

**Identifizierung eines
N-Methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin spezifischen
mRNA-Expressionsmusters im C3H-M2 Mausfibroblasten-
Transformationssystem**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Shao Shi

aus Peking, P. R. China

Hamburg 2006

Für meine Familie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2002 bis Mai 2006 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. H. Marquardt am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. H. Marquardt
2. Gutachter: Prof. Dr. P. Grunwald

Tag der letzten mündlichen Prüfung (Rigorosum): 08.09.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung (Summary).....	1
2	Einleitung.....	4
2.1	Tumore und Krebs.....	4
2.2	Chemische Kanzerogenese.....	4
2.3	Tumorkinetik.....	6
2.4	Ras und Rab.....	9
2.4.1	Ras.....	9
2.4.1.1	Einführung.....	9
2.4.1.2	Modifizierung der Ras-Proteine.....	10
2.4.1.3	Ras als molekularer Schalter.....	11
2.4.1.4	Ras-Mutation und Anti-Ras-Medikamente.....	13
2.4.2	Rab.....	13
2.4.2.1	Einführung.....	13
2.4.2.2	Modifizierung der Rab-Proteine.....	15
2.4.2.3	Rab als molekularer Schalter.....	15
2.4.2.4	Vesikulärer Transport.....	17
2.5	Toxikogenetik.....	18
2.6	Genexpressionsanalysen.....	19
2.7	Differential Display Analyse (DD-Analyse).....	21
2.8	Aufgabenstellung.....	23
2.8.1	Methodischer Teil.....	23
2.8.2	Identifizierung eines MNNG-spezifischen mRNA- Expressionsmusters im CH3-M2-Fibroblasten-System.....	25
3	Material und Methoden.....	26
3.1	Verwendete Geräte, Software und Chemikalien.....	26
3.2	Zellkulturen.....	27
3.3	Allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	29
3.3.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch OD-Messung...	29

3.3.2	Charakterisierung von Nukleinsäuren durch Chip-Elektrophorese.....	29
3.3.3	Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	31
3.3.4	Ethanol-fällung von DNA.....	32
3.3.5	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	32
3.3.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	34
3.3.7	Entfernung von Primern aus einem Reaktionsansatz.....	35
3.4	Arbeiten mit RNA.....	36
3.4.1	RNA-Isolierung nach Qiagen.....	36
3.4.2	RNA-Isolierung nach Chomczynski und Sacchi.....	37
3.5	Reverse Transkription (RT).....	38
3.6	Differential Display PCR (DD-PCR).....	40
3.6.1	Amplifikation im LightCycler.....	41
3.6.2	Amplifikation im Perkin Elmer 9600.....	42
3.7	Direct-Blotting-Elektrophorese.....	44
3.7.1	Herstellung eines Polyacrylamidgels.....	44
3.7.2	Direct-Blotting-PAGE.....	45
3.7.3	Detektion biotinylierter DNA.....	46
3.7.4	Herstellung von Direct-Blottin-Positiv-Kontrollen.....	47
3.8	Reamplifikation immobilisierter DNA von Nylonmembran.....	49
3.9	Arbeiten mit genetisch veränderten Organismen (GVOs).....	51
3.9.1	Ligation von DNA-Fragmenten in pUC18.....	51
3.9.2	Elektroporation von E. coli XL-1 blue.....	52
3.9.3	Blau-Weiß-Selektion.....	53
3.9.4	PCR mit Bakterien als Templat.....	54
3.9.5	Plasmid-Präparation.....	54
3.10	Sequenzanalyse durch „Cycle Sequencing“.....	56
3.11	Verifizierung von identifizierten Zielgenen.....	57
3.11.1	Quantifizierung von Zielgenen.....	58
3.11.2	Quantifizierung von Housekeeping Genen.....	59
3.11.3	Auswertung der quantitativen PCR.....	62
3.11.4	Auswertung der relativen quantitativen PCR.....	63

4	Ergebnisse.....	64
4.1	Optimierung der DD-Analyse.....	64
4.1.1	Erhöhung der DD-PCR-Produktausbeute.....	64
4.1.1.1	DD-PCR unter zusätzlicher Anwendung von DNA-Polymerase....	64
4.1.1.2	DD-PCR unter Anwendung von 14mer-Primern.....	70
4.1.2	Optimierung der Reversen Transkription.....	72
4.1.3	Optimierung der PCR-Amplifikation.....	75
4.1.4	Neueinstellung der Reamplifikationsbedingungen für 14mer-Primer...	79
4.1.5	Erhöhung der Membransensitivität.....	84
4.2	Identifizierung von transformationsrelevanten Genen mittels DD-Analyse.....	88
4.2.1	Charakterisierung der RNA.....	88
4.2.2	Qualitätskontrolle der DD-Amplifikate durch Chip-Elektrophorese....	90
4.2.3	Direct-Blotting-Elektrophorese und Reamplifikation.....	91
4.2.4	Klonierung und Sequenzierung der differenzierten DNA-Fragmente...	96
4.2.5	Relative Quantifizierung durch <i>real time</i> PCR.....	99
4.2.5.1	Quantifizierung des Rab7-Gens.....	99
4.2.5.2	Quantifizierung des GAPDH-Gens.....	101
4.2.5.3	Auswertung.....	104
5	Diskussion.....	106
5.1	Optimierung der DD-Analyse.....	106
5.1.1	Erhöhung der DD-PCR-Produktausbeute.....	106
5.1.2	Optimierung der Reversen Transkription.....	109
5.1.2.1	Reverse Transkription mit 14mer-Primer.....	109
5.1.2.2	RNA-Qualität.....	112
5.1.3	Optimierung der PCR-Amplifikation.....	114
5.1.4	Optimierung der Reamplifikationsbedingungen.....	115
5.1.5	Erhöhung der Membransensitivität.....	116
5.1.6	Methodenkritik.....	118
5.1.6.1	Leistung der DD-Analyse.....	118

5.1.6.2	Falsch-Positive.....	119
5.1.6.3	Reduzierung der falsch positiven Ergebnisse.....	119
5.2	Rab7.....	123
5.2.1	Rab7 im Endozytoseweg.....	123
5.2.2	Rab7 im Autophagieweg.....	126
5.2.3	Rab7 und Krebs.....	128
5.2.3.1	Rab7, Endozytose und Tumorentstehung.....	129
5.2.3.2	Rab7, Autophagie und Tumorentstehung.....	132
5.3	Ausblick.....	137
6	Literaturverzeichnis.....	139

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	bakterielle alkalischer Phosphase
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
Bio	Biotin
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
Cox-1	Cyclooxygenase Isoenzym 1
C _T	Thresholdzyklus
Cys	Cystein
DD	Differential Display
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMBA	7,12-Dimethylbenz(a)anthrazen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	2,2-Bis[4-chlor-phenyl]-1,1,1-trichlorethan
dNDP	Desoxyribonukleotiddiphosphat
dNMP	Desoxyribonukleotidmonophosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
E.coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESTs	Expressed Sequence Tags

FCS	Fötale Kälberserum
G	Guamin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
IL6	Interleukin 6
In Silico	digital
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	kiloDalton
Konz.	Konzentration
max.	maximal
MCA	3-Methylcholanthren
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin
mRNA	messenger RNA
rRNA	ribosomaler RNA
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NF-1	Neurofibromatose Typ I
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PrP	Prion Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription von RNA in cDNA und anschließende Polymerase Kettenreaktion
SA-AP	Streptavidin-Alkalische-Phosphatase
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNPs	Single Nukleotide Polymorphismen

s.o.	siehe oben
sog.	sogennant
s.u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
Xgal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranoside
λ	Wellenlänge
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
x g	Gramm
mg	10^{-3} Gramm
μ g	10^{-6} Gramm
pg	10^{-12} Gramm
L	Liter
mL	10^{-3} Liter
μ L	10^{-6} Liter
M	Mol/Liter
mM	10^{-3} Mol/Liter
μ M	10^{-6} Mol/Liter
cm	10^{-2} Meter
nm	10^{-9} Meter
sec	Sekunde
min	Minuten

h	Stunde
m/v	Masse/Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewichtsprozent pro Volumen
U	Unit
V	Volt
W	Watt

1 Zusammenfassung

Chemische Substanzen in der Umwelt verursachen die Mehrzahl der menschlichen Tumore. Aktuelles Zielvorhaben der Krebsforschung ist die Identifizierung und Charakterisierung substanzspezifischer Kanzerogenese-Gene. Eine Strategie für die Erforschung der Wirkungsmechanismen von chemischen Kanzerogenen besteht in der Analyse differentiell exprimierter Gene auf mRNA Ebene. Die Differential Display Analyse (DD-Analyse) ist eine für Genexpressionsanalysen häufig angewendete Methode, deren größter Nachteil in der hohen Anzahl an falsch positiven Ergebnissen liegt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die DD-Analyse durch eine Kombination von Chip-Elektrophorese, *real time* PCR und Direct-Blotting-Elektrophorese optimiert. Die besten Bedingungen für die Reverse Transkription wurden mit 2 µg RNA-Ansatz und unter Verwendung des Enzyms „Superscript II“ der Firma Invitrogen erzielt. Eine spezifische *real time* Amplifikation konnte nach der Vorschrift von GenHunter unter Verwendung von Qiagen-Chemikalien im LightCycler-System etabliert werden. Bei der Optimierung der Reamplifikationsbedingungen wurden zwei Sorten von Nylonmembran verwendet: positiv geladene Nylonmembran und neutrale Nylonmembran. Die positiv geladene Nylonmembran zeigte stärkere Sensitivität, allerdings waren die darauf immobilisierten DNA-Banden nicht reamplifizierbar. Die neutrale Nylonmembran wies zwar eine geringere Sensitivität auf, gewährleistete aber eine 100%-ige Reproduzierbarkeit von DNA-Banden bei unterschiedlichen Programmen. Der Nachteil der geringeren Sensitivität der neutralen Nylonmembran wurde durch erhöhte Zugabe von SA-AP und Verlängerung von Kopplungszeit und Farbreaktionszeit weitestgehend ausgeglichen. Zur Optimierung der DD-Analyse wurden von der RNA bis hin zu den Expressed Sequence Tags (ESTs) Schritt für Schritt Qualitätskontrollen eingeführt. Schließlich wurde ein optimiertes Protokoll dieses Verfahrens in Hinblick auf eine Reduzierung der Falsch-Positiven erstellt.

Im zweiten Teil dieser Promotionsarbeit wurde die optimierte DD-Analyse zur Erforschung von tumorspezifischen Genen eingesetzt. Hierbei wurde das C3H-M2 Mausfibroblasten-Transformationssystem verwendet. Durch Vergleich der Gesamt-

mRNA-Population aus unbehandelten und mit 0,5 µg/mL sowie 1,0 µg/mL MNNG behandelten M2-Zellen ließen sich 24 differentielle DNA-Banden identifizieren, von denen eine eine 99%-ige Homologie mit dem Rab7-Gen der Ras-Superfamilie aufwies. Weiterhin konnte durch eine (semi-) quantitative PCR festgestellt werden, dass das Rab7-Gen in den mit MNNG (0,5 µg/mL) und MNNG (1,0 µg/mL) behandelten M2-Zellen, jeweils um 650% und 430% höher exprimiert ist im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle.

Das Rab7-Protein spielt sowohl bei der Endozytose als auch bei der Autophagie eine wichtige Rolle. Die festgestellte Überexpression von Rab7 könnte diese Vorgänge verstärken und dadurch nach Ergebnissen in der Literatur ein wichtiges Ereignis in der Zelltransformation darstellen. Es ist denkbar, dass die erhöhte Rab7-Expression eine Folge der Zelltransformation ist und als Marker für transformierte Zellen herangezogen werden kann.

Summary

Chemical substances in the environment cause the majority of human tumors. A current aim of the cancer research is the identification and characterisation of substance-specific carcinogenic genes. One strategy for the study of the mode of action of chemical carcinogens is the analysis of differentially expressed genes on mRNA level. The differential display analysis (dd-analysis) is a method frequently used for the analysis of gene expressions. Unfortunately, this method shows a considerable disadvantage because of a high number of incorrect positive results.

In the first part of this work the dd-analysis was optimized by a combination of chip-electrophoresis, real time PCR and direct-blotting-electrophoresis. The best conditions for the reverse transcription were achieved by using a 2 µg RNA preparation and the "Superscript II" enzyme from the company Invitrogen. A specific real time amplification could be established in the LightCycler system by using Qiagen chemicals, according to the protocol of GenHunter. In order to optimize the reamplifications' conditions two sorts of nylon-membranes were used: a positively charged nylon-membrane and a neutral nylon-membrane. The positively charged membrane showed a higher sensitivity, but the

DNA-band, which was immobilized upon it, could not be reamplified. The neutral membrane proved to be less sensitive, but on the other hand provided a reproducibility of the DNA-bands with different programs up to one hundred per cent. The disadvantage of the low sensitivity of the neutral nylon-membrane was compensated by an increased addition of SA-AP and the extension of the coupling's and the colour-reaction's time. For the optimization of the dd-analysis, quality controls were performed step by step from the RNA up to the Expressed Sequence Tags (ESTs). Finally an optimized protocol of this procedure was made available in order to reduce incorrect positives.

In the second part of this work the optimized dd-analysis was used for the study of tumor-specific genes. Here, the C3H-M2 mouse fibroblast transformation system was used. By comparison of the total-mRNA-population of untreated and with 0,5 µg/mL as well as 1.0 µg/mL treated MNNG M2-cells, 24 differential DNA-bands could be identified. One of these bands showed a homology with the Rab7-Gen of the Ras-superfamily to 99%. Moreover, it was demonstrated by a (semi-) quantitative PCR that the Rab7-gene is higher expressed in the M2-cells treated with MNNG (0.5 µg/mL) and MNNG (1.0 µg/mL), in both cases by about 650% and 430% compared with the untreated control.

The Rab7-protein is known to play an important role in the processes of endocytosis and autophagy. The observed overexpression of Rab7 could support these processes and may represent an important event in the cell transformation, as suggested by the results published in the literature. It is conceivable that the increased Rab7-Expression is a consequence of cell transformation and can be considered as a marker for transformed cells.

2 Einleitung

2.1 Tumore und Krebs

Mit jährlich etwa 210000 Opfern zählen Krebserkrankungen neben kardiovaskulären Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland^[1]. Unter **Krebs** werden **maligne (böartige) Tumore** verstanden, die sich durch ein unkontrolliertes, invasives und destruierendes Zellwachstum und Neigung zur Metastasierung (Ausbildung von Tochtergeschwülsten) auszeichnen^[1,2]. Im Gegensatz zu bösartigen Tumoren halten **benigne (gutartige) Tumore** ihr expansives Wachstum begrenzt^[3]. Sie können zwar das umliegende Gewebe durch Druck und Veränderung schädigen, breiten sich aber nicht in andere Gewebe aus. Benigne Tumore können sich aber zu malignen weiterentwickeln.

Die Krebsentstehung kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden, wie z.B. ionisierende Strahlen, infektiöses biologisches Material, genetische Determinanten sowie chemische Substanzen. Die Mehrzahl der menschlichen Tumore wird durch chemische Substanzen in der Umwelt verursacht^[1].

2.2 Chemische Kanzerogenese

Unter **chemischer Kanzerogenese** versteht man die Entstehung maligner (böartiger) Tumore unter der Einwirkung von Chemikalien. Sie erfolgt - vereinfachend dargestellt - in einem dreistufigen Prozess, bei dem sich nach einer Latenzzeit von Jahren bis Jahrzehnten aus einer normalen Körperzelle schrittweise maligne transformierte Zellen entwickeln: **Initiation, Promotion** und **Progression**.

In der **Tumorinitiationsphase** kommt es in den meisten Fällen zu einem DNA-Schaden, der durch Interaktion mit genotoxischen Substanzen ausgelöst wird und nicht oder nur fehlerhaft repariert werden kann^[4]. Derartige Substanzen werden als **genotoxische Kanzerogene** bezeichnet. Beispielsweise sind chemische Substanzen wie das in dieser Arbeit verwendeten N-Methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG), 3-Methylcholanthren (MCA) und 7,12-Dimethylbenz(a)anthrazen (DMBA, Abb. 1) in der Lage, die DNA zu verändern.

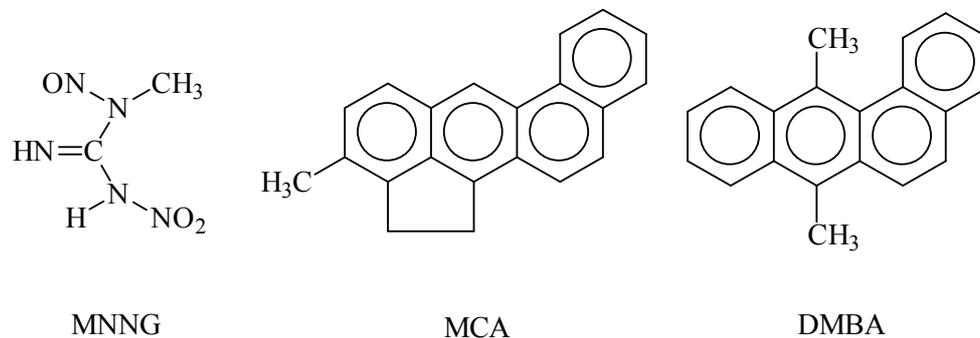


Abb. 1: N-Methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG), 3-Methylcholanthren (MCA) und 7,12-Dimethylbenz[a]anthrazen (DMBA)

Während MNNG direkt mit den zellulären Makromolekülen, insbesondere mit der DNA unter Bildung von DNA-Addukten reagiert, müssen MCA und DMBA erst metabolisch aktiviert werden, um sich als Epoxid-Derivat kovalent an DNA binden zu können.

In der Tumorinitiationsphase wird DNA modifiziert. Diese chemisch modifizierte DNA initiiert Zellen, die bei der Replikation zu Mutationen führen, und diese können zu einem Wachstumsvorteil gegenüber den normalen Zellen führen. Wenn die DNA nicht oder fehlerhaft repariert wird, ist die Tumorinitiation ein irreversibler Prozess.

Epigenetische Kanzerogene sind nicht genotoxisch und besitzen andere biologische Wirkungen: Sie können eine Steigerung der Zellproliferation auslösen und dadurch eine Basis für Kanzerogenität darstellen. Die Homöostase kann z. B. durch Zytotoxizität (gesteigerte regenerative Zellproliferation), chronische Entzündungsreaktionen, hormonale Einflüsse sowie immunologische Wirkungen gestört werden^[1].

In der **Promotionsphase** werden die initiierten Zellen aufgrund ihres Wachstumsvorteils selektiv vermehrt. Diese präferentielle Vermehrung initiiert Zellen führt zum Auftreten von Zellklonen, die auch als präneoplastische Foci bezeichnet werden^[5]. Präneoplastische Foci besitzen einen anderen Phänotyp als Zellen aus Normalgewebe und sind dadurch in der Regel lichtmikroskopisch erkennbar. Die Expression dieses Phänotyps ist in vielen Foci unvollständig und instabil. Nach der Mehrstufentheorie entstehen zufällig neue Phänotypen, die den wachstumshemmenden Mechanismen im Körper mehr und mehr entkommen können^[4].

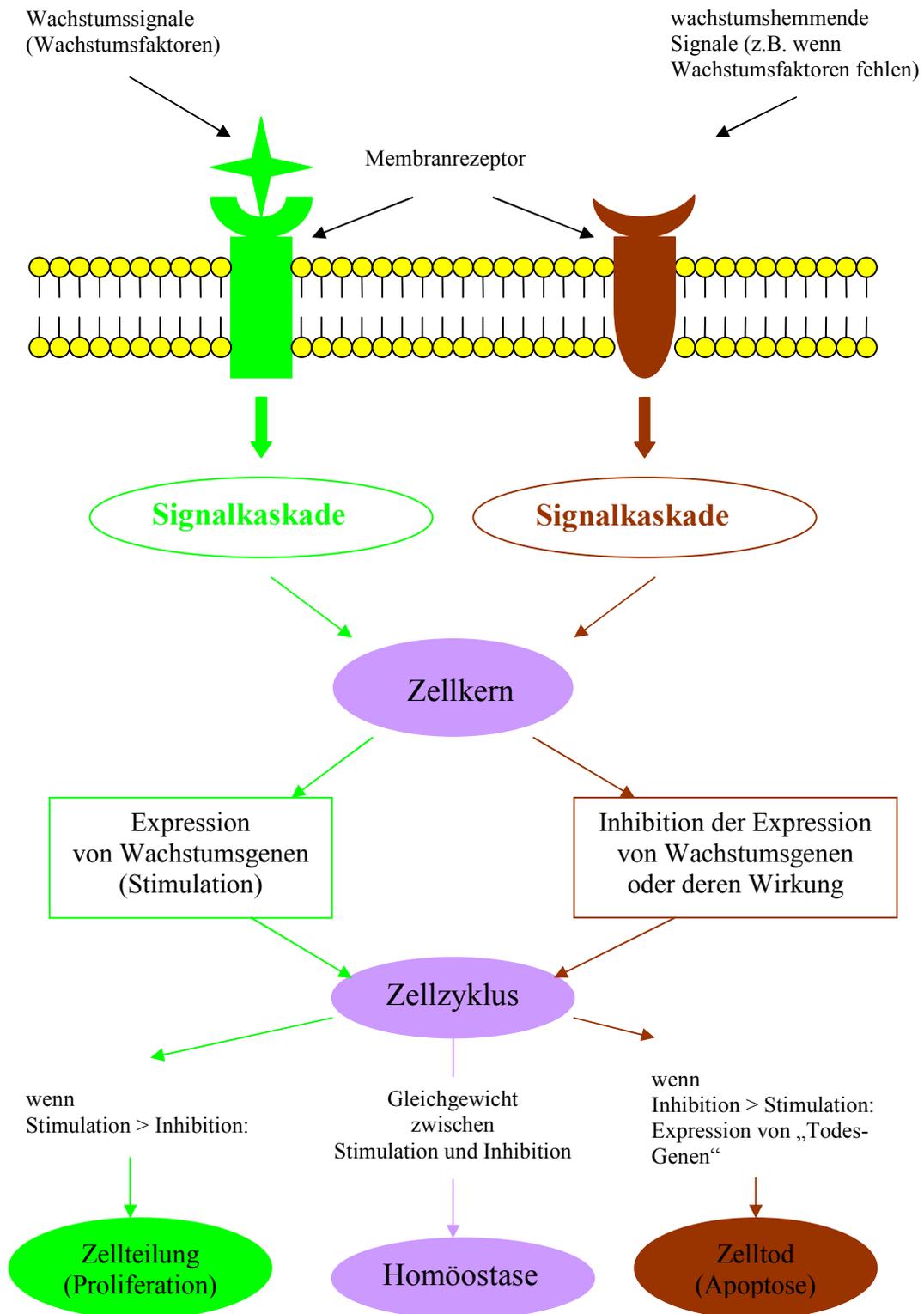


Abb. 3: Die vereinfachte Darstellung des Gleichgewichts zwischen dem Zellwachstum und dem Zelltod (Apoptose) in der normalen Zelle

In Krebszellen sind die zellulären Signal-Mechanismen dauerhaft gestört. Proto-Onkogene, die sich in einer normalen Zelle meistens in den Signalkaskaden befinden, codieren überwiegend Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren und Signalübermittler. Wenn ein Proto-Onkogen mutiert, so entsteht ein Onkogen, das die wachstumsfördernden Signalkaskaden permanent aktivieren kann. Diese aktivierten Signalkaskaden führen dann zu einem unkontrollierten Zellwachstum. Proto-Onkogene sind direkt an der Proliferation und Differenzierung der Zellen beteiligt^[8]. Ein Beispiel hierfür stellt die Familie der **ras-Onkogene** dar, die bei ca. 40% aller menschlichen Tumore und ca. 85% aller Fälle von Mutationen bei Darm-, Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebs nachzuweisen sind^[9,10]. Die von diesen Genen exprimierten Proteine stimulieren permanent das Wachstum und können so die normale Zelle zu einer Krebszelle transformieren.

Im Gegensatz zu Proto-Onkogenen sind Tumorsuppressoren nicht direkt an der Proliferation oder Differenzierung beteiligt. Tumorsuppressor-Gene führen zur Expression von Zellzyklus inhibierenden Proteinen^[8]. Mutiert ein Tumorsuppressor-Gen, so führt dies zum Funktionsausfall des entsprechenden Tumorsuppressors. Dieses kann ebenfalls zu unkontrolliertem Wachstum führen. Ein Beispiel hierfür ist das im Zytoplasma vorkommende Protein des Genes **NF-1**, das ras-Proteine komplexiert, bevor sie zu einer Wachstumsförderung führen können^[11-15]. Ein anderes Beispiel ist der Tumorsuppressor **p53**, der am Ende der G₁- und G₂- Phase in den Zellzyklus eingreift. Liegt ein Schaden vor, so wird die Zellteilung solange herausgezögert, bis der Schaden repariert ist. Ist der DNA-Schaden irreparabel, so wird der Zellzyklus gestoppt und die Apoptose eingeleitet^[16-21]. In der normalen Zelle ist p53 aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von maximal 20 Minuten nur in geringer Konzentration vorhanden^[22]. Nach der Einwirkung von genotoxischen Einflüssen steigt die Konzentration von p53 im Zellkern an. Daher wird p53 auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet^[20]. Es sichert die Integrität des Genoms, in dem ein genetischer Schaden nicht durch Zellteilung auf Tochterzellen weitergegeben werden kann. In mehr als 50% der menschlichen Tumore wurde ein defektes p53-Tumorsuppressorgen gefunden^[8, 23-25]. Damit ist es das häufigste mutierte Tumorsuppressor-Gen.

2.4 Ras und Rab

In Bezug auf die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wird ein kurzer Überblick über das Ras- und Rab-Gen ausgeführt.

2.4.1 Ras

2.4.1.1 Einführung

Das Ras-Gen wurde erstmals im Jahr 1964 aus dem akut transformierten Ratten-Adeno-Sarkom Virus isoliert. Das entsprechende Genprodukt ist ca. 21 kDa groß und an der Plasmamembran lokalisiert^[26]. Mittlerweile sind einige Unterfamilien Ras-homologer Proteine bekannt. Zu ihnen gehören die Ras-, Rab-, Rho-, Arf-, Ran-, Rheb-, Rad-, Rit- und Rag-Proteine, deren Funktionen jeweils in Tab. 1 dargestellt sind. Ras und ihre homologen Proteine bilden die Ras-Familie.

Tab. 1: Funktionen der Mitglieder der Ras-Familie

Ras-Familie	Funktion
Ras (<i>Rat sarcoma</i>)	Beeinflussung von Apoptose, Proliferation und Differenzierung eukaryotischer Zellen ^[27]
Rab (<i>Ras-like proteins from rat brain</i>)	Regulation von den vesikulären Transport ^[28,29]
Rho (<i>Ras homology</i>)	Reorganisation des Zytoskeletts und Kontrolle von Zellwachstum und Genexpression ^[30,31]
Arf (<i>ADP ribosylation factors</i>)	Steuerung des vesikulären Transport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat (und umgekehrt) ^[32,33]
Ran (<i>Ras-related nuclear proteins</i>)	Regulation des Kerntransports ^[34]
Rheb (<i>Ras homolog enriched in brain</i>)	Beeinflussung von Zellwachstum ^[35]
Rad (<i>Ras-associated with diabetes</i>)	noch nicht näher beschrieben ^[36]
Rit (<i>Ras-like expressed in many tissues</i>)	noch nicht näher beschrieben ^[37-39]
Rag (<i>Ras-related GTP-binding proteins</i>)	noch nicht näher beschrieben ^[40,41]

Die Proteine der Ras-Familie sind alle GTP-bindende Proteine. Sie besitzen eine GTP-bindende Domäne und können GTP binden. Im Vergleich zu anderen GTP-bindenden Proteinen zeichnen sie sich durch ihr geringes Molekulargewicht von 20 bis 25 kDa aus, und gehören daher zur Superfamilie der kleinen GTPasen.

2.4.1.2 Modifizierung der Ras-Proteine

Die Ras-Proteine sind alle an der Zellmembran lokalisiert. Die Membranlokalisation der Ras-Proteine wird durch hydrophobe Modifikation an Cystein des C-Terminus ermöglicht. Ras-Proteine besitzen meistens die sogenannte CAAX-Box (C: Cystein; A: aliphatische Aminosäure; X: beliebige Aminosäure). Die Modifikation erfolgt durch Isoprenylierung und/oder Palmitoylierung an Cystein des C-Terminus^[42,43], proteolytische Spaltung der drei terminalen Aminosäuren und Methylierung an der Carboxylgruppe des isoprenylierten Cystens^[43-45] (Abb. 4).

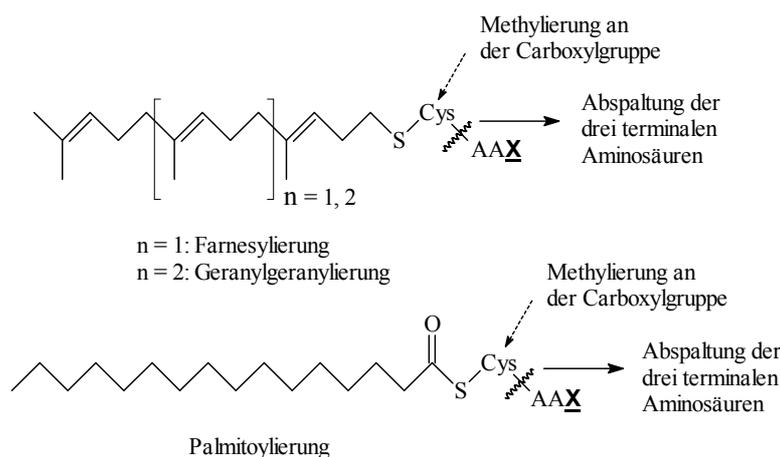


Abb. 4: Modifikationen von Ras-Proteinen

Ras-Proteine besitzen meistens CAAX-Box. Die Isoprenylierung an Cystein des C-Terminus kann auf zwei Arten erfolgen, die von der Eigenschaft von "X" abhängen: Ist "X" ein Leucin oder ein Phenylalanin, so wird das Protein von der Geranylgeranyltransferase I (GGTase I) geranylgeranyliert; ist "X" ein Serin, Methionin, Alanin oder Glutamin, so wird es von der zytosolischen Farnesyltransferase (FTase) farnesyliert^[46-48]. Neben der Isoprenylierung werden die letzten drei Aminosäuren (-AAAX) proteolytisch von Cystein entfernt, und anschließend wird das isoprenylierte Cystein an der Carboxylgruppe methyliert.

Ras-Proteine können auf der Membran die Interaktionshäufigkeit mit Effektoren um einen Faktor von 10^6 verbessern^[49]. Dies ist essentiell für die biologische Aktivität der Ras-Proteine^[50,51].

2.4.1.3 Ras als molekularer Schalter

Die biologische Funktion von Ras liegt in der Regulation einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen. Als kleine GTPase fungieren Ras-Proteine als molekularer Schalter in Signaltransduktionskaskaden. Sie erfüllen ihre Schalterfunktion durch die Bindung und Hydrolyse von Guaninnukleotiden (Abb. 5).

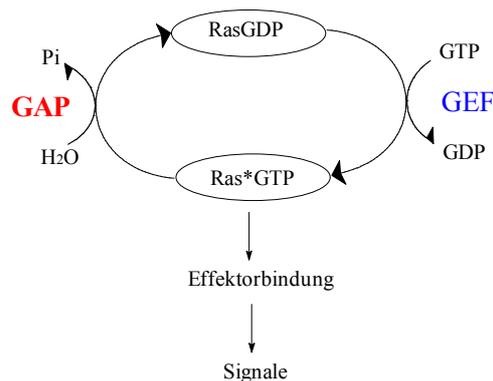


Abb. 5: Ras als molekularer Schalter in Signaltransduktionswegen

Durch GEF (*guanine nucleotide exchange factors*) tritt Ras in seine aktive Konformation (Ras*GTP) ein, die an Effektorproteine binden kann. Damit werden die Transduktionswege eingeschaltet. Nach der Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP durch GAP (*GTPase activating protein*) geht Ras in seinen inaktiven Zustand (RasGDP) über, wodurch die Signalleitung beendet wird.

Binden die Ras-Proteine GTP, so befinden sie sich in ihrer aktiven Konformation (Ras*GTP) und sind in der Lage mit Effektoren zu interagieren. Damit werden die Signaltransduktionswege eingeschaltet. Nach der Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP geht Ras in seinen inaktiven Zustand (RasGDP) über, wodurch die Signalleitung beendet wird.

Die aktive bzw. inaktive Konformation von Ras stellt einen Ras-Zyklus dar, in denen sowohl die Hydrolyse von Ras*GTP zu RasGDP als auch der Austausch des an Ras gebundenen GDP gegen GTP ohne Beteiligung von anderen Proteinen nur sehr langsam geschehen. Diese beiden Prozesse werden jeweils durch die **GTPase Aktivierenden Proteine (GAP)** und den Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (**GEF: *Guanine nucleotide Exchange Factors***) beschleunigt.

Der Mechanismus des GEF-katalysierten Nukleotidaustausch basiert darauf, dass GEF die Nukleotidbindung von Ras destabilisiert^[52,53]. Dies führt zu einer Erhöhung der Nukleotiddissoziation. Als Folge kann die in Zellen gegenüber GDP ca. zehnmal höher konzentrierte Spezies GTP an die freien Nukleotidbindestellen des Ras binden.

Die intrinsische Hydrolysereaktion von Ras*GTP wird von GAP um den Faktor 10^5 beschleunigt. Der Mechanismus über die GAP-katalysierte GTP-Hydrolyse konnte bislang nicht erklärt werden^[54]. Die Strukturen des Ras-RasGAP-Komplexes (Abb. 6) im Übergangszustand und die biochemischen Charakterisierung des Einflusses einzelner Aminosäuren zeigten, dass GAP direkt an der Hydrolysereaktion beteiligt ist^[55,56]. GAP stabilisiert den Übergangszustand der Phosphoryltransfer-Reaktion von Ras^[57]. NMR-Untersuchungen zeigten, dass Arginin789 des GAP bei der Stabilisierung des Übergangszustands eine entscheidende Rolle spielt, da das γ -Phosphat von GTP nur im Übergangszustand von sogenannten Arginin-Finger kontaktiert wird^[58].

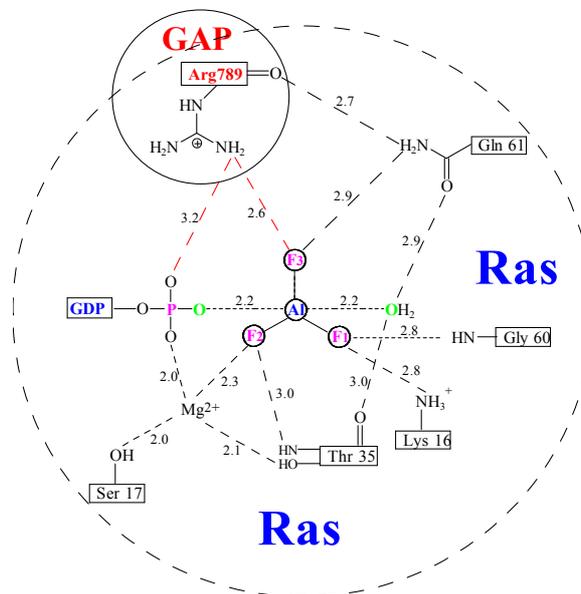


Abb. 6: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums von Ras-RasGAP-Komplex im Übergangszustand (modifiziert von Scheffzek 1997^[56])

An dem aktiven Zentrum des Ras-RasGAP-Komplex im Übergangszustand der Phosphoryltransfer-Reaktion ist Aluminiumtrifluorid beteiligt. Es bildet das Zentrum einer pentagonalen Bipyramide, in der das Fluorid die dreieckige Grundfläche und die zwei Sauerstoffatome (stammen aus Wasser und γ -Phosphat) die Spitzen der Pyramide darstellen. Dieser Übergangszustand wird durch Arg789 des GAP stabilisiert. Die Abstände zwischen den jeweiligen Atomen werden durch kleine Ziffern in der Maßeinheit Ångström angegeben^[56].

Die Ras-Signaltransduktionskaskade ist physiologisch außerordentlich wichtig. Sie ist von zentraler Bedeutung für die Regulierung von Zellwachstum und Zelldifferenzierung. Eine Mutation des Ras-Gens kann eine Fehlregulierung des Signalpfades induzieren. Dies kann einer der entscheidenden Schritte bei der Transformation von Zellen sein. So konnte gezeigt werden, dass Ras das am häufigsten bei Menschen zum Onkogen mutierte Proto-Onkogen ist^[9,10].

2.4.1.4 Ras-Mutation und Anti-Ras-Medikamente

Die am häufigsten vorkommenden onkogenen Mutationen von Ras betreffen die Aminosäure Glycin (Position 12) und Glutamin (Position 61). Mutationen von beiden Aminosäuren führen entweder zur Nicht-Stabilisierung des für den nukleophilen Angriff auf das γ -Phosphat verantwortlichen Hydroxyl-Ions oder zu einer sterischen Hinderung des Zutritts des Argininfingers ins aktive Zentrum von Ras (siehe Abb. 6, Seite 12)^[56]. Als Folge daraus wird die Hydrolyse des an Ras gebundenen GTPs verhindert. Dadurch bleibt Ras länger im aktiven Zustand (Ras*GTP) und führt schließlich zur ständigen Stimulation von Ras-abhängigen Signalwegen.

Die Entwicklung von Anti-Ras-Medikamenten basiert auf der Grundlage des Wissens über den intrinsischen, GAP-stimulierten GTP-Hydrolysemechanismus. Ziel ist die Suche nach den entsprechenden GTPase-beschleunigenden Wirkstoffen, um das konstitutiv aktive Protein zu inaktivieren^[59,60]. Weitere Ansätze für die Krebs-Medikamente bestehen aus folgenden Strategien:

- Inhibierung von Ras auf der Membran^[61,62]
- Entwicklung von Hemmstoffen für die Nukleotidaustauschreaktion^[63,64]
- Inhibierung der Interaktion von Ras mit Effektoren^[65,66]

2.4.2 Rab

2.4.2.1 Einführung

Bei der Untersuchung über Sekretionsmutanten von *Saccharomyces cerevisiae* (SEC4-Mutationen) wurde festgestellt, dass das Protein des SEC4-Gens ein "ras-ähnliches" kleines GTP-bindendes Protein ist, das an der Regulation des vesikulären Transports beteiligt ist^[67-69]. Nach weiteren Untersuchungen der korrespondierenden Proteine bei Säugetier-Zellen wurde eine große Zahl von solchen ras-ähnlichen Proteinen entdeckt. Da die ersten Säugetierproteine aus Rattenhirn isoliert wurden, werden sie als **Rab**-Proteine (*Ras-like protein from rat brain*) bezeichnet^[70,71].

Rab-Proteine sind kleine GTP-bindende Proteine und besitzen eine hoch konservierte GTP-Bindungsdomäne. Sie haben ein Molekulargewicht von 20 – 25 kDa und gehören zur Ras-Superfamilie. Bis heute wurden ca. sechzig Rab-Proteine (einschließlich der Isoformen) im Menschen identifiziert, die an verschiedenen Organellen spezifisch

lokalisiert und an den unterschiedlichen Membran-Fusionsprozessen beteiligt sind^[72]. Die größere Anzahl reflektiert den komplexeren Aufbau eines vielzelligen Organismus, in dem jeder Schritt des vesikulären Transports durch spezifische Rab-Proteine kontrolliert wird^[73,74].

Leider konnte bis jetzt nur ein kleiner Teil davon charakterisiert werden. Darunter sind Lokalisationsorte von zwölf Rab-Proteinen bekannt und die Funktionen von acht Rab-Proteinen charakterisiert (Tab. 2).

Tab. 2: Charakterisierung einiger Mitglieder der Rab-Familie

	Intrazelluläre Lokalisationsorte	Funktion
Rab4	frühe und rezyklisierende Endosomen	endozytotische Rezyklisierung zur Plasmamembran ^[75,76]
Rab5	Clathrin-umhüllte Vesikel und frühe Endosomen	endozytotische Internalisierung und Fusion der frühen Endosomen ^[77,78]
Rab7	späte Endosomen und Lysosomen	Transport von frühen Endosomen zu späten Endosomen bzw. von späten Endosomen zu Lysosomen ^[78-81]
Rab9	späte Endosomen	Transport von späten Endosomen zum trans-Golgi ^[82,83]
Rab11	Golgi und rezyklisierende Endosomen	Exportieren von Golgi über Endosomen, apical und basolateral endozytotische Rezyklisierung ^[84-89]
Rab15	frühe und rezyklisierende Endosomen	Inhibitor der endozytotischen Internalisierung ^[90]
Rab17	Epithelial spezifisch; apical rezyklisierende Endosomen	Transport durch apical rezyklisierende Endosomen ^[91,92]
Rab18	Epithelial spezifisch; apicale Tubuli der Niere und basolaterale Domäne der Därme	noch nicht näher beschrieben ^[29]
Rab20	Epithelial spezifisch; apicale Tubuli der Niere	noch nicht näher beschrieben ^[29]
Rab22	Endosomen und Plasmamembrane	noch nicht näher beschrieben ^[29]
Rab24	Endoplasmatisches Retikulum, Golgi und späte Endosomen	noch nicht näher beschrieben ^[29]
Rab25	Epithelial spezifisch; apical rezyklisierende Endosomen	Transport durch apical rezyklisierende Endosomen ^[93-95]

Die Weitergabe der durch die Rab-Proteine übermittelten Signale zur Regulierung von Transportprozessen geschieht durch die Interaktion mit spezifischen Effektoren. Dies ist die Grundlage für die Funktion der Rab-Proteine als Regulatoren multipler Transportschritte.

2.4.2.2 Modifizierung der Rab-Proteine

Wie Ras-Proteine können Rab-Proteine nur auf der Membran ihre biologischen Funktionen erfüllen. Die Verankerung der Rab-Proteine an der Membran wird durch die posttranslationale Modifizierung der C-terminalen Cysteinreste erreicht. Im Gegensatz zu Ras haben die Proteine der Rab-Familie meistens Doppel-Cys-Motive, wie z.B. CC- und CXC-Box. Sie werden von der Geranylgeranyltransferase-II (GGTase-II) über Thioetherbindungen geranylgeranyliert^[96]. An der Geranylgeranylierung des Rab-Proteins ist das dritte Protein **REP** (*Rab Escort Protein*)^[97,98] beteiligt (Abb. 7).

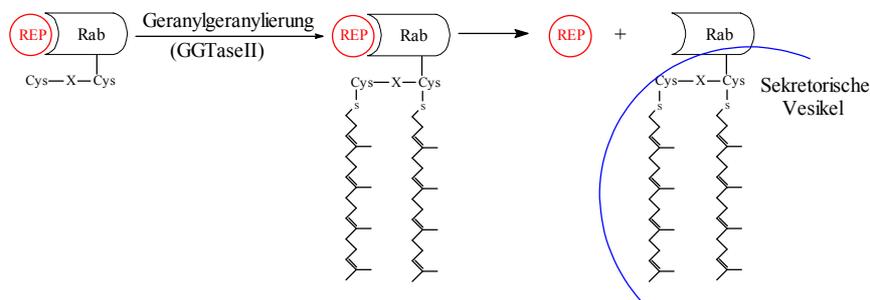


Abb. 7: Posttranslationale Modifizierung der Rab-Proteine

Vor dem Isoprenyltransfer bildet das neu synthetisierte Rab-Protein mit dem REP einen Komplex, der als Substrat von der GGTase-II erkannt wird. Die Geranylgeranylierung erfolgt anschließend an beiden C-terminalen Cysteinresten. Nach der Übertragung der Geranylgeranylgruppen bleibt REP an das Rab gebunden und führt es zu seiner Zielmembran^[99].

Die Rab-Proteine sind an unterschiedlichen intrazellulären Membranen lokalisiert. Wie sie allerdings ihre jeweilige Zielmembran erreichen, ist bislang nicht hinreichend geklärt^[96].

2.4.2.3 Rab als molekularer Schalter

Rab-Proteine fungieren als molekularer Schalter im vesikulären Transport. Wie Ras haben Rab-Proteine auch zwei Konformationen: die aktive GTP-Form (Rab*GTP) und die inaktive GDP-Form (RabGDP). Diese beiden Konformationen stellen einen Rab-Zyklus dar. Im Gegensatz zu Ras findet der Rab-Zyklus zwischen der Membran und dem Zytosol statt, an dem drei regulatorische Proteinklassen beteiligt sind: Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren (**GEF**), Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (**GDI**) und GTPase-aktivierende Proteine (**GAP**) (Abb. 8)^[74,100,101].

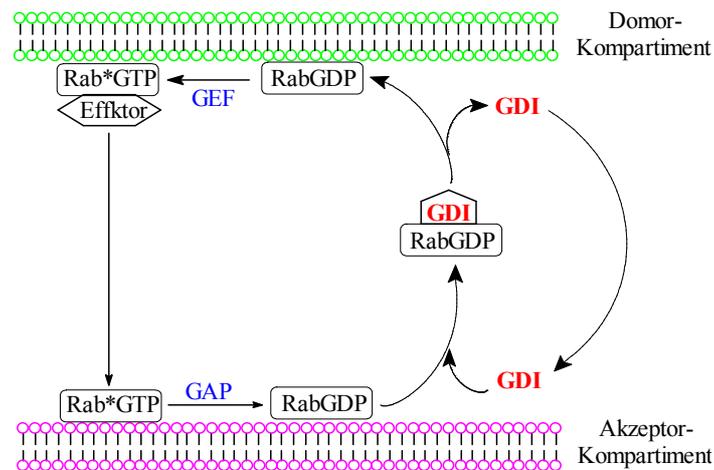


Abb. 8: Schematische Darstellung des Regulationszyklus der Rab-Proteine

Befinden sich Rab-Proteine in ihrer aktiven Konformation (Rab*GTP), können sie sich an den Effektoren binden. Dies führt zum vesikulären Transport vom Donor-Kompartiment zum Akzeptor-Kompartiment. Nach dem Andocken (tethering/docking) werden Rab-Proteine in ihre inaktive Konformation zurückkehren. Der Transportsweg ist beendet.

Nach der GTP-Hydrolyse werden die an der Akzeptormembran gebundenen RabGDP von den GDI extrahiert und zurück zur Donormembran transportiert. Dabei bildet sich GDI mit Rab-Proteinen einen RabGDP/RabGDI-Komplex, der den durch GEFs stimulierten Austausch von GDP gegen GTP hemmt. Bisher wurden drei Isoformen von RabGDI entdeckt, RabGDI α , RabGDI β und RabGDI γ , die über ähnliche chemische Eigenschaften verfügen^[102-106]. Nach der Bindung an die Donormembran wird der RabGDP/RabGDI-Komplex durch einen *GDI displacement factor* (GDF) dissoziiert und GDI kehrt ins Zytosol zurück, um erneut Rab-Moleküle zu binden^[107,108].

Die Aktivierung bzw. Inaktivierung von Rab werden jeweils von GEF und GAP stimuliert. Im Vergleich zum RabGDI sind RabGEF-Proteine spezifisch. Sie können nur mit der jeweiligen Rab-Unterfamilie interagieren, wie z.B. Rab3GEF, das den Nukleotidaustausch von Rab3a, Rab3c und Rab3d katalysiert, nicht aber den von Rab2, Rab5a, Rab10 und Rab11^[109]. RabGAP enthalten wie bei anderen Ras-homologen Proteinen kurze *fingerprint*-Sequenzen, die zwischen den verschiedenen Spezies konserviert sind.

2.4.2.4 Vesikulärer Transport

Der intrazelluläre vesikuläre Transport zwischen zwei Organellen lässt sich grob in vier Teilschritte gliedern (Abb. 9):

- Bildung eines Transportvesikels an der Donormembran (*budding*)
- Transport des Vesikels durch die Zelle zum Zielort
- das Andocken (*tethering/docking*)
- Verschmelzung des Vesikels mit der Akzeptormembran (*fusion*)

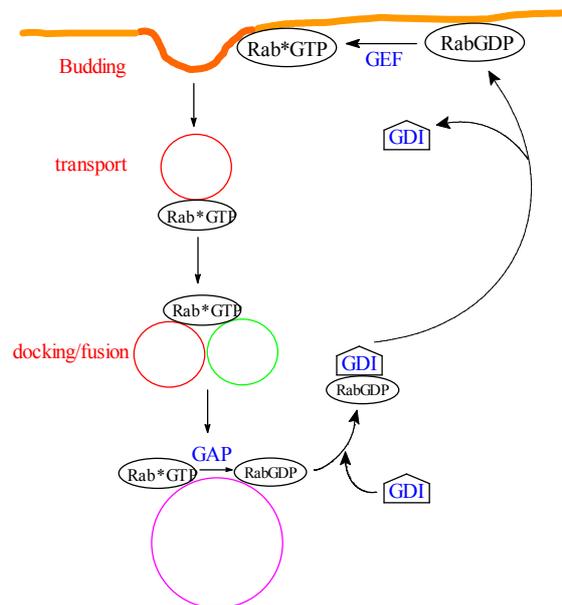


Abb. 9: Schematische Darstellung des von Rab regulierten vesikulären Transports

An diesen Aspekten des vesikulären Transports sind einige miteinander wirkende Proteine beteiligt. Zu Ihnen gehören die Rab-Proteine und ihre Effektoren.

Rab-Proteine als molekularer Schalter spielen in dem intrazellulären vesikulären Transport eine sehr wichtige Rolle. Sie sind an der Regulation intrazellulärer vesikulärer Transporte beteiligt. Dadurch werden die Enzyme, Proteine und Lipide gezielt an ihren Bestimmungsort transportiert. Dies ist von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der spezifischen Funktion und Zusammensetzung der verschiedenen Organellen.

2.5 Toxikogenetik

Durch die Einführung moderner genetischer Verfahren lassen sich viele biologische Prozesse auf molekularer Ebene zunehmend aufklären. Diese hat zu unserem Verständnis über die Entstehung von Krebserkrankungen wesentlich beigetragen.

Die molekulare Onkologie erforscht die pathophysiologischen Grundlagen und damit die biochemischen Ursachen der Tumorentstehung und versucht daraus verbesserte diagnostische und therapeutische Strategien abzuleiten. Sie setzt die Erkenntnis voraus, dass Tumorerkrankungen eine genetisch bedingte Störung des Gleichgewichts zwischen Stimulation und Inhibition der Zellproliferation und Apoptose darstellen (siehe Abb. 3, Seite 7). Um zu erklären wie Zellproliferation und Apoptose reguliert werden, welche Mechanismen der Entstehung von Krankheiten zugrunde liegen, benötigt man neue, leistungsfähige Werkzeuge, mit denen man die Funktion der Gene analysieren kann. Genexpressionsanalysen sind daher ein wichtiges Werkzeug für die Genomforschung. Sie werden auf der Ebene der RNA-Transkripte oder der Proteine durchgeführt. Die Parallelität der Messanordnung in Verbindung mit den speziellen Methoden der Bioinformatik erlaubt einen hohen Probendurchsatz in relativ kurzer Zeit. Dies ist eine Voraussetzung für die immer stärker geforderten „High-Throughput“-Verfahren.

Neue bioinformatische Ansätze in der Toxikologie versuchen biologische Unterschiede zwischen „normalen“ und „entarteten“ bzw. zwischen Kontrollzellen und malignen transformierten Zellen auf molekularer Ebene aufzuklären. Sie verwenden dazu große, öffentlich zugängliche, molekularbiologische Datenbanken wie beispielsweise die „GenBank“, die „Database of Expressed Sequence Tags“ oder die Datenbank „Unigene Digital Differential Display“^[110-112].

Die Voraussetzungen dafür wurden im Rahmen des Human Gene Projektes geschaffen, in dem Hochdurchsatz-Sequenzieretechniken entwickelt wurden, die eine rasche Identifizierung von DNA-Fragmenten erlauben. Bei diesen Sequenzinformationen handelt es sich meistens jedoch nicht um vollständige Gensequenzen: So sind 70% der in der GenBank gespeicherten Sequenzen keine vollständigen Gene, sondern nur Auszüge aus der Gesamt-Sequenz^[113,114]. Diese werden als Expressed Sequence Tags (ESTs)

bezeichnet und sind definiert als die 5'- oder 3'-Randbereiche einer klonierten DNA^[115-117].

ESTs erlauben im Idealfall eine in silico Identifizierung des dazugehörigen Genes und damit auch eine Charakterisierung des kodierten Proteins, die allein auf den DNA-Sequenz-Daten beruht. Neben dieser Identifizierung neuer Zielgene („Biomarker“) erlauben ESTs aber auch die Identifizierung des Zielgewebes^[118-120] und die Charakterisierung der Genregulation^[121-123]. Fasst man alle relevanten bioinformatischen Auswertungsmöglichkeiten zusammen und bezieht diese auf den Genotyp, versucht man sogenannte „susceptible genotypes“ zu charakterisieren, d.h. man versucht die Anfälligkeit von Genotypen für definierte Noxen vorherzusagen^[124-126], wobei insbesondere für die SNPs (Single Nukleotide Polymorphismen) eine bedeutende Rolle diskutiert wird^[125].

Grundlage all dieser als „Toxikogenetik“ bezeichneten Arbeitsansätze sind die in öffentlichen Datenbanken digital gespeicherten Sequenzen, die experimentell im Wesentlichen durch Genexpressionsanalysen gewonnen werden. **Die Qualität der toxikologischen Auswertung hängt in erster Linie von der Qualität der generierten Rohdaten ab**^[110].

2.6 Genexpressionsanalysen

Der Mensch besitzt 30 bis 40 Tausend Gene, von denen nur ein kleiner Teil, ca. 10-15% aller Gene, in einer individuellen Zelle exprimiert wird^[127]. Die Wahl der Gene, welche exprimiert werden, bestimmt alle Lebensprozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Zellzyklusregulation sowie Homöostase. Der Ablauf physiologischer, aber auch pathologischer Prozesse, wie sie bei Tumorerkrankungen vorkommen, geht mit einer Veränderung der Genexpression einher. Um die differentiell exprimierten Gene zu identifizieren und dadurch die Mechanismen der Entstehung von Krebserkrankungen zu erklären, werden Genexpressionsanalysen eingesetzt. Dazu gehören die Hybridisierung auf Microarrays^[128,129], die Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)^[130], die Subtraktive Hybridisierung und die Differential Display Analyse.

Die **DNA-Mikroarrays** setzen sich aus einer zweidimensional angeordneten Ansammlung von cDNA-Molekülen zusammen, die auf einem festen Träger fixiert sind^[131]. Diese einzelsträngigen cDNAs stammen entweder aus cDNA-Klonen, die zuerst auf die Oberfläche des Chips aufgebracht und dann fixiert werden oder aus kurzen DNA-Oligonukleotiden, die direkt auf der Chipoberfläche synthetisiert werden. Zur Erfassung der Genexpressionsprofile wird eine unbekannte cDNA-Probe (mit Fluoreszenzfarbstoff oder Radioaktivität) markiert und dann gegen die cDNA auf den Arrays hybridisiert. Durch den Vergleich mit einem identischen Array, der mit einer anderen cDNA-Probe versetzt wurde – etwa Tumorzellen-cDNA gegenüber cDNA aus gesunden Organmaterial – wird ein differentielles Expressionsprofil dargestellt. Die DNA-Mikroarrays Technik ermöglicht zwar eine vergleichende Transkriptom-Analyse, wobei simultan die Expressionsstärke von mehreren Tausend Genen erfasst wird, hat aber einige Nachteile: Nur cDNAs, deren genetische Informationen bereits bekannt sind, können analysiert werden. Neue, unbekannte Gene oder Gene, die nicht auf dem Array immobilisiert sind, kann man mit dieser Methode nicht untersuchen. Schließlich bestehen noch methodische Schwierigkeiten, die dazu führen, dass die Reproduzierbarkeit nach dem heutigen Stand der Technik nicht befriedigend ist. Die Analyse ist weiterhin sehr kostenintensiv, so dass diese Methode für kleine Arbeitsgruppen meist nicht finanzierbar ist.

Die **SAGE-Technologie** beruht darauf, dass kurze, 9-14 Nukleotide lange Nukleotidsequenzen sogenannte SAGE-Tags, genügend Information enthalten, um ein Gen mit Hilfe öffentlicher Datenbanken zu identifizieren. Mit SAGE lässt sich theoretisch die gesamte Genexpression in einem RNA-Gemisch untersuchen. In der Praxis lassen sich SAGE-Tags jedoch schwerer eindeutig einem Gen zuzuordnen als längere ESTs, die beispielsweise durch Subtraktive Hybridisierung gewonnen werden. Besonders schwer wirken sich Sequenzierungsfehler in den SAGE-Sequenzen aus. Ein sehr großer Nachteil liegt auch darin, dass 200000 bis 300000 SAGE-Tags nötig sind, um ein Gen zu identifizieren^[132]. Dieses Arbeitsvolumen kann von kleinen Arbeitsgruppen nicht geleistet werden.

Die **Subtraktive Hybridisierung** vergleicht zwei Transkriptome miteinander und isoliert dadurch differentiell exprimierte cDNA-Fragmente. Mit dieser Technik können

unbekannte und insbesondere niedrig exprimierte Gene identifiziert werden. Diese Methode hat aber den Nachteil, dass sie deutlich komplexer und dadurch auch fehleranfälliger ist als die Differential Display Analyse, die ESTs generiert, die aber meist außerhalb der kodierenden Sequenz liegen.

2.7 Differential Display Analyse (DD-Analyse)

Die Differential Display Analyse wurde erstmals im Jahr 1992 von Liang und Pardee^[133] entwickelt. Der erste umfassende Bericht über Differential Display (DD) geht auf das Jahr 1995 zurück. In dieser Zeit gab es ca. 100 Veröffentlichungen, die die Verwendung und Verbesserung dieser Methode beschrieben. Heute beträgt die Gesamtzahl der Publikationen über DD mehr als 4000. Dies übersteigt bei weitem die Gesamtmenge aller Publikationen der konkurrierenden Methoden, wie z.B. Subtraktive Hybridisierung, SAGE und DNA-Microarrays. Damit ist die DD-Analyse in Bezug auf die Anwendungshäufigkeit die wichtigste Methode zur Identifizierung unterschiedlich exprimierter Gene. Das Differential Display ist eine relativ sensitive Methode, bei der auch kleine Expressionsunterschiede dargestellt werden können. Damit eignet es sich besonders, um komplexe biologische Vorgänge, wie das Zellwachstum oder die Apoptose zu untersuchen, die von Gen-Produkten reguliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollen mit Hilfe des Differential Display in einem C3H-M2 Mausfibroblasten Modellsystem differentiell exprimierte Gene identifiziert werden.

Der Differential Display Analyse liegt die Idee zugrunde, die mRNA-Profile verschiedener Zellen im Anschluss an eine zuvor durchgeführte Reverse Transkription-PCR (RT-PCR) durch hochauflösende Polyacrylamidgelelektrophorese miteinander zu vergleichen^[134]. Nach dem visuellen Vergleich der PCR-Produkte werden differentielle DNA-Banden isoliert. Durch Sequenzierung und anschließende Datenbankvergleiche können die differentiell exprimierten Gene identifiziert werden. Der endgültige Beweis der differentiellen Genexpression wird meist durch eine (semi-) quantitative PCR erbracht. Die verschiedenen Arbeitsschritte der in unserem Arbeitskreis etablierten Differential Display Analyse sind in Abb.10 graphisch dargestellt.

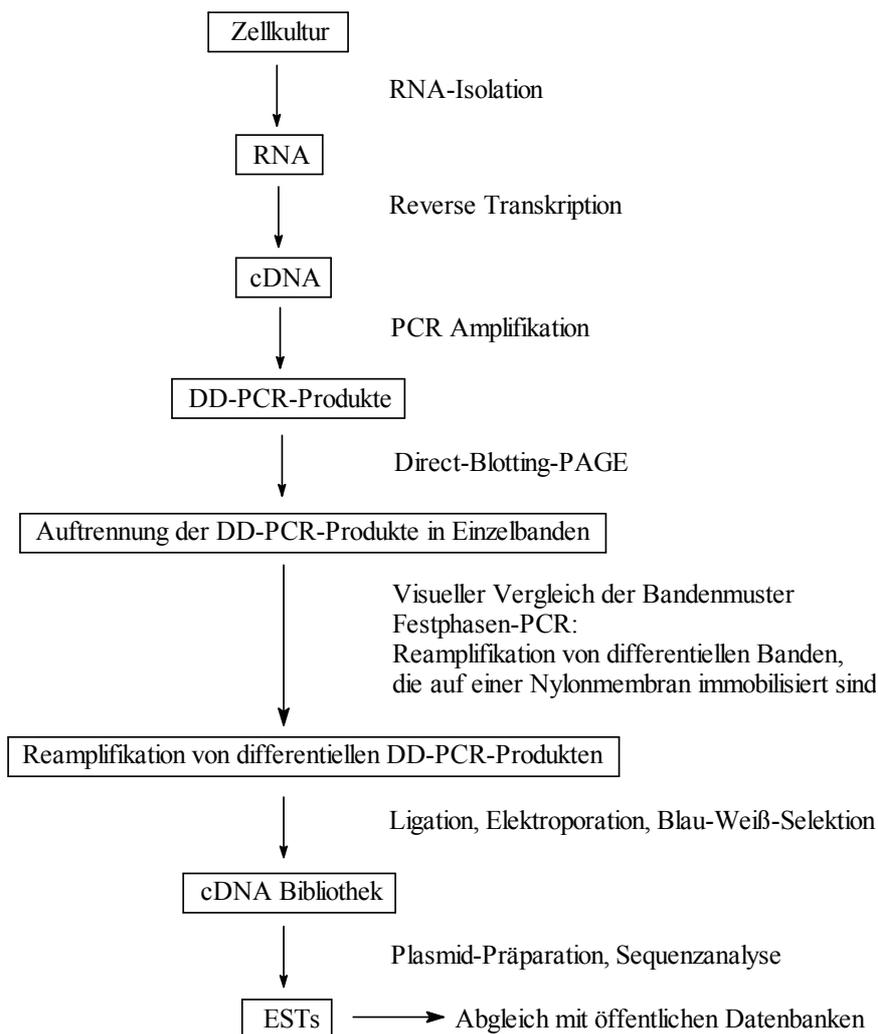


Abb. 10: Grundprinzip und Arbeitskreis-spezifische Modifikationen der Differential Display Analyse

Im ersten Versuchsschritt wird die gesamte RNA aus den Zellen isoliert. Durch eine Reverse Transkription wird mRNA in cDNA umgeschrieben. Anschließend wird eine Differential Display PCR-Amplifikation durchgeführt. In unserem Arbeitskreis wurden dazu biotinylierte Primer und ein (*real time*) PCR-Gerät verwendet.

Die PCR-Produkte werden anschließend durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese vereinzelt. In unserem Arbeitskreis wurde eine Direct-Blotting-PAGE etabliert, bei der die DNA-Fragmente aus dem Gel heraus auf eine Nylonmembran wandern, die automatisch unter dem Gel transportiert wird^[135]. Zur Detektion der biotinylierten PCR-Produkte wird in unserem Arbeitskreis ein auf einer Farbreaktion basierendes

Detektionssystem verwendet, bei dem Nitrotetrazoliumblauschlorid (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (BCIP) beteiligt sind^[136,137].

Nach Reamplifikation der differentiellen DNA-Fragmente werden diese durch Chip-Elektrophorese in der Größe kontrolliert. Die cDNA wird in einen Plasmidvektor kloniert und in Bakterien vermehrt. Zum Schluss werden die differentiellen DNA-Fragmente durch Sequenzierung charakterisiert, um ESTs zu erhalten, die dann mit öffentlichen Datenbanken abgeglichen werden können.

2.8 Aufgabenstellung

2.8.1 Methodischer Teil

Die Differential Display Analyse ermöglicht zwar die PCR-basierte Bestimmung der Genexpression verschiedener Zellpopulationen, hat jedoch einen großen Nachteil, nämlich die hohe Anzahl an falsch positiven Ergebnissen. Schätzungen gehen davon aus, dass 75% bis 90% der durch Differential Display identifizierten Transkripte falsch positive sind^[138,139].

Aufgrund der hohen Anzahl an Falsch-Positiven sind die heute in der Literatur etablierten Protokolle zur Differential Display PCR Analyse nur begrenzt geeignet, toxikologische Fragestellungen der differentiellen Genexpression durch kleine Arbeitsgruppen zu bearbeiten. In der vorangegangenen Diplomarbeit^[140] wurde durch die Kombination von Chip-Elektrophorese, *real time* PCR und Direct-Blotting-Elektrophorese eine nahezu vollständige Prozesskontrolle der DD-Analyse etabliert, die es erlaubt, Fehlerquellen gezielt zu lokalisieren. Weiterhin wurde gezeigt, dass die mangelnde DD-PCR-Produktausbeute den letzten noch fehlenden Baustein darstellt, damit die DD-Analyse in unserem Arbeitskreis zur Erforschung von tumorspezifischen Kanzerogenese-Genen eingesetzt werden kann. Zur Erhöhung der PCR-Ausbeute werden in dieser Arbeit zwei Versuche beschrieben:

1. In der vorangegangenen Diplomarbeit^[140] wurde festgestellt, dass die mit dem Enzym „Thermoscript“ synthetisierte cDNA zu weniger PCR-Nebenprodukten führt, während die mit „Superscript II“ synthetisierte cDNA eine höhere PCR-Ausbeute ergibt. Die qualitativ besten Thermoscript-Amplifikate konnten in der *real time* PCR charakterisiert,

nicht aber in der Direct-Blotting-Elektrophorese detektiert werden, weil deren Konzentration zu gering war^[140]. Eine mögliche Fehlerursache in den PCR-Bedingungen liegt in dem verwendeten *real-time*-Enzymsystem der Firma Qiagen. In diesem Reagenz ist die Taq-Polymerase mit einem hitzestabilen Antikörper inaktiviert, der im aktiven Zentrum des Enzyms bindet. In der Anfangsphase der PCR-Amplifikation wird der Reaktionsansatz 15 min bei 95°C denaturiert. Dieser in der Literatur als „Hot Start“ bezeichnete Inkubationsschritt denaturiert den Antikörper und setzt die aktive Taq-Polymerase frei^[141]. In der Denaturierungsphase werden aber auch dNTPs zur dNDPs und dNMPs hydrolysiert (Abb. 11).

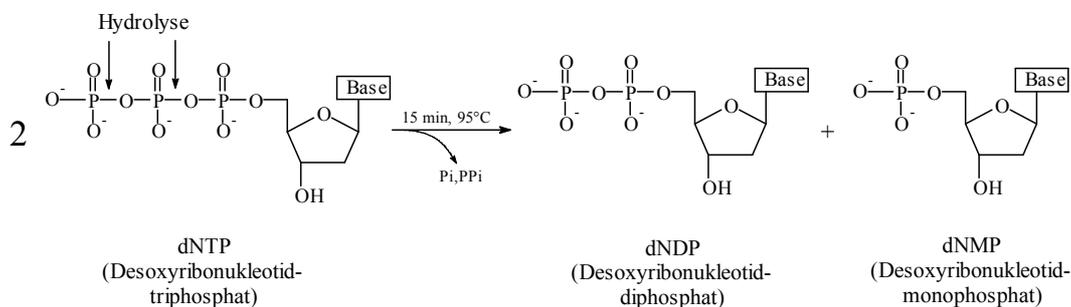


Abb. 11: Postulierte Hydrolyse von dNTPs in der Denaturierungsphase

dNDPs und dNMPs können von der Taq-Polymerase nicht zur Synthese von DNA verwendet werden und stellen damit einen limitierenden Faktor für die Produktausbeute in der DD-Analyse dar.

Die Hydrolyse der Triphosphate könnte die Ursache der nicht befriedigenden PCR-Ausbeute sein. In dieser Arbeit wird zunächst versucht, die Denaturierungszeit durch zusätzliche Zugabe von DNA-Polymerase zu reduzieren. Dabei wird sowohl mit dem Enzym „Superscript II“ als auch mit dem Enzym „Thermoscript“ synthetisierte cDNA in die DD-PCR eingesetzt.

2. Weiterhin wird der Einfluss von verschiedenen PCR Primer-Längen untersucht. Bisher wurden in unserem Arbeitskreis 23mer lange Primer benutzt. Durch die Verwendungen von kürzeren Primern 5'-T12MN-3' (wobei gilt: M = A,C,G; N = A, T, C, G) und AP-Primern (ein 10mer Primer) postulierten wir eine erhöhte PCR-Ausbeute.

Anschließend wird die DD-Analyse unter Verwendung von kürzeren Primern optimiert. Dabei wurden folgende Untersuchungen ausgeführt:

- Optimierung der Reversen Transkription: Die Reverse Transkription sollte mit verschiedenen Reversen Transkriptasen bzw. unterschiedlichen Mengen RNA hergestellt und anschließend gleiche Volumina (unterschiedlicher cDNA-Konzentrationen) in die DD-PCR eingesetzt werden. Eine gute RNA-Qualität und eine optimale RNA-Quantität sind die Voraussetzung zur Untersuchung der differentiellen Genexpression.
- Optimierung der PCR-Amplifikation: Die DD-PCR sollte unter Verwendung von GenHunter-, Roche- und Qiagen-Chemikalien untersucht und anschließend im LightCycler-System etabliert werden.
- Neueinstellung der Reamplifikationsbedingungen: Es sollten zwei Arten von Nylonmembran verwendet und die optimalen Reamplifikationsbedingungen für die 14mer-Primer-DD-PCR-Produkte gefunden werden.
- Erhöhung der Membransensitivität: Die Nylonmembran sollte unter Verwendung von verschiedenen Protokollen entwickelt werden. Hieraus sollten sich dann die optimalen Bedingungen für die Membranentwicklung ergeben.

2.8.2 Identifizierung eines MNNG-spezifischen mRNA-Expressionsmusters im CH3-M2-Fibroblasten-System

In dem zweiten Teil dieser Doktorarbeit soll mit Hilfe der DD-Analyse substanzspezifische Kanzerogenese-Gene identifiziert werden. Hierbei werden C3H-M2 Zelllinien verwendet, die aus einer von Herrn Prof. Marquardt im Jahr 1971 angelegten permanenten Zelllinie stammen. Es wird ein mRNA-Expressionsmuster von CH3-Maus M2 Fibroblasten erstellt. Durch den Vergleich mit einem mRNA-Expressionsmuster von M2 Zellen, die mit MNNG behandelt wurden, sollen differentiell transkribierte Genprodukte identifiziert werden.

Weiterhin sollen die identifizierten Gene durch Charakterisierung ihrer Expression mittels quantitativer *real time* PCR verifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte, Software und Chemikalien

Geräte:

Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, USA
LightCycler, Roche Diagnostics, Mannheim
MaxiCycler, PTC-100, MJ Research, Watertown
MiniCycler, MJ Research, Watertown
GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer, Weiterstadt
GATC 1500 Direct Blotting Elektrophoresis System, GATC GmbH, Konstanz
GATC BioDetection System, GATC GmbH, Konstanz
Spannungsquelle Desatronic 2000/300, Desaga, Heidelberg
GelPrint 1000i Dokumentationssystem, MWG Biotech, Ebersberg
Spannungsquelle PPS 200-1D Powersupply, MWG Biotech, Ebersberg
Transilluminator mit integriertem Weißlichttisch, MWG Biotech, Ebersberg
Schüttelplattform Köttermann 4010, Hamburg
Pulse Controller II, BIO-RAD, München
Capacitance Extender Plus, BIO-RAD, München
Gene Pulser[®] II, BIO-RAD, München
Schüttelwasserbad 1083, GFL, Burgwedel
DU-64 Spectrophotometer mit Quant I Soft-Pac, Beckmann Instruments, München
Zentrifuge EBA 12R, Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Model J2-21M, Beckman, USA
Autoklav Fedegari 1616 E, Gössner, Hamburg, und KSG 117, KSG GmbH, Olching
pH-Meter CG 820, Schott-Geräte, Hofheim
ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystem, Weiterstadt

Software:

Oligo Primer Analysis Software, Medprobe, Norwegen

Chemikalien:

Alle verwendeten Chemikalien, sofern nicht anders im Text angegeben, wurden von den Firmen Merck, Boehringer, Riedel-de-Haen, Fluka oder Sigma bezogen und entsprachen dem Reinheitsgrad „zur Analyse“. Für die RNA-Präparation und die *real time* PCR wurde steriles Wasser der Firma Roche, Mannheim und Qiagen, Hilden eingesetzt. Alle weiteren wässrigen Lösungen wurden mit Wasser aus dem Mischbett-Wasservollentsalzer „Seradest SD 2800 Vario“ der Firma Seral, Ransbach-Baumbach angesetzt.

3.2 Zellkulturen

Sämtliche Arbeiten im Zusammenhang mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen und unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in sterilen Petrischalen kultiviert. Das Medium, das für die Zellkultur notwendig war, wurde vorher im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Reagenzien:

BME-Medium (Gibco BRL) mit: 10% fötales Kälberserum
 1% Penicillin-Streptomycin
 2 mmol/L Glutamin

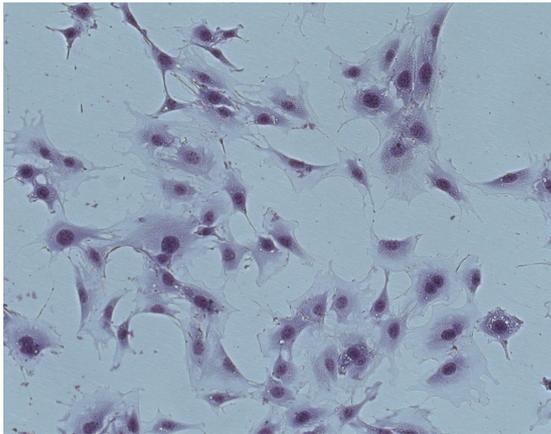
Es wurden ausschließlich Zellen zwischen der 11. und 20. Passage verwendet, die in 25 cm² großen Zellkulturschalen mit BME-Medium kultiviert wurden.

In der vorangegangenen Diplomarbeit^[140] wurden vier Zelllinien verwendet, die morphologisch nicht zu unterscheiden sind (Abb. 12-15).

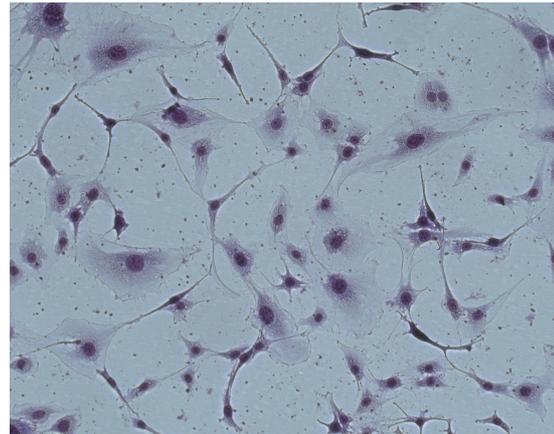
Die nicht transformierten Fibroblasten aus der Prostata von C3H-Mäusen, kurz M2-Zellen genannt, stammten aus einer von Herrn Prof. Marquardt im Jahr 1971 angelegten permanenten Zelllinie und dienten als Kontrollzellen (Abb. 12).

Die anderen Zelllinien wurden von Herrn Prof. Marquardt in den Jahren 1971 und 1972 aus den M2-Zellen durch maligne Transformation erzeugt. Dabei wurden die mit polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen transformierten Zellen in C3H-Mäuse injiziert und nach der Tumorbildung wieder aus den Tieren isoliert.

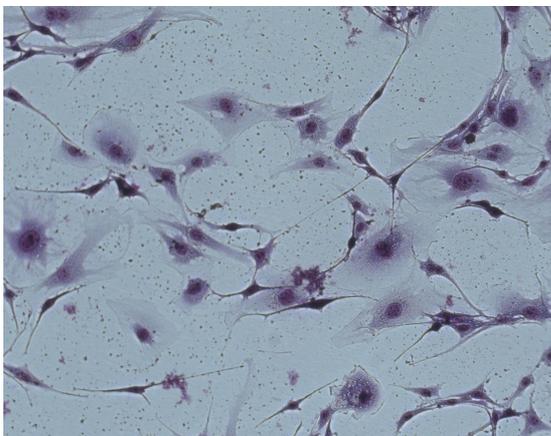
Klon1-Zellen (M2-Zellen, Klon 6, Tumor 9, Abb. 13) wurden durch Behandlung mit MCA-Epoxid (siehe Abb. 1, Seite 5) erzeugt. Klon2-Zellen (M2-Zellen, transformierter Klon3-Zellen, Tumor 3, Abb. 14) und Klon3-Zellen (M2-Zellen, transformierter Klon3-Zellen, Teil 1 von Tumor 3, Abb. 15) wurden durch Behandlung mit DMBA (siehe Abb. 1, Seite 5) maligne transformiert.



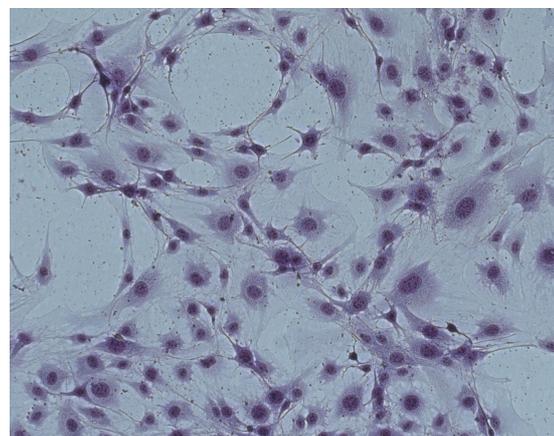
**Abb. 12: C3H-M2-Fibroblasten,
100× vergrößert**



**Abb. 13: Klon-1-Fibroblasten
(M2 Cl6 Tu/9), 100× vergrößert**



**Abb. 14: Klon-2-Fibroblasten
(M2 trCl3 Tu/3), 100× vergrößert**



**Abb. 15: Klon-3-Fibroblasten
(M2 trCl3 Tu1/3), 100× vergrößert**

Von diesen vier Zelllinien wurden drei in dieser Promotionsarbeit weiter untersucht. Diese sind: C3H-M2 sowie Klon1 und Klon2.

Kulturführung der permanenten Zelllinie C3H-M2

1000 M2-Zellen wurden ausplattiert und einen Tag später mit 0,5 µg/mL bzw. 1,0 µg/mL MNNG oder 1 µg/mL bzw. 10 µg/mL MCA 24 h lang initiiert. Als Lösungsmittelkontrolle diente Kulturmedium mit 0,5% DMSO. Nach 5 Tagen erfolgte in dem Ansatz-5 (s.u.) eine zusätzliche Tumorpromotor-Applikation mit TPA. Die Zellen wurden bis zu 7 Wochen weiter kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich. In dem Ansatz-5 wurde bei jedem Mediumwechsel die TPA-Applikation wiederholt. Es wurden 5 verschiedene Behandlungen für jeweils 7 Wochen durchgeführt:

- 1) 0,5 DMSO Medium
- 2) MNNG (0,5 µg/mL) Medium
- 3) MNNG (1,0 µg/mL) Medium
- 4) MCA (10 µg/mL) Medium
- 5) MCA (1 µg/mL, 24 h) + TPA (0,25 µg/mL) Medium

Anschließend wurde RNA aus den Ansätzen 1 bis 5 isoliert.

Die Strukturformeln der Stoffe MNNG, MCA und TPA sind in der Einleitung in Abb. 1 und Abb. 2 (siehe Seite 5 und 6) dargestellt.

3.3 Allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch OD-Messung

Die Extinktion einer wässrigen RNA- bzw. DNA-Lösung wurde in Quarzglas-Halbmikroliter-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine Extinktion von 1,0 entspricht ungefähr einer Konzentration von 40 µg/mL RNA oder 50 µg/mL DNA^[142].

3.3.2 Charakterisierung von Nukleinsäuren durch Chip-Elektrophorese

Eine qualitative und quantitative Charakterisierung der Nukleinsäure wurde mit dem „Agilent 2100 Bioanalyzer“ der Firma Agilent Technologie durchgeführt. In dem „Lab on a Chip“-Gerät tauchen Elektroden in die flüssigkeitsgefüllten Puffergefäße eines RNA beladenen Chips ein. Durch ein Netzwerk winziger Kanäle und Vertiefungen im Chip fließen Flüssigkeitsmengen im Bereich von wenigen Nanolitern – gesteuert und reguliert durch elektrische Felder und Spannung. Die Trennung der unterschiedlichen Moleküle

erfolgt zeitabhängig aufgrund unterschiedlicher Migrationsgeschwindigkeit in der Kapillare. Die Detektion erfolgt mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes bei 635 nm^[143]. Diese Technologie eignet sich sowohl zur Untersuchung von Proteinen, DNA- oder RNA-Molekülen als auch zur Durchflußzytometrie von Zellen.

RNA LabChip Kit

Für die RNA-Messung wurde der „RNA 6000 Nano LabChip Kit“ von der Firma Agilent Technologie verwendet. Die Fehlerquote bei der Reproduzierbarkeit der RNA-Quantifizierung beträgt laut Angaben des Herstellers 10%.

RNA 6000 Nano Marker (25 nt lange RNA)

RNA Dye Concentrate (SYBR Green Derivat)

RNA Gel Matrix (zur Herstellung des Gels auf dem Chip)

Spin Filters (Filter zur Säubern der Gel-Matrix)

RNA 6000 Ladder (RNA Leiter zu Größenbestimmung: 200 nt, 500 nt, 1000 nt, 2000 nt, 4000 nt, 6000 nt)

DNA LabChip Kit

Für die DNA-Messung wurde je nach unterschiedlicher Größe der DNA-Fragmente der DNA 500, 1000 oder 7500 LabChip Kit der Firma Agilent Technologie verwendet. Die Messgenauigkeit für die DNA-Längenmessung ergibt folgendes: Während das Ergebnis bei den DNA 500 bzw. 1000 LabChip Kits bei jeweils $\pm 10\%$ liegt, ergibt sich für den „DNA 7500 LabChip Kit“ ein Wert von $\pm 15\%$. Im Gegensatz dazu führt die Messgenauigkeit bei der DNA-Konzentrationsmessung für alle drei DNA LabChip Kits zu einem einheitlichen Wert von $\pm 30\%$.

DNA 500 LabChip Kit

DNA 500 Marker 15/600 bp

DNA Dye Concentrate (SYBR Green Derivat)

DNA Gel Matrix (zur Herstellung des Gels auf dem Chip)

Spin Filters (Filter zur Säubern der Gel-Matrix)

DNA 500 Ladder (DNA Leiter zu Größenbestimmung: 25 bp, 50 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 250 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp)

DNA 1000 LabChip Kit

DNA 1000 Marker 15/1500 bp

DNA Dye Concentrate (SYBR Green Derivat)

DNA Gel Matrix (zur Herstellung des Gels auf dem Chip)

Spin Filters (Filter zur Säubern der Gel-Matrix)

DNA 1000 Ladder (DNA Leiter zu Größenbestimmung: 25 bp, 50 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 700 bp, 850 bp, 1000 bp)

DNA 7500 LabChip Kit

DNA 7500 Marker 50/10380 bp

DNA Dye Concentrate (SYBR Green Derivat)

DNA Gel Matrix (zur Herstellung des Gels auf dem Chip)

Spin Filters (Filter zur Säubern der Gel-Matrix)

DNA 7500 Ladder (DNA Leiter zu Größenbestimmung: 100 bp, 300 bp, 500 bp, 700 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 3000 bp, 5000 bp, 7000 bp)

Die Bedienung des Bioanalyzers erfolgte nach Vorschrift des Herstellers.

3.3.3 Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Plasmid-DNA aus Abschnitt 3.9.5 wurde mit Restriktionsendonukleasen EcoRI (MBI Fermentas) sequenzspezifisch gespalten. Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben: Eine Unit entspricht der Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-Phagen-DNA in einer Stunde zu spalten.

Reagenzien:

X µg DNA

10 U/µL Restriktionsendonuklease EcoRI (MBI Fermentas)

10× Restriktionspuffer:	50 mmol/L Tris·Cl, pH 7,5 10 mmol/L MgCl ₂ 100 mmol/L NaCl 0,02% Triton X-100 0,1 mg/mL BSA
1× Restriktionspuffer:	Stammlösung 10× Restriktionspuffer, 10fach verdünnt

Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Trennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurde der Restriktionsansatz gefällt (siehe 3.3.4) und anschließend im 0,5%-igen Agarosegel aufgetragen (siehe 3.3.5).

3.3.4 Ethanolfällung von DNA

Reagenzien:

Natriumacetat, 3 mol/L, pH 5,2
100% Ethanol

Wässrige Lösungen, die Nukleinsäure enthielten, wurden mit 1/10 Volumen 3 mol/L Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol versetzt und homogenisiert. Nach 15 min Fällung im Eisbad wurden die Proben für 20 min bei 12000g und 0°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Die DNA wurde 3 min im Trockenschrank bei 70°C getrocknet und in destilliertem Wasser aufgenommen (ca. 5 µL H₂O pro 20 µL ursprünglicher DNA-Lösung).

3.3.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Reagenzien:

Agarose, Gibco BRL

Stammlösung 10× TAE	0,4 mol/L Tris(hydroxymethyl)aminomethan 0,05 mol/L Na ₂ EDTA, pH 8,0 0,2 mol/L Essigsäure
---------------------	---

1× TAE	Stammlösung 10× TAE, 10fach verdünnt
--------	--------------------------------------

MetaPhor® Agarose, FMC BioProduct

Stammlösung 10× TBE	0,89 mol/L Tris(hydroxymethyl)aminomethan 0,89 mol/L Borsäure 0.02 mol/L Na ₂ EDTA mit HCl auf pH 8,3 einstellen
1× TBE	Stammlösung 10× TBE, 10fach verdünnt
6× DNA-Ladepuffer	12% Ficoll 400 0,06 mol/L Na ₂ EDTA, pH 8,0 0,6% SDS 0,15% Bromphenolblau
100 bp DNA-Marker	10% (v/v) 100 bp DNA-Ladder 1 µg/µL, Gibco BRL 10% (v/v) 10× TAE 20% (v/v) 6× DNA-Load 60% (v/v) Wasser 100 bp, 14 Fragmente, jeweils um 100 bp größer Die 600 bp-Bande erscheint 2-3 Mal stärker als die anderen Banden.
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/mL, Biometra, Göttingen
Ethidiumbromid-Färbelösung	10 µL Ethidiumbromid-Stammlösung in 100 mL 1× TBE

Standard-Agarosegele

Bei Standard-Agarosegelen wurde Agarose der Firma Gibco BRL in 1× TAE Puffer in der Mikrowelle gelöst, auf 60°C abgekühlt und dann in das Gel-Tablett gegossen. Die Agarose-Konzentration der Gele betrug 2% (w/v). Nach ca. 30 min wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1× TAE Puffer überschichtet. 10 µL Probe-Lösung wurde mit 2 µL 6× DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente diente ein 100 bp Marker der Firma Gibco BRL. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand für ca. 2 h durchgeführt. Anschließend wurde das Gel 20 min in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und zweimal 15 min mit entionisiertem Wasser gewaschen. Die DNA-Fragmente wurden durch UV-Bestrahlung visualisiert und mittels einer digitalen Kamera dokumentiert.

MetaPhor-Agarosegele

Um DNA-Einzelbanden mit einem Größenunterschied von ungefähr 10 bp zu vereinzeln, wurden Methaphor-Agarosegele verwendet. Hierbei wurde Methaphor-Agarose der Firma FMC BioProducts langsam unter starkem Rühren zu eisgekühltem 1× TBE Puffer gegeben und 10 min hydratisiert. Die Suspension wurde in der Mikrowelle gelöst, auf 60°C abgekühlt und dann in das Gel-Tablett gegossen. Das Gel wurde zunächst 30 min bei Raumtemperatur und dann 30 min bei 4°C zur Verfestigung stehengelassen. Die Agarosekonzentration betrug 0,5% bis 2% (m/v). Die Gelelektrophorese erfolgte wie bei den Standard-Agarosegelen beschrieben.

3.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt.

Reagenzien:

QX1-Puffer, Qiagen

QIAEX II, Qiagen

PE-Puffer, 25% in Ethanol, Qiagen

TE-Puffer: 10 mmol/L Tris·Cl
1 mmol/L Na₂EDTA
pH 8,0

1. Die DNA-Banden aus Abschnitt 3.3.5 wurden mit einem Skalpell sorgfältig aus dem Agarosegel geschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und ausgewogen.
2. Das Agarosegel wurde in QX1-Puffer aufgelöst (3 µL QX1-Puffer pro mg Agarosegel). Zu dieser Lösung wurden 30 µL QIAEX II Glasmilch Suspension gegeben. Die Suspension wurde für 10 min bei 50°C inkubiert. Während der Inkubation wurde die Suspension alle 2 min gevortext.
3. Die Glasmilchpartikel wurden dann 30 sec bei 12000g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend einmal mit 500 µL QX1-Puffer, zweimal mit 500 µL PE-Puffer gewaschen und für 30 min an der Luft getrocknet.

4. Zur Elution der DNA wurden die Glasmilchpartikel zweimal in 20 μL 0,25 \times TE-Puffer suspendiert, für 30 sec bei 12000g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die im Überstand befindliche DNA wurde abgenommen. Die Konzentration der gereinigten DNA-Lösung wurde durch Chip-Elektrophorese bestimmt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe für die quantitative PCR hergestellt, die aus Lösungen mit der Konzentration 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 und 10^8 DNA-Moleküle pro μL besteht (siehe 3.11).

3.3.7 Entfernung von Primern aus einem Reaktionsansatz

Primer können säulenchromatographisch mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen aus PCR-Reaktionsansätzen entfernt werden.

Reagenzien:

QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen: PB-Puffer, Qiagen
PE-Puffer, 25% in Ethanol, Qiagen
EB-Puffer: 10 mmol/L Tris·Cl, pH 8,5
QIAquick Spin Columns, Qiagen

Der Reaktionsansatz wurde mit 5 Volumen PB-Puffer versetzt und auf eine QIAquick Spin Column aufgetragen. Nach dem Zentrifugieren (1 min, 12000g, Raumtemperatur) wurden 750 μL PE-Puffer auf die Säule gegeben, 5 min inkubiert und zentrifugiert (1 min, 12000g, Raumtemperatur). Nach einer Leerzentrifugation (1 min, 12000g, Raumtemperatur) wurden zweimal je 50 μL EB-Puffer auf die Säule aufgetragen, 5 min inkubiert und zentrifugiert (1 min, 12000g, Raumtemperatur). Das Eluat enthält die von PCR-Primern gereinigten PCR-Produkte bzw. die von RT-Primern gereinigte cDNA. (Die Entfernung von Primern aus Reverse Transkriptionsansätzen mittels QIAquick PCR Purification Kits hat sich nicht bewährt, weil die Ausbeute unbefriedigend ist).

3.4 Arbeiten mit RNA

3.4.1 RNA-Isolierung nach Qiagen

Die RNA-Isolierung wurde mit dem „RNeasy® Mini Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt.

Reagenzien:

RLN⁺-Puffer 50 mmol/L Tris·Cl, pH 8,0
 140 mmol/L NaCl
 1,5 mmol/L MgCl₂
 0,5 mmol/L (v/v) Nonidet P-40
Vor der Benutzung wurde eine Konzentration von 1 mmol/L DTT eingestellt.

RLT-Puffer, Qiagen

RW1, Qiagen

RPE-Puffer, Qiagen

RNase freies Wasser, Qiagen

RNeasy Mini Column, Qiagen

1. Die Zellen wurden mit 175 µL RLN-Puffer versetzt, 5 min in Eis gestellt und zentrifugiert (2 min, 300g, 4°C).
2. Die in der wässrigen Phase gelöste RNA wurde vom Pellet dekantiert, mit 600 µL RLT-Puffer und 430 µL Ethanol versetzt und anschließend homogenisiert.
3. Das Gemisch wurde in eine RNeasy Mini Column eingeführt und zentrifugiert (15 sec, 8000g, 20°C).
4. Anschließend wurde die RNeasy Mini Column einmal mit 700 µL RW1-Puffer, zweimal mit je 500 µL RPE-Puffer gewaschen und zentrifugiert (15 sec, 8000g, 20°C).
5. Zur Elution der RNA von der Säule wurde die RNeasy Mini Column zweimal in je 30 µL RNase-freien Wasser für 5 min inkubiert und zentrifugiert (1 min, 8000g, 20°C). Die eluierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.4.2 RNA-Isolierung nach Chomczynski und Sacchi^[144]

Reagenzien:

Stammlösung Solution D	100 g Guanidinthiocyanat 117 mL bidest. Wasser 7 mL 0.75 mol/L Na ₃ -Citratpuffer pH 7 10,6 mL 10% N-Lauroylsarcosin bei 65°C lösen und bei 4°C lagern
Solution D	50 mL Stammlösung Solution D 360 µL Mercaptoethanol
Natriumacetat	2 mol/L Natriumacetat pH 4,0 mit Essigsäure einstellen
Na ₃ -Citratpuffer	0,75 mol/L Na ₃ Citrat pH 7,0 mit Zitronensäure einstellen
Chloroform-Isoamylalkohol	49 Teile Chloroform 1 Teil Isoamylalkohol
Phenol	Wasser-gesättigte Lösung, pH 4,5

Das Protokoll zur Isolierung von RNA nach Chomczynski und Sacchi wurde wie nachfolgend beschrieben modifiziert:

1. Die Zellen wurden mit 800 µL Solution D lysiert.
2. Das Zellysat wurde mit 1/10 Volumen 2 mol/L Natriumacetat und 1 Volumen saurem Phenol versetzt, homogenisiert und 5 min auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 1/5 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol wurde das Gemisch 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (30 min, 12000g, Raumtemperatur).
3. Die in der oberen, wässrigen Phase gelöste RNA wurde von der unteren, phenolischen Phase getrennt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und gegebenenfalls ü.N. bei -80°C gelagert.
4. Schritt 2 und 3 wurden wiederholt. Die RNA-Lösung wurde mit 1 Volumen kaltem Isopropanol versetzt und homogenisiert. Die Präzipitation der RNA erfolgte 15 min im Eisbad mit anschließender Zentrifugation (20 min, 12000g, 4°C).
5. Das Pellet wurde in 125 µL Solution D suspendiert, mit 1 Volumen kaltem Isopropanol gefällt und zentrifugiert (10 min, 12000 g, 4°C).

6. Das RNA-Pellet wurde einmal mit 75% Ethanol, zweimal mit 100% Ethanol gewaschen, anschließend 3 min bei 70°C getrocknet und in Wasser aufgenommen.

3.5 Reverse Transkription (RT)

Reverse Transkription mit SuperScript™ II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase

Reaktionsansatz-1:

5 µmol/L Ankerprimer T21GG, Metabion, Martinsried (siehe Tab. 3, Seite 40)

5× First Strand Puffer, Gibco BRL

0,1 mol/L dTT, Gibco BRL

10 mmol/L-each-dNTPs, Gibco BRL

200 U SuperScript™ II RT, Gibco BRL

2,5 µg RNA wurde in Anwesenheit des Primers T21GG 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend im Eisbad schockgekühlt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Zugabe von 4 µL 5× First Strand Puffer, 2 µL 0,1 mol/L dTT, 1 µL 10 mmol/L-each-dNTPs und 1 µL 200 U Superscript II in einem Gesamtvolumen von 20 µL für 50 min bei 42°C. Das Enzym wurde anschließend 15 min bei 70°C inaktiviert und der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt.

Reaktionsansatz-2:

2 µmol/L Ankerprimer T12MN, MWG Biotech (siehe Tab. 3, Seite 40)

5× First Strand Puffer, Gibco BRL

0,1 mol/L dTT, Gibco BRL

10 mmol/L-each-dNTPs, Gibco BRL

200 U SuperScript™ II RT, Gibco BRL

0,8 µg bis 2,0 µg RNA wurden in Anwesenheit des Primers T12MN 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend im Eisbad schockgekühlt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Zugabe von 4 µL 5× First Stand Buffer, 2 µL 0,1 mol/L dTT, 1 µL 10 mmol/L-each-dNTPs und 1 µL 200 U Superscript II in einem Gesamtvolumen von 20 µL für 50

min bei 42°C. Das Enzym wurde anschließend 15 min bei 70°C inaktiviert und der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt.

Reverse Transkription mit ThermoScript™ RNase H⁻ Reverse Transcriptase

5 µmol/L Ankerprimer T21GG, Metabion, Martinsried (siehe Tab. 3, Seite 40)

5× First Strand Puffer, Gibco BRL

0,1 mol/L dTT, Gibco BRL

10 mmol/L-each-dNTPs, Gibco BRL

40 U/µL RNase OUT, Gibco BRL

15 U/µL ThermoScript™ RNase H⁻ Reverse Transcriptase, Gibco BRL

2,5 µg RNA wurde in Anwesenheit des Primers T21GG 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend im Eisbad abgekühlt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Zugabe von 4 µL 5× First Strand Puffer, 1 µL 0,1 mol/L dTT, 1 µL 10 mmol/L-each-dNTPs, 1 µL RNase OUT und 1 µL ThermoScript™ RNase H⁻ Reverse Transcriptase in einem Gesamtvolumen von 20 µL für 60 min bei 65°C. Das Enzym wurde anschließend 15 min bei 70°C inaktiviert und der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt.

Reverse Transkription mit MMLV Reverse Transcriptase

Die cDNA-Synthese nach der Vorschrift von GenHunter wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen in einem Gesamtvolumen von 20 µL im MaxiCycler ausgeführt.

0,2 µg RNA (aus 3.4)

1 µmol/L T12MN Ankerprimer, MWG Biotech (siehe Tab. 3, Seite 40)

5× RT Buffer, GenHunter

20 µmol/L dNTP, GenHunter

MMLV Reverse Transcriptase, GenHunter

Die Durchführung der Reaktion erfolgte wie oben beschrieben, allerdings bei unterschiedlichen Temperaturen:

65°C, 5 min
37°C, 60 min
75°C, 5 min

Die MMLV Reverse Transcriptase wurde nach 10 min bei 37°C in das Reaktionsgemisch gegeben. Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt und weiter im MaxiCycler inkubiert.

3.6 Differential Display PCR (DD-PCR)

Die PCR-Amplifikation wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µL im Lightcycler bzw. von 100 µL im Perkin Elmer 9600 durchgeführt. Als Templat wurde die cDNA-Lösung aus Abschnitt 3.5 eingesetzt. Als Kontrolle für die DD-PCR wurde das Haushaltenszym Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) amplifiziert. Es wurden die in Tab. 3 aufgeführten Primer verwendet. Die in der DD-PCR angewendeten PCR-Programme wurden in Tab. 4 dargestellt (siehe Seite 41).

Tab. 3: Charakterisierung der verwendeten Primer für die DD-PCR

Primer		Sequenz
Sense Primer	T12MN (M=A,C,G; N=A,C,G,T)	T12MG 5'-(TTT) ₄ MG-3'
		T12MA 5'-(TTT) ₄ MA-3'
		T12MC 5'-(TTT) ₄ MC-3'
		T12MT 5'-(TTT) ₄ MT-3'
	Bio T12MN (M=A,C,G; N=A,C,G,T)	Bio T12MG 5'-bio-(TTT) ₄ MG-3'
		Bio T12MA 5'-bio-(TTT) ₄ MA-3'
		Bio T12MC 5'-bio-(TTT) ₄ MC-3'
		Bio T12MT 5'-bio-(TTT) ₄ MT-3'
	T21GG	5'-(TTT) ₇ GG-3'
	Bio T21GG	5'-bio-(TTT) ₇ GG-3'
	GAPDH	5'-AAT GGT GAA GGT CGG TGT GA-3'
	Antisense Primer	AP1
AP2		5'-GAC CGC TTG T-3'
AP3		5'-AGG TGA CCG T-3'
AP4		5'-GGT ACT CCA C-3'
AP5		5'-GTT GCG ATC C-3'
U23bam		5'-TGC GGA TCC TGG TAA AGG G-3'
GAPDH		5'-CTG GAA GAT GGT GAT GGG C-3'

Die Primer für die PAGE-Positiv-Kontrollen sind auf Seite 48 und die Primer für die PCR mit Bakterien als Templat sind auf Seite 54 aufgeführt.

Tab. 4: Charakterisierung der verwendeten DD-PCR-Programme

PCR-Programm	Aktivierung	Amplifikation		Terminale Extension
1	15 min, 95°C	15 sec, 95°C (Denaturierung)	40 Cyclen	
		15 sec, 40°C (Annealing)		
		30 sec, 72°C (Synthese)		
2	2 min , 95°C	15 sec, 95°C (Denaturierung)	40 Cyclen	
		15 sec, 40°C (Annealing)		
		30 sec, 72°C (Synthese)		
3	2 min , 95°C	15 sec, 95°C (Denaturierung)	40 Cyclen	5 min, 72°C
		120 sec , 40°C (Annealing)		
		30 sec, 72°C (Synthese)		
4	10 min , 95°C	15 sec, 95°C (Denaturierung)	40 Cyclen	5 min, 72°C
		120 sec, 40°C (Annealing)		
		30 sec, 72°C (Synthese)		
5	15 min , 95°C	15 sec, 95°C (Denaturierung)	40 Cyclen	5 min, 72°C
		120 sec, 40°C (Annealing)		
		30 sec, 72°C (Synthese)		
6	15 min, 95°C	60 sec, 95°C (Denaturierung)	40 Cyclen	
		30 sec, 59°C (Annealing)		
		60 sec, 72°C (Synthese)		

3.6.1 Amplifikation im LightCycler

Reaktionsansatz-1 (20 µL Gesamtvolumen):

2 µL cDNA (aus 3.5)

0,5 µmol/L Sense Primer T21GGbio, Metabion, Martinsried (siehe Tab. 3, Seite 40)

0,5 µmol/L Antisense Primer U23bam, Metabion, Martinsried (siehe Tab. 3, Seite 40)

RNase-freies Wasser, Qiagen

2× QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix: HotStarTaq™ DNA Polymerase
 QuantiTect SYBR Green PCR Puffer
 dNTP Mix (mit dUTP)
 SYBR Green I
 ROX (passiver Referenz-Farbstoff)
 5 mmol/L MgCl₂

Für diesen Reaktionsansatz wurde das PCR-Programm 2 verwendet (siehe Tab. 4, Seite 41).

3.7 Direct-Blotting-Elektrophorese

Die Auflösung von Agarosegelen reicht nicht aus, um DNA-Banden aus einer DD-PCR zu vereinzeln. Hierfür wird eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen eingesetzt, die eine Auftrennung von DNA-Einzelsträngen bis zu einem Längenunterschied von einem Nukleotid ermöglicht.

Die mit Biotin markierten Amplifikate der DD-PCR werden durch Polyacrylamidgele aufgetrennt und direkt auf eine Nylonmembran transferiert, die unter dem Gel entlang transportiert wird (Abb. 16). Nach der Immobilisierung der DNA auf der Membran und der Visualisierung durch eine NBT/BCIP-Farbstoffreaktion werden einzelne DNA-Banden aus der Membran mit einem Skalpell ausgeschnitten und einer Festphasen-PCR unterzogen (siehe 3.8).

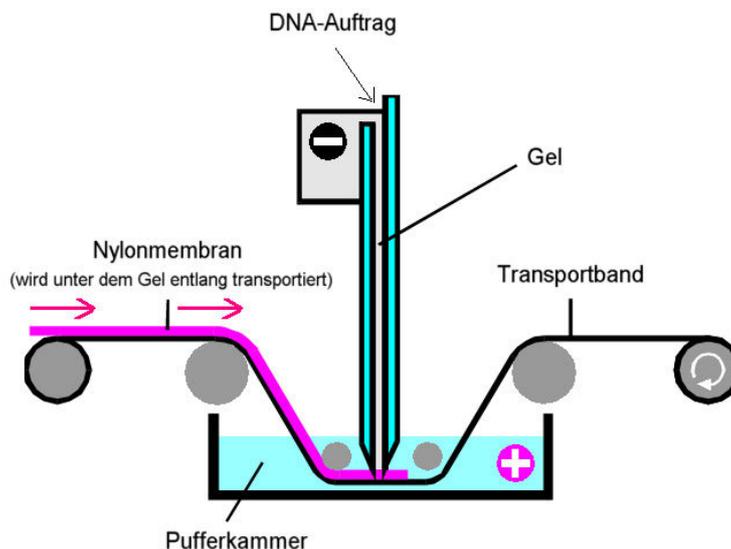


Abb. 16: Schematischer Aufbau der Direct-Blotting-Elektrophorese

Die DD-PCR-Produkte werden an der oberen Gel-Kante aufgetragen. Während der Direct-Blotting-Elektrophorese wandern sie in Richtung Anode, laufen aus dem Gel heraus und werden direkt auf die Nylonmembran transferiert („Direct-Blotting“).

3.7.1 Herstellung eines Polyacrylamidgels

Reagenzien:

Harnstoff

10× TBE Puffer (siehe 3.3.5)

Long Ranger Gel Solution, FMC BioProducts

10% Ammonium Persulfat (APS), BIO-RAD: 1 g auf 10 mL H₂O,
300 µL Aliquot bei -20°C gelagert.

N,N,N'N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED), BIO-RAD

Es wurden 21 g Harnstoff mit 5 mL 10× TBE Puffer, 4,25 mL Long Ranger Gel Solution und 28 mL Wasser versetzt. Nach kurzem Rühren wurde die klare Lösung 5 min unter Vakuum entgast. Die Lösung wurde mit Filtern der Marke Filtropur S 0,45 der Firma Sarstedt filtriert. Nach der Zugabe von 300 µL APS und 30 µL TEMED wurde die Gel-Lösung innerhalb von 10 min zwischen zwei Glasplatten geschoben, die durch einen Abstandhalter (Dicke: 0,19 mm) auseinandergehalten wurde. Das Gel wurde 30 min bei Raumtemperatur polymerisiert, dann mit Plastikfolie eingepackt und ü.N. bei 4°C aufbewahrt.

3.7.2 Direct-Blotting-PAGE

Die Elektrophorese erfolgte nach der Bedienungsanleitung des GATC 1500 Direct-Blotting-Elektrophoresis-Systems der Firma GATC, Konstanz.

Reagenzien:

Stop-Mix	99% (v/v) deionisiertes Formamid
	5 mmol/L Na ₂ EDTA
	0,1% (w/v) Bromphenolblau

5 µL der in Abschnitt 3.3.4 gefällten DNA-Lösung wurden mit 3,33 µL Stop-Mix versetzt, 3 min bei 95°C denaturiert und sofort im Eisbad abgekühlt. Nach 5 min wurde 1 µL dieser kalten Lösung auf das Gel aufgetragen. Pro Gel darf die Proben-Auftragezeit 10 min nicht überschreiten. Die Gelelektrophorese wurde bei 30 W und etwa 1500 bis 1700 V durchgeführt. 50 min nach Probenauftragung wurde der Schritt-Motor der Direct-Blotting-Apparatur (siehe Abb. 16) gestartet. Die verwendete Nylonmembran war 40 cm lang und wurde mit einer Geschwindigkeit von 12 cm/h unter dem Gel entlanggeschoben. Nach Abschluss des Direct-Blotting-Prozesses befand sich die Membran auf der rechten Seite der Apparatur (siehe Abb. 16).

Anschließend wurde die DNA im Trockenschrank durch 20 minütige Inkubation bei 80°C auf der Nylonmembran immobilisiert.

3.7.3 Detektion biotinylierter DNA

Die mittels PAGE auf der Nylonmembran aufgetrennten DNA-Fragmente wurden im „BioDetection System“ der Firma GATC visualisiert.

Reagenzien:

dest. Wasser

Waschlösung-1 (W1-Lösung)	100 mmol/L NaCl 50 m mol/L Tris·HCl, pH 9,4
1% SDS-Blockierlösung	1% (w/v) Casein Hammerstein, ICN Biomedicals, Ohio in W1-Lösung 1% SDS
Waschlösung-2 (W2-Lösung)	100 m mol/L NaCl 50 m mol/L Tris·HCl, pH 9,4 1% SDS
NBT/BCIP-Lösung	1 Tablette NBT/BCIP, Roche, Mannheim in 20 mL dest. Wasser (0,2 mg/mL NBT, 95 µg/mL BCIP)
SA-AP-Lösung	2,7 µL bis 3,2 µL Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat, GATC Biotech (Art. No A50010), in 20 mL 1% SDS-Blockierlösung

Detektions-Programm:

1. 5 min mit 50 mL dest. Wasser
2. 5 min mit 50 mL W1-Lösung
3. 15 min mit 50 mL 1% SDS-Blockierlösung
4. 15 min mit 50 mL 1% SDS-Blockierlösung
5. 15 min mit 50 mL 1% SDS-Blockierlösung
6. 60 min bis 90 min mit 20 mL SA-AP-Lösung
7. 15 min mit 50 mL 1% SDS-Blockierlösung
8. 5 min mit 50 mL W2-Lösung
9. 5 min mit 50 mL W2-Lösung
10. 5 min mit 50 mL W1-Lösung
11. 5 min mit 50 mL W1-Lösung
12. 5 min mit 50 mL W1-Lösung
13. 180 min bis 240 min mit 20 mL NBT/BCIP-Lösung

14. 5 min mit 50 mL dest. Wasser
15. 5 min mit 50 mL dest. Wasser
16. 5 min mit 50 mL dest. Wasser

Die Membran wurde in Wasser befeuchtet und in W1-Lösung äquilibriert (Schritt 1-2). Unspezifische Bindungsstellen der Membran wurden mit Blockierlösung abgeblockt (Schritt 3-5). Streptavidin-Biotin-Konjugat wurde zugegeben und anschließend unspezifisch gebundenes Konjugat von der Membran entfernt (Schritt 6-12). BCIP/NBT wurde zugegeben und die Membran nach der Farbentwicklung neutralisiert (Schritt 13-16).

3.7.4 Herstellung von Direct-Blottin-Positiv-Kontrollen

Die Direct-Blotting-Elektrophorese und die anschließende kolorimetrische Detektion sind technisch und methodisch sehr anspruchsvoll, weil viele Fehlerquellen zum Scheitern führen können. Um zu zeigen, dass der Mangel an (differentiellen) DNA-Banden nicht an der mangelnden Sensitivität dieser Arbeitsprozesse liegt, wurden vier verschiedene biotinylierte PCR-Produkte als Positiv-Kontrollen in die Elektrophorese eingesetzt. Die biotinylierten DNA-Fragmente codieren Teile der Cyclooxygenase 1 (Cox-1), des Tumor Nekrose Faktors (TNF), des Interleukins 6 (IL6) und des Prion Proteins (PrP). Sie haben jeweils eine Größe von 133 bp, 450 bp, 600 bp, 750 bp und umfassen damit die für die DD-PCR interessanten Fragmentgrößen. Die Herstellung von den vier Positiv-Kontrollen wurde nach folgenden Arbeitsschritten angefertigt:

Herstellung der Positiv-Kontrolle Cox-1 (133 bp), TNF (450 bp) und IL6 (600 bp)

1. Templat: Es lagen pUC18-Plasmide mit folgenden Inserts vor: Cox-1 (Maus, 133 bp), TNF (Mensch, 450 bp) und IL6 (Mensch, 600 bp). Die Konzentration der Plasmide betrug jeweils 10^7 Moleküle pro μL .
2. PCR-Amplifikation:
Die PCR-Amplifikation wurde mit der Plasmid-DNA als Templat (siehe Punkt 1) und passenden biotinylierten Primern (siehe Tab. 5, Seite 48) unter Verwendung

- der PCR-Programm 7 und PCR-Programm 8 (s.u.) im MaxiCycler durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 100 µL, davon war 1 µL Templat.
3. Trennung von Nebenprodukten durch Agarose-Gelelektrophorese: Die PCR-Produkte wurden mit 1/10 Volumen 3 mol/L Natriumacetat und 2,5 Volumen 100%-iges Ethanol gefällt (siehe 3.3.4) und anschließend auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetragen (siehe 3.3.5).
 4. Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel:
Die DNA-Fragmenten wurden mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen aus dem Agarosegel isoliert (siehe 3.3.6).
 5. Charakterisierung von DNA-Fragmenten durch Chip-Elektrophorese: Die aus dem Agarosegel isolierten DNA-Fragmente wurden durch Chip-Elektrophorese in der Größe überprüft und quantifiziert (siehe 3.3.2).

Tab. 5: Charakterisierung der PCR-Primer für die Positiv-Kontrollen

Primer		Sequenz
Sense Primer	Cox-1	5'-bio-CAA AAG AAC CCA GTG TCC-3'
	TNF	5'-bio-GAG TGA CAA GCC TGT AGC CCA TGT TGT AGC A-3'
	IL6	5'-bio-ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC-3'
	PrP	5'-bio-GCA GAG CAG TCA TTA TGG CGA AC-3'
Antisense Primer	Cox-1	5'-bio-ATG AGT CCA TCT GTT CCC-3'
	TNF	5'-bio-GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC TGC CCA GAC T-3'
	IL6	5'-bio-GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G-3'
	PrP	5'-bio-CCC ACT ATC AGG AAG ATG AGG AAA-3'

PCR-Programm 7: (für die Positiv-Kontrollen TNF, IL6 und PrP der Direct-Blotting-PAGE)

Aktivierung	15 min	95°C	
Amplifikation	1 min	95°C	(Denaturierung)
(35 Cyclen)	1 min	56°C	(Annealing)
	2 min	72°C	(Synthese)

PCR-Programm 8: (für die Positiv-Kontrollen Cox-1 der Direct-Blotting-PAGE)

Aktivierung	15 min	95°C	
Amplifikation	30 sec	95°C	(Denaturierung)
(35 Cyclen)	30 sec	53°C	(Annealing)
	60 sec	72°C	(Synthese)

Herstellung der Positiv-Kontrolle PrP (750 bp)

1. Templat: Die Gesamt-DNA wurde aus HeLa-Zellen mit dem QIAamp DNA Mini Kits der Firma Qiagen nach Vorschrift des Herstellers isoliert.
2. PCR-Amplifikation: Die PCR-Amplifikation wurde mit 1 µg Gesamt-HeLa-DNA als Templat und dem biotinylierten Primerpaar (siehe Tab. 5, Seite 48) unter Verwendung des PCR-Programms 7 im MaxiCycler in einem Gesamtvolumen von 100 µL durchgeführt.
3. Reinigung und Quantifizierung erfolgten wie oben beschrieben.

3.8 Reamplifikation immobilisierter DNA von Nylonmembran

Die Reamplifikation der DNA-Banden von der Nylonmembran wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µL im MaxiCycler durchgeführt.

Reagenzien:

Templat: (ausgeschnittene Membranstücke mit immobilisierter DNA-Bande aus 3.7 oder 10 µL bzw. 40 µL cDNA aus 4.1.4 und 4.2.3)

0,5 µmol/L Primer Mix: (siehe Tab. 3 und 5, Seite 40 und 48, Endkonzentration im Reaktionsansatz)

dest. Wasser, Qiagen

50 µL HotStarTaq Master Mix, Qiagen: 2,5 U HotStarTaq DNA Polymerase
 1× PCR Puffer (enthält 1,5 mmol/L MgCl₂)
 200 µmol/L-each-dNTP Mix

Die Reamplifizierungsprogramme für die Positiv-Kontrollen TNF, IL6, PrP und Cox-1 der Direct-Blotting-PAGE entsprechen den PCR-Programmen 7 und 8 (siehe Seite 48). Dabei gilt PCR-Programm 7 für die Reamplifizierungsprogramme von TNF, IL6, PrP und PCR-Programm 8 für das Reamplifizierungsprogramm von Cox-1.

Die Reamplifizierungsprogramme für die DD-Amplifikate wurden in Tab. 6 dargestellt (siehe Seite 50).

Tab.6: Charakterisierung der verwendeten Reamplifizierungsprogramme für die DD-Amplifikate

Reamplifizierungsprogramm	Aktivierung	Amplifikation		Terminale Extension
1	15 min 95°C	1 min, 95°C (Denaturierung)	50 Cyclen	3 min 72°C
		1 min, 60°C (Annealing)		
		2 min, 72°C (Synthese)		
2		2 min, 95°C (Denaturierung)	40 Cyclen	
		2 min, 40°C (Annealing)		
		2 min, 72°C (Synthese)		
3		2 min, 95°C (Denaturierung)	40 Cyclen	
	4 min, 40°C (Annealing)			
	2 min, 72°C (Synthese)			
4	2 min, 95°C (Denaturierung)	40 Cyclen		
	6 min, 40°C (Annealing)			
	2 min, 72°C (Synthese)			
5	2 min, 95°C (Denaturierung)	40 Cyclen		
	8 min, 40°C (Annealing)			
	2 min, 72°C (Synthese)			
6	2 min, 95°C (Denaturierung)	40 Cyclen		
	6 min, 30°C (Annealing)			
	2 min, 72°C (Synthese)			
7	2 min, 95°C (Denaturierung)	40 Cyclen		
	6 min, 20°C (Annealing)			
	2 min, 72°C (Synthese)			

3.9 Arbeiten mit genetisch veränderten Organismen (GVOs)

Die Reamplifikationsprodukte differentieller Banden (siehe 3.8) wurden nach der Primer-Entfernung gefällt (siehe 3.3.7 und 3.3.4) und dann in das Plasmid pUC18 wie folgt kloniert.

3.9.1 Ligation von DNA-Fragmenten in pUC18

Blunting/Kinase Reaktion

Die Blunting Reaktion und die Kinase Reaktion wurden gleichzeitig unter folgenden Reaktionsbedingungen in einem Gesamtvolumen von 20 μL im MiniCycler ausgeführt.

Reaktionsansatz:

5 μL	Templat (PCR-Amplifikate aus 3.8, nach Primer Entfernung, siehe 3.3.7)
2 μL	10*Y/Tango-Puffer, MBI Fermentas
0,5 μL	Klenow Fragment bei 10 U/ μL , MBI Fermentas
1 μL	T4 Polynukleotid Kinase (PNK) 10 U/ μL , MBI Fermentas
1 μL	dNTP 1 mmol/L, Gibco BRL
10,5 μL	dest. Wasser

Temperaturprofil der Reaktion: 37°C, 35 min
 75°C, 10 min
 65°C, 10 min

Ligation

Die Ligation wurde wie folgt in einem Gesamtvolumen von 20 μL im MiniCycler durchgeführt.

Reaktionsansatz:

7 μL	DNA-Lösung (aus der Blunting/Kinase-Reaktion)
7 μL	dest. Wasser
2 μL	10*Ligation Puffer für T4 DNA Ligase, MBI Fermentas
2 μL	50% PEG Lösung

1 μ L pUC18 50 ng/ μ L (SmaI, BAP)

1 μ L T4 DNA Ligase (30 U/ μ L), MBI Fermentas

Temperaturprofil der Reaktion: 22°C, 60 min
65°C, 10 min

Die Entsalzung des Reaktionsansatzes für die nachfolgende Elektroporation wurde wie folgt durchgeführt:

20 μ L Ligationsansatz wurden mit 2 μ L Glycogen (35 mg/mL, AGS) und 28 μ L Wasser aufgefüllt und anschließend mit 10 Volumen kaltem Butanol versetzt. Das Pellet wurde ü.N. bei Raumtemperatur getrocknet und dann für die Elektroporation in 10 μ L H₂O aufgenommen.

3.9.2 Elektroporation von E. coli XL-1 blue

Nach der Klonierung der DNA-Fragmente in pUC18 wurde das rekombinierte Plasmid durch Elektroporation in E. coli transformiert und vermehrt.

Aufzucht der Bakterien für die Elektroporation

Reagenzien:

E. coli XL-1 der Firma Stratagene

LB-Medium: 10 g/L Bacto-Trypton, DIFCO
5 g/L Bacto-Yeast, DIFCO
10 g/L NaCl
pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren

40 μ L E. coli XL-1 der Firma Stratagene wurden mit 2 mL LB-Medium gemischt und anschließend in 1 L LB-Medium angeimpft. Diese Lösung wurde ü.N. bei 37°C geschüttelt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,5-1,0 wurden die Bakterienzellen für 30 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (17 min, 4230g, 0°C), in 800 mL eiskaltem destillierten Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach einer weiteren Resuspension der Zellen in 200 mL eiskaltem destillierten Wasser wurde die Zentrifugation wiederholt. Das Zellpräzipitat wurde in 20 mL 10% (v/v) eiskaltem Glycerin gelöst. Schließlich wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3900g,

Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C wurden folgende Substanzen zugegeben:

100 µg/ml Ampicillin
40 µg/mL X-Gal-Lösung
0,1 mmol/L IPTG

Die Lösung wurde homogenisiert und Platten sofort gegossen.

3.9.4 PCR mit Bakterien als Templat

Es wurden weiße Kolonien in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Die PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µL im Perkin Elmer 9600.

Reagenzien:

PCR-Templat: eine ausgewählte weiße Kolonie, mit einem Zahnstocher in das Reaktionsgefäß überführt

0,5 µL Primer-Mix (je 5 µmol/L):

Sense Primer: 5'- CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACG-3'
Antisense Primer: 5'- GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGG-3'

4,5 µL dest. Wasser

5 µL HotStarTaq Master Mix, Qiagen (siehe 3.6)

Amplifizierungsprogramm:	Aktivierung	15 min	95°C	
	Amplifikation	30 sec	96°C	(Denaturierung)
	(35 Cyclen)	1 min	65°C	(Annealing)
		2 min	72°C	(Synthese)

3.9.5 Plasmid-Präparation

Zur Plasmidvermehrung wurden die entsprechenden Klone von den LB-Amp-Platten mit einem autoklavierten Zahnstocher gepickt und in 10 mL LB-Amp-Medium bei 37°C über Nacht herangezogen. Die Präparation der Plasmide erfolgte nun unter Verwendung des „QIAquick Mini-Prep Plasmid Purification Kits“ der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers.

Reagenzien:

Antibiotika-LB-Medium: 10 g/L Bacto-Trypton, DIFCO

5 g/L Bacto-Yeast, DIFCO
10 g/L NaCl
pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren
Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C wurden 100
µg/mL Ampicillin zugegeben.

QIAquick Mini-Prep Plasmid Purification Kit (Qiagen):

Resuspendierungspuffer P1: 0,01% (w/v) RNase A,
50 mmol/L Tris·Cl, pH 8,0

Lyse-Puffer P2: 200 mmol/L NaOH
1% (w/v) SDS

Neutralisierungspuffer N3: 3 mol/L Kaliumacetat

PE-Puffer: 25% in Ethanol, Qiagen

QIAquick Spin Columns, Qiagen

3 mL der Übernacht-Kultur wurde 1 min bei 12000g zentrifugiert, das Bakterien-Pellet in 250 µL P1-Puffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Durch Zugabe von 250 µL P2-Puffer wurden die Bakterien lysiert. Nach maximal 5 min wurde die Lyse durch Zugabe von 350 µL N3-Puffer und leichtes Schwenken beendet. Eine 10 minütige Zentrifugation bei 12000g führte zur Sedimentation der Zelltrümmer einschließlich chromosomaler DNA. Die Plasmid-DNA verblieb im Überstand, der abgenommen, auf eine QIA-Spin-Säule gegeben und 1 min bei 12000g zentrifugiert wurde. Die an die Säule gebundene DNA wurde nun mit 750 µL PE-Puffer gewaschen, wobei der Puffer durch 1 min Zentrifugation bei 12000g entfernt wurde. Um Lösungsmittel-Reste zu entfernen, wurde die QIA-Spin-Säule 1 min bei 12000g leer zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte durch Auftragen von 100 µL EB-Puffer auf die Säule (Inkubationszeit: 1 min) und durch Zentrifugation für 1 min bei 12000g.

3.10 Sequenzanalyse durch „Cycle Sequencing“

Die DNA-Sequenzanalyse wurde mit dem „ABI PRISM™ BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

Bei dieser Methode wird ein sog. „Terminator Premix“ eingesetzt, der unter anderem vier fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) und die DNA abhängige DNA-Polymerase AmpliTaq beinhaltet. Gibt man diesem Premix nun die zu sequenzierende doppelsträngige DNA sowie einen geeigneten Oligonukleotid-Primer zu und unterzieht es einem PCR-ähnlichen Verfahren („Cycle Sequencing“), so erhält man eine große Anzahl von DNA-Fragmenten, die als Startpunkt den Primer tragen und bis zum zufälligen Einbau eines Didesoxynukleotides verlängert wurden. Trennt man diese Fragmente nun auf einem Sequenzierungsgel auf, so kann man anhand dessen die DNA-Sequenz analysieren. Da die Fluoreszenzfarbstoffe nukleotidspezifisch sind, kann die Reaktion in einem einzigen Gefäß stattfinden. Die Cycle Sequencing-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µL im Perkin Elmer 9600 ausgeführt. Die anschließende Auftrennung mittels Kapillar-Elektrophorese und die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgten im „ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer“ im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE).

Reagenzien:

Templat: 300 ng Plasmid-DNA (aus 3.9.5)

15 pmol Primer-Mix:

Sense Primer : 5'- ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG-3'

Antisense Primer : 5'- TTCACACAGGAAACAGCTATGACC-3'

8 µL Terminator Premix: 2 µL Big Dye, Terminator Sequencing Mix

6 µL 2,5× Sequencing Buffer

dest. Wasser

Sequenzierungs-Zyklus: (30 Cyclen)	Denaturierung	10 sec 96°C
	Annealing	5 sec 50°C
	Synthese	4 min 60°C

Zu den 20 μL Reaktionsansatz wurden 80 μL 0,3 mol/L Natriumacetat und 300 μL 100%-iges Ethanol zugegeben. Die DNA wurde dann bei Raumtemperatur 5 min inkubiert und anschließend für 20 min bei 12000 g in der Eppendorf-Zentrifuge pelletiert. Das kaum sichtbare Pellet wurde an der Luft getrocknet, in 35 μL Formamid gelöst und in die Kapillar-Elektrophorese eingeführt.

Die DNA-Sequenzdaten wurden mit dem „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) Programm des National Center for Biotechnology Information (NCBI) im BLASTn Searchmode (Nucleotide-nucleotide-BLAST) mit den Sequenzen der Datenbank verglichen und die korrespondierende cDNA-Sequenz ermittelt.

3.11 Verifizierung von identifizierten Zielgenen

Die in Abschnitt 3.10 identifizierten Gene wurden durch Charakterisierung ihrer Expression mittels quantitativer *real time* PCR verifiziert. In unserem Arbeitskreis wird mit einem LightCycler gearbeitet, der schnelles Thermocycling mit der Online Fluoreszenzdetektion der RT-PCR Zielgenprodukte kombiniert. Als Quantifizierungsstrategie wurde eine normalisierte relative Quantifizierung gewählt, wobei die mRNA Expressionsdaten eines Zielgens mit denen eines Referenzgens (Housekeeping Gen) verglichen wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen eingesetzt. GAPDH ist ein Housekeeping Gen, das in allen Geweben exprimiert wird. Die erfolgreiche Amplifikation dieser mRNA dient als Kontrolle: Sie beweist die Präparation intakter RNA und zeigt, dass alle Komponenten der RT-PCR funktionieren. Die Detektion der GAPDH-Amplifikate erfolgte über das FRET-Prinzip („fluorescence resonance energy transfer“, siehe Abb. 17, Seite 60) und die der Zielgen-Amplifikate mittels SYBR Green.

3.11.1 Quantifizierung von Zielgenen

Zur Quantifizierung von Zielgenen in der cDNA durch eine Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit definierten Templatkonzentrationen wie folgt hergestellt:

1. Plasmid-Präparation: Die weißen Kolonien mit Zielgeninsert (aus 3.9.3) wurden entnommen und in 10 mL LB-Amp-Medium bei 37°C über Nacht kultiviert. Die Plasmid-Präparation erfolgte unter Verwendung des „QIAquick Mini-Prep Plasmid Purification Kits“ der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers (siehe 3.9.5).
2. Plasmid-Verdauung: Die Plasmid-DNA mit Insert wurde mit Restriktionsendonukleasen (EcoRI, MBI Fermentas) sequenzspezifisch außerhalb des Inserts gespalten (siehe 3.3.3).
3. Trennung von Nebenprodukten durch Agarose-Gelelektrophorese: Die Restriktionsprodukte wurden mit 1/10 Volumen 3 mol/L Natriumacetat und 2,5 Volumen 100%-igem Ethanol gefällt (siehe 3.3.4) und anschließend auf einem 0,5% -igen Agarosegel aufgetragen (siehe 3.3.5).
4. Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel: Die DNA-Fragmente wurden mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen aus dem Agarosegel isoliert (siehe 3.3.6).
5. Charakterisierung von DNA-Fragmenten durch Chip-Elektrophorese: Die aus dem Agarosegel isolierten DNA-Fragmenten wurden durch Chip-Elektrophorese in der Größe überprüft und quantifiziert (siehe 3.3.2).
6. Herstellung einer Verdünnungsreihe: Anhand der in Chip-Elektrophorese bestimmten Konzentration der DNA-Lösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, in denen theoretisch 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 und 10^8 DNA-Moleküle pro μL enthalten sein sollten.

In der Sequenz von dem identifizierten Zielgen Rab7 wurde mit Hilfe der „Oligo Primer Analysis Software“ ein für die quantitative PCR geeignetes Primerpaar ermittelt.

Sense Primer (Rab7): 5'-GAA CAT GCC AGG AGA G-3'
Antisense Primer (Rab7): 5'-GGC CAG TCA TCA AAT G-3'

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 20 μL im Lightcycler ausgeführt. Die Quantifizierung des Zielgens erfolgte über eine Doppelbestimmung.

Reagenzien:

Templat:	Eichkurve:	1 μL Plasmid-DNA, pro Amplifikationsansatz (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 oder 10^8 DNA-Moleküle pro μL)
	Unbekannte Probe:	1 μL cDNA (aus 3.5)

0,5 $\mu\text{mol/L}$ Primer-Mix (Endkonzentration im Reaktionsansatz):

Sense Primer (Rab7):	5'-GAA CAT GCC AGG AGA G-3'
Antisense Primer (Rab7):	5'-GGC CAG TCA TCA AAT G-3'

RNase-freies Wasser, Qiagen

2 \times QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix:	HotStarTaq TM DNA Polymerase QuantiTect SYBR Green PCR Puffer dNTP Mix (mit dUTP) SYBR Green I ROX (passiver Referenz-Farbstoff) 5 mmol/L MgCl ₂
--	---

Quantifizierungsprogramm von Zielgenen:

Aktivierung	15 min	95°C	
Amplifikation	15 sec	95°C	(Denaturierung)
(50 Cyclen)	20 sec	55°C	(Annealing)
	15 sec	72°C	(Synthese)

3.11.2 Quantifizierung von Housekeeping Genen

Für die Quantifizierung von Housekeeping Genen wurden zu einem Standard PCR-Ansatz zusätzlich zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Hybridisierungsproben) zugefügt, welche zwischen den beiden Primern in räumlicher Nähe zueinander (1-5 Nukleotide Abstand) an die Ziel-DNA binden. Diese Hybridisierungsproben sind mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Fluorescein und LC Red 640). Die Detektion basiert auf dem FRET-Prinzip („fluorescence resonance energy transfer“) (Abb. 17).

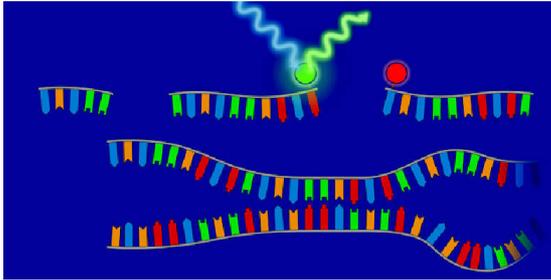


Abb. 17.1: Denaturierung

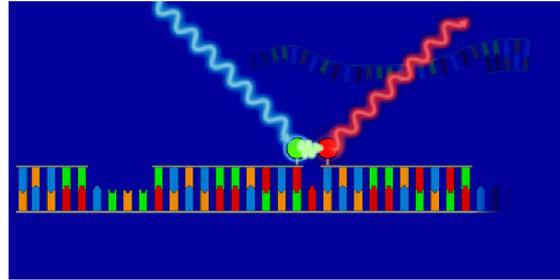


Abb. 17.2: Primer Anlagerung

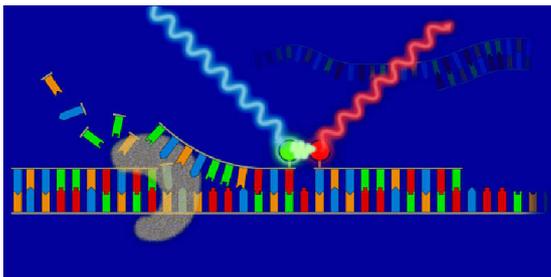


Abb. 17.3: Kettenverlängerung

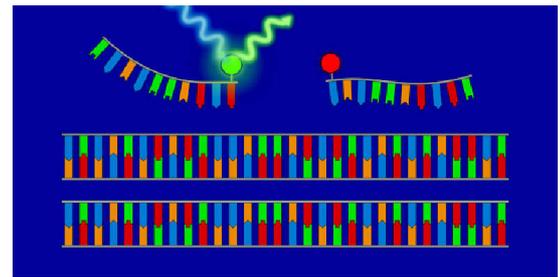


Abb. 17.4: Ende des Zyklus

Abb. 17: Schematischer Ablauf einer PCR mit Hybridisierungsproben

In der Denaturierungsphase wird die doppelsträngige DNA voneinander getrennt (Abb. 17.1). Während der Annealingphase binden die beiden Hybridisierungsproben an der gesuchten Ziel-DNA in räumlicher Nähe. Wenn man gleichzeitig das Fluorescein anregt, emittiert dieses keine Fluoreszenz, sondern überträgt die Energie auf den benachbarten zweiten Fluoreszenzfarbstoff LC Red 640 (Abb. 17.2). Dieser emittiert nun rote Fluoreszenz, deren Intensität in Summe direkt proportional der Menge an Ziel-DNA ist. Die Messung des Signals erfolgt einmal pro Zyklus nach dem Primer Annealing. Zu diesem Zeitpunkt sind beide Hybridisierungsproben an die Ziel-DNA gebunden, und es erfolgt ein Energietransfer. Ungebundene Hybridisierungsproben geben auf Grund der fehlenden räumlichen Nähe kein Signal. In der Elongationsphase wurden die Hybridisierungsproben von der Taq-Polymerase abgebaut (Abb. 17.3). Im nächsten Zyklus binden bisher nicht hybridisierte Sonden an die Zielsequenz. Dafür werden intakte, nicht abgebaute, Hybridisierungssonden benötigt. Daher liegen die Sonden im Reaktionsansatz im Überschuss vor (Abb. 17.4).

Zur Quantifizierung des GAPDH-Gens in der cDNA durch eine Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit definierten Templatkonzentrationen wie folgt hergestellt:

1. GAPDH-cDNA Synthese: Die Gesamt-RNA wurde von den M2-Zellen mittels RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen isoliert und mit den Enzymen „Superscript II“ und Primer T12MC in cDNA umgeschrieben.
2. Amplifikation des GAPDH-Gens: Eine PCR, in die GAPDH-cDNA als Templat und GAPDH_{Sense} + GAPDH_{Antisense} (siehe Tab. 3, Seite 40) als Primerpaar eingesetzt wurden, wurde unter Verwendung des PCR-Programm 6 am Perkin Elmer 9600 durchgeführt (siehe 3.6.2).
3. Charakterisierung der GAPDH-Fragmente durch Chip-Elektrophorese: Die GAPDH-PCR-Produkte waren frei von Nebenprodukten (siehe 3.3.2).
4. Herstellung einer Verdünnungsreihe: Anhand der in Chip-Elektrophorese bestimmten Konzentration der DNA-Lösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, in denen theoretisch 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 und 10^8 GAPDH-Moleküle pro μL enthalten sein sollten.

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 20 μL im Lightcycler ausgeführt.

Reagenzien:

Templat:	Eichkurve:	1 μL GAPDH-DNA, pro Amplifikationsansatz (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 oder 10^8 DNA-Moleküle pro μL)
	Unbekannte Probe:	1 μL cDNA (aus 3.5)

0,5 $\mu\text{mol/L}$ Primer-Mix (Endkonzentration im Reaktionsansatz):

Sense Primer (GAPDH): 5'-AAT GGT GAA GGT CGG TGT GA-3'
 Antisense Primer (GAPDH): 5'-CTG GAA GAT GGT GAT GGG C-3'

0,15 $\mu\text{mol/L}$ Sonde-Primer-Mix (Endkonzentration im Reaktionsansatz):

Sense Primer: 5'-GGC AAA TTC AAC GGC ACA GTC AAG -3'
 Antisense Primer: 5'-CCG AGA ATG GGA AGC TTG TCA TCA AC-3'

RNase-freies Wasser, Qiagen

2 \times QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix:

HotStarTaqTM DNA Polymerase
 QuantiTect SYBR Green PCR Puffer
 dNTP Mix (mit dUTP)
 SYBR Green I
 ROX (passiver Referenz-Farbstoff)
 5 mmol/L MgCl₂

GAPDH Quantifizierungsprogramm:

Aktivierung	10 min	95°C	
Amplifikation (40 Cyclen)	10 sec	95°C	(Denaturierung)
	10 sec	60°C	(Annealing)
	12 sec	72°C	(Synthese)

3.11.3 Auswertung der quantitativen PCR

Mit Hilfe der *real time* PCR ist es möglich, die gebildete DNA-Menge während der PCR Reaktion direkt im Echtzeit zu messen^[145]. Innerhalb der PCR-Kurve kann ein geeigneter Punkt für die Quantifizierung gewählt werden. Dieser Punkt wird „Threshold“ oder Crossing-point (Cp) genannt und ist der Schnittpunkt mit einer Geraden (Crossing Line), die oberhalb der Hintergrundschwellewert-Geraden liegt (Abb. 18).

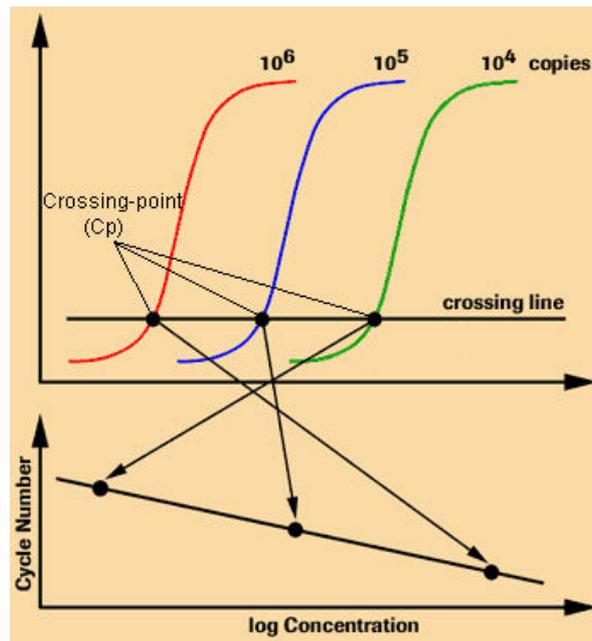


Abb. 18: Prinzip der Quantifizierung mit dem LightCycler System

In Abb. 18 sind die Amplifikationskurven in Abhängigkeit von der eingesetzten Templat-Menge (oberer Teil) und die berechnete Standard-Eichkurve (unterer Teil) dargestellt. Der ermittelte Threshold-Cycle wird gegen die Konzentration der eingesetzten Templat-Menge logarithmisch aufgetragen: Eine Standard-Eichkurve wird ermittelt.

Zur Quantifizierung mit Hilfe des LightCycler Systems wurden die Crossing-points der Proben mit den Crossing-points einer Standardreihe mit bekannter Konzentration verglichen, um die Templatkonzentration in den Proben zu bestimmen.

3.11.4 Auswertung der relativen quantitativen PCR

Bei der Auswertung der relativen quantitativen PCR wird die Genexpression eines Zielgens auf ein konstant exprimiertes „Housekeeping Gen“ bezogen. Man nennt diesen Vorgang auch Normalisierung der Expressionsergebnisse.

Es wurden jeweils Eichreihen für das Zielgen und Houskeeping Gen erstellt. Die unbekanntenen Proben wurden anhand der Standardkurven quantifiziert (siehe 3.11.3).

Die relative Quantifizierung hat folgende Formel zur Grundlage und wird ausgedrückt als Verhältnis (ohne Einheit):

$$\frac{\frac{\text{Zielgen behandelte-Zelle}}{\text{Referenzgen behandelte-Zelle}}}{\frac{\text{Zielgen Kontrollzelle}}{\text{Referenzgen Kontrollzelle}}} = \frac{\frac{\text{Rab7}_{\text{MNNG-Zelle}}}{\text{GAPDH}_{\text{MNNG-Zelle}}}}{\frac{\text{Rab7}_{\text{M2-Zelle}}}{\text{GAPDH}_{\text{M2-Zelle}}}}$$

Das Ergebnis gibt an, wie stark ein bestimmtes Gen in behandelten Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen (Kontrollzellen) exprimiert wird.

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung der DD-Analyse

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde zunächst versucht, die DD-PCR-Produktausbeute unter verschiedenen Ansätzen zu erhöhen. Anschließend wurden die optimalen Bedingungen für die DD-PCR bestimmt. Dabei wurde die DD-PCR nach der Reversen Transkription, der PCR-Amplifikation sowie der Neueinstellung der Reamplifikation und der Erhöhung der Membransensitivität untersucht.

4.1.1 Erhöhung der DD-PCR-Produktausbeute

Zur Erhöhung der DD-PCR-Produktausbeute wurden zwei Strategien verfolgt:

- Erhöhung der DNA-Polymerase-Konzentration im PCR-Reaktionsansatz
- Wechseln der Primer von 23mer-Primer (T21GGbio) auf 14mer-Primer (T12MNbio)

Hierfür wurden die in der vorangegangenen Diplomarbeit^[140] verwendeten M2-, Klon1- und Klon2-Zellen genutzt. Die Gesamt-RNA wurden entweder mittels RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen oder nach der Methode von Chomczynski und Sacchi isoliert.

4.1.1.1 DD-PCR unter zusätzlicher Anwendung von DNA-Polymerase

In der vorangegangenen Diplomarbeit^[140] wurde die DD-PCR unter Verwendung des PCR-Programms 1 (siehe Tab. 4, Seite 41) durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass eine mögliche Fehlerursache in den PCR-Bedingungen in dem verwendeten *real-time*-Enzymsystem der Firma Qiagen liegt. In der fünfzehn minütigen Denaturierungsphase wird die Taq-Polymerase von dem Antikörper freigesetzt, gleichzeitig werden aber auch dNTPs zur dNDPs und dNMPs hydrolysiert. Die Hydrolyse der Triphosphate könnte die Ursache der nicht befriedigenden PCR-Ausbeute sein.

In den folgenden Versuchen wurde die DD-PCR unter zusätzlicher Anwendung von 1 Unit DNA-Polymerase verschiedener Firmen untersucht. Dabei wurde die DD-PCR unter Anwendung des PCR-Programms 2 (siehe Tab. 4, Seite 41) am LightCycler durchgeführt. In diesem PCR-Programm wurde die Denaturierungszeit durch Zugabe der

DNA-Polymerase von 15 min auf 2 min reduziert (vgl. PCR-Programm 1, siehe Tab. 4, Seite 41). cDNA wurde mit den Enzymen „Superscript II“ und „Thermoscript“ synthetisiert. Als Primerpaar wurde T21GGbio+U23bam in die DD-PCR eingesetzt.

Abb. 19 zeigt die Amplifikationskurve, in der 1 Unit DNA-Polymerase der Firma Qiagen hinzugefügt wurden. Als Templat wurden die Superscript-Klon1-cDNA und Thermoscript-Klon1-cDNA eingesetzt. Die Gesamt-RNA von Klon1-Zellen wurde mittels RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen isoliert.

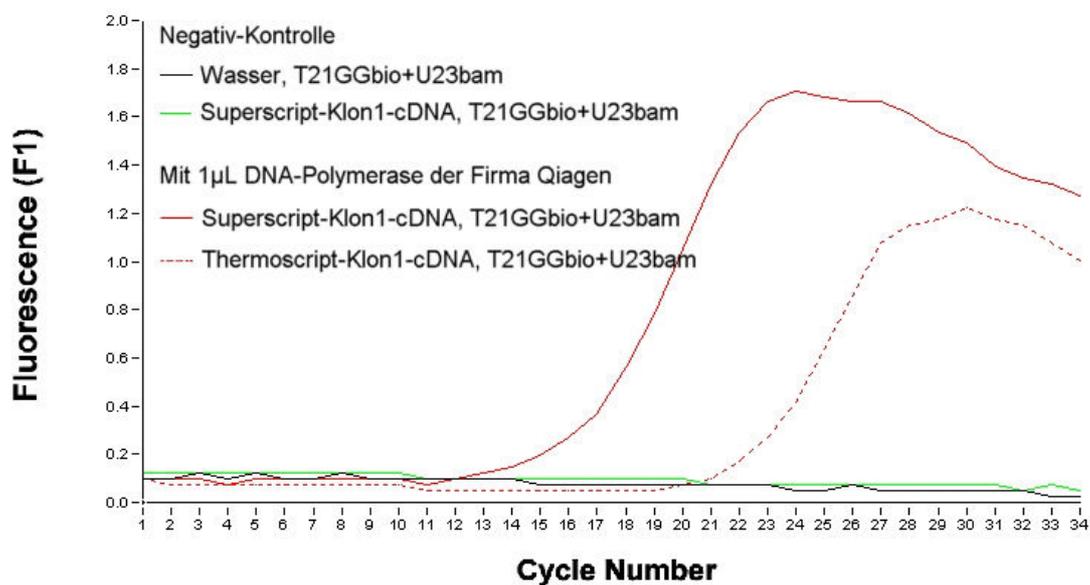


Abb. 19: Amplifikationskurve, deren Produktionsansatz zusätzlich mit DNA-Polymerase angereicht wurde

Zusätzlich zu Reaktionsansatz-1 (siehe 3.6.1) wurde 1 Unit DNA-Polymerase der Firma Qiagen hinzugefügt.

Templat: Superscript-Klon1-cDNA und Thermoscript-Klon1-cDNA

Aus Abb. 19 ist folgendes zu erkennen:

1. Der Thresholdzyklus (C_T) beträgt bei der Superscript-Amplifikationskurve 14, bei der Thermoscript-Amplifikationskurve 21. Je niedriger der C_T -Wert ist, desto mehr cDNA war als Templat vorhanden. Daraus folgt, dass Thermoscript im Vergleich zu Superscript entweder weniger aktiv ist oder spezifischer cDNA synthetisiert, so dass weniger Templat vorhanden ist.
2. Dies zeigt sich auch an dem gemessenen maximalen Fluoreszenzwert. Das Fluoreszenz-Maximum von Superscript liegt mit 1,7 deutlich höher als das von Thermoscript mit 1,2.

Die DD-PCR-Produkte wurden durch Chip-Elektrophorese geprüft (Abb. 20.1 und 20.2). Da keine DNA-Banden von den Negativ-Kontrollen auf den Analysen-Diagrammen detektiert wurden, wurden sie hier nicht dargestellt.

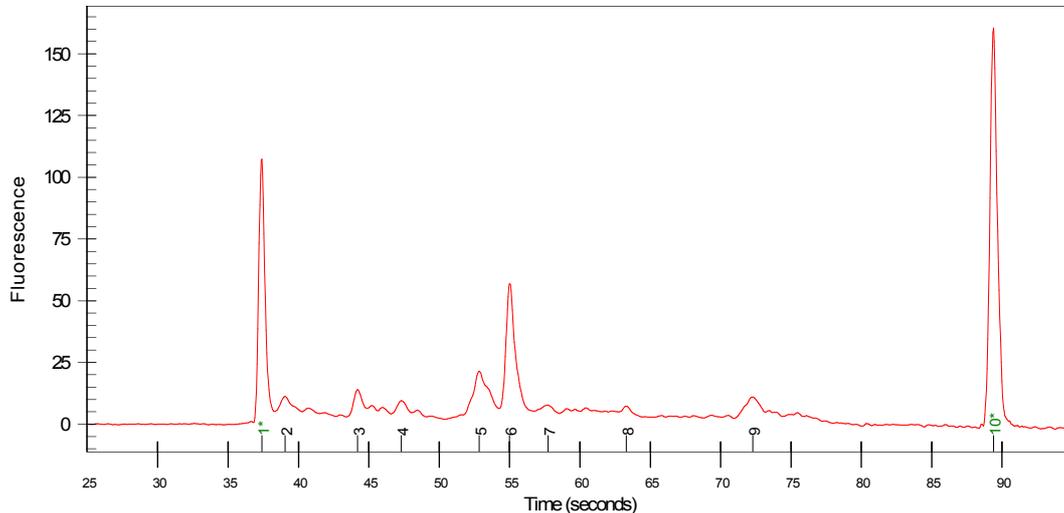


Abb. 20.1: Chip-Elektrophorese der unter zusätzlicher Anwendung von Qiagen-DNA-Polymerase angereicherten DD-PCR-Produkte

In Abb. 20.1 ist das Analysen-Diagramm für die Superscript-Klon1-DD-PCR-Produkte dargestellt. Nach 37 sec bzw. 89 sec wurden die DNA-Markerbanden (50 bp und 10380 bp) detektiert, die jeweils einen Fluoreszenzwert von ungefähr 110 und 160 haben. Die DNA-Banden wurden jeweils durch Peaks 2 bis 9 angezeigt. Sie haben folgende Größen: 82 bp, 172 bp, 226 bp, 327 bp, 374 bp, 434 bp, 575 bp und 924 bp.

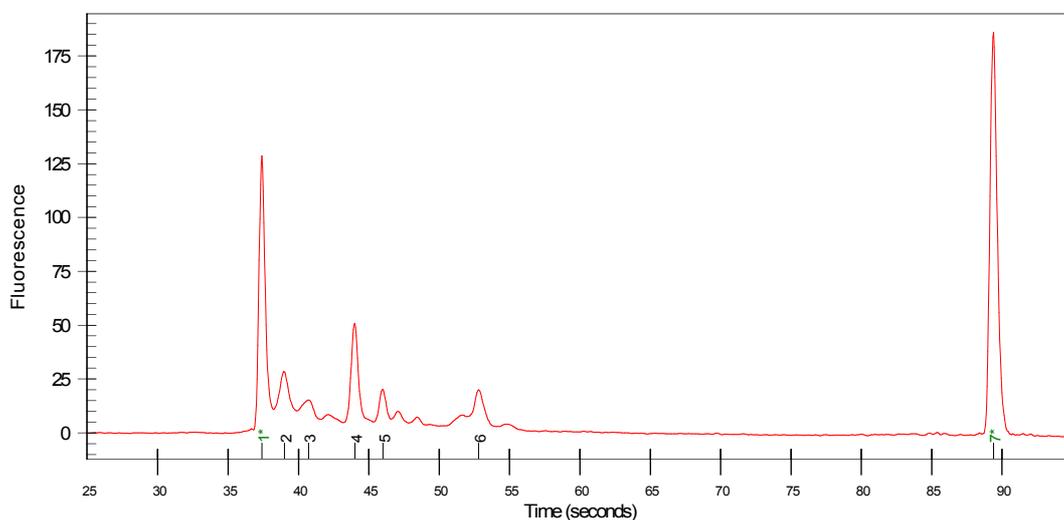


Abb. 20.2: Chip-Elektrophorese der unter zusätzlicher Anwendung von Qiagen-DNA-Polymerase angereicherten DD-PCR-Produkte

In Abb. 20.2 ist das Analysen-Diagramm für die Thermoscript-Klon1-DD-PCR-Produkte dargestellt. Nach 37 sec bzw. 89 sec wurden die DNA-Markerbanden (50 bp und 10380 bp) detektiert, die jeweils einen Fluoreszenzwert von ungefähr 130 und 185 haben. Die DNA-Banden wurden jeweils durch Peaks 2 bis 6 angezeigt. Sie haben folgende Größen: 81 bp, 112 bp, 169 bp, 203 bp und 326 bp.

Aus den in Abb. 20.1 und 20.2 dargestellten Analysen-Diagrammen ist folgendes zu erkennen:

1. In Abb. 20.1 und 20.2 sind viele DNA-Banden zu erkennen. Dies weist darauf hin, dass in den mit 1 Unit DNA-Polymerase der Firma Qiagen durchgeführten DD-PCR-Amplifikationen viele PCR-Produkte synthetisiert wurden.
2. In Abb. 20.1 zeigt sich fast das gleiche Muster wie in Abb. 20.2 nur mit dem Unterschied, dass in Abb. 20.1 oberhalb 370 bp noch weitere Banden erscheinen. Dieses Ergebnis zeigt, dass in den mit Superscript-cDNA durchgeführten DD-PCR-Amplifikationen längere DNA-Fragmente erzeugt wurden.

Die gemessenen Proben wurden in Abb. 21 in die Direct-Blotting-Elektrophorese eingesetzt. Hierzu wurde eine positiv geladene Nylonmembran verwendet.

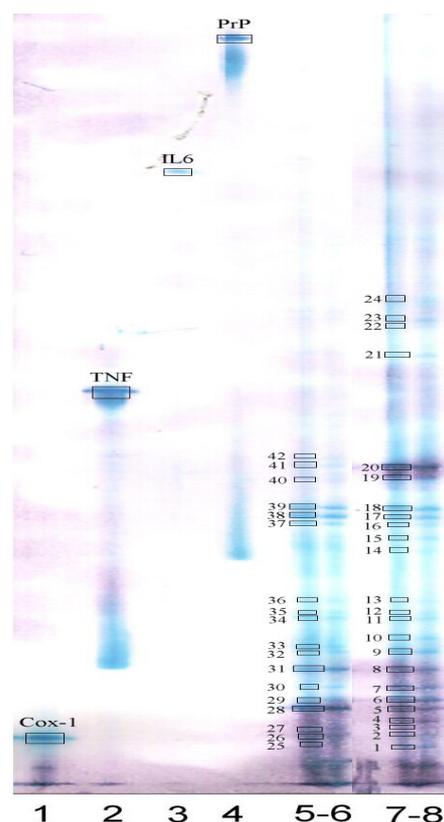


Abb. 21: Direct-Blotting-Elektrophorese der unter zusätzlicher Anwendung von Qiagen-DNA-Polymerase angereicherten DD-PCR-Produkte

In den Spuren 1 bis 4 sind die Standard-DNA-Fragmente Cox-1, TNF, IL6 und PrP mit einer jeweiligen Größe von 133 bp, 450 bp, 600 bp und 750 bp aufgetragen.

In den Spuren 5 bis 8 sind die PCR-Amplifikate aus Abb. 20.1 und 20.2 aufgetragen.

Spur 5-6: Thermoscript-Klon1-cDNA, T21GGbio+U23bam

Spur 7-8: Superscript-Klon1-cDNA, T21GGbio+U23bam

Insgesamt wurden 46 DNA-Banden aus der Nylonmembran ausgeschnitten und unter Verwendung der Reamplifizierungsprogramme 1, 7 und 8 (siehe Seite 48 und 50) amplifiziert. Die Reamplifikationsprodukte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese geprüft (Abb. 22).

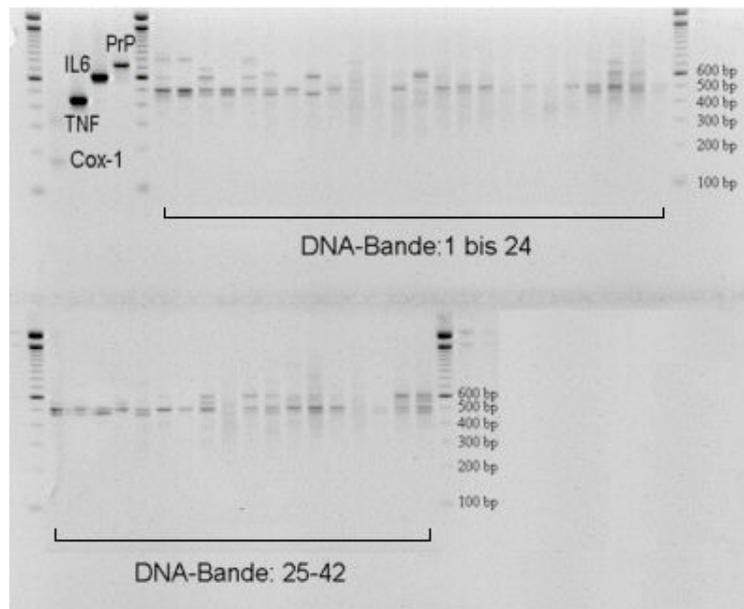


Abb. 22: Agarosegel der Reamplifikate aus der Direct-Blotting-Elektrophorese

Aus Abb. 22 wird deutlich, dass in den Spuren, in denen sich die 42 PCR-Reamplifikate befinden, DNA-Banden zu sehen sind. Nach der Reamplifikation wurde eine Fragmentgröße von ca. 500 bp festgestellt. Für die Reamplifikation wurden Banden ausgeschnitten, die ca. 150-550 bp groß waren. Von den vier DNA-Markerbanden konnten drei reamplifiziert werden (TNF-, IL6- und PrP-Bande). Daraus folgt, dass die mit DNA-Polymerase der Firma „Qiagen“ erzeugten PCR-Produkte Falsch-Positive sind.

Im folgenden Versuch wurde die DD-PCR unter zusätzlicher Anwendung von DNA-Polymerase der Firmen ABgene und Gibco untersucht (Abb. 23). Als Templat wurden die Superscript-Klon2-cDNA und die Thermoscript-Klon2-cDNA eingesetzt. Die Gesamt-RNA wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi mit selbst angesetzten Lösungen isoliert.

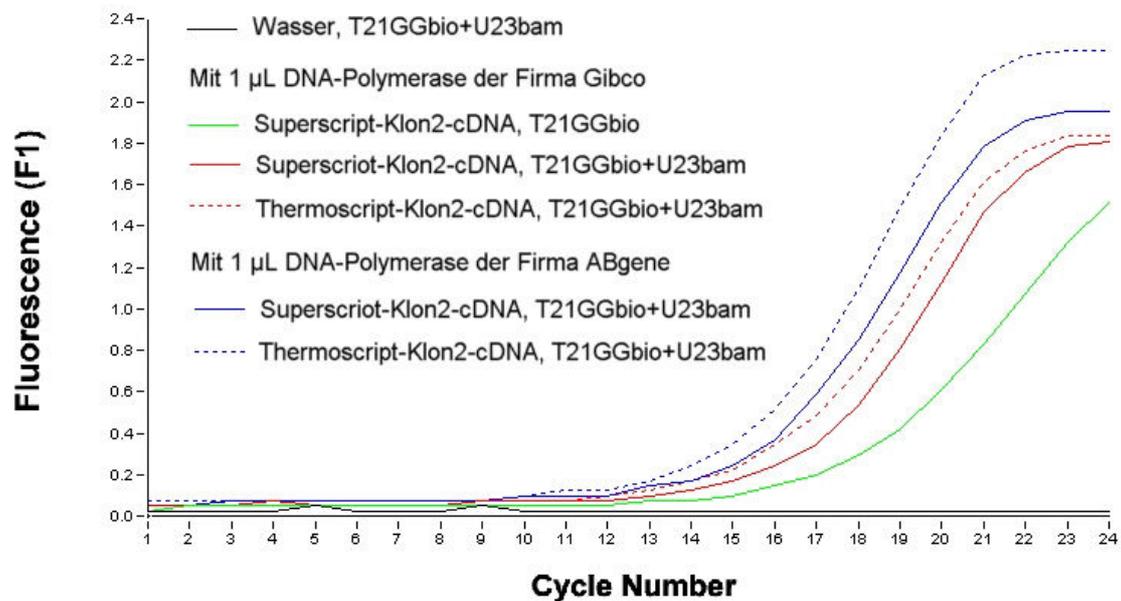


Abb. 23: Amplifikationskurve, deren Produktionsansatz zusätzlich mit DNA-Polymerase angereichert wurde

Zusätzlich zu Reaktionsansatz-1 (siehe 3.6.1) wurde 1 Unit DNA-Polymerase der Firmen Gibco und ABgene hinzugefügt.

Templat: Superscript-Klon2-cDNA und Thermoscript-Klon2-cDNA

Aus Abb. 23 wird ersichtlich, dass sowohl im Superscript-System als auch im Thermoscript-System die Ein-Primer-Negativ-Kontrolle mit dem Primer T21GG dicht an den dazugehörigen Amplifikationskurven verläuft. Der C_T -Wert liegt *einheitlich* bei 13. Dies deutet darauf hin, dass bei der Zwei-Primer-Amplifikation auch DNA-Fragmente synthetisiert werden, die in ihrer Synthese nur von T21GG abhängig sind und somit keine korrekten DD-PCR-Produkte (Falsch-Positive) darstellen. Hieraus folgt, dass durch zusätzliche Anwendung von 1 Unit DNA-Polymerase der Firmen ABgene und Gibco bevorzugt Falsch-Positive erzeugt wurden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die DD-PCR unter zusätzlicher Anwendung von DNA-Polymerase zu Falsch-Positiven führt. Im folgenden Abschnitt wurde die DD-PCR nach der Vorschrift von GenHunter mit 14mer-Primern untersucht.

4.1.1.2 DD-PCR unter Anwendung von 14mer-Primern

In den folgenden Versuchen wurde die DD-PCR nach der Vorschrift von GenHunter mit dem 14mer-Ankerprimer „T12MN“ und dem 10mer-Upstream-Primer „AP“ am Perkin Elmer 9600 durchgeführt (siehe 3.6.2). Hierfür wurde das PCR-Programm 3 (siehe Tab. 4, Seite 41) verwendet. In diesem PCR-Programm wurde die Annealingzeit von 15 sec auf 2 min verlängert (vgl. PCR-Programm 1, siehe Tab. 4, Seite 41). Als Templat wurde M2-cDNA eingesetzt, die mit dem Enzym „MMLV“ der Firma GenHunter und dem Primer T12MG synthetisiert wurde (siehe 3.5). Die M2-RNA wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi mit selbst angesetzten Lösungen isoliert.

In Abb. 24 wurden die Messergebnisse aus der Chip-Elektrophorese für die DD-PCR-Produkte dargestellt. Hierfür wurde die DD-Amplifikation mit dem Primerpaar T12MG+AP1 durchgeführt.

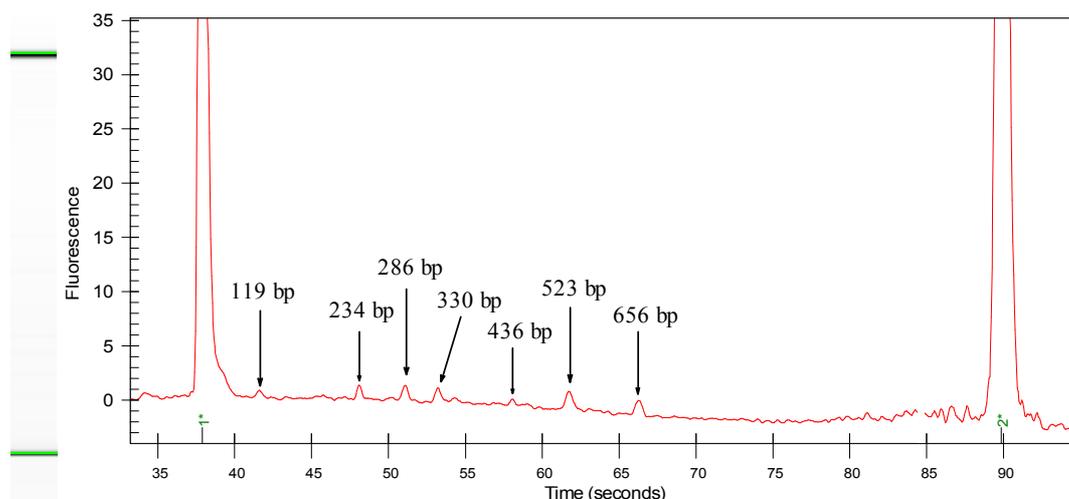


Abb. 24: Chip-Elektrophorese der GenHunter-DD-PCR-Produkte mit dem 14mer-Primer

Rechts ist das gemessene Analysen-Diagramm dargestellt. Nach 38 sec bzw. 90 sec wurden die DNA-Markerbanden (50 bp und 10380 bp) detektiert, die einen Fluoreszenzwert von ca. 160 haben. Zwischen den beiden Markerbanden gibt es mindestens sieben kleine Peaks, die einen schwachen Fluoreszenzwert von ungefähr 1 zeigen. Sie entsprechen folgenden DNA-Fragmentgrößen: 119 bp, 234 bp, 286 bp, 330 bp, 436 bp, 523 bp und 656 bp. Links ist das aus dem Analysen-Diagramm errechnete gelelektrophoretische Bild dargestellt, auf dem wegen der niedrigen Konzentration der DNA-Fragmente keine DNA-Banden detektiert wurden.

Aus Abb. 24 wird ersichtlich, dass in dem Analysen-Diagramm viele kleine Peaks zu sehen sind, die vermutlich den vielfältigen PCR-Amplifikaten entsprechen. Dieser

Versuch wurde mit den Primerpaaren T12MG+AP(1-5) wiederholt. Die PCR-Produkte wurden gefällt und in 5 µL Wasser aufgenommen. Die Fällungsprodukte wurden mittels Chip-Elektrophorese geprüft (Abb. 25).

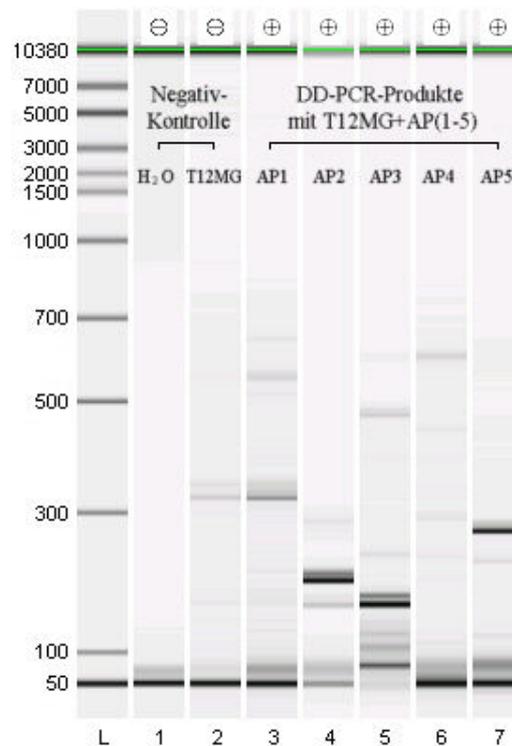


Abb. 25: Chip-Elektrophorese der GenHunter-DD-PCR-Produkte mit dem 14mer-Primer

In Abb. 25 wurde das gelelektrophoretische Bild für die GenHunter-DD-PCR-Produkte dargestellt. In der Spur L sind zwölf Banden zu sehen, entsprechend von unten nach oben: Lower-DNA-Marker: 50 bp; DNA Leiter: 100 bp, 300 bp, 500 bp, 700 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 3000 bp, 5000 bp und 7000 bp; Upper-DNA-Marker: 10380 bp. In den Spuren 1 bis 7 wurden die PCR-Amplifikate aufgetragen.

Spur 1: Wasser,	T12MG+AP1,	Negativ-Kontrolle
Spur 2: M2-cDNA,	T12MG,	Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)
Spur 3: M2-cDNA,	T12MG+AP1	
Spur 4: M2-cDNA,	T12MG+AP2	
Spur 5: M2-cDNA,	T12MG+AP3	
Spur 6: M2-cDNA,	T12MG+AP4	
Spur 7: M2-cDNA,	T12MG+AP5	

Aus Abb. 25 wird ersichtlich, dass im Vergleich zu Abb. 24 höhere Konzentrationen von DNA-Fragmenten nach der Fällung durch die Chip-Elektrophorese detektiert wurden. In den Spuren 3 bis 7 sind DNA-Banden mit unterschiedlichen Größen zu erkennen. Dies weist darauf hin, dass unter Verwendung der verschiedenen Primerpaare unterschiedliche PCR-Amplifikate erzeugt wurden.

Mit den weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass viele DD-PCR-Produkte mit dem Primer T12MC unter anderen Bedingungen produziert wurden (siehe 4.1.2 und 4.1.3) und sie nach der Direct-Blotting-Elektrophorese reamplifiziert werden konnten (siehe 4.1.4). Daraus kann man schließen, dass die DD-PCR-Produktausbeute unter Verwendung der 14mer-Primer erhöht wurde. In den folgenden Versuchen wurden die DD-PCR unter diesen Bedingungen weiter untersucht.

4.1.2 Optimierung der Reversen Transkription

In den folgenden Versuchen wurde die DD-PCR mit der aus verschiedenen Methoden synthetisierten cDNA untersucht. Dabei wurde die Reverse Transkription mit zwei Ansätzen durchgeführt:

- Reverse Transkription mit unterschiedlichen Reversen Transkriptasen
- Reverse Transkription mit verschiedenen Mengen von RNA

Dazu wurden die M2-Zellen genutzt. Die Gesamt-M2-RNA wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi isoliert. Als Primer wurde T12MC bei der Reversen Transkription eingesetzt. Die DD-PCR-Amplifikationen wurden unter Verwendung des PCR-Programms 3 (siehe Tab. 4, Seite 41) und des Primerpaares T12MC+AP1 am Perkin Elmer 9600 durchgeführt.

DD-PCR mit der cDNA aus unterschiedlichen Reversen Transkriptasen

In diesem Versuch wurde die M2-RNA jeweils mit dem Enzym „MMLV“ der Firma GenHunter und dem Enzym „Superscript II“ der Firma Invitrogen in cDNA umgeschrieben (siehe 3.5). Anschließend wurde die aus den beiden Methoden synthetisierte cDNA als Templat in die DD-PCR eingesetzt. Die Amplifikationsprodukte wurden gefällt und auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 26).

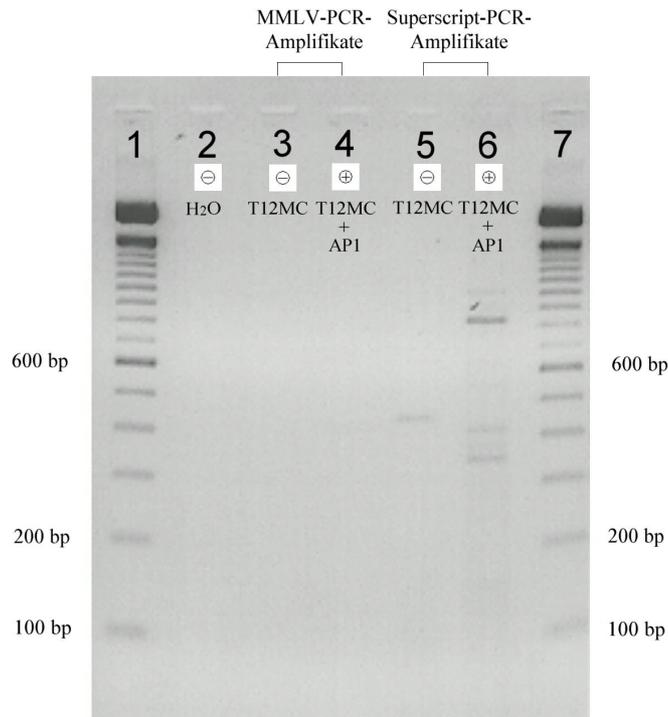


Abb. 26: Agarosegel von 14mer-Primer-DD-PCR-Produkten mit der aus unterschiedlichen Reversen Transkriptasen synthetisierten cDNA

In den Spuren 1 und 7 befindet sich ein 100 bp Marker von Gibco BRL. In den Spuren 2 bis 6 wurden die DD-PCR-Produkte aufgetragen, wobei Spur 3-4 die MMLV-Amplifikate und Spur 5-6 die Superscript-Amplifikate enthalten. Die in der Reversen Transkription eingesetzte RNA-Menge beträgt bei MMLV-Ansatz 0,2 µg, bei Superscript II-Ansatz 0,8 µg (siehe 3.5).

Spur 2: Wasser,	T12MC+AP1,	Negativ-Kontrolle
Spur 3: M2-cDNA(0,2 µg RNA),	T12MC,	Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)
Spur 4: M2-cDNA(0,2 µg RNA),	T12MC+AP1	
Spur 5: M2-cDNA(0,8 µg RNA),	T12MC,	Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)
Spur 6: M2-cDNA(0,8 µg RNA),	T12MC+AP1	

Aus Abb. 26 wird ersichtlich, dass wegen der geringeren Sensitivität des Agarosegels nur schwache Banden in den Spuren 5 und 6 zu erkennen sind. In den Spuren 3 und 4, wo sich die MMLV-Amplifikate befinden, zeigen sich keine Banden. Dies weist darauf hin, dass in der mit der Superscript-cDNA durchgeführten DD-PCR mehrere Amplifikate erzeugt wurden.

Es lässt den Schluss zu, dass im Vergleich zum Enzym „Superscript II“ das Enzym „MMLV“ weniger aktiv ist. Es kann andererseits nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Mengenansätze von RNA in diesem Versuch eine Rolle spielen.

Im folgenden Versuch wurde die DD-PCR untersucht, in der cDNA mit verschiedenen RNA-Mengen synthetisiert wurde. Dabei wurde die cDNA mit dem Enzym „Superscript II“ synthetisiert.

DD-PCR mit der cDNA aus verschiedenen Mengen von RNA

Es wurden jeweils 0,8 µg, 1,0 µg, 1,5 µg und 2,0 µg M2-RNA mit dem Enzym „Superscript II“ und dem Primer T12MC in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die mit verschiedenen RNA-Mengen synthetisierte cDNA als Templat in die DD-PCR eingesetzt. Die Amplifikationsprodukte wurden gefällt und durch Chip-Elektrophorese geprüft (Abb. 27).

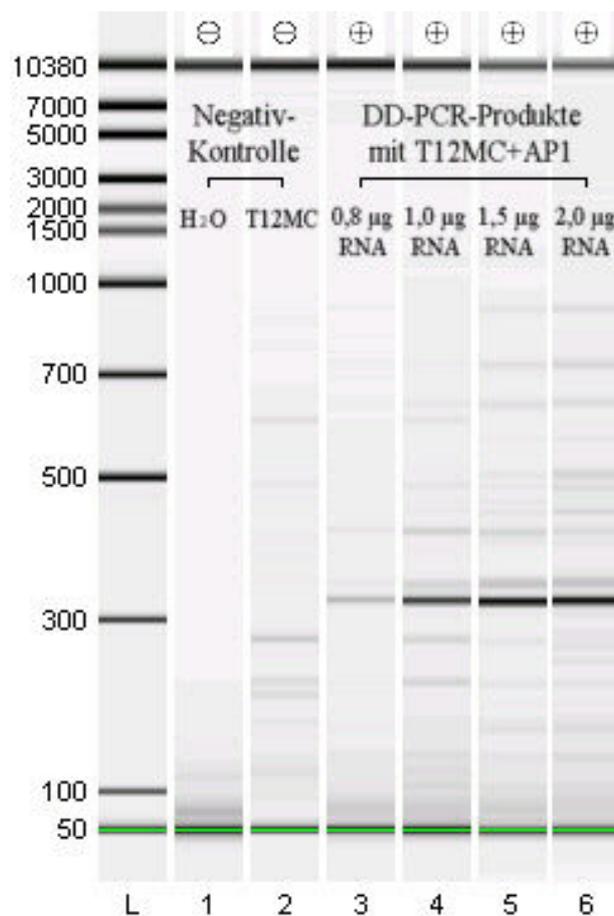


Abb. 27: Chip-Elektrophorese von GenHunter-DD-PCR-Produkten mit unterschiedlichen RNA-Konzentrationen in der Reversen Transkription

In der Spur L sind zwölf Banden zu sehen, entsprechend von unten nach oben: Lower-DNA-Marker: 50 bp; DNA Leiter: 100 bp, 300 bp, 500 bp, 700 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 3000 bp, 5000 bp und 7000 bp; Upper-DNA-Marker: 10380 bp. In den Spuren 1 bis 6 wurden die PCR-Amplifikate aufgetragen.

Spur 1: Wasser, T12MG+AP1, Negativ-Kontrolle
 Spur 2: M2-cDNA(0,8 µg RNA), T12MC, Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)
 Spur 3: M2-cDNA(0,8 µg RNA), T12MC+AP1
 Spur 4: M2-cDNA(1,0 µg RNA), T12MC+AP1
 Spur 5: M2-cDNA(1,5 µg RNA), T12MC+AP1
 Spur 6: M2-cDNA(2,0 µg RNA), T12MC+AP1

Abb. 27 macht deutlich, je mehr RNA in der cDNA-Synthese eingesetzt wurde, desto mehr Amplifikate wurden in der DD-PCR erzeugt. Daraus kann man schließen, dass die mit 2,0 µg RNA durchgeführte DD-PCR das beste Ergebnis erzielte. Da das Volumen des RNA-Reaktionsansatzes *max.* 40% im RT-Ansatz betragen darf, wurde die RNA-Konzentration nicht weiter erhöht.

4.1.3 Optimierung der PCR-Amplifikation

Die nach der Vorschrift von GenHunter durchgeführte DD-PCR ermöglicht zwar die Erhöhung der PCR-Ausbeute, hat jedoch einen Nachteil: Die DD-PCR-Amplifikationen können nicht durch das *real-time*-PCR-System kontrolliert werden, da bei den GenHunter-Chemikalien keine Farbstoffe enthalten sind und somit keine Fluoreszenz gemessen werden kann.

In den folgenden Versuchen wurde versucht, die nach der Vorschrift von GenHunter am Perkin Elmer 9600 durchgeführte DD-PCR im LightCycler-System zu etablieren. Dazu wurden zwei Ansätze verfolgt:

1. Die DD-PCR wurde unter Verwendung von GenHunter-, Roche-, und Qiagen-Chemikalien untersucht.
2. Die DD-PCR wurde mit Qiagen-Chemikalien am Perkin Elmer 9600 und LightCycler durchgeführt.

Dazu wurden die M2-Zellen genutzt. Die Gesamt-M2-RNA wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi isoliert und mit dem Enzym „Superscript II“ sowie dem Primer T12MC in cDNA umgeschrieben. Die DD-PCR-Amplifikationen wurden unter Verwendung der PCR-Programme 3-5 (siehe Tab. 4, Seite 41) und dem Primerpaar T12MCbio+AP1 durchgeführt.

Vergleich der mit verschiedenen Chemikalien synthetisierten Amplifikate

Im folgenden Versuch wurden die DD-PCR-Amplifikationen unter Verwendung von GenHunter-, Roche-, und Qiagen-Chemikalien am Perkin Elmer 9600 durchgeführt (siehe 3.6.2). Hierfür wurden die PCR-Programme 3-5 angewendet (siehe Tab. 4, Seite 41). Die Amplifikationsprodukte wurden gefällt. Die Fällungsprodukte wurden durch Chip-Elektrophorese geprüft (Abb. 28).

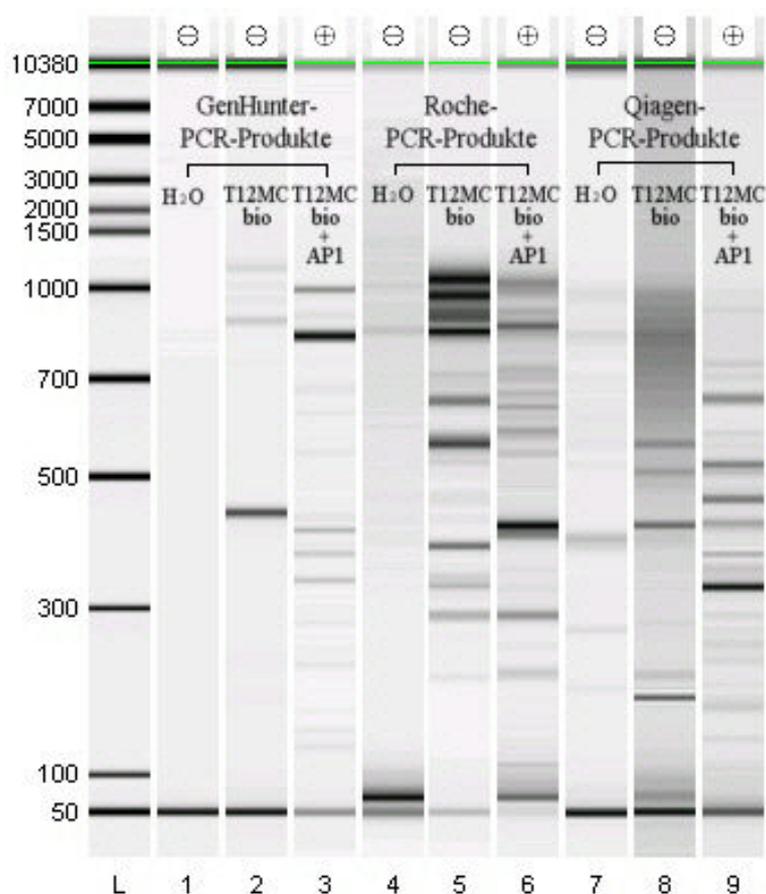


Abb. 28: Chip-Elektrophorese der mit GenHunter-, Roche- und Qiagen-Chemikalien synthetisierten DD-PCR-Produkte

In der Spur L sind zwölf Banden zu sehen, entsprechend von unten nach oben: Lower-DNA-Marker: 50 bp; DNA Leiter: 100 bp, 300 bp, 500 bp, 700 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 3000 bp, 5000 bp und 7000 bp; Upper-DNA-Marker: 10380 bp.

In den Spuren 1-3, 4-6 und 7-9 wurden jeweils die mit GenHunter-, Roche-, und Qiagen-Chemikalien synthetisierten PCR-Amplifikate aufgetragen. Dabei wurde für die GenHunter-Chemikalien das PCR-Programm 3, für die Roche-Chemikalien das PCR-Programm 4 und für die Qiagen-Chemikalien das PCR-Programm 5 angewendet (siehe Tab. 4, Seite 41).

Spur 1, 4 und 7: Wasser, T12MC+AP1, Negativ-Kontrolle

Spur 2, 5 und 8: M2-cDNA, T12MC, Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)

Spur 3, 6 und 9: M2-cDNA, T12MC+AP1

Die in Spuren 7 bis 9 gemessenen Proben wurden in Abb. 30 und 31 in die Direct-Blotting-Elektrophorese eingesetzt.

Aus Abb. 28 ist folgendes zu erkennen:

1. Bei den mit GenHunter-Chemikalien produzierten PCR-Amplifikaten (Spur: 1-3): Die Wasser-Negativ-Kontrolle ergab keine Amplifikate (Spur 1). Die Ein-Primer-Negativ-Kontrolle wies eine Bande bei 445 bp und vier Banden ab 890 bp auf. Die Zwei-Primer-Amplifikate haben die Fragmentgrößen zwischen 130 bp und 1000 bp. Die mit GenHunter-Chemikalien erzeugten Amplifikate dienen als Vergleichsmuster für die mit Roche- und Qiagen-Chemikalien erzeugten PCR-Produkte.
2. Bei den mit Roche-Chemikalien produzierten PCR-Amplifikaten (Spur 4-6): In der Spur 4 ist eine Bande unterhalb von 100 bp zu sehen, was auf Primerdimere hinweist. In der Spur 5 ergab sich fast das gleiche Muster wie in Spur 6. Dieses weist darauf hin, dass die Zwei-Primer-Amplifikate viele Ein-Primer-Nebenprodukte enthalten. Daraus folgt, dass die Roche-Chemikalien für die DD-PCR im LightCycler-System nicht geeignet sind.
3. Im Gegensatz zu Roche-Chemikalien erreichten Qiagen-Chemikalien bessere Ergebnisse. Sowohl die Wasser-Negativ-Kontrolle als auch die Ein-Primer-Negativ-Kontrolle zeigten schwächere oder weniger Banden im Vergleich zu ihren Zwei-Primer-Amplifikaten auf. Daraus kann man schließen, dass DD-PCR unter Verwendung von Qiagen-Chemikalien fast das gleiche Ergebnis erzielt wie bei GenHunter-Chemikalien.

Im folgenden Versuch wurde die DD-PCR unter Verwendung von Qiagen-Chemikalien sowohl am LightCycler als auch am Perkin Elmer 9600 untersucht.

Vergleich der am Perkin Elmer 9600 und LightCycler erzeugten PCR-Amplifikate

Die DD-PCR-Amplifikationen wurden unter Verwendung von Qiagen-Chemikalien und dem PCR-Programm 5 sowohl am Perkin Elmer 9600 als auch am LightCycler durchgeführt (siehe 3.6.1 und 3.6.2). Bei den LightCycler-Amplifikationen wurde jede DD-PCR fünfmal wiederholt. Insgesamt wurden 100 μ L Amplifikationsprodukte gefällt. Die Fällungsprodukte wurden durch Chip-Elektrophorese geprüft (Abb. 29).

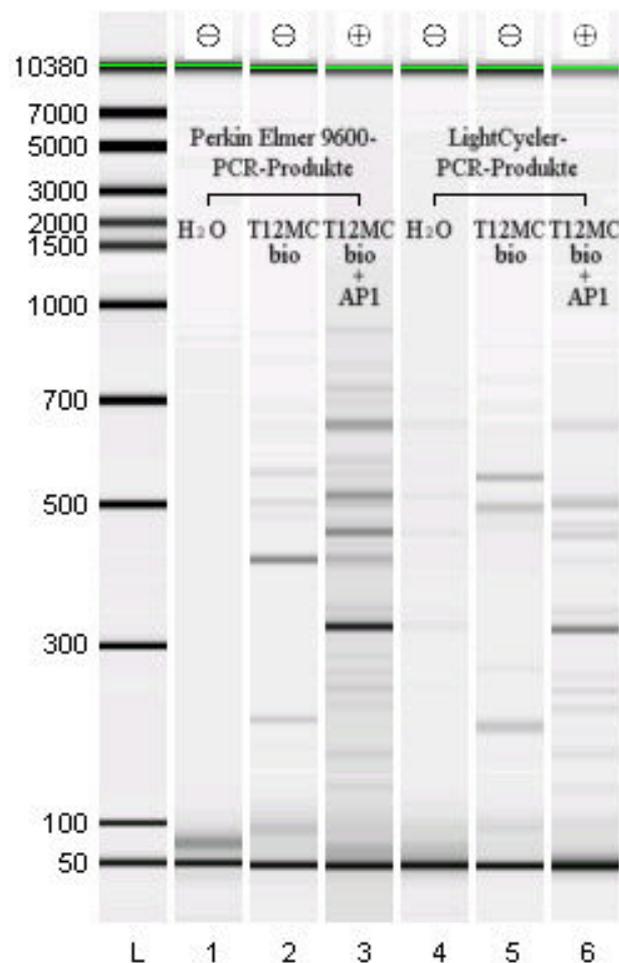


Abb. 29: Chip-Elektrophorese der unter Verwendung von Qiagen-Chemikalien parallel am LightCycler und am Perkin Elmer erzeugten DD-PCR-Produkte

In der Spur L sind zwölf Banden zu sehen, entsprechend von unten nach oben: 50 bp; DNA Leiter: 100 bp, 300 bp, 500 bp, 700 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 3000 bp, 5000 bp und 7000 bp; Upper-DNA-Marker: 10380 bp.

In den Spuren 1-3 und 4-6 sind jeweils die am Perkin Elmer 9600 und am LightCycler synthetisierten Amplifikate aufgetragen.

In den Spuren 1 und 4: Wasser, T12MC+AP1, Negativ-Kontrolle

In den Spuren 2 und 5: M2-cDNA, T12MC, Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)

In den Spuren 3 und 6: M2-cDNA, T12MC+AP1

Aus Abb. 29 wird ersichtlich, dass sich in den Spuren 1-3 und 4-6 fast die gleichen Muster ergeben. Dies deutet darauf hin, dass unter Anwendung von Qiagen-Chemikalien am Perkin Elmer 9600 und LightCycler die gleichen PCR-Amplifikate erzeugt wurden. Daraus kann man schließen, dass die DD-PCR unter Verwendung von Qiagen-Chemikalien erfolgreich im LightCycler-System etabliert wurde.

In den folgenden Versuchen wurden die nach der Vorschrift von GenHunter, unter Verwendung von Qiagen-Chemikalien produzierten PCR-Amplifikate in die Direct-Blotting-Elektrophorese eingesetzt. Dabei wurden die Reamplifikationsbedingungen für die 14mer-Primer-DD-PCR-Produkte sowie die Membransensitivität untersucht.

4.1.4 Neueinstellung der Reamplifikationsbedingungen für 14mer-Primer

In den Abschnitten 4.1.1-4.1.3 wurde die DD-PCR-Ausbeute unter Verwendung von 14mer-Primern erhöht und anschließend die RT-PCR-Bedingungen optimiert. In den folgenden Versuchen wurden die Reamplifikationsbedingungen für die 14mer-Primer-DD-PCR-Produkte neu eingestellt. Dabei wurden zwei Sorten von Nylonmembranen verwendet: positiv geladene Nylonmembran und neutrale Nylonmembran. Die Reamplifikation wurde unter verschiedenen Programmen am Maxicycler durchgeführt (siehe Tab. 6, Seite 50).

Reamplifikation der DNA-Fragmente auf der positiv geladenen Nylonmembran

Die gemessenen Proben aus Abb. 28 (Spur 7-9, Seite 76) wurden in die Direct-Blotting-Elektrophorese eingesetzt. Hierbei wurde eine positiv geladene Nylonmembran verwendet (Abb. 30).

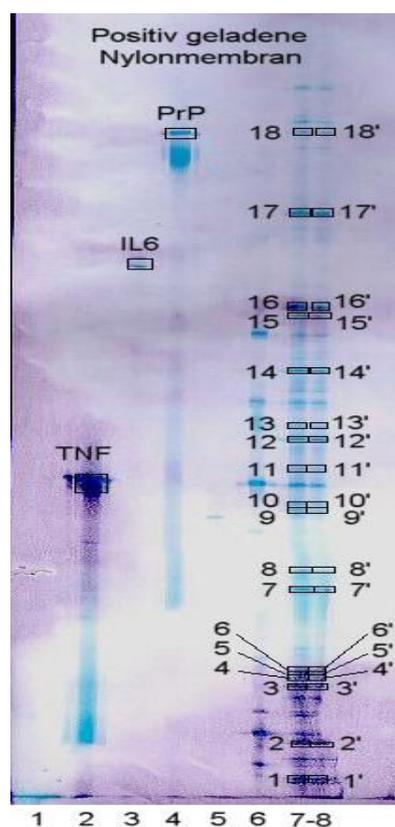


Abb. 30: Direct-Blotting-Elektrophorese der 14mer-Primer-DD-PCR-Amplifikate auf der positiv geladenen Nylonmembran

In Abb. 30 wurden die DD-PCR-Produkte aus Abb. 28 (Spur 7-9, Seite 76) auf der positiv geladenen Nylonmembran aufgetragen. Dabei wurde die DD-PCR unter Verwendung des PCR-Programms 5 am Perkin Elmer 9600 durchgeführt. Als Templat und Primerpaar wurden jeweils M2-cDNA und T12MCbio+AP1 eingesetzt.

In den Spuren 1 bis 4 sind die Standard-DNA-Fragmente Cox-1, TNF, IL6 und PrP mit einer jeweiligen Größe von 133 bp, 450 bp, 600 bp und 750 bp aufgetragen. In den Spuren 5 bis 8 wurden die DD-PCR-Amplifikate aufgetragen.

Spur 5: Wasser, T12MCbio+AP1, Negativ-Kontrolle

Spur 6: M2-cDNA, T12MCbio, Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)

Spur 7-8: M2-cDNA, T12MCbio+AP1

36 auf der Nylonmembran markierten DNA-Banden wurden ausgeschnitten und unter folgenden Reamplifizierungsprogrammen reamplifiziert (Tab. 7).

Tab. 7: Die angewendeten Reamplifizierungsprogramme für die DNA-Banden auf der positiv geladenen Nylonmembran

DNA-Banden (Nr.) aus Abb. 30	Reamplifizierungsprogramm (Nr.) aus Tab. 6
4, 9	2
4', 9'	3
1, 2, 3, 7, 10, 10', 14, 18	4
1', 2', 3', 7', 14', 18'	5
5, 8, 13	6
5', 8', 13'	7

Die Reamplifikate wurden anschließend durch Chip-Elektrophorese geprüft. Es konnten allerdings keine Reamplifikate detektiert werden. Weiterhin wurde versucht die DNA auf der Nylonmembran in eine wässrige Lösung zu bringen. Ein Teil dieser Lösung wurde als Templat in die PCR eingesetzt, und die PCR wurde dann unter Verwendung des PCR-Programms 5 am Maxicycler durchgeführt (siehe 3.8). Vier Lösungsansätze wurden dabei verfolgt:

1. DNA-Banden 6, 12 und 15 wurden in 45 μL Wasser aufgenommen, bei 95°C für 10 min erwärmt. 40 μL dieser Lösung wurden als Templat in die PCR eingesetzt.
2. DNA-Banden 6', 12' und 15' wurden in 45 μL Wasser aufgenommen, bei 99°C für 30 min erwärmt. 40 μL dieser Lösung wurden als Templat in die PCR eingesetzt.
3. DNA-Banden 11, 16 und 17 wurden in 45 μL 5%ige Formamidlösung aufgenommen, bei 99°C für 30 min erwärmt. 40 μL dieser Lösung wurden als Templat in die PCR eingesetzt.
4. DNA-Banden 11', 16' und 17' wurden in 30 μL 10%ige Formamidlösung aufgenommen, bei 99°C für 30 min erwärmt. 10 μL dieser Lösung wurden als Templat in die PCR eingesetzt.

Die Amplifikate wurden anschließend durch Chip-Elektrophorese geprüft. In der Chip-Elektrophorese zeigten sich dabei keine Amplifikate. Daraus folgt, dass die auf der positiv geladenen Nylonmembran immobilisierten GenHunter-DD-PCR-Produkte nicht reamplifizierbar sind. Im folgenden Versuch wurden DNA-Fragmente auf der neutralen Nylonmembran untersucht.

Reamplifikation der DNA-Fragmente auf der neutralen Nylonmembran

Hierbei wurde die Direct-Blotting-Elektrophorese unter Anwendung der neutralen Nylonmembran durchgeführt (Abb. 31). Die GenHunter-DD-PCR-Produkte aus Abb. 28 (Spur 7-9, Seite 76) wurden weiter als Probe eingesetzt.

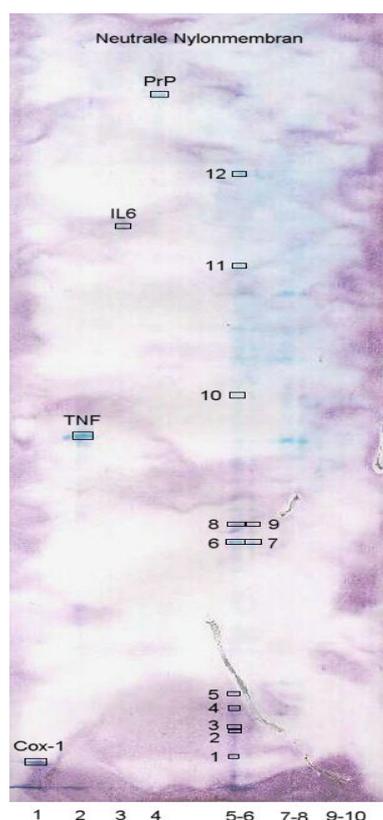


Abb. 31: Direct-Blotting-Elektrophorese der 14mer-Primer-DD-PCR-Amplifikate auf der neutralen Nylonmembran

In Abb. 31 wurden die DD-PCR-Produkte aus Abb. 28 (Spur 7-9, Seite 76) auf der neutralen Nylonmembran aufgetragen. Dabei wurde die DD-PCR unter Verwendung des PCR-Programms 5 am Perkin Elmer 9600 durchgeführt. Als Templat und Primerpaar wurden jeweils M2-cDNA und T12MCbio+AP1 eingesetzt.

In den Spuren 1 bis 4 sind die Standard-DNA-Fragmente Cox-1, TNF, IL6 und PrP mit einer jeweiligen Größe von 133 bp, 450 bp, 600 bp und 750 bp aufgetragen. In den Spuren 5 bis 10 sind DD-PCR-Amplifikate aufgetragen.

In den Spuren 5 und 6: M2-cDNA, T12MCbio+AP1

In den Spuren 7 und 8: M2-cDNA, T12MCbio, Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)

In den Spuren 9 und 10: Wasser, T12MCbio+AP1, Negativ-Kontrolle

Die auf der neutralen Nylonmembran markierten DNA-Fragmente haben ungefähr folgende Größe: 140 bp, 165 bp, 170 bp, 185 bp, 200 bp, 345 bp, 345 bp, 365 bp, 365 bp, 480 bp, 570 bp und 660 bp (Bande 1 bis 12).

12 der in Abb. 31 markierten DNA-Banden wurden ausgeschnitten und unter Anwendung der Reamplifizierungsprogramme 2-5 reamplifiziert (Tab. 8).

Tab. 8: Die angewendeten Reamplifizierungsprogramme für die DNA-Banden auf der neutralen Nylonmembran

DNA-Banden (Nr.) aus Abb. 31	Reamplifizierungsprogramm (Nr.) aus Tab. 6
9	2
4, 5, 6	3
8, 10, 11, 12	4
1, 2, 3, 7	5

Die Reamplifikationsprodukte wurden anschließend durch Chip-Elektrophorese geprüft (Abb. 32).

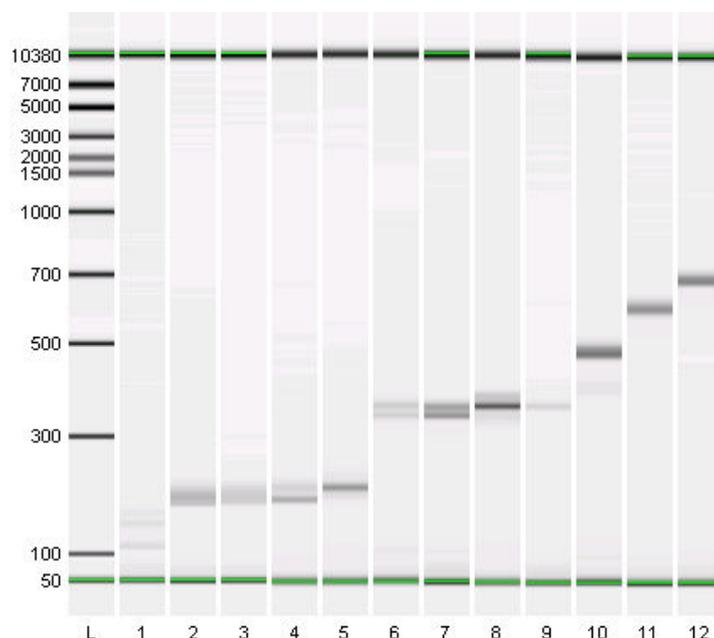


Abb. 32: Chip-Elektrophorese der Reamplifikate von DNA-Banden auf der neutralen Nylonmembran

In der Spur L sind zwölf Banden zu sehen, entsprechend von unten nach oben: Lower-DNA-Marker: 50 bp; DNA Leiter: 100 bp, 300 bp, 500 bp, 700 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 3000 bp, 5000 bp und 7000 bp; Upper-DNA-Marker: 10380 bp. In den Spuren 1 bis 12 sind die Reamplifikate der in Abb. 31 markierten DNA-Banden (1 bis 12) aufgetragen.

Die in Abb. 31 markierten DNA-Fragmente und in der Chip-Elektrophorese gemessenen Reamplifikate haben folgende Größen (Tab. 9):

Tab. 9: Vergleich der DNA-Fragmentgrößen vor und nach der Reamplifikation

Markierte DNA-Bande aus Abb. 31	Fragmentgröße (bp) auf der neutralen Nylonmembran	In der Chip-Elektrophorese gemessenen Reamplifikationsprodukte in bp und ihre Konzentrationen (ng/μL)
1	140	Zwei Banden: 112 (0,81), 151 (0,58)
2	165	197 (3,5)
3	170	198 (2,5)
4	185	Zwei verzweigte Banden: 193 (1,9), 214 (1,1)
5	200	213
6	345	Zwei verzweigte Banden: 344 (0,79), 362 (0,98)
7	345	Zwei verzweigte Banden: 348 (2,0), 365 (1,7)
8	365	362 (4,5)
9	365	369 (0,6)
10	480	472 (4,0)
11	570	603 (3,0)
12	660	686 (3,0)

Aus Abb. 32 und Tab. 9 ist folgendes zu erkennen:

1. In den Spuren 1 bis 12 in Abb. 32 sind Reamplifikate zu sehen. Ihre gemessenen Reamplifikatgrößen sind mit den in Abb. 31 markierten DNA-Banden vergleichbar. Hierbei wird berücksichtigt, dass die Messgenauigkeit bei der „DNA 7500 Assay“ $\pm 15\%$ beträgt. Dies weist darauf hin, dass die DNA-Fragmente auf der neutralen Nylonmembran unter Anwendung der Reamplifizierungsprogramme 2-5 reamplifizierbar sind.
2. Im Vergleich zu den Reamplifikaten von DNA-Banden 1-7 und 9 zeigten die Reamplifikate der DNA-Banden 8 und 10-12 stärkere Konzentrationen auf (siehe Tab. 9). Dieses deutet darauf hin, dass die DD-PCR unter Anwendung des Reamplifizierungsprogramms 4 das beste Ergebnis liefert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die PCR-Amplifikate auf der neutralen Nylonmembran, egal wie schwach die Banden sind, reamplifiziert werden konnten. Das beste Ergebnis wurde mit dem Reamplifizierungsprogramm 4 erzielt. Daraus kann man schließen, dass die optimalen Reamplifikationsbedingungen für die GenHunter-DD-PCR-Amplifikate gefunden wurden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur positiv geladenen Nylonmembran die neutrale Nylonmembran geringere Sensitivität aufweist. Im folgenden Versuch wurde erprobt, die Membransensitivität der neutralen Nylonmembran zu erhöhen.

4.1.5 Erhöhung der Membransensitivität

Um die Membransensitivität der neutralen Nylonmembran zu erhöhen, wurden drei Schritte verfolgt:

1. Erhöhung des SA-AP-Ansatzes von 2,7 μL auf 3,2 μL
2. Verlängerung der Kopplungszeit von 60 min auf 90 min
3. Verlängerung der Farbreaktionszeit von 3 h auf 4 h

(siehe 3.7.3, Detektionsprogramm: Schritt 6 und 13, Seite 46)

Hierfür wurden fünf Zellkulturen verwendet: M2-Zellen und ihre mit MNNG (0,5 $\mu\text{g/mL}$), MNNG (1,0 $\mu\text{g/mL}$), MCA (10 $\mu\text{g/mL}$), MCA (1 $\mu\text{g/mL}$, 24 h)+TPA (0,25 $\mu\text{g/mL}$) behandelten Zellen. Sie sind jeweils mit den Ziffern 1 bis 5 nummeriert. Die Gesamt RNA wurde mittels RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen isoliert und mit dem Enzym „Superscript II“ in cDNA umgeschrieben. Die DD-PCR wurde unter Verwendung des PCR-Programms 5 und des Primerpaares T12MCbio+AP1 am Perkin Elmer 9600 durchgeführt (Abb. 33).

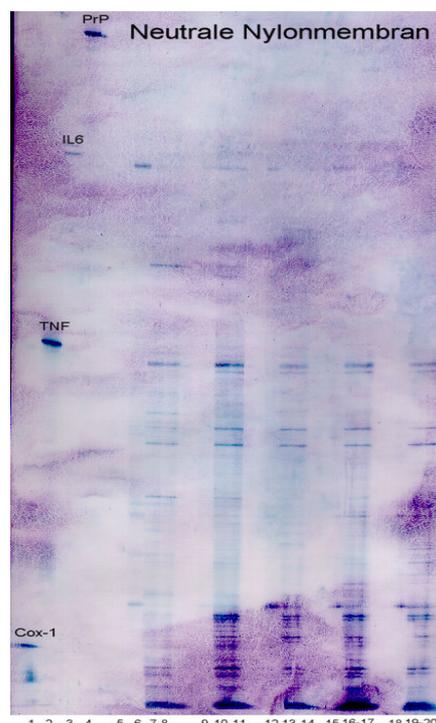


Abb. 33: Entwicklung der neutralen Nylonmembran mit höherer SA-AP-Konzentration

Die neutrale Nylonmembran wurde jeweils mit 2,7 μL , 3,0 μL und 3,2 μL SA-AP (Konjugat aus Streptavidin und alkalischer Phosphatase) entwickelt. Dabei wurde die Kopplungszeit und Farbreaktionszeit jeweils von 60 min auf 90 min und von 3 h auf 4 h verlängert.

In den Spuren 1-4 sind jeweils die Standard-DNA-Fragmente Cox-1, TNF, IL6 und PrP mit einer jeweiligen Größe von 133 bp, 450 bp, 600 bp und 750 bp aufgetragen. Auf der neutralen Nylonmembran sind folgende PCR-Amplifikate aufgetragen:

Spur 5:	Wasser, T12MCbio+AP1,	Negativ-Kontrolle
Spur 6:	cDNA-1, T12MCbio,	Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)
Spur 7-8:	cDNA-1, T12MCbio+AP1	
Spur 9:	cDNA-2, T12MCbio,	Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)
Spur 10-11:	cDNA-2, T12MCbio+AP1	
Spur 12:	cDNA-3, T12MCbio,	Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)
Spur 13-14:	cDNA-3, T12MCbio+AP1	
Spur 15:	cDNA-4, T12MCbio,	Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)
Spur 16-17:	cDNA-4, T12MCbio+AP1	
Spur 18:	cDNA-5, T12MCbio,	Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)
Spur 19-20:	cDNA-5, T12MCbio+AP1	

cDNA-1: cDNA aus den M2-Kontrollzellen
cDNA-2: cDNA aus den mit MNNG (0,5 µg/mL) behandelten M2-Zellen
cDNA-3: cDNA aus den mit MNNG (1,0 µg/mL) behandelten M2-Zellen
cDNA-4: cDNA aus den mit MCA (10 µg/µL) behandelten M2-Zellen
cDNA-5: cDNA aus den mit MCA (1 µg/mL, 24 h)+TPA (0,25 µg/mL) behandelten M2-Zellen

Aus Abb. 33 wird ersichtlich, dass die Membransensitivität nach erhöhter Zugabe von SA-AP und Verlängerung der Kopplungszeit (von 60 min auf 90 min) und der Farbreaktionszeit (von 3 h auf 4 h) deutlich steigt. Die Sensitivität der neutralen Nylonmembran ist vergleichbar mit der positiv geladenen Nylonmembran (vgl. Abb. 30, siehe Seite 80).

Zusammenfassend kann im ersten Teil dieser Arbeit folgendes festgestellt werden:

1. DD-PCR führt unter zusätzlicher Anwendung von DNA-Polymerase zu Falsch-Positiven (siehe 4.1.1.1).
2. Die DD-PCR-Produktausbeute wird nach der Vorschrift von GenHunter unter Verwendung der 14mer-Primer erhöht. Hierbei wird die DD-PCR unter Anwendung des PCR-Programms 3 durchgeführt, in dem die Annealingzeit von ursprünglich 15 sec auf 2 min verlängert wird (siehe 4.1.1.2).
3. Die optimalen Bedingungen für die Reverse Transkription werden unter Verwendung des Enzyms „Superscript II“ der Firma Invitrogen und 2 µg RNA-Ansatz erzielt (siehe 4.1.2).
4. Durch Vergleich der mit verschiedenen Chemikalien bzw. an unterschiedlichen PCR-Geräten synthetisierten PCR-Amplifikate werden die optimalen Bedingungen für das *real-time*-PCR-System gefunden. Damit kann die nach der Vorschrift von GenHunter am Perkin Elmer 9600 durchgeführte DD-PCR im LightCycler-System etabliert werden (siehe 4.1.3).
5. Bei der Optimierung der Reamplifikationsbedingung werden zwei Sorten von Nylonmembran verwendet: positiv geladene Nylonmembran und neutrale Nylonmembran. Die positiv geladene Nylonmembran zeigt stärkere Sensitivität, allerdings sind die darauf immobilisierten DNA-Banden nicht reamplifizierbar. Die neutrale Nylonmembran weist zwar eine geringere Sensitivität auf,

gewährleistet aber eine 100%-ige Reproduzierbarkeit von DNA-Banden bei unterschiedlichen Programmen (siehe 4.1.4).

6. Die geringere Sensitivität von neutraler Nylonmembran wird durch weitere Zugabe von SA-AP und Verlängerung von Kopplungszeit (von 60 min auf 90 min) und Farbreaktionszeit (von 3 h auf 4 h) erhöht (siehe 4.1.5).

Bisher wurde die DD-Analyse durch die Kombination von Chip-Elektrophorese, *real time* PCR und Direct-Blotting-Elektrophorese optimiert. Im folgenden Kapitel wurde die DD-Analyse zur Erforschung von substanzspezifischen Kanzerogenese-Genen eingesetzt.

4.2 Identifizierung von transformationsrelevanten Genen mittels

DD-Analyse

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden mit Hilfe der DD-Analyse substanzspezifische Kanzerogenese-Gene untersucht. Hierbei wurden fünf Zellkulturen verwendet: M2-Zellen und ihre mit MNNG (0,5 µg/mL), MNNG (1,0 µg/mL), MCA (10 µg/mL), MCA (1 µg/mL, 24 h)+TPA (0,25 µg/mL) behandelten Zellen. Sie sind jeweils mit den Ziffern 1 bis 5 nummeriert. Ihre RNA und cDNA entsprechen RNA1 bis RNA5 bzw. cDNA1 bis cDNA5.

4.2.1 Charakterisierung der RNA

Die Gesamt-RNA der oben genannten fünf Zellkulturen wurde mittels RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen isoliert. Die Qualitätskontrolle erfolgte sowohl über die Messung der Optischen Dichte (OD) im Photometer als auch über eine Chip-Elektrophorese. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 sowie in Abb. 34 dargestellt.

Tab. 10: Ergebnisse der OD-Messung zur RNA-Quantifizierung

	RNA-1	RNA-2	RNA-3	RNA-4	RNA-5
Berechnete Konz. (ng/µL)	408	360	576	568	538
$\lambda_{260}/\lambda_{280}$	1,82	1,73	1,76	1,78	1,76

Das Verhältnis $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ liegt bei einer intakten RNA zwischen 1,8 und 2,0^[142].

RNA-1: Gesamt-RNA aus den M2-Kontrollzellen

RNA-2: Gesamt-RNA aus den mit MNNG (0,5 µg/mL) behandelten M2-Zellen

RNA-3: Gesamt-RNA aus den mit MNNG (1,0 µg/mL) behandelten M2-Zellen

RNA-4: Gesamt-RNA aus den mit MCA (10 µg/µL) behandelten M2-Zellen

RNA-5: Gesamt-RNA aus den mit MCA (1 µg/mL, 24 h)+TPA (0,25 µg/mL) behandelten M2-Zellen

Aus Tab. 10 wird deutlich, dass die photometrische Qualitätskontrolle der mittels RNeasy Mini Kits isolierten RNA aller fünf Zellkulturen auf eine verhältnismäßig gute bis sehr gute Qualität hinweist. Das Verhältnis von $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ liegt bei RNA-2 bis RNA-5 jeweils knapp unter dem Grenzwert von 1,8. Dieses weist auf eine Verunreinigung der RNA mit Protein hin.

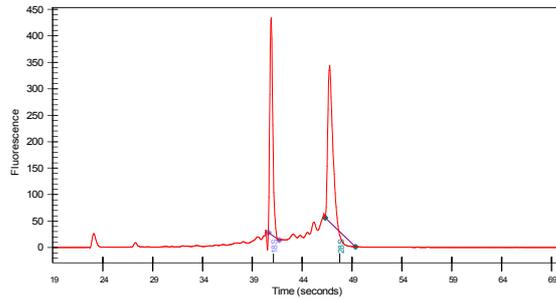


Abb. 34.1: RNA-1-Chip-Elektrophorese
RNA Konz.: 750 ng/μL
rRNA Ratio [28S/18S]: 1,02

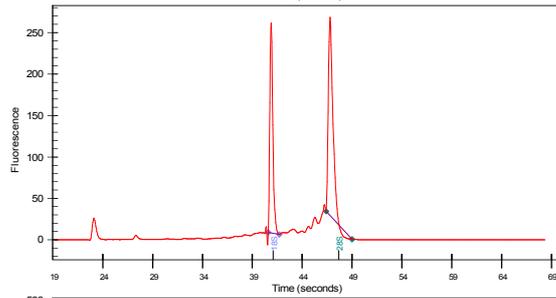


Abb. 34.2: RNA-2-Chip-Elektrophorese
RNA Konz.: 459 ng/μL
rRNA Ratio [28S/18S]: 1,17

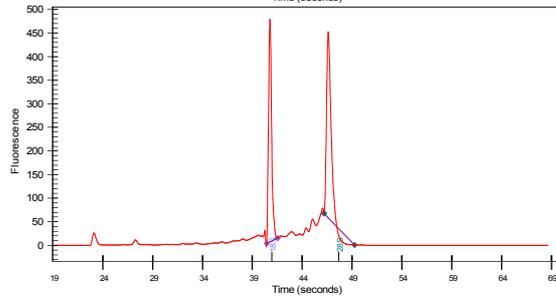


Abb. 34.3: RNA-3-Chip-Elektrophorese
RNA Konz.: 873 ng/μL
rRNA Ratio [28S/18S]: 1,05

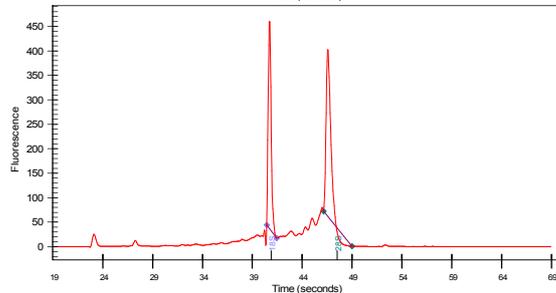


Abb. 34.4: RNA-4-Chip-Elektrophorese
RNA Konz.: 888 ng/μL
rRNA Ratio [28S/18S]: 1,03

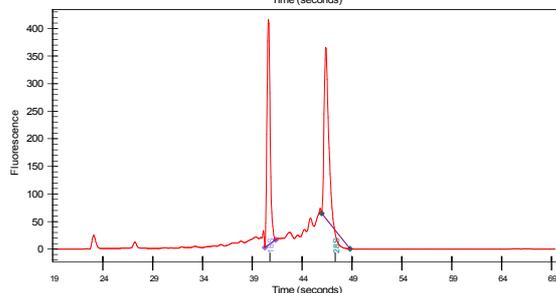


Abb. 34.5: RNA-5-Chip-Elektrophorese
RNA Konz.: 806 ng/μL
rRNA Ratio [28S/18S]: 0,95

Abb. 34: Chip-Elektrophorese zur Gesamt-RNA-Qualitätskontrolle

In Abb. 34 wurden die gemessenen Analysen-Diagramme für die Gesamt-RNA-Qualität dargestellt. Nach 24 sec wurde die RNA-Markerbande (25 nt) detektiert, die in allen fünf Messungen einen einheitlichen Fluoreszenzwert von ungefähr 25 hat. Nach ungefähr 41 sec wurde die 18S rRNA, nach ca. 47 sec die 28S rRNA detektiert.

Der Quotient der Konzentration von 18S zu 28S rRNA (rRNA Ratio) beträgt in einer intakten Gesamt-RNA mindestens $1,7^{[143]}$. Aus Abb. 34 wird ersichtlich, dass die RNA aller fünf Zellkulturen unterschiedlich stark degradiert sind: Die rRNA-Ratios reichen von 0,95 bis 1,17. Zudem wurde bei der Chip-Elektrophorese eine höhere RNA-Konzentration gemessen als bei der OD-Messung (vgl. Tab. 10 und Abb. 34).

4.2.2 Qualitätskontrolle der DD-Amplifikate durch Chip-Elektrophorese

Mittels der OD-Konzentrationsbestimmung wurden $2 \mu\text{g}$ der Gesamt-RNA mit dem Enzym „Superscript II“ und dem Primer T12MG in cDNA umgeschrieben. Die DD-PCR wurde dabei unter Verwendung des PCR-Programms 5 und der Primerpaare T12MGbio + AP(1-5) am Perkin Elmer 9600 durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden gefällt und die Fällungsprodukte wurden durch Chip-Elektrophorese geprüft (Abb. 35).

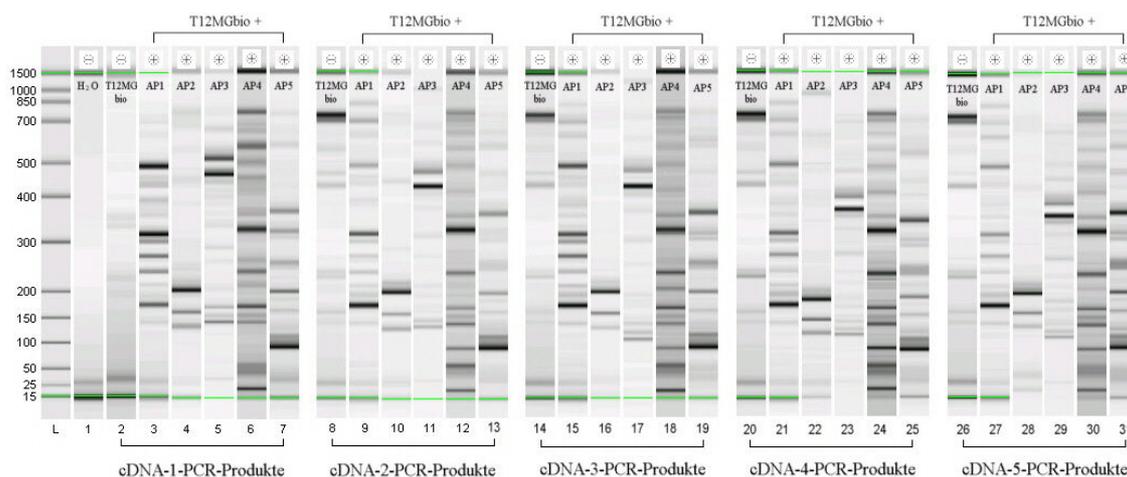


Abb. 35: Chip-Elektrophorese der substanzspezifischen DD-PCR-Produkte

In der Spur L sind dreizehn Banden zu sehen, entsprechend von unten nach oben: Lower-DNA-Marker: 15 bp; DNA Leiter: 25 bp, 50 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 700 bp, 850 bp und 1000 bp; Upper-DNA-Marker: 1500 bp. In der Spur 1 befindet sich die Wasser-Negativ-Kontrolle, bei der Wasser und T12MGbio+AP1 in die PCR eingesetzt wurden. In den Spuren 2-7, 8-13, 14-19, 20-25 und 26-31 wurden jeweils die cDNA-1-, cDNA-2-, cDNA-3-, cDNA-4- und cDNA-5-Amplifikate aufgetragen.

Spur 2, 8, 14, 20 und 26: cDNA-1, cDNA-2, cDNA-3, cDNA-4, cDNA-5; T12MGbio

Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)

Spur 3, 9, 15, 21 und 27: cDNA-1, cDNA-2, cDNA-3, cDNA-4, cDNA-5; T12MGbio+AP1

Spur 4, 10, 16, 22 und 28: cDNA-1, cDNA-2, cDNA-3, cDNA-4, cDNA-5; T12MGbio+AP2

Spur 5, 11, 17, 23 und 29: cDNA-1, cDNA-2, cDNA-3, cDNA-4, cDNA-5; T12MGbio+AP3

Spur 6, 12, 18, 24 und 30: cDNA-1, cDNA-2, cDNA-3, cDNA-4, cDNA-5; T12MGbio+AP4

Spur 7, 13, 19, 25 und 31: cDNA-1, cDNA-2, cDNA-3, cDNA-4, cDNA-5; T12MGbio+AP5

cDNA-1: cDNA aus den M2-Kontrollzellen

cDNA-2: cDNA aus den mit MNNG (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) behandelten M2-Zellen

cDNA-3: cDNA aus den mit MNNG (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) behandelten M2-Zellen

cDNA-4: cDNA aus den mit MCA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) behandelten M2-Zellen

cDNA-5: cDNA aus den mit MCA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 24 h)+TPA (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) behandelten M2-Zellen

4.2.3 Direct-Blotting-Elektrophorese und Reamplifikation

Direct-Blotting-Elektrophorese

Die DD-PCR-Produkte aus Abb. 35 wurden in die Direct-Blotting-Elektrophorese eingesetzt (Abb. 36). Wegen der Probenkapazität des Polyacrylamidgels wurden nur die mit cDNA-1, cDNA-2 und cDNA-3 synthetisierten DD-PCR-Produkte auf dem Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe Abb. 35, Spur 1-19).

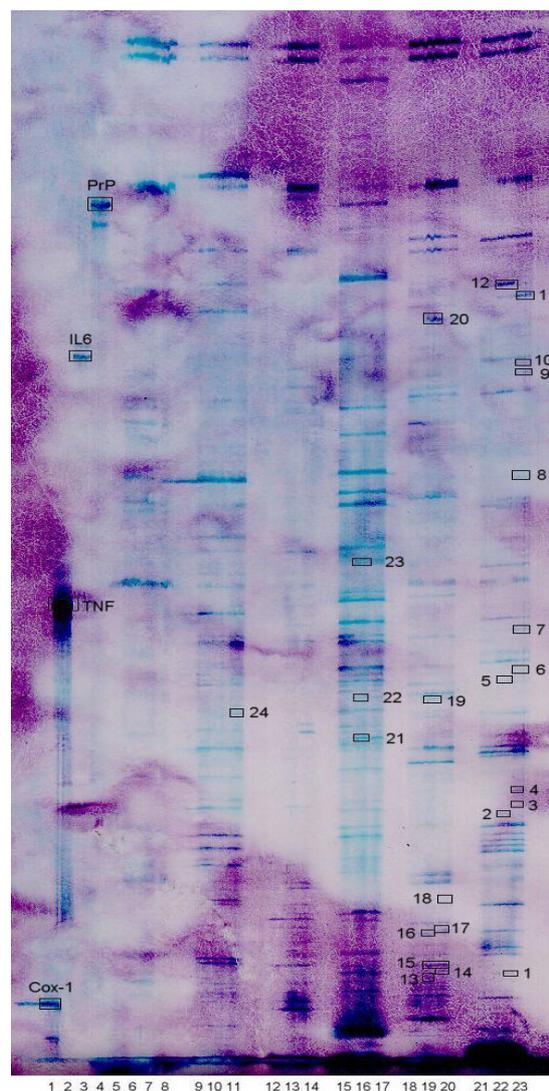


Abb. 36: Direct-Blotting-Elektrophorese der M2- und MNNG-spezifischen DD-PCR-Produkte

In den Spuren 1 bis 4 sind die Standard-DNA-Fragmente Cox-1, TNF, IL6 und PrP mit einer jeweiligen Größe von 133 bp, 450 bp, 600 bp und 750 bp aufgetragen. In den Spuren 5 bis 23 sind die DD-PCR-Amplifikate aufgetragen. Dabei wurde die DD-PCR unter Verwendung des PCR-Programms 5 am Perkin Elmer 9600 durchgeführt. Als Templat und Primerpaar wurden jeweils cDNA-1, cDNA-2, cDNA-3 und T12MGbio+AP(1-5) eingesetzt.

Spur 5: Wasser, T12MGbio+AP1, Negativ-Kontrolle
 Spur 6-8: cDNA-1, cDNA-2 und cDNA-3; T12MGbio, Einprimer-Negativ-Kontrolle (Falsch-Positive)
 Spur 9-11: cDNA-1, cDNA-2 und cDNA-3; T12MGbio+AP1
 Spur 12-14: cDNA-1, cDNA-2 und cDNA-3; T12MGbio+AP2
 Spur 15-17: cDNA-1, cDNA-2 und cDNA-3; T12MGbio+AP3
 Spur 18-20: cDNA-1, cDNA-2 und cDNA-3; T12MGbio+AP4
 Spur 21-23: cDNA-1, cDNA-2 und cDNA-3; T12MGbio+AP5
 cDNA-1: cDNA aus den M2-Kontrollzellen
 cDNA-2: cDNA aus den mit MNNG (0,5 µg/mL) behandelten M2-Zellen
 cDNA-3: cDNA aus den mit MNNG (1,0 µg/mL) behandelten M2-Zellen

Die DD-Amplifikate von cDNA-4 und cDNA-5 werden in der zukünftigen Arbeit weiter verarbeitet werden.

Reamplifikation

Aus der Nylonmembran wurden 24 differentielle DNA-Banden ausgeschnitten und unter Verwendung des Reamplifizierungsprogramms 4 reamplifiziert. Die Reamplifikate wurden anschließend durch Chip-Elektrophorese geprüft (Abb. 37).

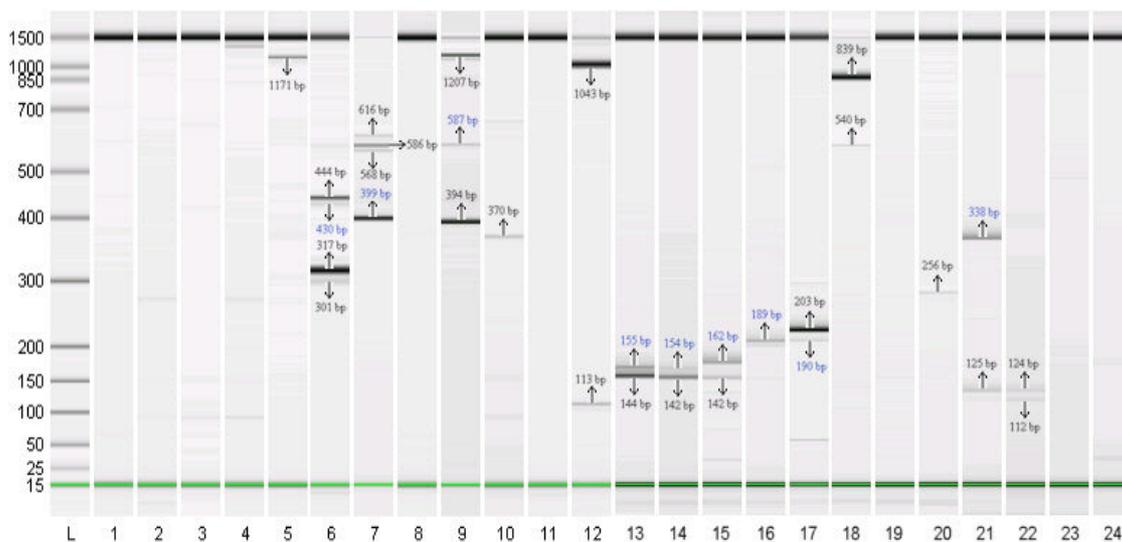


Abb. 37: Chip-Elektrophorese aus den Reamplifikaten der 24 differentiellen DNA-Banden

In der Spur L sind dreizehn Banden zu sehen, entsprechend von unten nach oben: Lower-DNA-Marker: 15 bp; DNA Leiter: 25 bp, 50 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 700 bp, 850 bp und 1000 bp; Upper-DNA-Marker: 1500 bp. In den Spuren 1 bis 24 sind die Reamplifikate der in Abb. 36 markierten DNA-Banden (1 bis 24) aufgetragen.

Aus Abb. 37 wird ersichtlich, dass in den Spuren 5-7, 9-10, 12-18 und 20-22 DNA-Banden zu sehen sind. Hieraus ergeben sich 9 DNA-Banden, deren in Abb. 36 bestimmten Fragmentgrößen mit der reamplifizierten Fragmentgröße übereinstimmen (siehe Tab. 11, Seite 93). Sie sind jeweils in Abb. 37 (mit blauen Zahlen) und in Tab. 11

(fett) abgebildet. Daraus folgt, dass nach der erstmaligen Reamplifikation 9 von 24 Banden reamplifiziert werden konnten.

Die in Abb. 36 markierten DNA-Fragmente und in der Chip-Elektrophorese gemessenen Reamplifikate haben folgende Größen (siehe Tab. 11):

Tab. 11: Vergleich der DNA-Fragmentgrößen vor und nach der Reamplifikation

Markierte DNA-Bande aus Abb. 36	Fragmentgröße (bp) auf der neutralen Nylonmembran	In der Chip-Elektrophorese gemessenen Reamplifikationsprodukte in bp und ihre Konzentrationen (ng/ μ L)
1	155	--
2	285	--
3	290	--
4	300	--
5	390	1171 (0,42)
6	400	Multi-Banden: 301 (0,57), 317 (3,3), 430 (0,24) , 444 (1,0)
7	430	Multi-Banden: 399 (76,6) , 568 (7,6), 586 (22,0), 615 (6,2)
8	525	--
9	590	Multi-Banden: 394 (16,8), 587 (1,4) , 1143 (1,7), 1207 (6,6)
10	595	370 (0,24)
11	650	--
12	670	Zwei-Banden: 113 (2,9), 1043 (11,1)
13	150	Zwei verzweigte Banden: 144 (2,0), 155 (1,2)
14	155	142 (1,2), 154 (0,46)
15	160	Zwei verzweigte Banden: 142 (0,49), 162 (1,4)
16	185	189 (0,69)
17	190	Zwei-Banden: 190 (0,24) , 203 (3,0)
18	215	Zwei-Banden: 540 (1,5), 839 (33,0)
19	375	--
20	635	256 (0,13)
21	345	Zwei-Banden: 125 (0,59), 338 (1,0)
22	380	Zwei-Banden: 112 (0,13), 124 (0,31)
23	480	--
24	365	--

Mit den in Abb. 36 markierten Banden 21 und 22 wurden aus folgenden Gründen weitergearbeitet:

1. Sie sind kleiner als 400 bp. Oberhalb von 450 bp treten vermehrt Falsch-Positive auf.
2. In den benachbarten Spuren 15 und 17 sind keine bzw. signifikant schwächere Banden auf dieser Höhe (siehe Abb. 36, Seite 91). Die Banden 21 und 22 sind somit besonders deutlich „differentiell“.

10 µL Reamplifikationsprodukte von DNA-Banden 21 und 22 wurden weiter als Templat in die DD-PCR eingesetzt. Die PCR-Amplifikationen wurden unter Verwendung des PCR-Programms 5 am Maxicycler durchgeführt (siehe 3.8). Die PCR-Produkte wurden durch Chip-Elektrophorese geprüft (Abb. 38).

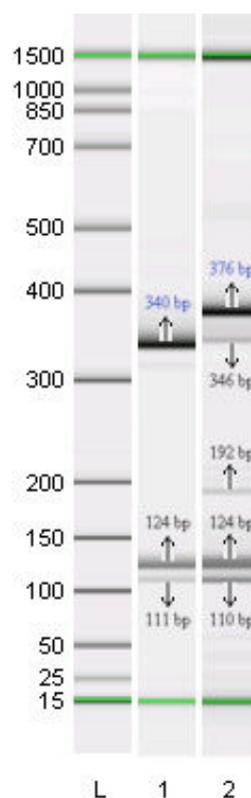


Abb. 38: Chip-Elektrophorese der Re-Reamplifikate von DNA-Banden 21 und 22 (siehe Abb. 36)

In der Spur L sind dreizehn Banden zu sehen, entsprechend von unten nach oben: Lower-DNA-Marker: 15 bp; DNA Leiter: 25 bp, 50 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 700 bp, 850 bp und 1000 bp; Upper-DNA-Marker: 1500 bp. In den Spuren 1 und 2 sind die Re-Reamplifikate von DNA-Banden 21 und 22 aus Abb. 36 (siehe Seite 91) aufgetragen.

Aus Abb. 38 ist folgendes erkennbar:

1. In der Spur 1 sind drei DNA-Banden zu sehen. Sie haben jeweils folgende Fragmentgrößen und Konzentrationen: 111 bp (1,1 ng/μL), 124 bp (4,6 ng/μL) und 340 bp (7,1 ng/μL). Dabei stimmt die DNA-Bande mit der Größe von 340 bp mit der Fragmentgröße von DNA-Bande 21 auf der Nylonmembran und ihrer Reamplifikate (vgl. Tab. 11, Seite 93) überein.
2. In der Spur 2 sind fünf DNA-Banden zu sehen. Sie haben jeweils folgende Fragmentgrößen und Konzentrationen: 110 bp (1,5 ng/μL), 124 bp (3,1 ng/μL), 192 bp (0,39 ng/μL), 346 bp (0,52 ng/μL), 376 bp (3,1 ng/μL). Dabei ist die DNA-Bande mit der Größe von 376 bp mit der DNA-Bande 22 auf der Nylonmembran vergleichbar (vgl. Tab. 11, Seite 93). Allerdings wurden nach der ersten Reamplifikation keine der Fragmentgröße entsprechenden Reamplifikate auf der Chip-Elektrophorese detektiert (siehe Abb. 37, Spur 22, Seite 92).

In den folgenden Versuchen wurden die Re-Reamplifikate von den DNA-Banden 21 und 22 zur Sequenzierung gebracht.

4.2.4 Klonierung und Sequenzierung der differenzierten DNA-Fragmente

Die Re-Reamplifikate von DNA-Banden 21 und 22 aus Abb. 36 wurden nach der Primerentfernung und DNA-Fällung in den Vektor pUC18 einligiert und in *E.coli* transformiert. Mit Hilfe des Lac Z-Selektionssystemes wurden einzelne Bakterienkolonien mit weißem Phänotyp gepickt und als Templat in die Bakterien-PCR eingesetzt. Die Bakterien-PCR-Produkte wurden durch das Agarosegel geprüft (Abb. 39).

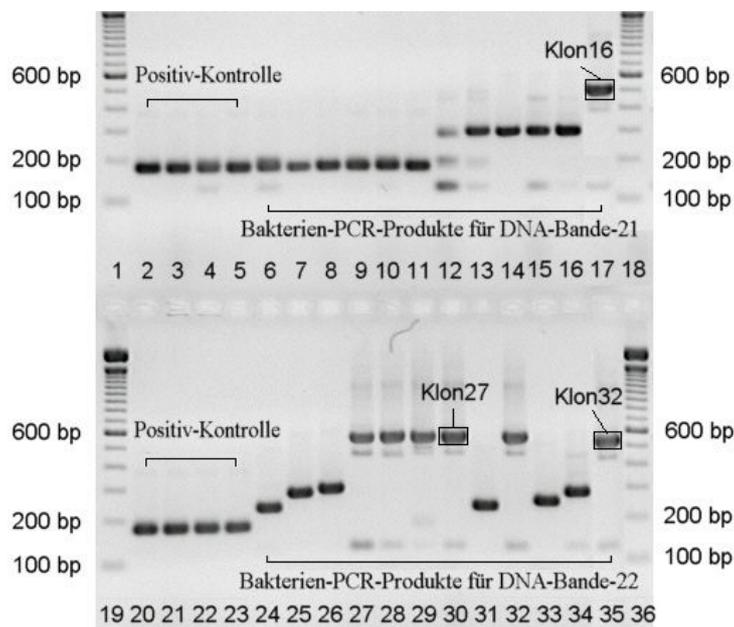


Abb. 39: Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten mit Bakterien als Templat

Die auf der Nylonmembran markierten DNA-Banden 21 und 22 wurden abgeschnitten und zweimal reamplifiziert (siehe Abb. 36-38). Die Re-Reamplifikate wurden nach der Primerentfernung und DNA-Fällung in pUC18 kloniert und durch Elektroporation vermehrt. Es wurden je zwölf weiße Kolonien mit einem Zahnstocher entnommen und als Templat in die Bakterien-PCR eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurden die blauen Kolonien, in denen die Elektroporation mit pUC18 ohne Insert durchgeführt wurde, als Templat in die Bakterien-PCR eingesetzt.

In den Spuren 1, 18, 19 und 36 ist jeweils ein 100 bp Marker von Gibco BRL zu sehen.

In den Spuren 2-5 und 20-23: Bakterien-PCR-Produkte für Positiv-Kontrolle

In den Spuren 6 bis 17: Bakterien-PCR-Produkte für DNA-Fragmente (Bande Nr.21)

In den Spuren 24 bis 35: Bakterien-PCR-Produkte für DNA-Fragmente (Bande Nr.22)

Aus Abb. 39 ist folgendes zu erkennen:

1. In den Spuren 2-5 und 20-23 sind acht Positiv-Kontrollen. Sie enthalten pUC18 ohne Insert als Templat. Das PCR-Produkt ist 180 bp groß. In den Spuren 6 bis 11 sind die DNA-Banden jeweils in Höhe der Positiv-Kontrolle. Daraus folgt, dass kein Insert im Plasmid inseriert wurde.

2. In den Spuren 13-16, 24-26, 31, 33 und 34 sind unterschiedlich lange PCR-Produkte der Größe von 240 bp bis 310 bp zu sehen. Nach Abzug des Plasmidanteils von 180 bp ergibt sich damit eine uneinheitliche Insertgröße von 60 bis 130 bp. Dies weist auf die unterschiedlichen Bakterien-PCR-Produkte von Reamplifikationsnebenprodukten hin.
3. In den Spuren 17, 27-30, 32 und 35 sind die erwarteten PCR-Banden zu sehen. Die Fragmente sind jeweils 500 bp, 550 bp, 550 bp und 520 bp groß, von denen 180 bp Plasmidanteil sind, so dass die Inserts die erwartete Größen von 320 bp, 370 bp, 370 bp und 340 bp haben.

Die Identifizierung der Inserts von Klon 16, 27 und 32 aus Abb. 39 erfolgte über eine Sequenzanalyse.

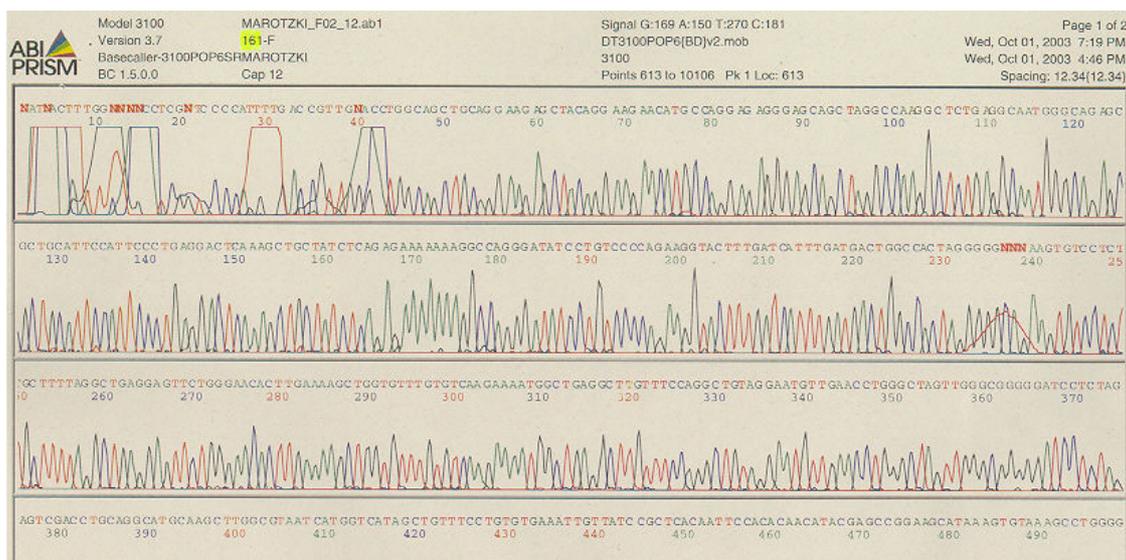


Abb. 40: DNA-Sequenzanalyse des in Klon 16 inklinierten Inserts

Das Insert von Klon 16 besitzt eine Größe von 318 Basen und umfasst die Basen 43 bis 360. Es ist parallel zum α -Peptid der β -Galactosidase (Lac Z') im Plasmid orientiert.

Die Sequenzanalyse von Klon 16 zeigte eine 99%-ige Homologie (316/318) mit den Sequenzen aus „*Mus musculus 16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length Rab7*“ und „*Mus 6 days neonate head cDNA, RIKEN full-length Rab7*“, das heißt 309 von 318 Basenpaaren des Inserts sind identisch mit den Sequenzen der in der Literatur identifizierten Gene. Diese sind ein Mitglied der **Ras-Oncogenfamilie**.

Weiterhin konnte bei der Analyse des Inserts festgestellt werden, dass ein Teil dieses Gens, der durch DD-PCR identifiziert wurde, nicht in dem proteinkodierenden Bereich des Gens liegt (Abb. 41).

1	gagaaagaga	ggaggaaaac	tcagagggaa	gtggcctctc	acccaaaaccg	tttgcgttct
61	caatactggc	cagattgaaa	ctgccactcc	tagaagagag	accagacct	agaactccca
121	cctgtgtgag	gccctgaagc	ccctcatgaa	tccccgaaag	aaagtggact	tgaaacttat
181	cattgttggt	gcacttggcg	tgggaaagac	ctctcttctt	caccaatatg	tacacaaaac
241	atTTTTcgag	gaataccaga	ccacactggg	ggccagcatc	ctctccaaaa	tcatcatatt
301	ggatgacaca	actttgaagc	tgcagatctg	ggacacaggt	ggtcaggagc	ggttccgctc
361	aatggatatca	acattctaca	aaggttccga	tggctgtatc	ctggcatttg	atgttactga
421	tccagagtcc	tttgaagccc	tggatatctg	gagggatgat	gtcctggcaa	agattatccc
481	tatggagcag	tcatatocca	tgggtggtgct	ggggaacaaa	atcgatctgg	aagataggaa
541	gtaccagggc	accgcagaga	accacctcat	agactccgtc	aagctctctc	caggccagcc
601	aaagagcaga	tgctgctgat	ctcggcctcc	ctccggactc	ccgatgacag	ctgtgcagcc
661	attccaagtg	caatcccacc	agccggtact	cagctaggag	gctggggcac	tgcagcagga
721	aagaatgtca	caggcaaadc	ctggccccag	agaaatcacg	ggcgtctcca	tgactcaagc
781	tctcttttct	cctctgctc	aacaccgtcc	tgctcatctc	tgacagacaa	ctgctccctt
841	cagcaccacg	gaccgacag	tttggatgga	gatgcaggtc	tgattccctc	agcagtcaga
901	acatggaccg	ctcctgacag	gcagaagcct	acaggcctga	gacttcccac	agcttctttc
961	agggagagct	gagggagcaa	gataaaaaca	gttgtacctc	tttctgggt	gctcaaacag
1021	ctcccataac	tgaccaggcc	tcagtgcgcc	ctctgccaaa	tgagagtcc	caaggcttcc
1081	ccataccta	gggcgactga	gaaccataat	cttcatttaa	atcccacgtg	ctggtgtgga
1141	cacacagcct	cactcctttg	gagagtattt	ttgatgcctt	cgatgtacat	tgactgaag
1201	tcaccagaca	cacaaagcag	acatgagtcc	ttcactccca	gaagcgcacc	tggagagaga
1261	gggccagcag	acatgagcaa	gacagacaac	agcaacaagg	tactgtttta	gacaaaaggg
1321	ccaagagggc	tttctgtgta	cggtgaccgt	tgggctggca	gctgcaggaa	gagctacagg
1381	aagaacatgc	caggagaggg	agcagctagg	ccaaggctct	gaggcaatgg	gcagagtgtc
1441	gcattccatt	ccctgaggac	tcaaagctgc	tatctcagag	aaaaaaaggc	cagggatatc
1501	ctgtccccag	aaggactttt	gatcatttga	tgactggcca	ctagggggca	gaagtgtcct
1561	ctgcttttag	gctgaggagt	tctgggaaca	cttgaaaagc	tgggttttgt	gtcaagaaaa
1621	tggctgaagc	ttgtttccag	gctgtaggaa	tgttgaacct	gggctagttg	ggtg

Abb. 41: cDNA-Sequenz des Rab7-Gens

Rab7-Gen besitzt eine Größe von 1674 Basen. Der kodierende Bereich („coding sequence“, CDS) umfasst die Basen 146 bis 619 und kodiert für ein Protein aus 207 Aminosäuren. Die Position des proteinkodierenden Bereiches und des Ampliklons sind jeweils hellgrau bzw. dunkelgrau markiert.

Bei der Untersuchung des Inserts von Klon 27 und Klon 32 wurden keine entsprechenden Gene in der Literatur gefunden. Es handelt sich hier wahrscheinlich um eine falsch-positive DNA-Bande oder um ein unbekanntes Gen. Ich habe mich daher auf die DNA-Bande 21 aus Abb. 36 konzentriert, die ein Rab7-Amplifikat darstellt.

In folgenden Versuchen wurde die Rab7-Expression in den M2-Zellen bzw. ihren mit MNNG behandelten Zellen untersucht.

4.2.5 Relative Quantifizierung durch *real time* PCR

4.2.5.1 Quantifizierung des Rab7-Gens

Zur Quantifizierung des Rab7-Gens wurde die PCR unter den in Abschnitt 3.11.1 beschriebenen Bedingungen am LightCycler durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte über eine Doppelbestimmung (Abb. 42).

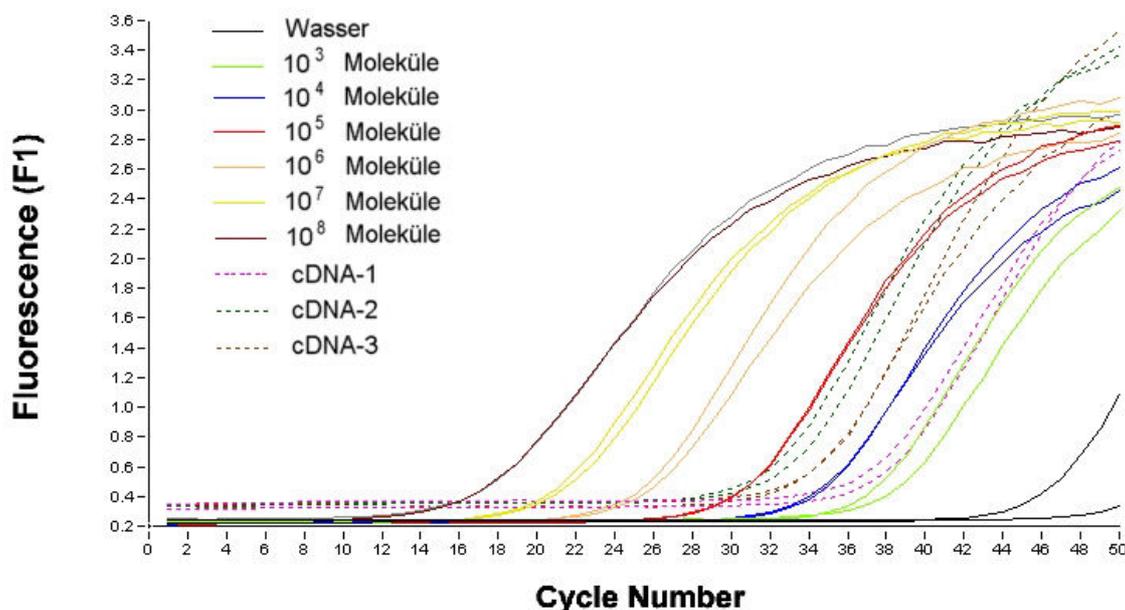


Abb. 42: Amplifikationskurven der Rab7-PCR

In Abb. 42 sind die Amplifikationskurven der Rab7-PCR abgebildet. Als Templat wurde jeweils 1 μL Rab7-Plasmid-DNA-Lösung aus der Standardverdunnungsreihe und 1 μL unbekannte Probe-Lösung eingesetzt. Dabei sollten in der Verdunnungsreihe theoretisch 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 und 10^8 DNA-Moleküle pro μL enthalten sein (siehe 3.11.1). Als Negativ-Kontrolle wurde 1 μL Wasser als Templat in die PCR eingesetzt. Die Standard- und Wasser-Negativ-Kontrolle-Amplifikationskurven werden mit verschiedenen Farblinien gekennzeichnet. Die Amplifikationskurven der unbekannteten Proben sind gestrichelt dargestellt.

cDNA-1: cDNA aus den M2-Kontrollzellen

cDNA-2: cDNA aus den mit MNNG (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) behandelten M2-Zellen

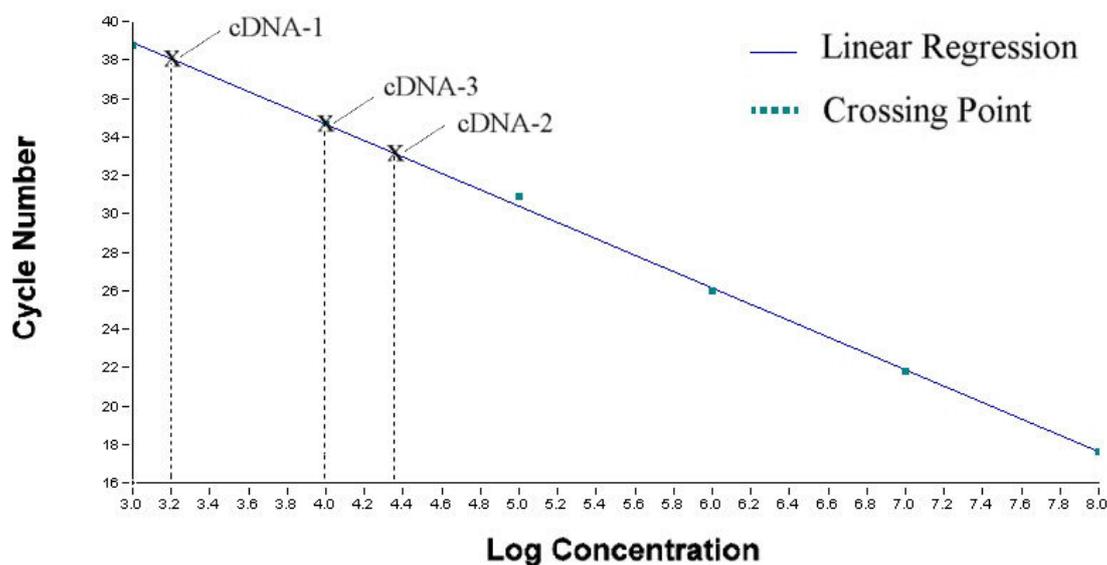
cDNA-3: cDNA aus den mit MNNG (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) behandelten M2-Zellen

In Tab. 12 sind die aus der Rab7-PCR gemessenen Daten dargestellt. Sie werden automatisch vom Computer errechnet und als einzelne Werte festgehalten. Dabei sind die Messdaten bei der Standardverdunnungsreihe so angeordnet, dass schließlich der Error-Wert am kleinsten ist (siehe Seite 101 und 103). Bei den Messdaten für die unbekannteten Proben ergeben sich die Werte aus der Durchschnittsberechnung.

Tab. 12: Die in der Rab7-PCR gemessenen Daten

Theoretisch berechnete Konzentration (Moleküle in 1 μ L Templat)	Praktisch gemessene Konzentration (Moleküle in 1 μ L Templat)	Logarithmen der praktisch gemessenen Konzentration
0 (Wasser-Negativ-Kontrolle)	$< 2,162 \times 10^1$	1,33
10^3	$1,108 \times 10^3$	3,04
10^4	$1,007 \times 10^4$	4,00
10^5	$7,681 \times 10^4$	4,89
10^6	$1,106 \times 10^6$	6,04
10^7	$1,050 \times 10^7$	7,02
10^8	$1,005 \times 10^8$	8,00
cDNA-1	$1,587 \times 10^3$	3,20
cDNA-2	$2,334 \times 10^4$	4,37
cDNA-3	$9,239 \times 10^3$	3,97

Die Standard-Eichkurve wurde aus den Standard-Amplifikationskurven ermittelt, in die 1 μ L Rab7-Plasmid-DNA-Lösung aus der Verdünnungsreihe als Templat eingesetzt wurde (Abb. 43).

**Abb. 43: Standard-Eichkurve der Rab7-Quantifizierung**

Die Standard-Eichkurve ist durch die lineare Regression gekennzeichnet, die durch die Datenpunkte von Crossing-point (Threshold-Cycle) gegen den Logarithmus der Standardkonzentration dargestellt ist.

Aus der gemessenen Regression wurden folgende Werte hergeleitet:

Slope = -4,258 (Steigung, Slope = $-1/\log E$, E: Amplifikationseffizienz)

Y-Intercept = 51,68 (= $\log N_{Cp}/\log E$, N_{Cp} : Summe der Cp von PCR-Produkten)

Error = 0,0938 (Quadratischer Fehler)

R = -1,00 (Korrelationskoeffizient)

Die Amplifikationseffizienz wird aus der Steigung (Slope) der Regressionsgrade nach folgender Formel berechnet:

$$E = 10^{-\left(\frac{1}{\text{Slope}}\right)}$$

Eine theoretisch optimale Amplifikationseffizienz ist $E = 2$, was der Verdopplung der DNA mit jedem PCR-Zyklus entspricht. Die ermittelte Effizienz der Rab7-PCR beträgt hier 1,72 und liegt gerade noch im Bereich des Signifikanten. Unterhalb einer Effizienz von 1,7 werden Quantifizierungen als nicht zuverlässig charakterisiert^[141]. Damit ist die akkurate Quantifizierung von Rab7 unter den in dieser Arbeit beschriebenen Bedingungen gewährleistet.

Weiterhin wird ersichtlich, dass sich aus den Amplifikationskurven eine nahezu lineare Standard-Eichkurve mit einem Korrelationskoeffizient von $r = -1,00$ ergibt. Dies deutet darauf hin, dass der Threshold-Cycle sehr gut mit der eingesetzten Target-Menge korreliert und daher eine sehr genaue Quantifizierung der Target-Menge erlaubt. Dieses Ergebnis wurde auch für die Standard-Eichkurve im GAPDH-PCR-Lauf ermittelt (siehe Abb. 45, Seite 103).

Schließlich konnten die Konzentrationen der unbekanntenen Proben aus der Standard-Eichkurve ermittelt werden. Sie betragen jeweils $1,587 \times 10^3$ Moleküle/ μL für cDNA-1, $2,334 \times 10^4$ Moleküle/ μL für cDNA-2 und $9,239 \times 10^3$ Moleküle/ μL für cDNA-3. Die Crossing-points der zu quantifizierenden Proben liegen alle auf der Standard-Eichkurve.

4.2.5.2 Quantifizierung des GAPDH-Gens

Zur Quantifizierung des GAPDH-Gens wurde die PCR unter den in Abschnitt 3.11.2 beschriebenen Bedingungen am LightCycler durchgeführt (Abb. 44).

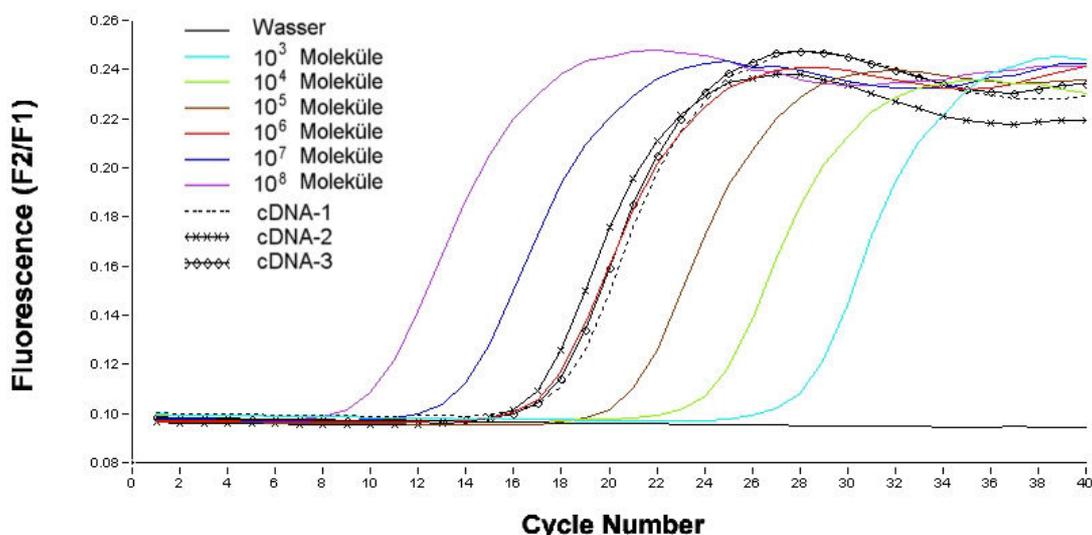


Abb. 44: Amplifikationskurven der GAPDH-PCR

In Abb. 44 sind die Amplifikationskurven der GAPDH-PCR abgebildet. Als Templat wurde jeweils 1 μL GAPDH-Plasmid-DNA-Lösung aus der Standardverdünnungsreihe und 1 μL unbekannte Probe-Lösung eingesetzt. Hierbei sollten in der Verdünnungsreihe theoretisch 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 und 10^8 DNA-Moleküle pro μL enthalten sein (siehe 3.11.2). Als Negativ-Kontrolle wurde 1 μL Wasser als Templat in die PCR eingesetzt. Die Standard- und Wasser-Negativ-Kontrolle-Amplifikationskurven werden mit verschiedenen Farblinien bezeichnet. Die Amplifikationskurven der unbekanntenen Proben sind entweder gestrichelt, durch Linie mit Kreuzen oder durch Linie mit Kreisen dargestellt.

cDNA-1: cDNA aus den M2-Kontrollzellen

cDNA-2: cDNA aus den mit MNNG (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) behandelten M2-Zellen

cDNA-3: cDNA aus den mit MNNG (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) behandelten M2-Zellen

In Tab. 13 sind die aus der GAPDH-PCR gemessenen Daten dargestellt.

Tab. 13: Die in der GAPDH-PCR gemessenen Daten

Theoretisch berechnete Konzentration (Moleküle in 1 μL Templat)	Praktisch gemessene Konzentration (Moleküle in 1 μL Templat)	Logarithmen der praktisch gemessenen Konzentration
0 (Wasser-Negativ-Kontrolle)	0	--
10^3	$9,109 \times 10^2$	2,96
10^4	$1,101 \times 10^4$	4,04
10^5	$1,061 \times 10^5$	5,03
10^6	$9,577 \times 10^5$	5,98
10^7	$9,924 \times 10^6$	7,00
10^8	$9,893 \times 10^7$	8,00
cDNA-1	$6,217 \times 10^5$	5,79
cDNA-2	$1,406 \times 10^6$	6,15
cDNA-3	$8,470 \times 10^5$	5,93

Die Standard-Eichkurve wurde aus den Standard-Amplifikationskurven ermittelt, in die 1 μL GAPDH-Plasmid-DNA-Lösung aus der Verdünnungsreihe als Templat eingesetzt wurde (Abb. 45).

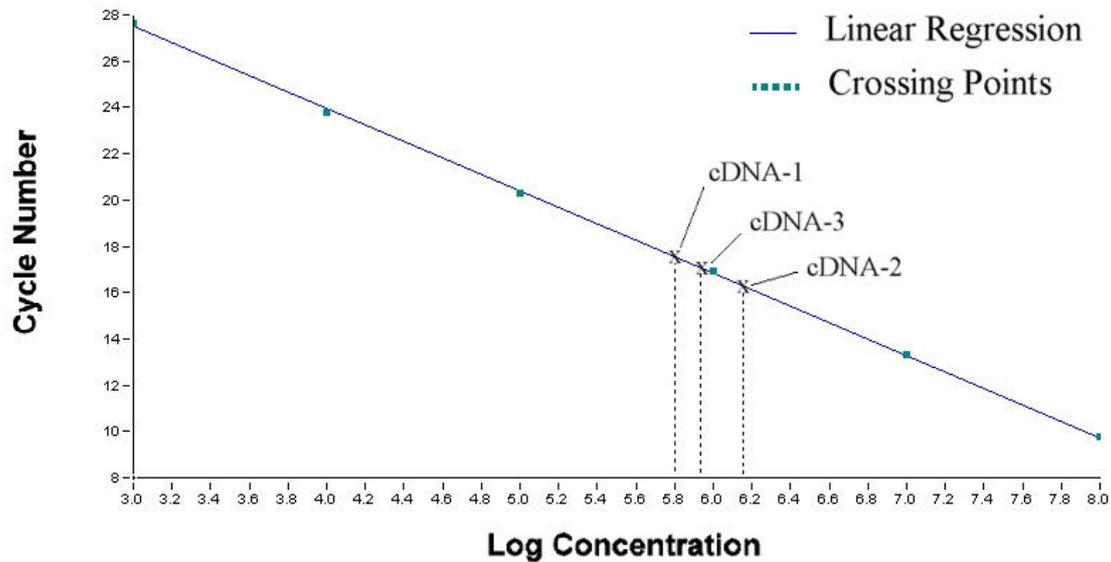


Abb. 45: Standard-Eichkurve der GAPDH-Quantifizierung

Aus der gemessenen Regression wurden folgende Werte hergeleitet:

Slope = -3.551

Y-Intercept = 38.15

Error = 0,0394

R = -1,00

Aus Abb. 45 wird ersichtlich, dass im Vergleich zur Standard-Eichkurve der Rab7-PCR die GAPDH-PCR ein besseres Ergebnis erzielt. Hierbei beträgt der Error-Wert 0,0394 und die Amplifikationseffizienz 1,91. Dies weist darauf hin, dass das GAPDH-Gen eine hohe Effektivität hat und somit als Referenz-Gen für die relative PCR geeignet ist. Weiterhin liegen die Crossing-points aller unbekanntnen Proben innerhalb der Eichkurve. Ihre Konzentrationen betragen jeweils $6,217 \times 10^3$ Moleküle/ μL für cDNA-1, $1,406 \times 10^4$ Moleküle/ μL für cDNA-2 und $8,470 \times 10^3$ Moleküle/ μL für cDNA-3.

4.2.5.3 Auswertung

Zur Auswertung der Quantifizierung wird folgende Formel verwendet (siehe 3.11.4).

$$\frac{\frac{\text{Zielgen behandelte-Zelle}}{\text{Referenzgen behandelte-Zelle}}}{\frac{\text{Zielgen Kontrollzelle}}{\text{Referenzgen Kontrollzelle}}} = \frac{\frac{\text{Rab7}_{\text{MNNG-Zelle}}}{\text{GAPDH}_{\text{MNNG-Zelle}}}}{\frac{\text{Rab7}_{\text{M2-Zelle}}}{\text{GAPDH}_{\text{M2-Zelle}}}}$$

Hierbei gilt:

Zielgen:	Rab7
Referenzgen:	GAPDH
Kontrollzelle:	M2-Zelle
Behandelte Zelle:	mit MNNG (0,5 µg/mL) bzw. MNNG (1,0 µg/mL) behandelte M2-Zelle
Rab7 _{MNNG-Zelle} :	gemessene Rab7-Konzentration in der mit MNNG behandelten M2-Zelle
GAPDH _{MNNG-Zelle} :	gemessene GAPDH-Konzentration in der mit MNNG behandelten M2-Zelle
Rab7 _{M2-Zelle} :	gemessene Rab7-Konzentration in der M2-Zelle
GAPDH _{M2-Zelle} :	gemessene GAPDH-Konzentration in der M2-Zelle

In Tab. 14 sind die in der PCR gemessenen Rab7- bzw. GAPDH-Konzentrationen dargestellt.

Tab. 14: Die in der PCR gemessenen Rab7- bzw. GAPDH-Konzentrationen

	M2-Zelle	mit MNNG (0,5 µg/ml) behandelte M2-Zelle	mit MNNG (1,0 µg/ml) behandelte M2-Zelle
Rab7 (Moleküle/µL)	$1,587 \times 10^3$	$2,334 \times 10^4$	$9,239 \times 10^3$
GAPDH (Moleküle/µL)	$6,217 \times 10^5$	$1,406 \times 10^6$	$8,470 \times 10^5$
Rab7-Verhältnis (in Prozent)	100%	650%	430%

Aus der Formel und Tab. 14 (s.o.) ergibt sich: Das Rab7-Gen, in den mit MNNG (0,5 µg/mL) und MNNG (1,0 µg/mL) behandelten M2-Zellen, ist jeweils um 650% bzw. 430% höher exprimiert als im Vergleich zu ihren M2-Zellen.

Zusammenfassend kann im zweiten Teil dieser Arbeit folgendes festgestellt werden:

1. Mit Hilfe der DD-Analyse wurde ein differentiell exprimiertes Gen in dem C3H-M2 Mausfibroblasten-Modellsystem nach der Behandlung von MNNG identifiziert. Die Sequenzanalyse zeigte, dass ein Teil dieses Gens, der durch DD-PCR identifiziert wurde, zu 99% mit dem Rab7-Gen der Rab-Familie identisch ist. Die abweichenden Basen liegen nicht in dem proteincodierenden Bereich des Gens.
2. Mittels quantitativer *real time* PCR wurde festgestellt, dass das Rab7-Gen in den mit MNNG (0,5 µg/mL) und MNNG (1,0 µg/mL) behandelten M2-Zellen, jeweils um 650% und 430% höher exprimiert ist im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle.

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mittels „Differential Display“ das differentiell exprimierte Rab7-Gen in einem C3H-M2 Mausfibroblasten-Modellsystem identifiziert.

Im folgenden Kapitel wird das Rab7-Gen, das zur Rab-Familie gehört, in Bezug auf seine Funktion in dem Endozytoseweg bzw. dem Autophagieweg diskutiert. Anschließend wird der Beitrag des Rab7-Gens zur Tumorentstehung abgeleitet.

Zunächst soll aber die Optimierung der Methode „Differential Display“ vorgestellt werden. Dabei werden die mit der Methode verbundenen Komplikationen zusammen mit den eigenen Ergebnissen diskutiert.

5.1 Optimierung der DD-Analyse

5.1.1 Erhöhung der DD-PCR-Produktausbeute

Zur Optimierung der DD-Analyse wurde in dieser Arbeit zunächst die Erhöhung der PCR-Produktausbeute in Frage gestellt. Die mangelhafte PCR-Produktausbeute kann aus folgenden Gründen entstanden sein:

1. Die Gesamtheit der Erbinformationen des Menschen umfasst etwa 3×10^9 bp, die auf 23 Chromosomen verteilt sind. Allerdings sind lediglich 3-5% des gesamten Genoms für proteincodierende Abschnitte der insgesamt ca. 30.000 exprimierten Gene zuständig. Dem humanen Genom sehr ähnlich ist das der Maus, das ebenfalls eine Länge von etwa 3×10^9 bp beinhaltet und auf 20 Chromosomen verteilt ist. Es umfasst ca. 30.000 exprimierte Gene und weist auch auf der Sequenzebene eine hohe Homologie zum Genom des Menschen auf^[146].
2. Weiterhin werden nicht alle Gene eines Genoms gleichzeitig exprimiert. Man geht allerdings davon aus, dass zu jedem Zeitpunkt nur ein Teil (10-15%) der Gene tatsächlich exprimiert werden, die notwendig sind, um die Lebensprozesse der Zelle aufrecht zu erhalten^[127].
3. Schließlich werden die Gene nicht gleich stark exprimiert. Während einige Gene sehr selten oder nur kurzzeitig (transient) exprimiert werden, bleiben andere

ständig (konstitutiv) exprimiert. Wan et al.^[147] ordnet 99% der mRNAs mit einer Kopienzahl bis zu 300 pro Zelle in die Kategorie ‚selten‘ ein. Diese 99% machen 50% der gesamten mRNA-Masse aus. Im Gegensatz dazu entfällt die andere Hälfte der mRNA-Masse einer gegebenen Zelle auf die mittel bis stark exprimierten Spezies, die aber nur ca. 1% der Transkripte von den gesamten exprimierten Genen betragen.

Damit ist zu erwarten, dass das Screeningverfahren DD-PCR, basierend auf Zufallsbindungen unter unstringenten Bedingungen, mit erheblich höherer Wahrscheinlichkeit Moleküle identifiziert, die häufig im Genom vorkommen.

In früheren Publikationen^[133,141,148] gehen die Autoren von der Annahme aus, dass sich optimale PCR-Bedingungen für eine DD-Analyse in einer maximalen Anzahl von reproduzierbaren Banden nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese widerspiegeln würden. Beispielsweise wurden die Annealingtemperatur^[141,148] und die Länge des upstream-Primers^[133] unter dem Kriterium, möglichst viele verschiedene Amplifikate zu erzeugen, optimiert. Das Auftreten von reproduzierbaren Falsch-Positiven stellt dieses Optimierungskriterium in Frage.

In der vorangegangenen Diplomarbeit^[140] wurde festgestellt, dass die mangelnde PCR-Produktausbeute den letzten fehlenden Baustein für die DD-Analyse darstellt. Eine mögliche Fehlerursache in den PCR-Bedingungen könnte in dem verwendeten *real-time*-Enzymsystem der Firma Qiagen liegen (siehe Seite 24). In der vorliegenden Arbeit wurde die Denaturierungszeit unter zusätzlicher Anwendung von 1 Unit DNA-Polymerase von 15 min auf 2 min reduziert. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl im Superscript-System als auch im Thermoscript-System bevorzugt Falsch-Positive erzeugt wurden (siehe 4.1.1.1).

Weiterhin wurde bei der Erhöhung der PCR-Produktausbeute der Blick auf den PCR-Primer sowie das PCR-Programm fokussiert.

Die Wahl der Primer für die RT-PCR stellt einen Kompromiss zwischen Spezifität und Reproduzierbarkeit dar. In der in unserem Arbeitskreis bisher durchgeführten DD-PCR

wurde neben dem Ankerprimer T21MN (wobei gilt: M = A, C, G; N = A, T, C, G) noch ein Upstream-Primer eingesetzt, der aus 20 Dekameren besteht. Mit dem längeren Primer (Oligonukleotide mit einer Länge von 15-25 bp) wurden zwar hochspezifische Produkte erzeugt, dies führte aber zu weniger PCR-Ausbeute. Durch die systematische Variierung kurzer Primer (sechs bis sieben bp) ist in der Theorie eine lückenlose Erfassung aller mRNAs möglich. Derartige Primer sind aber unspezifisch und führen nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen^[133]. In dieser Arbeit wurden ein 14mer-Primer T12MN und ein AP-Primer (ein 10mer Primer) für die DD-PCR eingesetzt. Unter Verwendung der 14mer-Primer und des PCR-Programms 3 (siehe Seite 41) wurde eine Vielzahl von PCR-Amplifikaten produziert.

Das hier entwickelte PCR-Protokoll weicht von dem bisher durchgeführten PCR-Protokoll ab. Ursprünglich wurde das Verfahren allein mit 15 sec Annealingzeit durchgeführt (siehe PCR-Programm 1, Seite 41). Bei diesen Bedingungen ist die PCR-Produktausbeute jedoch gering. Das hier verwendete PCR-Protokoll beinhaltet eine Annealingzeit von 2 min. Nach der Verlängerung der Annealingzeit von ursprünglich 15 sec auf 2 min weisen die PCR-Produkte auf eine deutlich bessere Quantität hin (siehe 4.1.1.2).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die DD-PCR unter zusätzlicher Anwendung von DNA-Polymerase zu Falsch-Positiven führt. Die DD-PCR-Produktausbeute wurde unter Verwendung der 14mer-Primer und durch Verlängerung der Annealingzeit erhöht. In folgenden Abschnitten wird eine Optimierung der DD-Analyse unter diesen Bedingungen diskutiert.

5.1.2 Optimierung der Reversen Transkription

5.1.2.1 Reverse Transkription mit 14mer-Primer

Die Zusammenlagerung zweier einzelsträngiger Nukleinsäure-Stränge in einem experimentellen Ansatz wird als Hybridisierung bezeichnet. Bei der Reversen Transkription hybridisiert ein DNA-Primer an eine RNA und synthetisiert den komplementären cDNA-Strang. Ein stabiler Hybridisierungskomplex mit hoher Dissoziationstemperatur zwischen Primer und RNA liegt vor, wenn die Bindungsenergie zwischen den Nukleinsäureeinzelsträngen möglichst hoch ist. Die Bindungsenergie zwischen RT-Primer und RNA ist von verschiedenen Parametern abhängig:

- Je mehr Nukleotide vorhanden sind, desto größer ist das Bestreben des Primers eine Verbindung mit der Zielsequenz einzugehen. Das thermodynamische Maß für dieses Bestreben ist die Änderung der Freien Enthalpie (ΔG). Je mehr Nukleotide pro Primer vorhanden sind, desto negativer ist die Änderung der Freien Enthalpie und desto größer ist die Bindungsenergie zwischen RT-Primer und RNA. Ein langer Primer bildet daher eine stabilere Duplexstruktur mit einer Zielsequenz als ein kurzer.
- Ein Primer mit hohem G+C-Gehalt bildet eine stabilere Duplexstruktur mit einer RNA als ein A+T reicher, weil Guanin-Cytosin-Basenpaarungen drei Wasserstoffbrückenbindungen bilden, während dieses bei Adenin-Uracil- und Thymin-Adenin-Basenpaarungen nur zwei sind.
- Die Energie jeder einzelnen Wasserstoffbrückenbindung ist abhängig von den benachbarten Basen. Je nach Nachbarschaftseffekt hat eine Basenpaarung einen unterschiedlichen Energiegehalt^[149]. Daher spielt nicht nur die Basenzusammensetzung, sondern auch die Basensequenz für die thermodynamischen Eigenschaften eines Primers eine Rolle.

Aus der Berechnung der Bindungsenergie zwischen dem RT-Primer und der RNA lassen sich Hinweise auf eine optimale Hybridisierungstemperatur bei der Reversen Transkription ableiten. Computerprogramme, die die Bindungsenergie zwischen DNA-RNA-Duplexen berechnen, sind in unserem Arbeitskreis nicht vorhanden, wohl aber Programme, die die Bindungsenergie zwischen DNA-DNA-Duplexen berechnen, die eine

annähernd vergleichbar hohe Bindungsenergie wie DNA-RNA-Duplexe aufweisen^[141]. Suggs et al.^[150] berechnen unter der Berücksichtigung der Länge und Basenzusammensetzung der DNA den Schmelzpunkt (in Grad Celsius) zwischen zwei DNA-Einzelsträngen nach der Formel:

$$T_m = 2 \times \text{Anzahl der Adenin-Thymin-Basenpaarungen} + 4 \times \text{Anzahl der Guanin-Cytosin-Basenpaarungen}$$

Freier et al.^[151] berechnen den Schmelzpunkt T_m (in Grad Celsius) zwischen DNA-Einzelsträngen unter zusätzlicher Berücksichtigung der Nachbarschaftseffekte nach der Formel:

$$T_m = \frac{dH}{dS + R * \ln(C/4)} - 273,15 - t,$$

wobei gilt:

dH = Änderungen in der Enthalpie während der Helixformation: Je mehr Nukleotide pro Primer vorhanden sind, desto mehr Energie wird bei der Hybridisierung freigesetzt.

dS = Änderungen in der Entropie während der Helixformation: Eine Abnahme der Entropie während der Hybridisierung ist darauf zurückzuführen, dass aus einem ungeordneten Zustand (Einzelstrang) ein Zustand größerer Ordnung entsteht (Doppelstrang). Die Entropieabnahme wird mit steigender Nukleotidanzahl größer, weil ein längerer Einzelstrang-Duplex einen Zustand größerer Ordnung darstellt als ein kürzerer.

R = molare Gaskonstante (1,987 cal/°C*mol)

C = Konzentration der Probe

t = empirisch gefundener Temperaturkorrekturfaktor

Diese Formel wird in der Literatur als „nearest neighbor method“ bezeichnet^[151]. In Tab. 15 wurde die Schmelzpunkttemperatur der Differential Display RT-Primer von einem DNA-Einzelstrang nach dieser Methode berechnet.

Tab. 15: RT-Primer in der Differential Display Analyse und ihre T_m -Werte

Primer		Schmelzpunkt (T_m) in °C („nearest neighbor method“)
T21GG	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GG	64
T21AA	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AA	60
T21AC	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AC	60
T21AG	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AG	60
T21AT	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AT	59,4
T21CA	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CA	62
T21CC	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CC	63
T21CG	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CG	64
T21CT	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CT	61
T21GA	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GA	62
T21GC	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GC	64
T21GT	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GT	62
T12AG	TTT TTT TTT TTT AG	31,3
T12CG	TTT TTT TTT TTT CG	31,3
T12GG	TTT TTT TTT TTT GG	31,3
T12AA	TTT TTT TTT TTT AA	29,3
T12CA	TTT TTT TTT TTT CA	29,3
T12GA	TTT TTT TTT TTT GA	29,3
T12AT	TTT TTT TTT TTT AT	29,3
T12CT	TTT TTT TTT TTT CT	29,3
T12GT	TTT TTT TTT TTT GT	29,3
T12AC	TTT TTT TTT TTT AC	31,3
T12CC	TTT TTT TTT TTT CC	31,3
T12GC	TTT TTT TTT TTT GC	31,3

Der Schmelzpunkt T_m ist definiert als die Temperatur, bei der sich 50% der Primer in einer Lösung an ihre komplementären Zielsequenzen binden. Die optimale Temperatur für die Hybridisierung liegt bei fünf bis zehn Grad Celsius unter der Dissoziationstemperatur des Duplexes^[152]. Je höher die gewählte Hybridisierungstemperatur liegt, desto geringer ist das Hintergrundsignal, das durch unspezifische Bindungen verursacht wird.

In dieser Arbeit wurde statt des bisher verwendeten RT-Primers T21MN der 14mer-Primer T12MN (wobei gilt: M = A, C, G; N = A, T, C, G) in die Reverse Transkription eingesetzt. Außerdem wurde neben den Enzymen „Superscript II“ und „Thermoscript“ das Enzym „MMLV“ der Firma GenHunter verwendet, das cDNA bei 37°C synthetisiert. Aus Tab. 15 wird deutlich, dass die Schmelzpunkte des RT-Primers T12MN ca. 30°C

unter den des RT-Primers T21MN liegen. Je niedriger die Temperatur ist, desto mehr RT-Primer binden die RNA und desto vergleichsweise mehr cDNA wird synthetisiert. Aus Abb. 24 und 25 (siehe Seite 70 und 71) kann abgeleitet werden, dass in der Reversen Transkription, in die der RT-Primer T12MN und das Enzym "MMLV" eingesetzt wurden, mehr cDNA erzeugt werden. Bei einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung des Enzyms "MMLV" vergleichsweise weniger cDNA synthetisiert wurde, als mit dem Enzym "Superscript II" (Siehe Abb. 26, Seite 73). Die Ursache ist darin zu sehen, dass die RNase Aktivität, die alle Reversen Transkriptasen haben, bei dem Enzym "Superscript II" nahezu vollständig ausgeschaltet wird. Dadurch ist eine hohe cDNA-Ausbeute zu erwarten.

Im nächsten Abschnitt wird die RNA-Qualität diskutiert.

5.1.2.2 RNA-Qualität

Die DD-Analyse dient zur Untersuchung der differentiellen Genexpression auf RNA-Ebene. Folglich ist die RNA das Fundament eines jeden DD-Experiments: Mit RNA schlechter Qualität kann man keine gute DD-Analyse anfertigen.

Bisher wurde die RNA-Qualität in unserem Arbeitskreis durch Agarose-Gelelektrophorese und OD-Messung geprüft^[153]. Beide Methoden weisen jedoch Nachteile auf: Die Durchführung der RNA-Agarose-Gelelektrophorese ist zeitaufwendig und beide Methoden sind nicht sensitiv genug, teilweise degradierte RNA zuverlässig zu detektieren.

In der vorangegangenen Diplomarbeit^[140] wurde der Agilent 2100 Bioanalyzer erfolgreich in die DD-Analyse integriert, mit dem man RNA schnell qualitativ und quantitativ charakterisieren kann. Die Berechnung der rRNA Ratios [28S/18S] erlaubt eine wesentlich feinstufigere und vor allem eine *quantitative Bewertung der RNA-Qualität*. So konnte gezeigt werden, dass RNA, die nach der Methode von Chomczynski und Sacchi isoliert wurde, nach fünf Monaten Lagerung bei -20°C eine bessere Qualität als die mittels RNeasy Mini Kit isolierte RNA hat.

In dieser Arbeit wurde die RNA-Qualität direkt nach der Isolierung mit den beiden unterschiedlichen Methoden verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass RNA, die nach der

Methode von Chomczynski und Sacchi isoliert wurde, genauso gute Qualität hat wie die mittels RNeasy Mini Kit isolierte RNA. Dies weist darauf hin, dass die mangelhafte RNA-Qualität als Ursache für die mangelnden PCR-Ausbeuten ausgeschlossen werden kann, was in der vorangegangenen Diplomarbeit^[140] vermutet wurde.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die RNA-Qualität immer vor der Reversen Transkription mit dem Bioanalyzer kontrolliert. Eines der Ergebnisse ist in Abb. 34 dargestellt (siehe Seite 89): Hierbei zeigt sich, dass RNA aus M2-Zellen und ihren mit MNNG (0,5 µg/mL), MNNG (1,0 µg/mL), MCA (10 µg/mL), MCA (1 µg/mL, 24 h)+TPA (0,25 µg/mL) behandelten Zellen unterschiedlich stark degradiert sind. Die rRNA-Ratios reichen von 0,95 bis 1,17, liegen also noch im Toleranzbereich. Dies wurde auch von der OD-Messung bestätigt: Die RNA aller fünf Zellkulturen weist auf eine verhältnismäßig gute bis sehr gute Qualität hin (siehe Tab. 10, Seite 88). Das Verhältnis von $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ liegt bei dem Grenzwert 1,8. Daraus folgt, dass in dieser Arbeit die mangelhafte RNA-Qualität als Ursache für die aufgetretenen technischen Probleme bei den Untersuchungen der substanzspezifischen Kanzerogenese-Gene ausgeschlossen werden kann.

Schließlich könnte die RNA-Quantität in Frage kommen: Mit RNA schlechter Quantität kann man ebenfalls keine gute DD-Analyse anfertigen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die genetische Information von der DNA in die einsträngige messenger RNA (mRNA) umgeschrieben wird, die max. 5% der gesamten Menge an RNA in einer Zelle ausmacht und weiter bei der Translation als Vorlage für die Proteinsynthese dient. So konnte gezeigt werden, dass die Reverse Transkription mit 2 µg Gesamt-RNA das beste Ergebnis erzielte (siehe Abb. 27, Seite 74). Weil das Volumen des RNA-Reaktionsansatzes max. 40% im RT-Ansatz betragen darf, wurde die RNA-Konzentration nicht weiter erhöht.

5.1.3 Optimierung der PCR-Amplifikation

Bislang wurde die DD-PCR-Produktausbeute unter Verwendung der 14mer-Primer und durch Verlängerung der Annealingzeit wesentlich erhöht. Allerdings besteht folgender Nachteil: Die mit GenHunter-Chemikalien am Perkin Elmer 9600 durchgeführten DD-PCR können nicht durch das *real-time*-PCR-System kontrolliert werden. Im Vergleich zur konventionellen PCR bietet *real time* PCR folgende Vorteile:

1. Die *real time* PCR-Technik verfügt über eine Detektionsoptik, die es erlaubt, den Verlauf der PCR-Reaktionen unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen in Echtzeit zu verfolgen und aufzuzeichnen^[154]. Damit können die DD-PCR-Produkte bei gleichzeitiger Durchführung der Wasser-Negativ-Kontrolle und Ein-Primer-Negativ-Kontrolle kontrolliert werden. Weiterhin können die PCR-Bedingungen durch Variation der PCR-Parameter in Hinblick auf eine Minimierung der Falsch-Positiven optimiert werden.
2. Mit Hilfe der aufgezeichneten Amplifikationskurven können die Effizienzen der einzelnen PCR-Reaktion abgeschätzt werden. Eine PCR mit höherer Effizienz macht sich durch einen steilen Verlauf der Amplifikationskurve bemerkbar. Dies ist sehr wichtig für die quantitative PCR (siehe 4.2.5), da nur mit hoher PCR-Effizienz die quantitative PCR gewährleistet werden kann.

In dieser Arbeit wurde versucht, die nach der Vorschrift von GenHunter am Perkin Elmer 9600 durchgeführte DD-PCR im LightCycler-System zu etablieren. Dabei wurde die DD-PCR unter Verwendung der Chemikalien von verschiedenen Firmen untersucht und unterschiedliche Ergebnisse erzielt (siehe Abb. 28, Seite 76): Bei der mit Roche-Chemikalien durchgeführten PCR wurden neben der Zwei-Primer-Amplifikate viele Ein-Primer-Nebenprodukte produziert. Damit sind die Roche-Chemikalien für das LightCycler-System nicht geeignet. Im Gegensatz dazu erreicht die DD-PCR unter Verwendung von Qiagen-Chemikalien fast die gleichen Ergebnisse wie bei den GenHunter-Chemikalien. Hierbei sollte die Art der Reaktionsgefäße und des Thermocyclers keine Rolle gespielt haben, da alles parallel und mit den gleichen Arbeitsmitteln durchgeführt wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die DD-PCR unter Verwendung von Qiagen-Chemikalien am Perkin Elmer 9600 die gleichen PCR-

Amplifikate wie im LightCycler erzielt (siehe Abb. 29, Seite 78). Daraus kann man schließen, dass die unter Verwendung der GenHunter-Chemikalien am Perkin Elmer 9600 durchgeführte DD-PCR durch Qiagen-Chemikalien und LightCycler ersetzt werden kann.

Zu beachten ist, dass die DD-PCR im LightCycler wegen der Wärme und Feuchtigkeit im Sommer schwerer durchführbar war. Abweichende Fragmentmuster zwischen LightCycler und Perkin Elmer 9600 können somit auf unterschiedliche Temperaturübertragungsraten der Geräte zurückgeführt werden. In dieser Arbeit wurde die DD-PCR bei den Untersuchungen der substanzspezifischen Kanzerogenese-Gene im Perkin Elmer 9600 durchgeführt. Damit kann dieser Faktor als Ursache für die aufgetretenen technischen Probleme in der DD-Analyse ausgeschlossen werden.

5.1.4 Optimierung der Reamplifikationsbedingungen

In der vorangegangenen Diplomarbeit^[140] wurde die Direct-Blotting-Elektrophorese unter Verwendung der neutralen Nylonmembran durchgeführt, die auf eine geringere Sensitivität aufweist. In dieser Arbeit wurde zunächst die positiv geladene Nylonmembran untersucht. Nach der Detektion zeigte sich ein deutlich besseres Ergebnis: Im Vergleich zur neutralen Nylonmembran konnten auf der positiv geladenen Nylonmembran deutlich schärfere DNA-Banden detektiert werden (siehe Abb. 30, Seite 80). Allerdings konnten die auf der positiv geladenen Nylonmembran immobilisierten DNA-Banden anschließend nicht reamplifiziert werden. Deshalb wurde die neutrale Nylonmembran weiter verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die PCR-Amplifikate auf der neutralen Nylonmembran, egal wie schwach die Banden sind, reamplifiziert werden konnten (siehe Abb. 31 und 32, Seite 82 und 83). Bei der Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurden die DNA-Fragmente auf der neutralen Nylonmembran unter Verwendung von verschiedenen Reamplifizierungsprogrammen durchgeführt. Das beste Ergebnis wurde mit dem Reamplifizierungsprogramm 4 erzielt.

5.1.5 Erhöhung der Membransensitivität

Eine Nylonmembran mit scharfen DNA-Banden setzt den visuellen Vergleich der PCR-Bandenmuster voraus. Die auf der neutralen Nylonmembran immobilisierten DNA-Banden können zwar zu 100% reamplifiziert werden, sind aber nicht deutlich genug zu erkennen. Als Nächstes wurde versucht, die Sensitivität der neutralen Nylonmembran zu erhöhen.

Die mangelnde Sensitivität der neutralen Nylonmembran könnte in dem Detektionssystem (BioDetection System der Firma GATC) liegen. Die mittels PAGE auf der Nylonmembran aufgetrennten DNA-Fragmente wurden in einem automatischen Detektionssystem visualisiert. Die Detektion beruht auf einer Farbreaktion zwischen Nitrotetrazoliumblauschlorid (NBT) und 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP):

Streptavidin, das als Konjugat mit einer alkalischen Phosphatase (SA-AP) vorliegt, bildet eine hochaffine Bindung mit der 5'-Biotin-Markierung der Amplifikate. Nach Zugabe einer BCIP-NBT-Lösung spaltet SA-AP aus BCIP einen Phosphatrest ab. Hierbei dient BCIP als AP-Substrat, welches nach seiner Dephosphorylierung oxidativ in einen blauen Indigofarbstoff überführt wurde. Als Oxidationsmittel dient NBT, welches bei dieser Reaktion ebenfalls zu einem blauen Farbstoff reagiert. NBT wirkt somit farbverstärkend (Abb. 46).

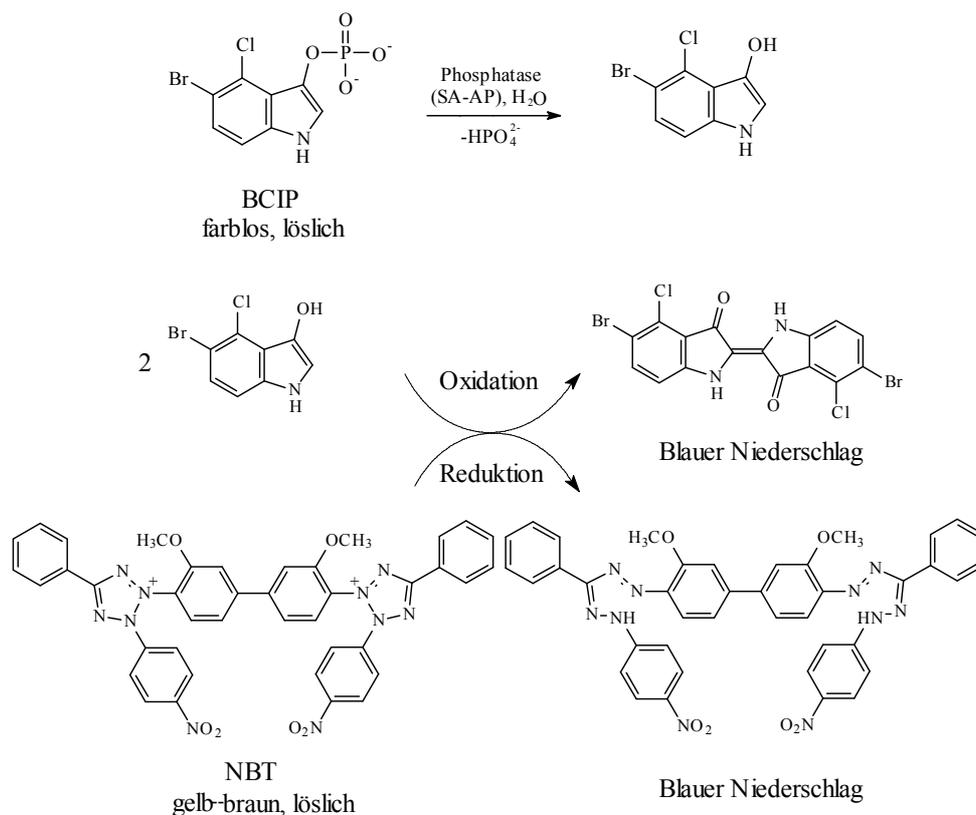


Abb. 46: Reaktionsschema der Farbstoff-erzeugenden Redox-Reaktion

SA-AP (Konjugat aus Streptavidin und alkalischer Phosphatase) katalysiert den initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt. Die nachfolgende Redoxreaktion führt zu einem blauen Niederschlag auf der Membran.

In dem bisher in unserem Arbeitskreis verwendeten Membranentwicklungsprotokoll wurde die Kopplungszeit zwischen SA-AP und Membran sowie die Farbenreaktionszeit zwischen NBT und BCIP jeweils bei 60 min und 180 min durchgeführt (siehe 3.7.3, Detektions-Programm: Schritt 6 und 13, Seite 46). Diese Bedingungen könnten als Ursache für die nicht zufriedenstellende Sensitivität der neutralen Nylonmembran sein. Dies wurde auch in dieser Arbeit bestätigt. Durch weitere Zugabe von SA-AP und Verlängerung von Kopplungszeit (von 60 min auf 90 min) und Farbreaktionszeit (von 3 h auf 4 h) wurde die Membransensitivität wesentlich erhöht (siehe Abb. 33, Seite 85).

5.1.6 Methodenkritik

5.1.6.1 Leistung der DD-Analyse

Das Differential Display basiert auf einer Reversen Transkription der mRNA mit verschiedenen Oligo-dT-Primern. Durch Vergleich der Gesamt-Populationen von verschiedenen mRNAs lassen sich differentiell exprimierte Gene identifizieren. Damit gehört das Differential Display zu einer der sensitivsten Methoden, bei der auch sehr kleine Expressionsunterschiede dargestellt werden können. Theoretisch können die low-abundance-mRNAs (< 50 Kopie pro Zelle) durch die hohe Sensitivität der DD-Analyse identifiziert werden, die in der Praxis jedoch nicht immer bestätigt werden^[155].

Ein weiterer Vorteil der DD-Analyse liegt darin, dass mRNA-Transkripte aus mehreren Zellpopulationen parallel analysiert werden können. Die Anzahl der Proben hängt lediglich von der Probenkapazität des Polyacrylamidgels ab. Durch den direkten side-by-side Vergleich ergibt sich auch die Möglichkeit einer internen Kontrolle hinsichtlich der Spezifität der PCR-Produkte, da nur differentielle Banden berücksichtigt werden, die in den Mustern von mindestens zwei identischen aber unabhängig voneinander erzeugten PCR-Amplifikaten vorkommen.

Dass das Verfahren universell einsetzbar sowie kostengünstig ist und einen vergleichsweise geringen Arbeitsaufwand erfordert, sind weitere Vorzüge, die es für begleitende Untersuchungen besonders interessant macht.

Schließlich ist die DD-Analyse eine rasch durchführbare Methode, die nur geringe Mengen an mRNA benötigt. Für das in dieser Arbeit etablierte „Differential Display“ werden rechnerisch jeweils 2 µg RNA für einen RT-PCR-Ansatz benötigt. Wegen den RNA-Qualitätsuntersuchungen und den zwangsläufigen Wiederholungen ist der tatsächliche RNA-Bedarf wesentlich höher.

5.1.6.2 Falsch-Positive

Das erstmals 1992 von Liang und Pardee^[133] beschriebene System des Differential Display (DD) ermöglicht zwar die PCR-basierte Bestimmung von Genen verschiedener Zellpopulationen, hat jedoch einen großen Nachteil, nämlich die hohe Anzahl an falsch positiven Ergebnissen. Unter reproduzierbaren Falsch-Positiven werden im allgemeinen differentiell erkannte Banden verstanden, die entweder nicht reamplifizierbar sind oder die im Northern Blot zu keinem differentiellen Signal führen, wie z.B. rRNA-Amplifikate. Schätzungen gehen davon aus, dass 75% bis 90% der durch Differential Display identifizierten Transkripte Falsch-Positive sind^[138,139]. Die „Falsch-Positiven“ könnten aus folgenden Gründen entstanden sein:

- Das Differential Display ist eine PCR-basierte Methode, bei der die zu vergleichenden Transkript-Populationen nach einem Zufallsprinzip amplifiziert werden. Wegen des exponentiellen Verstärkungseffektes der PCR ist diese Methode generell fehleranfällig. Beispielsweise könnten Primerdimer- und Ein-Primer-Nebenprodukte die Fehlerquellen für spätere Falsch-Positive sein.
- Beim Differential Display handelt es sich um einen visuellen Vergleich der RT-PCR Bandenmuster. Die Auswahl der differentiellen DNA-Banden könnte großzügig oder sehr streng sein. Die Kriterien zum Picken einer Bande sind sehr individuell und daher verantwortlich für einen Großteil von Falsch-Positiven^[156].
- Die Kontamination der RNA mit genomischer DNA könnte als Fehlerquelle nicht ausgeschlossen werden.

5.1.6.3 Reduzierung der falsch positiven Ergebnisse

Zur Reduzierung der Falsch-Positiven wurden in dieser Arbeit folgende Maßnahmen durchgeführt:

- Die DD-PCR wurde immer mit Wasser- und Ein-Primer-Negativ-Kontrolle durchgeführt.
- Die DD-PCR-Produkte wurden mit Chip-Elektrophorese kontrolliert.
- Bei der Direct-Blotting-Elektrophorese wurden die Positiv-Kontrollen verwendet.

- Die durch DD-Analyse identifizierten Gene wurden mit quantitativer PCR verifiziert.

Wasser- und Ein-Primer-Negativ-Kontrolle zur DD-Amplifikate

In Hinblick auf eine Verminderung der Falsch-Positiven, die durch Primerdimer- und Ein-Primer-Nebenprodukte verursacht werden, wurde in dieser Arbeit bei der DD-PCR-Amplifikation immer zwei Negativ-Kontrollen durchgeführt, wobei in den Ansatz der PCR entweder kein Templat oder Upstream-Primer zugegeben wurde. Anschließend wurden diese beiden Negativ-Kontrollen zusammen mit den Zwei-Primer-PCR-Produkten in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dadurch lassen sich die Primerdimer- und Ein-Primer-Nebenprodukte von den Zwei-Primer-PCR-Produkten effektiv unterscheiden. Folglich können die Primerdimer- und Ein-Primer-Nebenprodukte als Fehlerquelle der Falsch-Positiven ausgeschlossen werden.

Qualitätskontrolle der DD-Amplifikate durch Chip-Elektrophorese

Die DD-PCR-Produkte mit hoher Qualität sind die Voraussetzung für die folgende Direct-Blotting-Elektrophorese. Unter „hoher Qualität“ versteht man zum einen das DD-PCR mit höherer Produktausbeute und zum anderen das DD-PCR mit wenigen Falsch-Positiven. In dieser Arbeit wurden die DD-PCR-Produkte vor der Direct-Blotting-Elektrophorese mit Hilfe der Chip-Elektrophorese geprüft. Mittels Chip-Elektrophorese kann man die DD-PCR-Amplifikate sowohl qualitativ als auch quantitativ charakterisieren. Die quantitative Bestimmung der PCR-Produkte ist sehr hilfreich für die anschließende Direct-Blotting-Elektrophorese. So konnte in der vorangegangenen Diplomarbeit^[140] gezeigt werden, dass man ungefähr 1 ng DNA-Fragment benötigt, um eine Bande auf der Direct-Blotting-Membran detektieren und reamplifizieren zu können. Durch die Messung der DNA-Fragmentlänge und deren Konzentration kann abgeschätzt werden, ob sich die anschließende, arbeitsintensive Direct-Blotting-Elektrophorese lohnt.

Positiv-Kontrolle zur Direct-Blotting-Elektrophorese

Die Direct-Blotting-Elektrophorese ist technisch sehr anspruchsvoll, bei der die Gefahr besteht, dass die DNA-Fragmente bei Austritt aus dem Gel nicht auf die Nylonmembran

transferiert werden, wenn der Kontakt zwischen Gel-Ende und Nylonmembran nicht nahtlos und luftblasenfrei ist (siehe Abb. 16, Seite 44). In der vorangegangenen Diplomarbeit^[140] wurden vier biotinylierte DNA-Fragmente als Positiv-Kontrolle für die Direct-Blotting-Elektrophorese etabliert, die diese Fehlerursache anzeigen.

Wenn die Direct-Blotting-Elektrophorese und die anschließende Detektion der DNA technisch einwandfrei funktionieren, benötigt man ungefähr 1 ng DNA-Fragment, um eine Bande auf der Direct-Blotting-Membran zu detektieren. Ein technischer Fehler in der Direct-Blotting-Elektrophorese als Ursache für die niedrige Bandenzahl kann aufgrund der funktionierenden Positiv-Kontrollen ausgeschlossen werden.

Die biotinylierten DNA-Fragmente dienen gleichzeitig zur Charakterisierung der EST-Fragmentgröße auf der Nylonmembran. Die für uns interessante DNA-Fragmentgröße liegt in einem Bereich zwischen 100 und 350 bp; insbesondere DNA-Fragmente oberhalb von 350 bp sind Falsch-Positive.

Anschließend dienen die Markerbanden als Positiv-Kontrolle für die Reamplifikation. Die Länge der DNA-Fragmente auf der Nylonmembran stimmt bei allen vier Positiv-Kontrollen mit der Länge der PCR-Fragmente nach der Reamplifikation überein. Dieses ist nicht bei allen EST-Banden der Fall und spiegelt sich auch nach der Klonierung der Reamplifikate wieder. Bei den PCR-Produkten, deren Länge nach der zweimaligen Reamplifikation mit der Längenmessung auf der Nylonmembran übereinstimmt, wurde nach der Klonierung die identische Insertlänge detektiert (siehe Abb. 39, DNA-Bande 21, Spur 17, Seite 96). Wenn hingegen die Länge des Reamplifikationsproduktes von der des Einzelstranges auf der Nylonmembran abweicht, wurde nach der Klonierung neben den identischen Insertlängen auch eine Vielzahl von uneinheitlich langen Inserts detektiert (siehe Abb. 39, DNA-Bande 22, Spur 24-35, Seite 96), was auf Falsch-Positive hinweist. Als Ursache für das Auftreten dieser vermutlich Falsch-Positiven in Abb. 39 kommen die ungereinigten PCR-Reamplifikate in Frage, von der vorausgehend gezeigt wurde, dass während der erstmaligen Reamplifikation keine der Fragmentgröße entsprechenden PCR-Produkte in der Chip-Elektrophorese detektiert wurden, ergeben sich unerwartete DNA-Banden in der zweimaligen Reamplifikation (siehe Abb. 37 und 38, Seite 92 und 94).

Verifizierung von identifizierten Genen durch quantitative PCR

Wegen der hohen Anzahl der Falsch-Positiven ist eine Kontrolle der in der DD-Analyse festgestellten Regulation erforderlich. Als häufig angewendete Methode zählt die Northern-Blot Analyse. Die Northern-Blot Analyse, als konventionelle Methode der mRNA-Analyse, ist oftmals nicht sensitiv genug, um schwach exprimierte Gene nachweisen zu können und erlaubt zudem nur eine grobe Quantifizierung^[157]. So liegt die maximale Nachweisgrenze im Northern-Blot bei ca. 0,5 pg spezifischer mRNA^[141]. D.h. werden mit der RT-PCR „low abundancy“ RNAs amplifiziert, lässt sich ihre Expression durch Northern-Blot Analyse nicht mehr nachweisen. Ein weiterer Nachteil der Methode ist der hohe Arbeitsaufwand und der Einsatz größerer Menge an RNA, weil eine hohe Northern-Blot Anzahl notwendig ist, um die Gen-Regulation zu bestätigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Bestätigung der differentiellen Rab7-mRNA-Expression eine relative quantitative PCR eingesetzt, die im Gegensatz zur Northern-Blot Analyse hohe Sensitivität aufweist. Um mögliche Schwankungen in der RNA-Qualität und – Konzentration auszugleichen, erfolgte eine Relativierung der ermittelten Rab7-mRNA-Expression gegenüber der GAPDH-mRNA-Expression^[158]. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in den mit MNNG behandelten M2-Zellen deutlich mehrere Rab7-Moleküle detektiert wurden als in den unbehandelten M2-Zellen (siehe Abb. 42 und Tab. 12, Seite 99 und 100). Dies spricht für einen hohen Anstieg der Rab7-mRNA-Expression zu diesem Zeitpunkt. Aufgrund der in Seite 63 dargestellten Formel wird festgestellt, dass in den mit MNNG (0,5 µg/mL) bzw. MNNG (1,0 µg/mL) behandelten M2-Zellen das Rab7-Gen um jeweils 650% und 430% höher exprimiert ist als im Vergleich zu ihren M2-Zellen.

Im folgenden Kapitel wird das Rab7-Gen, das zu der Rab-Familie gehört, in Bezug auf seine Funktion in dem Endozytoseweg bzw. dem Autophagieweg diskutiert. Dabei wird der Beitrag des Rab7-Gens zur Tumorentstehung abgeleitet.

5.2 Rab7

Das Rab7-Gen, das zur Rab-Familie gehört, wurde sowohl aus Pflanzen als auch aus Säugetieren isoliert^[159-162]. Sein Genprodukt ist an multiplen Proteintransporten bei vielen biologischen Vorgängen beteiligt, wie z.B. Reifung der Phagosomen und Autophagosomen, Invasion von *Trypanosoma cruzi*, Osteoblasten-Polarisation, frühe-späte Endosomen-Fusion^[162-166]. Allerdings ist die Funktion des Rab7-Proteins in den vesikulären Transportwegen bislang nicht hinreichend geklärt. Im folgenden Kapitel wird das Rab7-Protein und seine Funktionen in dem Endozytoseweg sowie dem Autophagieweg vorgestellt. Anschließend wird das Rab7-Protein im Zusammenhang mit Krebs diskutiert. Dabei werden in dieser Arbeit erzielte Ergebnisse mit der Literatur verglichen.

5.2.1 Rab7 im Endozytoseweg

Endozytose bezeichnet einen Prozess, durch den die Substanzen wie z.B. größere Nahrungsteilchen, Makromoleküle oder kleine Partikeln von der extrazellulären Umgebung in die Zelle aufgenommen werden. Die Aufnahme erfolgt durch Abschnürung der Zytoplasma-Membran ins Zellinnere, wobei der Prozess ursprünglich in die Aufnahme ganzer Partikel (Phagozytose) und die Aufnahme von Flüssigkeit (Pinozytose) unterteilt war.

Bei dem endozytotischen Weg wird nach Aufnahme von Stoffen ein kleines präendosomales Trägervesikel gebildet, das sich im Laufe der Reifung mit Hilfe von Mikrotubuli und den Motorproteinen (Kinesin und Dynein) zu frühen Endosomen umwandelt. Die durch Endozytose ins Zellinnere internalisierten Stoffe werden entweder von frühen Endosomen über rezyklisierende Endosomen an die Zelloberfläche zurückkehren oder sich zu späten Endosomen bzw. Lysosomen wandeln, in denen die Stoffe abgebaut werden. In Abb. 47 ist der Endozytoseweg vereinfacht dargestellt.

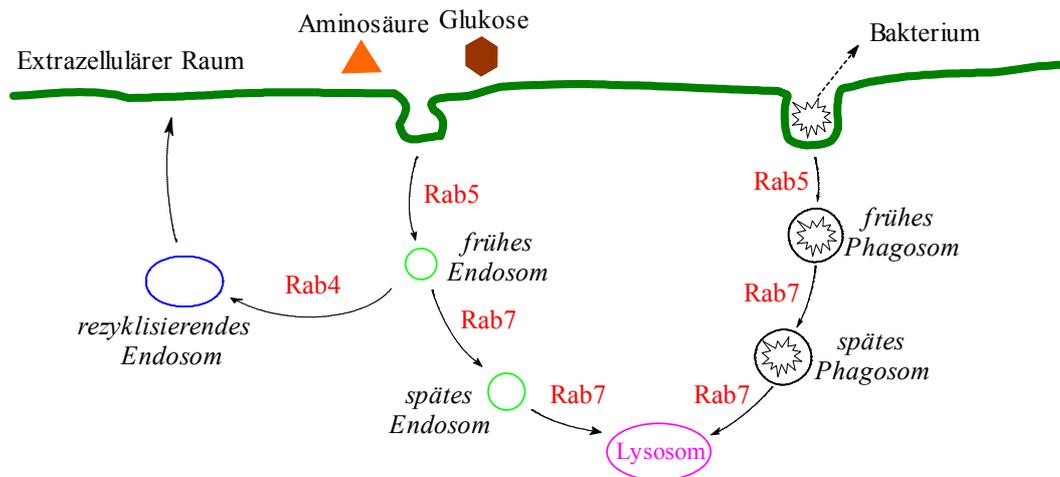


Abb. 47: Vereinfachte schematische Darstellung des Endozytosewegs

Die Sortierung der verschiedenen internalisierten Verbindungen, die an die Zelloberfläche zu transportieren sind oder in Lysosomen abgebaut werden sollen, spielt eine wichtige Rolle bei dem Endozytoseweg. Die Zelle kann dadurch verschiedene Rezeptoren, wie z.B. die Rezeptoren für LDL und Transferrin sowie Transportproteine für Nährstoffe wieder verwenden. Gleichzeitig wird der Großteil der residenten Zelloberflächenproteine, die internalisiert wurden, wieder zurückgeführt^[167-169]. Hopkins et al.^[170] zeigten, dass zahlreiche Proteine sowie Rezeptoren, ca. 70-80% des gesamten Inhalts der frühen Endosomen, zur Plasmamembran über einen Recyclingweg zurückgebracht werden. Der restliche Inhalt, wie z.B. herabregulierte Rezeptoren und Liganden, wird zu späten Endosomen bzw. Lysosomen transportiert.

Man nimmt an, dass der Vorgang der Endozytose evolutionär aus dem Mechanismus der Nahrungsaufnahme früher einzelliger Organismen hervorgegangen ist. Im Laufe der Entwicklung zu höheren Lebewesen hat sie sich jedoch immer mehr spezialisiert und wurde von den Zellen für verschiedene Aufnahmeprozesse adaptiert, wie z.B. für die Interaktion mit anderen Zellen, für die Immunreaktion, zur Regulation zellulärer Prozesse über Wachstumshormone, zur Eliminierung körperfremder Zellen oder zum Abbau extrazellulärer Makromoleküle^[171].

Im Bereich des Endozytosewegs wurden hauptsächlich die Rab-Proteine Rab4, Rab5 und Rab7 charakterisiert^[29]. Während das Rab4- und das Rab5-Protein mit den frühen Endosomen assoziiert sind, wird hingegen das Rab7-Protein den späten Endosomen und

Lysosomen zugeordnet. Sie sind jeweils an verschiedenen vesikulären Transporten beteiligt.

Rab5 reguliert den vesikulären Transport von Präendosomen zu frühen Endosomen. Überexpression von Rab5 führt zu einer Zunahme der Endozytose und zu einem vergrößerten frühen Endosom^[77,78]. Im Gegensatz dazu wird der Endozytoseweg bei Transfektion vom dominant negativen Rab5 (S34N) blockiert^[172]. Rab4 ist am Recycling von frühen Endosomen zu rezyklisierenden Endosomen beteiligt, wie am Beispiel des Transferrin-Rezeptors gezeigt werden konnte^[173,174]. Überexpression von Rab4 führt zu einer Akkumulation von Transferrin auf der Zelloberfläche^[174].

In dem Degradierungsweg spielt das Rab7-Protein eine wichtige Rolle. Experimentelle Daten zeigen, dass das Rab7-Protein mit den späten endozytotischen Strukturen sowie den späten Endosomen/Lysosomen assoziiert ist. Eine dominant negative Mutante von Rab7 (T22N) führt zu einer starken Hemmung des vesikulären Transports von frühen zu späten Endosomen. Dies weist darauf hin, dass Rab7 für diesen Schritt verantwortlich ist^[79,175]. Durch eine andere konstitutiv aktive Mutante von Rab7 (Q67L) wird außerdem gezeigt, dass Rab7 auch den vesikulären Transport von späten Endosomen zu Lysosomen reguliert^[176]. Des Weiteren kann das Rab7-Protein auch bei der Lysosomen-Biogenese nachgewiesen werden^[177]. Dabei ist es an der Regulation der heterotypischen Fusion zwischen späten Endosomen und Lysosomen und der homotypischen Fusion von Lysosomen beteiligt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Rab5 und das Rab7-Protein auch an der Reifung der Phagosomen beteiligt sind^[178-180]. Wenn ein Fremdkörper wie z.B. ein Bakterium in den Körperbereich eindringt, dann wird er meist schnell von patrouillierenden Fresszellen des Immunsystems (wie z.B. Makrophagen) aufgenommen („phagozytiert“), wodurch ein neues Organell, das Phagosom, gebildet wird. Das entstandene Phagosom wird von den aufnehmenden Zellen wie ein spezialisiertes Endosom behandelt, läuft über verschiedene Reifungsphasen und fusioniert schließlich mit dem Lysosom. Dabei wird das Phagolysosom gebildet, in dem die aufgenommenen Mikroorganismen in der Regel getötet und ihre Antigene präsentiert werden. Die Veränderung eines Phagosoms hin zum Phagolysosom wird entsprechend der

Endosomenreifung als „Phagosomenreifung“ bezeichnet^[179,180] (siehe Abb. 47, Seite 124). An der Phagosomenreifung sind hauptsächlich Rab5 und Rab7 beteiligt. Während das „frühe Phagosom“, das direkt nach der Partikelaufnahme gebildet wird, vor allem durch das Rab5 gekennzeichnet ist, ist Rab7 in dem „späten Phagosom“ nachzuweisen^[178]. Sie sind jeweils an der Fusion von Präphagosomen zu frühen Phagosomen bzw. von späten Phagosomen zu Lysosomen beteiligt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Rab7-Protein an der Reifung der Endosomen und Phagosomen in dem Endozytoseweg beteiligt ist. Es reguliert jeweils den vesikulären Transport von frühen Endosomen (frühen Phagosomen) zu späten Endosomen (späten Phagosomen) und von späten Endosomen (späten Phagosomen) zu Lysosomen.

5.2.2 Rab7 im Autophagieweg

Autophagie, wörtlich das „Selbstfressen“, wird als ein Recyclingprozess in der Zelle bezeichnet, in dem die intrazellulären Proteine oder auch funktionsunfähige Zellorgane verdaut und weiter die Einzelteile als Baustoffe wieder verwendet werden können. Sie ist ein evolutionärer konservierter Prozess, der in allen eukaryotischen Zellen auftritt.

Bei der Autophagie wird zunächst eine preautophagosomale Struktur gebildet, die aus dem glatten Endoplasmatischen Retikulum stammt. Anschließend verschließen sich die Ränder der Membran und gleichzeitig werden die Teile der zytoplasmatischen Materialien durch die Doppelmembranstrukturen isoliert. Als Folge bildet sich ein Autophagosom. Dieses Autophagosom fusioniert dann mit dem späten Endosom oder dem Lysosom, wodurch das Autolysosom entsteht. Die durch Autophagie isolierten Stoffe werden durch lysosomale Hydrolasen abgebaut (Abb. 48).

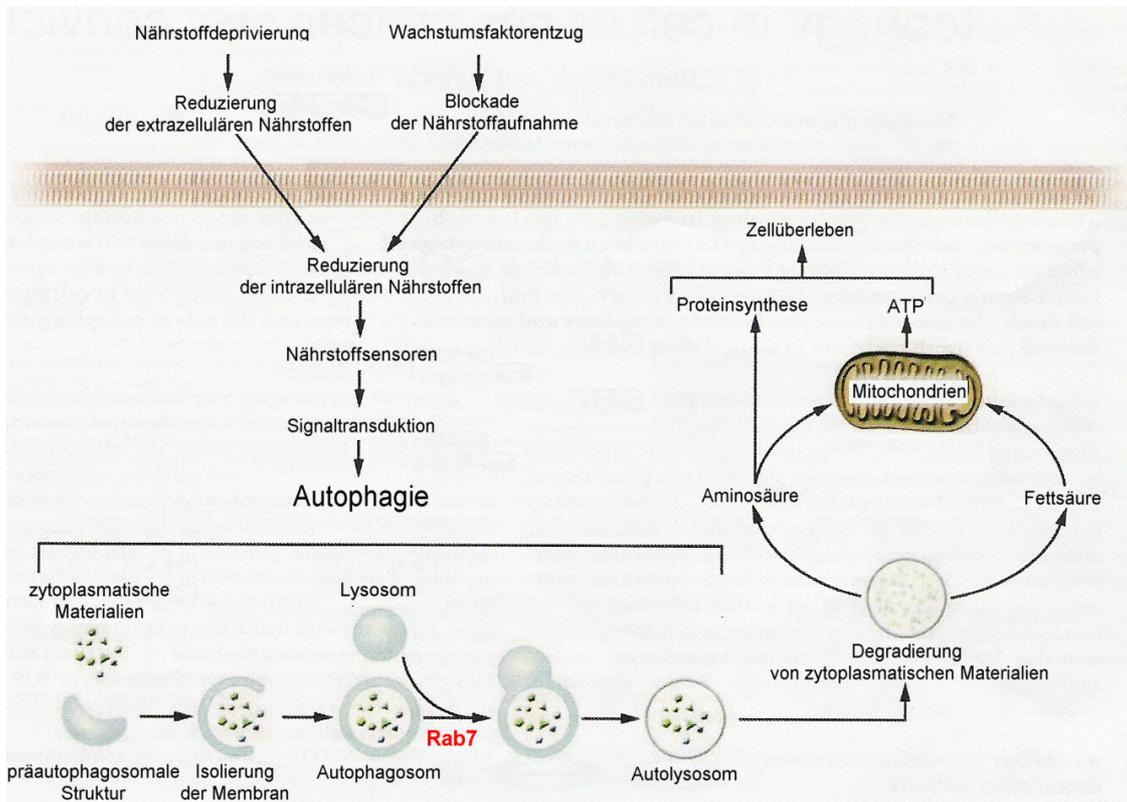


Abb. 48: Vereinfachte schematische Darstellung des Autophagiewegs und seine Rolle in der nährstoffdeprivierten Zelle

Wenn sich die Zelle in dem Zustand des „Verhungerns“ befindet oder wenn der Wachstumsfaktor der Zelle fehlt, wird die Aufnahme von den intrazellulären Nährstoffen stark reduziert. Als Folge werden die nährstoffsensitiven Signaltransduktionswege aktiviert, welche Autophagie anregen. Durch Abbau zellinnerer Membranlipide und Proteine werden freie Fettsäuren und Aminosäuren erzeugt, die wieder von der Zelle verwendet werden können. Damit behält die Zelle ihre mitochondriale Energie und Proteinsynthese bei. Dies ist vermutlich der Mechanismus dafür, dass die Zelle während des Verhungerns überlebt. Dieser Zellüberlebensmechanismus von Autophagie ist ein evolutionärer Prozess, der sowohl in Einzellorganismen als auch bei Säugetieren vorkommt. Allerdings wird Autophagie als eine „selbst-begrenzte“ Überlebensstrategie betrachtet^[181]. Bei übermäßigem Niveau der intrazellulären Autophagie führt sie zu einem übermäßigen „Selbst-Verbrauch“ bzw. einem bioenergetischen Ausfall und schließlich zu einem „autophagischen Zelltod“^[182].

Vor kurzer Zeit haben Gutierrez et al.^[183] bei der Untersuchung von CHO-Zellen (*Chinese hamster ovary*) festgestellt, dass das Rab7-Protein eine wichtige Rolle in dem Autophagieweg spielt. Sie setzten die Plasmide pEGFP-Rab7, pEGFP-Rab7Q67L und pEGFP-Rab7T22N in die CHO-Zellen ein, und markierten die Autophagosomen mit einem Autofluoreszenzmarker (Monodansylcadaverine). Nach der Einschränkung von Aminosäuren wurde Autophagie ausgelöst. Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie haben sie beobachtet, dass das Rab7- und das Rab7Q67L-Protein mit der Membran der Autophagosomen assoziiert sind. Im Gegensatz dazu verteilt sich das Rab7T22N-Protein diffus im Zytosol. Daraus wurde geschlossen, dass Rab7 an der Reifung der Autophagosomen beteiligt ist. Weiterhin haben sie bewiesen, dass Überexpression von Rab7 (T22N) zu großen Autophagosomen führt. Damit ist der Fusionsweg zwischen Autophagosomen und Lysosomen gesperrt. Dieses Ergebnis wurde auch von Jager et al.^[184] bestätigt. In HeLa-Zellen wurde mittels Elektron-Mikroskopie beobachtet, dass Überexpression von einer dominant negativen Mutante von Rab7 oder bei RNA-Interferenz zu einer Autophagosom-Akkumulation führt. Diese betroffenen Autophagosomen sind predominant späte Autophagosomen. Daraus haben sie geschlossen, dass das Rab7-Protein an der Reifung der späten Autophagosomen und der Fusion mit den Lysosomen beteiligt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Rab7-Protein an der Progression der Autophagie beteiligt ist. Es ist an den späten Autophagosomen lokalisiert und für die Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen erforderlich.

5.2.3 Rab7 und Krebs

Eine Anforderung für die Multizellularität ist, dass Zellwachstum innerhalb der Gewebe homöostatisch reguliert bleibt. Während das Wachstum bei einzelligen Organismen ausschließlich von extrazellulären Nährstoffen abhängig ist, werden die Eukaryotenzellen bei Säugtieren ständig mit Nährstoffen versorgt und das Zellwachstum wird durch die Wachstumsfaktoren kontrolliert, die von anderen Zellen produziert werden^[185,186]. Diese Wachstumsfaktoren liefern Signale, die die Ziel-Zellen zum Wachstum anregen. Wenn

die Wachstumsfaktoren limitiert werden, treten die Zellen von dem Zellzyklus zurück und gehen einen intrinsischen Weg zur Apoptose (siehe Abb. 3, Seite 7).

Durch Reduzierung von Wachstumsfaktoren lässt sich ein „Pseudohungerzustand“ von Zellen induzieren. Dieser fördert sowohl Endozytose als auch Autophagie. In dem Endozytoseweg beobachtet man bei einem Mangel an Wachstumsfaktoren eine Degradierung der Transportproteine für Glukose und Aminosäuren^[187-191]. In diesem Prozess fungiert das Rab7-Protein als ein „proapoptotisches Protein“, indem es den vesikulären Transport zwischen frühen Endosomen, späten Endosomen und Lysosomen reguliert^[187]. Es fördert den Abbau von Transportproteinen in den Lysosomen. Andererseits können die Zellen auch während des Zustands des „Verhungerns“ Autophagie induzieren. Durch die zelluläre autophagische Proteolyse von zytoplasmatischen Materialien werden freie Fettsäuren und Aminosäuren erzeugt, die wieder von der Zelle verwendet werden können. Dies führt zu einem „selbst-begrenzten“ Zellüberleben^[181]. Hierbei spielt auch das Rab7-Protein eine sehr wichtige Rolle. Es reguliert die Fusion von Autophagosomen zu Lysosomen, damit der ganze Recyclingprozess der Autophagie durchgeführt werden kann.

Obwohl die Funktion von Rab7 in dem vesikulären Transportweg in den letzten Jahren intensiv untersucht wird, ist es noch unbekannt, ob Rab7 eine Rolle bei der Tumorentstehung spielt. Im Folgenden wird der Blick auf den Einfluss des Rab7-Proteins auf die Tumorentstehung fokussiert. Dabei wird der Beitrag des Rab7-Gens zur Tumorentstehung in Bezug auf den Endozytoseweg und den Autophagieweg diskutiert.

5.2.3.1 Rab7, Endozytose und Tumorentstehung

In dem Endozytoseweg funktioniert das Rab7-Protein als ein „proapoptotisches Protein“. Das Rab7-Protein setzt die Nährstoffaufnahme von der Zelloberfläche herab, indem es den vesikulären Transport zwischen frühen Endosomen, späten Endosomen und Lysosomen reguliert.

Die Arbeitsgruppe von Edinger^[187] hat bei der Forschung an FL5.12-Zellen gezeigt, dass in den wachstumsfaktordeprivierten Zellen die Transportproteine für Glukose und Aminosäuren schnell durch den Endozytoseweg bzw. den Degradierungsweg von der

Zelloberfläche verloren gehen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass zum einen das Rab7-Protein die Transportproteine entlang des Degradierungswegs zu den Lysosomen transportiert, wo diese abgebaut werden, und zum anderen, dass der Wachstumsfaktor indirekt die Aufnahme von extrazellulären Nährstoffen reguliert, indem er die Expression von Nährstofftransportproteinen kontrolliert.

Weiterhin wurde in diesen Arbeiten^[187] festgestellt, dass in Anwesenheit des Wachstumsfaktors die Transfektion vom dominant negativen Rab7 keinen Einfluss auf die Nährstofftransport-Funktion hat. Wenn der Wachstumsfaktor fehlt, führt die Herabsetzung der Expression von Rab7 zu einem wachstumsfaktorunabhängigen, nährstoffabhängigen Zellüberleben. Dieses Ergebnis lässt sich durch folgenden Vorgang erklären. Ist die Funktion des Rab7-Proteins gehemmt, wird der vesikuläre Transportweg von frühen Endosomen zu späten Endosomen blockiert. Als Folge daraus werden die internalisierten Nährstofftransporter über den Recyclingweg wieder zur Zelloberfläche zurückgebracht. Dies könnte für das nährstoffabhängige Zellüberleben verantwortlich sein. Zu beachten ist, dass diese Zellen für die aufgrund der Nährstofflimitierung induzierten Apoptose ebenso empfindlich sind wie die Kontroll-Zellen.

Eine Voraussetzung für die komplette Transformation ist, dass die Zellen dem intrinsischen Apoptoseweg entkommen und unabhängig von den Wachstumsfaktoren wachsen können. Andererseits hängt das neoplastische Wachstum auch von der Inaktivierung der Tumorsuppressorgene ab, wie z.B. p53 und Rb (*Retinoblastomprotein*)^[192,193]. **Aber die Inaktivierung von p53 und Rb kann keine Transformation bei MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) in „soft agar“ oder in der Maus induzieren^[194]. Edinger et al.^[187] haben beobachtet, dass die Transformationskolonien erst nach der Herabregulierung des Rab7-Proteins und der Inaktivierung von p53 und Rb in „soft agar“ detektiert werden.** Daraus haben sie geschlossen, dass durch die Hemmung des Rab7-Proteins im Endozytoseweg das wachstumsfaktorunabhängige, nährstoffabhängige Zellüberleben gefördert wird. Dies kann bei der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen p53 und Rb eine zelluläre Transformation induzieren.

Auch andere Rab-Proteine, wie z.B. Rab5, sind bei der Regulation des Endozytosewegs bei der Entstehung von Krebs mitbeteiligt^[195,196]. Anders als bei der Rab7-Inhibition konnte allerdings nach der Transfektion vom dominant negativen Rab5 (S34) kein Zellüberleben bei der wachstumsfaktordeprivierten Zelle festgestellt werden^[187]. Dieses Resultat widerspricht nicht dem von Edinger vorgestellten Modell. Eine Voraussetzung für die Nährstoffaufnahme in dem Endozytoseweg besteht darin, dass die Transportproteine für Glukose und Aminosäuren wieder zur Zelloberfläche zurückkehren können. Im Gegensatz zu Rab7 wird bei der Störung der Rab5-Funktion der vesikuläre Transportweg von Präendosomen zu frühen Endosomen blockiert. Die Nährstoffaufnahme kann nicht wie bei der Hemmung von Rab7 unterstützt werden. Die wachstumsfaktordeprivierten Zellen können daher bei Störung von Rab5 nicht weiter überleben.

Es ist festgestellt worden, dass einige Proteine in dem Endozytoseweg eine wachstumsfaktorabhängige zelluläre Transformation induzieren können^[197]. Beispielsweise wurden drei unterschiedliche Proteine in dem Endozytoseweg aufgrund chromosomaler Translokationen identifiziert, die bei hämatopoetischen Neoplasien vorkommen. Eins davon ist das *eps15* (*epidermal growth factor receptor pathway substrate 15*). Bei NIH 3T3 Zellen wurden im „soft agar“ Transformationskolonien durch Überexpression von *eps15* gefunden. Es ist zu vermuten, dass solche Transformationen der Regulation eines wachstumsfaktorabhängigen Signaltransduktionswegs unterliegen. **Von Arbeitsgruppe Edinger^[187] wird ein anderer Transformationsmechanismus vorgestellt. Durch die Hemmung des Rab7-Proteins wird im Endozytoseweg das wachstumsfaktorunabhängige, nährstoffabhängige Zellüberleben gefördert. Diese autonom induzierte Nährstoffaufnahme ist vermutlich ein wichtiger Schritt bei der Transformation.**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mittels „Differential Display“ ein differentiell exprimiertes Gen in dem C3H-M2 Mausfibroblasten-Modellsystem identifiziert. Die Sequenzanalyse zeigt, dass ein Teil dieses Gens, der durch DD-PCR identifiziert wurde, zu 99% mit dem Rab7-Gen der Rab-Familie identisch ist. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass die abweichenden Basen nicht in dem proteincodierenden Bereich des Gens

liegen. Dies deutet darauf hin, dass es sich hier höchst wahrscheinlich um ein nicht mutiertes Genprodukt handelt. Ein endgültiger Beweis für die Mutation des Rab7-Gens wäre möglich, wenn die Sequenzanalyse durch das ganze Gen ausgeführt würde. Es wurde aber durch eine semiquantitative PCR festgestellt, dass das Rab7-Gen in den mit MNNG (0,5 µg/mL) und MNNG (1,0 µg/mL) behandelten M2-Zellen, jeweils um 650% und 430% höher exprimiert ist als in Kontroll-M2-Zellen.

Behandlung von C3H-M2 Mausfibroblasten-Modellsystem mit MNNG führt zur Zelltransformation^[198-200]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein aktiviertes Rab7-Gen in den mit MNNG behandelten M2-Zellen identifiziert. Weil Rab7-Gen in dem Endozytoseweg als „proapoptotisches Protein“ funktioniert und die Überexpression von Rab7-Gen zu einer Degradierung der durch Endozytose internalisierten Nährstofftransporter und weiterhin zu Apoptose führt, können die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse das Phänomen der Zelltransformation durch den Endozytoseweg nicht erklären. Vor kurzem wurden die Funktionen von Rab7-Protein in dem Autophagieweg identifiziert. Im Folgenden wird Rab7 bezüglich seiner Auswirkung auf den Autophagieweg sowie auf den Krebs diskutiert.

5.2.3.2 Rab7, Autophagie und Tumorentstehung

Das Rab7-Protein ist an der Progression der Autophagie beteiligt. Es fördert Autophagie durch eine Regulation der Fusion zwischen Autophagosomen und Lysosomen. Überexpression von Rab7 führt zu einer erhöhten Autophagierate. Im Gegensatz dazu wird der Autophagieweg nach der Hemmung des Rab7-Proteins blockiert. Unser Verständnis über Autophagie und ihre Rolle beim Krebs ist noch in einem sehr frühen Stadium. Auch die grundlegende Frage, ob Autophagie die Krebszellen tötet oder die Krebszellen vor ungünstigen Bedingungen schützt, ist noch nicht geklärt. Neue Beobachtungen deuten aber darauf hin, dass Autophagie eine sehr wichtige Rolle bei der Tumorentstehung spielt^[201,202]. Im Folgenden wird Autophagie jeweils als Zelltodmechanismus und Zellüberlebensmechanismus vorgestellt. Anschließend wird das Rab7-Protein im Zusammenhang mit Autophagie und Krebs diskutiert.

Autophagie als Mechanismus des Zelltodes

Der Zelltod ist meistens mit Apoptose verbunden, allerdings kann er auch ohne Apoptose wie z.B. durch „autophagischen Zelltod“ auftreten^[203]. „Autophagischer Zelltod“ wird auch als „programmierter Zelltod Typ-2“ bezeichnet. Er resultiert aus einem gesteigerten zellulären Autophagie^[182]. Anders als Apoptose (programmierter Zelltod Typ-1), die durch Signaltransduktion-Abhängigkeit und durch DNA-Spaltung gekennzeichnet ist, werden im „autophagischen Zelltod“ die Organellen früher degradiert, während die Signalkaskade-Aktivierung und DNA-Fragmentierung sehr spät (wenn überhaupt) auftreten^[181].

Obwohl in vielen Fällen die morphologischen Eigenschaften des autophagischen und apoptotischen Zelltods in der gleichen Zelle beobachtet werden, wurde von vielen Wissenschaftlern festgestellt, dass die Zellen vorzugsweise durch Apoptose sterben^[204-206]. Während einige Autoren annehmen, dass Autophagie mehr Apoptose auslöst, statt einen direkten Einfluss auf den Zelltodprozess zu haben^[207,208], schlagen die Anderen vor, dass Autophagie nur dann eine Rolle im Zelltodprozess spielt, wenn der Apoptoseweg in der Zelle blockiert ist^[209]. Daher bleibt der „autophagische Zelltod“ als Zelltodmechanismus weiterhin umstritten.

Autophagie als Mechanismus des Zellüberlebens

Im Vergleich zu ihrem Zelltodmechanismus, ist Autophagie als Zellüberlebensmechanismus seit langem bekannt^[201,210]. Der Zellüberlebensmechanismus von Autophagie ist ein evolutionärer Prozess. Einzellige Organismen, in denen Autophagie-Gene durch Mutation inaktiv sind, sind in normalen Wachstumszuständen lebensfähig; jedoch anders als ihr Wildtyp, sterben sie schnell während des Zustands des „Verhungerns“^[211-213]. Bei Deletion von Autophagie-Genen (z.B., *Atg6*, *Atg7* und *Atg9*) in Pflanzenzellen kommt es zu einem Verlust des Chlorophylls und es beschleunigt sich der Seneszenzprozess nach Nährstoffdeprivierung^[214-216]. In Mauszellen, in denen das *Atg5* fehlt und das plazentare Blut-Versorgungsmaterial unterbrochen wird, befinden sich die Zellen in einem Zustand des „Verhungerns“ und führen zum Tod während der neonatalen Periode^[217]. In der *Atg5*-defizienten Maus kann die Herabsetzung des Aminosäurespiegels, eine Reduzierung der kardialen ATP-Produktion und eine

myokardiale Beschädigung verursachen. Obwohl der individuelle Tod sich noch nicht in *Atg5*-defizienten Mauszellen eingesetzt hat, konnte festgestellt werden, dass die Recyclingfunktion von Autophagie sehr wichtig für die Beibehaltung der zellulären Energie-Homöostase und das Zellüberleben während der neonatalen Periode ist.

Es ist nachgewiesen, dass Autophagie-Gene auch für die Beibehaltung der zellulären Bioenergetik und des Zellüberlebens wichtig sind, wenn die Zellen nicht in der Lage sind, externe Nährstoffe aufzunehmen (z.B. während der Wachstumsfaktordeprivierung). In der wachstumsfaktordeprivierten Zelle wird die Expression für Nährstofftransportproteine herunter reguliert. Als Folge wird die Aufnahme von Nährstoffen reduziert und die Zelle befindet sich in einem Zustand des „Verhungerns“^[187]. Dies führt normalerweise schnell zur Apoptose. Neue Studien in apoptosedefizienten *bax*^{-/-}- und *bak*^{-/-}-Zellen haben eine wesentliche Rolle für Autophagie-Gene (z.B., *Atg5*, *Atg7*) entwirrt, die für das Zellüberleben nach Entzug von IL-3 wichtig sind^[209].

Der durch Autophagie induzierte Zellüberlebensmechanismus wird nicht nur auf seine Rolle bei der Beibehaltung der zellulären Energie während des Zustands des „Verhungerns“ beschränkt, sondern wird auch in die Entfernung von geschädigten Mitochondrien und anderen Organellen miteinbezogen. Diese Funktionen von Autophagie können Zellüberleben während des Alterns, bei infektiösen Krankheiten und während neurodegenerativer Prozesse fördern^[181].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Autophagie in den apoptose-intakten Zellen hauptsächlich einen Überlebensmechanismus und nicht einen Zelltodmechanismus darstellt. Allerdings ist Autophagie als Zellüberlebensmechanismus auch begrenzt. Wie im Zustand des „Verhungerns“ bei der Hefezelle, ist Autophagie eine „selbst-begrenzte“ Überlebensstrategie während des Wachstumsfaktorentzugs. IL-3-deprivierende *bax*^{-/-}- und *bak*^{-/-}-Zellen sterben schließlich, vermutlich wegen des übermäßigen „Selbst-Verbrauchs“ und des bioenergetischen Ausfalls^[209]. Diese Beobachtungen stehen mit dem Konzept in Einklang, dass Autophagie anstatt einem Primär- oder irreversiblen Zelltodprozess als eine „selbst-begrenzte“ Überlebensstrategie angesehen wird.

Rab7, Autophagie und Tumorentstehung

Autophagie beschreibt einen Prozess, in dem die Zelle durch Degradierung bzw. Wiederverwendung von den intrazellulären Proteinen und anderen Komponenten gegen „Verhungern“ und „Stress“ reagiert. Neue Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Autophagie eine sehr wichtige Rolle bei der Tumorentstehung spielt^[201,202]. Sie kann die Krebszellen im positiven und negativen Sinne beeinflussen.

Autophagie funktioniert einerseits wie ein Tumorsuppressor. Sie reduziert die Mutationsrate und unterdrückt Onkogenese durch Eliminierung von geschädigten Organellen, die genotoxischen Stress (z.B. durch freie Radikale) ausüben. Wenn die Funktion von Autophagie ausfällt, könnte in dieser Phase Zelltransformation induziert werden. Beispielsweise zeigt das beclin1 (ein Hefe-Homologe Säugetier-Autophagie-Gens *Atg6*) die Tumorsuppressorgenaktivität in der humanen Brustkrebszelllinie MCF7^[218]. Expression von beclin1 kann die Tumorentstehungskapazität durch Induktion von Autophagie reduzieren. Das defekte beclin1 wird allgemein in der menschlichen Brust-, Ovarium- und im Prostatakrebs gefunden^[219]. Auch eine durch negative Rab7-Gen-Mutation induzierte Zelltransformation lässt sich auf diese Weise erklären. Das Rab7-Protein reguliert die Fusion zwischen Autophagosomen und Lysosomen und fördert dadurch Autophagie. Wenn Rab7 durch Mutation inaktiviert ist, wird der vesikuläre Transportweg von Autophagosomen zu Lysosomen gesperrt. Als Folge wird Autophagie verhindert. Dies löst bei Inhibition von p53 und Rb Zelltransformation aus, wie von Edinger^[187] beobachtet wurde. In diesem Fall funktioniert Rab7 auch wie ein Tumorsuppressorgen. Dieses Phänomen kann ebenfalls im Endozytoseweg durch einen wachstumsfaktorunabhängigen, nährstoffabhängigen Zellüberlebensmechanismus erklärt werden (siehe 5.2.3.1). Aufgrund der Tumorsuppressoreigenschaft des Rab7-Gens kann man eine Beteiligung von Rab7 an der MNNG-induzierten Transformation in den C3H-M2 Mausfibroblasten nicht erklären, weil die Ergebnisse dieser Arbeit nicht eine Inaktivierung des Rab7-Gens durch Mutation, sondern eine Überexpression dieses Gens zeigen. Es wäre eventuell denkbar, dass die Rab7-Überexpression die M2-Zellen vor MNNG-induzierter Transformation schützt. Dies würde bedeuten, dass nur diejenigen Zellen maligne transformieren, die Rab7 nicht hoch regulieren.

Andererseits kann Autophagie auch das Wachstum von Krebszellen fördern. Die Tumorzellen befinden sich meistens in einem Sauerstoffmangel- und Nährstoffmangelzustand^[220]. Hierbei könnte Autophagie als Überlebensstrategie für die transformierten Zellen fungieren. Sie unterstützt das Tumorstadium, indem sie Zellüberleben während des Zustands des „Verhungerns“ fördert. In verschiedenen Krebszelllinien wie Darmkrebs, Brustkrebs, Melanomen, Leberkrebs und bösartige Gliome wird erhöhte Autophagie während der Nährstoffdeprivierung nachgewiesen^[221-225]. Es wird ebenfalls angenommen, dass solch ein Bedarf an Autophagie in der Tumorentstehung die Hochregulierung von beclin1^{+/-} in allen Tumoren der Mäuse erklärt^[226]. Es muss allerdings erwähnt werden, dass in einer Ras-Onkogen-induzierten Transformation von NIH3T3-Zellen ein Unterdrücken der Autophagie während der Nährstoffdeprivierung beobachtet worden ist^[227].

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde festgestellt, dass die Behandlung von C3H-M2 Mausfibroblasten mit der transformierten Substanz MNNG zu einer Hochregulierung des Rab7-Gens führt. Dies weist darauf hin, dass Autophagie in den mit MNNG behandelten M2-Zellen mehr begünstigt ist als in Kontrollzellen. Es ist interessant darauf hinzuweisen, dass bereits im Jahr 1985 über eine erhöhte Autophagie in MNNG-induzierten experimentellen Tumoren berichtet wurde^[228]. Damals war das Rab7-Gen noch nicht bekannt. Wie vorher erörtert, wird Autophagie in apoptoseintakten Zellen als eine „selbst-begrenzte“ Überlebensstrategie angesehen. Dieser Zellüberlebensmechanismus der Autophagie könnte ein wichtiger Schritt in der Transformation von M2-Zellen sein. Es wäre denkbar, dass Autophagie - wie genetische Instabilität - eine gemeinsame Eigenschaft der Krebszelle ist und damit zum malignen Phänotyp gehört. Die erhöhte Fähigkeit zur Autophagie könnte einen Selektionsvorteil der transformierten Zellen bedeuten. Dieses wäre z.B. in der Tumorstadiumsphase von großer Bedeutung. Hierbei könnte das Rab7-Gen als Marker-Gen für die Autophagie und dadurch für die Zelltransformation betrachtet werden.

5.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels „Differential Display“ ein überexprimiertes Rab7-Gen in mit MNNG behandelten C3H-M2 Mausfibroblasten nachgewiesen. Wegen der Probenkapazität des Polyacrylamidgels bei der Direct-Blotting-Elektrophorese wurde der Einfluss des MCA bzw. MCA+TPA auf das gleiche Zellsystem nicht berücksichtigt. Dieses wäre eine interessante Aufgabenstellung für nachfolgende Arbeiten.

Die Analyse der differentiellen Genexpression ist für die Aufklärung von Mechanismen der epigenetischen Kanzerogenese von großer Bedeutung. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die DD-Analyse durch eine Kombination von Chip-Elektrophorese, *real time* PCR und Direct-Blotting-Elektrophorese optimiert. Mit diesem neuen System könnten zukünftig auch durch kleinere Arbeitsgruppen toxikologische Fragestellungen zur differentiellen Genexpression bearbeitet werden. So wäre es möglich, substanz- und zellspezifische Signalkaskaden auf mRNA-Ebene zu charakterisieren und damit einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der Mechanismen der Tumorpromotion zu liefern. In einem zukünftigen Projekt soll mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Methoden der Mechanismus der Tumorförderung für die chemisch sehr unterschiedlichen Tumorpromotoren 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) und 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) untersucht werden.

Das menschliche Rab7-Gen ist auf dem Chromosom 3 (3q22.1) lokalisiert. In dieser Region können Deletion, Insertion, Inversion und Translokation häufig bei hämatologischen Neoplasien nachgewiesen werden^[229-231]. Einige andere Tumorarten sind auch durch genomische Veränderung in dieser Region charakterisiert^[232,233]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass das Rab7-Gen in den mit MNNG behandelten M2-Zellen hoch reguliert ist. Allerdings ist noch offen, ob dieses Gen eventuell mutiert ist. Eine Rab7-Gen-Mutationsanalyse soll zukünftig in dem mit MNNG behandelten C3H-M2 Mausfibroblasten-Modellsystem durchgeführt werden. Dies wäre möglich, wenn die Sequenzanalyse das ganze Gen erfassen würde. Es ist ebenfalls sehr wichtig, in der Zukunft zu untersuchen, ob die erhöhte Rab7-Expression

nach Behandlung von C3H-M2 Mausfibroblasten mit MNNG in den transformierten Zellen erfolgt.

Schließlich soll in der zukünftigen Arbeit die Rab7-Aktivität auch bei anderen natürlich vorkommenden Tumorzellen untersucht werden. Die Analyse der menschlichen Primär-Tumorzellen wäre wichtig, um zu klären, ob die Rab7-Aktivität in Tumorzellen erhöht ist oder andere Möglichkeiten existieren, welche die intrazelluläre Nährstoff-Mobilisierung oder extrazelluläre Nährstoffaufnahme bei der Tumorentstehung unterstützen. Sobald die Mechanismen, durch die die Primär-Tumorzellen die Nährstoffversorgung beibehalten, identifiziert sein werden, könnten sie ein neues und unerforschtes Potential für die chemotherapeutische Intervention darstellen. Die Strategie der Nährstoffbeschränkung wird bereits bei der Hemmung der Angiogenese verwendet. Es ist daher möglich, dass Medikamente, die den Nährstofftransport durch den Endozytoseweg bzw. den Autophagieweg beeinflussen, eine ähnliche Wirkung ausüben könnten.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Marquardt, H., (1994), Chemische Kanzerogenese, Lehrbuch der Toxikologie, hrsg. von H. Marquardt und S. Schäfer, Wissenschaftsverlag, Mannheim, 124-147
- [2] Neumann, H.G., (1992), Entstehung und Behandlung von Tumoren, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, hrsg. von Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K., Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, 6. Auflage, 722-746
- [3] Dekant, W., Vamvakas, S., (1994), Toxikologie für Chemiker und Biologen, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- [4] Schulte-Hermann, R., Marian, B., Bursch, W., (1994), Tumorpromotion, Lehrbuch der Toxikologie, hrsg. von H. Marquardt und S. Schäfer, Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, 148-177
- [5] Cohen, S., (1990), Cell proliferation in carcinogenesis, *Science* **249**, 1007-1011
- [6] Kerr, J.F., Winterford, C.M., Harmon, B.V., (1994), Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy, *Cancer* **73**, 2013-2026
- [7] Willis, R.A., (1952), The spread of tumors in the human body, London: Butterworth
- [8] Poremba, C., Bankfalvi, A., Dockhorn-Dworniczak, B., (1996), Tumor suppressor gene p53. Theoretical principles and their significance for pathology, *Pathologie* **17**, 181-188
- [9] Clarke, S., (1992), Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues, *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 355-386
- [10] Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E., Marshall, C.J., (1989), All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated, *Cell* **57**, 1167-1177
- [11] Knudson, A.G., (1971), Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 820-823
- [12] Knudson, A.G., (1990), Two-event carcinogenesis: roles of oncogenes and antioncogenes, In: S. H. Moolgavkar (ed.), *Scientific Issues in Quantitative Cancer Risk Assessment*, 32-48

-
- [13] Stanbridge, E.J., (1990), Human tumor suppressor genes, *Annu. Rev. Genet.* **24**, 615-657
- [14] Varmus, H., Weinberg, R.A., (1994), Gene und Krebs. Biologische Wurzeln der Krebsentstehung, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- [15] Weinberg, R.A., (1996), How cancer arises, *Sci. Am.* **275**, 62-70
- [16] Cordon-Cardo, C., (1995), Mutations of cell cycle regulators, *Am. J. Pathol.* **147**, 545-560
- [17] Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., (1998), Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage, *Science* **282**, 1497-1501
- [18] Evan, G., Littlewood, T., (1998), A matter of life and cell death, *Science* **281**, 1317-1322
- [19] Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W., (1991), Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage, *Cancer Res.* **51**, 6304-6311
- [20] Lane, D.P., (1992), Cancer. p53, guardian of the genome, *Nature* **358**, 15-16
- [21] Selivanova, G., Wiman, K.G., (1995), P53: a cell cycle regulator activated by DNA damage, *Adv. Cancer Res.* **66**, 143-180
- [22] Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A., (1991), The p53 tumour suppressor gene, *Nature* **351**, 453-456
- [23] Hainaut, P., Soussi, T., Shomer, B., Hollstein, M., Greenblatt, M., Hovig, E., Harris, C.C., Montesano, R., (1997), Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: update compilation and future prospects, *Nucleic Acids Res.* **25**, 151-157
- [24] Soussi, T., (2000), The p53 Tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **910**, 121-137
- [25] Soussi, T., Dehouche, K., Beroud, C., (2000), p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis, *Hum. Mutat.* **15**, 105-113
- [26] Barbacid, M., (1987), Ras genes, *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 779-827

- [27] Vojtek, A.B., Der, C.J., (1998), Increasing complexity of the Ras signaling pathway, *J. Biol. Chem.* **273**, 19925-19928
- [28] Schimmöller, F., Simon, I., Pfeffer, S.R., (1998), Rab GTPases, directors of vesicle docking, *J. Biol. Chem.* **273**, 22161-22164
- [29] Somsel, R.J., Wandinger-Ness, A., (2000), Rab GTPases coordinate endocytosis, *J. Cell Sci.* **113**, 183-192
- [30] Mackay, D.J., Hall, A., (1998), Rho GTPases, *J. Biol. Chem.* **273**, 20685-20688
- [31] Sander, E.E., Collard, J.G., (1999), Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion, *Eur. J. Cancer* **35**, 1905-1911
- [32] Jackson, C.L., Casanova, J.E., (2000), Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors, *Trends Cell Biol.* **10**, 60-67
- [33] Moss, J., Vaughan, M., (1998), Molecules in the ARF orbit, *J. Biol. Chem.* **273**, 21431-21434
- [34] Moore, M.S., (1998), Ran and nuclear transport, *J. Biol. Chem.* **273**, 22857-22860
- [35] Buerger, C., Devries, B., Stambolic, V., (2006), Localization of Rheb to the endomembrane is critical for its signaling function, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**, 869-880
- [36] Fu, M., Zhang, J., Tseng, Y.H., Cui, T., Zhu, X., Xiao, Y., Mou, Y., De Leon, H., Chang, M.M., Hamamori, Y., Kahn, C.R., Chen, Y.E., (2005), Rad GTPase attenuates vascular lesion formation by inhibition of vascular smooth muscle cell migration, *Circulation* **111**, 1071-1077
- [37] Hoshino, M., Yoshimori, T., Nakamura, S., (2005), Small GTPase proteins Rin and Rit Bind to PAR6 GTP-dependently and regulate cell transformation, *J. Biol. Chem.* **280**, 22868-22874
- [38] Shao, H., Kadono-Okuda, K., Finlin, B.S., Andres, D.A., (1999), Biochemical characterization of the Ras-related GTPases Rit and Rin, *Arch. Biochem. Biophys.* **371**, 207-219
- [39] Lee, C.H., Della, N.G., Chew, C.E., Zack, D.J., (1996), Rin, a neuron-specific and calmodulin-binding small G-protein, and Rit define a novel subfamily of Ras proteins, *J. Neurosci.* **16**, 6784-6794

- [40] Sekiguchi, T., Todaka, Y., Wang, Y., Hirose, E., Nakashima, N., Nishimoto, T., (2004), A novel human nucleolar protein, Nop132, binds to the G Proteins, RRag A/C/D, *J. Biol. Chem.* **279**, 8343-8350
- [41] Schürmann, A., Brauers, A., Massmann, S., Becker, W., Joost, H.G., (1995), Cloning of a novel family of mammalian GTP-binding proteins (RagA, RagBs, RagB1) with remote similarity to the Ras-related GTPases, *J. Biol. Chem.* **270**, 28982-28988
- [42] Magee, A.I., Gutierrez, L., McKay, I.A., Marshall, C.J., Hall, A., (1987), Dynamic fatty acylation of p21N-ras, *EMBO J.* **6**, 3353-3357
- [43] Duncan, J.A., Gilman, A.G., (1996), Autoacylation of G protein alpha subunits, *J. Biol. Chem.* **271**, 23594-23600
- [44] Zhang, F.L., Casey, P.J., (1996), Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences, *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 241-269
- [45] Fujiyama, A., Matsumoto, K., Tamanoi, F., (1987), A novel yeast mutant defective in the processing of ras proteins: assessment of the effect of the mutation on processing steps, *EMBO J.* **6**, 223-228
- [46] Park, H.W., Boduluri, S.R., Moomaw, J.F., Casey, P.J., Beese, L.S., (1997), Crystal structure of protein farnesyltransferase at 2.25 angstrom resolution, *Science* **275**, 1800-1804
- [47] Resh, M.D., (1996), Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins, *Cell Signal.* **8**, 403-412
- [48] Seabra, M.C., (1998), Membrane association and targeting of prenylated Ras-like GTPases, *Cell Signal.* **10**, 167-172
- [49] Gelb, M.H., (1997), Protein prenylation, et cetera: signal transduction in two dimensions, *Science* **275**, 1750-1751
- [50] Cox, A.D., Hisaka, M.M., Buss, J.E., Der, C.J., (1992), Specific isoprenoid modification is required for function of normal, but not oncogenic, Ras protein, *Mol. Cell Biol.* **12**, 2606-2615
- [51] Maltese, W.A., (1990), Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian-cells, *FASEB J.* **4**, 3319-3328

- [52] Boriack-Sjodin, P.A., Margarit, S.M., Bar-Sagi, D., Kuriyan, J., (1998), The Structural Basis of the Activation of Ras by Sos, *Nature* **394**, 337-343
- [53] Lenzen, C., Cool, R.H., Prinz, H., Kuhlmann, J., Wittinghofer, A., (1998), Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm, *Biochemistry* **37**, 7420-7430
- [54] Wittinghofer, A., Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., (1997), The interaction of Ras with GTPase-activating proteins, *FEBS Lett.* **410**, 63-67
- [55] Ahmadian, M.R., Stege, P., Scheffzek, K., Wittinghofer, A., (1997), Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras, *Nat. Struct. Biol.* **4**, 686-689
- [56] Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., Wittinghofer, A., (1997), The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase-activation and its loss in oncogenic Ras mutants, *Science* **277**, 333-338
- [57] Mittal, R., Ahmadian, M.R., Goody, R.S., Wittinghofer, A., (1996), Formation of a transition-state analog of the Ras GTPase reaction by Ras-GDP, tetrafluoroaluminate, and GTPase-activating proteins, *Science* **273**, 115-117
- [58] Geyer, M., Herrmann, C., Wohlgemuth, S., Wittinghofer, A., Kalbitzer, H.R., (1997), Structure of the Ras-binding domain of RalGEF and implications for Ras binding and signalling, *Nat. Struct. Biol.* **4**, 694-699
- [59] Dancey, J., Sausville, E.A., (2003), Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 296-313
- [60] Ahmadian, M.R., Zor, T., Vogt, D., Kabsch, W., Selinger, Z., Wittinghofer, A., Scheffzek, K., (1999), Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7065-7070
- [61] Gibbs, R.A., Zahn, T.J., Sebolt-Leopold, J.S., (2001), Non-peptidic prenyltransferase inhibitors: diverse structural classes and surprising anti-cancer mechanisms, *Curr. Med. Chem.* **8**, 1437-1465

- [62] Kohl, N.E., Conner, M.W., Gibbs, J.B., Graham, S.L., Hartman, G.D., Oliff, A., (1995), Development of inhibitors of protein farnesylation as potential chemotherapeutic agents, *J. Cell Biochem. Suppl.* **22**, 145-150
- [63] Dharmawardana, P.G., Peruzzi, B., Giubellino, A., Burke, T.R., Bottaro, D.P., (2006), Molecular targeting of growth factor receptor-bound 2 (Grb2) as an anti-cancer strategy, *Anticancer Drugs.* **17**, 13-20
- [64] Buolamwini, J.K., (1999), Novel anticancer drug discovery, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 500-509
- [65] Weinstein-Oppenheimer, C.R., Blalock, W.L., Steelman, L.S., Chang, F., McCubrey, J.A., (2000), The Raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors, *Pharmacol. Ther.* **88**, 229-279
- [66] Cirielli, C., Capogrossi, M.C., Passaniti, A., (1997), Anti-tumor gene therapy, *J. Neurooncol.* **31**, 217-223
- [67] Novick, P., Field, C., Schekman, R., (1980), Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway, *Cell* **21**, 205-215
- [68] Salminen, A., Novick, P., (1987), A ras-like protein is required for a post -Golgi event in yeast secretion, *Cell* **49**, 527-538
- [69] Goud, B., Zahraoui, A., Tavitian, A., Saraste, J., (1990), Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae, *Nature* **345**, 553-556
- [70] Haubruck, H., Disela, C., Wagner, P., Gallwitz, D., (1987), The Ras-related Ypt protein is an ubiquitous eukaryotic protein: Isolation and sequence analysis of mouse cDNA clones highly homologous to the yeast Ypt gene, *EMBO J.* **6**, 4049-4053
- [71] Touchot, N., Chardin, P., Tavitian, A., (1987), Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8210-8214
- [72] Zerial, M., McBride, H., (2001), Rab proteins as membrane organizers, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107-117

- [73] Bourne, H.R., (1988), Do GTPases direct membrane traffic in secretion? *Cell* **53**, 669-671
- [74] Novick, P., Zerial, M., (1997), The diversity of Rab proteins in vesicle transport, *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 496-504
- [75] Daro, E., van der Sluijs, P., Galli, T., Mellman, I., (1996), Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9559-9564
- [76] Mohrmann, K., van der Sluijs, P., (1999), Regulation of membrane transport through the endocytic pathway by rabGTPases, *Mol. Membr. Biol.* **16**, 81-87
- [77] Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., Zerial, M., (1992), The small GTPase Rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway, *Cell* **70**, 715-728
- [78] Gorvel, J.P., Chavrier, P., Zerial, M., Gruenberg, J., (1991), RAB5 controls early endosome fusion in vitro, *Cell* **64**, 915-925
- [79] Feng, Y., Press, B., Wandinger-Ness, A., (1995), Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic, *J. Cell Biol.* **131**, 1435-1452
- [80] Mukhopadhyay, A., Funato, K., Stahl, P.D., (1997), Rab7 regulates transport from early to late endocytic compartments in *Xenopus* oocytes, *J. Biol. Chem.* **272**, 13055-13059
- [81] Vitelli, R., Santillo, M., Lattero, D., Chiariello, M., Bifulco, M., Bruni, C.B., Bucci, C., (1997), Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway, *J. Biol. Chem.* **272**, 4391-4397
- [82] Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M.A., Goda, Y., Zerial, M., Pfeffer, S.R., (1993), Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans-Golgi network, *EMBO J.* **12**, 677-682
- [83] Riederer, M.A., Soldati, T., Shapiro, A.D., Lin, J., Pfeffer, S.R., (1994), Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network, *J. Cell Biol.* **125**, 573-582
- [84] Chen, W., Feng, Y., Chen, D., Wandinger-Ness, A., (1998), Rab11 is required for trans-Golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDI dissociation inhibitor, *Mol. Bio. Cell* **9**, 3241-3257

- [85] Duman, J.G., Tyagarajan, K., Kolsi, M.S., Moore, H.P., Forte, J.G., (1999), Expression of rab11a N124I in gastric parietal cells inhibits stimulatory recruitment of the H⁺-K⁺-ATPase, *Am. J. Physiol.* **277**, C361-372
- [86] Goldenring, J.R., Smith, J., Vaughan, H.D., Cameron, P., Hawkins, W., Navarre, J., (1996), Rab11 is an apically located small GTP-binding protein in epithelial tissues, *Am. J. Physiol.* **270**, G515-525
- [87] Ren, M., Xu, G., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Adesnik, M., Sabatini, D.D., (1998), Hydrolysis of GTP on Rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6187-6192
- [88] Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M., Parton, R.G., (1996), Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome, *J. Cell Biol.* **135**, 913-924
- [89] Urbe, S., Huber, L.A., Zerial, M., Tooze, S.A., Parton, R.G., (1993), Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells, *FEBS Lett.* **334**, 175-182
- [90] Zuk, P.A., Elferink, L.A., (1999), Rab15 mediates an early endocytic event in Chinese hamster ovary cells, *J. Biol. Chem.* **274**, 22303-22312
- [91] Hunziker, W., Peters, P.J., (1998), Rab17 localizes to recycling endosomes and regulates receptor-mediated transcytosis in epithelial cells, *J. Biol. Chem.* **273**, 15734-15741
- [92] Zacchi, P., Stenmark, H., Parton, R.G., Orioli, D., Lim, F., Giner, A., Mellman, I., Zerial, M., Murphy, C., (1998), Rab17 regulates membrane trafficking through apical recycling endosomes in polarized epithelial cells, *J. Cell Biol.* **140**, 1039-1053
- [93] Cheng, K.W., Lahad, J.P., Kuo, W.L., Lapuk, A., Yamada, K., Auersperg, N., Liu, J., Smith-McCune, K., Lu, K.H., Fishman, D., Gray, J.W., Mills, G.B., (2004), The Rab25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers, *Nat. Med.* **10**, 1251-1256

- [94] Wang, X., Kumar, R., Navarre, J., Casanova, J.E., Goldenring, J.R., (2000), Regulation of vesicle trafficking in madin-darby canine kidney cells by Rab11a and Rab25, *J. Biol. Chem.* **275**, 29138-29146
- [95] Casanova, J.E., Wang, X., Kumar, R., Bhartur, S.G., Navarre, J., Woodrum, J.E., Altschuler, Y., Ray, G.S., Goldenring, J.R., (1999), Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells, *Mol. Biol. Cell.* **10**, 47-61
- [96] Brown, M.S., Goldstein, J.L., (1993), Protein prenylation. Mad bet for Rab, *Nature* **366**, 14-15
- [97] Seabra, M.C., Brown, M.S., Slaughter, C.A., Sudhof, T.C., Goldstein, J.L., (1992), Purification of component A of Rab geranylgeranyl transferase: possible identity with the choroideremia gene product, *Cell* **70**, 1049-1057
- [98] Seabra, M.C., Goldstein, J.L., Sudhof, T.C., Brown, M.S., (1992), Rab geranylgeranyl transferase. A multisubunit enzyme that prenylates GTP-binding proteins terminating in Cys-X-Cys or Cys-Cys, *J. Biol. Chem.* **267**, 14497-14503
- [99] Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steelemortimer, O., Seabra, M.C., Zerial, M., (1994), Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes, *EMBO J.* **13**, 5262-5273
- [100] Takai, Y., Sasaki, T., Shirataki, H., Nakanishi, H., (1996), Rab3A small GTP-binding protein in Ca²⁺-dependent exocytosis, *Genes Cells* **1**, 615-632
- [101] Martinez, O., Goud, B., (1998), Rab proteins, *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 101-112
- [102] Yang, C., Slepnev, V.I., Goud, B., (1994), Rab proteins form in vivo complexes with two isoforms of the GDP-dissociation inhibitor protein (GDI), *J. Biol. Chem.* **269**, 31891-31899
- [103] Shisheva, A., Südhof, T.C., Czech, M.P., (1994), Cloning, characterization, and expression of a novel GDP dissociation inhibitor isoform from skeletal muscle, *Mol. Cell Biol.* **14**, 3459-3468
- [104] Nishimura, N., Nakamura, H., Takai, Y., Sano, K., (1994), Molecular cloning and characterization of two rab GDI species from rat brain: brain-specific and ubiquitous types, *J. Biol. Chem.* **269**, 14191-14198

- [105] Janoueix-Lerosey, I., Jollivet, F., Camonis, J., Marche, P.N., Goud, B., (1995), Two-hybrid system screen with the small GTP-binding protein Rab6. Identification of a novel mouse GDP dissociation inhibitor isoform and two other potential partners of Rab6, *J. Biol. Chem.* **270**, 14801-14808
- [106] Shisheva, A., Chinni, S.R., DeMarco, C., (1999), General role of GDP dissociation inhibitor 2 in membrane release of Rab proteins: Modulations of its functional interactions by in vitro and in vivo structural modifications, *Biochemistry* **38**, 11711-11721
- [107] Dirac-Svejstrup, A.B., Sumizawa, T., Pfeffer, S.R., (1997), Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI, *EMBO J.* **16**, 465-472
- [108] Sakisaka, T., Meerlo, T., Matteson, J., Plutner, H., Balch, W.E., (2002), Rab-alpha GDI activity is regulated by a hsp90 chaperone complex, *EMBO J.* **21**, 6125-6135
- [109] Wada, M., Nakanishi, H., Satoh, A., Hirano, H., Obaishi, H., Matura, Y., Takai, Y., (1997), Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins, *J. Biol. Chem.* **272**, 3875-3878
- [110] Fielden, M.R., Matthews, J.B., Fertuck, K.C., Halgren, R.G., Zacharewski, T.R., (2002), In silico approaches to mechanistic and predictive toxicology: an introduction to bioinformatics for toxicologists, *Crit. Rev. Toxicol.* **32**, 67-112
- [111] Benton, D., (1996), Bioinformatics – principles and potential of a new multidisciplinary tool, *Trends Biotechnol.* **14**, 261-272
- [112] Norris, D.A., Leesman, G.D., Sinko, P.J., Grass, G.M., (2000), Development of predictive pharmacokinetic simulation models for drug discovery, *J. Control Release* **65**, 55-62
- [113] Miller, G., Fuchs, R., Lai, E., (1997), IMAGE cDNA clones, UniGene clustering, and ACeDB: an integrated resource for expressed sequence information, *Genome Res.* **7**, 1027-1032
- [114] Hogenesch, J.B., Chan, W.K., Jackiw, V.H., Brown, R.C., Gu, Y.Z., Pray-Grant, M., Perdew, G.H., Bradfield, C.A., (1997), Characterization of a subset of the

- basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway, *J. Biol. Chem.* **272**, 8581-8593
- [115] Adams. M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., (1991), Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project, *Science* **252**, 1651-1656
- [116] Soares, M.B., (1997), Identification and cloning of differentially expressed genes, *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 542-546
- [117] Boguski, M.S., Lowe, T.M., Tolstoshev, C.M., (1993), dbEST – database for “expressed sequence tags”, *Nat. Genet.* **4**, 332-333
- [118] Urmenyi, T.P., Bonaldo, M.F., Soares, M.B., Rondinelli, E., (1999), Construction of a normalized cDNA library for the Trypanosoma cruzi genome project, *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**, 542-544
- [119] Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., Siebert, P.D., (1996), Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6025-6030
- [120] Bonaldo, M.F., Lennon, G., Soares, M.B., (1996), Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery, *Genome Res.* **6**, 791-806
- [121] Blackwood, E.M., Kadonaga, J.T., (1998), Going the distance: a current view of enhancer action, *Science* **281**, 61-63
- [122] Blackwell, T.K., Weintraub, H., (1990), Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection, *Science* **250**, 1104-1110
- [123] Geraghty, M.T., Bassett, D., Morrell, J.C., Gatto, G.J., Bai, J., geisbrecht, B.V., Hieter, P., Gould, S.J., (1999), Detecting patterns of protein distribution and gene expression in silico, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2937-2942
- [124] Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., Shaw, N., Lane, C.R., Lim, E.P., Kalayanaraman, N., Nemesh, J., Ziaugra, L., Friedland, L., Rolfe, A., Warrington, J., Lipshutz, R., Daley, G.Q., Lander, E.S., (1999),

- Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes, *Nat. Genet.* **22**, 231-238
- [125] Nebert, D.W., (1999), Pharmacogenetics and pharmacogenomics: why is this relevant to the clinical geneticist? *Clin. Genet.* **56**, 247-258
- [126] Zubritsky, E., (1999), SNP mining. The rush is on, *Anal. Chem.* **71**, 683A-686A
- [127] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., (1989), *Molecular Biology of the cell*, Garland Publ, New York
- [128] Loftus, S.K., Chen, Y., Gooden, G., Ryan, J.F., Birznieks, G., Hilliard, M., Baxevanis, A.D., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J., Pavan, W., (1999), Informatic selection of a neural crest-melanocyte cDNA set for microarray analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9277-9280
- [129] Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O., (1995), Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science* **270**, 467-470
- [130] Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., (1995), Serial analysis of gene expression, *Science* **270**, 484-487
- [131] Grotzer, M.A., Patti, R., Geoerger, B., Eggert, A., Chou, T.T., Phillip, P.C., (2000), Biological stability of RNA isolated from RNAlater-treated brain tumor and neuroblastoma xenografts, *Med. Pediatr. Oncol.* **34**, 438-442
- [132] Seemann, S., (2003), Genexpressionsanalyse: Verfahren & Datenbankanforderungen, <http://www.bioinf.uni-leipzig.de/~seemann/html/genexpression.htm>
- [133] Liang, P., Pardee, A.B., (1992), Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, *Science* **257**, 967-971
- [134] Matz, M.V., Lukyanov, S.A., (1998), Different strategies of differential display: areas of application, *Nucleic Acids Res.* **26**, 5537-5543
- [135] GATC 1500-System, Direct Blotting Elektrophoresis, Fa. GATC, Konstanz
- [136] Horwitz, J.P., Chua, J., Noel, M., Donatti, J.T., Freisler, J., (1966), Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. II. Some dihalo-3-indolyl phosphates and sulfates, *J. Med. Chem.* **9**, 447
- [137] Fa. Boehringer Mannheim: NBT/BCIP-Ready-to-use-Tabletten, Best. Nr. 1697471, Packungsbeilage

-
- [138] Lottspeich, F., Zorbas, H., (1998), Lehrbuch der Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 867-876
- [139] Sun, Y., Hegamyer, G., Colburn, N.H., (1994), Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells: one is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinases-3, *Cancer Res.* **54**, 1139-1144
- [140] Shao, S., (2002), Strategien zur Prozesskontrolle der Differential Display Analyse, Diplomarbeit an der Universität Hamburg
- [141] Marotzki S., (2002), pers. Komm., Institut für Toxikologie, UKE, Universität Hamburg
- [142] Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., (1989), Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- [143] Agilent Technologies, (2002), Pers. Komm.
- [144] Chomczynski, P., Sacchi, N., (1987), Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* **162**, 156-159
- [145] Sambrook, J., Russell, R., (2001), Molecular Cloning, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [146] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., (1995), Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- [147] Wan, J.S., Sharp, S.J., Poirier, G.M., Wagaman, P.C., Chambers, J., Pyati, J., Hom, Y.L., Galindo, J.E., Huvar, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Erlander, M.G., (1996), Cloning differentially expressed mRNAs, *Nat. Biotechnol.* **14**, 1685-1691
- [148] Liang, P., Averboukh, L., Pardee, A.B., (1993), Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization, *Nucleic Acids Res.* **21**, 3269-3275
- [149] Breslauer, K.J., Frank, R., Blöcker, H., Marky, L.A., (1986), Predicting DNA duplex stability from the base sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3746-3750

- [150] Suggs, S.V., Hirose, T., Miyake, E.H., Kawashima, M.J., Johnson, K.I., Wallace, R.B., (1981), In D.D. Brown (ed.), ICN-UCLA Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes, Acad. Press Inc., New York, Vol. 23, 683-693
- [151] Freier, S.M., Kierzek, R., Jaeger, J.A., Sugimoto, N., Caruthers, M.H., Neilson, T., Turner, D.H., (1986), Improved free-energy parameters for prediction of RNA duplex stability, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9373-9377
- [152] Rychlik, W., Rhoads, R.E., (1989), A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridisation, Sequencing and in vitro amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.* **17**, 8543-8551
- [153] Marotzki, S., (1997), Molekularbiologische und zellbiologische Mechanismen der Tumorpromotion durch Polychlorierte aromatische Kohlenwasserstoffe am Beispiel von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin, Dissertation an der Universität Hamburg
- [154] Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., (1993), Kinetic PCR Analysis: Real time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology* **11**, 1026-1030
- [155] Liang, P., Pardee, A.B., (1995), Recent advances in differential display, *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 274-280
- [156] Liang, P., Pardee, A.B., (1994), Method of Differential Display, *Methods in Mol. Genetics* **5**, 3-16
- [157] Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., Bunn, H.F., (1990), Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2725-2729
- [158] Watzka, M., Waha, A., Koch, A., Schmutzler, R.K., Bidlingmaier, F., von Deimling, A., Klingmuller, D., Stoffel-Wagner, B., (1997), An optimized protocol for mRNA quantification using nested competitive RT-PCR, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 813-817
- [159] Vitelli, R., Chiariello, M., Bruni, C.B., Bucci, C., (1995), Cloning and expression analysis of the murine Rab7 cDNA, *Biochim. Biophys. Acta* **1264**, 268-270

- [160] Vitelli, R., Chiariello, M., Lattero, D., Bruni, C.B., Bucci, C., (1996), Molecular cloning and expression analysis of the human Rab7 GTPase complementary deoxyribonucleic acid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 887–890
- [161] Bucci, C., Frunzio, R., Chiariotti, L., Brown, A.L., Rechler, M.M., Bruni, C.B., (1988), A new member of the ras gene superfamily identified in a rat liver cell line, *Nucleic Acids Res.* **16**, 9979–9993
- [162] Fabry, S., Jacobsen, A., Huber, H., Palme, K., Schmitt, R., (1993), Structure, expression, and phylogenetic relationships of a family of ypt genes encoding small G-proteins in the green alga *Volvox carteri*, *Curr. Genet.* **24**, 229–240
- [163] Rupper, A., Grove, B., Cardelli, J., (2001), Rab7 regulates phagosome maturation in *Dictyostelium*, *J. Cell Sci.* **114**, 2449–2460
- [164] Wilkowsky, S.E., Barbieri, M.A., Stahl, P.D., Isola, E.L., (2002), Regulation of *Trypanosoma cruzi* invasion of nonphagocytic cells by the endocytically active GTPases dynamin, Rab5, and Rab7, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 516–521
- [165] Zhao, H., Laitala-Leinonen, T., Parikka, V., Vaananen, H.K., (2001), Downregulation of small GTPase Rab7 impairs osteoclast polarization and bone resorption, *J. Biol. Chem.* **276**, 39295–39302
- [166] Meresse, S., Steele-Mortimer, O., Finlay, B.B., Gorvel, J.P., (1999), The rab7 GTPase controls the maturation of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in HeLa cells, *EMBO J.* **18**, 4394-4403
- [167] Hubbard, A.L., (1989), Endocytosis, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1**, 675-683
- [168] Gruenberg, J., Howell, K.E., (1989), Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays, *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 453-481
- [169] Trowbridge, I.S., Collawn, J.F., Hopkins, C.R., (1993), Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway, *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 129-161
- [170] Hopkins, C.R., Gibson, A., Shipman, M., Strickland, D.K., Trowbridge, I.S., (1994), In migrating fibroblasts, recycling receptors are concentrated in narrow tubules in the pericentriolar area and then routed to the plasma membrane of the leading lamelle, *J. Cell Biol.* **125**, 1265-1274

- [171] Kleinig, H., Sitte, P., (1986), Zellbiologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- [172] Stenmark, H., Parton, R.G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J., Zerial, M., (1994), Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis, *EMBO J.* **13**, 1287-1296
- [173] van der Sluijs, P., Hull, M., Zahraoui, A., Tavitian, A., Goud, B., Mellman, I., (1991), The small GTP-binding protein rab4 is associated with early endosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6313-6317
- [174] van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B., Mellman, I., (1992), The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway, *Cell* **70**, 729-740
- [175] Press, B., Feng, Y., Hoflack, B., Wandinger-Ness, A., (1998), Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment, *J. Cell Biol.* **140**, 1075-1089
- [176] Meresse, S., Gorvel, J.P., Chavrier, P., (1995), The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes, *J. Cell Sci.* **108**, 3349-3358
- [177] Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., van Deurs, B., (2000), Rab 7, a key to lysosome biogenesis, *Mol. Biol. Cell* **11**, 467-480
- [178] Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G., Griffiths, G., (1994), Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus, *J. Cell Biol.* **124**, 677-688
- [179] Duclos, S., Desjardins, M., (2000), Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens, *Cell Microbiol.* **2**, 365-377
- [180] Haas, A., (1998), Reprogramming the phagocytic pathway-intracellular pathogens and their vacuoles, *Mol. Membr. Biol.* **15**, 103-121
- [181] Levine, B., Yuan, J., (2005), Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* **115**, 2679-2688
- [182] Schweichel, J.U., Merker, H.J., (1973), The morphology of various types of cell death in prenatal tissues, *Teratology* **7**, 253-266

- [183] Gutierrez, M.G., Munafo, D.B., Beron, W., Colombo, M.I., (2004), Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells, *J. Cell Sci.* **117**, 2687-2697
- [184] Jager, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., Eskelinen, E.L., (2004), Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles, *J. Cell Sci.* **117**, 4837-4848
- [185] Conlon, I., Raff, M., (1999), Size control in animal development, *Cell* **96**, 235-244
- [186] Raff, M.C., (1992), Social controls on cell survival and death, *Nature* **356**, 397-400
- [187] Edinger, A.L., Cinalli, R.M., Thompson, C.B., (2003), Rab7 prevents growth factor-independent survival by inhibiting cell-autonomous nutrient transporter expression, *Dev. Cell* **5**, 571-582
- [188] Edinger, A.L., Thompson, C.B., (2002), Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake, *Mol. Biol. Cell* **13**, 2276-2288
- [189] Kan, O., Baldwin, S.A., Whetton, A.D., (1994), Apoptosis is regulated by the rate of glucose transport in an interleukin 3 dependent cell line, *J. Exp. Med.* **180**, 917-923
- [190] Vander Heiden, M.G., Plas, D.R., Rathmell, J.C., Fox, C.J., Harris, M.H., Thompson, C.B., (2001), Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism, *Mol. Cell Biol.* **21**, 5899-5912
- [191] Whetton, A.D., Bazill, G.W., Dexter, T.M., (1984), Haemopoietic cell growth factor mediates cell survival via its action on glucose transport, *EMBO J.* **3**, 409-413
- [192] Sherr, C.J., (2001), The INK4a/ARF network in tumour suppression, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 731-737
- [193] Vousden, K.H., Lu, X., (2002), Live or let die: the cell's response to p53, *Nat. Rev. Cancer* **2**, 594-604
- [194] Degenhardt, K., Chen, G., Lindsten, T., White, E., (2002), BAX and BAK mediate p53-independent suppression of tumorigenesis, *Cancer Cell* **2**, 193-203

- [195] Li, Y., Feng, H., Chen, Y., (1999), RAB5A, a gene possibly related to metastasis of human carcinoma of the lung and stomach, *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **21**, 178-181
- [196] Li, Y., Meng, X., Feng, H., Zhang, G., Liu, C., Li, P., (1999), Over-expression of the RAB5 gene in human lung adenocarcinoma cells with high metastatic potential, *Chin. Med. Sci. J.* **14**, 96-101
- [197] Floyd, S., De Camilli, P., (1998), Endocytosis proteins and cancer: a potential link? *Trends Cell Biol.* **8**, 299-301
- [198] Wolfle, D., Schmutte, C., Westendorf, J., Marquardt, H., (1990), Hydroxyanthraquinones as tumor promoters: enhancement of malignant transformation of C3H mouse fibroblasts and growth stimulation of primary rat hepatocytes, *Cancer Res.* **50**, 6540-6544
- [199] Wolfle, D., Marquardt, H., (1996), Antioxidants inhibit the enhancement of malignant cell transformation induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *Carcinogenesis* **17**, 1273-1278
- [200] Wolfle, D., (2003), Enhancement of carcinogen-induced malignant cell transformation by prostaglandin F(2 alpha), *Toxicology* **188**, 139-147
- [201] Ogier-Denis, E., Codogno, P., (2003), Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer, *Biochim. Biophys. Acta* **1603**, 113-128
- [202] Gozuacik, D., Kimchi, A., (2004), Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism, *Oncogene* **23**, 2891-2906
- [203] Clarke, P.G., (1990), Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms, *Anat. Embryol. (Berl)* **181**, 195-213
- [204] Lockshin, R.A., Zakeri, Z., (2004), Apoptosis, autophagy, and more, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2405-2419
- [205] Lee, C.Y., Baehrecke, E.H., (2001), Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development, *Development* **128**, 1443-1455
- [206] Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., Tsujimoto, Y., (2004), Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes, *Nat. Cell Biol.* **6**, 1221-1228

- [207] Bursch, W., Ellinger, A., Kienzl, H., Torok, L., Pandey, S., Sikorska, M., Walker, R., Hermann, R.S., (1996), Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy, *Carcinogenesis* **17**, 1595–1607
- [208] Xue, L., Fletcher, G.C., Tolkovsky, A.M., (1999), Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution, *Mol. Cell. Neurosci.* **14**, 180–198
- [209] Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., Thompson, C.B., (2005), Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis, *Cell* **120**, 237–248
- [210] Lum, J.J., DeBarardinis, R.J., Thompson, C.B., (2005), Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 439–448
- [211] Tsukada, M., Ohsumi, Y., (1993), Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.* **333**, 169–174
- [212] Otto, G.P., Wu, M.Y., Kazgan, N., Anderson, O.R., Kessin, R.H., (2003), Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*, *J. Biol. Chem.* **278**, 17636–17645
- [213] Otto, G.P., Wu, M.Y., Kazgan, N., Anderson, O.R., Kessin, R.H., (2004), *Dictyostelium* macroautophagy mutants vary in the severity of their developmental defects, *J. Biol. Chem.* **279**, 15621–15629
- [214] Doelling, J.H., Walker, J.M., Friedman, E.M., Thompson, A.R., Vierstra, R.D., (2002), The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.* **277**, 33105–33114
- [215] Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Ohsumi, Y., (2002), Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene, *Plant Physiol.* **129**, 1181–1193
- [216] Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Talloczy, Z., Levine, B., Dinesh-Kumar, S.P., (2005), Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response, *Cell* **121**, 567–577

- [217] Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., Mizushima, N., (2004), The role of autophagy during the early neonatal starvation period, *Nature* **432**, 1032–1036
- [218] Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., Levine, B., (1999), Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1, *Nature* **402**, 672–676
- [219] Aita, V.M., Liang, X.H., Murty, V.V., Pincus, D.L., Yu, W., Cayanis, E., Kalachikov, S., Gilliam, T.C., Levine, B., (1999), Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21, *Genomics* **59**, 59–65
- [220] Cuervo, A.M., (2004), Autophagy: in sickness and in health, *Trends Cell Biol.* **14**, 70–77
- [221] Ogier-Denis, E., Hourii, J.J., Bauvy, C., Codogno, P., (1996), Guanine nucleotide exchange on heterotrimeric G13 protein controls autophagic sequestration in HT-29 cells, *J. Biol. Chem.* **271**, 28593–28600
- [222] Liang, X.H., Yu, J., Brown, K., Levine, B., (2001), Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function, *Cancer Res.* **61**, 3443–3449
- [223] Proikas-Cezanne, T., Waddell, S., Gaugel, A., Frickey, T., Lupas, A., Nordheim, A., (2004), WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy, *Oncogene* **23**, 9314–9325
- [224] Susan, P.P., Dunn, W.A., (2001), Starvation-induced lysosomal degradation of aldolase B requires glutamine 111 in a signal sequence for chaperone-mediated transport, *J. Cell. Physiol.* **187**, 48–58
- [225] Ito, H., Daido, S., Kanzawa, T., Kondo, S., Kondo, Y., (2005), Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells, *Int. J. Oncol.* **26**, 1401–1410
- [226] Edinger, A.L., Thompson, C.B., (2004), Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy, *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 663–669

- [227] Furuta, S., Hidaka, E., Ogata, A., Yokota, S., Kamata, T., (2004), RAS is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase, *Oncogene* **23**, 3898–3904
- [228] Resau, J.H., Cottrell, J.R., Hudson, E.A., Trump, B.F., Jones, R.T., (1985), Studies on the mechanisms of altered exocrine acinar cell differentiation and ductal metaplasia following nitrosamine exposure using hamster pancreatic explant organ culture, *Carcinogenesis* **6**, 29-35
- [229] Kashuba, V.I., Gizatullin, R.Z., Protopopov, A.I., Allikmets, R., Korolev, S., Li, J., Boldog, F., Tory, K., Zabarovska, V., Marcsek, Z., Sumegi, J., Klein, G., Zabarovsky, E.R., Kisselev, L., (1997), NotI linking/jumping clones of human chromosome 3: mapping of the TFRC, RAB7 and HAUSP genes to regions rearranged in leukemia and deleted in solid tumors, *FEBS Lett.* **419**, 181-185
- [230] Mitelman, F., Mertens, F., Johansson, B., (1997), A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia, *Nat. Genet.* **15**, 417-474
- [231] Wieser, R., Schreiner, U., Pirc-Danoewinata, H., Aytakin, M., Schmidt, H.H., Rieder, H., Fonatsch, C., (2001), Interphase fluorescence in situ hybridization assay for the detection of 3q21 rearrangements in myeloid malignancies, *Genes Chromosomes Cancer* **32**, 373-380
- [232] Bodmer, D., Janssen, I., Jonkers, Y., van den Berg, E., Dijkhuizen, T., Debiec-Rychter, M., Schoenmakers, E., van Kessel, A.G., (2002), Molecular cytogenetic analysis of clustered sporadic and familial renal cell carcinoma-associated 3q13 approximately q22 breakpoints, *Cancer Genet. Cytogenet.* **136**, 95-100
- [233] Edstrom, E., Mahlamaki, E., Nord, B., Kjellman, M., Karhu, R., Hoog, A., Goncharov, N., Teh, B.T., Backdahl, M., Larsson, C., (2000), Comparative genomic hybridization reveals frequent losses of chromosomes 1p and 3q in pheochromocytomas and abdominal paragangliomas, suggesting a common genetic etiology, *Am. J. Pathol.* **156**, 651-659

Danksagung

Zuerst möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater, dem Direktor des Instituts für Experimentelle und Klinische Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Herrn Prof. Dr. med. H. Marquardt bedanken, der mir die Gelegenheit gab, meine Doktorarbeit im Bereich der Toxikologie und Molekularbiologie anzufertigen und mich auch bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit vielseitig unterstützt hat.

Herrn Dr. Stefan Marotzki danke ich für die interessante Themenstellung und seine freundliche Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Schaefer, für die hilfreichen, konstruktiven Vorschläge und die Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Susanne Amon und Frau Bärbel Launer von der Abteilung Internationales der Universität Hamburg danke ich sehr herzlich für die finanzielle Unterstützung während der Endphase dieser Arbeit.

Frau Angelika Piaseck danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Für das Korrekturlesen möchte ich mich bei Sascha Lange, Thorsten Lembrecht, Regina Heinz, Antje Balschun, Dr. Sabine Fleischer und Dr. Dietmar Bächner bedanken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundliche Atmosphäre, Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meiner Mutter und meiner Schwester für ihre seelische Unterstützung und für ihr Verständnis während der Arbeit bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Shao
Vorname: Shi
Geburtsdatum: 26.11.1969
Geburtsort: Beijing (P.R.China)
Staatsangehörigkeit: chinesisch
Familienstand: ledig

Schulbildung

02/77 - 01/82 Grundschule Kuijiachang, Beijing
01/82 - 07/82 Grundschule Xianger, Beijing
09/82 - 07/88 Gymnasium Nr.22 Beijing
07/88 Abitur

Studium

09/88 - 07/92 Studium Chemie-Ingenieurwesen an der Vereinigten Universität
Beijing, Hochschule für chemische Technik
07/92 Diplom-Ingenieur
10/94 - 10/96 Deutschkurs an der Universität Kiel
12/96 - 10/02 Studium der Chemie an der Universität Hamburg
04/98 Anerkennungsprüfung zum Vordiplom
11/02 Diplom-Chemiker
Seit 11/02 Promotionsstudium am Institut für Experimentelle
und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, UKE
(Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf),
Thema: „Identifizierung eines N-Methyl-N'-nitro-N-
Nitrosoguanidin spezifischen mRNA-Expressionsmusters in C3H-
M2 Mausfibroblasten-Transformationssystem“

Berufserfahrung

08/92 - 07/94 Tätigkeit in der Prozessregelung und instrumentellen Analytik in
der Firma Beijing Huaer Co., Ltd

Sprachkenntnisse

Chinesisch (Muttersprache)
Deutsch
Englisch

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hamburg, Mai 2006

Shao Shi