

## 7. Diskussion

### 7.1 Die Auswirkungen laminarer Strömung auf die Morphologie und Apoptoserate von HUVEC

Vaskuläre Endothelzellen bilden *in vivo* als innerste Zellschicht von Blutgefäßen eine mechanische Barriere zwischen Gefäßwand und dem strömenden Blut aus. Aufgrund ihrer exponierten Lage sind sie direkt unterschiedlichen Kräften ausgesetzt. Neben der durch den Blutfluss verursachten laminaren Strömung wirken gerichtete mechanische Reize wie der rhythmische Wechsel des Gefäßdurchmessers durch Herz- oder Pulsschlag auf das Endothel ein.

In früheren Studien der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Apoptose vaskulärer Endothelzellen strömungsabhängig durch einen Rezeptorkomplex aus Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , CD47 und dem Liganden Thrombospondin-1 reguliert wird. Während das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  unabhängig von äußeren Strömungseinwirkungen konstitutiv exprimiert wird, konnte für das CD47 gezeigt werden, dass es unter statischen und dynamischen Kulturbedingungen vorhanden ist aber strömungsabhängig eine Konformationsänderung erfährt, so dass der aktive Rezeptorkomplex nicht gebildet wird. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Thrombospondin-1 Konzentration im Kulturüberstand statisch kultivierter HUVEC mit der Kultivierungsdauer zunimmt, im Kulturüberstand dynamisch kultivierter HUVEC jedoch konstant auf einem basalen Niveau bleibt. Durch das unter statischen Bedingungen in den Kulturüberstand sezernierte Tsp-1 wird in HUVEC Apoptose ausgelöst, indem dieses an den Rezeptorkomplex aus Integrin  $\alpha_v\beta_3$  und CD47 bindet.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation der mechanosensitiven Apoptose vaskulärer Endothelzellen näher charakterisiert werden, indem die strömungsabhängige Regulation der Thrombospondin-1 Expression auf Protein- und auf RNS-Ebene genauer untersucht wurde. Hierzu wurden HUVEC unter dynamischen Bedingungen in einer Plattenkegelapparatur kultiviert und mit ihren jeweiligen statischen Kontrollen hinsichtlich der Expression des Tsp-1 verglichen. Um sicherzustellen, dass in den jeweiligen Versuchen laminare Strömungsbedingungen herrschten, wurde entweder die Ausrichtung der Zellen in Strömungsrichtung kontrolliert oder der Apoptose-Index bestimmt. Das Absinken des Apoptose-Index auf 1/3 der jeweiligen statischen Kultur wurde als interne Kontrolle der herrschenden Strömungsbedingungen verwendet. In der Abbildung 6.1, Abschnitt 6.1.2 ist die

unterschiedliche Morphologie statisch und dynamisch kultivierter HUVEC zu erkennen. In der Tabelle 6.1, Abschnitt 6.1.2 befinden sich die zugehörigen Apoptoseraten, die durch die anschließende Fixierung des Zellrasens und DAPI-Färbung bestimmt wurden. Wie die Ergebnisse zeigen, war eine Ausrichtung der Zellen in Strömungsrichtung zu erkennen, und die Apoptoserate der dynamisch kultivierten Zellen lag um das 5,2fache niedriger als die Apoptoserate der statischen Kontrolle. In der Plattenkegelapparatur waren die Zellen somit einer laminaren Strömung ausgesetzt.

## 7.2 Die Bestimmung der Tsp-1 Konzentration im Kulturüberstand durch ELISA

Aus früheren Studien war bekannt, dass die Tsp-1 Konzentration im Kulturüberstand statisch kultivierter Zellen mit der Kultivierungsdauer ansteigt, aber im Kulturüberstand dynamisch kultivierter Zellen konstant auf einem basalen Niveau bleibt [Kaiser *et al.*, 1997]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Änderung der Tsp-1 Konzentration mit den Strömungsbedingungen durch ELISA bestätigt werden: über einen Zeitraum von 24 h statischer Kultivierung stieg die Tsp-1 Konzentration im Kulturüberstand auf 250 ng/ml an. In der dynamischen Kultur konnte hingegen nur eine Konzentration von 5 ng/ml Tsp-1 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6.2, Abschnitt 6.2).

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die im ELISA verwendeten Antikörper mit dem Tsp-1 im Serum des Kulturmediums kreuzreagierten. Erst nachdem die gesamte Kultivierung unter serumfreien Bedingungen durchgeführt wurde, waren die dargestellten Ergebnisse zu erhalten. Ein Problem der Serumreduktion war die schwächere Anhaftung der HUVEC vor allem in den Strömungsversuchen. Um einen intakten Zellrasen zu erhalten konnte nur ein Scherstress von 1 dyn/cm<sup>2</sup> angelegt werden. Ein weiterer Nachteil des Serumentzuges war, dass innerhalb der Promotorregion des Tsp-1 ein *Serum Response Element* vorhanden war. Durch den Entzug von Serum könnte es somit zu Änderungen der Tsp-1 Expression kommen, die unabhängig von den Strömungsbedingungen waren. Um weitere Untersuchungen zur Sekretion und zur Proteinbiosynthese des Tsp-1 durchführen zu können, erwies sich der ELISA-Test als ungeeignet und wurde durch eine radioaktive Markierung des Tsp-1 verbessert.

Ein Vorteil der Markierung durch Einbau von L-[<sup>35</sup>S]-Methionin war, dass nicht unter serumfreien Bedingungen gearbeitet werden musste, da im Serum vorhandenes Tsp-1 nicht radioaktiv markiert wurde.

### 7.3 Einfluss von Scherstress auf die Proteinbiosynthese von Tsp-1

Die Frage stellte sich nun, ob das unter statischen Kulturbedingungen sezernierte Tsp-1 das Produkt einer de-novo-Synthese, die nach Strömungsabbruch initiiert wird, ist oder ob Tsp-1 auch unter dynamischen Bedingungen synthetisiert aber intrazellulär bis zum Abbruch der Strömung gespeichert wird.

Eine intrazelluläre Speicherung wurde bereits für den von Willebrand Faktor (vWf) gezeigt, der in den Weibel-Pallade-Körperchen von Endothelzellen vorliegt, und erst nach einem Stimulus sezerniert wird [Wagner *et al.*, 1990; Tschopp *et al.*, 1974; Meyer *et al.*, 1983]. Galbusera und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Sekretion des von Willebrand Faktors von HUVEC durch laminare Strömung erhöht ist [Galbusera *et al.*, 1997]. Scherstress übt also einen erheblichen Einfluss auch auf die Sekretion dieses Proteins aus. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Tsp-1 unter dynamischen Bedingungen extrazellulär gespeichert wird. Extrazellulär kommt Tsp-1 an Heparansulfat gebunden vor (Feitsma *et al.*, 2000). So könnte durch den Strömungsabbruch Tsp-1 über eine Protease von der Zelloberfläche in den Kulturüberstand freigesetzt werden.

Zur Untersuchung der de-novo Biosynthese bzw. Speicherung des Tsp-1 wurden metabolische Radiomarkierungen von Tsp-1 unter statischen und dynamischen Kulturbedingungen durchgeführt. Im Zellysat und im Kulturüberstand dynamisch kultivierter Zellen waren im Rahmen der Fehlergenauigkeit des Auswertungsprogramms gleiche Mengen Tsp-1 vorhanden. Dies legte nahe, dass Tsp-1 unter dynamischen Kulturbedingungen in geringerem Maße neu synthetisiert wird als unter statischen und auch nicht intrazellulär gespeichert wird. Im Fall einer intrazellulären Speicherung unter dynamischen Bedingungen müsste deutlich mehr Tsp-1 im Zellysat als im Kulturüberstand vorhanden sein.

Das Tsp-1 im Kulturüberstand nach Strömungsabbruch ist also das Produkt einer *de-novo* Proteinbiosynthese. Nun stellte sich die Frage, ob die Hochregulation der Tsp-1 Expression auf Transkriptions- oder auf Translationsebene stattfand.

Die Regulation der Genexpression ist in mehreren Stadien auf dem Weg von der DNS zum fertigen Protein möglich. Die Zeitspanne bis Tsp-1 nach Strömungsabbruch im Kulturüberstand detektiert werden kann, könnte ein Hinweis sein, auf welcher Ebene die Tsp-1- Biosynthese reguliert ist.

Bereits 60 min nach Strömungsabbruch sind die ersten apoptotischen Zellen zu detektieren [Freyberg, Dissertation 1999]. Diese Zeitspanne lässt zunächst nicht darauf schließen, auf welcher Ebene die Tsp-1 Biosynthese reguliert ist, da die Transkription in tierischen Zellen mit 40 Nukleotiden pro Sekunde [Lewin, 6. überarbeitete Auflage,1997] relativ schnell verläuft. Dies wäre eine Transkriptionszeit von 6 min für die Tsp-1 hnRNS, die mit Exons und Introns etwa 16000 nt umfasst. 3` und 5`-Modifikationen der mRNA sowie das Spleißen benötigen ebenfalls Zeit. Es sollte ca. 20 Minuten dauern, bis die fertige Tsp-1 mRNA ins Cytoplasma gelangt. Die mRNA muss anschließend translatiert, glykosyliert und sezerniert werden. Eine Hochregulation der Tsp-1 Expression auf Transkriptionsebene, sollte mind. 30 min dauern. Eine kurze Zeitspanne < 30 min bis Tsp-1 nach Strömungsabbruch im Kulturüberstand nachgewiesen werden kann, könnte dagegen auf eine Regulation auf Translationsebene hindeuten.

Um die Zeitspanne zu bestimmen, nach der Tsp-1 im Kulturüberstand auftaucht, wurden nach Abbruch der Strömung zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben aus dem Kulturüberstand entnommen und zur Immunpräzipitation mit Tsp-1-Antikörper eingesetzt. Nach 90 min konnte Tsp-1 im Kulturüberstand detektiert werden (Abbildung 6.12, Abschnitt 6.3.2.3). Diese Zeitspanne spricht für die Regulation der Tsp-1 Expression auf Transkriptionsebene.

Die Tsp-1 Protein-Biosynthese konnte durch Zugabe von Actinomycin C fast vollständig unterbunden werden (Abbildung 6.13, Abschnitt 6.3.3). Dies könnte ein Hinweis auf eine relativ instabile Tsp-1 mRNA sein, was auch durch die Tatsache unterstützt wird, dass die Tsp-1 mRNA in der 3`-UTR Erkennungssequenzen zur Restriktion durch Endonukleasen enthält, was zum schnellen Turn-Over der Tsp-1 mRNA beitragen sollte. Hinweise auf unterschiedlich stabile Tsp-1 mRNA Transkripte unter dynamischen und statischen Kulturbedingungen lagen bereits in der Literatur vor. Es konnte gezeigt werden, dass die

Tsp-1 mRNA unter dynamischen Bedingungen von geringerer Stabilität war als unter statischen [Dissertation Bergmann, 2004]. Ob diese Stabilitätsunterschiede als Erklärung für die unterschiedlichen Tsp-1 Mengen in den Kulturüberständen dynamisch und statisch kultivierter HUVEC ausreichen, konnte hier noch nicht geklärt werden.

Eine hohe Turn-Over-Rate der mRNA könnte auch ein Hinweis auf eine Regulation auf Transkriptionsebene sein. Eine Regulation auf Transkriptionsebene würde bei einer sehr stabilen mRNA wenig Sinn ergeben, da durch die hohe Stabilität die Regulation erheblich verzögert würde.

#### 7.4 Quantifizierung der Tsp-1 mRNA durch Northern Blot

Die Vermutung, dass Tsp-1 auf Transkriptionsebene scherstressabhängig reguliert wird, konnte durch Northern Blot Analysen (Abschnitt 6.4.2, Abbildung 6.17 und 6.18) bestätigt werden. Die Tsp-1 mRNA war unter dynamischen Bedingungen in geringerem Maße vorhanden als unter statischen. Die Mittelwerte der drei unabhängigen Versuche mit  $10 \text{ dyn/cm}^2$  ergaben einen signifikanten Abfall der Tsp-1 mRNA Menge auf  $35 \% \pm 11 \%$  bezogen auf den statischen Wert ( $p < 0,005$  Student's T-Test). Diese Ergebnisse standen auch im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls zeigen konnten, dass die Expression der Tsp-1 mRNA *in vitro* durch laminaren Scherstress in zeit- und dosisabhängiger Weise herunterreguliert wird [Bongrazio *et al.*, 2006]. Außerdem konnte durch Northern Blot Analyse bestätigt werden, dass die scherstressabhängige Regulation zumindest zum Teil auf Transkriptionsebene stattfindet. Um die beteiligten cis-aktiven Elemente zu identifizieren, wurde die Promotorregion des Tsp-1 genauer untersucht.

## 7.5 Der Tsp-1 Promotor

Um die scherstressabhängige Regulation der Tsp-1 Expression auf Transkriptionsebene genauer analysieren zu können, wurde der Promotorbereich des Tsp-1 Gens untersucht. Bereits 1989 war der Tsp-1 Promotor und seine flankierenden Regionen von Laherty und Kollegen kloniert und untersucht worden [Laherty *et al.*, 1989]. Durch Durchmusterung einer genomischen Bibliothek mit einer Tsp-1 cDNS, die gegen den Aminoterminus des Thrombospondin-1 gerichtet war, konnte ein 30 kb großer Cosmid-Klon isoliert werden. Dieser enthielt eine 3823 bp lange Nukleotidsequenz, die die ersten zwei Exons, Teile des dritten Exons sowie die ersten beiden Introns und 2277 Nukleotide stromauf der Transkriptionsstartstelle enthielt. Das Exon I hat eine Größe von 151 bp und enthält die 5`-UTR, das erste Intron hat eine Größe von 599 bp und enthält eine, durch Laherty und Kollegen identifizierte AP-2 Transkriptionsfaktorbindestelle. Das Exon II hat eine Größe von 96 bp und enthält das Initiator-Methionin sowie die hydrophobe Signalsequenz des Tsp-1. 24 bp stromauf der Transkriptionsstartstelle liegt eine A/T-reiche Sequenz, die homolog zu TATA-Box Sequenzen eukaryotischer Promotoren ist. Die TATA-Box befindet sich üblicherweise 19 bis 27 bp stromauf der Transkriptionsstartstelle [Breathnach *et al.*, 1981] und ist verantwortlich für die korrekte Positionierung der RNS-Polymerase II [Grosschedl *et al.*, 1980]. Sequenzen stromauf der TATA-Box enthalten eine Vielzahl möglicher regulatorischer Elemente wie eine inverse CAAT-Box an der Position -63, *Response Elemente* für *Heat Shock* (-792), cAMP (-1192) und Serum (-1269). Konsensus Sequenzen für die *c-fos direct repeats* (-324 und -449), virale *Core Enhancer* (-823 und -1760) und mögliche Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren SP-1 (GC-Boxen -118, -165 und -581) und AP-2 (-311 und -735) konnten identifiziert werden. CAAT- und GC-Boxen sind bidirektional und können starken Einfluss auf die Frequenz der Transkriptionsinitiation ausüben [Lewin, 1998]. In der Abbildung 6.17, Abschnitt 6.5 ist die Sequenz des Tsp-1 Promotors von der Position -2217 bis +754 dargestellt.

Eine Analyse der von Laherty hergestellten Deletionsmutanten ergab nach Transfektion in COS-1 und NIH3T3 Zellen, dass Sequenzen im ersten Intron des Tsp-1 Gen dessen Expression erheblich beeinflussen. Das Fehlen der ersten Intron Sequenz führte zu einer Erniedrigung der Transkriptionsaktivität um 75 %. Dies konnte bereits in den Promotoren anderer extrazellulärer Matrix Proteine wie z.B. bei Kollagen II, alpha1 (I)-Kollagen und alpha1 (IV)-Kollagen beobachtet werden. Außerdem schienen die TATA- und die CAAT-Box

notwendige Elemente des Tsp-1 Promotors zu sein. Ein Entfernen dieser Elemente führte zu einer Reduktion der Transkriptionsaktivität um 98 %.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt der Bereich des Tsp-1 Promotors von -2217 bis +754 ausgewählt, um nach weiteren potenziell scherstressabhängigen, cis-aktiven Elementen zu suchen. Eine computergestützte Analyse dieser Region durch das Programm MatInspector Release professional 7.4.4 [Quandt *et al.*, 1995] zeigte eine Reihe potenzieller Transkriptionsfaktorbindestellen. Von diesen wurden lediglich die ausgewählt, die bereits im Zusammenhang mit scherstressabhängiger Genregulation beschrieben wurden (Abbildung 6.17 im Abschnitt 6.5 rosa unterstrichen).

An den Positionen -1417 und +157 waren mögliche Bindestelle für den Transkriptionsfaktor **Egr-1** vorhanden. Egr-1 gehört zu den „*immediate early genes*“ und kodiert für einen Transkriptionsfaktor der Zinkfinger-Klasse. Es handelt sich um ein 80-82 kDa großes Protein, dass von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entdeckt wurde, die hauptsächlich nach Faktoren die Zellwachstum und Proliferation beeinflussen suchten [Gashler *et al.*, 1995]. Der Transkriptionsfaktor Egr-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese [Khachigian *et al.*, 2004]. Außerdem wird der Egr-1 Transkriptionsfaktor scherstressabhängig aktiviert, bindet an ein GC-reiches Element in der Promotor-Region des PDGF-A Gens und ist für dessen scherstressabhängige Aktivierung verantwortlich [Khachigian *et al.*, 1997].

An den Positionen -1223 und +413 befinden sich mögliche Bindestellen der **GATA**-Transkriptionsfaktoren. Der Transkriptionsfaktor GATA 6 wird durch laminaren Scherstress aktiviert und bindet an eine GATA-Konsensusbindesequenz im Bereich des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA)-Promotors und inhibiert so dessen Transkription [Sokabe *et al.*, 2004].

Besonders interessant ist die mögliche Transkriptionsfaktorbindestelle an der Position -1123. Es handelt sich hierbei um die Sequenz *GAGACC*, welche zuerst von Resnick und Mitarbeitern [Resnick *et al.*, 1992] im Promotor des scherstressabhängigen PDGF-B Gens entdeckt und als ***Shear Stress Response Element (SSRE)*** bezeichnet wurde. Resnick konnte durch Deletionsanalysen die scherstressabhängige Expression des PDGF-B Gens auf die Sequenz *GAGACC* zurückführen. 2003 wurde die Sequenz von Fissthaler *et al.* um 4 Nukleotide zu der Sequenz *ACC(G)/(T)AGACCAG* erweitert. Im Promotorbereich des Tsp-1 Gens befindet sich die Sequenz *TGGAGACCAG*, die nicht ganz der erweiterten Version aber zumindest der

ursprünglichen Version des SSRE entspricht. Das SSRE konnte bereits in den Promotorbereichen vieler Gene, die sensitiv auf Scherstress reagieren, identifiziert werden. Eine Wechselwirkung konnte mit dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B nachgewiesen werden [Resnick *et al.*, 1992; Lan *et al.*, 1994].

Das SSRE ist nicht immer alleine für die Scherstressabhängigkeit eines Promotors verantwortlich ist. So ist in der Promotorsequenz der scherstressabhängigen Gene von TGF- $\beta$  und MCP-1 zwar das SSRE vorhanden [Ohno *et al.*, 1995], TGF- $\beta$  und MCP-1 zeigen aber trotz Deletion des SSRE weiter scherstressabhängige Transkriptionsaktivität. Im Promotor des Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA)-Gens konnte die Mutation des SSRE an der Position -945 dessen Scherstressabhängigkeit nicht inhibieren [Sumpio *et al.*, 1997]. Hier zeigten sich dagegen CRE und AP-2 für die scherstressabhängige Genexpression des tPA-Gens verantwortlich.

Mögliche Bindestellen für den Transkriptionsfaktor **AP-2** konnten ebenfalls in der Promotorregion des Tsp-1 Gens an den Positionen -756 und +670 identifiziert werden. Der Transkriptionsfaktor AP-2 gehört zu einer Familie von drei eng verwandten und evolutionär konservierten, sequenzspezifischen DNS-Bindeproteinen, AP-2(Alpha), AP-2(Beta) und AP-2(Gamma). AP-2 Bindestellen sind GC-reiche Elemente, die in ihrer Bindungsaffinität sehr unterschiedlich sein können [Hilger-Eversheim *et al.*, 2000]. Der Transkriptionsfaktor AP-2 reguliert Gene, die an einer Reihe wichtiger biologischer Funktionen beteiligt sind. So werden z.B. die Gene von TGF- $\alpha$  und Typ IV-Kollagenase durch AP-2 aktiviert [Wang *et al.*, 1997; Frisch *et al.*, 1990], das c-myc Gen dagegen reprimiert [Gaubatz *et al.*, 1995]. Die Proteine der AP-2 Familie bestehen aus einem C-terminalen Homodimerisierungsmotiv, einem basischen helikalen DNS-Binde-Motiv und einer weniger konservierten prolinreichen Transaktivator-domäne innerhalb des N-Terminus [Williams *et al.*, 1991].

An der Position +553 befindet sich außerdem eine **GAGA-Box**. Es handelt sich hierbei um einen purinreichen Nukleotid-Bereich, der normalerweise stromauf der Transkriptionsstartstelle lokalisiert ist. GAGA-Boxen spielen eine wichtige Rolle bei der Transkription des Insulin I Gens und des *Angiotensin I Converting Enzymes* in der Ratte [Kennedy *et al.*, 1992]. GAGA-Boxen können von mind. 5 unterschiedlichen Zinkfingerproteinen gebunden werden. Im Promotor des *Angiotensin-Converting Enzymes* der Ratte konnte nachgewiesen werden, dass dessen scherstressabhängige Transkriptionsaktivität ebenfalls nicht von dem, vorhandenen SSRE an der Position -1274 abhängt sondern von den vorhandenen *Barbie-*



und GAGA-Boxen, wobei nur eine Doppelmutation in beiden Transkriptionsfaktorbindestellen die scherstressabhängige Transkriptionsaktivität inhibieren konnte [Miyakawa *et al.*, 2004].

Eine Analyse des Tsp-1 Promotorbereiches ergab weiterhin, dass zwischen der Sequenz des SSRE und dem Transkriptionsstartpunkt des Tsp-1 Gens ein hypothetischer Offener Leserahmen lokalisiert ist, von dem bisher nicht bekannt ist, ob er für ein Protein kodiert (Abbildung 6.17, Abschnitt 6.5 in blau dargestellt). Er umfasst 426 Nukleotide. Stromauf des Startkodons konnte durch Analyse des Programms MatInspector Release Professional 7.4.4 keine Konsensussequenz für eine eukaryotische TATA-Box oder ein Initiator-Element identifiziert werden. Daher war es eher unwahrscheinlich, dass hier eine Expression stattfinden könnte. Um dies jedoch vollständig auszuschließen wurde das Promotortestplasmid pSEAP1-1,4kb generiert, das den gesamten 5'-Bereich des hypothetischen Offenen Leserahmens enthält.

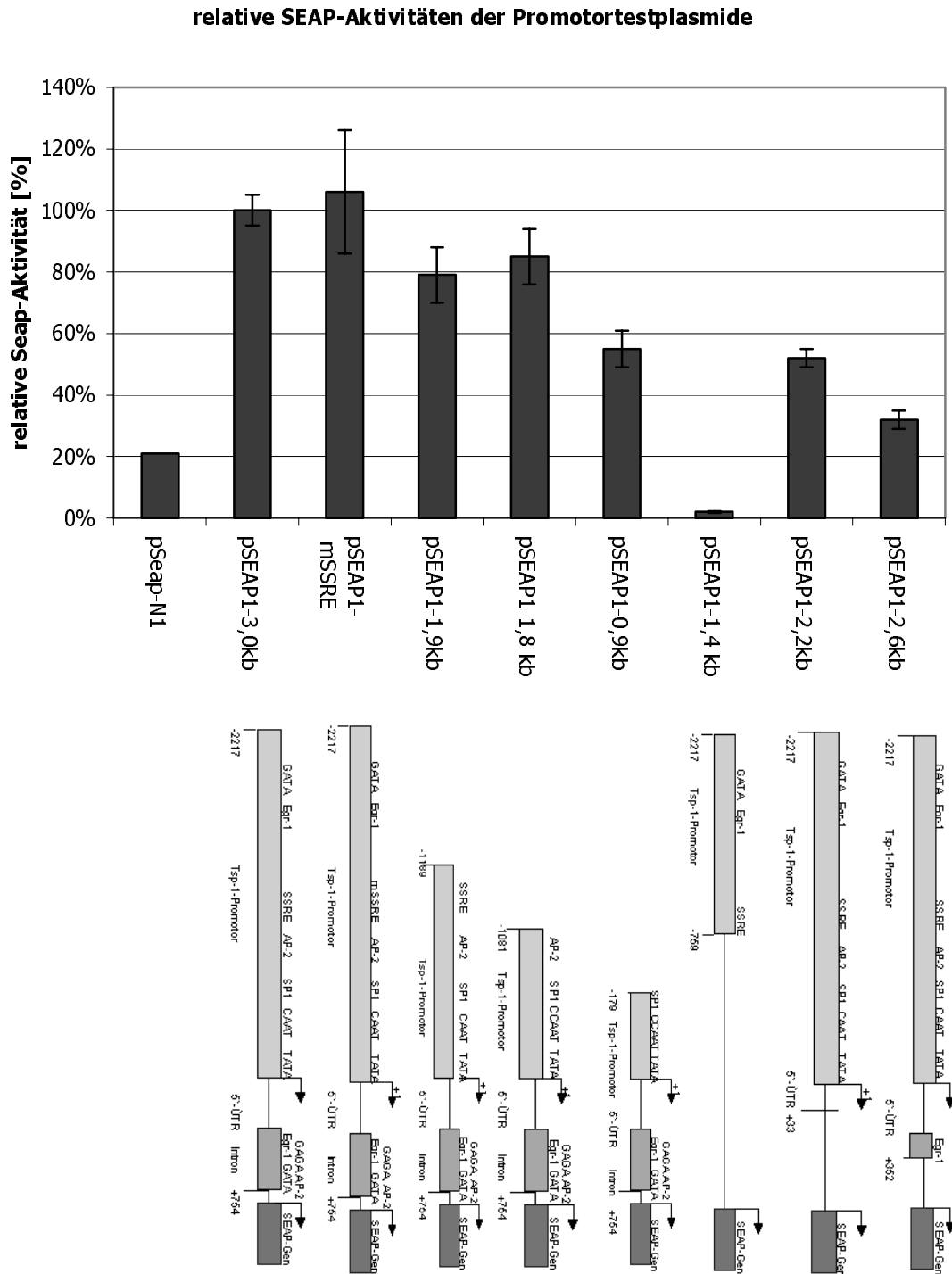
## 7.6 Promotoranalyse statisch kultivierter Zellen

Die BHK-21 Zellen wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Metafectene nach vorheriger Optimierung des DNS zu Transfektionsreagenz-Verhältnisses (Abschnitt 6.5.5.1) transfiziert.

Die Erzeugung stabiler Zelllinien ermöglichte die Messung der Reporter-genaktivitäten unabhängig von der Transfektionseffizienz, so dass die Normierung der Messwerte über die Gesamtzellzahl erfolgen konnte.

Ein Problem der Messung von Reporter-genaktivitäten in stabilen Zelllinien ist, dass der Integrationsort des Plasmids im Genom unterschiedlichen, übergeordneten Regulationsmechanismen der Transkription unterworfen sein kann. Niveau und Stabilität der Expression kann durch chromosomale Positionierungseffekte und die Zahl der Integrationsereignisse beeinflusst werden [Lacy *et al.*, 1983]. Damit diese Effekte keinen Einfluss auf die Untersuchungen der Reporter-genaktivitäten ausübten, wurden polyklonale Expressionszelllinien hergestellt. Die Zellpopulation bestand aus einem Gemisch unterschiedlicher Zellen, die das aufgenommene Plasmid an unterschiedlichen Positionen im Genom integriert hatten. Die unterschiedlichen Positionierungseffekte sollten sich so über die gesamte Population ausgleichen und die Reporter-genaktivität nicht beeinflussen.

Es wurde zunächst die Reporterogenaktivität statisch kultivierter Zellen bestimmt, um die unterschiedlichen Expressionsstärken der jeweiligen Promotortestplasmide in den erhaltenen Linien aufzuzeigen (Abbildung 6.46).



**Abb. 6.46:** Relative SEAP-Aktivitäten der unterschiedlichen Promotortestplasmide. Die Aktivität des pSEAP1-3,0kb wurden 100 % gesetzt.

Keine signifikante Aktivitätsänderung ergab sich zwischen den Promotortestplasmiden des Wildtyp-Promotors und pSEAP1-mSSRE (Abbildung 6.46, Tabelle 6.8, Abschnitt 6.5.6.2). Da die Promotorsequenzen bis auf die Mutation im *Shear Stress Response Element* identisch waren, zeigte das SSRE somit keinen Einfluss auf die statische Tsp-1 Expression.

Schwache Aktivitätsänderungen von 21 % bzw. 15 % ergaben sich zwischen den Promotortestplasmiden pSEAP1-1,9kb und pSEAP1-1,8kb bezogen auf den Wildtyp-Promotor. Dies deutet auf ein regulatorisches Element in den deletierten Sequenzbereichen von Position –2217 bis –1189 des Tsp-1-Promotors hin.

Deutliche Aktivitätsänderungen ergaben sich zwischen Promotortestplasmiden pSEAP1-1,4kb, pSEAP1-0,9kb, pSEAP1-2,2kb, pSEAP1-2,6kb und dem Wildtyp-Promotor.

Das Promotortestplasmid pSEAP1-1,4kb zeigte einen Aktivitätsverlust von 98 % bezogen auf den Wildtyp-Promotor. Da kaum Transkriptionsaktivität durch den untersuchten Promotorbereich stattfand, konnte ausgeschlossen werden, dass der offene für ein Protein kodierende Leserahmen innerhalb des Tsp-1-Promotors exprimiert wird.

Eine signifikante Verringerung der Transkriptionsaktivität, um 45 % im Vergleich zum Wildtyp-Promotor konnte bei dem Vektor pSEAP1-0,9kb detektiert werden. Dies deutet auf starke regulatorische Elemente wie Enhancer im Sequenzbereich von –2217 bis –179 des Tsp-1 Promotors hin.

Da ein Aktivitätsunterschied zwischen den Sequenzbereichen des Wildtyp-Promotors und des Promotortestplasmides pSEAP1-1,8kb von 15 % und ein Aktivitätsunterschied zwischen den Promotortestplasmiden pSEAP1-1,8kb und pSEAP1-0,9kb von 30 % festgestellt werden konnte, heißt das, dass mindestens zwei Enhancer-Regionen in diesem Bereich vorliegen: Eine im Sequenzbereich von –2217 bis –1089 und eine im Sequenzbereich von –1089 bis –179. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von früheren Studien [Laherty *et al.*, 1989]. Hier zeigten Deletionen stromaufwärts der Position –234 keine oder nur minimale Effekte auf die Transkriptionsaktivität. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Laherty andere Zelllinien verwendete und die beobachteten Effekte spezifisch für Fibroblasten sind.

Die Transkriptionsaktivität erniedrigte sich um 48 % im Promotortestplasmid pSEAP1-2,2kb, bei dem das erste Intron und einen Teil der 5`-UTR fehlt. In diesem Bereich des Tsp-1 Gens

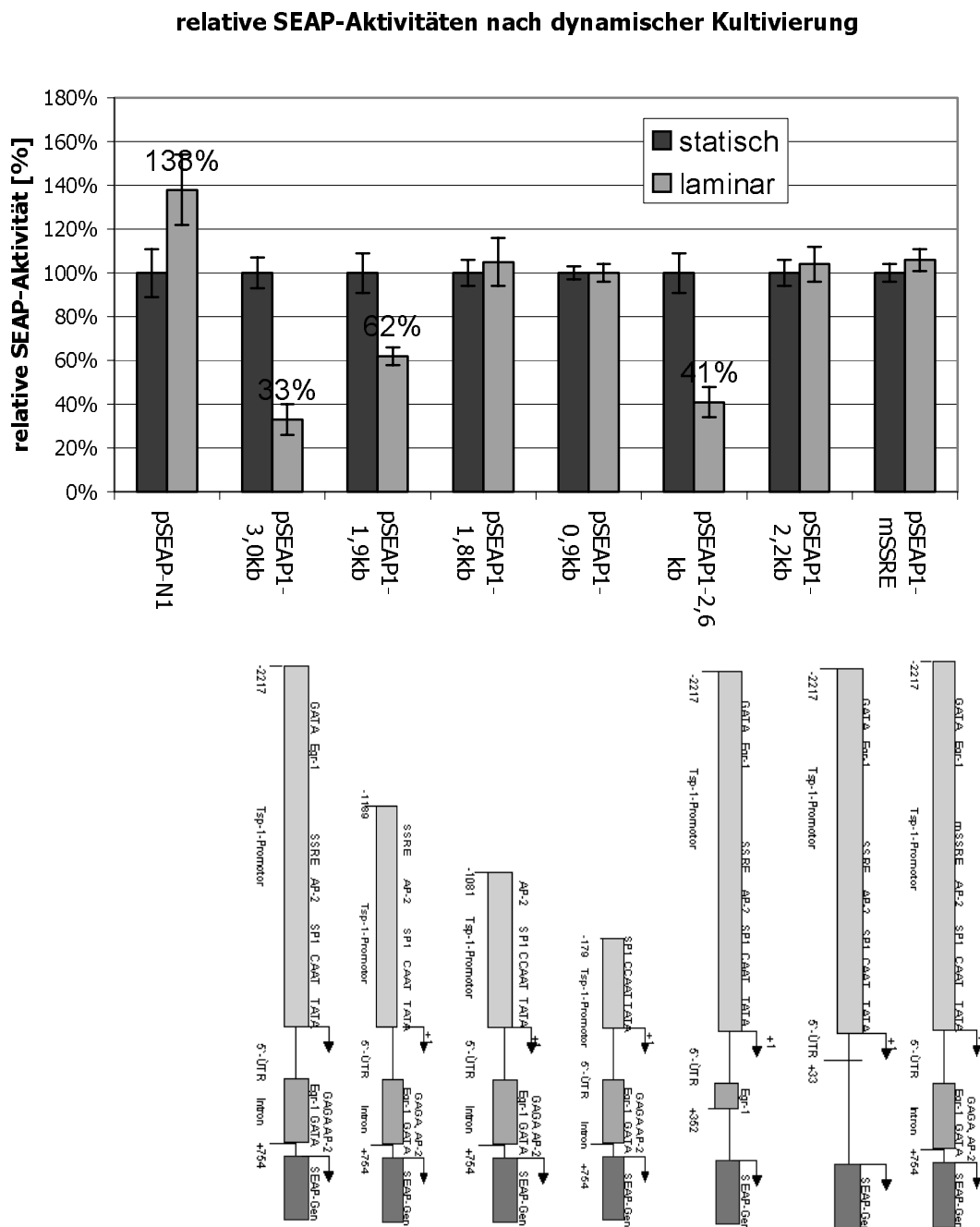
liegt ein für die Transkription entscheidendes Element. Dieses Ergebnis zeigten auch die Untersuchungen von Laherty, die sogar eine Erniedrigung der Transkriptionsaktivität um 72 % durch Deletion dieser Bereiche erhielten [Laherty *et al.*, 1989].

Eine noch deutlichere Erniedrigung der Transkriptionsaktivität um 68 %, gegenüber dem Wildtyp-Promotor ergab sich, wenn nur Teile des ersten Introns deletiert wurden (Vektor pSEAP1-2,6kb). Hier waren im Vergleich zu dem Vektor pSEAP1-2,2kb die gesamte 5'-UTR und die erste Hälfte des Introns noch vorhanden. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich im Bereich des ersten Introns oder in der 5'-UTR cis-aktive Elemente der Transkription befinden, die eine reprimierende Wirkung ausüben. Es könnte ebenfalls sein, dass sich im Bereich der 5'-UTR von Position +33 bis +152 (deletiert im Vektor pSEAP1-2,2kb, vorhanden im Vektor pSEAP1-2,6kb) Elemente befinden, die die Stabilität der mRNA beeinflussen. Zwar sind hier keine kurzen offenen Leserahmen (*upstream open reading frames*) vorhanden, die oft die Initiation der Translation kontrollieren, doch könnten cis-aktive Elemente innerhalb der 5'-UTR die mRNA destabilisieren. Für die AC914 mRNA in *Dictyostelium discoideum* konnten z.B. destabilisierende Elemente innerhalb der 5'-UTR nachgewiesen werden, die mit der 40S ribosomalen Untereinheit interagieren [Chiaberge *et al.*, 1998]. Die Ergebnisse konnten zeigen, dass die stabilisierende und destabilisierende Wirkung der 40S ribosomalen Untereinheit von der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 abhängt.

Zusammenfassend konnte durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden, dass im Bereich des ersten Intron des Tsp-1 Gens regulatorische Elemente liegen, die die Transkriptionsaktivität verstärken. Das Vorhandensein eines schwachen Repressors im 5'-Bereich des ersten Introns, dessen reprimierende Wirkung durch benachbarte cis-regulatorische Aktivatoren innerhalb des Sequenzbereichs zwischen +352 und +754 überdeckt wird, ist möglich. Ebenfalls könnten sich innerhalb der 5'-UTR cis-aktive regulatorische Elemente befinden, die die mRNA destabilisieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich im Sequenzbereich von -2217 bis -179 der stromaufwärts der TATA- und CAAT-Box sowie der SP-1 Transkriptionsfaktorbindestellen liegt, weitere stark aktivierend wirkende, regulatorische Elemente der Transkription befinden. Hierbei scheint es sich um entscheidende Elemente für die konstitutive Transkription in BHK-21 Zellen zu handeln.

## 7.7 Promotoranalyse unter dynamischen Bedingungen

Die Reporterogenaktivitäten dynamisch kultivierter Zellen wurden bestimmt, und diese mit deren jeweiliger statischer Aktivität verglichen. Zeigte sich hier ein Aktivitätsunterschied, war in der entsprechenden Region mit hoher Wahrscheinlichkeit ein cis-aktives Element zur scherstressabhängigen Regulation vorhanden (Abbildung 6.47).



**Abb. 6.47:** Relative SEAP-Aktivitäten der unterschiedlichen Promotortestplasmide unter statischen und dynamischen Bedingungen. Die Aktivitäten der jeweiligen statischen Kontrollen wurden 100 % gesetzt.

Für die Promotortestplasmide ergaben sich unterschiedliche Änderungen der Transkriptionsaktivitäten in Bezug auf ihre jeweilige statische Kontrolle: Starke Aktivitätsänderungen ergaben sich bei den Promotortestplasmiden pSEAP1-3,0kb und pSEAP1-2,6kb, eine schwächere Aktivitätsänderung ergab sich bei dem Promotortestplasmid pSEAP1-1,9kb und keine Aktivitätsänderungen ergaben sich bei den Promotortestplasmiden pSEAP1-1,8kb, pSEAP1-0,9kb, pSEAP1-2,2kb und pSEAP1-mSSRE.

Der Wildtyp-Promotor pSEAP1-3,0kb und das Promotortestplasmid pSEAP1-2,6kb zeigten eine vergleichbare Verminderung der Transkriptionsaktivität unter dynamischen Bedingungen auf 33 bzw. 41 %. Dies läßt darauf schließen, dass im deletierten Sequenzbereich des ersten Introns von Position +352 bis +754 keine scherstressrelevanten cis-aktiven Elemente vorhanden sind. Hier waren mögliche Bindestellen für GATA und AP-2 sowie eine GAGA-Box lokalisiert.

Eine Erniedrigung der Transkriptionsaktivität auf 62 % konnte für den Vektor pSEAP1-1,9kb (Sequenzbereich -1189 bis +754) nachgewiesen werden. Die Scherstressabhängigkeit dieses Promotortestplasmides schien weniger stark ausgeprägt zu sein als bei dem Vektor pSEAP1-2,6kb (41 %) und dem Wildtyp-Promotor (33 %), was auf das Vorhandensein scherstressaktiver Elemente (Egr-1 und GATA) im deletierten Sequenzbereich von -2217 bis -1189 hindeutet. Allerdings war bei der Positiv-Kontrolle pSEAP-N1, die nicht scherstressabhängig reguliert werden sollte, ebenfalls eine Aktivitätsänderung von 38 % zu beobachten.

Der Vektor pSEAP1-1,8kb (Sequenzbereich -1081 bis +754) zeigte im Vergleich zu seiner statischen Kontrolle keine scherstressabhängige Aktivitätserniedrigung. Dies läßt auf essentielle scherstressabhängige Transkriptionsfaktorbindestellen in den deletierten Sequenzbereichen von Position -2217 bis -1081 schließen. Innerhalb dieser Region befindet sich zusätzlich zu den potenziellen GATA- und Egr-1 Transkriptionsfaktorbindestellen, die bereits im Vektor pSEAP1-1,9kb deletiert waren, die Sequenz des SSRE. Dieses Element scheint demnach an der scherstressabhängigen Regulation des Tsp-1 Promotors essentiell beteiligt zu sein.

Einen weiteren Hinweis, dass das SSRE für die scherstressabhängige Regulation des Tsp-1 Promotors zwingend notwendig ist, liefern die Ergebnisse des Vektors pSEAP1-mSSRE, bei dem die scherstressabhängige Erniedrigung der Transkriptionsaktivität durch Mutation des SSRE vollständig unterbunden wurde.

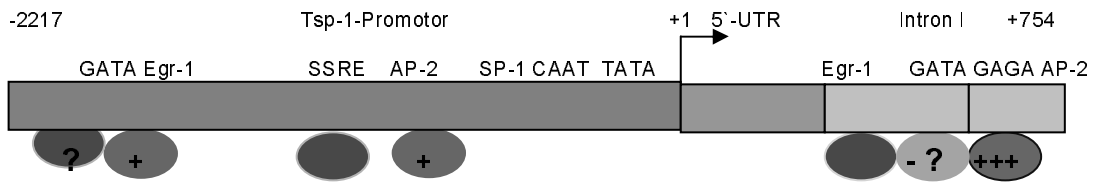
Der Vektor pSEAP1-2,2kb (Sequenzbereich -2217 bis +33) zeigte im Vergleich zu seiner statischen Kontrolle keine scherstressabhängige Aktivitätserniedrigung, obwohl hier das SSRE noch vorhanden ist. Dies lässt auf das Vorhandensein weiterer essentieller, scherstressabhängig regulierter Elemente innerhalb der deletierten Region des Vektors pSEAP1-2,2kb schließen. Innerhalb des Sequenzbereiches von +33 bis +352 befindet sich eine potenzielle Egr-1 Transkriptionsfaktorbindestelle, die demnach ebenfalls an der scherstressabhängigen Regulation des Tsp-1 Promotors beteiligt sein könnte.

Da durch Deletion von nur einem der beiden Elemente, SSRE oder Egr-1, die Scherstressabhängigkeit des Tsp-1 Promotors vollständig unterbunden werden konnte, lässt das darauf schließen, dass beide Elemente zur scherstressabhängigen Genregulation des Tsp-1 Gens benötigt werden.

Zusammenfassend stellt sich folgende Regulation auf Transkriptionsebene dar (Abbildung 7.1): Das SSRE an der Position -1123 im Promotor des Tsp-1 Gens hat einen Einfluss auf die scherstressabhängige Transkriptionsregulation, da ein Entfernen dieses Elementes entweder durch Deletion des Promotorbereiches von Position -2217 bis -1081 (pSEAP1-1,8kb) oder durch Mutation der Kernbindesequenz (pSEAP1-mSSRE) einen Verlust der scherstressabhängigen Transkriptionserniedrigung zur Folge hat.

Innerhalb des Sequenzbereiches +33 bis +352 scheint ebenfalls ein cis-aktives Element lokalisiert zu sein, dass an der scherstressabhängigen Regulation des Tsp-1-Gens beteiligt ist, da eine Deletion dieses Bereiches (pSEAP1-2,2kb) ebenfalls einen Verlust der scherstressabhängigen Transkriptionserniedrigung zur Folge hat. An der Position +157 befindet sich eine potenzielle Egr-1 Transkriptionsfaktorbindestelle, die hierfür verantwortlich sein könnte.

Ob innerhalb der Region von -2217 bis -1189 ein weiteres cis-aktives Element zur scherstressabhängigen Regulation lokalisiert ist, konnte nicht eindeutig geklärt werden, da der Vektor pSEAP1-1,9kb im Vergleich zum Wildtyp-Promotor nur eine schwache Erniedrigung der Transkriptionsaktivität um 38 % zeigte.



- +++ = starker Enhancer
- + = Enhancer
- = Scherstressabhängige Transkriptionsfaktorbindestelle
- ? = Repressor

**Abb. 7.1:** Schematische Darstellung des Tsp-1 Promotors mit möglichen Enhancerregionen, Repressorregionen und scherstressrelevanten cis-aktiven Elementen.



## 8. Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die scherstressabhängige Expression des Thrombospondin-1 auf Transkriptionsebene reguliert wird. Durch Deletionsanalysen des Tsp-1 Promotors konnten als mögliche Elemente, die an dieser Regulation beteiligt sind, das SSRE und eine Egr-1 Bindestelle identifiziert werden. Ob zwischen den Positionen -2217 bis -1189 ebenfalls scherstressabhängig regulierte cis-aktive Elemente vorhanden sind, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Mutationen der möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen in diesem Bereich könnte hier Klarheit schaffen. Die Deletionsanalysen konnten zwar darauf hinweisen, dass in der jeweiligen Promotorregion bedeutsame Elemente vorhanden sind. Ob diese Bereiche wirklich aktiv sind oder von Transkriptionsfaktoren unter den entsprechenden Bedingungen gebunden werden, konnte aus den vorliegenden Ergebnissen nicht beantwortet werden. Hierzu müssten im Weiteren Band Shift Analysen mit Zellextrakten aus dynamisch und statisch kultivierten Zellen zeigen, ob überhaupt eine Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit den vermuteten DNS-Bereichen stattfindet. Weiterhin müsste über Super-Shift-Analysen mit spezifischen Antikörpern untersucht werden, um welche Proteine es sich hierbei handelt.

## 9. Literatur

Adams, J. C., (1995), Formation of stable microspikes containing actin and 55 kDa actin bundeling protein, fascin, is a consequence of cell adhesion to thrombospondin-1: implications for the anti-adhesive activities of thrombospondin-1. *J. Cell Sci.* 108, 1977-1990.

Adams, J. C. (1997), Thrombospondin-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 861-865

Alberts, B. Bray, D. Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. *Molecular Biology of the Cell*, 3<sup>rd</sup> Edition, Garland Publishing, New York (1994)

Apenberg, S., *Mechanismen und Strukturen der zellulären Mechanorezeption in Endothel- und Glatten Gefäßmuskelzellen*, Dissertation, Fachbereich Chemie, TU Darmstadt. (2004)

Arends, M. J., Morris, R. G., Wyllie, A. H., Apoptosis. The role of vascular endothelial cells by FGF deprivation, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 168(3), 1194 – 1200. (1990)

Asakura, T., Karino, T., Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronaryarteries, *Circ. Res.*, 66, 1045 –1066. (1990)

Baenziger, N.L., Brodie, G. N. and Majerus, P.W. (1971), A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 240-249

Bein, K., Simons, M., Thrombospondin-type-I-repeats interact with matrixmetalloproteinase 2 *J. Biol. Chem.* 275: 32167-32173 (2000)

BenEzra, D., Griffin, B. W., Maftzir, G., Aharonov, O., Thrombospondin and in vivo angiogenesis induced by basic fibroblast growth factor or lipopolysaccharide. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 3601-8, (1993)

Bergmann, E. C., *Charakterisierung der Genexpression von Thrombospondin-1 und des humanen dezidualen Progesteron-induzierten Proteins (DEPP) in humanen Endothelzellen durch Wandschubspannung als Mechanismus der Angioadaptation*. Dissertation Charité Universitätsmedizin Berlin.

Bongrazio, M., Da Silva, A., Bergmann, E. C., Baum, O., Hinz, B., Pries, A. R., Zarkzewicz, A., Shear stress modulates the expression of thrombospondin-1 and CD36 in endothelial cells in vitro and during shear stress induced angiogenesis in vivo. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 19 (1): 35-48, (2006)

Bonifacino, J. S. (1998), Metabolic labeling with amino acids. *Current protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons.

Bonifacino, J. S., Dell Angelica, E. C., Sprinter, T.A. (1999), Immunoprecipitation. *Current protocols in Molecular Biology*, Wiley and Sons.

Bornstein, P., Sage, E.H., (1994), Thrombospondines. *Methods in Enzymology*, 245, 62-85

Bornstein, P. (2001), Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J. Clin. Inv.*, 107, 929-934.

Breathnach, R., Chambon, P., *Annu. Rev. Biochem.* 50: 349-384 (1981)

Briggs, M. R., Kardonaga, J. T., Bel, S. P., Tijan, R., *Science*, 234: 47-52 (1986)

Busse, R., Fleming, I., Hecker, M., (1993) Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation. *14*: 2-9

Campell, J. H., Campell, G. R., Endothelial cell influences on vascular smooth muscle phenotype, *Annu. Rev. Physiol.* 48, 295 – 306. (1986).

Chen, H., Herndon, M. E., Lawler, J., The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix biology*, 19: 597-614, (2000)

Davies, P. F., Remuzzi, A., Gordon, E. J., Dewey JR, C. F., Gimbrone JR, M. A. (1986). Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2114 – 2117.

Davies, P. F. (2000). Spatial hemodynamics, the endothelium, and focal atherogenesis. A cell cycle link? *Circ. Res.*, 86, 114 – 116.

De Paola, N., Gimbrone JR, M. A., Davies, P.F., Dewey JR, C.F. (1992). Vascular endothelium responds to fluid shear stress gradients, *Arterioscler. Thromb.*, 12, 1254 – 1257. [Erratum: *Arterioscler. Thromb.* 1993, 13, 465].

De Paola, N., Davies, P. F., Pridchard, W. F., Florenz, L., Haberneck, N., Polacek, D. C. (1999). Spatial and temporal regulation of gap junction connexin 43 in vascular endothelial cells exposed to controlled disturbed flows in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3154 – 3159.

Dawson, D. W., Volpert, O. V., Pearce, S. F. A., Schneider, A. J., Silverstein, R. L., Henkin, J., Bounck, N. P., Three distinct D-amino acid substitutions confer potent antangiogenic activity on an inactive peptide derived from a thrombospondin-typ I-repeat. *Molec. Pharmacol.* 55: 332-338, 1999

Diamond, S. L., Sharefkin, J. B., Dieffenbach, C., Frasier-Scott, K., McIntire, L. V., Eskin, S. G. (1990) Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress. *J. Cell Physiol.* 143 (2): 364-71

Dobrin, P. B., Littooy, F. N., Endean, E. D. (1989). Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts, *Surgery*, 105, 393 – 405.

Dorahy, D. J., Lincz, L. F., Meldrum, C. J., Burns, G. F., Biochemical isolation of membrane microdomain from resting platelets highly enriched in the plasma membrane glycoprotein CD 36, *Biochem.* 319: 67-72, (1992).

Fissthaler, B., Boengler, K., Fleming, I., Schaper, W., Busse, R., Deindl, E., Identification of a cis-element regulating transcriptional activity in response to fluid shear stress in bovine aortic endothelial cells. *Endothelium* 10(4-5): 267-75, (2003)

Fajardo, L.F. (1989). The Complexity of Endothelial Cells, *Am. J. Clin. Path.* 92, 241 – 250

Freyberg, M. A., Kaiser, D., Graf, R., Bottenbender, J., Friedl, P., Proatherogenic flow conditions initiate endothelial apoptosis via thrombospondin-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286: 584-588 (2001)

Freyberg, M. A., Kaiser, D., Graf, R., Vischer, P., Friedl, P., Integrin associated Protein and thrombospondin-1 as endothelial mechanosensitive death mediators. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271: 141-149 (2001)

Friedl, P., Vischer, P., Freyberg, M. A., The role of thrombospondin-1 in apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 1347-1357, (2002)

Freyberg, M.A., Entwicklung eines modularen Perfusionssystems für die Zellkultur zur Untersuchung des fluidmechanischem Einflusses auf die Zellphysiologie, Dissertation, Fachbereich Biologie, TU Darmstadt. (1999)

Freyberg, M. A., Kaiser, D., Graf, R., Friedl, P. (2001). Vascular endothelial cells express a functional fas-receptor due to lack of hemodynamic forces, *Apoptosis*, 6, 339 – 343. (2001)

Friedl, P., Tatje, D., Czaplak, R. An optimized culture medium for human vascular endothelial cells from umbilical cord veins, *Cytotechnology* 2, 171 – 175. (1989)

Friedl, P., Labitzke, R., (2001), A serumfree medium formulation supporting growth of human umbilical cord vein endothelial cells in long term cultivation. *Cytotechnology*, 35, 87-92.

Feitsma, K., Hauser, H., Robenek, H., Kresse, H., Vischer, P., Interaction of thrombospondin-1 and heparan sulfate from endothelial cells. Structural requirements of heparan sulfate., *J. Biol. Chem.* 275 (13): 9396-402, (2000)

Folkman, H., Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors, *Science*, 235, 442 – 447.

Frisch, S. M., Morisaki, J. H., Positive and negative transcriptional elements of the human Type IV-Collagenase gene. *Mol. Cell. Biol.* 10(12): 6524-6532 (1990)

Gashler, A., Sukhatme, V. P. (1995), Early growth response protein (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 50: 191-224

Goldstein, G., Betz, L. Die Blut-Hirn-Schranke. Spektrum der Wissenschaft (1986)

Graf, R. Mechanismen und Strukturen der Mechanoperzeption in humanen Endothel- und Bindegewebszellen, Dissertation, Fachbereich Biologie, TU Darmstadt. (2001).

Graf, R., Freyberg, M., Kaiser, D., Friedl, P. Mechanosensitive induction of apoptosis in fibroblasts is regulated by thrombospondin-1 an integrin-associated protein (CD47), *Apoptosis*, 7, 493-498 (2002).

Gray, H., Gray's Anatomy (Williams, P. L., Warwick, R., Dyson, M., Bannister, L. H., eds.), 37<sup>th</sup> edition, Churchill Livingstone. (1989)

Galbusera, M., Zoja, C., Donadelli, R., Paris, S., Morigi, M., Benigni, A., Figliuzzi, M., Remuzzi, G., Remuzzi, A., Fluid shear stress modulates von Willebrand factor release from human vascular endothelium., *Blood*, Vol. 90, No 4, 1558-1564 (1997).

Gaubatz, S., Imhof, A., Dosch, R., Werner, O., Mitchell, P., Buettner, R., Eilers, M., Transcriptional activation by myc is under negative control by transcriptionfactor AP-2. *EMBO J.* 14 (7): 1508-1519 (1995).

Gimbrone, M. A., Shefton, E. J., JR., Cruise, S. A. (1978). Isolation and primary culture of endothelial cells from human umbilical vessels, *TCA Manual*,. 4(2), 813 – 817.

Grosschedl, R., Birnstiel, M., Spacer DNA sequences upstream of the T-A-T-A-A-A-T-A sequence are essential for promotion of the H2A histone gene transcription in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 1432-1436 (1980).

Guo, N. H., Drutsch, H. C., Inman, J. K., Roberts, D. D., Tsp-1 and type-I-repeat peptides of tsp-1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. *Cancer Res.* 57: 1735-1742, 1997.

Gupta, K., Gupta, P., Solovey, A., Hebbel, R. P. (1999), Mechanism of interaction of thrombospondin-1 with human endothelium and inhibition of sickle erythrocyte adhesion to human endothelial cell by heparin. *Biochem. Biophys. Acta*, 1453, 63-73.

Goldstein, G., Betz, L. (1986). Die Blut-Hirn-Schranke. Spektrum der Wissenschaft.

Hacke, K., Untersuchungen zur Scherstressabhängigkeit der Proteinbiosynthese von Thrombospondin-1 in humanen Nabelschnurvenenendothelzellen. Diplomarbeit TU Darmstadt.

Ham, R. G., Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 53, 288. (1965).

Hanahan, D., Studies on Transformation of Escherichia coli with Plasmids, J. Mol. Biol. 166, 557 – 580. (1983).

Hilger-Eversheim, K., Moser, M., Schorle, H., Buettner, R., Regulatory roles of AP-2 transcription factor in vertebrate development, apoptosis and cell cycle control., Gene 260: 1-12 (2000)

Helisch, A. Ware, J. A., Therapeutic angiogenesis in ischemic heart disease, Thrombosis and Haemostasis, 82(2), 772 – 780. (1999).

Hogg, P. J., Thrombospondin-1 as an enzyme inhibitor. Thromb. Haemost. 72: 787-792 (1994)

Houston, P., White, B. P., Campell, C. J., Braddock, M., Delivery and Expression of Fluid Shear Stress-Inducible Promoters to the Vessel Wall: Applications for Cardiovascular Gene Therapy. *Human Gene Therapy* 10, 3031-3044. (1999).

Iscoe, N. N., Melchers, F. Complete replacement of serum by albumin, transferrin and soyabean lipid in cultures of lipopolysaccharide reactive B lymphocytes, J. Exp. Med. 147, 923 – 933. (1978).

Jaffe, E. A. (1984)., Biology of endothelial cells. Martinus Nidhoff Publishers.[<http://www.geocities.com/HotSprings/Spa/3430/marqueurs/thrombo1.htm>]

Iruela-Arispe, M. L., Lombardo, M., Krutsch, H. C., Lawler, J., Roberts, D. D., Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type-I-repeats. *Circulation*, 100: 1423-31, 1999

Janz, A., Seignani, C., Kenyon, K., Ngo, C. V., Thomas-Tikhonenko, A., Activation of the myc oncoprotein leads to increased turnover of thrombospondin-1 mRNA. *Nucleic Acids Research*, Vol. 28 (11): 2268-2275 (2000)

Jimenez, B., Volpert, O. V., Crawford, S. E., Febbraio, M., Silverstein, R. L., Bouck, N., Signals leading to apoptosis dependent inhibition of neovascularisation by thrombospondin-1, *Nature Medicine*, 6: 41-48, (2000)

Joseph-Silverstein, J., Silverstein, R. L. (1998). Cell adhesion: an overview, *Cancer Investig.*, 16(3), 176 – 182.

Kaiser, D., Scherstress – ein lebenswichtiger Reiz für das vaskuläre Endothel, Dissertation, FB Chemie, TU Darmstadt. (2000).

Kaiser, D., Freyberg, M. A., Friedl, P., Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231: 586-590, (1997)

Kaufmann, R. J., Pipe, S. W. (1999). Regulation of factor VIII expression and activity by von Willebrand factor, *Thrombosis and Haemostasis*, 82(2), 201 – 208.

Kennedy, G. C., Rutter, W. J., (1992), Pur-1, a zinc-finger protein that binds to purin-rich sequences, transactivates an insulin promotor in heterologous cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1: 11498-502.

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. R., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, 26, 239 – 257.

Khachigian, M. L., Anderson, K. R., Halnon, N. J., Gimbrone, M. A., Resnick, N., Collins, T., Egr-1 is activated in endothelial cells exposed to fluid shear stress and interacts with a novel shearstress response element in the PDGF A chain promotor. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 17: 2280-2286 (1997)

Khachigian, L. M., Early growth response-factor in cardiovascular pathobiology. *Circ.Res.* 98: 186-191 (2006)



Khachigian, L. M., Early growth response-1: Blocking Angiogenesis by Shooting the messenger. *Cell Cycle* 3:1 10-11 (2004)

Ku, D. N., Giddens, D. P., Zarins, C. K., Glagov, S. (1985). Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress, *Atherosclerosis*, 5, 293 – 302.

Laherty, C. D., Gierman, T. M., Dixit V M, Characterization of the promotor region of the human thrombospondin gene. DNA sequence within the first intron increase transcription. *J. Biol. Chem.* 264(19): 11222-7, (1989)

Lan, Q., Mercurius, K. O., Davies, P. F. (1994). Stimulation of transcription factors NF kappa B and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 201(2), 950 – 956.

Lawler J. (2000), The functions of thrombospondin-1 and 2. *Current Opinion in Cell Biology*, 12: 634-640

Lawler J. (2002), Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J. Cell. Mol. Med.* Vol. 6, No 1, pp.1-12

Lemarchand, P., Jaffe, H. A., Danel, C., Cid, M. C., Kleinman, H. K., Stradford-Perricaudet, L. D., Perricaudet, M., Pavirani, A., Lecoq, J. P., Crystal, R. G. (1992). Adenovirus-mediated transfer of a recombinant human alpha 1-antitrypsin cDNA to human endothelial cells, *Proc. Natl. Acac. Sci. USA* 89, 6482 – 6486.

Lewin, B., *Molekularbiologie der Gene*, 6. Auflage, Heidelberg: Berlin: Spektrum Akademischer Verlag (1998).

Lindl, T., Bauer, J. (1994), *In Zell und Gewebekultur*, 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York

MacFarlane, M., Williams, A. C., Apoptosis and disease: a life and death decision. *EMBO reports*, 5: 674-678, (2004)

Malek, A. M., Gibbons, G. H., Dzau, V. J., Izumo, S. (1993). Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium, *J. Clin. Invest.*, 92, 2013 – 2021.

Malek, A. M., Jackman, R., Rosenberg, R. D., Izumo, S. (1994). Endothelial expression of Thrombomodulin is reversibly by fluid shear stress. *Circ. Res.*, 74, 582 – 585

Malek, A. M., Izumo, S. (1996). Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodelling in response to fluid shear stress. *J. Cell Sci.*, 109, 713-726.

Megumi M, Yoshikazu M, Fumi T, Sachio M, Toshiyuki S, Activator protein-1 mediates shear stress induced prostaglandin D synthase gene expression in vascular endothelial cells. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 25: 970-975, (2005)

Meyer D, Baumgartner H R, Role of von Willebrand factor in platelet adhesion to the subendothelium. *Br. J. Haematol.* 54: 1 (1983)

Miao W, Seng W L, Duquette M, Laus C, Detmar M, Lawler J, Thrombospondin-1 type I repeat recombinant proteins inhibit tumor growth. *Blood*, 97: 1689-1696, (2001)

Miyakawa A A, Junqueira M, Krieger J E, Identification of two novel shear stress responsive elements in rat angiotensin I converting enzyme promoter. *Physiol. Genomics*, 17: 107-113, (2004)

Murphy-Ulrich J. E., Schultz-Cherry S., Hook M., Transforming growth factor- beta complexes with thrombospondin-1: mechanism and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* (2000), 11: 59-69

Nakatsuka H, Sokabe T, Yamamoto K, Sato Y, Hatakeyma A, Ando J, Shear stress induces hepatocyte Pai-1 gene expression through cooperative Sp1/Ets-1 activation of transcription. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 291 (1): G26-34, (2006)

Nicosia R F, Tuszynski G P, Matrix bound thrombospondin promotes angiogenesis in vitro. *J. Cell Biol.*, 124: 183-93, (1994)

Nor J E, Mitra R S, Sutorik M M, Mooney D J, Castle V P, Polverini P J, Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. *J. Vasc. Res.*, 37: 209-18, (2001)

Ohno, M., Cooke, J. P., Dzau, V. J., Gibbons, G. H., (1995), Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade. *J. Clin. Invest.* 95 (3): 1363-9

Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., Werner, T., (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 11: 4878-84

Rebres, R. A., Vaz, L. E., Green, J.M., Brown, E. J., (2001) Normal ligand binding and signaling by CD47 requires a long range disulfide bond between the extracellular and membrane spanning domains. *J. Biol. Chem.* 276 (37): 34607-16

Rebres, R. A., Green, J. M., Reinhold, M. I., Ticchioni, M., Brown, E. J., (2001) Membrane raft association of CD47 is necessary for actin polymerization and protein kinase C theta translocation in its synergistic activation of T cells. *J. Biol. Chem.* 276 (10): 7672-80

Reidel, U. (1999), Einfluss hämodynamischer Kulturbedingungen auf die Sekretion von Thrombospondin-1 durch humane vaskuläre Endothelzellen. Diplomarbeit, TU Darmstadt

Resnick, N., Collins, T., Atkins, R., Bonthron, D. T., Dewey JR, C. F., Gimbrone JR, M. A. (1992). Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear stress responsive element, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90,4591-4595.

Resnick, N., Gimbrone JR, M. A. (1995). Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression, *The FASEB Journal* 9,

Reznikoff WS, Siegele D A, Cowing D W, Gross C A, *Annu. Rev. Genet.*, 19: 355-387 (1985)

Ruoslahti E, RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 697-715

Ryan, U. S., Rubanyi, G. M. (1992). Endothelial regulation of vascular tone, Marcel Dekker, New York – Basel – Hongkong.

Sadler, J. E. (1998). Biochemistry and genetics of Von Willebrand factor, *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 395 – 424.

Sage, E. H., Regulation of interactions between cells and extracellular matrix: a command performance on several stages. *J. Clin. Invest.* (2001), 107 (7): 781-3

Schmid-Schönbein, G. W., Murakami, H. (1985). Blood flow in contracting arterioles, *Clin. Exp.*, 4, 311 – 328.

Schultz-Cherry S, Chen H, Mosher DF, Miesenheimer T M, Krutsch H C, Roberts DD, Murphy-Ulrich JE: Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin-1. *J Biol Chem* (1995), 270: 7304-7310

Sdougos, H. P., Bussolari, S. R., Dewey JR, C. F. (1984). Secondary flow and turbulence in a cone-plate device, *J. Fluid Mech.*, 138, 379 – 404.

Sheu, J. – R., Yen, M. – H., Kan, Y. – C., Hung, W. – C., Chang, P. – T., Luk, H. –N. (1997). Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti- $\alpha_v\beta_3$  integrin monoclonal antibody, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336, 445 – 454.

Shimizu, Y., Newman, W., Tanaka, Y., Shaw, S. (1992). Lymphocyte interactions with endothelial cells, *Immunology Today*, 3, 106 – 112.

Shyy, Y. J., Hsieh, H. J., Usami, S., Chien, S. (1994). Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in vascular endothelium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(11), 4678 – 4682.

Silverman E S, Tucker C, Pathways of Egr-1 mediated gene transcription in vascular biology, *American Journal of pathology* 154:3 665-670 (1999).

Sokabe T, Yamamoto K, Ohura N, Nakatsuka H, Qin K, Obi S, Kamyia A, Ando J, Differential regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by fluid shear stress in human

coronary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* , 287: 2027-2034, (2004)

Sporn, L. A., Marder, V. J., Wagner, D. D. (1986). Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand Factor multimers, *Cell*, 46, 185 – 190.

Thorne R F, Marshall J F, Shafren D R, Gibson P G, Hart I R, Burns G F, The integrins alpha (3) beta (1) and alpha (6) beta(1) physically and functionally associate with CD36 in human melanoma cells. Requirement for the extracellular domain of CD36, *J. Biol.Chem.*, 275: 35264-75, (2000)

Tolsma S S, Volpert O V, Good D J, Frazier W A, Polverini P J, Bouck N, Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J. Cell. Biol.*, 122: 497-511, 1993

Traub, O., Berk, B. C. (1998). Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18, 677 – 685.

Tschopp T B, Wiss H J, Baumgartner H R, Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von Willebrand`s disease. *J. Lab. Clin. Med.* 83: 296 (1974)

Ueda, N., Shah, S. V. (1994). Apoptosis, *J. Lab. Clin. Med.*, 124, 169 – 177.

Vogel T, Guo N H, Krutsch H C, Blake D A, Hartman J, Mendelovitz S, Panet A, Roberts D D, Modulation of endothelial cell proliferation, adhesion, and motility by recombinant heparin binding domain and synthetic peptides from the type I repeats of thrombospondin-1. *J.Cell Biochem.*, 53: 74-84, (1993)

Volpert O V, Modulation of endothelial cell survival by an inhibitor of angiogenesis thrombospondin-1: a dynamic balance. *Cancer Metastasis Rev.*, 19: 87-92 (2000).

Wagner DD, Cell biology of von Willebrandt factor. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6: 217 (1990)

Wang D, Shin T H, Kudlow J E, Transcription factor AP-2 controls transcription of the human transforming growth factor alpha gene. *J. Biol. Chem.* 272 (22): 14244-14250 (1997)

Ware, J. A. (1999). Cellular mechanisms of angiogenesis.. In: Ware, J.A., Simons, M., eds. *Angiogenesis and Cardiovascular Disease*, New York: Oxford University Press, 30 – 59.

Warren, J. B. ED. (1990) in: *The endothelium: An introduction to current research*. Wiley-Liss, New York.

Wehner, R., Gehring, W., Kühn, A. ( 2003). *Zoologie*, Thieme Verlag, Stuttgart.

Weibel, E. R., Palade, G. E. (1964). *J. Cell. Biol.*, 23,101 – 112.

Williams T, Tijan R, Characterisation of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins. *Science* 251: 1067-1071 (1991)

Williams T, Tijan R, Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcriptionfactor AP-2. *Genes Dev.* 5(4), 670-682 (1991)

Wu, K. K., Thiagarajan, P. (1996). Role of endothelium in thrombosis and hemostasis, *Annu. Rev. Med.*, 47, 315 – 331.

## 10 Anhang

### Sequenz der Sezernierten Alkalischen Phosphatase:

ATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGCCTGAGGCTACAGCTCTCCCTGGGCATCATCCAGTTGAGGAGGAGAACCCTGGACTTCTGGAACCCGG  
AGGCAGCCGAGGCGCTGGGTGCCGCCAAGAAGCTGCAGCCTGCACAGACAGCCGCCAAGAACCTCATCATCTTCTGGGCGATGGGATGGGGGT  
GTCTACGGTGACAGCTGCCAGGATCCTAAAAGGGCAGAAAGGACAACTGGGGCTGAGATACCCCTGGCCATGGACCGCTTCCCATATGTG  
GCTGTGTCCAAGACATACAATGTAGACAAAACATGTGCCAGACAGTGGAGCCACAGCCACGGCTACCTGTGGGGGTCAAGGGCAACTTCCAGA  
CCATTGGCTTGAGTGCAGCCGCCCTTTAACAGTGCACACAGCACAGCCGCAACGAGGTCATCTCCGTGATGAATCGGGCCAAAGAAAGCAGG  
GAAGTCAGTGGGAGTGGTAAACCACACAGAGTGCAGCACGCCTCGCCAGCCGGCACCTACGCCACACGGTGAACCCCAACTGGTACTCGGAC  
GCCAGCTGCCTGCCTCCGCCCGCCAGGAGGGGTGCCAGGACATCGTACGCAGCTCATCTCCAACATGGACATTGACGTGATCCTAGGTGGAG  
GCCAAAGTACATGTTTCGCATGGGAACCCAGACCTGAGTACCCAGATGACTACAGCCAAGGTGGGACCAGGCTGGACGG

### pSEAP-1

TAGTTATTACTAGCGCTACCGACTCAGATCTCGAGGGTACCGGGGCCGGATCCACCGGTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGCCTGA  
GGCTACAGCTCTCCCTGGGCATCATCCAGTTGAGGAGGAGAACCCTGGACTTCTGGAACCCGGAGGCAGCCGAGGCGCTGGGTGCCGCCAAGAA  
GCTGCAGCCTGCACAGACAGCCGCCAAGAACCTCATCATCTTCTGGGCGATGGGATGGGGGTGTCTACGGTGACAGCTGCCAGGATCCTAAAA  
GGGCAGAAAGAGGACAACTGGGGCTGAGATACCCCTGGCCATGGACCGCTTCCCATATGTGGCTGTCCAAGACATACAATGTAGACAAAAC  
ATGTGCCAGACAGTGGAGCCACAGCCACGGCTACCTGTGGGGGTCAAGGGCAACTTCCAGACCATTGGCTGAGTGCAGCCGCCCGCTTTAA  
CCAGTGCACACAGCACAGCCGCAACGAGGTATCTCCGTGATGAATCGGGCCAAAGAAAGCAGGGAAGTCACTGGGAGTGGTAAACCACACAGCA  
GTGCAGCACGCCTCGCCAGCCGGCACCTACGCCACACGGTGAACCCCAACTGGTACTCGGACGCCGACGTGCCTGCCTCGCCCGCCAGGAGG  
GGTGCAGGACATCGCTACGCAGCTCATCTCCAACATGGACATTGACGTGATCCTAGGTGGAGGCCGAAAGTACATGTTTCGCATGGGAACCC  
AGACCTGAGTACCCAGATGACTACAGCCAAGGTGGGACCCAGGCTGGACGGGAAGAACTGGTGCAGGAATGGCTGGCGAAGCCGAGGGTGC  
CGGTATGTGTGGAACCCGACTGAGTTCATGCAGGCTTCCCTGGACCCGTCTGTGACCCATCTCATGGTCTCTTTGAGCCTGGAGACATGAAT  
ACGAGATCCACCGAGACTCCACACTGGACCCCTCCCTGATGGAGATGACAGAGGCTGCCCTGCGCCTGCTGAGCAGGAACCCCGCGGCTTCTT  
CCTCTTCGTGGAGGGTGGTGCATCGACCATGGTTCATGAAAGCAGGGCTTACCGGGCAGTACTGAGACGATCATGTTTCGCACGACGCCATT  
GAGAGGGCGGGCCAGCTCACCAGCGAGGAGGACACGCTGAGCCTCGTCACTGCCGACACTCCCAGTCTTCTCTTCGGAGGCTACCCCTGCG  
GAGGAGCTCCATCTTCGGGCTGGCCCTGGCAAGCCGGGACAGGAAGCCCTACACGGTCTCTATACGGAAACCGTCCAGGCTATGTGGCT  
CAAGGACCGCGCCCGCCGGATGTTACCGAGAGCGAGAGCGGGAGCCCGAGTATCGGCAGCAGTCAAGTGCAGTCCCTGGACGAAAGACCCAC  
GCAGGCGAGGACGTGGCGGTGTTCGGCGCGGGCCGCGAGGCGCACCTGGTTCACGGCGTGCAGGAGCAGACCTTCATAGCGACGTATGGCCT  
TCGCCGCTGCTGGAGCCCTACACCGCCTGCGACCTGGCGCCCCCGCCGGCACACCCGACGCGCGCACCCGGTAAAGCGCCGCGACTCT  
AGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTACTTGTCTTAAAAAACCCTCCCACACCTCCCCTGAACCTGAAACATAAAAATGAATGC  
AATTTGTTGTTAACTTGTATTTATTCAGCTTATAATGGTTACAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTG  
CATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACCTCATCAATGTATCTTAAGCGTAAATTTGAAGCGTAAATATTTTGTAAAATTCGCGTAAATTTTTGT  
TAAATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCCAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAG  
TTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCAAAGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGCGGATGGCCACTACGTGAACCATC  
ACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTCCGTAAGACTCCCGGACTAAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT  
GCGAACGTGGCGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAGCGGGCCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGTCAAGTGCAGCTGCGGTAAACCACAC  
CCGCCGCGCTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAAGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACA  
TTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATATATGAAAAAGGAAGACTCCTGAGCGGAAAGAACCCAGCTGT  
GGAAATGGTGTGTCAGTTAGGTGGTGGAAAGTCCCGAGGCTCCCGCAGGCAAGTATGCAAGCATGCACTCAATTAGTCAGCAACCCAGGTG  
TGGAAAGTCCCGAGGCTCCCGAGCAGGCGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATC  
CCGCCCTAACTCGGCCAGTTCGCCCATTTCTCGGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCCGAGGCGCGCTCGGCCTCTG  
AGCTATTCCAGAAGTAGTAGGAGGCTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAGAGTGCATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTG  
AACAGATGGATTGCAGCAGGTTCTCGGCCGCTTGGCCGCTTGGAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCACACAGACAATCGGCTGCTGTGTC  
CGCCGTGTTCCGGCTGTGAGCGAGGGCGCCCGTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCGAGCG  
CGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGCGCTTCCCTGCGCAGCTGTGCTCGAGTGTGCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAG  
TGCCGGGCGAGGATCTCTGTATCTCACCTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCC  
GGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGCTTGTGCTCATCAGGATGATCTGGAC  
GAAGAGCATCAGGGGCTCGCCGACCCGAACTGTTCCGAGGCTCAAGGCGAGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATG  
CCTGCTTGCAGAAATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTCTGATTCATCGACTGTGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGC  
GTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCAATGGCTGACCGCTTCTCGTGTTCACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGACGCGC  
ATCGCTTCTATCGCTTCTTGACGAGTCTCTGAGCGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGCAAGCAGCAGCCCAACCTGCCATCACGAGA  
TTTTGATTCACCCGCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACCGCGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATG  
CTGGAGTCTTCGCCCAACCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGAC  
AGAATAAACCGCACGGTGTGGGTGTTGTTTCATAAACCGGGGTTCCGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGGAGACCCCATTTG  
GGGCAATACGCCCGGTTTTCTTCTTTTCCACCCCAACCCCAAGTTCCGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACCTCGGGGCGGCGAGG  
CCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATA  
ATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTT  
TCTGCGGTAATCTGCTGCTGCAAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG  
GTAACCTGGCTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTGGCCCAACTTCAAGAACTCTGAGCACCAGCCTA  
CATACTCGCTCTGTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGG  
TAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA  
CTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGATCCGGTAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTC  
CAGGGGAAACGCTGGTATCTTATAGTCTGTCCGGTTTCGCCACTCTGACTGAGCGTCAATTTTTGTGATGCTCTGAGGGGCGGAG  
CCTATGGA AAAACCGCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTCTGTCCTTTTTGCTGACATGTTCTTCTCGGTTATCCCTGAT  
TCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT







pSEAP1-1,9kb

TAGTTATTACTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCACTGAAGTATCATGATAAGAGGAATCCAGGAAGCTAGAGTCATGCTGGCTTGGGA  
CAGTGGCTTGGAGACCAGACTTCAATGACAGAAGCACTAGGCAGCGGCCTCATGGCAATGTGTGACCCACAGAAATGTAAACCACACCTCGG  
GTT CAGGAGCCGAAAAATGAAAAGAACGTTTAGGGAGGAAAAAGGAAATACAATATAGGCAGAGAGTAATTTATTTACTCTATGGGCTGGCT  
TGTAATAGCTAAGACTCTGGAGCCAGATGGTTCTGCAAATCTCCAAACAGGATCACGTTAAGAAGCAGAGTGGGCGACAAAACTGTTTT  
TCAAGACACAATTTCAATTTGGCTTGTGGAACTGGATACGAGTAAGTTTCTTAAAAATTCGAGTAGAAAGCAGCTGCTCCCTCCCGGGCCCTT  
GATGAGAATACGCACACCGCCCCAAGCGGCGGGCCGAGGAGCGCGCGGACGCGGGAGAGGCGTCTCTGTGGGCCCTGGCAGCCGCGGCA  
GGAAAGGGCCGAAGGCAGCGAAGGCGAACGCGGCGCACCAACCTGCCGGCCCGCGACGCGCGCTCACCTCCCTCCGGGGCGGGGCTGGGG  
CCAGCTCAGGACAGGCGCTCGGGGACGCGTGTCTCACCACCGGGACGCTGGAGGAGAGTCAGCGAGGGCCCGAGGGGACAGTACTTTAAC  
GAATGGCTCTCTTGGTGTCCCTGCGCCCGCTCGGCCATTTTTCTTTTTACAAAACGGGCCAGTCTTAGTATCCACCTCTCGCCATCAACC  
AGGCATTCCGGGAGATCAGCTCGCCGAAAGCCCTGCGCCACCCCGGGCCCTCCTAGTGGTCTCCCGACCCCGTCCCTTTTCGGGATGC  
TTGCTGATCACCCGAGCCCGCTGGCGCAAGAGTACGAGCGCCGAGCCCGTGGCGCAAGGCTGCGTGGGCGGGCACCGACTTCTCTGAGAA  
GTTCTAGTGCTCCCAAGCCCCACCCCGCCCCCTTCACTTTCTAGCTGGAAAGTTGCGCGCCAGGCAGCGGGGGGAGAGAGGAGCCGAGA  
CTGGCCACCCCTCCCGCTTCTGCGCCCGCGCCCTTGGCCGAGGAAATCCCGAGGAATGCGAGCGCCCTTTAAAAGCTCCCGCCCTCCT  
CCGCCCTTGCAGCCGCTGCGCCGAGCTGGCTGCGAGTTGAGGGCTCCTGTGCTCTCCAGGACCACTCTACTCCGACGCACAGGCATT  
CCCGCGCCCTCCAGCCCTCGCCGCTCGCCACCGCTCCCGCGCCCGCGCTCCGGTACACACAGGTAAGTCGCCCCGGCGCGCCGAGGA  
CCAAAGCTGCCGGGACATCCACCTGGAGCGCTGAGGCTTCAGTCCCTCTGGTGGACCCCGGAACCTACACTCTCCCGCTCGCTACCCGAC  
CCGCTCCTCTCAGCCGCTGGAGGACTCTT CAGGGCAAGGCTCCAGAGCCATCTCCAGCCTTAGGTT CACAAAACACTCTCGCCATCAACC  
CCAAGATTTCTTACTCTCTGAAGTCTCTTAAAGCTTTGTATCAGCACTCAGGGAAGAGTCTGTACTTCCCTGCCCTCCCTGCAACCCCAA  
ACTACAGTTCCTGATCTTGTCTACCTTGCAGTCTCCAAAAGCCCCAAATGTTGGTCTTGGCGCCCCACACTTTAAAACAGCATCTCTTCT  
CTCCACCT  
GATGGTCCCGGCCCTTCCCCTAGCCAGCCCGTTTCTGCGACGGAATCCCTCCCTAGCTGATCTGTAGCCCTCGGCTTCTGTGCTTCTCTCT  
GCTACAGGATGGTACCGCGGGCCCGGATCCACCGGTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
CCAGTTGAGGAGGAGAACCAGGACTTCTGGAACCGCGAGGCGAGCCGAGGCCCTGGGTGCCGCCAAGAAGCTGCAGCCTGCACAGACAGCCGCA  
AGAACCTCATCATCTTCTGGGCGATGGGATGGGGGTGTCTACGGTGACAGCTGCCAGGATCCTAAAAGGCGAGAAGAAGGACAACTGGGGCC  
TGAGTACCCTGGCCATGACCGCTTCCCATATGTGGCTGTCCAAGACATACAAATGTAGACAAACATGTGCCAGAGTGGAGCCACAGCC  
ACGGCCTACCTGTGCGGGTCAAGGGCACTTCCAGACCATTGGCTTGTGTCAGCCGCCGCTTTAACAGTGCAACACGACACGCGGCAACG  
AGGTCATCTCCGTGATGAATCGGGCAAGAAAGCAGGGAAGT CAGTGGGAGTGGTAACCAACACAGAGTGCAGCAGCCCTCGCCAGCCGGCAC  
CTACGCCACACGGTGAACCGCACTGGTACTCGGACGCGCAGCTGCTGCTCCCGCCCGCAGGAGGGGTGCCAGGACATCGCTACGACGCTC  
ATCTCCAACATGGACATGACCTGATCCTAGGTGGAGGCGGAAAGTACATGTTCGCATGGGAACCCAGACCCCTGAGTACCAGATGACTACA  
GCCAAGGTGGGACCAGGCTGGACGGGAAGAATCTGGTGCAGGAATGGCTGGCGAAGCGCCAGGTTGCCGGTATGTGTGGAACCGCACTGAGCT  
CATGCAGGCTCCCTGGACCCGTCTGTGACCCATCTCATGGTCTCTTGTAGCCTGGAGACATGAATACAGATCCACCGAGACTCCACACTG  
GACCCCTCCTGATGGAGATGACAGAGGCTGCCCTGCGCTGCTGAGCAGGAACCCCGCGGCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT  
ACCATGGT CATCATGAAAGCAGGGCTTACCGGGCACTGATGAGAGCTCATGTTCCGACGACGCCATTGAGAGGGCGGGCCAGCTCCGACGCA  
GGAGGACACGCTGAGCCTCGTCACTGCCGACCCTCCCACGTCTTCT  
CCTGGCAAGGCCCGGGACAGGAAGGCTTACACGGTCTCCTATACGGAACCGGTCCAGGCTATGTGCTCAAGGACGCGCCCGCGCGGATGTTA  
CCGAGAGCGAGAGCGGGAGCCCGAGTATCGGCAGCAGT CAGCAGTGCCTTGGACGAAGAGACCCAGCAGGCGAGGACGTTGGCGGTGTTCGC  
GCGCGCCAAAGCGAGGCGGCGCTGGTTCACGGCGGTG CAGGAGTGCAGGACTCATAGCGCACGT CATGGCTTCCGCGCGCTGCTTGGAGCCCTACAC  
GCCTGCGACCTGGCGCCCCCGCCGACCACCGACGCGCGCACCCGGGTTAAGCGGCCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTT  
GTAGAGGTTTACTTGTCTTAAAAAACCCTCCCACACCTCCCGCTGAACTGAAACATAAAATGAATGCAATTTGTTGTGTTAACTGTTTATTTG  
CAGCTTATAATGGTTACAATAAAGCAATAGCATCACAATTTCAAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTGTGGTGTGTTCCAACT  
CATCAATGTATCTAAGGCGTAAATGTAAAGCTTAATATTTGTTAAATTTGCTTAAATTTTGTAAATTTTGTAAATTTTAAACCAATA  
GGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAG  
AACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTGA  
GGTGGCGTAAAGCACTAAATCGAACCCCTAAAGGGAGCCCGGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTTGGCGAGAAAGGAAGGGAA  
GAAAGCTGTTGCGCAGGCTCAAGGGCAGCATGCGCGCTGGCAAGTGCAGGACTCATAGCGCACGT CATGGCTTCCGCGCGCTGCTTGGAGCCCTACAC  
GGCGCGT CAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGAACCCCTATTTGTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGAC  
AATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATGAAAAGGAAGAGTCTGAGCGGAAAGAACCCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGA  
AAGTCCCAAGGCTCCCGCAGGCGAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATAGTCAGCAACCAGGTGGAAAGTCCCAAGGCTCCCGCAGCAG  
GCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATAGTCAGCAACCATCTCCGCGCCCTAACTCCGCCCCTCCCGCCCTCCCGCCCTCCCGCCCTCCG  
CCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCGAGGCGCCCTCGGCCCTCTGAGCTATTCAGAAGTAGTGAGGAGGC  
TTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATGAAACAAGATGGATTGCACGAGGTTCT  
CCGGCCGCTTGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAAATCGGCTGCTCTGATGCCCGCTGTCCGGCTGT CAGCGCAGG  
GGCGCCCGTCTTTTTGTTGCAAGACCGACCTGTCCGCTGCGCTCAATGAACTGCAAGACGAGGCGAGCCGCTATGTTGGCCAGCCAGGG  
CGTTCTTTCGCGAGCTGTGCTGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTTGGCGAAGTGCAGGGGCGAGGATCTCCTGTCTCT  
CACCTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGCGGCTGCATACGCTTGTCCGGCTACCTGCCATTCGACCACCAAG  
CGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGCTTGTGCTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGC  
CGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGGGCAGCATGCCCCAGCGGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCCGATGCCCTGCTGCCGAATATCATGGTGGAA  
AATGGCCGCTTTCTGGATTCTGACTGTGGCCGGCTGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAG  
AGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCGGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTCTTGAAG  
GTTCTTCTGAGCGGACTCTGGGGTTCGAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACAGATTTTCGATCCACCGCCGCTTCTATG  
AAAGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCGGCTGGATGATPCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCTAGGG  
GAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTCG  
TTTTGTTCAATAACCGCGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTGTGTGATACCCACCGAGACCCCATTTGGGGCAATACGCCCGGCTTCTTCT  
TTTTCCCAACCCACCCCAAGTTCCGGGTGAAGCCCGAGGCTCGCAGCCACCTCGGGCGGCGAGCCCTGCGCATAGCTCAGGTTACTCATA  
TACTTTTTAGATGATTTAAAACCTCATTTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAAGT  
GAGTTTTCTGCTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGTGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAA  
CAAAAAACCCAGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGGCGGATCAAGAGCTACCACTCTTTTTCCGAGGTAAGTGGCTTTCAGCAGAGGGCAGAT  
ACCAAACTACTGCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTCAAGAATCTGTAGCACCOCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTA  
CCAGTGGCTGCTGCCAGTGGGATAGTGTGCTTACCGGTTGGAACCTCAAGACATAGTTAAGGATAGGATAGGATAGGATAGGATAGGATAGGAT  
GGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGTGATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGA  
AGGGAGAAGGGCGGACAGGTTATCCGGTAAGCGGCAGGGTGGAAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTAT  
AGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGTAGCGTGCATTTTTGTGATGCTGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACGCGG  
CCTTTTTACGGTTCTGCGCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTGCTCACATGTTCTTTCTGCTTATCCCCTGATCTGTGGATAACCGTATACCGCCAT  
GCAT

pSEAP1-1,8kb

TAGTTATTACTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTGAATTCACCCACAGAAATGTAAACCACACCTCGGGTTCAGGAGCCGA  
AAAAATGAAAAGAAGCTTTAGGGAGGAAAAAGGAAATACAATAATAGGCAGAGAGTAATTTATTACTCTATGGGTCTGCTCTGTAATAGCTGA  
AGACTCTGGAGCCAGATGGTTCTGCAAATCTCCAAACAGGAGTACAGTTAAGAAGCAGAGTGGGCACAAAACCTGTTTTTCAAGACACAATT  
TCAATTTGGCTTGTGGAACTGGATACGAGTAAGTTTCTTAAATTTAGAGTAGAAGCAGCTGTCTCCCGGGGCCCTTGATGAGAATACGC  
ACACCGCCCCAAGCGCGCGCGAGGAGCGCCGCGGAGAGGCTCTCTGTGGGCCCCCTGGCAGCCGCGGAGGAAAGGCCCCGA  
AGGCAGCGAAGCGAACCGCGCCACCAACCTGCCGGCCCCGCGGACCGCGCTCACCTCCCTCCGGGGCGGGCGTGGGGCCAGCTCAGGACA  
GGCGCTCGGGGGACGCGTGTCTCACCCACCGGGACGGTGGAGGAGAGTACGCGAGGGCCCCGAGGGGACAGTACTTTAACGAATGGCTCTCT  
GGTGTCCCTGCGCCCCGTGGGCCATTTTTCTTTTTACAAAACGGGCCAGTCTCTAGTATCCACCTCTCGCCATCAACCAGGCATTCGGGA  
GATCAGCTCGCCGAAAGCCCTGCGCCACCCCGCGGCCCTCTAGTGGTCTCCCAGCCCCGTCCCTTTTCGGGATGCTTGTGATCACCC  
CGAGCCCGCGTGGCGCAAGAGTACGAGCGCCGAGCCCTGCGCGCAAGGCTCGTGGGGCGGGCACCGACTCTGAGAAGTTCTAGTGTCTCC  
CAAGCCCCGACCCCCGCCCTTCACTTTCTAGCTGGAAGTTGCGCGCCAGGCAGCGGGGGCGGAGAGAGGCCAGACTGGCCCCACCT  
CCCCGTTCTGCCCGCGCGCCCATTTGCCGGAGGAATCCCCAGGAATGCGAGCGCCCTTTAAAGCGCGCGGCTCTCCGCTTGGCAGC  
CGCTGCGCCGAGCTGGCTGCGAGTTTCAAGGCTCTGCTCTCCAGGAGCACTCTACTCCGGACGCACAGGCATTTCCCGCGCCCCCTC  
AGCCTCGCCGCTCCGCAACCGCTCCCGCGCGCGCGCTCCGTTACACAGAGTAACTGCGCCCTCCGCGCGCGCGGACCTTAAAGCCAGCTGCCC  
GGACATCCACCTGGAGCGCTGAGGCTTCACTCCCTCTGGTGGACCCCGGAACCTACACTCTCCCGCTCGCTACCCAGCCCGCTCTCTCAG  
CCGCTGGAGGACTCTTCAAGGCAAGGCTCCAGAGCCATCTCTCCAGCCTTGAGGTTACAAACCACTCATCAGGACACCCCAAGATTTCTCT  
ACTCTCTGAAGTCTCTTAAAGCTTTGTATCAGCACTCAGGGAAGTCTGTACTTTCCCTGCCCTCCCTGCAACCCCAACTACAGTCTCTCT  
ATCTTGTCTACCTTCCATAACCTTCCAAAAGCCCAATTTGGTGTCTTGGCCCTCCACACTTTAAACCCACACTTTAAACCCAGCTTTCTCT  
TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCATGCTCTCTGAAAGTAATCCTGTTGTCTTATTTCAGCAACCGCGGGTCAAAGAGGGATGGTCCCGGCC  
CTGTCCCATGCCAGCCCGTTTTCTGCGCACCGTCCCTCCCTGCTAGCTGATCTCTGACCTCGGCTCTTGTGCTTCTGCTACAGGATGGT  
ACCGCGGGCCCGGATCCACCGGTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGCCCTGAGGCTACAGCTCTCCCTGGGCTCATCCAGTTGAGGAGG  
AGAACCCTCGCTTGGAAACCGAGGACGCGAGGCGCTGGTGGCTGCCAAGAAGCTGCAGCTGCACAGACGCGCCAAAGCACTCATCAT  
CTTCTGGGCGATGGGATGGGGTGTCTACGGTGACAGCTGCCAGGATCCTAAAAGGCGAGAAGAAGGACAACTGGGGCTGAGATACCCCTG  
GCCATGGACCGCTTCCATATATGGCTCTGTCCAAGACATACAATGTAGACAAACATGTGCCAGACAGTGGAGCCACAGCCACGCGCTACCTGT  
GCGGGGTCAAGGGCAACTTCCAGCCATTTGGCTTGTAGTGCAGCGCCCGCTTTAACAGTGAACACGACACGCGGCAACGAGGTCTCCGT  
GATGAATCGGCGCAAGAAAGCGAGGAGTCACTGGGAGTAACTAACACACACAGCTGCAGCACGCTCCGCGCGCGGACCTACGCCACCG  
GTGAACCGCAACTGGTACTCGGACGCGACGCTGCCCTCGCCCGCCAGGAGGGTGGCAGGACATCGCTACGCACTCATCTCAACATGG  
ACATTTGACGTGATCCTAGTGGAGGCCAAAGTACATGTTTCGCATGGGAACCCAGACCTGAGTACCCAGATGACTACAGCCAAGGTGGGAC  
CAGGCTGGACGGGAAGAATCTGGTGCAGGAATGGCTGGCGAAGCGCCAGGTTGCCGGTATGTGTGAACCGCACTGAGCTCATGCAAGCTCC  
CTGGACCGCTCTGTGACCCATCTCATGGTCTCTTTGAGCCTGGAGACATGAAATACGAGATCCACCGAGACTCCACTGGACCCCTCCCTGA  
TGGAGATGACAGAGGCTGCCCTGCGCTGCTGAGCAGGAACCCCGCGGCTTCTTCTCTCGTGGAGGGTGGTGCATCGACCATGGTCTATCA  
TGAAGCAGGGCTTACCGGGCACTGACTGAGACGATCATGTTGCAGCAGCCATTTAGAGGGCGGCCAGCTCACAGCGAGGAGGACACGCTG  
AGCCTCGTCACTGCGCCACTCCACGCTTCTCTCTTCCGGAGCTACCCCTGCGAGGGAGCTCCATCTCGGGCTGGCCCTGGCAAGGCC  
GGGATCAAGGGCCACTACACCGTCCCTCTACGGAACCGTCCAGCTATGCTGCTCAAGGACGCGCCCGCCGCGGCTTTACCGGAGCGGAG  
CGGGAGCCCCGATATCGGACGAGTCAAGCAGTGCAGTGCCTGGACGAAGAGACCCACGCGAGGCGAGGACGTGGCGGTGTTCGCGCGCGGCCGAG  
GCGCACTGGTTCAGCGCTGCAGGAGCAGACCTTATAGCGCAGCTCATGGCTTCGCGCGCTGCTGGAGCCCTACACCGCTGGCACTGG  
CGCCCCCGCGCGCACCCGACGCGCGCACCCGGTAAAGCGCGCGGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTAC  
TTGCTTTAAAAAATCTCCCAACCTCCCGCTGAACTGAAACATAAAATGAATGCAATTTGTTGTTAACTGTTTATTGAGCTTATAAATGG  
TTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTTAGTTTGGTGTTCGCAAACTCATCAATGTATCT  
TAAGGCGTAAATTTAAGCGTAAATTTTTGTAAAATTCGCGTAAATTTTGTAAAATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAATCGGC  
AAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCA  
ACGTCAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCTACGTTGAACCATACCCTAATCAAGTTTTTGGGGTCTAGGTTAGGCTCCGAGT  
ACTAAATCGGAACCCTAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCGCGCAACGTTGGCGAGAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGA  
GCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCAAGCTGCGCGTAAACACACACCGCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGGTGAGTGG  
GCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTTCAAATATGATCCGCTCATGAGACAAATACCCTGATA  
AATGCTTCAATAATTTGAAAAGGAGAGTCTGAGGGGAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
CCCCAGCAGGCGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATAGTCAAGCAACAGGTTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCGAAGTATGCA  
AAGCATGCATCTCAATAGTCAAGCAACCATAGTCCGCCCCAATCCGCCCCAATCCGCCCCAGTCCGCCCCATTCTCCGCC  
CATGGCTGACTAATTTTTTTATTTATGACAGAGGCGGAGGCGCCCTCGGCTCTGAGCTATTTCCAGAAGTGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCC  
TAGGCTTTTGCAGAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGTCTGTTGCTGATGATTGAACAAGATGGATTGCAGCAGTCTCCGCGCGCTTTGGG  
TGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGGTTCGGCTGTGAGCGAGGGGCGCCCGGTCT  
TTTTGTCAAGACCGACTGTCGGTGCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGCGGTCTCTGCGCA  
GCTGTGCTCGAGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTTGGCGAAGTGGCGGGGAGGATCTCCTGTCTACCTACCTGCTGCTG  
CCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGCGGCTGCATACGCTTTGATCCGGCTAACCCTGCCATTCGACCACCAAGGAAACATCGCAT  
CGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCGGCTTGTGCGATCAGGATGATCTGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTGCC  
AGGCTCAAGGCGAGCATGCCGACGCGGAGGATCTCGTCTGACCATGGCGATGCTGCTTCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCGCTTTT  
CTGGATTCTGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATGCTGAAGAGCTTGGCGGCGA  
ATGGGTGACCGCTTCTGAACTTTACGGTATGCGCGCTCCGATTCCGAGCGCATCGCTTCTATCGCTTCTTGACAGGTTCTTCTGAGCG  
GGACTCTGGGTTGAAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTGATCCACCGCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTT  
CGGAATCGTTTTCCGGGACGCGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTCTTCGCCACCCCTAGGGGGAGGCTAACTGAA  
ACACGGAAGGAGCAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTGTTTTGTTCAATAAC  
GCGGGTTCCGTTCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCACCGAGACCCCATTTGGGGCCAATACGCCCGGTTTTCTCTTTCCGCCACCCCA  
CCCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATT  
GATTTAAACTTCATTTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACAAAATCCCTTAACTGAGTTTTCTGTTCC  
ACTGAGCGTCAAGCCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGTCTTTTTTCTGCGCGTAACTGCTGCTTGCACAACAAAAAACCCAC  
GCTACACAGCGGTGGTTTTGTTGCGGATCAAGAGCTACCACTTTTTTCCGAAGTAACTGGCTTCAGGAGGCGGAGATCAAAAATACTGTCT  
CTTCTAGTGTAGCGTAGTTAGGCCACCACTCAAGAAGTCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTG  
CCAGTGGCGATAAGTCTGTTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTCAC  
ACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAAGCGCCAGCTTCCCGAGGGGAGGAAAGCGG  
GACAGGTATCCGGTAAGCGGAGGCTCGGAACAGGAGAGCGGACGAGGAGTCTCCAGGGGAAAGCGCTGATCTTATAGTCTGTGCGGTT  
TTCCGCCACTCTGACTTTGAGCGTCAATTTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCTATGGAAAACCGCCAGCAGCGCGGCTTTTTACGGTT  
CCTGGCTTTTTGCTGGCTTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATCTGTGGATAACCGTATTACCGCATGCAT

pSEAP1-1,4kb

TAGTTATTACTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCAACTGAAGTATCATGATAAGAGGAAAGGGCTTTGTGTTTGAGATAAGCAGCTCCTATA  
CCTGT CAGCTTTCTCTAATAAGAAAAGCTCTTTCCCTGCCACCGTATAGGTACACCTTCTATTGGTAAGGCATGATGAAGTTTGGAACTGTTGT  
CCTTGTGTTTGTGTAAGAAGCCAAGTCCAAAGAACTGTCAGAGGCATTCTACAATCCCTCAGCCATGGCAGCATGAATCCTGAAGGGGCAGT  
GAGTGTGGTTTCTACTGTCTGTCACAGCTAAGCCTAGGGGAGATAACTTTTTATACAAGATGCATTCTGCTTTTGTGGGCTCTTGACGCC  
CTCAAGCCCCCATCTGATTTGTACACAATGATCCAGTGGGCCAGAGGAGCCAGAGCCATGAGCGGCCATCCCTCCAAGAATACTTTCTGACT  
GTCAGTATCATGGAGCAAGTGGAAAGAAGAAAAAACCCTAATTTCTTTTCGAGAGCAAGATGAATGCTGTAGAAGGAGAAGGAAGGGGA  
GGGAGATGGATGGGTGCCGATTCCAGAATCTTCAGATCTGCTGGATGAATCATTACCTATGATTTGCGGGACAAGAATCTGATTTTATTTCATC  
AACCAGTAGAACTTTCTTTCTGCTCCCAACATCTGAAATCCAACAACATGTGCCTTAGGAACATACCGGTCATCTTTTAGAGGCATTTTA  
TATACATATTGAGTAACTAGAAAACACTCTTTCCGTAATAC  
AGAAAAGCGAACTGCTGTTGATGAATGTAACACTTGGCTGTTTGCAGCAGTCCGGAGTCTGCCGAGTTAAGTGTAAAGATGGGAGGTGA  
ACCCAGGGGTTTCCCCCTGCCCGTCTGAGATCCTATTGTTGCTCAAGCTTCTACCTATGCCTCGGCCTCGGAGCGAGCCGATAGCGCTGGAT  
CACAGCAGAGGGAGCGAGGCGGCTGACGTCCCCTCCGAGAGATGAATGTTTCCAGGAAGCTAGAGTCACTGCTGGCTGGGACAGTGGCTT  
GGAGCCAGACTTCAATGACAGAAGCACTAGGCAGCGGCCTCATGGCAATGTGTGCACCCACAGAAATGTAACCCACACCTCGGGTTCAGGAG  
CCGAAAAATGAAAAGACGTTTAGGGAGGAAAAGGGAAATACAATAATAGGCAGAGAGTAAATTTACTCTATGGGTCTGCTCTGTAATAG  
CTGAAGACTCTGGAGCCAGATGGTCTGCAAAATCTCCAACAGGAGTCAAGTAAAGAAGCACAGAGTGGGCACAAAAACTGTTTTCAAGCACA  
ATTTCAATTTGGCTTGTGAAACTGGATACGAGTAAAGTTTCTTAAAATCGAGTAAAGAAGCAGTCTCCTCCCGGGCCCTTGGTACCGCG  
GGCCCGGATCCACTCGGTATGCT  
CGGACTTCTGGAACCGGAGGCAGCGAGGCGCTGGTGCOCGAAGAAGCTGCAGCCTGCACAGACAGCGCCAAAGAACCTCATCATCTTCT  
GGGCGATGGGATGGGGTGTCTACGGTGACAGCTGCCAGGATCCTAAAAGGGCAGAAAGGACAACTGGGGCTGAGATACCCCTGGCCATG  
GACCGCTTCCCATATGTGGCTCTGTCCAAGACATAACAATGTAGACAAACTGTGCCAGACAGTGGAGCCACAGCCAGGCTACCTGTGCGGG  
TCAAGGGCAACTCCAGACCTTGGCTTGGTGCAGCGCCCGCTTAAACAGTGCACACGACACGCGGCAACGAGTCACTCCGTGATGAA  
TCGGGCCAAGAAAGCAGGGAAGTCAAGTGGGAGTGGTAACCACCACAGAGTGCAGCACGCCTCGCCAGCCGGCACCTACGCCACAGGTAAC  
CGCAACTGGTACTCGGACGCGACGCTGCCTGCCTCCGCGCCAGGAGGGGTGCCAGGACATCGCTACGCAGCTCATCTCCAACATGGACATTTG  
ACGTGATCCTAGTGGAGGCGAAAGTACATGTTTGCATGGGAACCCACAGCCTGAGTACCCAGATGACTACAGCCAAGTGGGACCCAGGCT  
GGACGGGAAGATCTGGTGCAGGAATGGCTGGCGAAGCGCCAGGTCGCGGCTGTGTGGAACCCGCACTGAGTCTGAGGCTTCCCTCGGAC  
CCGTCTGTGACCCATCTCATGGTCTCTTTGAGCCTGGAGACATGAAATACGAGATCCACCAGAGACTCCACACTGGACCCCTCCCTGATGGAGA  
TGACAGAGGCTGCCCTGCGCCTGCTGAGCAGGAACCCCGCGGCTTCTTCTCTTCTGTTGGAGGGTGGTGCATCGACCATGGTCAATGAAAG  
CAGGGCTTACCGGGCACTGACTGAGACGATCATGTTTCGACGACGCCATGAGAGGGCGGGCCAGCTCACAGCGAGGAGGACAGCTGAGCCTC  
GTCACCTCCGACCACTCCCAGCTTCTTCTCGGAGGCTACCCCTGCGAGGAGCTCCATCTTCCGGGTCGGCCCTGCAAGGCGCCGAGACA  
GGAAGGCCATACCGGTCCTCCTATACGGAACGGTCCAGGCTATGTGCTCAAGGACGCGCCCGCGGATGTTACCGAGAGCGAGAGCGGGAG  
CCCCGAGTATCGGCAGCAGTCAAGCAGTGCCTGGACGAAGAGACCCAGGCGAGGAGCGTGGCGGTGTTGCGCGCGCGCCCGCAGGCGCAC  
CTGGTTCACGCGTGCAGGAGCAGACCTTATAGCGCACGCTCATGGCCTTCCGCGCTGCCTGGAGCCCTACACCCGCTCGACCTGGCGCCCT  
CCGCGGCAACTGCGCGCCGACCCCGGTTAAGCGCGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGTTTATAGGTTTACTG  
TAAAAAACCCTCCCACACCTCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTTGTTGTTAACTTGTATTATGACAGCTTATAATGGTTACAA  
ATAAAGCAATAGCATCACAATTTACAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAAGGC  
GTAATTTGAAGCGTAAATATTTGTTAAAATTCGCGTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATC  
CCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTTCTAAATATGTGTTGGAACAAGAGTCCACTATAAAGACCTGGAAGGCT  
AAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTGGGGTGGAGGTGCGGTAAGCACTAAA  
TCGGAACCTAAAGGGAGCCCGGATTTAGAGCTTACGCGGAAAGCCGCGAAGCTGGCAGAAAGGAAGGAAAGGAAAGGAGCGGGC  
GCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACACACCCGCGGCTTAAATGCGCCGTACAGGGCGCTCAGGTGAGCATT  
TTCCGGGAAATGCGCGGAAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATATGTTTCTAAATATGTTTCTAAATATGTTTCTAAATATGTTTCTAAAT  
TCAATAATATGAAAAAGGAAGAGTCTGAGGGCGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTGAGTTAGGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAG  
CAGGCAGAAATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACAGGTTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCAT  
GCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCAGCCCTAATCCGCCCCTACCCGCCCCTAACCTCCGCCCAGTCCGCCCCTTCTCCGCCCCTGGC  
TGACTAATTTTTTATTTATTTACGAGAGCCGAGGCGCCTCGGCCCTGAGCTATCCAGAAAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGTGT  
TTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTCGCATGATGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGA  
GGCTATTCGGCTATGACTGGGCACACAGACAATCGGCTGCTGATGCCGCCGTGTCCGGCTGTGAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGT  
CAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCGCGGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTCTCTGCGCAGCTGTG  
CTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATGGGCGAAGTGGCCGGGACAGGATCTCCTGTATCTCACTTGTCTCCTGCGGAGA  
AAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGTACCGGCTACCTGCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCG  
AGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTGTGATCAGGATGATCTGGACGAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTC  
AAGGGCAGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCTGCTGCGGAAATATCATGGTGGAAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT  
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTGGCTACCCGTGATATGCTGAAGAGCTTGGCGCGCAATGGGC  
TGACCCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTACGAGTCTCTGAGCGGGACTC  
TGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCAGGAGATTTGATTTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAAT  
CGTTTTCCGGGACCGCGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCCGCCACCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGG  
AAGGAGACAATAACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAAAGCACGAGTGTGGGTGTTTTGTTCAATAAACCGCGGG  
TTCCGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCATTTGGGGCAATACGCCCGGCTTCTTCTTTTCCCCACCCACCCCCC  
AAGTTCCGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATGATTTA  
AACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTTAGTTTTCTGTTCCACTGAG  
CGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTCCAAACAAAAAACCACCGCTACC  
AGCGGTGGTTTGTGTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTGTCTCTA  
GTGTAGCCGTAGTTAGGCCACACTTCAAGAACTCTGTAGCAGCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTACAGTGGCTGCTGCCAGTG  
GCGATAAGTCTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCG  
CAGCTTGGAGCGAACGACCTACCCGAGTACCTACAGCGTGGAGTATGAGAAAGCGCCAGCTTCCGAAAGGAGAAAGGAGGAGGACAGG  
TATCCGGTAAAGCGGAGGGTCCGAAACAGGAGAGCGCACAGGAGGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGGGTTTCGCC  
ACCTCTGACTGAGCGTCAATTTTTGTGATGCTGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAAGCGGCTTTTTACGGTCTCTGGC  
CTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCTCGGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTTACGCCATGCAT





pSEAP1-2,6kb

TAGTTATTACTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCAACTGAAGTATCATGATAAGAGGAAAGGGCTTTGTGTTTGAGATAAGCAGCTCCTATA  
CCTGTGAGCTTTCTCTAATAAGAAAGCTCTTTCCCTGCCACCGTATAGGTCACCTTCTTATGGTAAGGCATGATGAAGTTTGGAACTGTTGT  
CCTTGTGTTTGTGTTGAAAGAAGCCAGTTCCAAGAAATCTGCAGAGGATTCTCTACAATCCCTCAGCCATGGCAGCATGAATCCTGAAGGGGCGAGT  
GAGTGTGGTTTCTACTCTGTGCACAGCTAAGCCTAGGGGAGATAATCTTTTCATACAAGATGCATTCTGCTTTTGTGGGCTCTTTCAGGCC  
CTCAAGCCCCCATCTGATTTGTACACAATGATCCAGTGGGCCAGAGGAGCCAGAGCCATGAGCGGCCATCCCTCCAAGAACTTTCTGACT  
GTCCAGTATCATGGAGCAAGTGGAAAGAAGAAAAAACCCTACTTTTCGAAAGCAAGATGAATGCTGTAGAAGGAGAAGGAAGGGGA  
GGGAGATGGATGGGTGCCGATTCCAGAATCTCAGATCTGCTTGGATGAATCATTACCTATGATTTGCGGGACAAGAATCTGATTTTATTCTATC  
AACAGTAGAAACTTTCTTCTGCTCCCAACATCTGAAATCCAACAACATGTGCCTTAGGAACATACCGGTCTATCTTTAGAGGCATTTTA  
TATACATATTTAGTAACTAGAAAACACTCTTTCCGTAATAC  
AGAAAAGCGAACTGCTGTTTGTGATGAATGTAACACTTGGCTGTTTGCAGCAGTCCGGAGTCTCGCCGAGTTAAGTGCTAAGATGGGAGGTGA  
ACCCAGGGGTTTCCCCCTGCCGTTGCTGAGATCCTTATTTGGTCAAGCTTCTACCTATGCTCGGCCCTCGGAGCGAGCCCGATAGCGTGGAT  
CACAGCAGAGGGAGCGAGGCGGCTGACGTCCCATCCGAAAGATGAATGAAATCCAGGAAGCTAGAGTCACTGTGGCTTGGGACAGTGGCTT  
GGAGCAGACTCAATGACGAAGCACTAGGTAAGCGGCTCATGCGAATGTGTGCACCCACAGAAATGTAACCCACCTCGGGTTCAGGAG  
CCGAAAAATGAAAAGACGTTTAGGGAGGAAAAGGAAATACAATAATAGGCAGAGAGTAAATTTATTACTCTATGGGCTGCTCTGTAAATAG  
CTGAAGACTCTGGAGCCAGATGGTCTGCAAAATCTCCAACAGGAGTCAAGTAAAGAAGCACAGTGGGCACAAAAACTGTTTTCAAGACAC  
AATTTCAATTTGGCTTGTGAAACTGGATACGAGTAAAGTTTCTTAAAATTCGAGTAGAAAGCAGCTGTCTCCCGGGCCCTTGTAGAGAAAT  
ACGCACACCGCCCAAGCGCCGCGGAGGGAGCGCCGCGGCTCAAGGGAGTCTCTGTGGGCCCTGAGGAAAGGAGTGGGAAAGGAGT  
CCGAAGGCAGCGAAGGCGAACGCGCGCACCACTGCGGCCCGCGCAGCGCGCTCACCTCCCTCCGGGGCGGGCTGGGGCCAGCTCAG  
GACAGGCGCTCGGGGGACGCGTGTCTCACCCACGGGGAGCGTGGAGGAGAGTCAAGCGAGGGCCCGAGGGGCGAGTACTTTAACGAATGGCTC  
TCTTGGTGTCCCTGCGCCCGTGGGCCATTTTCTTTTACAACAGGGCCAGTCTCTAGTATCCACCTCTGCCATCAACCAGGCTATCC  
GGGAGATCAGTCCGCCGAAAGCCCTCGCCACCCCGCGGCTCTCCCGAGCCCTCCCTTTCGGGTTTCCGGATGCTTGTGCTGCT  
ACCCCGAGCCCGCTGGCGCAAGAGTACGAGCGCCGAGCCGCTGCGCGCAAGGCTGCGTGGGCGGGCACCGACTTCTCTGAGAAGTCTAGTG  
CTCCAAGCCCGACCCCGCCCTTCACTTTCTAGCTGAAAGTTTGGCGCCAGGCAGCGGGGGCGGAGAGAGGCCAGACTGGCCCCC  
ACCTCCCGCTTCTGCGCCGCGCGCCCATTTGGCCGGAGGAATCCCGAGAAATGCGAGCGCCCTTAAAGCGCGCGCTCTCCGCTGCTG  
CAGCGCTGCGCCGAGCTGGCTGCGAGTTCAGGATGTTACCGCGGGCCCGGATCCACCGGTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG  
AGGCTACAGCTCTCCCTGGGCATCATCCAGTTGAGGAGGAGAACCCGACTTCTGGAACCGCGAGGCAGCCGAGGCCCTGGGTGCCGCAAGA  
AGCTGCAGCTGCACAGACAGCCGCAAGAACCTCATCATCTCTGGGCGATGGATGGGGGTGTCTACGTTGACAGTGCAGGATCCTAAA  
AGGGCAGAAAGGACAACTGGGGCTGAGATACCCCTGGCCATGGACCGCTCCCATATGTGGCTCTGTCCAAGACATACAATGTAGACAAA  
CATGTGCCAGACAGTGGAGCCACAGCCAGGCGCTACCTGTGGGGTCAAGGGCAACTCCAGACCATGGCTTGGTGCAGGAGCCCGGCTTTA  
ACCAGTGCACACGACGCGGCAACGAGGTCATCTCCGTGATGAATCGGGCCAAGAAAGCAGGGAGTCAAGTGGGAGTGGTAACCCACACG  
AGTGCAGCAGCCTCGCCAGCCGCGACCTACGCCACAGCGTGAACCGCAACTGTTACTCGGACGCGACGCTGCTGCTCCGCGCCAGGAG  
GGGTGCCAGGACATCGTACGCAGCTCATCTCAACATGGACATGACGTTGATCCTAGGTGGAGGCCGAAAGTACATGTTTCGCATGGGAACCC  
CAGACCCCTGAGTACCCAGTACTACAGCCAAAGTGGAGCCAGGCTGAGCCCTGTCAGTGCAGAAATCTGGTGCAGAAATGGCTGGCAGGCGC  
CCGGTATGTGTGGAACCGCACTGAGCTCATGCAGGCTTCCCTGGACCCGCTGTGTACCCATCTCATGGGTCTCTTTGAGCCTGGAGACATGAAA  
TACGAGATCCACCGAGACTCCACACTGGACCCCTCCCTGATGGAGATGACAGAGGCTGCCCTGCGCTGCTGAGCAGGAACCCCGGGCTTCT  
TCCTCTTCTGTGGAGGTTGGTCCGATCGACCATGGTCAATGAAAGCAGGGCTTACCGGGCACTGACTGAGACGATCATGTTCCGACGACCCAT  
TGAGAGGGCGGGCCAGTACTACAGCGAGGAGGACACGCTCGTCACTGCCGACACTCCACGCTTCTCTCTTGGGAGTGGAGTGGTCCCTCG  
CGAGGGAGCTCCATCTTGGGCTGGCCCTGGCAAGGCCCGGACAGGAAGGCTACACGGTCTCTATACGGAAACGGTCCAGGCTATGTGC  
TCAAGGACGCGCCCGCCGGATGTTACCAGAGAGCGAGAGCGGGACCCCGAGTATCGGCAGCAGTCAAGCAGTGCCTGGACGAAGAGACCCA  
CGCAGGCGAGGACGTTGGCGGTGTTGCGCGCGGCCCGCAGGCGCACCTGGTTACGGCGTGCAGGAGCAGACCTCATAGCGCAGCTCATGGCC  
TTGCGCCCTGCTGGAGCCCTACACCCCTGCGACCTGCGCCCGCCCGCGCCCGGACCCAGGACCCAGGAGCGCGCGCTTAAGCGCCCGCAGT  
TAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTACTTGTCTTAAAAACCTCCACACCTCCCTGAACTGAAACATAAAATGAATG  
CAATGTGTTGTGTTAACTTGTATGTCAGCTTATAATGTTACAATAAAGCAATAGCATCACAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCTACT  
GCATTTAGTGTGGTTTGTCCAACCTCATCAATGATCTTAAAGCGTAAATGTAAGCGTAAATATTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTTG  
TTAAATCAGCTATTTTTAACCAATGAGCCGAAATCGGAACTCCCTTATATAAATAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTTAGGTTGTTTCCA  
GTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCAT  
CACCTAATCAAGTTTTTTGGGTCGAGGTGCCGTAAGCACTAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCGATTTAGAGTGTGACGGGAAAGCC  
GGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAAGCGAAAGGAGCGGGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTGACGCTGCGCTAACCCACACA  
CCCGCCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAAGGGCGGCTTTCGGGAAATGTCGCGGAAACCCCTATTGTTTATTTCTAAATAC  
ATTCAAATATGATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAGAGTCTGAGGCGGAAAGAACAGCTG  
TGGAAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGAAAGTCCCGAGGCTCCCGAGCAGGAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATAGTCAGCAACCAT  
GTGGAAAGTCCCGAGGCTCCCGAGCAGGCGAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAATCCGCCCC  
CCCGCCCTAATCCCGCCAGTTCCGCCCCATTCCGCCCCATTCCGCCCCATTGCTACTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGAGCGAGGCGCC  
GAGCTATTCAGAAGTAGTGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATG  
GAACAAGATGGATTGCACGAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATCGGCTATGACTGGGCACACAGACAATCGGCTGCTGTATG  
CCGCGGTGTTCCGGCTGTGAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACTGTCCGGTGCCTGAATGACTGCAAGACGAGGCGAGC  
GCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGGCGAGCTGTGCTCGAGTGTGACTGAGAGCGGAAAGGAGTGGCTGCTATTGGGCGAA  
GTGCCGGGCGAGGATCTCCTGTCTCACCTTGTCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGGCGGCTGCATACGCTGTATC  
CGGCTACCTGCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTGTGCTGATCAGGATGATCTGGA  
CGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGAGGCTCAAGGCGAGCATGCCGACGCGGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGAT  
GCCGCTTGCAGAAATCATGTTGGAAATGGCCGCTTTCTGGATTCACTGAGTGTGGCCGCTGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAG  
CGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCG  
CATCGCTTCTATCGCTTCTTACGAGGTTCTTCTGAGCGGACTCTGGGTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCACTGCCATCAGGATCAGGAT  
GTTTCGATTCACCGCCGCTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGAAATCGTATTTCCGGGACGCGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCAT  
ACTTGGAGTTCTTCCGCCACCTAGGGGAGGCTAAGTAAACAGGAGGAGACATACCGGAAGGAAACCCGCTATGACGGCAATAAAAGA  
CAGAAATAAACGACCGGTTGTTGGTCTTGTTCATAAACCGGGGTTCCGGTCCCGAGGCTGGCACTCTGTGCTATACCCACCGAGACCCCAT  
GGGGCAATACGCCCGCTTCTTCTTTTCCCAACCCCAAGTTCCGGGTGAAAGCCAGGGCTCGCAGCCACGTCGGGGCGGCGAGG  
CCCTGCCATAGCCCTCAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTCTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGT  
AATCTCATGACCAAATCCCTTAAAGTGGTTTTCTGGATTCACTGAGCTCAGACCCGAGGAGAAAGATCAAGAGTCTTCTGAGATCCTTTT  
TCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCACAAACAAAAAACCACCGCTACAGCGGTTGGTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAA  
GGTAACTGGCTTACGAGAGGCGAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCGGTAGTTAGGCCACCACTCAAGAACTCTGTAGCACCGCT  
ACATACCTCGCTCTGTAATCCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGG  
ATAAGGCGCAGCTGCGGTGCGGTGAACGGGGGTTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCAACTGAGATACCTACAGCTGGA  
GCTATGAGAAAGCGCCAGCTTCCGAAAGGAGAAAGCGGACAGGATACCGTAAAGCGGAGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTT  
CCAGGGGAAACCGCTGGTATCTTTATAGTCTGCGGTTTCCGACCTCTGACTTGGCGTCTGATTTTTGTGATGCTGTCAGGGGGCGGGA





AAACGCGGGGTTCCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCTTTTCCCCAC  
CCCACCCCAAGTTCCGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTA  
GATTGATTTAAAACATCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAAGTGAGTTTTCG  
TTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCACAAAAA  
CACCGCTACCAGCGGTGGTTGTTTGCCTGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATACCAAAATAC  
TGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCT  
GCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTG  
GCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAA  
GGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCTC  
GGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGCGCTTTTTTAC  
GGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAAACCGTATTACCGCCATGCAT

### Aminosäuresequenz Thrombospondin-1

MGLAWGLGVLFLMHVCGTNRIPESGGDNSVFDIFELTGAARKGSGRRLVKGFPDSSPAFRIEDANLI PVPDDKFQDLVDVAVRTEKGFLLLASL  
RQMKKTRGTLALERKDHSGQVFSVVSNGKAGTLDLSLTVQKQHVVSVEEALLATGQWKSITL FVQE DRAQLYIDCEKMENAELDVPIQSVFT  
RDLAS IARLR IAKGVNDNFQGV LQNVRFVFGTTPEDILRNKGCSSSTSVLLTLDNNVVGSSPAIRTNYIGHKTKDLQAI CGISCEDELSSMVL  
ELRGLRTIVTTLQDSIRKVFTEENKELANELRRPPLCYHNGVQYRNN EEWTVDSCTECHCQNSVTICKKVSCPIMPSCNATVPDGECCPRCWPSD  
SADDGWSPWSEWTSCTSCGNGIQQRGRSCDSLNNRCEGSSVQTRTCHIQCCKR FKQDGGWSHWSPWSSCSVTCCGDVITRIRLCNSPS PQMN  
GKPCGEARETKACKKDACPINGGWG PWS PWDICSVTCGGGVQKR SRLCNNPT PQFGGKDCVGDVTENQICNKQDCPIDGCLSNPCFAGVKCT S  
YPDGSWKCGACPPGYSGNGIQCTDVDECKEVPDACFNHNGEHRCENTDPGYNCLPCP PRFTGSQPFQGGVEHATANKQVCKPRNPCTDGTDCN  
KNAKCNLYLGHYS DPMYRCECKPGYAGNGIICGEDTDLDGWPNENLVCVANATYHCKKDNC PNL PNSGQEDYDKDGIGDACDDDDNDKI PDDR  
NCPFHYNPAQYDYDRDDVGDRC DDCPNYHNPDQADTDNNGEGDACAADI DGDGILNERDNCQYVYVNDQRDTDMDGVDQDCDNC PLEHNPDQLD  
SDSDRIGDTCDDNQDIDEDGHQNNLDNCPYVFNANQADHDKDGKGDACDHDNDNDGI PDDKDNCR LVPNPDPQKDS DGDGRGDACKDDFDHDSVP  
DIDDI CPENVDISETDFRRFQMI PLDPKGT SQNDPNWVVRHQGKELVQTVNCDPGLAVGYDE FNAVDFSGTFFINTERDDDYAGFVFGYQSSSR  
FYVVMWKQVTQSYWDTNPTRAQGYSGLSVKVVNSTTG PGEHLRNALWHTGNT PGQVRTLWHDPRHIGWKDFTAYRWRLSHRPKTGFTRVVMYEG  
KKIMADSGPIYDKTYAGGR LGLFVFSQEMVFFS DLYE CRDP

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Daniela Rupp, geb. Sattler  
Anschrift Weiskircher Strasse 56  
63110 Rodgau Jügesheim  
Geburtsdatum 19. 07. 1975  
Geburtsort Offenbach  
Staatsangehörigkeit deutsch  
Familienstand verheiratet, 1 Kind

## Schulischer Werdegang

08/82 bis 06/86	Carl-Orff-Schule, Jügesheim	Grundschule
08/86 bis 06/88	Georg-Büchner-Schule, Jügesheim	Förderstufe
08/88 bis 06/92	Georg-Büchner-Schule, Jügesheim	Gymnasium
08/92 bis 06/95	Georg-Kerschensteiner-Schule, Obertshausen	Oberstufe Abschluss: Abitur

## Studium

10/95 bis 04/2001 Technische Universität Darmstadt Diplom Studiengang Biologie.  
Diplomarbeit am Institut für Biochemie. Thema: „Die Charakterisierung des scherstressabhängigen Elementes SSRE mittels eines destabilisierten grün fluoreszierenden Proteins.“  
Abschluss: Diplom (Gesamtnote: „Mit Auszeichnung bestanden“)

## Dissertation

10/01 bis 10/07 Technische Universität Darmstadt Dissertation  
Anfertigung der Dissertationsarbeit am Institut für Biochemie unter der Leitung des Herrn Prof. Dr. P. Friedl  
Thema: „Die scherstressabhängige Regulation der Thrombospondin-1 Expression“

## Sonstiges

02/05 bis 05/06 Mutterschutz und Elternzeit

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Rodgau, den

(Daniela Rupp)

