lancet Oncol. *6 (5)*, 266.

Kieran,M.W. and Billett,A. (2001). Antiangiogenesis therapy. Current and future agents. Hematol. Oncol. Clin North Am. *15 (5)*, 835-51, viii.

Klagsbrun,M. and Moses,M.A. (1999). Molecular angiogenesis. Chem Biol *6 (8)*, R217-R224.

Klee,C.B., Ren,H., and Wang,X. (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. J Biol Chem *273 (22)*, 13367-13370.

Koch,A.E., Polverini,P.J., Kunkel,S.L., Harlow,L.A., DiPietro,L.A., Elner,V.M., Elner,S.G., and Strieter,R.M. (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. Science *258 (5089)*, 1798-1801.

Kumar,S., West,D.C., and Ager,A. (1987). Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. Differentiation *36 (1)*, 57-70.

Lal,A., Lash,A.E., Altschul,S.F., Velculescu,V., Zhang,L., McLendon,R.E., Marra,M.A., Prange,C., Morin,P.J., Polyak,K., Papadopoulos,N., Vogelstein,B., Kinzler,K.W., Strausberg,R.L., and Riggins,G.J. (1999). A public database for gene expression in human cancers. Cancer Res *59 (21)*, 5403-5407.

Law,J.H. and Wells,M.A. (1989). Insects as biochemical models. J Biol Chem *264 (28)*, 16335-16338.

Lecomte,F.J., Ismail,N., and High,S. (2003). Making membrane proteins at the mammalian endoplasmic reticulum. Biochem Soc. Trans. *31 (Pt. 6)*, 1248-1252.

Letunic,I., Copley,R.R., Schmidt,S., Ciccarelli,F.D., Doerks,T., Schultz,J., Ponting,C.P., and Bork,P. (2004). SMART 4.0: towards genomic data integration. Nucleic Acids Res *32 Database issue*, D142-D144.

Leung,D.W., Cachianes,G., Kuang,W.J., Goeddel,D.V., and Ferrara,N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science *246 (4935)*, 1306-1309.

Lissbrant,I.F., Stattin,P., Damber,J.E., and Bergh,A. (1997). Vascular density is a predictor of cancer-specific survival in prostatic carcinoma. Prostate *33 (1)*, 38-45.

Losordo,D.W., Vale,P.R., and Isner,J.M. (1999). Gene therapy for myocardial angiogenesis. Am. Heart J *138 (2 pt 2)*, S132-S141.

Lupas,A., Van Dyke,M., and Stock,J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. Science *252 (5010)*, 1162-1164.

Lyden,D., Young,A.Z., Zagzag,D., Yan,W., Gerald,W., O'Reilly,R., Bader,B.L., Hynes,R.O., Zhuang,Y., Manova,K., and Benezra,R. (1999). Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. Nature *401 (6754)*, 670-677.

Machida,S., Saga,Y., Takei,Y., Mizuno,I., Takayama,T., Kohno,T., Konno,R., Ohwada,M., and Suzuki,M. (2005). Inhibition of peritoneal dissemination of ovarian cancer by tyrosine kinase receptor inhibitor SU6668 (TSU-68). Int J Cancer *114 (2)*, 224-229.

Madri,J.A., Pratt,B.M., and Tucker,A.M. (1988). Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. J Cell Biol *106 (4)*, 1375-1384.

Manna,S.K. and Ramesh,G.T. (2005). Interleukin-8 Induces Nuclear Transcription Factor-{kappa}B through a TRAF6-dependent Pathway. J Biol Chem *280 (8)*, 7010-7021.

Mantovani,A., Bussolino,F., and Dejana,E. (1992). Cytokine regulation of endothelial cell function. FASEB J *6 (8)*, 2591-2599.

Matsuda,A., Suzuki,Y., Honda,G., Muramatsu,S., Matsuzaki,O., Nagano,Y., Doi,T., Shimotohno,K., Harada,T., Nishida,E., Hayashi,H., and Sugano,S. (2003). Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. Oncogene *22 (21)* , 3307-3318.

Matsumoto,M., Nishinakagawa,H., Kurohmaru,M., Hayashi,Y., and Otsuka,J. (1992). Pregnancy and lactation affect the microvasculature of the mammary gland in mice. J Vet. Med. Sci. *54 (5)*, 937-943.

McDonald,D.M. and Foss,A.J. (2000). Endothelial cells of tumor vessels: abnormal but not absent. Cancer Metastasis Rev. *19 (1-2)*, 109-120.

Michiels,C. (2003). Endothelial cell functions. J Cell Physiol *196 (3)*, 430-443.

Midgley,R. and Kerr,D. (2005). Bevacizumab--current status and future directions. Ann. Oncol. *16 (7)*, 999-1004.

Miller,D.L., Ortega,S., Bashayan,O., Basch,R., and Basilico,C. (2000). Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. Mol Cell Biol *20 (6)*, 2260-2268.

Minami,T., Horiuchi,K., Miura,M., Abid,M.R., Takabe,W., Noguchi,N., Kohro,T., Ge,X., Aburatani,H., Hamakubo,T., Kodama,T., and Aird,W.C. (2004). Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. J Biol Chem *279 (48)*, 50537-50554.

Modlich,U., Kaup,F.J., and Augustin,H.G. (1996). Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion. Lab Invest *74 (4)*, 771-780.

Moir,D.T. and Mao,J.I. (1990). Protein secretion systems in microbial and mammalian cells. Bioprocess. Technol. *9*, 67-94.

Montesano,R., Pepper,M.S., Mohle-Steinlein,U., Risau,W., Wagner,E.F., and Orci,L. (1990). Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. Cell *62 (3)*, 435-445.

Mothes,W., Heinrich,S.U., Graf,R., Nilsson,I., Von Heijne,G., Brunner,J., and Rapoport,T.A. (1997). Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. Cell *89 (4)*, 523-533.

Mullis,K.B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. Ann. Biol Clin (Paris) *48 (8)*, 579-582.

Munoz-Chapuli,R., Quesada,A.R., and Angel,M.M. (2004). Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. Cell Mol Life Sci. *61 (17)*, 2224-2243.

Niida,S., Kaku,M., Amano,H., Yoshida,H., Kataoka,H., Nishikawa,S., Tanne,K., Maeda,N., Nishikawa,S., and Kodama,H. (1999). Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. J Exp Med. *190 (2)*, 293-298.

O'Reilly,M.S., Boehm,T., Shing,Y., Fukai,N., Vasios,G., Lane,W.S., Flynn,E., Birkhead,J.R., Olsen,B.R., and Folkman,J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell *88 (2)*, 277-285.

O'Reilly,M.S., Holmgren,L., Shing,Y., Chen,C., Rosenthal,R.A., Moses,M., Lane,W.S., Cao,Y., Sage,E.H., and Folkman,J. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell *79*, 315-328.

Ornitz,D.M. and Itoh,N. (2001). Fibroblast growth factors. Genome Biol *2 (3)*, reviews3005.1-3005.12.

Osada,H. and Kakeya,H. (2004). [Novel angiogenesis inhibitors for molecular target therapy of cancer]. Nippon Rinsho *62 (7)*, 1257-1263.

Paavonen,K., Mandelin,J., Partanen,T., Jussila,L., Li,T.F., Ristimaki,A., Alitalo,K., and Konttinen,Y.T. (2002). Vascular endothelial growth factors C and D and their VEGFR-2 and 3 receptors in blood and lymphatic vessels in healthy and arthritic synovium. J Rheumatol. *29 (1)*, 39-45.

Pahl,H.L. and Baeuerle,P.A. (1997). The ER-overload response: activation of NF-kappa B. Trends Biochem Sci. *22 (2)*, 63-67.

Palade,G.E., Simionescu,M., and Simionescu,N. (1979). Structural aspects of the permeability of the microvascular endothelium. Acta Physiol Scand. Suppl *463*, 11-32.

Paleolog,E.M. (2002). Angiogenesis in rheumatoid arthritis. Arthritis Res *4 (Suppl 3)*, 81-90.

Panda,A.K. (2003). Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of Escherichia coli. Adv. Biochem Eng Biotechnol. *85*, 43-93.

Park,J.E., Keller,G.A., and Ferrara,N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. Mol Biol Cell *4 (12)*, 1317-1326.

Parry,D.A. (1982). Coiled-coils in alpha-helix-containing proteins: analysis of the residue types within the heptad repeat and the use of these data in the prediction of coiled-coils in other proteins. Biosci. Rep. *2 (12)*, 1017-1024.

Patan,S. (2000). Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. J Neurooncol. *50 (1-2)*, 1-15.

Pepper,M.S. (1997a). Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol *17 (4)*, 605-619.

Pepper,M.S. (1997b). Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. Cytokine Growth Factor Rev. *8*, 21-43.

Plate,K.H. and Warnke,P.C. (1997). Vascular endothelial growth factor. J Neurooncol. *35 (3)*, 365-372.

Plemper,R.K. and Wolf,D.H. (1999). Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. Trends Biochem Sci. *24 (7)*, 266-270.

Pober,J.S. (1987). Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. Ciba Found. Symp. *131*, 170-184.

Puck,T.T. (1979). Studies on cell transformation. Somatic. Cell Genet. *5 (6)*, 973-990.

Rak,J.W., St Croix,B.D., and Kerbel,R.S. (1995). Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy. Anticancer Drugs *6 (1)*, 3-18.

Reddy,G.K. (2005). The addition of bevacizumab to FOLFOX4 prolongs survival in relapsed colorectal cancer: interim data from the ECOG 3200 trial. Clin Colorectal Cancer *4 (5)*, 300-301.

Ribatti,D., Nico,B., Vacca,A., Roncali,L., and Dammacco,F. (2002). Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. J Hematother. Stem Cell Res *11 (1)*, 81-90.

Ribatti,D., Vacca,A., Nico,B., Presta,M., and Roncali,L. (2003a). Angiogenesis: basic and clinical aspects. Ital. J Anat. Embryol. *108 (1)*, 1-24.

Ribatti,D., Vacca,A., Roccaro,A.M., Crivellato,E., and Presta,M. (2003b). Erythropoietin as an angiogenic factor. Eur. J Clin Invest *33 (10)*, 891-896.

Risau,W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. Nature *386 (6626)*, 671-674.

Robinson,C.J. and Stringer,S.E. (2001). The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. J Cell Sci. *114 (Pt. 5)*, 853-865.

Romani,d.W., Rondaij,M.G., and van Mourik,J.A. (2004). [Weibel-Palade bodies: unique secretory organelles within endothelial cells]
Weibel-Palade-lichaampjes: unieke secretieorganellen in endotheelcellen. Ned. Tijdschr. Geneeskd. *148 (32)*, 1572-1577.

Rosen,L. (2000). Antiangiogenic strategies and agents in clinical trials. Oncologist. *5 (Suppl 1)*, 20-27.

Rosengart,T.K., Lee,L.Y., Patel,S.R., Sanborn,T.A., Parikh,M., Bergman,G.W., Hachamovitch,R., Szulc,M., Kligfield,P.D., Okin,P.M., Hahn,R.T., Devereux,R.B., Post,M.R., Hackett,N.R., Foster,T., Grasso,T.M., Lesser,M.L., Isom,O.W., and Crystal,R.G. (1999). Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. Circulation *100 (5)*, 468-474.

Rosenkilde,M.M. and Schwartz,T.W. (2004). The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. APMIS *112 (7-8)*, 481-495.

Rotondaro,L., Mele,A., and Rovera,G. (1996). Efficiency of different viral promoters in directing gene expression in mammalian cells: effect of 3'-untranslated sequences. Gene *168 (2)*, 195-198.

Salcedo,R., Resau,J.H., Halverson,D., Hudson,E.A., Dambach,M., Powell,D., Wasserman,K., and Oppenheim,J.J. (2000). Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. FASEB J *14 (13)*, 2055-2064.

Salcedo,R., Wasserman,K., Young,H.A., Grimm,M.C., Howard,O.M., Anver,M.R., Kleinman,H.K., Murphy,W.J., and Oppenheim,J.J. (1999). Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. Am. J Pathol. *154 (4)*, 1125-1135.

Schall,T.J., Jongstra,J., Dyer,B.J., Jorgensen,J., Clayberger,C., Davis,M.M., and Krensky,A.M. (1988). A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. J Immunol. *141 (3)*, 1018-1025.

Scherer,W.F., Syverton,J.T., and Gey,G.O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. J Exp Med. *97 (5)*, 695-710.

Schmitt,A.O., Specht,T., Beckmann,G., Dahl,E., Pilarsky,C.P., Hinzmann,B., and Rosenthal,A. (1999). Exhaustive mining of EST libraries for genes differentially expressed in normal and tumour tissues. Nucleic Acids Res *27 (21)*, 4251-4260.

Schultz,J., Milpetz,F., Bork,P., and Ponting,C.P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *95 (11)*, 5857-5864.

Schweigerer,L. (1995). Antiangiogenesis as a novel therapeutic concept in pediatric oncology. J Mol Med. *73 (10)*, 497-508.

Seematter,G., Binnert,C., Martin,J.L., and Tappy,L. (2004). Relationship between stress, inflammation and metabolism. Curr. Opin. Clin Nutr. Metab Care *7 (2)*, 169-173.

Senger,D.R., Van de,W.L., Brown,L.F., Nagy,J.A., Yeo,K.T., Yeo,T.K., Berse,B., Jackman,R.W., Dvorak,A.M., and Dvorak,H.F. (1993). Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. Cancer Metastasis Rev. *12 (3-4)*, 303-324.

Shibuya,M. (1995). Role of VEGF-flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. Adv. Cancer Res *67*, 281-316.

Shing,Y., Folkman,J., Sullivan,R., Butterfield,C., Murray,J., and Klagsbrun,M. (1984). Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. Science *223 (4642)*, 1296-1299.

Shipley,G.D., Keeble,W.W., Hendrickson,J.E., Coffey,R.J., Jr., and Pittelkow,M.R. (1989). Growth of normal human keratinocytes and fibroblasts in serum-free medium is stimulated by acidic and basic fibroblast growth factor. J Cell Physiol *138 (3)*, 511-518.

Sleijfer,S., Kruit,W.H., and Stoter,G. (2004). Thalidomide in solid tumours: the resurrection of an old drug. Eur. J Cancer *40 (16)*, 2377-2382.

Soker,S., Takashima,S., Miao,H.Q., Neufeld,G., and Klagsbrun,M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. Cell *92 (6)*, 735-745.

Soule,H.D., Vazguez,J., Long,A., Albert,S., and Brennan,M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J Natl. Cancer Inst. *51 (5)*, 1409-1416.

Southern,J.A., Young,D.F., Heaney,F., Baumgartner,W.K., and Randall,R.E. (1991). Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. J Gen. Virol. *72 (Pt 7)*, 1551-1557.

Stack,M.S., Gately,S., Bafetti,L.M., Enghild,J.J., and Soff,G.A. (1999). Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. Biochem J *340 (Pt 1)*, 77-84.

Stein,I., Neeman,M., Shweiki,D., Itin,A., and Keshet,E. (1995). Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. Mol Cell Biol *15 (10)*, 5363-5368.

Stetler-Stevenson,W.G. (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. J Clin Invest *103 (9)*, 1237-1241.

Strausberg,R.L., Feingold,E.A., Klausner,R.D., and Collins,F.S. (1999). The mammalian gene collection. Science *286 (5439)*, 455-457.

Taipale,J. and Keski-Oja,J. (1997). Growth factors in the extracellular matrix. FASEB J *11 (1)*, 51-59.

Tarui,T., Majumdar,M., Miles,L.A., Ruf,W., and Takada,Y. (2002). Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin. J Biol Chem *277 (37)*, 33564-33570.

Teicher,B.A., Sotomayor,E.A., and Huang,Z.D. (1992). Antiangiogenic agents potentiate cytotoxic cancer therapies against primary and metastatic disease. Cancer Res *52 (23)*, 6702-6704.

Terman,B.I., Dougher-Vermazen,M., Carrion,M.E., Dimitrov,D., Armellino,D.C., Gospodarowicz,D., and Bohlen,P. (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. Biochem Biophys Res Commun. *187 (3)*, 1579-1586.

Terranova,V.P., DiFlorio,R., Lyall,R.M., Hic,S., Friesel,R., and Maciag,T. (1985). Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. J Cell Biol *101 (6)*, 2330-2334.

Thanos,L., Mylona,S., Pomoni,M., Kalioras,V., Zoganas,L., and Batakis,N. (2004). Primary lung cancer: treatment with radio-frequency thermal ablation. Eur. Radiol. *14 (5)*, 897-901.

Thomas,J.G., Ayling,A., and Baneyx,F. (1997). Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from E. coli. To fold or to refold. Appl. Biochem Biotechnol. *66 (3)*, 197-238.

Tilling,T., Engelbertz,C., Decker,S., Korte,D., Huwel,S., and Galla,H.J. (2002). Expression and adhesive properties of basement membrane proteins in cerebral capillary endothelial cell cultures. Cell Tissue Res *310 (1)*, 19-29.

Treisman,R. (1992). The serum response element. Trends Biochem Sci. *17 (10)*, 423-426.

Tse,G.M., Lui,P.C., Lee,C.S., Kung,F.Y., Scolyer,R.A., Law,B.K., Lau,T.S., Karim,R., and Putti,T.C. (2004). Stromal expression of vascular endothelial growth factor correlates with tumor grade and microvessel density in mammary phyllodes tumors: a multicenter study of 185 cases. Hum. Pathol. *35 (9)*, 1053-1057.

Unger,R.E., Peters,K., Wolf,M., Motta,A., Migliaresi,C., and Kirkpatrick,C.J. (2004). Endothelialization of a non-woven silk fibroin net for use in tissue engineering: growth and gene regulation of human endothelial cells. Biomaterials 2004. *25 (21)*, 5137-5146.

van Groningen,J.P., Wenink,A.C., and Testers,L.H. (1991). Myocardial capillaries: increase in number by splitting of existing vessels. Anat. Embryol. (Berl) *184 (1)*, 65-70.

Veikkola,T. and Alitalo,K. (1999). VEGFs, receptors and angiogenesis. Semin. Cancer Biol *9 (3)*, 211-220.

Wagner,D.D. (1993). The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. Thromb. Haemost. *70 (1)*, 105-110.

Walter,J.J. and Sane,D.C. (1999). Angiostatin binds to smooth muscle cells in the coronary artery and inhibits smooth muscle cell proliferation and migration In vitro. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol *19 (19)*, 2041-2048.

Walter,P., Gilmore,R., and Blobel,G. (1984). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. Cell *38 (1)*, 5-8.

Walter,P. and Johnson,A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. Annu. Rev. Cell Biol *10*, 87-119.

Watson,C.A., Camera-Benson,L., Palmer-Crocker,R., and Pober,J.S. (1995). Variability among human umbilical vein endothelial cultures. Science *268 (5209)*, 447-448.

Weidner,N., Semple,J.P., Welch,W.R., and Folkman,J. (1991). Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. N. Engl. J Med. *324 (1)*, 1-8.

West,C.M. and Price,P. (2004). Combretastatin A4 phosphate. Anticancer Drugs *15 (3)*, 179-187.

Wickham,T.J., Davis,T., Granados,R.R., Shuler,M.L., and Wood,H.A. (1992). Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. Biotechnol. Prog. *8 (5)*, 391-396.

Willett,C.G., Boucher,Y., di Tomaso,E., Duda,D.G., Munn,L.L., Tong,R.T., Chung,D.C., Sahani,D.V., Kalva,S.P., Kozin,S.V., Mino,M., Cohen,K.S., Scadden,D.T., Hartford,A.C., Fischman,A.J., Clark,J.W., Ryan,D.P., Zhu,A.X., Blaszkowsky,L.S., Chen,H.X., Shellito,P.C., Lauwers,G.Y., and Jain,R.K. (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. Nat. Med. *10 (2)*, 145-147.

Xia,H., Fitzgerald,J., Bredt,D.S., and Forsayeth,J.R. (1997). Detection of mycoplasma infection of mammalian cells. Biotechniques *22 (5)*, 934-936.

Yamamoto,K., Hamada,H., Shinkai,H., Kohno,Y., Koseki,H., and Aoe,T. (2003). The KDEL receptor modulates the endoplasmic reticulum stress response through mitogen-activated protein kinase signaling cascades. J Biol Chem *278 (36)*, 34525-34532.

Yashima,R., Abe,M., Tanaka,K., Ueno,H., Shitara,K., Takenoshita,S., and Sato,Y. (2001). Heterogeneity of the signal transduction pathways for VEGF-induced MAPKs activation in human vascular endothelial cells. J Cell Physiol *188 (2)*, 201-210.

Yoshida,A., Anand-Apte,B., and Zetter,B.R. (1996). Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. Growth Factors *13 (1-2)*, 57-64.

Zorick,T.S., Mustacchi,Z., Bando,S.Y., Zatz,M., Moreira-Filho,C.A., Olsen,B., and Passos-Bueno,M.R. (2001). High serum endostatin levels in Down syndrome: implications for improved treatment and prevention of solid tumours. Eur. J Hum. Genet. *9 (11)*, 811-814.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbständig ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt worden ist.

Ich habe mich anderweitig keiner Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 17.12.2005

(Stefan Heß)

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Stefan Heß
Geburtsdatum:	27.02.1974
Geburtsort:	Jugenheim
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Studium

Ab 11/2001	**Promotion** in Biologie bei der Firma Xantos Biomedicine AG, Großhadern, Doktorvater Prof. Dr. Peter Buckel, Ludwig-Maximillians-Universität München, Thema: Endothelzellproliferation und die Identifizierung pro-angiogener Gene durch ein neuartiges Hochdurchsatz-Screen-System
10/1997 - 02/2001	**Studium** der Biologie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Note sehr gut (1,4) **Schwerpunkte**: Molekularbiologie als Hauptfach, Zellbiologie und Pharmakologie als Nebenfach **Diplomarbeit**: Abgabe 02/2001. Am Zentrum für Molekulare Biologie (ZMBH), INF 282, 69121 Heidelberg, Arbeitsgruppe Prof. Schaller Thema: Phosphorylierungsanalyse des Enten-Hepatitis-B-Virus-Coreproteins, Note sehr gut (1,3) Diplomprüfung Februar 2000, Note gut (1,6)
04/1996 - 09/1997	Studium der Biologie an der TH Darmstadt Vordiplom 09/1997, Note befriedigend (3,0)
10/1995 - 03/1996	Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
10/1994 - 03/1995	Studium des Bauingenieurwesens, TH Darmstadt

Schulausbildung

07/1985 - 05/1994	Gymnasium Schuldorf Bergstraße Seeheim, Seeheim-Jugenheim, Allgemeine Hochschulreife, Note gut (2,5)
08/1981 - 07/1985	Grundschule Tannenbergschule, Seeheim-Jugenheim