

Michael W. Pfaffl\*, Petros Arnaoutis# & Alois Sellmayer#

\* Institut für Physiologie, Life Science Zentrum Weihenstephan, Technische Universität München, 85350 Freising

# Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Klinikum der LMU, 80336 München

### Einleitung

DNA Mikroarrays sind großartige Werkzeuge um funktionelle Zusammenhänge auf der mRNA Ebene zwischen einer Vielzahl von Genen zu untersuchen. Aber aufgrund der sequenzabhängigen Hybridisierungseigenschaften und deren Variationen die den Hybridisierungsreaktionen zugrunde liegen, müssen die Array Ergebnisse als semi-quantitativ angesehen werden. Als optimale Ergänzung der signifikanten Array Ergebnisse bietet sich die sensitive Verifikation der Expressionsdaten mittels voll quantitativer real-time RT-PCR an.

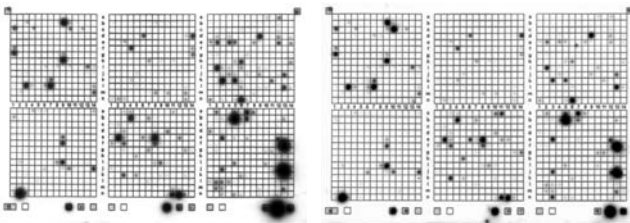
Ziel dieses Projektes bestand darin mittels Northern-Blot, cDNA Array und real-time RT-PCR Techniken, einen Katalog an Genen zu ermitteln die im Menschen regional bzw. temporär beschränkte mRNA Expressionsmuster während der ersten Stunden der Wundheilung aufweisen.

### Hintergrund

Die mechanische Verletzung der Gefäßwand, wie z.B. durch die Angioplastie, führt zur Aktivierung von Endothelzellen und zum endothelialen Wundverschluss durch deren Migration und Proliferation. Eine sehr schnelle Zellantwort auf die mechanische Endothelzellverletzung stellt die Expression von *Early Response Genen*, die eng mit dem Zellwachstum korreliert sind, dar. So induziert die mechanische Verletzung die Expression von c-FOS mRNA (Briski & Gillen, 2001) und EGR-1 mRNA (Yan et al., 2000) und bereits nach einer Stunde ist das Maximum der mRNA Expression erreicht.

Ziel unserer Untersuchungen war es *in vitro* weitere *Early Response Gene* zu identifizieren, die durch die mechanische Verletzung in kürzester Zeit in Endothelzellen aktiviert werden und dadurch einen besseren Einblick in die molekularen Mechanismen des Wundheilungsprozesses zu gewinnen. Um dieses Ziel zu erreichen, kamen unterschiedliche molekularbiologische Methoden zum Einsatz, wie etwa Northern-Blot (Ergebnisse werden nicht beschrieben), cDNA Mikroarray Technologie (Darstellung 1) und als voll quantitative Bestätigungsmethode die real-time RT-PCR.

**Darstellung 1:** Atlas-Array (Clontech) hybridisiert mit [<sup>32</sup>P]-markierten Sonden aus unverletzten und verletzten HUVEC Zellen.



### Methodik

Um neue durch die mechanische Verletzung induzierte Gene zu entdecken und zu identifizieren wurde ein Zeitfenster von bis zu 6 Stunden gewählt. Aus unverletzten und verletzten konfluent gewachsenen humanen Endothelzellen aus Umbilikalvenen (HUVEC) wurde Gesamt-RNA extrahiert und mittels des Atlas Pure Total Labeling System (Clontech, CA, USA) [<sup>32</sup>P]-markierte cDNA Sonden hergestellt. Diese Sonden wurden getrennt voneinander auf zwei Atlas Human 1.2 I Array Membranen (Clontech) hybridisiert: unverletzt versus verletzt cDNA Sonden aus HUVEC Zellen. Auf diesen Nylon-Membranen sind cDNA Fragmente von 1176 verschiedene Genen immobilisiert, darunter auch *Housekeeping Gene* zur Normierung der Expressionsergebnisse, wie GAPDH, β-Actin, Ubiquitin.

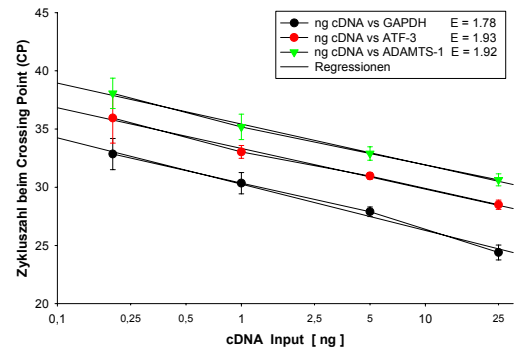
$$R = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta CP_{Zielgen}} \text{ (unverletzt - verletzt)}}{(E_{GAPDH})^{\Delta CP_{GAPDH}} \text{ (unverletzt - verletzt)}}$$

Die Bestätigung dieser semi-quantitativen Array Ergebnisse erfolgte mittels voll quantitativer real-time RT-PCR Analyse. Hierfür wurde mit einem LightCycler (Roche Diagnostics, Penzberg) gearbeitet, der schnelles Thermocycling (rapid cycling) mit der Online SYBR Green I Fluoreszenzdetektion der RT-PCR Produkte kombiniert. Als Quantifizierungsstrategie wurde eine neu entwickelte normalisierte relative Quantifizierung gewählt (Pfaffl, 2001), wobei die mRNA Expressionsdaten eines Zieltgens mit denen eines Referenzgens (*Housekeeping Gen = GAPDH*) verglichen wurden. Die relative Expressionsratio (R) wird anhand der PCR Effizienzen (E) und der Differenz (Δ) der „Crossing Points“ (ACP) der zu vergleichenden Ansätze berechnet. In unserem Falle waren das einerseits **unverletzte (Kontrolle)** versus **verletzte Endothelzellen** gesamt cDNA (= 20 ng revers transkribierte total RNA).

#### Literatur

- Arnaoutis P, Bolz SS, Pfaffl MW, Treitl M, M. Esser, Apfelbacher M, Weber PC & Sellmayer A (2000) Identifizierung neuer, durch mechanische Verletzung induzierter Gene in Endothelzellen. GRK 438 "Vaskuläre Biologie in der Medizin", DFG-Berichtskolloquium, 17. November 2000
- Briski K & Gillen E (2001) Differential distribution of Fos expression within the male rat preoptic area and hypothalamus in response to physical vs. psychological stress. *Brain Res Bull.* 55 No 3: 401-408.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 29 No 9: 1-6.
- Rasmussen R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, Nakagawara, K, eds. *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications* Springer Press, Heidelberg; page 21-34
- Yan SF, Pinsky DJ, Mackman N & Stern DM (2000) EGR-1: is it always immediate and early? *J Clin Invest.* 105 No 5: 553-554.

**Darstellung 2:** Berechnung der real-time PCR Effizienzen anhand der Steigung mittels folgender Gleichung:  $E = 10^{-1/Steigung}$  (Rasmussen, 2001)

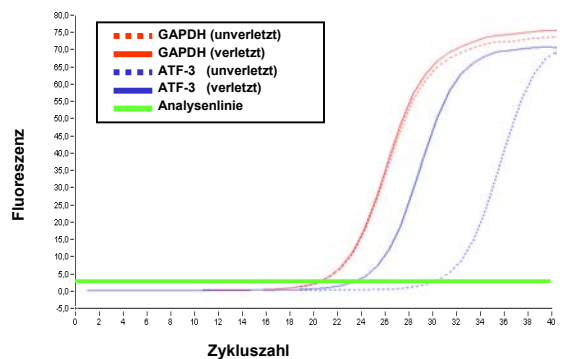


### Ergebnisse

Die Bestimmung der CP Zykluszahlen (n=3) der real-time RT-PCR für GAPDH und ATF-3 zeigen die geringe intra-Assay Varianzen (<2,8% VQ) und somit hohe Reproduzierbarkeit der LightCycler RT-PCR. Für GAPDH und die Zielgene ergaben sich folgenden minimale und maximale real-time PCR Effizienzen:  $E_{GAPDH} = 1,78$ ,  $E_{c-FOS} = 1,89$  und  $E_{ICAM-1} = 2,06$  (Darstellung 2). Die real-time PCR Effizienzen wurden anhand der Steigung wie folgt berechnet  $E = 10^{-1/Steigung}$  (Rasmussen, 2001). Es konnte mit Hilfe der beschriebenen Methoden neben schon bekannten durch Verletzung induzierte *Early Response Gene*, wie c-FOS, und EGR-1, auch weitere Gene nachgewiesen werden, wie ICAM-1, ATF-3, TTP, ADAMTS-1, ETR-101 und PAI-1 (Arnaoutis et al., 2000).

Die Genexpression wurden im verletzten Zustand, im Vergleich zur unverletzten Kontrolle, normalisiert mit der individuellen GAPDH Expression, extrem aufreguliert (Mittelwert aus drei Wiederholungen): c-FOS 264-fach, TTP 102-fach, ATF-3 43,5-fach, ADAMTS-1 25,3-fach, ETR-101 11,2-fach, ICAM-1 5,7-fach und PAI-1 2,2-fach (Darstellung 3).

GAPDH wurde im Gegensatz nur marginal reguliert (~40%). Die Expressionsdaten weisen jedoch darauf hin, dass nicht nur Transkriptionsfaktoren, sondern auch Adhäsionsmoleküle und Plasminogen Inhibitoren in der Frühphase der mechanischen Verletzung in Endothelzellen vermehrt exprimiert werden.



### Schlussfolgerungen

Mit dem Northern-Blot und dem Atlas DNA Array System konnte die differentielle Expression von einer Vielzahl von „neuer“ *Early Response Genen* aufgezeigt und mittels relativer Quantifizierung in der real-time RT-PCR exakt quantifiziert werden.

Mit der Mikroarray Technik und als optimal Ergänzung die real-time RT-PCR wurden somit schnelle als auch hoch quantitative analytische Möglichkeiten geschaffen, den Funktionszusammenhang auf mRNA Ebene zu entdecken, was besonders in nächster Zukunft vor dem Hintergrund des komplett publizierten humanen Genoms von besonderer Interesse sein wird.