

Aus dem Institut für
Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. T. Eschenhagen

**Effekte des 2988G>A Polymorphismus im *CYP2D6*-Gen
auf das Splicing in einem Minigen-Konstrukt**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von
Silke Juliane Diepenbruck
aus Hamburg
Hamburg 2006

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 09.01.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Th. Eschenhagen

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. C. Wagener

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. A. Gal

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Hepatische Cytochrom P450 Monooxygenasen	1
1.2	CYP2D6-Genpolymorphismus und Phänotyp	1
1.3	CYP2D6*41-Allel	5
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	7
2	Material und Methoden	8
2.1	Material	8
2.1.1	COS7-Zellen.....	8
2.1.2	Top 10 F'-Zellen	8
2.1.3	Vektoren.....	8
2.1.4	DNA und RNA	11
2.2	Methoden	11
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	11
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	13
2.2.3	Zellbiologische Methoden	25
2.3	Substanzen, Reagentien, Hilfsmittel und Geräte	27
2.3.1	Substanzen	27
2.3.2	Primer.....	28
2.3.3	Restriktionsenzyme	29
2.3.4	Lösungen.....	30
2.3.5	Hilfsmittel und Geräte	30
3	Ergebnisse.....	32
3.1	In-Silico-Analyse der Splice-Site und Versuchs-Strategie	32
3.2	Klonierung der genomischen DNA-Abschnitte	36
3.3	Mutagenese um PCR-Fehler zu korrigieren.....	38
3.4	Unklonierung in den pSL3-Exontrapping-Vektor	39
3.5	Transfektion von COS7-Zellen und Analyse der Spliceprodukte.....	46
4	Diskussion	57
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis.....	72
7	Abkürzungsverzeichnis	75
8	Danksagung	77
9	Lebenslauf	78
10	Eidesstattliche Versicherung.....	79

1 Einleitung

1.1 Hepatische Cytochrom P450 Monooxygenasen

Für die hepatische Biotransformation von Pharmaka und Xenobiotika kommt den Phase-I-Reaktionen eine zentrale Bedeutung zu. Hierbei handelt es sich um Funktionalisierungsreaktionen, bei denen durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionelle Gruppen freigelegt bzw. in die unpolare Ausgangssubstanz eingefügt werden. Die größte Bedeutung für die oxidative Biotransformation von Arzneistoffen besitzen die Hämproteine vom Typ des Cytochrom P-450. Das Enzymsystem der Cytochrom P-450-Monooxygenasen besteht aus einer Vielzahl von Isoenzymen (CYP). Beim Menschen werden die Isoenzyme anhand ihrer Aminosäuresequenz in 18 verschiedene Genfamilien (gekennzeichnet durch die erste Ziffer, z.B. CYP1 oder CYP2) und 43 Subfamilien (gekennzeichnet durch den Buchstaben nach der Ziffer, z.B. CYP2A oder CYP2D) unterteilt (Nelson 2003; Nelson et al. 2004). In der menschlichen Leber wird die Subfamilie CYP3A am stärksten exprimiert und eliminiert etwa 50% der Arzneistoffe. Weitere für den Arzneistoffmetabolismus wichtige Subfamilien sind CYP1A2, CYP2C und CYP2D6 (Ring, Wrighton 2000). Mehr als 65 Arzneimittel werden von der Subfamilie CYP2D6 metabolisiert (Wilkinson 2001). Zu diesen Pharmaka gehören z.B. Betablocker, Antidepressiva, Neuroleptika, Opioide und einige Antiarrhythmika. Da es sich bei diesen Arzneistoffen um häufig verordnete Pharmaka handelt, kommt CYP2D6 eine wesentliche Rolle in der Biotransformation von Arzneimitteln zu. Zwei der von CYP2D6 metabolisierten Arzneistoffe sind das Antihypertensivum Debrisoquin und das Antiarrhythmikum Spartein. Schon vor fast 30 Jahren stellten Ärzte fest, dass bei einigen Menschen unerwartet starke unerwünschte Nebenwirkungen (UAW) unter der Therapie mit Debrisoquin bzw. Spartein auftraten (Mahgoub et al. 1977; Eichelbaum et al. 1979). Die Tatsache, dass einige Menschen unter Anwendung der Standarddosierung dieser Medikamente stärkere UAW entwickelten als andere, war zunächst nicht erklärbar. Erst im Laufe der kommenden Jahre stellte sich heraus, dass diese unterschiedlich starken Nebenwirkungen auf den ausgeprägten Genpolymorphismus von CYP2D6 zurückzuführen sind.

1.2 CYP2D6-Genpolymorphismus und Phänotyp

Das kodierende Gen von CYP2D6 liegt auf dem langen Arm von Chromosom 22 (22q13.1) *downstream* von zwei Pseudogenen, die als CYP2D7 und CYP2D8 bezeichnet werden. Diese sind zu CYP2D6 hoch homolog (Gonzalez et al. 1988; Kimura et al. 1989; Gough et al. 1993). Das funktionelle Gen des CYP2D6 besteht aus

9 Exons und 8 Introns, die zusammen 4378 Basenpaare (bp) umspannen (Kimura et al. 1989).

Es sind bislang über 50 verschiedene CYP2D6-Allele beschrieben worden (Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee 2006). Wenn man alle Untergruppen des Allels berücksichtigt, kommt man auf eine Zahl von über 90 verschiedenen Allelen. Bei vielen dieser Allele zeigt sich eine Kombination aus verschiedenen Polymorphismen. Diese können mit einer Änderung der enzymatischen Aktivität von CYP2D6 verbunden sein. Meist lässt sich feststellen, welche der genetischen Veränderungen sich am stärksten auf die Aktivität von CYP2D6 auswirkt und somit diagnostisch für ein bestimmtes Allel ist. Die Enzymaktivität wird mit dem Phänotyp beschrieben. Der CYP2D6-Phänotyp eines Individuums lässt sich nach der Einnahme eines Testsubstrates (z.B. Debrisoquin oder Spartein) mit Hilfe des metabolischen Quotienten (MR) bestimmen. Der metabolische Quotient beschreibt das Verhältnis der Plasmakonzentrationen von Muttersubstanz zu Metabolit.

Allele, die zu keiner messbaren Enzymaktivität von CYP2D6 führen, bezeichnet man als Null-Allele. Zur Zeit sind etwa 15 verschiedene Null-Allele beschrieben. Sie sind bedingt durch veränderte *splicing-Stellen* (z.B. CYP2D6*4, *11), *frameshift-Mutationen* (z.B. CYP2D6*3, *6, *13, *15), Deletion des kompletten Gens (CYP2D6*5), vorzeitige Stopcodons (CYP2D6*8) oder *missense-Mutationen* (CYP2D6*7). Wenn alle vererbten Allele eines Individuums Null-Allele sind, so resultiert daraus der Phänotyp des *poor metabolizers* (PM). Ein PM ist entweder homozygot bezüglich des betroffenen Null-Allels oder besitzt zwei verschiedene Null-Allele. Beides führt zu einem vollständigen Fehlen der metabolischen Funktion von CYP2D6 und behindert somit den oxidativen Abbau von CYP2D6-abhängig metabolisierten Arzneistoffen erheblich. Bei Kaukasiern kommt der PM-Phänotyp mit einer Häufigkeit von 7% vor.

Im Gegensatz zu den Null-Allelen, die zu einer fehlenden Enzymaktivität führen, gibt es auch Allele, die mit einer normalen metabolischen Aktivität von CYP2D6 verbunden sind. Zu diesen Allelen gehören das Wildtyp-Allel CYP2D6*1 und CYP2D6*2, welches eine Variante des Wildtyp-Allels mit zwei Veränderungen in der Aminosäuresequenz (R296C und S486T) ist. Wenn im Genom eines Individuums eines dieser Allele vorkommt und keine Duplikationen oder Amplifikationen der CYP2D6-Allele vorliegen, resultiert daraus in der Regel der Phänotyp des *extensive metabolizer* (EM). Dies ist unabhängig vom zweiten vererbten Allel. Der EM-Phänotyp kommt mit etwa 72% in der kaukasischen Bevölkerung am häufigsten vor (Griese et al. 1998).

Etwa 9% der kaukasischen Bevölkerung (Dahl et al. 1995; Griese et al. 1998) weisen eine über das normale Maß erhöhte metabolische Aktivität von CYP2D6 auf. Dies wird mit dem Phänotyp *ultrarapid metabolizer* (UM) beschrieben. In 10-30% der Fälle findet

sich die Ursache des UM-Phänotyps in vererblichen Duplikationen oder Amplifikationen eines funktionellen Allels (z.B. CYP2D6*1 oder *2). Das CYP2D6-Gen ist bislang das einzige Cyp-Gen, für das Duplikationen und Amplifikationen beschrieben worden sind. Ob neben diesen Veränderungen weitere genetische Faktoren eine sehr schnelle katalytische Aktivität des CYP2D6 bedingen können, ist unklar. Es werden Punktmutationen bzw. Kombinationen von bestimmten Punktmutationen (Haplotypen) diskutiert (Lovlie et al. 2001).

Neben den PM, EM und UM gibt es noch einen weiteren wichtigen CYP2D6-Phänotyp, der bei etwa 11% der kaukasischen Bevölkerung auftritt. Dabei handelt es sich um den Phänotyp des *intermediate metabolizer* (IM). Dieser beschreibt Individuen, bei denen die enzymatische Aktivität von CYP2D6 deutlich reduziert, jedoch vorhanden ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass IM zwar funktionelle Allele besitzen, diese aber mit einer stark reduzierten Aktivität von CYP2D6 assoziiert sind. Zu diesen Allelen gehören CYP2D6*9, *10 und *41. Lange Zeit wurden die IM als homogene Gruppe angesehen, in der die MR zwischen der von PM und EM liegt. Wenn aber der für die untersuchten Individuen ermittelte Genotyp in Bezug zum vorliegenden Phänotyp gesetzt wird, zeigt sich ein anderes Bild. Zwischen der Gruppe der EM mit zwei funktionellen Allelen und den PM mit zwei Null-Allelen, gibt es bezogen auf die enzymatische Aktivität von CYP2D6 zwei weitere Gruppen mit unterschiedlicher Enzymaktivität. Die erste Gruppe besteht aus Individuen, die heterozygot für voll funktionelle Allele (CYP2D6*1 und CYP2D6*2) sind. Diese Allele können sowohl mit Null-Allelen, als auch mit Allelen mit eingeschränkter Funktion (CYP2D6*9,*10 und *41) kombiniert sein. Die ermittelte CYP2D6-Aktivität ist der, die sich bei Individuen mit zwei funktionellen Allelen (EM) zeigt, sehr ähnlich. Die zweite Gruppe wird von Individuen gebildet, die homozygot bezüglich Allelen mit eingeschränkter Funktion sind oder bei denen eines dieser Allele mit einem Null-Allel kombiniert ist. Die gemessene enzymatische Aktivität ist vergleichbar mit der, die bei PM-Phänotypen vorliegt. Bezogen auf die Enzymaktivität ist es unerheblich, ob ein Individuum homozygot bezüglich eines mit IM assoziierten Allels ist oder ob ein IM-Allel gemeinsam mit einem Null-Allel auftritt (Rau et al. 2002).

Allelhäufigkeiten, die Sachse et al. 1997 in einer Population von 589 Kaukasern gefunden haben, sowie die unterschiedlichen Effekte auf die Aktivität von CYP2D6 *in vivo* sind in Tabelle 1 aufgeführt (Sachse et al. 1997). Tabelle 2 zeigt die Null-Allele und Mutationen, die sich am stärksten auf die Enzymaktivität auswirken.

Allel	Enzymaktivität in vivo	Frequenz
CYP2D6*1	Normal	36,4%
CYP2D6*1x2	Erhöht	0,51%
CYP2D6*2	Normal	32,4%
CYP2D6*2x2	Erhöht	1,34%
CYP2D6*3	Keine	2,04%
CYP2D6*4	Keine	20,7%
CYP2D6*4x2	Keine	0,08%
CYP2D6*5	Keine	1,95%
CYP2D6*6	Keine	0,93%
CYP2D6*7	Keine	0,08%
CYP2D6*8	Keine	0%
CYP2D6*9	Reduziert	1,78%
CYP2D6*10	Reduziert	1,53%
CYP2D6*11	Keine	0%
CYP2D6*12	Keine	0%
CYP2D6*13	Keine	0%
CYP2D6*14	Keine	0%
CYP2D6*15	Keine	0,08%
CYP2D6*16	Keine	0,08%

Tabelle 1: CYP2D6-Allele und deren Auswirkungen auf die Aktivität des CYP2D6-Enzyms (modifiziert nach der Homepage des Nomenklatur-Komitees 2002, Häufigkeiten nach (Sachse et al. 1997).

Null-Allel	Diagnostische Mutation	Veränderung der Proteinsequenz
CYP2D6*3	2549A>del	Verschiebung des Leserasters
CYP2D6*4	1846G>A	Verschiebung des Splicesignals
CYP2D6*5	Komplette Sequenz deletiert	Deletion des kompletten Gens
CYP2D6*6	1707T>del	Verschiebung des Leserasters
CYP2D6*7	2935A>C	H324P
CYP2D6*8	1758G>T	Vorzeitiges Stopcodon
CYP2D6*11	883G>C	Verschiebung des Splicesignals
CYP2D6*12	124G>A	G42R, R296C, S486T
CYP2D6*13	CYP2D7P/CYP2D6-Hybrid	Verschiebung des Leserasters
CYP2D6*14	1758G>A	P34S, G169R, R296C, S486T
CYP2D6*15	138insT	Verschiebung des Leserasters
CYP2D6*16	CYP2D7P/CYP2D6-Hybrid	Verschiebung des Leserasters

Tabelle 2: Auswahl von Null-Allelen mit den aktivitätsbestimmenden Mutationen und den Veränderungen der Proteinsequenz (modifiziert nach (Eichelbaum et al. 1997) und der Homepage des Nomenklatur-Komitees 2002).

Allen Phänotypen gemein ist, dass sich die unterschiedliche Aktivität von CYP2D6 auf die oxidative Elimination von Arzneistoffen auswirkt, die auf diesen metabolischen Abbauprozess angewiesen sind. Das bedeutet, dass bei PMs und IMs die Plasmakonzentrationen dieser Arzneistoffe höher sind als die Konzentrationen bei UMs und EMs. Diese Tatsache könnte sich auf die Sicherheit und die Effizienz der Arzneimitteltherapie auswirken. Es wird davon ausgegangen, dass PM und IM unter Standarddosierung ein höheres Risiko für das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen haben als EM. Bei UM besteht die Gefahr, dass eine Therapie mit Standarddosierung versagen könnte, wenn keine therapeutisch wirksamen Plasmakonzentrationen erreicht werden konnten (Eichelbaum et al. 1997). Deshalb ist es von großem Interesse, die unterschiedlichen Phänotypen mit Hilfe von Genotypisierungen sicher zu identifizieren und die genetischen Ursachen für die unterschiedlichen Enzymaktivitäten zu ermitteln.

1.3 CYP2D6*41-Allel

Das CYP2D6*41-Allel ist bei Kaukasiern, die einen IM-Phänotyp aufweisen, das am häufigsten vorkommende Allel. Die beiden anderen Allele, CYP2D6*9 und *10, welche auch mit dem IM-Phänotyp assoziiert werden, treten in der kaukasischen Bevölkerung selten auf und können deshalb nur bei 10-20% der IM nachgewiesen werden. Während z.B. bei PM durch den Nachweis von Null-Allelen mit einer Sicherheit von 99% vom Genotyp auf den Phänotyp geschlossen werden kann (Stuven et al. 1996; Griese et al. 1998; Sachse et al. 1998), war dies lange Zeit bei den IM-Phänotypen nicht möglich. Das lag einerseits daran, dass das am häufigsten vorkommende Allel *41 erst vor kurzem entdeckt wurde, andererseits aber auch daran, dass kein eindeutiger genetischer Marker für CYP2D6*41 bekannt war.

Die erste diagnostisch wichtige Mutation für *41 fand man, als der komplette kodierende Abschnitt und die Promotorregion des Allels untersucht wurden. CYP2D6*41 und *2 sind in der kodierenden Sequenz identisch und weisen zahlreiche weitere gemeinsame genetische Variationen im Vergleich zum *1-Allel auf. Sie unterscheiden sich aber im Promotorbereich durch einen Polymorphismus (-1584C>G). Bei der betroffenen Region handelt es sich um eine potentielle Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors κ B. Hier stimmt *41 mit der Nukleotidsequenz des Wildtyps (CYP2D6*1) -1584C überein, während *2 die mutierte Form -1584G aufweist. Es ist interessant, dass *2 trotz dieses Unterschiedes zum Wildtyp das Allel mit der höheren enzymatischen Aktivität ist. Ein praktisches Problem bei der genetischen Identifikation von *41 war, dass es nur indirekt diagnostiziert werden konnte. Zunächst musste das Vorliegen einer *2-Konfiguration in der kodierenden Region nachgewiesen werden, z.B. durch den Nachweis eines T-Allels an

der Position 2850. In einem zweiten Schritt musste dann das Fehlen der Mutation im Promotor (-1584C>G) aufgezeigt werden. Auch stellte sich heraus, dass trotz dieser Diagnostik bei einigen Individuen der ermittelte Genotyp nicht mit dem Phänotyp übereinstimmte.

2004 wurde die zweite diagnostisch wichtige Mutation des CYP2D6*41 Allels gefunden. Es wurde die Sequenz vom Promotor, der kodierenden Region und der Introns von CYP2D6 bei 308 Individuen untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass sich *41 und *2 nicht nur in dem schon bekannten Polymorphismus der Promotorregion unterscheiden, sondern auch durch eine weitere Mutation, die im Intron 6 (2988G>A) lokalisiert ist (Raimundo et al. 2004). An dieser Stelle weist *2 die Wildtypsequenz (2988G) und *41 einen Nukleotidaustausch (2988A) auf. Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis dieses Nukleotidpolymorphismus (SNP) in einem höheren Maß mit dem IM-Phänotyp korreliert, als der bereits bekannte Promotorpolymorphismus. 31 der 308 untersuchten Individuen zeigten einen IM-Phänotyp. Dies entspricht einer Häufigkeit von 10% und stimmt mit der Repräsentation von IM in der kaukasischen Bevölkerung überein. Der am häufigsten bestimmte Genotyp unter IMs war *41/*0 (n=17; 55%). Weitere Genotypen waren *9/*41 (n=1), *10/*0 (n=3), *9/*0 (n=2), *10/*10 (n=1) und sechs Sonderfälle, bei denen die genotypische Zuordnung nicht mit dem IM-Phänotyp übereinstimmte (*1/*1 (n=3), *1/*2 (n=1), *1/*4 (n=1), *1/*41 (n=1)). Zum Nachweis des *41-Allels wurden sowohl der Promotorpolymorphismus als auch der neu entdeckte Intronpolymorphismus herangezogen, um über einen direkten Vergleich die diagnostische Zuverlässigkeit zu prüfen. Durch den alleinigen Nachweis des Fehlens der Mutation in der Promotorregion konnten 56 der untersuchten 308 Individuen als heterozygote Träger des *41-Allels identifiziert werden. Bei fünf dieser 56 war der zweite für *41 charakteristische Polymorphismus, der SNP im Intron 6 (2988G>A), nicht vorhanden. Um eine Aussage darüber treffen zu können, welcher der beiden Polymorphismen die Enzymaktivität von CYP2D6 am sichersten vorhersagt, wurde der ermittelte Phänotyp dieser fünf Individuen herangezogen. Es zeigte sich, dass zwei Individuen EM waren, obwohl bei alleiniger Bestimmung des Promotorpolymorphismus ein Genotyp von *4/*41 ermittelt worden war. Dieser hätte, aufgrund der Kombination von *41 mit einem Null-Allel, sicher zu einem IM-Phänotyp führen müssen. Ein weiteres Individuum zeigte bei vorliegendem Promotorpolymorphismus aber fehlendem Intronpolymorphismus sogar einen UM-Phänotyp. Bei alleiniger Bestimmung des Promotorpolymorphismus war der Genotyp *4/*41x2 vermutet worden, welcher zum phänotypischen Bild eines IM hätte führen müssen.

Dies zeigte, dass der Nachweis des SNPs im Intron 6 eine höhere Sensitivität und Spezifität für die Identifikation eines *41-Allels und für die Vorhersage eines IM-Phänotyps bot als der bis zu diesem Zeitpunkt dafür eingesetzte Polymorphismus in der Promotorregion. Darüber hinaus kann der Promotorpolymorphismus auch mit dem Null-Allel *4 gekoppelt vorkommen, was die Diagnostik erschwert.

Zusammenfassend lässt sich Folgendes festhalten. Während CYP2D6*2 ein Allel mit normaler enzymatischer Funktion ist, ist das *41-Allel mit einer stark eingeschränkten metabolischen Funktion von CYP2D6 assoziiert. Auf molekularbiologischer Ebene sind CYP2D6*2 und CYP2D6*41 sowohl in ihrer kodierenden Region als auch in ihrer Aminosäuresequenz identisch. Sie unterscheiden sich nur durch zwei SNPs, von denen einer in der Promotorregion (-1584C>G) und einer im Intron 6 (2988G>A) lokalisiert ist. Raimundo et al. konnten 2004 zeigen, dass der Nachweis des Intronpolymorphismus sensitiver und spezifischer für das Vorliegen des *41-Allels und den IM-Phänotyps ist, als die bis zu diesem Zeitpunkt verwendete Mutation im Bereich des Promotors. Welche genauen funktionellen Auswirkungen der SNP im Intron 6 hat, ist bislang noch nicht geklärt.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Studie überprüfte, ob durch den Intronpolymorphismus im Intron 6 (2988G>A) des Gens von CYP2D6 das RNA-Splicing, welches als letzter Schritt im Rahmen der Transkription auftritt, verändert wird. Es wurde untersucht, ob durch den SNP andere, von den regulären Splicestelle abweichende, Splicedonor- oder Spliceakzeptorstellen entstehen und diese in der Splicereaktion verwendet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 COS7-Zellen

Bei den verwendeten COS7-Zellen handelt es sich um einen Zelltyp, der aus Nierengewebe der afrikanischen grünen Meerkatze stammt. Die Zellen wurden abgeleitet aus einer Affenzelllinie (CV-1) durch Transformation mit einer Mutante des SV-40-Virus. Die SV-40-Viren vermehren sich in den COS7-Zellen und unterstützen die Expression von Inserts in SV-40-getriebenen Vektoren. COS7-Zellen ähneln Fibroblasten, wachsen im Monolayer und erreichen eine Verdopplung der Zellzahl nach ca. 35-48 Stunden (bei 37 °C und 5% CO₂). Die Zellen zeigen einen hypodiploiden Karyotyp mit 25% polyploiden Zellen.

2.1.2 Top 10 F'-Zellen

Bei den Top 10 F'-Zellen handelt es sich um einen *E.coli*-Stamm, der aufgrund seines Genotyps ($\Phi 80/lacZ\Delta M15$) die Darstellung von erfolgreich transformierten Bakterienkolonien mit Hilfe des blue-white-screenings ermöglicht.

2.1.3 Vektoren

pCRII-Vektor

Der pCRII-Vektor hat eine Größe von 3971 Nukleotiden. In der multiple cloning site (MCS) befinden sich 16 Restriktionsschnittstellen. Dazu gehören z.B. Schnittstellen für EcoR I, Hind III, EcoR V, Not I, Xho I und Xba I.

Der Vektor weist sieben funktionell wichtige Regionen auf. Bei zwei dieser Regionen handelt es sich um Antibiotikaresistenzgene für Ampicillin und Kanamycin.

Zwei weitere Sequenzen kodieren für den *lac*-Promotor und das *lacZ α* -Fragment. Sie ermöglichen eine Selektion der mit dem Vektor transformierten Zellen durch das blue-white-screening. Innerhalb des *lacZ α* -Fragments liegt die MCS des Vektors, in die das zu vermehrende PCR-Produkt hineinkloniert wird. Das *lacZ α* -Fragment kodiert für das N-terminale α -Fragment der β -Galactosidase. Es kann nur dann exprimiert werden, wenn kein Insert in der MCS vorliegt. Nur wenn das α -Fragment gemeinsam mit dem C-terminalen ω -Fragment der β -Galactosidase exprimiert wird, besitzt es β -Galactosidase-Aktivität. Das ω -Fragment wird von den, zusammen mit dem Vektor verwendeten, Top10F'-Zellen gebildet. Die physiologische Funktion der β -Galactosidase liegt in der Spaltung von Galaktose in Laktose und Glukose. Das Enzym kann aber auch andere Substrate metabolisieren, wie z.B. den Farbstoff X-Gal

(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-[beta]-D-galactopyranoside). Wenn das α -Fragment und das ω -Fragment gemeinsam exprimiert werden, ergibt sich ein funktionsfähiges Enzym, welches X-Gal spaltet und die Bakterienkolonie dadurch blau färbt. Dies bedeutet, dass in der MCS kein Insert vorliegen kann, da sonst das α -Fragment der β -Galactosidase nicht gebildet werden könnte. Um ein blue-white-screening durchführen zu können, benötigt man neben dem *lac*-Promotor (zur Transkriptionsinitiation), dem *lacZ α* -Fragment und X-Gal auch IPTG (Isopropyl-[Beta]-D-Thiogalactopyranosid). IPTG induziert sowohl die *lacZ α* -Genexpression als auch die Aktivität der β -Galactosidase.

Das pUC origin ist verantwortlich für die Replikation, Aufrechterhaltung und hohe Zahl der Plasmidkopien in *E. coli*. Das f1 origin erlaubt die Mutagenese des sense-Stranges und die Sequenzierung eines Einzelstranges.

Die Primerbindungsstellen *M13 Forward* und *M13 Reverse* können für die Sequenzierung des Inserts genutzt werden.

pTracer-CMV2-Vektor

Der pTracer-CMV2-Vektor ist ein Expressionsvektor, der für die visuelle Erkennung transfizierter Säugetierzellen genutzt werden kann. Er hat eine Größe von 6210 Nukleotiden. Zu den zehn Restriktionsschnittstellen, die in der MCS liegen, gehören unter anderem *EcoR I*, *Kpn I*, *EcoR V*, *Not I* und *Xba I*. Der Vektor besitzt zehn funktionell wichtige Regionen, von denen acht in 5'-3'-Richtung auf dem *sense-Strang* und zwei auf dem *anti-sense-Strang* (in 3'-5'-Richtung) liegen.

Die folgenden Regionen sind in der Reihenfolge ihres Auftretens in 5'-3'-Richtung auf dem *sense-Strang* beschrieben.

Zwischen den Basen 209 bis 863 liegt der *Human cytomegalovirus (CMV) immediate-early promotor/enhancer* (PCMV). Dieser erlaubt eine hohe Expression des Plasmids. Noch innerhalb des PCMV befindet sich eine Primerbindungsstelle, *CMV Forward*, die für eine Sequenzierung des Inserts genutzt werden kann. An die *CMV Forward*-Bindungsstelle schließt sich die MCS des Vektors an. Auf die MCS folgt die zweite Primerbindungsstelle, *BGH Reverse*, die für die Sequenzierung des Inserts benötigt wird. Schon innerhalb der *BGH Reverse*-Sequenz beginnt ein Polyadenylierungssignal, welches vom *bovine growth hormone* (BGHPA) vermittelt wird. Dies sorgt für eine effiziente Transkriptionstermination und Polyadenylierung der mRNA.

Auf das BGHPA folgen drei weitere wichtige Regionen des Vektors. Bei zwei dieser Strukturen handelt es sich um Promotoren. Einer der Promotoren, *Human EF-1 α Promotor*, sorgt für eine starke Expression des *Cycle 3-GFP-Zeocin-Resistenzgens* in

Säugetierzellen. Da der pTracer-CMV2 nicht nur in Säugetierzellen, sondern auch in *E.coli* verwendet werden kann, wird noch ein zweiter Promotor benötigt, der in *E.coli* für eine hohe Expressionsrate dieses Gens sorgt. Der hierfür verantwortliche Promotor ist der *EM-7 Promotor*. Als dritte Struktur findet sich in diesem Abschnitt des Vektors das *Cycle 3-GFP-Zeocin-Resistenzgen*. Mit Hilfe des Zeocinresistenzgens ist eine Selektion von stabil-transfizierten Säugetierzellen möglich. Durch den GFP-Anteil dieser Gensequenz kann der pTracer-CMV2-Vektor für die visuelle Detektion von transformierten *E.coli* bzw. transfizierten Säugetierzellen verwendet werden. Bei dem GFP (green fluorescence protein) handelt es sich um ein kleines Protein, welches aus der Qualle *Aequorea victoria* stammt. Durch die Bestrahlung mit ultraviolettem oder blauem Licht unter dem Fluoreszenzmikroskop kommt es zur Übertragung von Energie auf das GFP. Dadurch wird das Protein aktiviert und strahlt grünes Licht aus. Durch dieses Farbsignal sind die Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, leicht zu erkennen.

Auf das *Cycle 3-GFP-Zeocin-Resistenzgen* folgt ein weiteres Polyadenylierungssignal, welches dem SV40-Virus (SV40PA) entstammt.

Auf dem gegenläufigen Strang des Vektors sind zwei Regionen lokalisiert. Das *pUC origin* sorgt für eine hohe Replikationsrate des Plasmids in *E.coli*. Zusätzlich zum *pUC origin* befindet sich auf dem *anti-sense-Strang* des Vektors ein weiteres Antibiotikaresistenzgen. Dieses kodiert für eine Ampicillinresistenz und kann für die Selektion des Vektors in *E.coli* genutzt werden.

pSPL3-Vektor

Der 6031 bp große Exontrapping-Vektor pSPL3 wurde ursprünglich entwickelt, um in genomischen Sequenzen Exons identifizieren zu können. Er enthält einen Replikationsursprung und eine Ampicillinresistenz für die Selektion des Vektors in *E.coli*. Ein weiteres wichtiges Element des Vektors ist das SV-40-Segment, welches aus einem SV-40-Orign und einem Promotor besteht und für eine effektive Replikation, Transkription und hohe Kopienanzahl des Vektors in eukaryotischen COS7-Zellen sorgt.

Die Besonderheit des Vektors liegt in dem *HIV-tat-Genfragment*. Dieses besteht aus einem Intron und zwei flankierenden Globin-Exonsequenzen, welche am 3'- bzw. 5'-Ende ein Splicedonorsignal bzw. -akzeptorsignal besitzen. Die Splicestellen sind mit denen anderer, nicht verwandter Gene kompatibel. Das Splicing weist an diesen Stellen eine, im Vergleich zu anderen Splicesignalen, langsame Kinetik auf. Dies soll die Verbindung mit den Splicestellen des klonierten Exons verbessern. Innerhalb der *HIV-tat*-Intronsequenz befindet sich die MCS des Vektors, in die das klonierte Exon

mittels Restriktionsendonukleasen eingebracht wird. In der MCS finden sich acht Restriktionsschnittstellen, unter anderem für *EcoR I*, *Xho I*, *Not I*, *Pst I*, *EcoR V* und *BstX I*. Die *BstX I*-Schnittstelle kann dafür genutzt werden, das Vektor-Vektor-Splicing und das Entstehen kryptischer Spliceprodukte zu reduzieren.

Außer den Splicesignalen befinden sich in jedem einzelnen Exon des *HIV-tat-Genfragments* jeweils zwei Primerbindungsstellen, die für zwei unterschiedliche PCR-Reaktionen verwendet werden können. In einem der Exons liegen die Bindungsstellen *SD6* und *dUSD2* und in dem anderen Exon befinden sich die Primerbindungsstellen *SA2* und *dUSA4*. Die Primerbindungsstellen sind in einem definierten Abstand zu den Splicestellen gelegen, was für die Größenbestimmung des Spliceproduktes des untersuchten Exons von entscheidender Bedeutung ist.

2.1.4 DNA und RNA

RNA-Proben

Die verwendete RNA wurden mit Hilfe des RNeasy Mini Kits aus tumorfreiem Randgewebe von Leberbiopsaten isoliert.

DNA-Proben

Bei der verwendeten genomischen DNA handelt es sich um bereits vorliegende, genotypisierte Proben, bei denen auch der dazugehörige Phänotyp ermittelt worden war. Sowohl Genotypisierung als auch Phänotypisierung erfolgte im Rahmen einer Studie, die den Effekt des CYP2D6-Genotyps auf den Metoprololmetabolismus während einer Langzeitbehandlung mit Metoprolol untersuchte (Rau et al. 2002). Aus diesem Probenkollektiv wurden die drei folgenden DNA-Proben verwendet. Die Proben 8L (*1/*1) und 20L (*2/*2), welche erwartungsgemäß phänotypisch das Bild des *extensive metabolizers* zeigten. Des weitern wurde die Probe 91L (*41/*41) mit dem phänotypischen Bild eines *intermediate metabolizers* verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

Transformation chemisch kompetenter Zellen

Das Prinzip der Transformation chemisch kompetenter Zellen wird im folgenden beschrieben. Die kompetenten Zellen werden zunächst auf Eis gelagert, so dass sich die rekombinanten Plasmidkonstrukte an die Zellwand anlagern können. Durch den nachfolgenden Hitzeschock, der bei 42 °C für 30 s ausgeführt wird, werden die

Plasmide in die Zellen aufgenommen. Die Transformation der chemisch kompetenten Top10F'-Zellen erfolgte mit Hilfe des TA-Cloning Kits nach Angaben des Herstellers.

Versuchsbedingungen: Der Ligationsansatz wurde kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Die bei -80 °C gelagerten Top 10 F'-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden 25 µl Bakteriensuspension in einem sterilen Eppendorfgefäß mit 2 µl Ligationsansatz versetzt und vorsichtig mit einer sterilen Pipettenspitze durchgerührt. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und nachfolgend für 30 s bei 42 °C im Heizblock einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach dem Hitzeschock wurde das Eppendorfgefäß wieder auf Eis gestellt. Es wurden 300 µl vorgewärmtes SOC.-Medium in das Eppendorfgefäß gegeben und durch auf- und abpipettieren mit dem Transformationsansatz vermischt. Danach wurde das Eppendorfgefäß im Heizblock bei 37 °C für 1 Stunde bei 300 rpm inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurden die Agarplatten vorbereitet. Die Kanamycinplatten wurden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Etwa eine Stunde bevor die Platten verwendet wurden, wurden sie aus dem Kühlschrank genommen und bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Nach etwa einer Stunde wurden auf jeder Platte 60 µl X-Gal und 60 µl IPTG mit einem Drigalski-Spatel so lange verteilt, bis die Flüssigkeiten in den Nährboden eingezogen waren. Danach wurden die Platten im Brutschrank aufbewahrt bis die Transformation der Bakterien erfolgt war und diese mit einem Drigalski-Spatel auf den Platten verteilt werden konnten. Auf einer Hälfte der Platte wurden 50 µl Bakteriensuspension und auf der anderen Hälfte 250 µl Suspension ausgestrichen. Vor und nach der Benutzung des Drigalski-Spatels wurde dieser in 70% Ethanol gespült und nachfolgend durch Abflammen sterilisiert. Die beimpften Kanamycinplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Elektroporation

Die Elektroporation ist ein Verfahren durch das eine Transformation elektrisch kompetenter Zellen erreicht werden kann. Bei der Elektroporation werden Zellmembranen durch das Anlegen einer elektrischen Spannung reversibel permeabilisiert, so dass die DNA in die Zelle eindringen kann.

Versuchsbedingungen: Das Plasmid wurde 1:1000 mit Aai verdünnt. Die elektrokompentenen Zellen wurden auf Eis gestellt und in einem sterilen Eppendorfgefäß wurden 1 µl des verdünnten Plasmids und 30 µl Bakteriensuspension durch vorsichtiges zweimaliges auf- und abpipettieren gemischt. Die Suspension wurde zwischen die beiden Elektroden einer sterilen Elektroporationsküvette pipettiert und diese in den Schlitten des Elektroporationsgerätes gestellt. Der Schlitten wurde in das Gerät eingesetzt und das Elektroporationsgerät auf 200 Ohm und 2,5 kV eingestellt.

Der Kondensator wurde über die Lösung in der Elektroporationsküvette entladen. Wenn ein Lichtblitz zu sehen war, wurde in einem neuen Ansatz die Leitfähigkeit der Suspension durch Verdünnung der Suspension mit 200 µl Aai weiter verringert und der Vorgang wiederholt. Nach Elektroporation wurden zu der Bakteriensuspension in der Küvette 300 µl SOC.- Medium gegeben und dieses durch auf- und abpipettieren mit der Suspension gemischt. Die Suspension wurde aus der Küvette in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und in einem Schüttelmischer für 45 min bei 300 rpm und 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 µl bzw. 200 µl der Suspension auf Ampicillin- oder Kanamycinplatten ausplattiert. Die Auswahl der Antibiotikaplatten richtete sich nach dem verwendeten Plasmid.

Bakterienkolonien picken und Übernachtskulturen anlegen

Um eine möglichst große Menge an rekombinanten Plasmiden zu erhalten, wurden nach durchgeführter Transformation und Inkubationszeit monoklonale Bakterienkulturen von den beimpften Agarplatten gepickt und in einer Übernachtskultur angelegt.

Versuchsbedingungen: Nach einer Inkubationszeit von etwa 12 Stunden wurden die beimpften Agarplatten aus dem Brutschrank genommen. Um ausschließlich monoklonale Kolonien zu picken, wurden nur diejenigen verwendet, die klar begrenzt waren, eine runde Form aufwiesen und keine anderen Kolonien auf der Platte berührten. Falls durch das verwendete Plasmid ein blue-white-screening möglich war, wurden nur die weißen Kolonien gepickt. Mit einer autoklavierten Pipettenspitze wurden die Kolonien vorsichtig von der Platte abgetragen. Für jede neue Kolonie wurde eine neue Pipettenspitze verwendet.

Zur Vermehrung der Bakterien wurden Übernachtskulturen angelegt. Hierfür wurde jeweils eine gepickte Kolonie in 10 ml LB-Medium gegeben. Dieses wurde, je nach verwendetem Plasmid, mit 100 µl Ampicillin oder 10 µl Kanamycin versetzt. Die so angelegte Übernachtskultur wurde für mindestens 12 Stunden bei 37 °C und 100 rpm im Schüttelmischer inkubiert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Agarosegele

Um DNA-Fragmente ihrer Größe nach durch Elektrophorese auftrennen zu können, wurden Agarosegele hergestellt. Es wurden 0,6%ige, 1%ige und 1,5%ige Gele hergestellt. Für ein 1%iges Agarosegel wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TBE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Es wurden 5 µl Ethidiumbromidlösung je 100 ml hinzugegeben, gemischt und die Lösung in einen Gelschlitten gegossen. Nachfolgend

wurde ein Kamm in die Lösung gehängt, der während des Aushärtens des Gels die Taschen im Gel bildete. Nach dem Aushärten des Gels wurde der Kamm gezogen, der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer gesetzt und die Taschen mit den DNA-Proben bestückt. Neben der normalen Agarose wurde bei kleineren DNA-Fragmenten (<300 bp) Small-DNA-Agarose verwendet.

Gelelektrophorese

Moleküle mit einer Nettoladung, wie z.B. DNA, wandern im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der elektrischen Feldstärke, der Nettoladung des Moleküls und dem Reibungskoeffizienten. Als Trägermedium werden in der Elektrophorese z.B. Agarosegele verwendet. Kleinere Moleküle wandern im elektrischen Feld schneller durch das Gel als große Moleküle, weshalb mit Hilfe der Elektrophorese eine Auftrennung der DNA-Fragmente ihrer Größe nach möglich ist.

Versuchsbedingungen: Es wurde eine Elektrophoresekammer mit 1x TBE-Puffer gefüllt, ein Agarosegel in die Kammer eingelegt und die Taschen des Gels mit der aufzutrennenden DNA-Lösung befüllt. Die DNA-Lösung wurde vorher in Abhängigkeit vom Lösungsvolumen mit der jeweils benötigten Menge *6x loading dye* (LD) versetzt. Wenn nur ein geringes Volumen DNA-Lösung eingesetzt wurde (z.B. nach Durchführung einer PCR), wurde dies mit *Aai* versetzt um ein größeres Endvolumen zu erzielen. Bei einer PCR sah der verwendete Ansatz im wesentlichen folgendermaßen aus. Es wurden 5 µl PCR-Produkt, 5 µl *Aai* und 2 µl LD durch vortexen gemischt und danach in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Als Größenstandard wurden je nach Bedarf eine 100 bp-Leiter oder eine 1 kb-Leiter verwendet. Nachdem alle Proben in das Gel geladen worden waren, wurde eine Spannungsquelle angeschlossen und die Proben für ca. 1 Stunde bei 80-200 V (je nach Größe der Kammer) aufgetrennt.

Methoden die auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruhen

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode mit deren Hilfe DNA-Fragmente exponentiell vervielfältigt werden können. Der erstellte Reaktionsansatz durchläuft während des Cyclings mehrfach das gleiche Syntheseprogramm, welches den Denaturierungs-, Annealing und Elongationsschritt umfasst. Bei der Denaturierung kommt es zur Auftrennung des DNA-Doppelstrangs. Beim anschließenden Annealing lagern sich die Primer an die Einzelstränge an. In der nachfolgenden Elongation synthetisiert die DNA-Polymerase anhand des Templatestranges den komplementären DNA-Strang.

Versuchsbedingungen: Der verwendete PCR-Ansatz sah im Wesentlichen folgendermaßen aus. Das Gesamtvolumen eines einfachen Reaktionsansatzes betrug 25 µl. Es wurden 16,5 µl Aai, 2,5 µl 10x Puffer, 2,5 µl dNTPs (2,5 mM), 1 µl forward primer (10 µM), 1 µl reverse primer (10 µM), 1 µl DNA und 0,5 µl Polymerase eingesetzt. Alle Reagenzien, die eingefroren waren wurden nach dem Auftauen gevortext, ebenso wie der fertig gestellte Reaktionsansatz. Danach erfolgte das Cycling.

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94 °C	2 min	1
94 °C	20 s	35
56 °C	20 s	
72 °C	40 s	
72 °C	4 min	1
4 °C	∞	

Tabelle 3: Temperaturbedingungen des Cycling-Programms

In Abhängigkeit von DNA-Konzentration und verwendeter Polymerase wurde der dargestellte Reaktionsansatz gegebenenfalls modifiziert. Gleiches galt für das PCR-Programm, welches an die Fragmentgröße der verwendeten DNA angepasst wurde.

Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe der RT-PCR ist es möglich aus einer RNA-Sequenz cDNA bzw. DNA zu synthetisieren. Bei der cDNA (complementary DNA) handelt es sich um ein einzelsträngiges Molekül deren Basensequenz komplementär zu der zugrunde liegenden mRNA ist. Eine Amplifikation der RNA ist nur mit einer RNA-abhängigen Polymerase möglich. Die verwendeten DNA-Polymerasen sind rekombinant erstellte, ursprünglich aus Retroviren stammende *reverse Transkriptasen*. Diese erzeugen während der RT-PCR ein RNA-DNA-Hybrid und ermöglicht so die Synthese einer komplementären cDNA bzw. DNA.

Versuchsbedingungen: Für die RT-PCR wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet. Das erste Verfahren, das mit Hilfe des *SuperScript. III First-Strand Synthesis System* durchgeführt wurde, umfasste zwei Syntheseschritte. Im ersten Schritt wurde cDNA hergestellt, die dann mit spezifischen Primern in DNA umgeschrieben wurde. Dieses Verfahren umfasste drei Reaktionsschritte. Im ersten Ansatz wurden 3 µl RNA, 1 µl Oligo dT, 1 µl dNTPs und 5 µl RNase-freies Wasser gemischt und für 5 min bei 65 °C inkubiert, um eine Denaturierung der RNA-Stränge zu erzielen. Es folgte eine Inkubation auf Eis für mindestens 1 min, um den Vorgang der

Denaturierung zu unterbrechen. Dieser Ansatz wurde vorsichtig mit einem zweiten Ansatz, der aus 2 µl 10x RT-Puffer, 4 µl 25mm MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNase out und 1 µl Superscript bestand, gemischt. Danach erfolgte die Synthese für 50 Minuten bei 50 °C. Durch fünfminütige Inkubation bei 85 °C wurde die RT inaktiviert.

Temperatur	Zeit
50 °C	50 min
85 °C	5 min

Tabelle 4: Temperaturbedingungen des Cyclings

Die so entstandene cDNA wurde dann in einem regulären PCR-Ansatz mit spezifischen Primern in das gewünschte doppelsträngige DNA-Fragment umgeschrieben.

Beim zweiten verwendeten Verfahren wurde aus der RNA direkt DNA synthetisiert. Hierfür wurde das *QIAGEN OneStep RT-PCR Kit* nach Herstellerangaben eingesetzt.

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
RNase freies Wasser	10,5 µl
5x QIAGEN OneStep Buffer	5 µl
dNTP Mix (2,5 mM)	1 µl
Forward primer (10 µM)	3 µl
Reverse primer (10 µM)	3 µl
QIAGEN Enzym Mix	1 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
RNA	1 µl
Endvolumen	25 µl

Tabelle 5: Reaktionsansatz der OneStep RT-PCR

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
50 °C	32 min	1
95 °C	15 min	1
94 °C	20 s	35
56 °C	20 s	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	1
4 °C	∞	

Tabelle 6: Temperaturbedingungen der OneStep RT-PCR

Die beiden beschriebenen Ansätze wurden im Wechsel verwendet. Die OneStep RT-PCR erfolgte mit genspezifischen Primern, so dass dieses Verfahren auch aus geringeren RNA-Mengen die spezifischen Produkte generieren kann.

Zielgerichtete Mutagenese (Site directed mutagenesis) von DNA

Bei der gezielten Mutagenese werden einzelne Nukleotide an einer definierten Stelle einer bereits existierenden DNA ausgetauscht, um die erwünschten Eigenschaften zu erzeugen.

Versuchsbedingungen: Es wurde das *Quick Change Site directed mutagenesis Kit* von Stratagene den Herstellerangaben folgend verwendet. Es wurden zwei entgegengesetzt gerichtete reverse-komplementäre Primer verwendet, die beide die gewünschte Mutation in der Mitte ihrer Sequenz enthalten. Mit Hilfe einer *proofreading-Polymerase*, der die 5'-3'-Exonukleaseaktivität fehlt, wurde das komplette Plasmid, welches das Insert enthielt, im Rahmen einer PCR amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit *Dpn I*, ein Restriktionsenzym welches spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA schneidet, verdaut. Durch den *Dpn I*-Verdau werden ausschließlich die aus den Bakterien stammenden Template-Stränge verdaut. Die durch die Polymerase *in vitro* neu synthetisierte DNA weist keinerlei Methylierung auf und wird deshalb auch nicht abgebaut. Es wurde folgender Ansatz verwendet:

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
10x Puffer	5 µl
DNA	1 µl
Primer 1 (~125 ng)	10 µl
Primer 2 (~125 ng)	10 µl
DNTPs (2,5 mM)	1 µl
Quick-Solution	3 µl
Aqua iniectionis	20 µl
Endvolumen	50 µl

Tabelle 7: Reaktionsansatz der Mutagenese-PCR

Danach folgte das Cycling unter folgenden Bedingungen.

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95 °C	1 min	1
95 °C	50 s	18
60 °C	50 s	
68 °C	1 min/ kb des Plasmids	
68 °C	7 min	1

Tabelle 8: Temperaturbedingungen des Cyclings bei zielgerichteter Mutagenese

Nach beendeter PCR folgte der *Dpn I*-Verdau mit 1 µl *Dpn I* pro PCR-Ansatz bei 37 °C und einstündiger Inkubationszeit. Anschließend wurde eine Transformation der *XL10-Gold Ultracompetent Cells* mit dem erzeugten PCR-Produkt durchgeführt.

Sequenzierung

Mit Hilfe dieser Methode des enzymatischen Kettenabbruchs ist es möglich die genaue Basenabfolge kurzer DNA-Fragmente zu bestimmen. Zusätzlich zu den Desoxyribonukleotiden (dNTPs) werden, mit jeweils einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markierte, Didesoxyribonukleotide (ddATP, ddCTP, ddTTP und ddGTP) eingesetzt. Wenn ein solches Didesoxyribonukleotid beim Cycle sequencing in die DNA eingebaut wird, kommt es zu einem basenspezifischen Kettenabbruch. Die dabei entstehenden Produkte werden mit Hilfe der Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt, die Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Laser angeregt und nachfolgend detektiert. So lässt sich die genaue Basensequenz eines DNA-Abschnitts bestimmen.

Versuchsbedingungen: Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurde immer der gleiche Reaktionsansatz verwendet. Für einen einfachen Ansatz wurden 8 µl Aai, 5,5 µl 2,5x Puffer und 2,5 µl Sequenziermix (enthält die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleotide) gevortext. Danach wurden 1,5 µl Forward primer (10 µM) und 2,5 µl der zu sequenzierenden DNA in den Ansatz gegeben und dieser gevortext. Die Sequenzierung erfolgte in beiden Orientierungen durch Verwendung unterschiedlicher Primer. Dies diente dazu, die Leseweite zu erhöhen. Danach folgte das Cycle sequencing.

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94 °C	10 s	30
50 °C	10 s	
60 °C	4 min	

Tabelle 2: Temperaturbedingungen des Cycle sequencing

Nach Abschluss des Cycle sequencing wurde die DNA ausgefällt. Es wurden 80 µl 0,3 M Natriumacetat (NaAc) und 300 µl Ethanol p.a. hinzugefügt, der Ansatz gevortext und für mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz 10 min bei 4 °C und 13.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet bei 37 °C im Schüttelmischer getrocknet.

Die gelelektrophoretische Auftrennung, Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe und die computergestützte Übersetzung der Signale in die Basensequenz wurden im Institut für experimentelle Pathologie durchgeführt.

Methoden zur Isolation und Reinigung der DNA

DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Das Prinzip der DNA-Extraktion aus Agarosegelen beruht auf dem Einsatz verschiedener Puffer mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen.

Durch Zugabe des Bindungspuffers, der eine hohe Salzkonzentration und GIT enthielt, wird die Agarose aufgelöst und die DNA an die Silica-Membran der Trägersäule gebunden. Da die Bindung der DNA an die Silica-Membran pH-Wert abhängig ist (optimale Bindung bei $\text{pH} \leq 7.5$), enthält der Bindungspuffer einen pH-Wert-Indikator, der über eine gelbe Farbgebung anzeigt, wenn optimale Bindungsbedingungen bestehen. Durch die nun folgenden Waschschrte, wird die DNA von Kontaminationen wie z.B. Agarose, Salzen und Primern gereinigt. Die Elution der an die Silica-Membran gebundenen DNA erfolgt pH-Wert-abhängig mit Hilfe eines leicht alkalischen Puffers ($\text{pH} 8.5$).

Die DNA-Extraktion aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des QIAquick Extraction Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

Versuchsbedingungen: Die DNA-Probe wurde ausgewogen, indem zunächst das Gewicht eines leeren Eppendorfgefäßes bestimmt wurde und dieses dann von dem mit der Probe befüllten Eppendorfgefäße subtrahiert wurde. Zu einem Volumen Gel wurden drei Volumen QG-Puffer gegeben. Dies bedeutet, dass bei einem ermittelten Gelgewicht von 200 mg nachfolgend 600 μl QG-Puffer hinzugefügt wurden. Danach wurde die Probe für 10 min bei 50 °C und 550 rpm im Heizblock inkubiert. Nachdem sich das Gel durch die Inkubation vollständig gelöst hatte, wurde die Probe gevortext. Um die pH-Wert-Verhältnisse und damit die Bindungsbedingungen der DNA an die Silica-Membran zu überprüfen, wurde darauf geachtet, dass die entstandene Suspension eine gelbe Farbe hatte. Dann wurde zum Ansatz ein Gelvolumen Isopropanol hinzugefügt. Die Lösung wurde gevortext, 750 μl auf die QIAquick spin Säule pipettiert und bei 14.000 rpm und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Zentrifugats wurde mit dem Rest der Lösung analog verfahren. Es wurden dann 400 μl QG-Puffer auf die Säule gegeben und diese bei 14.000 rpm und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und 750 μl PE-Puffer auf die Säule gegeben. Nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule bei 14.000 rpm und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Zentrifugats wurde eine erneute Zentrifugation für 30 s bei 14.000 rpm und Raumtemperatur durchgeführt. Die Säule wurde in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 50 μl EB-Puffer direkt auf die Membran der Säule

pipettiert. Nach einer Inkubation von 1 min bei Raumtemperatur wurde die DNA durch eine einminütige Zentrifugation bei 12.000 rpm und Raumtemperatur eluiert.

Aufreinigung mit E.Z.N.A Cycle Pure Kit

Die Aufreinigung der PCR-Proben wurde mit Hilfe des E.Z.N.A Cycle Pure Kits nach Angaben der Herstellerfirma Peqlab durchgeführt. Das Funktionsprinzip entspricht dem bereits bei der Beschreibung des QIAquick Extraction Kits geschilderten Prinzip.

Versuchsbedingungen: Die DNA-Probe wurde mit 4-5 Volumen CP-Puffer versetzt und durch auf- und abpipettieren gemischt. Die Lösung wurde auf die Säule des E.Z.N.A Cycle Pure Kit pipettiert und diese 1 min bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Zentrifugats wurden 750 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und diese erneut 1 min bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Waschschrift wiederholt. Zum Trocknen der Säulen wurden diese 1 min bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Es wurde überprüft, ob die Außenwand der Säulen trocken war, bevor diese in neue sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt wurden. Zur Elution wurden 50 µl Wasser direkt auf den weißen Filter der Säulen pipettiert und diese 1 min bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.

Plasmid-DNA-Präparation

Das Prinzip der Plasmidpräparation lässt sich folgendermaßen beschreiben. Das durch Zentrifugation erhaltene Bakterienpellet wird in einem Puffer resuspendiert und durch Hinzufügen eines alkalischen Puffers wird eine Zelllyse ausgelöst. Das Lysat wird durch einen stark salzhaltigen Puffer neutralisiert, um optimale Bedingungen für eine Bindung der DNA an die Silica-Membran einer Trägersäule zu schaffen. In den folgenden Waschsritten wird die DNA von Kontaminationen durch Salze und makromolare Zellkomponenten befreit und dann mit Hilfe eines leicht alkalischen Puffers (pH 8.5) eluiert.

Die Präparation der Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kits der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt.

Versuchsbedingungen: Die Zellsuspension, die aus einer Übernachtskultur mit 10 ml Medium gewonnen wurde, wurde in 50 ml Falconröhrchen 10 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Bakterienpellet in 250 µl Puffer A1 resuspendiert, so dass keine Zellklumpen mehr vorlagen. Die Suspension wurde aus den 50 ml Falconröhrchen in sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Um die Bakterien zu lysieren wurden 250 µl Puffer A2 hinzugefügt und durch 5-6 maliges Umwenden der Eppendorfgefäße mit der Probe gemischt. Es folgte eine Inkubation

von max. 5 min bei Raumtemperatur. Um das Lysat zu neutralisieren wurden 300 µl Puffer A3 in die Eppendorfgeläße pipettiert. Die Gefäße wurden zum Mischen 6-8 Mal vorsichtig umgewendet. Der Reaktionsansatz wurde dann 10 min bei 13.200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, um die aufgebrochenen Zelltrümmer von der im Puffer gelösten DNA zu trennen. Der entstandene Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig vom weißlich-gelben Pellet abgenommen, auf eine Säule des NucleoSpin Kits überführt und 1 min bei 13.200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und es wurden 500 µl vorgewärmter Puffer AW auf die Säule des NucleoSpin Kits gegeben. Diese wurde 1 min bei 13.200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Zentrifugats wurden 600 µl Puffer A4 auf die Säule pipettiert. Dann folgte eine weitere einminütige Zentrifugation bei 13.200 rpm. Nach erneutem Verwerfen des Zentrifugats wurde die Säule zum Trocknen 2 min bei 13.200 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues, steriles 1,5 ml Eppendorfgeläß überführt und es wurden 50 µl Puffer AE direkt auf die weiße Membran der Säule pipettiert. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA durch einminütige Zentrifugation bei 13.200 rpm eluiert.

Maxi-Plasmidpräparation

Die Plasmid-Präparation wurde mit dem Qiagen HiSpeed Plasmid Purification Kit nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip der Maxi-Plasmidpräparation entspricht dem der schon geschilderten Mini-Plasmidpräparation, mit dem Unterschied, dass mehr Plasmid-DNA gewonnen wird.

Versuchsbedingungen: Es wurde eine Übernachtskultur in 200 ml LB-Medium angelegt. Nach einer Inkubation von 15 Stunden bei 37 °C und 100 rpm wurde die Bakteriensuspension aus den sterilen Erlenmeyer Kolben in 50 ml blue caps überführt. Diese wurden 15 min bei 5.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Es wurden 10 ml Puffer P2 zu der Bakteriensuspension hinzugefügt und durch 4-6 maliges Umwenden der blue caps vorsichtig gemischt. Durch die Zellyse wurde die Lösung klar und viskös. Es folgte eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur. Während der Inkubation wurde der QIAfilter Maxi Cartridge vorbereitet, indem die Verschlusskappe auf die kleine Öffnung des QIAfilter Maxi Cartridge gedreht und dieser dann in ein Becherglas gestellt wurde. Es wurden 10 ml des vorgekühlten Puffer P3 auf das Lysat gegeben und durch 4-6 maliges Umwenden der Bluecaps gemischt. Dabei trübte sich das Lysat durch Ausfällung von Kalium-SDS-Salz und Proteinen. Das Lysat wurde in die QIAfilter Maxi Cartridges gegossen und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurde die Matrix eines HiSpeed Maxi Tip mit 10 ml Puffer QBT equilibriert. Dazu wurde die Säule über ein Auffanggefäß gehängt und 10 ml Puffer QBT darauf

gegeben. Nach Ablauf der 10 minütigen Inkubationszeit wurde die Verschlusskappe des QIAfilter Maxi Cartridge abgeschraubt, der Kolben in den QIAfilter Maxi Cartridge eingeführt und das Zelllysate durch den Filter hindurch in die equilibrierten HiSpeed Maxi Tips überführt. Das Lysat durchlief aufgrund der Schwerkraft die Matrix der HiSpeed Maxi Tips. Der Durchfluss wurde in einem Abfallgefäß aufgefangen. Es wurden 60 ml Puffer QC (Waschpuffer) auf die HiSpeed Maxi Tip pipettiert. Zur Elution der DNA wurden 15 ml Puffer QF auf die Säulen pipettiert. Der Durchfluß wurde in einem sterilen 50 ml Falcon aufgefangen. Zu dem Eluat wurden 10,5 ml Isopropanol hinzugefügt und mit diesem vermischt. Während der Inkubation wurde der Kolben aus einer 30 ml Spritze des Kits gezogen und ein QIAprecipitator Maxi Module auf die kleine Öffnung der Spritze geschraubt. Es wurde darauf geachtet, dass immer zuerst das QIAprecipitator Maxi Module von der Spritze abgedreht wurde, bevor der Kolben aus der Spritze gezogen wurde. Die Spritze mit dem aufgeschraubten QIAprecipitator Maxi Module wurde über ein Abfallgefäß gehalten und das Eluat/Isopropanol-Gemisch mit konstantem Druck durch das QIAprecipitator Maxi Module hindurch in das Abfallgefäß filtriert. Das QIAprecipitator Maxi Module wurde von der Spritze abgedreht und der Kolben aus der Spritze gezogen. Zum Trocknen des QIAprecipitator Maxi Module wurde der Kolben wieder in die Spritze eingeführt und Luft durch die Membran des QIAprecipitator Maxi Modules hindurchgedrückt. Dieser Vorgang wurde 3-4 mal wiederholt. Die kleine Öffnung des Filters wurde mit einem Tuch abgewischt, um eine Übertragung von Isopropanol in das Eluat zu verhindern. Der Kolben wurde aus einer neuen Spritze herausgezogen und das QIAprecipitator Maxi Module auf die Spritze geschraubt. Die Spritze wurde über ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß gehalten und 1 ml Puffer TE in die Spritze pipettiert. Der Kolben wurde in die Spritze eingeführt und mit konstantem Druck wurde die DNA vom Filter in das Eppendorfgefäß eluiert. Das QIAprecipitator Maxi Module wurde von der Spritze abgeschraubt, der Kolben aus der Spritze herausgezogen und das QIAprecipitator Maxi Module erneut auf die Spritze geschraubt. Das Eluat wurde nochmals in die Spritze pipettiert und erneut durch das QIAprecipitator Maxi Module hindurch filtriert. Es wurden 10 µl des Eluats in 140 µl AAI gelöst und fotometriert. Das restliche Eluat wurde bei 4°C gelagert.

Methoden zur Isolation von RNA

RNA-Präparation aus Lebergewebe

Das bei -80 °C im Falcon gelagerte Lebergewebe wurde aus der Tiefkühltruhe genommen und das Falcon in flüssigen Stickstoff gestellt. Ein kleines Stück des Lebergewebes wurde in einen, mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten, Mörser gegeben

und vorsichtig zerkleinert. Das pulverisierte Lebergewebe wurde in ein vorgekühltes Falcon hineingefüllt und das Gewicht bestimmt. Nachfolgend wurde die Leber-RNA mit Hilfe des QIAgen RNeasy Mini Kit von Qiagen isoliert.

Extraktion von RNA aus Zellen mit dem RNeasy Mini Kit

Zum Nachweis und Quantifizierung der RNA-Expression der erstellten Genkonstrukte wurde die RNA aus COS7-Zellen und humanem Lebergewebe mit Hilfe des RNeasy Mini Kits nach Herstellerangaben isoliert.

Da bei der RNA-Extraktion immer die Gefahr des RNA-Abbaus durch RNAsen besteht, muss das Gewebe möglichst schnell lysiert und die ubiquitär vorkommenden RNAsen inhibiert werden. Zu diesem Zweck wird der Lysis-Puffer verwendet, der das stark denaturierende Guanidinium-Isothiocyanat (GIT) und β -Mercaptoethanol enthält, wodurch RNAsen inaktiviert werden und eine Isolation intakter RNA möglich wird. Der Puffer enthält außerdem Ethanol, um die nachfolgende Bindung der RNA an die Silikagel-Membran einer Trägersäule zu optimieren. Anschließend werden mehrere Waschschriffe durchgeführt, um die RNA von Kontaminationen (z.B. Proteine oder DNA aus den Zellen) zu reinigen. Im letzten Schritt wird die RNA durch Zugabe von Wasser von der Silikagel-Membran eluiert.

Versuchsbedingungen: Das Nährmedium wurde aus den wells des 6-well-plates abgesaugt. Hierbei wurde immer zuerst die Negativkontrolle bearbeitet. Es wurden 600 μ l RLT-Puffer mit Filtertip-Pipettenspitzen auf jedes well geben und mit dem Puffer die Zellen von der Oberfläche des wells gelöst. Das Lysat wurde auf eine Shredder Säule überführt und diese wurde 2 min bei 13.200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Schritt dient der Verringerung der Viskosität und der Homogenisierung des Lysates, um so die Ausbeute an RNA zu erhöhen und eine Verstopfung des Filters der nachfolgend eingesetzten RNeasy mini column (Mini-Säule) zu verhindern. Die Shredder Säule wurde verworfen. Es wurde 1 Volumen (600 μ l) 70% Ethanol zu dem Zentrifugat gegeben und beides durch auf- und abpipettieren gemischt. 700 μ l der Lösung wurden auf eine RNeasy (Mini-Säule) gegeben und diese 15 s bei 13.200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Zentrifugats wurde mit dem Rest der Lösung analog verfahren. Es wurden 700 μ l RW1-Puffer auf die RNeasy Mini-Säule gegeben und diese 15 s bei 13.200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der dabei entstehende Durchfluß wurde verworfen. Die RNeasy Mini-Säule wurde in ein neues 2 ml Auffanggefäß überführt. Es wurden 500 μ l RPE-Puffer auf die RNeasy Mini-Säule gegeben und diese 15 s bei 13.200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der dabei entstehende Durchfluß wurde verworfen. Es wurden erneut 500 μ l RPE-Puffer auf die RNeasy Mini-Säule gegeben.

Diese wurde dann 2 min bei 13.200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Es wurde kontrolliert, ob die Außenwand der RNeasy Mini-Säule trocken war, um eine Übertragung des RPE-Puffers zu verhindern. Die RNeasy Mini-Säule wurde in ein neues 1,5 ml Auffanggefäß überführt und 50 µl RNase freies Wasser wurden direkt auf die weiße Membran der RNeasy Mini-Säule pipettiert. Diese wurde 1 min bei 13.200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Um die eluierte RNA vor Abbau durch RNAsen zu schützen, wurden die nächsten Schritte auf Eis durchgeführt. 10 µl des Eluats wurden für die Fotometrie abgenommen und mit 140 µl Aai versetzt, so dass ein Verdünnungsfaktor von 15 bestand. Die restlichen 40 µl des Eluats wurden mit 1 µl RNasin versetzt und bei -20 °C eingefroren.

Ligation

Unter einer Ligation versteht man das Verknüpfen von DNA-Fragmenten mit Hilfe des Enzyms DNA-Ligase. Es können sowohl einzelne PCR-Produkte miteinander verknüpft werden, als auch PCR-Produkte mit Plasmiden. Die Ligation wurde mit dem TA-Cloning Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Versuchsbedingungen: Im Wesentlichen wurde die Ligation wie folgt ausgeführt. Zunächst wurde der Thermoblock auf 14 °C vorgekühlt. In jedes Gefäß wurden 6 µl PCR-Produkt, 1 µl 10x ligation buffer, 2 µl pCR II Vektor (25 ng/µl) und 1 µl T4 DNA Ligase (4.0 Weiss units) gegeben. Somit betrug das Gesamtvolumen des Ansatzes 10 µl. Alle aufgetauten Reagenzien, mit Ausnahme der Ligase, wurden vor ihrer Zugabe zum Reaktionsansatz gevortext. Die Ligase wurde dem Ansatz als letztes zugefügt. Nach Zugabe der Ligase wurde der Reaktionsansatz durch 5-maliges auf- und abpipettieren gemischt und für mindestens 4 Stunden bei 14 °C inkubiert.

Restriktionsendonukleaseverdau

Restriktionsendonukleasen, die Ende der sechziger Jahre von Werner Arber, Hamilton Smith und Daniel Nathans entdeckt wurden, sind prokaryotische Enzyme, die spezifische Basensequenzen in einer DNA-Doppelhelix erkennen und in beiden Strängen der Helix an spezifischen Stellen die Phosphodiesterbindung spalten. Bei den Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen Typ II handelt es sich um Palindrome, die innerhalb der Erkennungssequenz des Enzyms liegen. Restriktionsendonukleasen, werden dazu genutzt DNA-Moleküle in spezifische Fragmente zu zerlegen bzw. spezifische Enden („*sticky ends*“ oder „*blunt ends*“) zu erzeugen, um verschiedene DNA-Fragmente durch Ligation miteinander verbinden zu können.

Versuchsbedingungen: Im Wesentlichen sah der Reaktionsansatz eines Restriktionsendonukleasenverdaus folgendermaßen aus. Es wurden 11 µl Aai, 4 µl 10x

Reaktionspuffer, 1 μ l Restriktionsenzym, 4 μ l BSA (10 μ g/ml) und 20 μ l DNA durch vortexen gemischt und 1 Stunde bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert. Das Endvolumen des Ansatzes variierte je nach Verwendungszweck. Wenn ein DNA-Fragment mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten werden sollte, wurde in Abhängigkeit von der Enzymaktivität beider Enzyme im verwendeten Reaktionspuffer ein Doppelverdau (bei einer Enzymaktivität >50%) oder bei zu geringer Aktivität (<50%) ein sequenzieller Verdau durchgeführt.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Zellkulturflaschen mit Kollagen beschichten

Um eine bessere Haftung der Zellen auf dem Boden der Zellkulturflasche zu ermöglichen, wurden die Flaschenböden mit Kollagen beschichtet.

Vorgehen: Die auf Eis gehaltene Kollagenlösung (4mg/ml) wurde mit einer gekühlten, steril filtrierten 1x PBS-Lösung 1:100 verdünnt. Es wurden 45,5 ml 1x PBS mit 500 μ l Kollagen versetzt und gründlich gemischt. Es wurden 5 ml der Kollagen/PBS-Lösung in eine kleine Zellkulturflasche gegeben und deren Boden durch Schwenken der Flasche benetzt. Die benötigte Menge ist abhängig von der Größe der Zellkulturflasche. Mit Hilfe einer Pipette wurde die restliche Lösung aus der Flasche entfernt und in die nächste Flasche überführt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis alle Kulturgefäße mit der Kollagen/PBS-Lösung behandelt waren. Die restliche Lösung wurde zurück in das Aufbewahrungsgefäß gefüllt.

Zellen aussäen

Um optimale Wachstumsbedingungen für die Zellkulturzellen zu schaffen wurden die Zellen, je nach Bedarf der nachfolgenden Experimente, auf unterschiedlichen Kulturschalen ausgesät.

Vorgehen: Das Nährmedium wurde aus den Zellkulturschalen abgesaugt und es wurden 5 ml Trypsin auf eine Schale gegeben. Um das Trypsin gleichmäßig zu verteilen, wurde die Schale leicht geschwenkt. Das Trypsin wurde sofort danach wieder abgesaugt, da es nur dem Zweck der Neutralisierung und Entfernung des im Nährmedium enthaltenen α_1 -Antitrypsins dient. Danach wurden erneut 5 ml Trypsin auf jede Zellkulturschale gegeben. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde das Trypsin einige Minuten auf den Platten belassen. Nachfolgend wurde der Trypsinierungsvorgang durch die Zugabe von 5 ml Nährmedium gestoppt. Mit einer Pipette wurde die Suspension in ein 50 ml Falcon überführt und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt. Danach folgte ein 5 minütiger Zentrifugationsschritt bei ~100 g. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet

wurde in 6 ml Medium resuspendiert. Danach wurde das zusätzlich benötigte Medium hinzugefügt und mit der Suspension durchmischt. In jede Schale des 6-well-plates wurden 3 ml Zellsuspension gegeben und die 6-well-plates wurden leicht geschwenkt, um die Zellen möglichst gleichmäßig auf dem Boden der Schalen zu verteilen.

Transfektionsmethoden

Transfektion der COS-7-Zellen

Als Transfektion bezeichnet man die Einführung fremder DNA in eine eukaryontische Zelle. Es gibt sehr viele verschiedene Transfektionsmethoden. Bei dem verwendeten Fugene Transfektionsreagenz der Firma Roche Diagnostics GmbH handelt es sich um eine Kombination verschiedener Lipide, die keine Liposomen ausbilden. Diese bilden Mizellen mit positiv geladener Oberfläche, wodurch negativ geladene Nukleinsäuren für die Einschleusung in Zellkulturzellen gebunden werden können. Diese Technik kann sowohl für Zelllinien als auch für Primärzellen eingesetzt werden und weist eine geringe Zelltoxizität auf. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde der Track CMV-Vektor eingesetzt, welcher einen GFP-Anteil besitzt. Bei gelungener Transfektion lässt sich unter dem Fluoreszenzmikroskop der grüne Farbstoff nachweisen.

Versuchsbedingungen: Für die Transfektion der COS-7-Zellen wurden 9 Proben und drei zusätzliche Kontrollen angefertigt.

Die erste der Kontrollproben enthielt 48,5 µl Serum- und antibiotikafreies Medium (SAFM), 1,5 µl Fugene Reagenz und 4 µl Track CMV. Die zweite Probe bestand aus 48,5 µl SAFM und 1,5 µl Fugene Reagenz. Die dritte Kontrollprobe enthielt nur 50 µl SAFM.

In die Eppendorfgefäße, die später die Proben enthalten sollten, wurden 48,5 µl SAFM pipettiert. Es wurden 1,5 µl Fugene-Reagenz hinzugefügt und beides durch vorsichtiges vortexen miteinander gemischt. Die Lösung wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für jede Genkonfiguration (*1, *2, *41) wurden unterschiedliche Ansätze erstellt, die sich in der zugefügte Menge des Exontrapping-Vektors unterschieden. Danach wurden 4 µl Track-CMV dazugeben, gemischt und die Lösung 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Nährmedium aus den 12-well-plates abgesaugt und durch 1 ml frisches Vollmedium pro plate ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung zweimal auf- und abpipettiert und vorsichtig über die jeweilige Schale des 12-well-plates verteilt auftröpfelt. Nach drei auf das 12-well-Plate aufgebrachten Proben, wurde das Plate vorsichtig geschwenkt, so dass die Proben gründlich im Medium verteilt wurden. Nach dem

Auftragen aller Proben wurde das Plate für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.3 Substanzen, Reagentien, Hilfsmittel und Geräte

2.3.1 Substanzen

- Agar: Bacto Agar, Becton, Dickinson and Company, Sparks USA
- Agarose Electrophoresis Grade, invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Agarose: Small DNA Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
- Ampicillin: SERVA, Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- *Aqua ad iniectabilia*: Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
- Borsäure: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- DNA-Längenstandard: 100 bp und 1 kb, Fermentas Life sciences
- dNTP-Mix, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- Dual Promotor TA Kloning-Kit, invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Ethanol: J.T. Baker, 7400 AA Deventer, Netherlands
- Ethidiumbromid: Fluka Biochemica, Buchs, Schweiz
- E.Z.N.A. Cycle Pure Kit, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
- Kanamycin: Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- 6x loading dye (Ladepuffer), Fermentas Life sciences
- 2-Mercaptoethanol, Sigma, Steinheim, Deutschland
- NaCl: J.T. Baker, 7400 AA Deventer, Netherlands
- NucleoSpin Plasmid: MACHEREY-NAGEL GmbH & CO. KG, Düren, Deutschland
- Oligonukleotide (Primer): MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
- One Step RT-PCR Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- PCR-Kits: Gene Amp XL PCR Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
- pCRII-Vektor, invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- pSPL3-Vektor, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- pTracer-CMV2-Vektor, invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Qiagen HiSpeed Plasmid Purification Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA

- Restriktionsendonukleasen: New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
- RNase-Inhibitor (RNAsin): Promega, Madison, WI, USA
- Rneasy Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- Super Script III First strand synthesis system for RT-PCR, invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Taq-Gold: Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
- Taq-Polymerase, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
- Transfektion: Fugene Transfection, Roche Applied Science, Indianapolis, USA und PolyFect, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- Tris Base: Trisma base, Sigma, Steinheim, Deutschland
- Trypsin: Trypsin-EDTA 0,5%, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- Trypton: Bacto Tryptone, Becton, Dickinson and Company, Sparks USA
- Yeast Extract: Bacto Yeast Extract, Becton, Dickinson and Company, Sparks USA

2.3.2 Primer

Standard-PCR #2 (CYP2D6-Genotypisierung)

2F und 2R

Primer	Sequenz	Position
2F	GGA CTC TGT ACC TCC TAT CCA CGT C	2224/2248
2R	CCT CAA CGT ACC CCT GTC TCA AAT	4408/4385

Sequenzierung

2d6mini_F/R

Primer	Sequenz
2d6mini_F	AAA AGG TTG GAC CAG TGC AT
2d6mini_R	GAG ATG CAG GGT GAG AGT GG

Mutagenese

2D6miMutStep1F und 2D6miMutStep1R

Primer	Sequenz
2D6miMutStep1F	GTG GCT GAC CTG TTC TCT GCC GGG ATG
2D6miMutStep1R	CAT CCC GGC AGA GAA CAG GTC AGC CAC

2d6mini_Int1 und *2d6mini_Int2*

Primer	Sequenz	Position
<i>2d6mini_Int1</i>	TCC TAC ATC CGG ATG TGC A	2929/2947
<i>2d6mini_Int2</i>	CTC ACA TGC CCT ACA CCA CT	3223/3242

2D6miMut2988A>G_F und *2D6miMut2988A>G_R*

Primer	Sequenz
<i>2D6miMut2988A>G_F</i>	GGG CCG AGG GAG GAA GGG TAC AGG C
<i>2D6miMut2988A>G_R</i>	GCC TGT ACC CTT CCT CCC TCG GCC C

2d6Uhu_exWT_F und *2d6Uhu_exWT_R*

Primer	Sequenz
<i>2d6Uhu_exWT_F</i>	GGG AAA CAG TGC AGG GGC CGA GGG AG
<i>2d6Uhu_exWT_R</i>	CTC CCT CGG CCC CTG CAC TGT TTC CC

Überprüfung Insert in pSPL3*pSPL3_SD6* und *pSPL3_SA2*

Primer	Sequenz	Position (in Vektorsequenz)
<i>pSPL3_SD6</i>	TCT GAG TCA CCT GGA CAA CC	607/626
<i>pSPL3_SA2</i>	ATC TCA GTG GTA TTT GTG AGC	3245/3265

Spezifische Primer für nested-PCR*SpNestEtrap_F* und *SpNestEtrap_R*

Primer	Sequenz
<i>SpNestEtrap_F</i>	ACC CTG AGA GCA GCT TCA AT
<i>SpNestEtrap_R</i>	GAT GCG GAA GCC CTG TAC T

2.3.3 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Schnittmuster
EcoR I	G AATTC	Überhängende Enden (sticky-end)
Tsp509 I	AATT	Überhängende Enden (sticky-end)
EcoRV	GAT ATC	Glatte Enden (blunt-end)
Pvu II	CAG CTG	Glatte Enden (blunt-end)

2.3.4 Lösungen

Lösungen	Ansatz	Endkonzentration
Agarnährboden	7,5 g Agar suspendiert in 500 ml LB-Medium, nachfolgend autoklaviert	
Ampicillin	40 mg Ampicillin in 8 ml Aai gelöst	50 µg/ml
Ethidiumbromid	10 mg in 1 ml Aai gelöst, zum Gebrauch 1:10 mit Aai verdünnt	1 mg/ml
EDTA	18,6 g Na ₂ EDTAx2H ₂ O, 70 ml Aai und mit 10 M NaOH auf pH 8 eingestellt, mit Aai auf 100 ml aufgefüllt	
IPTG	125 mg IPTG in 5 ml destillierten H ₂ O gelöst und steril filtriert	100 mM
Kanamycin	120 mg Kanamycin in 4 ml Aai gelöst	30 µg/ml
LB-Medium (low salt)	10 g Trypton, 5 g Yeast Extrakt, 5 g NaCl mit demineralisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert, pH 7,4	
Loading dye	18,9 g Glycerin, 25 mg Bromphenolblau und 30 mg Xylencyanol mit Aai auf 50 ml aufgefüllt	6x
SOC-Medium	20 g Trypton, 5 g Yeast Extrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 250 mM KCl auf 900 ml mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt, pH 7 eingestellt, autoklaviert, abkühlen lassen und 10 ml sterile 1M MgCl ₂ Lösung und 20 ml sterile 1 M Glukoselösung dazugegeben	
TBE-Puffer	108 g Tris Base, 55 g Borsäure und 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 mit demineralisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt zum Gebrauch 1:10 verdünnt	1x
X-Gal	20 mg X-Gal gelöst in 1 ml N,N-Dimethylformamid	20 mg/ml

2.3.5 Hilfsmittel und Geräte

- CERTOMAT MV, B.Braun, Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland
- CHEMI Genius², Bio Imaging System, Syngene, Cambridge, United Kingdom
- Elektrophorese-Kammern und Zubehör
 - Sub-Cell GT, Biorad Laboratories GmbH, München, Deutschland
 - Maxi Cell Primo und Mini Cell Primo Electrophoresis Gel System, E-C Apparatus Corporation, Holbrook, N.Y., USA
 - Power Pac basic Power Supply, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- 15 ml und 50 ml Falcons, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Inkubator: Heraeus B5050E
- Küvetten: Präzisionsküvetten aus Quarzglas, Hellma
- Multiply-PCR-Ketten, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Photometer: Smart Spec 3000, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Pipetten: Eppendorf, Hamburg, Deutschland

-
- Pipettenspitzen: Biosphere Filter Tips, 10µl, 100µl und 1000µl, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
 - Reinstwassersystem: Milli-Q Plus, Ultra Pure Water System, Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
 - Sterilwerkbank: Sterilwerkbank Klasse 2, Hera Safe, Typ HS 12, Kendro Laboratory Products
 - Schüttel-Inkubator: Scientific C25 Incubator Shaker, New Brunswick, Edison New York, USA
 - Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - Zellkultur-Medium: Dulbecco's MEM 1x, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
 - Zentrifugen:
 - Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - Beckman J-63, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
 - Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 In-Silico-Analyse der Splice-Site und Versuchs-Strategie

Es sollte der Einfluss des Polymorphismus im Intron 6 (2988G>A) des humanen CYP2D6 Gens auf das Splicing und die dabei entstehenden Spliceprodukte untersucht werden.

Die Arbeitshypothese war, dass durch diesen Polymorphismus, der sich in der *41-Variante findet, das Splicing und die dabei entstehenden Produkte verändert werden. Für die Vorhersage von Splicedonor- und -akzeptorsignalen, wurden die Sequenzen des interessierenden Genabschnittes (Intron 5 bis Intron 7) der einzelnen CYP2D6-Varianten (*1, *2 und *41) in ein Programm (NetGene2 v. 2.4) eingegeben, das die Wahrscheinlichkeit für die Aktivierung einzelner Donor- und akzeptorsignale in diesem Genabschnitt berechnete.

Für die *1 und *2-Variante, die den SNP im Intron 6 nicht aufweisen (2988G), ergaben sich in der Vorhersage der Splicestellen jeweils ein Akzeptorsignal und ein Donorsignal, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit aktiviert werden. Das Akzeptorsignal, für das eine Wahrscheinlichkeit von 0.77 angegeben wurde, erstreckt sich über den Bereich von Base 3161 bis Base 3180 im CYP2D6-Gen. Die ersten 10 Basen dieses Abschnittes werden durch das Splicing entfernt.

Bei dem einzigen Splicedonorsignal, das eine ausreichend hohe Wahrscheinlichkeit (0.8) aufweist, handelt es sich um den Genabschnitt von Base 2940 bis Base 2959. Die ersten 10 Basen dieses Abschnittes befinden sich am Ende von Exon 6 und die letzten 10 Basen am Beginn des Intron 6. Das Splicing findet zwischen einer Cytosin- und einer Guanin-Base statt. Wenn das Splicing zwischen diesen beiden Donor- und Akzeptorsignalen auftritt, ergibt sich ein Spliceprodukt, bestehend aus Exon 6 und Exon 7, mit der Größe von 316 Basenpaaren, wie es in der cDNA von CYP2D6 gefunden wird.

In der Vorhersage der Splicestellen für die *1 und *2-Variante wird ein weiteres Splicedonorsignal angegeben, welches jedoch nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 0.55 aktiviert wird. Dieses liegt im Intron 6 und soll im Folgenden bei der *41-Variante genauer beschrieben werden.

Wenn man die Sequenz der *41-Variante in das Programm für die Vorhersage der Splicestellen eingibt, errechnet sich dieselbe Wahrscheinlichkeit für das Spliceakzeptorsignal. Die Splicedonorstellen, die für das *41-Allel angegeben werden, stimmen mit denen des *1 und *2-Allels überein. Während die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der ersten Donorsite bei 0.8 bleibt, wird durch das Vorliegen der 2988A-

Variante die Wahrscheinlichkeit, dass der zweite Genabschnitt als Donorsite fungiert von 0.55 auf 0.71 erhöht.

Das zweite Donorsignal liegt im Intron 6, umfasst 20 Basenpaare von Base 2983 bis Base 3002 und schließt den Polymorphismus mit ein. Die ersten 10 Basenpaare des Signals liegen nach abgeschlossenem Splicing in einem verlängerten Exon 6, während die letzten 10 Basenpaare durch das Splicing der RNA entfernt werden. Wenn ein Splicing zwischen diesem Donorsignal und dem bekannten Akzeptorsignal eintritt, entsteht ein größeres Spliceprodukt aus Exon 6 und 7, als es bei dem regulären Splicing der Fall ist, da dieses zweite Donorsignal 33 Basenpaare weiter *upstream* im Intron 6 gelegen ist und somit Teile der sonst intronischen Sequenz im Exon 6 zu liegen kommen. Die dabei entstehende Produktgröße beträgt 359 Basenpaare.

Um den Einfluss des Polymorphismus im Intron 6 (2988G>A) des humanen CYP2D6-Gens auf das Splicing und die dabei entstehenden Produkte untersuchen zu können, wurde ein Konstrukt aus dem Exontrapping-Vektor pSPL3 und der jeweiligen Genvariante des CYP2D6 (*1, *2, *41) erstellt. Das Ziel dieses Experimentes war es, die Zelllinie COS7 mit diesen Konstrukten zu transfizieren, um so die entstandenen Spliceprodukte mit Hilfe der PCR nachzuweisen und die Sequenz dieser Produkte zu identifizieren.

Der Exontrapping-Vektor pSPL3 wurde ursprünglich entwickelt, um genomische Sequenzen auf das Vorhandensein von Exons zu untersuchen. Er kann aber auch dafür verwendet werden, um das Splicing in intronischen Sequenzen aufzuzeigen. Dies ist möglich, da der Vektor im *HIV-tat-Genfragment* außer einem Splicedonor- und einem Spliceakzeptorsignal, die die multiple-cloning-site (MCS) flankieren, auch noch zwei in einem definierten Abstand zu den Splicesignalen liegenden Primerbindungsstellen besitzt. Der *forward-primer* wird bezeichnet mit *SD6* und bindet 92 Basenpaare entfernt vom Splicedonorsignal des Vektors, während die Bindungsstelle des *reverse-primers* (*SA2*) 171 Basenpaare vom Spliceakzeptorsignal des Vektors entfernt liegt. Wenn in der MCS des Vektors kein Insert vorliegt oder der Vektor mit sich selber spleißt, ergibt sich bei der mit den spezifischen Primern *SD6* und *SA2* durchgeführten PCR ein Produkt mit der Größe von 263 bp. Wenn jedoch in der MCS ein Insert vorliegt, welches Splicesignale aufweist, wird das jeweilige Splicedonorsignal des Vektors bzw. des Inserts mit dem dazugehörigen Spliceakzeptorsignal des Inserts bzw. Vektors verbunden. Dadurch ergibt sich bei einer nachfolgenden PCR mit den spezifischen Primern ein Produkt, welches aus den 263 bp des Vektors und der Größe des Inserts besteht. Wenn ein Insert ein Intron mit mehreren aktiven Splicesignalen besitzt, die an unterschiedlichen Stellen im Intron

liegen, so ist dies über die variierende Größe der Spliceprodukte in der PCR nachweisbar.

Es wurden drei Varianten eines Genabschnittes des CYP2D6-Gens mit einer Länge von jeweils 954 bp erstellt. Alle drei Varianten beginnen im Intron 5 bei Base 2747 und enden im Intron 7 mit der Base 3700. Die erste Variante stellt der Wildtyp CYP2D6*1 (2850C, 2988G, 3384A und 3584G) dar. Die zweite Variante entsprach CYP2D6*2, welches in der Sequenz von Intron 6 mit der des Wildtyps übereinstimmt (2988G), sich aber durch einen Polymorphismus im Exon 6 (2850C>T) und zwei weitere im Intron 7 (3384A>C und 3584G>A) von *1 unterscheidet. Die dritte erstellte Variante war CYP2D6*41, welches zusätzlich zu den schon in *2 vorkommenden noch einen weiteren Polymorphismus im Intron 6 (2988G>A) aufweist. Abbildung 1 zeigt die Minigen-Konstrukte der einzelnen Genvarianten mit den enthaltenen Polymorphismen, Restriktionsschnittstellen und den verwendeten Primerbindungsstellen.

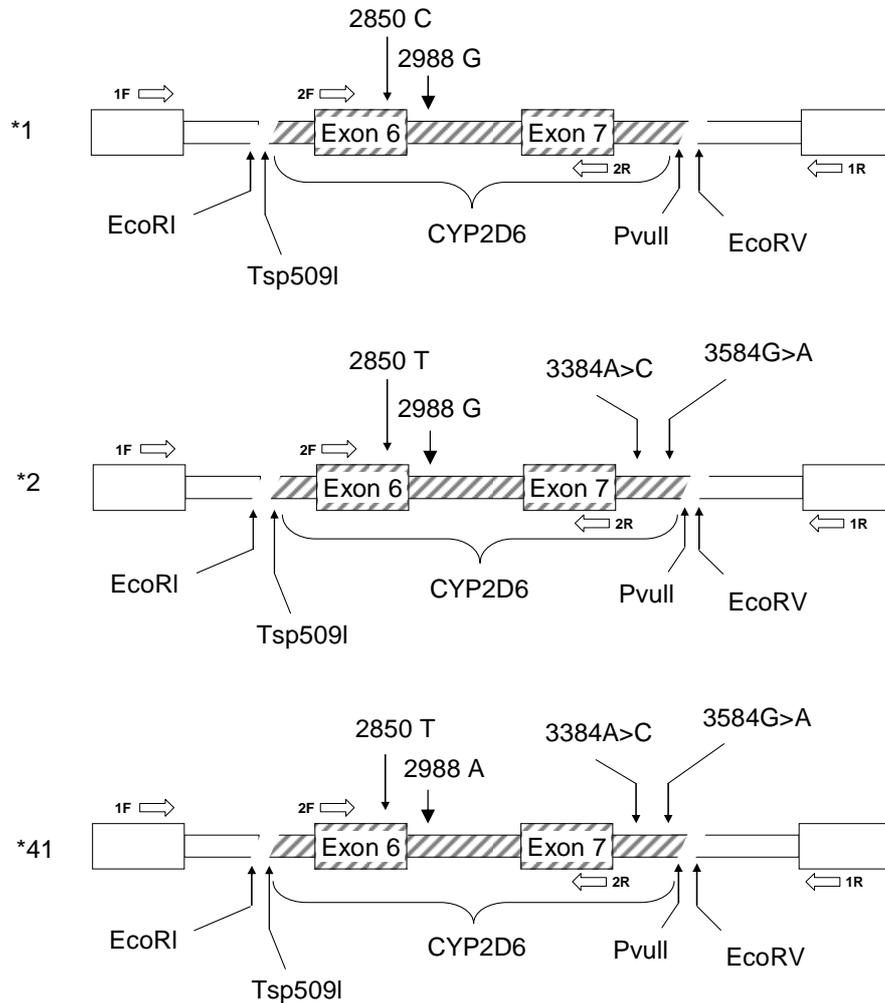


Abbildung 1: Darstellung der Minigen-Konstrukte bestehend aus pSPL3-Vektor und dem Genabschnitt der vom Intron 5 bis Intron 7 des CYP2D6-Gens reicht. Dargestellt sind die verwendeten Konstrukte der unterschiedlichen Genotypen *1/*1, *2/*2 und *41/*41. Die Inserts sind schraffiert dargestellt. Vermerkt sind die Restriktionsenzyme, die zur Verbindung zwischen Insert und Vektor verwendet wurden (EcoRI, Tsp509I, EcoRV und PvuII). Die im Minigen vorkommenden Polymorphismen sind durch senkrechte Pfeile markiert. Die Primer, die für die Einschnitt-RT-PCR verwendet wurden, sind mit 1F und 1R abgekürzt. Die Primer 2F und 2R stellen die für die nested-PCR verwendeten dar.

3.2 Klonierung der genomischen DNA-Abschnitte

Mit genomischer DNA der Genotypen CYP2D6*1/*1, *2/*2 und *41/*41 wurde eine Standard-PCR mit den Primern 2F und 2R durchgeführt, die normalerweise für die Genotypisierung des CYP2D6-Gens verwendet wird. Bei dieser PCR-Reaktion wird ein Produkt erzeugt, das eine Größe von 2162 bp hat und Base 2224 bis Base 4385 des CYP2D6-Gens umfasst. Nachdem die erwartete Produktgröße in der Gelelektrophorese nachgewiesen worden war (Abb. 2), wurden die Produkte mit dem E.Z.N.A Cycle Pure Kit aufgereinigt, mit 1 µl Glycogen und 120 µl absolutem Ethanol ausgefällt, mit dem pCRII-Vektor ligiert und in *E.coli* transformiert.

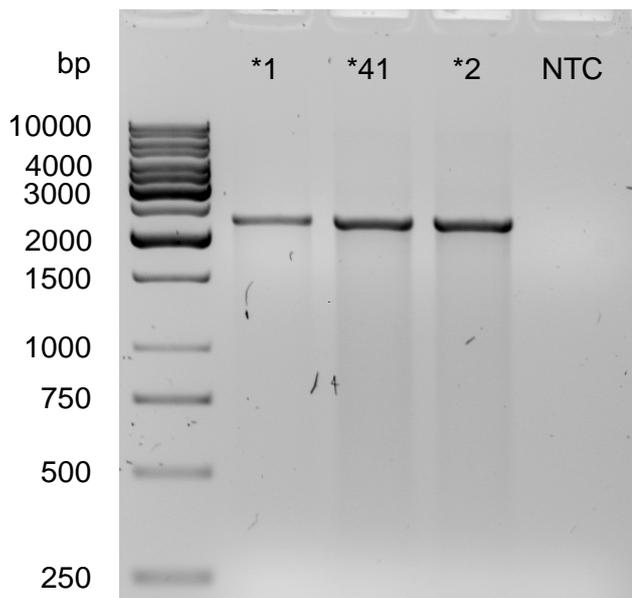


Abbildung 2: PCR-Produkte generiert aus genomischer DNA der Genotypen CYP2D6*1/*1, *2/*2 und *41/*41. Verwendet wurden die Primer 2F und 2R. Die erwartete Produktgröße beträgt 2162 bp. Für alle Varianten konnte ein PCR-Produkt dieser Größe nachgewiesen werden. Spur 1 *1-Allel, Spur 2 *41-Variante, Spur 3 *2-Variante und Spur 4 NTC (*no template control*). Verwendeter DNA-Längenstandard 1 kb.

Nach der Inkubation im Brutschrank zeigte sich eine zu geringe Ausbeute von Klonen auf den Platten, so dass keine Klone gepickt werden konnten. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde eine erneute Transfektion mit 4 µl Ligationsansatz anstatt der vorher verwendeten 2 µl durchgeführt. Auch bei diesem Versuch zeigte sich eine sehr geringe Ausbeute. Es ließen sich dennoch Klone der Varianten *1 und *41 von den Platten gewinnen. Es war jedoch nicht möglich, Klone der *2-Variante von den Platten zu picken. Da sich die Sequenz von *41 und *2 in dem zu untersuchenden Abschnitt des Gens nur durch den Polymorphismus im Intron 6 an der Stelle 2988G>A unterscheidet, wurde beschlossen, durch gezielte Mutagenese mit Hilfe des *Quick Change Site directed mutagenesis Kit* von Stratagene den Genotyp der *2-Variante aus der Sequenz der *41-Variante zu generieren. Bevor dies geschehen konnte, mussten aber

geeignete Klone herausgesucht und deren Sequenz, ebenso wie die der Klone von *1, gesichert werden.

Es wurden Über-Nacht-Kulturen (ÜNK) der gepickten Klone angelegt und nach erfolgter Inkubation bei 37 °C eine Plasmidpräparation der Klone mit dem NucleoSpin Kit durchgeführt. Es folgte ein Endonukleaseverdau der Produkte mit dem Restriktionsenzym EcoRI. Da in der MCS des Vektors zwei EcoRI-Schnittstellen flankierend neben der Klonierungsschnittstelle am Insert gelegen sind, wurden in der nachfolgenden Gelelektrophorese bei aufgenommenem Insert zwei Produkte erwartet. Ein Produkt, welches der Größe des klonierten PCR-Produktes (ca. 2,2 kb) entsprach und eines mit der Größe des pCRII-Vektors (4.0 kb). So erfolgte die Identifizierung der Plasmide, die ein Insert der erwarteten Größe aufgenommen hatten (Abb. 3).

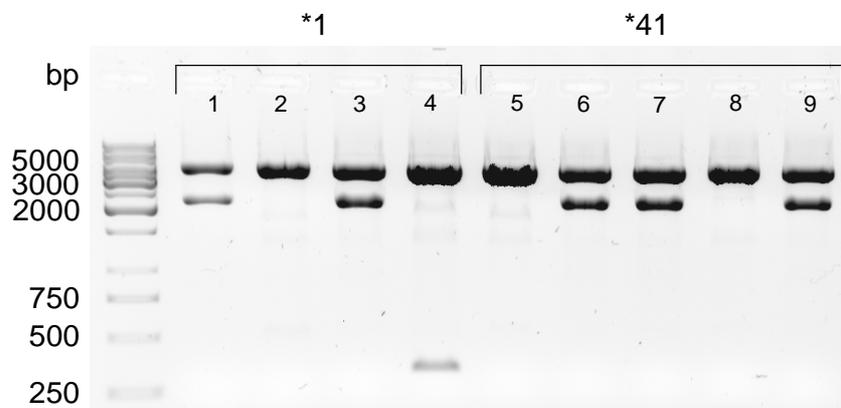


Abbildung 3: EcoRI-Verdau des pCRII-Vektors zum Nachweis der klonierten Inserts der *1-Variante (Spur 1-4) und der *41-Variante (Spur 5-9), verwendeter DNA-Längenstandard 1 kb (in den nicht nummerierten Spuren). Bei in den Vektor aufgenommenem Insert wurden zwei Banden mit den Fragmentgrößen 4.0 kb (Vektor) und 2,2 kb (Insert) erwartet. Bei fehlendem Insert wurde nur eine Bande der Größe 4.0 kb erwartet. Positive Klone sind in den Spuren 1, 3, 6, 7 und 9 zu sehen. Alle anderen Klone wiesen falsche Fragmentgrößen auf. Für die folgenden Experimente wurden die Klone in Spur 1 und 6 verwendet.

Um die genaue Sequenz der enthaltenen Introns nachzuweisen, wurden aus den in Frage kommenden Klonen jeweils zwei der *1-Variante (8L1 und 8L2) und der *41-Variante (91L1 und 91L2) herausgesucht und sequenziert. Für die Sequenzierung wurden die Primer *2d6mini_F* und *2d6mini_R* verwendet.

Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigten, dass sich in jedem der Klone ein Missmatch befand. Es bestand jetzt die Möglichkeit, entweder die Missmatches mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese zu entfernen oder eine erneute Klonierung und nachfolgende Sequenzierung durchzuführen. Da mit der zielgerichteten Mutagenese äußerst zuverlässige Ergebnisse erreicht werden können und durch die erneute Durchführung einer Klonierung nicht sicher hätte gewährleistet werden können, dass

ein fehlerfreier Klon entsteht, wurde beschlossen, je einen sequenzierten Klon pro Variante herauszusuchen und mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese den jeweiligen Missmatch zu entfernen. Es wurden die Klone 8L1 (*1-Variante) und 91L2 (*41-Variante) für die Mutagenese ausgewählt (Abb. 3 Spur 1 und 6).

3.3 Mutagenese um PCR-Fehler zu korrigieren

Es mussten drei Mutagenese-Reaktionen mit drei unterschiedlichen Primer-Paaren durchgeführt werden. In der ersten Reaktion wurde der Missmatch an der Stelle 167 in der Sequenz der *41-Variante korrigiert. Dafür wurden die Primer *2D6miMutStep1F* und *2D6miMutStep1R* verwendet. Nach Durchführung der Mutagenese wurden *E.coli* mit dem Produkt transformiert, eine ÜNK angelegt und nach erfolgter Inkubation eine Plasmidpräparation durchgeführt. Um die Sequenz des Inserts zu überprüfen, wurde eine erneute Sequenzierung zweier präparierter Klone (91mutA und 91mutB) mit den Primern *2d6mini_F* und *2d6mini_Int2* durchgeführt. Es wurde der Primer *2d6mini_Int2* anstelle des Primers *2d6mini_R* verwendet, da dieser näher an der durch Mutagenese veränderten Stelle bindet und damit eine optimale Lesbarkeit in diesem Bereich ermöglicht. Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigen, dass die Sequenz des Klons 91mutA fehlerfrei war. Somit konnte die fertige *41-Variante in den pSPL3-Vektor kloniert werden und auch dafür verwendet werden durch Mutagenese die *2-Variante zu entwickeln.

Der zweite Mutagenese-Schritt diente der Generierung der *2-Konfiguration aus der fertigen *41-Variante. Für diese Mutagenese-Reaktion wurden die Primer *2D6miMut2988A>G_F* und *2D6miMut2988A>G_R* verwendet. Das weitere Vorgehen war analog zum ersten Mutagenese-Schritt. Die Ergebnisse der sequenzierten Klone 20mutA und 20mutB zeigten eine fehlerfreie Sequenz des Klons 20mutB, weshalb dieser für die Weiterarbeit verwendet wurde.

In der dritten und letzten Mutagenese-Reaktion wurde der Missmatch in der *1-Variante korrigiert. Da sich die Sequenz des Wildtyps in dem zu untersuchenden Genabschnitt durch zwei Polymorphismen im Intron 7 (3384A>C und 3584G>A) von der *2-Variante bzw. durch drei SNPs von der *41-Variante unterscheidet, war es einfacher den einzelnen Missmatch aus dem Klon der *1-Variante zu korrigieren, als diesen aus einem der schon fertigen *41- oder *2-Variante aufzubauen. Um den Missmatch aus dem Klon 8L1 (*1-Variante) zu korrigieren, wurde für die Mutagenese-Reaktion das Primerpaar *2d6Uhu_exWT_F* und *2d6Uhu_exWT_R* verwendet. Das weitere Vorgehen war analog zu dem oben geschilderten. Die Ergebnisse der Sequenzierung ergaben, dass der Klon 8mutA eine fehlerfreie Sequenz aufwies und für die Weiterarbeit verwendet werden konnte.

3.4 Unklonierung in den pSL3-Exontrapping-Vektor

Nach der Fertigstellung der einzelnen Genkonstrukte mussten diese in den Zielvektor pSPL3 kloniert werden. Dies wurde mit Hilfe von vier Restriktionsendonukleasen ermöglicht, von denen zwei *blunt-end-cutter* (*PvuII* und *EcoRV*) und zwei *sticky-end-cutter* (*EcoRI* und *Tsp509I*) mit jeweils kompatiblen Enden waren.

Der Exontrapping-Vektor pSPL3 wurde mit *EcoRV* über Nacht bei 37°C geschnitten, mit 300 µl absolutem Ethanol ausgefällt, resuspendiert, danach mit *EcoRI* 1 h bei 37 °C geschnitten, erneut ausgefällt und in 50 µl *AAI* resuspendiert. Die sequenzierten, im pCRII-Vektor vorliegenden, CYP2D6-Varianten wurden mit *EcoRI* 2 h bei 37°C aus dem Vektor ausgeschnitten. Danach wurde der Verdau in einem 0,6% Agarosegel 90 min bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt, die Bande bei 2,16 kb, die das Insert repräsentierte, ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Extraction Kit* aus dem Gel extrahiert (Abb. 4 stellt dies exemplarisch anhand der *41-Variante dar).

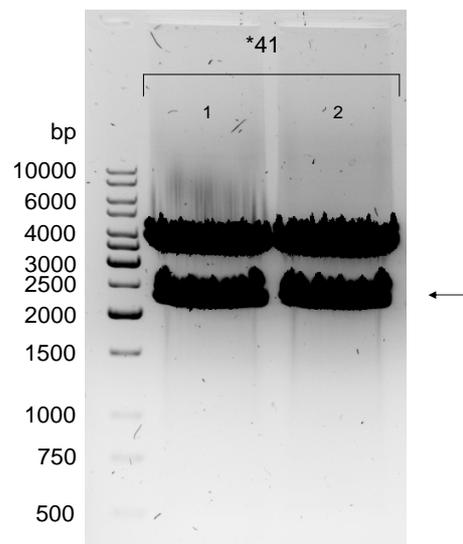


Abbildung 4: *EcoRI*-Verdau des pCRII-Vektors, um das Insert mit *41-Konfiguration aus dem Vektor auszuschneiden. Beide Spuren (1 und 2) enthalten denselben durch Mutagenese generierten und durch nachfolgende Sequenzierung bestätigten Klon. Dieser Verdau diente der Vorbereitung der Umklonierung in den Zielvektor pSPL3. Die Banden der Größe 2,2 kb stellen das Insert da (markiert mit →).

Danach erfolgten die Schnitte mit den Endonukleasen *PvuII* und *Tsp509I*, die Enden für die Verbindung mit dem pSPL3-Vektor schaffen sollten. Da *PvuII* zu Staraktivität neigt, wurde dieser Verdau für 90 min bei 37 °C durchgeführt und direkt danach ein Hitzeinaktivierungsschritt für 20 min bei 80 °C abgeschlossen. Der *Tsp509I*-Verdau wurde durchgeführt, indem 2 µl der Endonuklease direkt mit dem inaktivierten *PvuII*-Verdau vermischt und dieser für 2 h bei 65 °C im Cycler inkubiert wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Verdau in einem 0,6% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 5).

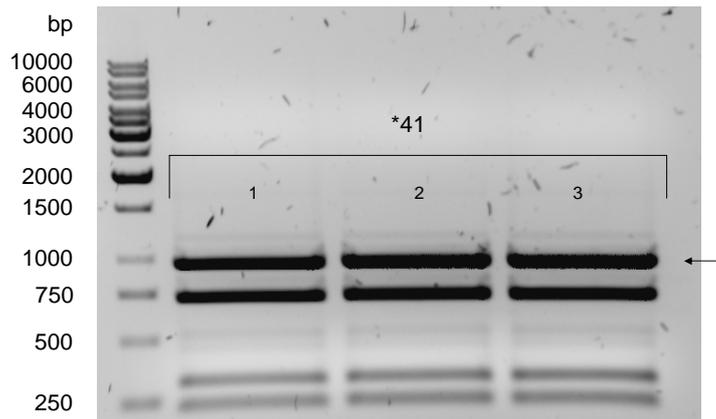


Abbildung 5: PvuII und Tsp509I-Verdau der vorher mit EcoRI aus dem pCRII-Vektor ausgeschnittenen *41-DNA. Durch diesen Verdau wurden ein *blunt-end* (PvuII) und ein *sticky-end* (Tsp509I) erzeugt, über die die Ligation mit dem geschnittenen Zielvektor pSPL3 erfolgte. Alle Spuren (1, 2 und 3) enthalten denselben Klon.

Die erwartete Größe der geschnittenen Produkte betrug 954 bp. Die im Gel sichtbare Bande dieser Größe wurde ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Extraction Kit* extrahiert. Es folgte die Ligation der geschnittenen Genvarianten mit dem geschnittenen pSPL3-Vektor. Nach Transformation und Präparation der Klone wurde zunächst ein 1 stündiger Verdau mit *PvuII* durchgeführt. Bei in den Vektor aufgenommenem Insert sollten zwei Fragmente der Größen 4230 bp und 2717 bp und bei nicht aufgenommenem Insert zwei Fragmente der Größen 4230 bp und 1801 bp entstehen. Da sich in der nachfolgenden Gelelektrophorese zusätzliche, nicht erwartete Banden zeigten, wurden zwei weitere Verdau mit den Endonukleasen *XbaI* und *HindIII* durchgeführt, um die Klone mit aufgenommenem Insert identifizieren zu können (Abb. 6, 7 und 8). Bei dem *XbaI*-Verdau wurde bei nicht aufgenommenem Insert eine Bande bei 6031 bp erwartet und bei vorliegendem Insert eine Bande bei 6947 bp. Bei dem *HindIII*-Verdau sollten sich bei Klonen ohne Insert zwei Banden mit den Größen 3514 bp und 2571 bp zeigen und bei aufgenommenem Insert zwei Banden der Größen 3514 bp und 3433 bp. Von den als positiv identifizierten Klonen wurden von jeder CYP2D6-Variante zwei sequenziert.

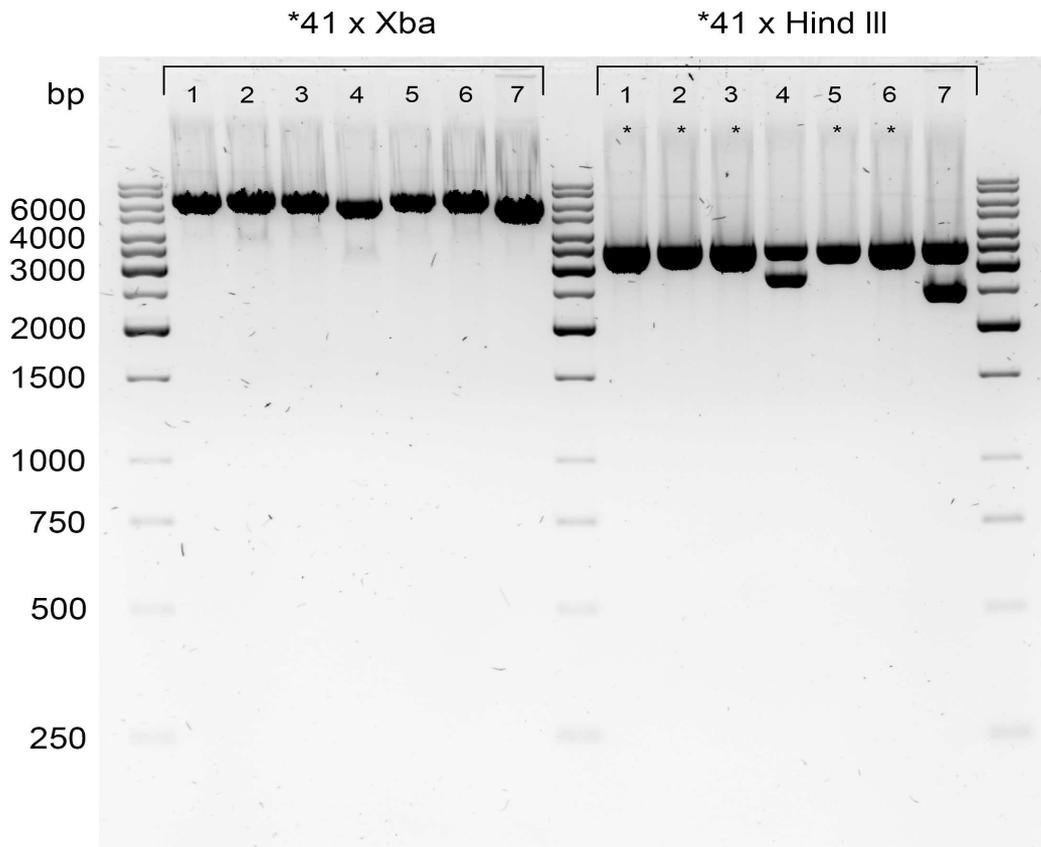


Abbildung 6: XbaI-Verdau und HindIII-Verdau des pSPL3-Vektors zum Nachweis des aufgenommenen Inserts mit *41-Konfiguration. Im HindIII-Verdau sind in den Spuren mit den positiven Klonen aufgrund der kurzen Laufzeit der Elektrophorese noch keine Doppelbanden zu sehen (die Spuren sind mit * gekennzeichnet). Spur 7 zeigt den nativ eingesetzten, geschnittenen pSPL3-Vektor. Verwendeter DNA-Längenstandard 1 kb.

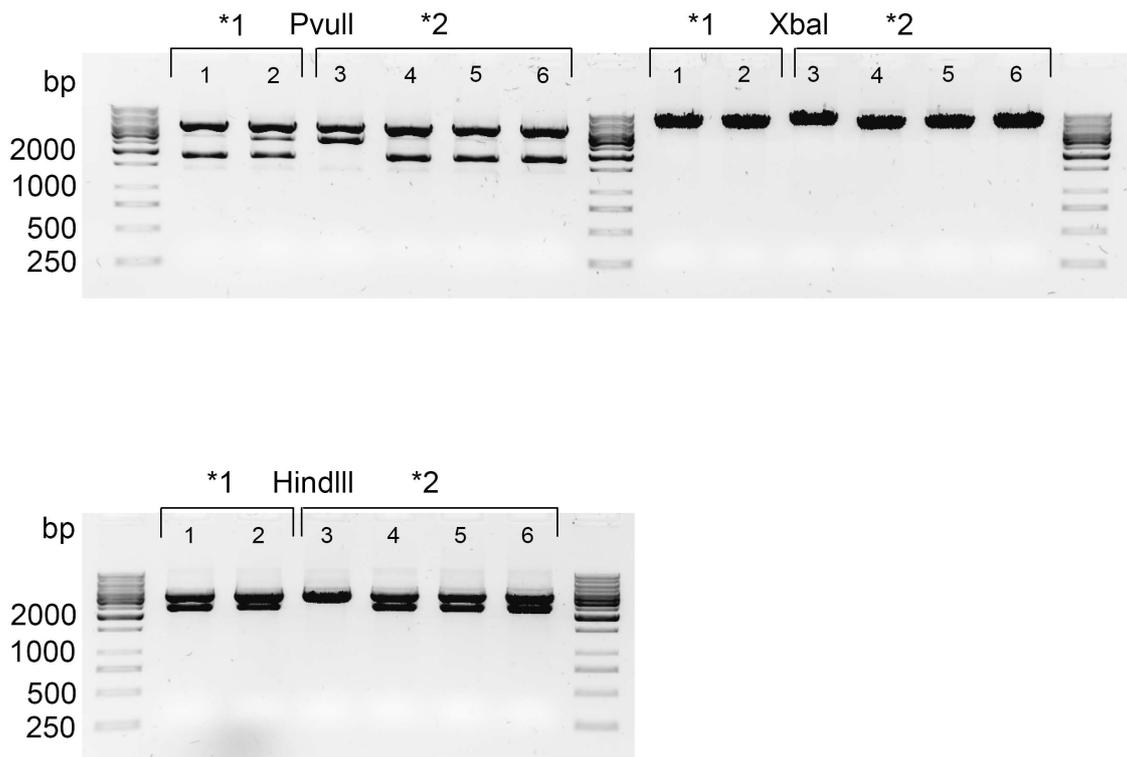


Abbildung 7: PvuII-Verdau, XbaI-Verdau und HindIII-Verdau des pSPL3-Vektors zum Nachweis des aufgenommenen Inserts mit *1- und *2-Konfiguration. Im PvuII-Verdau wurden bei vorliegendem Insert zwei 4230 kb und 2717 kb große Banden erwartet. Bei fehlendem Insert entstand eine 4230 kb und eine 1801 kb große Bande. Die Fragmentgrößen des XbaI- und HindIII-Verdaus entsprachen den bereits bei Abb. 5 geschilderten. Für die *1-Konfiguration konnte kein Klon mit Banden der richtigen Größe nachgewiesen werden. Für die *2-Konfiguration zeigte der Klon in Spur 3 die richtigen Fragmentgrößen. Verwendeter DNA-Längenstandard 1 kb.

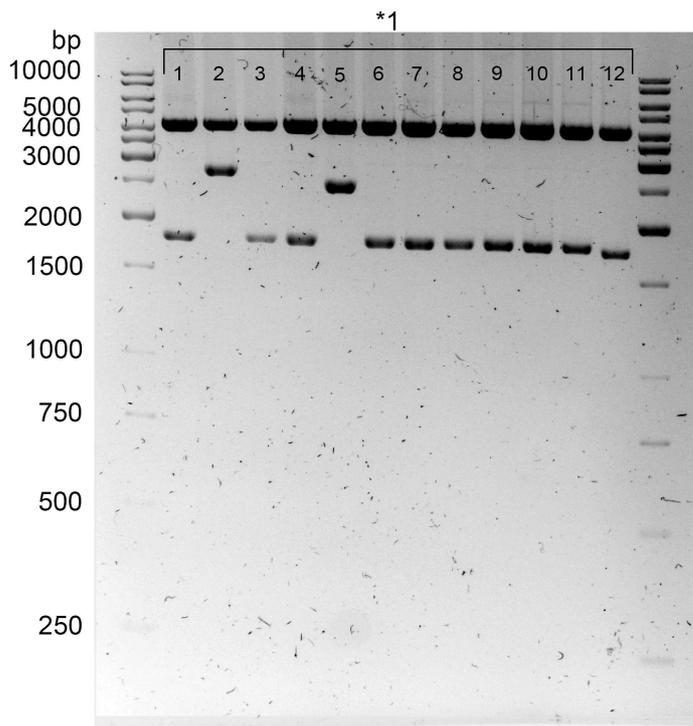


Abbildung 8: PvuII-Verdau (Spur 1-12) des pSPL3-Vektors zum Nachweis des aufgenommenen Inserts mit *1-Konfiguration. Die erwarteten Fragmentgrößen des PvuII-Verdaus entsprachen den bei Abb. 6 geschilderten. Der Klon in Spur 2 weist die richtigen Fragmentgrößen auf. Verwendeter DNA-Längenstandard 1 kb.

Die Klone *91mutA* in *pSPL3#2* (*41-Variante), *20mutB* in *pSPL3#1* (*2-Variante) und *8mutA* in *pSPL3#14* (*1-Variante) zeigten fehlerfreie Sequenzen (entsprechen den Klonen in Abb. 6 Spur 2, Abb. 7 Spur 3 und Abb. 8 Spur 2). Das Alignment und die wesentlichen Sequenzabschnitte sind in Abbildung 9 und 10 dargestellt.

```

Gaed  GAATTGGAGGTCATTTGGGGGCTACCCCGTTCTGTCCCGAGTATGCTCTCGGCCCTGCTC  60
*1    GAATTGGAGGTCATTTGGGGGCTACCCCGTTCTGTCCCGAGTATGCTCTCGGCCCTGCTC  60
*2    GAATTGGAGGTCATTTGGGGGCTACCCCGTTCTGTCCCGAGTATGCTCTCGGCCCTGCTC  60
*41   GAATTGGAGGTCATTTGGGGGCTACCCCGTTCTGTCCCGAGTATGCTCTCGGCCCTGCTC  60

Gaed  AGGCCAAGGGGAACCCTGAGAGCAGCTTCAATGATGAGAACCCTGCGCATAGTGGTGGCTG  120
*1    AGGCCAAGGGGAACCCTGAGAGCAGCTTCAATGATGAGAACCCTGCGCATAGTGGTGGCTG  120
*2    AGGCCAAGGGGAACCCTGAGAGCAGCTTCAATGATGAGAACCCTGTGCATAGTGGTGGCTG  120
*41   AGGCCAAGGGGAACCCTGAGAGCAGCTTCAATGATGAGAACCCTGTGCATAGTGGTGGCTG  120
                                           *

Gaed  ACCTGTTCTCTGCCGGGATGGTGACCACCTCGACCACGCTGGCCTGGGGCCTCCTGCTCA  180
*1    ACCTGTTCTCTGCCGGGATGGTGACCACCTCGACCACGCTGGCCTGGGGCCTCCTGCTCA  180
*2    ACCTGTTCTCTGCCGGGATGGTGACCACCTCGACCACGCTGGCCTGGGGCCTCCTGCTCA  180
*41   ACCTGTTCTCTGCCGGGATGGTGACCACCTCGACCACGCTGGCCTGGGGCCTCCTGCTCA  180

Gaed  TGATCCTACATCCGGATGTGCAGCGTGAGCCCATCTGGGAAACAGTGCAGGGGCCGAGGG  240
*1    TGATCCTACATCCGGATGTGCAGCGTGAGCCCATCTGGGAAACAGTGCAGGGGCCGAGGG  240
*2    TGATCCTACATCCGGATGTGCAGCGTGAGCCCATCTGGGAAACAGTGCAGGGGCCGAGGG  240
*41   TGATCCTACATCCGGATGTGCAGCGTGAGCCCATCTGGGAAACAGTGCAGGGGCCGAGGG  240

```

Gaed	AGGAAGGGTACAGGCGGGGGCCCATGAACTTTGCTGGGACACCCGGGGCTCCAAGCACAG	300
*1	AGGAAGGGTACAGGCGGGGGCCCATGAACTTTGCTGGGACACCCGGGGCTCCAAGCACAG	300
*2	AGGAAGGGTACAGGCGGGGGCCCATGAACTTTGCTGGGACACCCGGGGCTCCAAGCACAG	300
*41	AG A AAGGGTACAGGCGGGGGCCCATGAACTTTGCTGGGACACCCGGGGCTCCAAGCACAG	300
	!	
Gaed	GCTTGACCAGGATCCTGTAAGCCTGACCTCCTCCAACATAGGAGGCAAGAAGGAGTGTCA	360
*1	GCTTGACCAGGATCCTGTAAGCCTGACCTCCTCCAACATAGGAGGCAAGAAGGAGTGTCA	360
*2	GCTTGACCAGGATCCTGTAAGCCTGACCTCCTCCAACATAGGAGGCAAGAAGGAGTGTCA	360
*41	GCTTGACCAGGATCCTGTAAGCCTGACCTCCTCCAACATAGGAGGCAAGAAGGAGTGTCA	360
Gaed	GGGCCGGACCCCCCTGGGTGCTGACCCATTGTGGGGACGCATGTCTGTCCAGGCCGTGTCC	420
*1	GGGCCGGACCCCCCTGGGTGCTGACCCATTGTGGGGACGCATGTCTGTCCAGGCCGTGTCC	420
*2	GGGCCGGACCCCCCTGGGTGCTGACCCATTGTGGGGACGCATGTCTGTCCAGGCCGTGTCC	420
*41	GGGCCGGACCCCCCTGGGTGCTGACCCATTGTGGGGACGCATGTCTGTCCAGGCCGTGTCC	420
Gaed	AACAGGAGATCGACGACGTGATAGGGCAGGTGCGGCGACCAGAGATGGGTGACCAGGCTC	480
*1	AACAGGAGATCGACGACGTGATAGGGCAGGTGCGGCGACCAGAGATGGGTGACCAGGCTC	480
*2	AACAGGAGATCGACGACGTGATAGGGCAGGTGCGGCGACCAGAGATGGGTGACCAGGCTC	480
*41	AACAGGAGATCGACGACGTGATAGGGCAGGTGCGGCGACCAGAGATGGGTGACCAGGCTC	480
Gaed	ACATGCCCTACACCACTGCCGTGATTCATGAGGTGCAGCGCTTTGGGGACATCGTCCCCC	540
*1	ACATGCCCTACACCACTGCCGTGATTCATGAGGTGCAGCGCTTTGGGGACATCGTCCCCC	540
*2	ACATGCCCTACACCACTGCCGTGATTCATGAGGTGCAGCGCTTTGGGGACATCGTCCCCC	540
*41	ACATGCCCTACACCACTGCCGTGATTCATGAGGTGCAGCGCTTTGGGGACATCGTCCCCC	540
Gaed	TGGGTGTGACCCATATGACATCCCCTGACATCGAAGTACAGGGCTTCCGCATCCC T AAGG	600
*1	TGGGTGTGACCCATATGACATCCCCTGACATCGAAGTACAGGGCTTCCGCATCCC T AAGG	600
*2	TGGGTGTGACCCATATGACATCCCCTGACATCGAAGTACAGGGCTTCCGCATCCC T AAGG	600
*41	TGGGTGTGACCCATATGACATCCCCTGACATCGAAGTACAGGGCTTCCGCATCCC T AAGG	600
Gaed	TAGGCCTGGCGCCCTCCTCACCCCAGCTCAGCACCAGCACCTGGTGATAGCCCCAGCATG	660
*1	TAGGCCTGGCGCCCTCCTCACCCCAGCTCAGCACCAGCACCTGGTGATAGCCCCAGCATG	660
*2	TAGGCCTGGCGCCCTCCTCACCCCAGCTCAGCACCAGCCCC T GGTGATAGCCCCAGCATG	660
*41	TAGGCCTGGCGCCCTCCTCACCCCAGCTCAGCACCAGCCCC T GGTGATAGCCCCAGCATG	660
	*	
Gaed	GCTACTGCCAGGTGGGCCCACTCTAGGAACCTGGCCACCTAGTCCTCAATGCCACCACA	720
*1	GCTACTGCCAGGTGGGCCCACTCTAGGAACCTGGCCACCTAGTCCTCAATGCCACCACA	720
*2	GCTACTGCCAGGTGGGCCCACTCTAGGAACCTGGCCACCTAGTCCTCAATGCCACCACA	720
*41	GCTACTGCCAGGTGGGCCCACTCTAGGAACCTGGCCACCTAGTCCTCAATGCCACCACA	720
Gaed	CTGACTGTCCCCACTTGGGTGGGGGGT	747
*1	CTGACTGTCCCCACTTGGGTGGGGGGT	747
*2	CTGACTGTCCCCACTTGGGTGGGGGGT	747
*41	CTGACTGTCCCCACTTGGGTGGGGGGT	747

Abbildung 9: Alignment der Klone (*1, *2 und *41-Konfiguration) im pSPL3-Vektor. Die verwendete Referenzsequenz ist AY545216 von Gaedigk (abgekürzt Gaed). Exon 6 und Exon 7 sind grau unterlegt. Die in der Sequenz vorkommenden Polymorphismen (2850C>T und 3384A>C) sind fett gedruckt und mit einem * markiert. Der untersuchte Polymorphismus 2988G>A ist fett gedruckt und mit einem Ausrufungszeichen markiert.

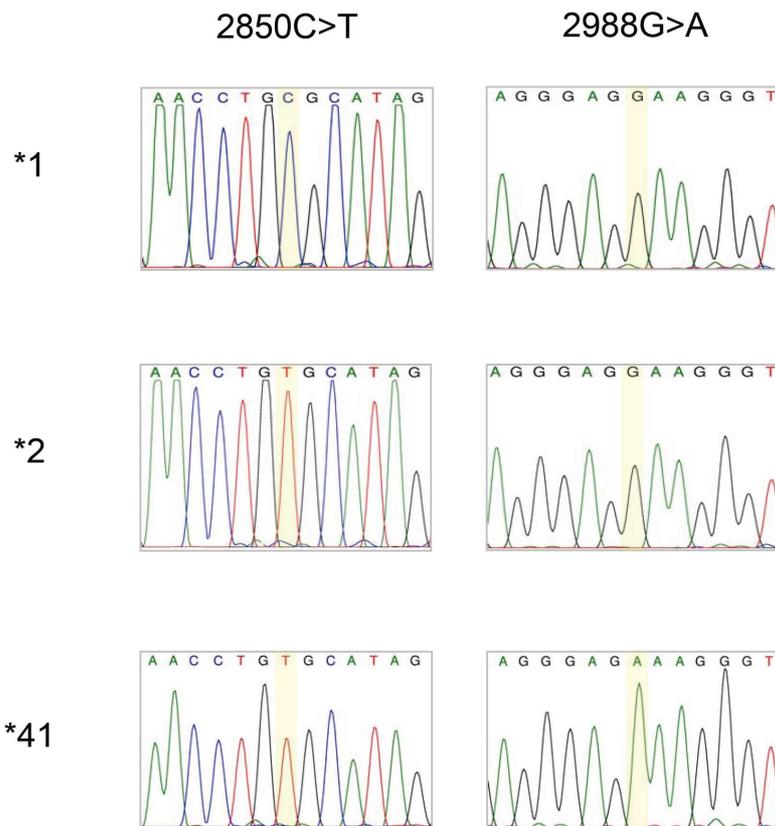


Abbildung 10: Sequenzausschnitte der generierten Klone (*1, *2 und *41) im pSPL3-Vektor. Die dargestellten Abschnitte zeigen die wesentlichen Polymorphismen 2850C>T (linke Spalte) und 2988G>A (rechte Spalte). Die Polymorphismen sind gelb unterlegt.

Die Klone wurden mit je fünf Mini-Plasmidpräparationen vervielfacht. Es wurde erneut ein *PvuII*-Verdau durchgeführt, um das Vorliegen der intakten Minigen-Konstrukte im Vektor nachzuweisen (Abb. 11).

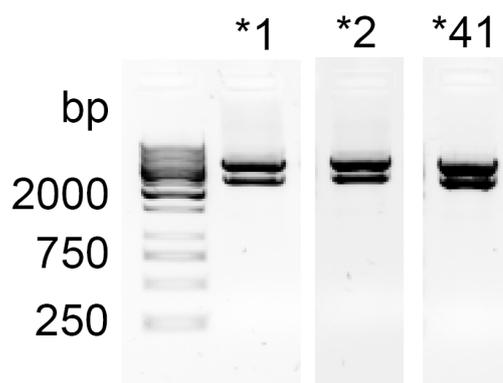


Abbildung 11: *PvuII*-Verdau des pSPL3-Vektors zum Nachweis des durch Sequenzierung bestätigten Inserts der *1-, *2- und *41-Konfiguration. Die erwarteten Fragmentgrößen entsprechen den bereits bei Abb. 6 geschilderten.

Nachfolgend wurde das gewonnene Eluat photometriert. Die Stammlösung der *1-Variante wies eine DNA-Konzentration von 672 µg/ml auf. Die Stammlösung der *2-Variante zeigte eine Konzentration von 693 µg/ml und die der *41-Variante eine

Konzentration von 785 µg/ml. Um Stammlösungen mit identischer Konzentration zu erhalten, wurden alle Lösungen auf 100 ng/ml verdünnt

3.5 Transfektion von COS7-Zellen und Analyse der Spliceprodukte

COS7-Zellen wurden auf einem 12-well-cluster ausgesät und sobald sie konfluent waren mit den drei verschiedenen Genkonstrukten transfiziert. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank für 23,5 h bei 37 °C und 5% CO₂. Die Transfektion erfolgte für jede Variante mit drei unterschiedlichen Konzentrationen. Pro Genvariante wurden je 10 µl, 5 µl und 2,5 µl der Stammlösungen (entspricht 1000 ng, 500 ng, 250 ng DNA) verwendet. Es wurden drei verschiedene Negativkontrollen mitgeführt. Die erste Kontrolle enthielt das Transfektionsreagenz Fugene, Nacktmedium und den Track CMV-Vektor, die zweite Kontrolle Fugene und Nacktmedium und die dritte Negativkontrolle nur noch das Nacktmedium. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits extrahiert und die eluierte RNA photometriert. Die ermittelte RNA-Konzentration der einzelnen Proben lag zwischen 368 µg/ml und 429 µg/ml. Die RNA-Proben wurden unverdünnt in eine One-Step-RT-PCR eingesetzt, bei der die Primer SD6 und SA2 verwendet wurden. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5% Small-DNA-Agarosegel gegeben und 40 min bei 140 V elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 12). Es zeigte sich wie erwartet ein klar dominantes Signal, welches von dem Spliceprodukt der Globinanteile des pSPL3-Vektors erzeugt wurde. Die Größe dieses Produktes betrug 260 bp.

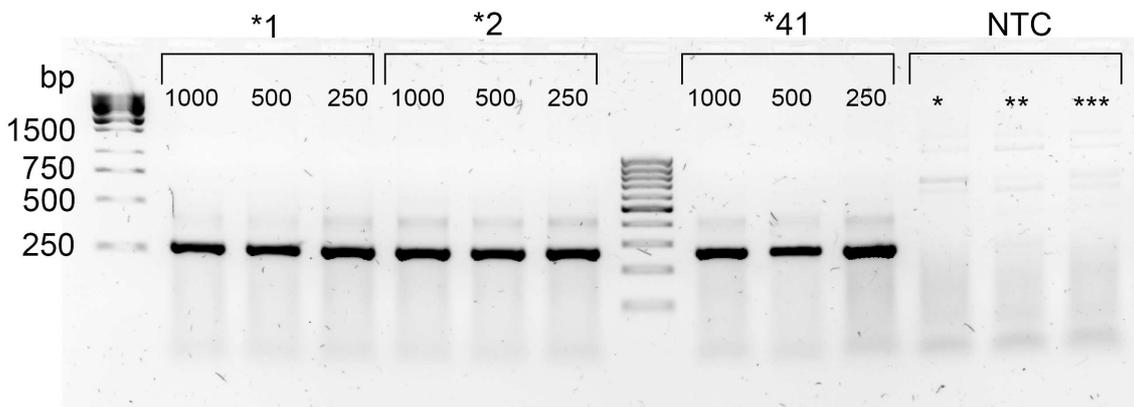


Abbildung 12: Einschritt-RT-PCR-Produkte generiert nach Transfektion von COS7-Zellen mit den einzelnen Genvarianten (*1-Variante, *2-Variante und *41-Variante). Es wurden die Primer SD6 und SA2 verwendet. Pro Variante wurden 1000 ng, 500 ng und 250 ng DNA für die Transfektion eingesetzt (die verwendete DNA-Menge ist an den einzelnen Spuren angegeben). Spur *-*** Negativkontrollen: Spur * (Fugene, Nacktmedium und Track-CMV), Spur ** (Fugene und Nacktmedium) und Spur *** (Nacktmedium), verwendeter DNA-Längenstandard 1 kb und 100 bp.

Anschließend wurde eine nested-PCR mit den spezifischen Primern *SpNestEtrap_F* und *SpNestEtrap_R* durchgeführt. Bei dieser PCR ergaben sich nur Produkte, die Exon 6 und Exon 7 enthielten. Die entstandenen Produkte wurden auf ein 1,5% Small-DNA-Agarosegel gegeben und 40 min bei 140 V elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 13).

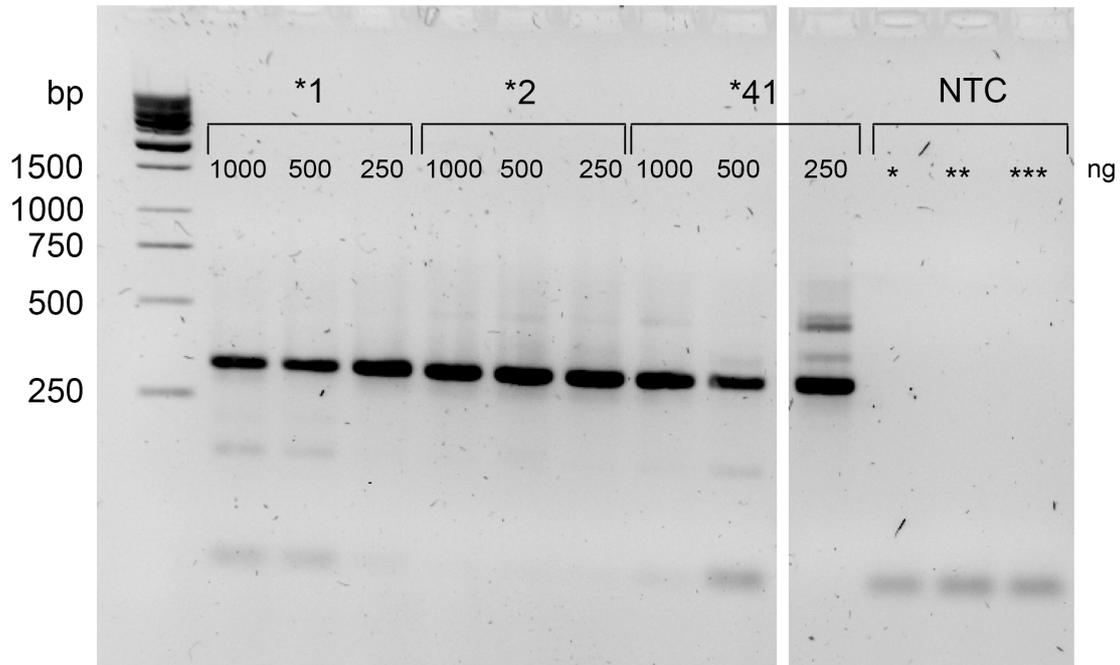


Abbildung 13: Nested-PCR-Produkte generiert aus den Einschnitt-RT-PCR-Produkten mit den Primern *SpNestEtrap_F* und *SpNestEtrap_R*. Spur 1-3 *1-Variante, Spur 4-6 *2-Variante und Spur 7-9 *41-Variante (eingesetzte DNA-Menge in ng ist an den Spuren angegeben), Spur *-*** Negativkontrollen: wie in Abb. 11, verwendeter DNA-Längenstandard 1 kb.

Bei allen drei Konstrukten zeigte sich ein Produkt der Größe von ca. 310 bp. Diese Produktgröße wurde bei korrektem Splicing erwartet. In der 9. Spur, welche die geringste bei der Transfektion verwendete Konzentration der *41-Konfiguration zeigte, fanden sich außer der Bande bei 310 bp noch zwei weitere etwas schwächere Banden bei ca. 360 bp und ca. 510 bp. Die Bande bei 510 bp könnte bei vollständigem Ausbleiben des Splicings auftreten.

Da diese zwei zusätzlichen Signale nur bei der *41-Variante mit der niedrigsten Konzentration nachzuweisen waren, ergab sich die Frage, ob das Splicing und die dabei entstehenden Produkte nicht nur von dem SNP im Intron 6 abhängig waren, sondern auch noch in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Konzentration variierten. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Versuch mit niedrigeren DNA-Konzentrationen wiederholt.

Die eingesetzten Stammlösungen der einzelnen Genvarianten wurden 1:10 verdünnt. Bei der Transfektion wurden für jede Variante 2,5 µl unverdünnte Stammlösung und 10 µl bzw. 2,5 µl verdünnte Stammlösung eingesetzt. Dies entspricht einer

eingesetzten DNA-Menge von 250 ng, 100 ng, 25 ng. Das weitere Vorgehen war analog zu dem vorangegangenen Versuch. Bei der Photometrie zur Bestimmung der RNA-Konzentration ergaben sich Werte zwischen 344 µg/ml und 421 µg/ml. Die Proben wurden unverdünnt in eine One-Step-RT-PCR mit den Primer *SD6* und *SA2* eingesetzt. In der nachfolgenden gelelektrophoretischen Auftrennung zeigte sich das gleiche Bild wie bei dem vorangegangenen Versuch (Abb. 14).

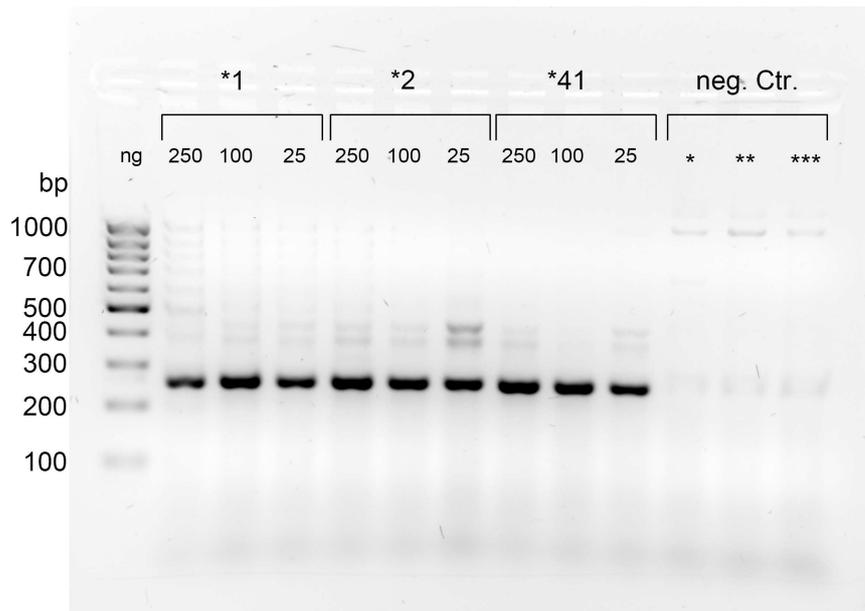


Abbildung 14: Einschritt-RT-PCR-Produkte generiert nach Transfektion von COS7-Zellen mit den einzelnen Genvarianten (*1-Variante, *2-Variante und *41-Variante). Es wurden die Primer *SD6* und *SA2* verwendet. Pro Variante wurden 250 ng, 100 ng und 25 ng DNA für die Transfektion eingesetzt (die verwendete DNA-Menge ist an den einzelnen Spuren angegeben). Spur *...*** Negativkontrollen: Spur * (Fugene, Nacktmedium und Track-CMV), Spur ** (Fugene und Nacktmedium) und Spur *** (Nacktmedium), verwendeter DNA-Längenstandard 100 bp.

Die RT-PCR-Produkte wurden 1:10 verdünnt und eine nested-PCR mit den spezifischen Primern *SpNestEtrap_F* und *SpNestEtrap_R* durchgeführt. In der nachfolgend durchgeführten Elektrophorese zeigte sich in dem verwendeten 1,5% Small-DNA-Agarosegel in den sechs Spuren, die mit den unterschiedlichen Verdünnungen der *1 und *2-Variante belegt waren, nur ein Produkt der Größe von ca. 310 bp (Abb. 15).

In den Spuren der *41-Variante zeigte sich ein anderes Bild. In der ersten Spur zeigten sich zwei PCR-Produkte, ähnlich wie in der Spur 9 im vorangegangenen Versuch. Dabei konnte ein kleines Produkt (ca. 310 bp) und ein größeres Produkt (ca. 360 bp) nachgewiesen werden. Das kleinere Produkt entsprach in seiner Größe den nach Transfektion von *1 bzw. *2 Konstrukten erhaltenen Produkten. Demgegenüber wurde das größere PCR-Produkt ausschließlich nach Transfektion des *41-Konstruktes gefunden. Nach weiterer Erniedrigung der DNA-Konzentration im Transfektionsansatz,

konnte die Bildung des kleineren Produktes nicht mehr nachgewiesen werden. Es war nur noch das größere Produkt nachweisbar. Wurde die zur Transfektion eingesetzte DNA-Menge noch weiter verringert, konnte unter Verwendung der CYP2D6-spezifischen Primer gar kein Produkt mehr nachgewiesen werden, obwohl ein reguläres Splicing der Globin-Exons gezeigt werden konnte (Abb. 14 und 15).

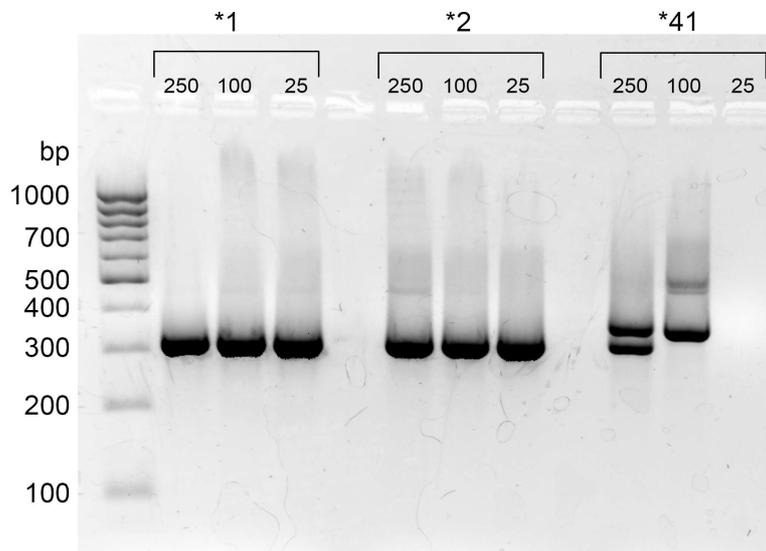


Abbildung 15: Nested-PCR-Produkte generiert aus den Einschritt-RT-PCR-Produkten mit den Primern *SpNestEtrap_F* und *SpNestEtrap_R*. Spur 1-7 zeigen das erwartete reguläre Spliceprodukt der Größe 316 bp. Spur 7 zeigt zudem ein alternatives Spliceprodukt der Größe 359 bp. Spur 8 zeigt nur das aberrante Spliceprodukt (359 bp). In Spur 9 zeigte sich kein Produkt, obwohl durch das klar dominante Signal in der vorangegangenen Einschritt-RT-PCR nachgewiesen worden war (siehe Abb. 9), dass die Transfektion der COS7-Zellen gelungen und das Vektor-Minigen-Konstrukt intakt war. Spur 1-3 *1-Variante, Spur 4-6 *2-Variante und Spur 7-9 *41-Variante (eingesetzte DNA-Menge in ng ist an den Spuren angegeben), verwendeter DNA-Längenstandard 100 bp.

Um nachweisen zu können, dass es sich bei dem Produkt der Größe 316 bp um das reguläre Spliceprodukt und bei dem Produkt der Größe 359 bp tatsächlich um das Spliceprodukt des aberranten Splicings handelt, wurden die Produkte sequenziert.

Die PCR-Produkte wurden aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert. Dabei wurde für *1 und *2 jeweils eine Bande analysiert. Für die *41-Variante wurden die beiden Produkte (316 bp und 359 bp), welche sich in der Spur 7 zeigten und das Produkt der Größe 359 bp, das sich in der Spur 8 zeigte, für die Sequenzierung verwendet. Vor der Sequenzierung der Produkte wurde eine Reinheitskontrolle mit Hilfe einer Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 16).

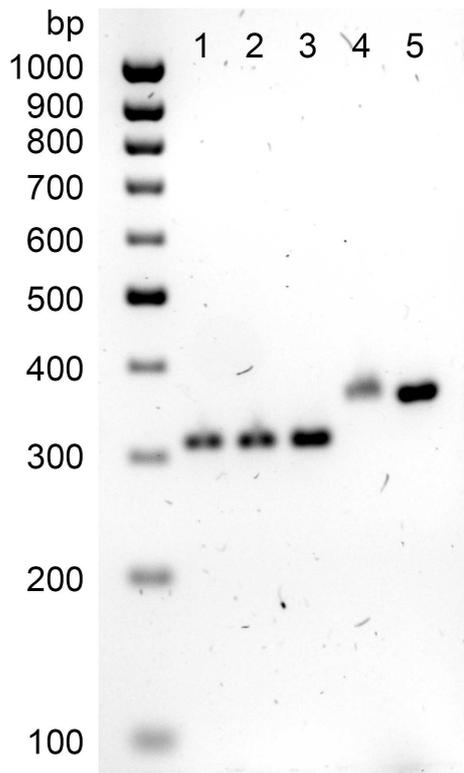


Abbildung 16: Reinheitskontrolle der ausgeschnittenen und aufgereinigten nested-PCR-Produkte der Spuren 3 (*1-Variante), 6 (*2-Variante), 7 und 8 (*41-Variante) aus der vorangegangenen nested-PCR (siehe Abb. 15). Die Banden wurden aus dem 2 % Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Extraction Kit aus dem Gel extrahiert. Die isolierten Produkte wurden nachfolgend sequenziert. Spur 1 *1-Variante, Spur 2 *2-Variante, Spur 3 316 bp großes Produkt der *41-Variante, Spur 4 359 bp großes Produkt der *41-Variante und Spur 5 359 bp großes Produkt der *41-Variante (aus Spur 8 der nested-PCR, Abb. 15), verwendeter DNA-Längenstandard 100 bp.

Es folgte eine Sequenzierung mit den Primern *SpNestEtrap_F* und *SpNestEtrap_R*. Um die geringe Konzentration der eingesetzten DNA auszugleichen, wurden statt der üblicherweise verwendeten 2,5 µl template-DNA 7,5 µl eingesetzt.

Die ermittelten Sequenzen wurden mit der Referenzsequenz der humanen CYP2D6 cDNA und der kompletten kodierenden Referenzsequenz des *1-Allels von CYP2D6 (Gaedigk AY545216) abgeglichen. Der Vergleich mit zwei verschiedenen Referenzsequenzen war aus zwei Gründen notwendig.

Zum einen zeigte sich beim Abgleich der Sequenzen der *1-Variante mit der humanen CYP2D6 mRNA (NM33388) ein vermeintlicher Mismatch. Dieser zeigte sich jedoch nicht bei Abgleich mit der Referenzsequenz des *1-Allels von CYP2D6 (AY545216). Dies bedeutete, dass die Sequenz der *1-Variante fehlerfrei sein musste. Es stellte sich durch diesen Vergleich heraus, dass die Referenzsequenz der humanen CYP2D6 mRNA in *2-Konfiguration vorliegt und es sich bei dem nachgewiesenen Polymorphismus nicht um einen Mismatch, sondern um den für *2 charakteristischen SNP 2850C>T handelte. Durch diesen Vergleich mit beiden Referenzsequenzen wurde

nachgewiesen, dass die sequenzierten Produkte der *1 und *2- Variante fehlerfrei waren. Dies konnte auch für das 316 bp große Produkt der *41-Variante nachgewiesen werden, welches in der Sequenz der Basenabfolge des *2 entsprach.

Zum anderen zeigte sich bei alleinigem Vergleich der Sequenz des größeren Fragmentes (359 bp) der *41-Variante mit der Referenzsequenz der humanen CYP2D6 mRNA eine Sequenz, die an einer Stelle unterbrochen war und dann fehlerfrei weiterlief. Um die zusätzlichen Basen identifizieren zu können, wurde die Sequenz mit der genetischen Sequenz des *1-Allels von CYP2D6 verglichen. So konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den im Spliceprodukt nachweisbaren zusätzlichen Basen um einen intronischen Abschnitt handelte. Abbildung 17 zeigt exemplarisch den Abgleich mit der Referenzsequenz des *1-Allels von CYP2D6 (AY545216).

AY545216	ACCCTGAGAG	CAGCTTCAAT	GATGAGAACC	TGCGCATAGT	GGTGGCTGAC
*1	ACCCTGAGAG	CAGCTTCAAT	GATGAGAACC	TGCGCATAGT	GGTGGCTGAC
*2	ACCCTGAGAG	CAGCTTCAAT	GATGAGAACC	TGT GCATAGT	GGTGGCTGAC
*41k	ACCCTGAGAG	CAGCTTCAAT	GATGAGAACC	TGT GCATAGT	GGTGGCTGAC
*41g	ACCCTGAGAG	CAGCTTCAAT	GATGAGAACC	TGT GCATAGT	GGTGGCTGAC
AY545216	CTGTTCTCTG	CCGGGATGGT	GACCACCTCG	ACCACGCTGG	CCTGGGGCCT
*1	CTGTTCTCTG	CCGGGATGGT	GACCACCTCG	ACCACGCTGG	CCTGGGGCCT
*2	CTGTTCTCTG	CCGGGATGGT	GACCACCTCG	ACCACGCTGG	CCTGGGGCCT
*41k	CTGTTCTCTG	CCGGGATGGT	GACCACCTCG	ACCACGCTGG	CCTGGGGCCT
*41g	CTGTTCTCTG	CCGGGATGGT	GACCACCTCG	ACCACGCTGG	CCTGGGGCCT
AY545216	CCTGCTCATG	ATCCTACATC	CGGATGTGCA	GCGTGAGCCC	ATCTGGGAAA
*1	CCTGCTCATG	ATCCTACATC	CGGATGTGCA	GCG.....
*2	CCTGCTCATG	ATCCTACATC	CGGATGTGCA	GCG.....
*41k	CCTGCTCATG	ATCCTACATC	CGGATGTGCA	GCG.....
*41g	CCTGCTCATG	ATCCTACATC	CGGATGTGCA	GCGTGAGCCC	<i>ATCTGGGAAA</i>
AY545216	CAGTGCAGGG	GCCGAGGGAG	G AAGGGTACA	GGCGGGGGCC	CATGAACTTT
*1
*2
*41k
*41g	<i>CAGTGCAGGG</i>	<i>GCCGAGGGAG</i>	A AAGGG....
AY545216	GCTGGGACAC	CCGGGGCTCC	AAGCACAGGC	TTGACCAGGA	TCCTGTAAGC
*1
*2
*41k
*41g
AY545216	CTGACCTCCT	CCAACATAGG	AGGCAAGAAG	GAGTGTTCAGG	GCCGGACCCC
*1
*2
*41k
*41g
AY545216	CTGGGTGCTG	ACCCATTGTG	GGGACGCATG	TCTGTCCAGG	CCGTGTCCAA
*1	CCGTGTCCAA
*2	CCGTGTCCAA
*41k	CCGTGTCCAA
*41g	CCGTGTCCAA
AY545216	CAGGAGATCG	ACGACGTGAT	AGGGCAGGTG	CGGCGACCAG	AGATGGGTGA
*1	CAGGAGATCG	ACGACGTGAT	AGGGCAGGTG	CGGCGACCAG	AGATGGGTGA
*2	CAGGAGATCG	ACGACGTGAT	AGGGCAGGTG	CGGCGACCAG	AGATGGGTGA
*41k	CAGGAGATCG	ACGACGTGAT	AGGGCAGGTG	CGGCGACCAG	AGATGGGTGA
*41g	CAGGAGATCG	ACGACGTGAT	AGGGCAGGTG	CGGCGACCAG	AGATGGGTGA

Abbildung 17: Alignment der sequenzierten nested-PCR-Produkte. Die zum Abgleich verwendete Sequenz ist die *1-Sequenz AY545216. *41k bezeichnet das Produkt des *41-Allels mit niedrigeren und *41g das Produkt mit höheren Molekulargewicht. Die erste Base des Alignments ist Base 7019 in der AY545216-Sequenz. Dies entspricht Base 2818 in der konventionell genutzten Referenzsequenz NM33388. Die in den einzelnen Variante vorkommenden Polymorphismen (2850C>T und 2988G>A) sind fett dargestellt. Der intronische Anteil, der in der cDNA der *41g-Variante vorliegt, ist kursiv dargestellt.

Bezug nehmend auf die Arbeitshypothese wurde die Sequenz dieses Produktes verglichen mit der Sequenz des aberranten Spliceproduktes der *41-Variante, welches

durch das Vorliegen des SNP im Intron 6 (2988G>A) und das daraus resultierende zweite Donorsignal entstehen könnte. Es zeigte sich, dass die Sequenz des entstandenen Produktes und die des aberranten Spliceproduktes exakt übereinstimmten.

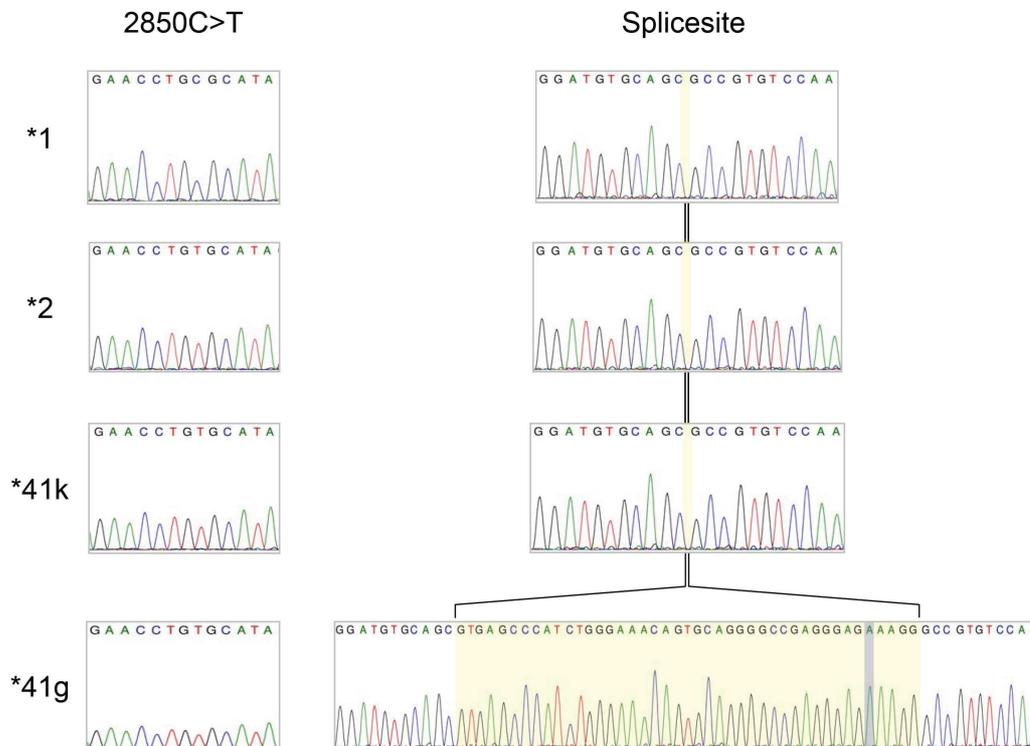


Abbildung 18: Dargestellt sind Abschnitte aus den Spliceprodukt-Sequenzen der Minigen-Konstrukte. Die linke Spalte zeigt den Polymorphismus 2850C>T. Die rechte Spalte stellt den Übergang zwischen Exon 6 und Exon 7 dar. Die letzte Base von Exon 6 und die erste Base von Exon 7 sind durch Striche markiert. Die zusätzlichen Basen des größeren Spliceproduktes der *41-Variante (*41g) sind gelb unterlegt. Der Polymorphismus 2988G>A ist blau unterlegt. In den übrigen Spliceprodukten markiert der gelbe Streifen die Stelle, an der bei der *41g-Variante die zusätzlichen Basen zu finden sind. Das kleinere Spliceprodukt des *41-Minigen-Konstruktes wurde *41k genannt.

Um die möglichen Auswirkungen des veränderten Spliceproduktes auf die Aminosäuresequenz des CYP2D6-Proteins feststellen zu können, wurden die Sequenzen des aberranten Spliceproduktes und die des regulären Spliceproduktes von *41 ebenso wie die Sequenzen von *1 und *2 in das Programm „DNA→Protein“ des „ExpASY (Expert Protein Analysis System) proteomics server“ eingegeben. Dieses Programm ist in der Lage, DNA- und RNA-Sequenzen in die daraus resultierenden Proteinsequenzen zu translatieren.

Es zeigte sich, dass das aus der *1 bzw. *2-Variante und das aus dem regulären Spliceprodukt der *41-Variante entstehende Protein 497 Aminosäuren umfasst, während das aus dem aberranten Spliceprodukt entstehende Protein nur eine Länge von 362 Aminosäuren aufweisen würde. Dies resultiert daraus, dass durch die

zusätzlichen, sonst intronisch liegenden Basen das Spliceprodukt so verändert wird, dass früher in der Basensequenz ein aberrantes Stopcodon entsteht.

Die Proteinsequenz der *1- und *2-Variante stimmen, bis auf die für *2 charakteristischen Aminosäureaustausche (R296C und S486T), miteinander überein. Die aus dem regulären Spliceprodukt der *41-Variante entstehende Proteinsequenz stimmt mit der von *2 überein. Die aus dem aberranten Spliceprodukt der *41-Variante resultierende Sequenz ist bis zur Aminosäure an Stelle 330 mit der Sequenz von *2 identisch. Danach weist das aus der *41-Variante entstehende Protein eine stark abweichende Aminosäuresequenz auf, die nach weiteren 32 Aminosäuren an der Position 362 abbricht (Abb. 19).

Gae	MGLEALVPLAVIVAIFLLLVDLMHRRQRWAARYPPGGLPLPGLGNLLHVDFQNTPYCFDQ	60
*1	MGLEALVPLAVIVAIFLLLVDLMHRRQRWAARYPPGGLPLPGLGNLLHVDFQNTPYCFDQ	60
*2/*41k	MGLEALVPLAVIVAIFLLLVDLMHRRQRWAARYPPGGLPLPGLGNLLHVDFQNTPYCFDQ	60
*41g	MGLEALVPLAVIVAIFLLLVDLMHRRQRWAARYPPGGLPLPGLGNLLHVDFQNTPYCFDQ	60
Gae	LRRRFGDVFSLQLAWTPVVVLNGLAAVREALVTHGEDTADRPPVPITQILGFGPRSQGVF	120
*1	LRRRFGDVFSLQLAWTPVVVLNGLAAVREALVTHGEDTADRPPVPITQILGFGPRSQGVF	120
*2/*41k	LRRRFGDVFSLQLAWTPVVVLNGLAAVREALVTHGEDTADRPPVPITQILGFGPRSQGVF	120
*41g	LRRRFGDVFSLQLAWTPVVVLNGLAAVREALVTHGEDTADRPPVPITQILGFGPRSQGVF	120
Gae	LARYGPAWREQRRFSVSTLRNLGLGKKSLEQWVTEEAACLCAAFANHSGRPFRPNGLLDDK	180
*1	LARYGPAWREQRRFSVSTLRNLGLGKKSLEQWVTEEAACLCAAFANHSGRPFRPNGLLDDK	180
*2/*41k	LARYGPAWREQRRFSVSTLRNLGLGKKSLEQWVTEEAACLCAAFANHSGRPFRPNGLLDDK	180
*41g	LARYGPAWREQRRFSVSTLRNLGLGKKSLEQWVTEEAACLCAAFANHSGRPFRPNGLLDDK	180
Gae	AVSNVIASLTCGRRFEYDDPRFLRLDLAQEGLKEESGFLREVLNAVTVLLHHPALAGKV	240
*1	AVSNVIASLTCGRRFEYDDPRFLRLDLAQEGLKEESGFLREVLNAVTVLLHHPALAGKV	240
*2/*41k	AVSNVIASLTCGRRFEYDDPRFLRLDLAQEGLKEESGFLREVLNAVTVLLHHPALAGKV	240
*41g	AVSNVIASLTCGRRFEYDDPRFLRLDLAQEGLKEESGFLREVLNAVTVLLHHPALAGKV	240
Gae	LRFQKAFLLTQLDELLETEHRMTWDPAQPPRDLTEAFLAEMEKAKGNPESSFNNDENLRIVVA	300
*1	LRFQKAFLLTQLDELLETEHRMTWDPAQPPRDLTEAFLAEMEKAKGNPESSFNNDENLRIVVA	300
*2/*41k	LRFQKAFLLTQLDELLETEHRMTWDPAQPPRDLTEAFLAEMEKAKGNPESSFNNDENLRIVVA	300
*41g	LRFQKAFLLTQLDELLETEHRMTWDPAQPPRDLTEAFLAEMEKAKGNPESSFNNDENLRIVVA	300
	*	
Gae	DLFSAGMVTSTSTTLAWGLLLMLHPDVQRRVQQEIDDVIGQVRRPEMGDQAHMPYTTAVI	360
*1	DLFSAGMVTSTSTTLAWGLLLMLHPDVQRRVQQEIDDVIGQVRRPEMGDQAHMPYTTAVI	360
*2/*41k	DLFSAGMVTSTSTTLAWGLLLMLHPDVQRRVQQEIDDVIGQVRRPEMGDQAHMPYTTAVI	360
*41g	DLFSAGMVTSTSTTLAWGLLLMLHPDVQRRVQQEIDDVIGQVRRPEMGDQAHMPYTTAVI	360
Gae	HEVQRFQDIVPLGVTHMTSRDIEVQGFRIKGTTLITNLSSVLKDEAVWEKPFRRFHPEHF	420
*1	HEVQRFQDIVPLGVTHMTSRDIEVQGFRIKGTTLITNLSSVLKDEAVWEKPFRRFHPEHF	420
*2/*41k	HEVQRFQDIVPLGVTHMTSRDIEVQGFRIKGTTLITNLSSVLKDEAVWEKPFRRFHPEHF	420
*41g	<u>DGX</u> -----	362
Gae	LDAQGHFVKPEAFLPFSAGRRACLGEPLARMELFLFFTSLLQHFSFSVPTGQPRPSHHGV	480
*1	LDAQGHFVKPEAFLPFSAGRRACLGEPLARMELFLFFTSLLQHFSFSVPTGQPRPSHHGV	480
*2/*41k	LDAQGHFVKPEAFLPFSAGRRACLGEPLARMELFLFFTSLLQHFSFSVPTGQPRPSHHGV	480
*41g	-----	
Gae	FAFLVSPSPYELCAVPR	497
*1	FAFLVSPSPYELCAVPR	497
*2/*41k	FAFLVSPSPYELCAVPR	497
*41g	-----	
	*	

Abbildung 19: Alignment der vorhergesagten Aminosäuresequenz der einzelnen Spliceprodukte. Es wurde das Programm „DNA→Protein“ des „ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server“ für die Vorhersage verwendet. Die verwendete Referenzsequenz ist die *1-Sequenz AY545216. Die Beschriftung der einzelnen Varianten ist analog zu der in Abb. 18. Die für die Allele charakteristischen Aminosäureveränderungen sind rosa unterlegt und mit einem Stern markiert. Die von den anderen Produkten abweichende Aminosäuresequenz von *41g ist unterstrichen und kursiv dargestellt. X = Stopcodon

Die Ergebnisse der Sequenzierung bestätigten die ursprünglich aufgestellte Hypothese, dass durch den SNP im Intron 6 der *41-Variante neben dem regulär

entstehenden Spliceprodukt ein alternatives Spliceprodukt entstehen könnte. Mit dem Translationsprogramm „DNA→Protein“ des ExPASy-Severs konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenz, die aus dem aberranten Spliceprodukt entsteht, stark von der des regulären Spliceproduktes abweicht und ein irreguläres Stopcodon aufweist.

4 Diskussion

Die kaukasische Bevölkerung unterscheidet sich deutlich hinsichtlich der enzymatischen Aktivität des CYP2D6. Der häufigste Phänotyp in dieser ethnischen Gruppe ist der des extensive metabolizers (EM), der einen Anteil von ca. 72% ausmacht. EMs weisen eine normale katalytische Aktivität des CYP2D6 auf. Die beiden häufigsten Allele, die diesen Phänotyp bedingen, sind CYP2D6*1 und *2. Während die Allelfrequenz von *1 bei Kaukasiern etwa 40% beträgt, liegt die Häufigkeit von *2 bei ca. 17% (Rau et al. 2002).

Zusätzlich zu den etwa 7-8% der Kaukasier, die ein vollständiges Fehlen der CYP2D6-Aktivität aufweisen (poor metabolizer), besitzen etwa 11% der kaukasischen Bevölkerung eine eingeschränkte enzymatische Aktivität des CYP2D6. Man bezeichnet diese Gruppe phänotypisch als intermediate metabolizer (IM). Die Gruppe wird vor allem von heterozygoten Merkmalsträgern gebildet, die ein Null-Allel (z.B. CYP2D6*4) und ein Allel besitzen, das mit reduzierter Aktivität verbunden ist.

Allele, die mit reduzierter enzymatischer Aktivität assoziiert sind, kommen in verschiedenen ethnischen Gruppen mit unterschiedlicher Häufigkeit vor. In der kaukasischen Bevölkerung ist das am häufigsten vorkommende Allel bei IM das *41-Allel. Die Allelfrequenz des *41-Allels ist bei Kaukasiern ca. 14% (Rau et al. 2002). Unter den kaukasischen Individuen, die phänotypisch IM sind, liegt die Häufigkeit des *41-Allels bei über 60% (Raimundo et al. 2000). Damit ist das *41-Allel das häufigste Allel kaukasischer IM. In vielen afrikanischen und asiatischen Bevölkerungsgruppen werden die vermindert aktiven Allele vor allem von *10 und *17 repräsentiert, so dass in diesen Gruppen das *41-Allel keine so große Bedeutung besitzt wie bei Kaukasiern.

Das *41-Allel, das in der vorliegenden Studie untersucht wurde, ist mit einer Reduktion der CYP2D6-Expression in der Leber assoziiert, wodurch eine verringerte metabolische Kapazität des CYP2D6 resultiert. Dies hat Auswirkungen auf die Plasmakonzentration der CYP2D6-metabolisierten Pharmaka. Zu diesen Arzneimitteln gehören häufig verordnete Substanzen wie z.B. Betablocker, Antidepressiva, Neuroleptika, Opioide und einige Antiarrhythmika.

Aufgrund des häufigen Vorkommens des *41-Allels bei Kaukasiern und seinen deutlichen Auswirkungen auf den Arzneistoffmetabolismus, erscheint es von Bedeutung, die genetische Ursache für die reduzierte enzymatische Aktivität des Genproduktes des *41-Allels zu verstehen. Ein Polymorphismus, der das *41-Allel identifiziert, wurde 2004 von Raimundo et al. entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass 2988A im Intron 6 des *41-Allels den Phänotyp des IM mit größerer Genauigkeit vorhersagen konnte, als der dafür sonst verwendete Promotorpolymorphismus

(-1584C>G). Dieser liegt beim *41-Allel in der -1584C Konfiguration (Wildtypkonfiguration) vor. Vor der Entdeckung der Signatur-Variation 2988A war die Diagnose des *41-Allels nur indirekt möglich, durch den Nachweis von 2850T (gemeinsam für das *2 und das *41-Allel) bei Vorliegen des Promoters in Wildtyp-Konfiguration. Nicht in allen Fällen war auf diese Weise der Genotyp klar zuzuordnen (Raimundo et al. 2000; Rau et al. 2002; Raimundo et al. 2004).

Das Allel *41 ist in den kodierenden Sequenzen identisch mit der *2-Variante (R296C; S486T). Im Gegensatz zum *41-Allel ist das *2-Allel mit einer normalen enzymatischen Aktivität assoziiert, so dass sich in den kodierenden Abschnitten der DNA keine Ursache für den Unterschied in der Aktivität findet.

Die vorliegende Studie untersuchte nun, ob der 2988G>A Polymorphismus im Intron 6 des CYP2D6-Gens das RNA-Splicing eines CYP2D6-Minigens beeinflusst. Die Untersuchung wurde mit Hilfe eines Exon-Trapping-Vektors an transfizierten COS 7-Zellen durchgeführt.

In den Konstrukten, die Sequenzen des *1 bzw. des *2 Allels enthielten, wurde nur ein Produkt in der RT-PCR gefunden, das durch reguläre Verwendung der Donor- und Akzeptorsignale zustande kam. Demgegenüber wurden zwei Veränderungen nach Transfektion des *41-Konstrukts festgestellt. Zum einen zeigte sich, dass neben einem Spliceprodukt der normalen Länge ein größeres, aberrantes Spliceprodukt auftrat. Zum anderen konnten bei Verwendung niedriger DNA-Konzentrationen in der nested PCR keine Produkte mehr amplifiziert werden, wenn CYP2D6-spezifische Primer aus Exon 6 und Exon 7 verwendet wurden. Somit kam es zu einem als Exon-Skipping bezeichneten Vorgang, bei dem ein oder mehrere Exons durch alternatives Splicing der RNA in der reifen mRNA fehlen.

In Zellen, die mit der *41-Variante transfiziert worden waren, fanden sich zwei Transkriptformen. Das eine, kleinere Transkript entsprach dem regulären 316 bp großen Spliceprodukt, welches auch nach Transfektion der *1- und *2-Konstrukte entstand. Die Sequenzierung bestätigte, dass es sich bei diesen Produkten um cDNAs handelte, wie sie durch die physiologische Verwendung der CYP2D6-Splicesignale entstehen.

Bei dem zweiten Transkript handelt es sich um ein alternatives Spliceprodukt, welches nur in den mit der *41-Variante transfizierten Zellen nachweisbar war. Dieses Produkt weist eine Größe von 359 bp auf. Das Produkt entsteht durch die Verwendung einer alternativen Splicedonorsite, die bei der 2988A-Variante im Intron 6 entsteht. Die *in-silico*-Vorhersage dieser alternativen Donorsite stellte den theoretischen

Ausgangspunkt für die Untersuchungen dieser Arbeit dar. Die Hypothese einer alternativen Donorsite-Verwendung konnte also experimentell bestätigt werden.

Die aberrant gespleißte größere mRNA, die durch die Verwendung der alternativen Donor-Site entsteht, enthält Anteile des Introns 6, die physiologischer Weise durch das Splicing entfernt würden. Durch diese zusätzlichen Basen lässt sich zum einen eine veränderte C-terminale Aminosäureabfolge vorhersagen, zum anderen kommt es zum Auftreten eines vorzeitigen Stopcodons, so dass das Protein trunkiert ist. Es ist davon auszugehen, dass das verkürzte Protein nicht funktionell ist, da die evolutorisch konservierte Ligandenbindungsstelle (FSAGRRACLG, aa 436-445) des Proteins für das Eisen-Atom des Häm-Kofaktors deletiert ist. Eine andere mögliche Konsequenz ist, dass das aberrante Spliceprodukt dem nonsense-mediated decay (NMD) unterworfen wird (s.u.).

Da aus dem aberranten Transkript kein funktionsfähiges Protein entsteht, ist die enzymatische Aktivität von *41 von der Menge des regulären Spliceprodukts abhängig. Auch beim *41-Allel entsteht das reguläre Spliceprodukt, welches die genetische Information für das funktionsfähige CYP2D6 enthält. Dies erklärt, warum intermediate metabolizer mit dem *41-Allel phänotypisch keine poor metabolizer (PM) sind. Die Bildung des regulären Spliceprodukts hing in unserem Versuchsansatz von der Menge der zugeführten DNA ab. Bei der Verwendung großer DNA-Mengen (1000 ng, 500 ng) im Transfektionsansatz konnte auch bei Transfektion des *41-Konstrukts nur das reguläre Spliceprodukt nachgewiesen werden. Bei Einsatz von 250 ng DNA konnten beide Spliceprodukte, das reguläre und das aberrante Transkript, nachgewiesen werden. Bei Einsatz einer DNA-Menge von 100 ng konnte nur noch das alternative Spliceprodukt detektiert werden. Bei der niedrigsten eingesetzten Gendosis (25 ng DNA) konnte nach Verwendung von Primern aus Exon6 und Exon7 gar kein Produkt nachgewiesen werden. Da die Bildung kleinerer PCR-Produkte in der Regel von der Reaktionskinetik her begünstigt sind, dürfte das Ausmaß der Bildung des korrekten Spliceprodukts eher überschätzt werden. Wesentlich ist, dass die Produkte der ersten PCR, die Primer (SD6 und SA2) aus den konstitutiven Exons des Vektors verwendet, in allen untersuchten Reaktionen (auch bei der Transfektion mit 25 ng) klar nachweisbar waren, so dass sicher von der Transfektion der Zellen mit einem funktionsfähigen Konstrukt auszugehen ist. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen des Produkts der nested-PCR nach Transfektion mit 25 ng *41-Konstrukt ist ein Exonskipping, das ein oder beide Exons des CYP2D6-Gens mit einbezieht.

Um die erhobenen Befund besser verstehen zu können, sollen hier die wesentlichen Aspekte des Splicings und des alternativen Splicings zusammenfassend dargestellt werden.

Bei der Transkription entsteht in eukaryoten Zellen ein primäres RNA-Transkript (hnRNA), das zahlreichen posttranskriptionellen Modifikationsprozesse unterworfen ist. Sie umfassen die Anheftung einer Kopfgruppe (Cap-Gruppe) am 5'-Ende, Polyadenylierung am 3'-OH-Ende und die Entfernung der Intronsequenzen (Splicing).

Die Cap-Gruppe ist ein notwendiges Signal für den Transport der mRNA durch die Kernporen und dient bei der Translation der Anheftung der mRNA an das Ribosom und dem Auffinden des Startpunktes. Sowohl die Cap-Gruppe als auch der Polyadenylatschwanz am 3'-Ende schützen die mRNA vor dem Abbau durch Nukleasen (Löffler, Petrides 1998).

Das Spleißen des primären RNA-Transkriptes entfernt die intronischen Sequenzen und verbindet die Exons so miteinander, dass ein durchgehendes kodierendes Leseraster entsteht. Die Exon-/Introngrenzen und damit auch die Splicestellen werden durch spezifische Basensequenzen festgelegt. Am 3'-Ende eines Exons liegen etwa 10 unterschiedlich stark konservierte Nukleotide. Das folgende Intron beginnt i.d.R. mit einem GU-Dinukleotid und setzt sich in einer weniger stark konservierten Sequenz fort. Im Intron folgen nun drei Sequenzbestandteile aufeinander. Etwa 20-50 Nukleotide vor dem Beginn des nachfolgenden Exons liegt die Verzweigungsstelle (branch site), die eine wichtige Rolle im Prozess des Splicings spielt. Darauf folgt ein Polypyrimidintrakt und ein terminales AG-Dinukleotid am 3'-Ende des Intron (Stryer 1996).

Für die Durchführung des Splicings ist das Spleißosom von entscheidender Bedeutung. Beim Spleißosom handelt es sich um einen makromolekularen Komplex, welcher die beiden, für das Splicing charakteristischen Umesterungen katalysiert. Es besteht aus verschiedenen snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles), akzessorischen Proteinen und mRNA-Vorläufern.

Der Beginn des Splicings wird über die Bildung des E complex eingeleitet. Der E complex besteht aus dem Ribonukleoprotein U1-snRNP und dem akzessorischen Protein U2AF, welches im späteren Verlauf die Funktion des U2-snRNP unterstützt. U1-snRNP bindet über Basenpaarung an die 5'-Splicestelle. Die 65-kDa Untereinheit des dimerischen U2AF bindet an den Polypyrimidintrakt des Introns. Das U2-snRNP bindet an die Verzweigungsstelle im Intron und sorgt durch die anschließende Assoziation von U1 und U2 für die räumliche Annäherung von 3'- und 5'-Ende des Introns. Dadurch kann U1 eine zusätzliche Bindung mit der 3'-Splicestelle eingehen. Ein Komplex aus den restlichen für die Bildung des Spleißosoms benötigten snRNPs U4, U5 und U6 tritt zu U1 und U2 hinzu. U5 bindet an die Exonsequenz der 5'-Splicestelle, die Basenpaarung zwischen U1 und dieser Splicestelle wird aufgelöst und U1 verlässt das Spleißosom. Die Bindung zwischen U4 und U6 wird aufgelöst, wodurch die inhibitorische Wirkung von U4 auf U6 aufgehoben und die katalytische

Aktivität von U6 freigesetzt wird. U6 bindet an Intronsequenzen der 5'-Splicestelle und an U2, welches immer noch mit der Verzweigungsstelle im Intron verbunden ist. Jetzt kann die 2'-OH-Gruppe der Verzweigungsstelle die 5'-Splicestelle angreifen, so dass eine Lasso-Struktur innerhalb des Introns entsteht. Das dadurch frei vorliegende 3'-OH-Ende des upstream gelegenen Exons kann nunmehr die 3'-Splicestelle angreifen, wodurch beide Exons miteinander verbunden werden. U2, U5 und U6 bleiben an das in Lassoform vorliegende Intron gebunden und werden mit ihm freigesetzt. Mit diesem Vorgang wird das Splicing abgeschlossen (Black 2003; Matlin et al. 2005)

Für das Auffinden der Splicestellen und das korrekte Splicing sind neben den Konsensus-Sequenzen der Intron Grenzen noch weitere wichtige Sequenzelemente der RNA von entscheidender Bedeutung. Bei diesen Elementen handelt es sich um splicing enhancer (SE) und splicing silencer (SS).

Splicing enhancer sind RNA-Sequenzen, an die sich Proteinkomplexe anlagern, die eine Verwendung von schwachen oder regulierten Splicestellen unterstützen. Entsprechende Enhancer können sowohl in Exons als auch in Introns lokalisiert sein. Exonic splicing enhancer (ESE) variieren sehr stark in ihrer RNA-Sequenz. Bei den sich anlagernden Proteinkomplexen handelt es sich zum größten Teil um SR Proteine. SR Proteine bestehen aus einer oder zwei RNP-cs RNA Bindungsstellen und einer RS Domäne, die von repetitiven Arginin-Serin-Dipeptiden gebildet wird. Die Serinbestandteile können unterschiedlich stark phosphoryliert sein, wodurch auch die Aktivität des Proteins reguliert werden kann. Die beiden Hauptbestandteile der SR Proteine haben unterschiedliche Funktionen. Die RNP-cs-RNA Bindungsstellen dienen der Bindung an die RNA-Sequenz. Ein Teil der RS Domäne unterstützt die Interaktion zwischen der RNA und dem Protein. Die RS-Domäne scheint außerdem Interaktionen mit anderen Proteinen zu unterstützen, die für die volle Funktionsfähigkeit der SR Proteine notwendig sind. Durch die Bindung von SR Proteinen an splicing enhancer wird die Basenpaarung zwischen U2AF bzw. U1-snRNP und der jeweiligen Splicestelle gefördert. Ein Beispiel für ein SR Protein, das über die Bindung an ESE das Splicing aktiviert, ist der oben genannte Faktor SF2/ASF (Black 2003; Matlin et al. 2005).

Bei intronic splicing enhancern (ISE) sind einige charakteristische Sequenzelemente identifiziert worden. ISE sind oft aufgebaut aus Kombinationen von aktivierenden und hemmenden Elementen, die sich zu großen RNP-Komplexen zusammenfügen. Zu diesen Bestandteilen von ISE gehören z.B. Uridin-reiche Sequenzen, die sich direkt downstream an die 5'-Splicestelle anschließen und für die Aktivierung der jeweiligen Splicestelle sorgen. Als weiteres wichtiges Element vieler ISE ist das Hexanukleotid UGCAUG zu nennen. Dieses Element wirkt stark aktivierend auf das Splicing, besonders wenn es in duplizierter Form vorliegt. Normalerweise befindet es sich

downstream des aktivierten Exons, wobei einige Bestandteile noch in einer Entfernung von >500 Basen zum Exon zu finden sind. Die Proteingruppe, die die Effekte dieses Hexanukleotids vermittelt ist noch nicht identifiziert worden. Generell gilt für die ISE, dass zwar einige Sequenzelemente identifiziert werden konnten, aber über die interagierenden Proteine noch wenig bekannt ist. Einige der intronic splicing enhancer sind SR Protein-abhängig. Es finden sich bei den ISE aber auch andere Proteinkomplexe, z.B. CELF-Proteine, die über die Bindung an intronic splicing enhancer für die Aktivierung von Splicestellen verantwortlich sind. CELF-Proteine sind eine hoch exprimierte Proteingruppe, die unterschiedlichste Effekte auf den RNA-Metabolismus haben kann (Black 2003).

Bedeutung der Splicing silencer

Die zweite wichtige Gruppe von Sequenzelementen der RNA, die einen großen Einfluss auf die Auswahl der Splicestellen hat, sind Splicing silencer. Auch diese Steruerelemente werden sowohl in Exons als auch in Introns gefunden. Splicing silencer sind RNA-Sequenzen, die über die Interaktion mit Proteinkomplexen die Aktivierung und Verwendung einer Splicestelle vermindern können.

Exonic splicing silencer (ESS) weisen unterschiedliche RNA-Sequenzen auf. Oft interagieren heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) mit den ESS und vermitteln deren inhibitorische Wirkung auf das Splicing. HnRNPs binden über ein RNA recognition motif (RRM) und die KH-Domäne sequenzspezifisch an einzelsträngige RNA. Weitere Bestandteile der HnRNPs treten in Wechselwirkung mit anderen Proteinen. Ein häufig auftretendes HnRNP ist das Protein hnRNP A1, welches sowohl die Wirkung von ESS als auch von intronic splicing silencern (ISS) vermitteln kann.

Ebenso wie ESS weisen intronic splicing silencer (ISS) sehr unterschiedliche RNA-Sequenzen auf. Es gibt bei den ISS unterschiedliche Proteinkomplexe, die mit ihnen in Interaktion treten. Wie bei den ESS wird auch die Wirkung einiger ISS mit Hilfe des hnRNP A1-Proteins vermittelt. Ein weiteres wichtiges Protein im Zusammenhang mit den ISS ist das polypyrimidine tract binding protein (PTB). Es zeigte sich außerdem, dass die SR Proteine die hauptsächlich im Zusammenhang mit der Aktivierung des Splicings über ESE oder ISE gesehen wurden, auch an ISS binden können und darüber das Splicing an bestimmten Splicestellen verhindern können (Matlin et al. 2005).

Die Hemmung des Splicings an ESS und ISS über die Anlagerung von Proteinkomplexen kann über verschiedene Wege erfolgen. Die Proteine können die Anlagerung von Komponenten des Spleißosoms verhindern oder auch die Aktivierung

des Splicings durch Faktoren wie SR Proteine verhindern. Welche Mechanismen verwendet werden, hängt unter anderem von der Position der Bindungsstelle des Proteins ab. Die Wirkung von ISS kann noch über Entfernungen von mehreren hundert Nukleotiden vermittelt werden, was aufgrund der teilweise sehr langen Introns (die durchschnittliche Intronlänge eines humanen Gens beträgt > 3300 nt) notwendig ist (Stamm et al. 2005).

Sowohl über splicing enhancer als auch über splicing silencer lässt sich sagen, dass sich die regulierenden Proteinkomplexe nur über relativ schwache Bindungen an die RNA-Sequenzen anlagern. Dadurch können zum einen die Proteinkomplexe nach dem Splicing durch andere Proteine ausgetauscht werden, was eine dynamische Prozessierung der RNA nach sich zieht. Weiterhin kann die Interaktion zwischen Protein und RNA z.B. durch Konzentrationsänderungen des regulierenden Proteins beeinflusst werden. Auch durch Phosphorylierung der regulatorischen Proteine kann die Protein-Protein-Interaktion modifizieren. Durch gewebespezifisches Vorkommen von Enhancern und Silencern kann die Auswahl einer Splicestelle, sowohl für das reguläre als auch das alternative Splicing, erfolgt über ein komplexes Zusammenspiel der regulatorischen Proteine, die die Funktionen von splicing enhancern und splicing silencern vermitteln.

Bedeutung des alternativen Splicings

Durch die Auswertung von expressed sequence tags (EST) und cDNA-Datensätzen wird geschätzt, dass 35-60% der menschlichen Genprodukte alternativ gespleißt werden (Mironov et al. 1999; Brett et al. 2000; Kan et al. 2001; Modrek et al. 2001). Dieser Prozentsatz erhöht sich auf 74% wenn man DNA-microarray-Experimente zugrunde legt (Johnson et al. 2003). Diese Zahlen zeigen deutlich, dass alternatives Splicing von humanen Genprodukten keinesfalls eine Ausnahme ist, sondern eher als regelhaft auftretender Prozess zu werten ist. Eine wichtigste Funktion des alternativen Splicings ist die Genregulation. Während die Genregulation, die durch den Promotor vermittelt wird meist nur die Höhe der Expression eines Genproduktes verändern kann, bietet das alternative Splicing vielfältige Möglichkeiten der Genregulation. Durch die Auswahl einer alternativen Splicestelle kann die Struktur der mRNA so verändert werden, dass alternative Proteine mit einer veränderten Primärstruktur und Funktion entstehen. Nach bisherigen Erkenntnissen wird alternatives Splicing weit überwiegend in den translatierten Regionen der mRNA beobachtet. Daraus resultieren Veränderungen der Protein-codierenden Region (Okazaki et al. 2002; Zavolan et al. 2003).

Alternatives Splicing kann auch nicht translatierten Regionen am 3'- oder 5'-Ende der RNA betreffen. Die entstehenden mRNA-Varianten können sich beispielsweise in ihrer

Halbwertszeit aber auch der subzellulären Lokalisation unterscheiden. Durch das alternative Splicing kann die Höhe der Expression eines Transkriptes verändert werden. So kann in Geweben, die ein Protein nicht exprimieren, durch das Fehlen essentieller Faktoren, die für ein korrektes Splicing der mRNA notwendig sind, ein Transkript entstehen, das zusätzliche Stopcodons enthält. Diese RNA wird in den nicht exprimierenden Geweben dem nonsense-mediated decay (NMD) zugeführt wird (s.u.). Durch die Beschränkung des korrekten Splicings auf bestimmte Gewebe kann also die Expression des Proteins auf bestimmte Gewebe beschränkt werden. Zwischen dem alternativen Splicing und dem gewebespezifischen Silencing von Genen besteht ein enger Zusammenhang.

Es wird vermutet, dass 15 bis 50% der menschlichen genetisch bedingten Erkrankungen auf Mutationen in Donor-/Akzeptor-Stellen, splicing enhancern (ESE und ISE) und splicing silencern (ESS und ISS) zurückzuführen sind. Dies zeigt die medizinische Relevanz von Mutationen die das Splicing betreffen (Caceres ,Kornblihtt 2002; Cartegni ,Kraimer 2002; Faustino ,Cooper 2003; Pagani ,Baralle 2004). Im Gegensatz zu Mutationen, die zu einer Veränderung der kodierenden Sequenz des Proteins führen, sind die funktionellen Effekte, die durch Veränderungen von Splicesignalen hervorgerufen werden, durch eine in-silico Analyse nicht sicher vorherzusagen.

Erkrankungen, die durch Veränderungen des Splicings der prä-mRNA entstehen

Im Folgenden sollen beispielhaft anhand des isolierten familiären Wachstumshormonmangel Typ II (IGHD II) dargestellt werden, wie vielschichtig Mutationen von Steuersignalen des Splicings sein können.

Beim IGHD II handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die durch Mutationen im Gen des Wachstumshormons (GH1) entsteht. Das Leitsymptom ist Kleinwuchs (Cogan et al. 1994). Das GH1-Gen besteht aus fünf Exons und bildet normalerweise nur einen kleinen Anteil (5-10%) alternativ gespleißter mRNA (Lecomte et al. 1987). Während das reguläre Wachstumshormon eine Masse von 22 kD aufweist, haben die durch alternatives Splicing entstandenen Proteine eine geringere Masse von 20 kD (durch Fehlen der ersten 45 nt. im Exon 3) bzw. 17,5 kD (durch komplettes Exonskipping des Exon 3). Die physiologische Funktion der kleineren Isoformen ist noch nicht geklärt.

Es gibt mehrere Mutationen, die durch ein verändertes Splicing des Exons 3 zum IGHD II führen. Dabei können von den Mutationen sowohl ein intronic splice enhancer, als auch ein exonic splice enhancer oder die 5'-Donor-Splice Stelle betroffen sein, die

dadurch in ihrer Funktion beeinträchtigt sind (Binder et al. 1996; Cogan et al. 1997; Moseley et al. 2002).

Im Intron, das downstream auf das Exon 3 folgt, wurden Mutationen beobachtet, die die Funktion des hier lokalisierten ISE stören. Die Mutationen können sowohl Punktmutationen als auch Deletionen von Nukleotiden sein (Cogan et al. 1997). Der betroffene ESE liegt im Exon 3 und seine Funktion kann durch eine G>A Mutation beeinträchtigt werden (Moseley et al. 2002). Daraus resultiert eine vermehrte Bildung sowohl der 20 kD- als auch der 17,5 kD-Isoform. Neben diesen Modifikationen von Splicenhancern wurde auch eine G>A Substitution im ersten Nukleotid des Intron 3 gefunden, die eine Unterbrechung der 5'-Splicestelle bewirkt, so dass wiederum ein Exonskipping des Exon 3 resultiert (Cogan et al. 1997).

Es wird deutlich, dass auch eine einzelne Punktmutation – beispielsweise in einem intronic splicing enhancer – ausreichen, um das Splicing so stark zu stören, dass es zur Auslösung eines Krankheitsbildes kommt.

Der untersuchte Polymorphismus im CYP2D6-Gen beeinflusst zum einen die verfügbaren Splicedonorsignale, unterbricht aber auch eine intronisch lokalisierte splicing enhancer Sequenz, die als Bindungsstelle des Splicingfaktor SF2/ASF dienen kann (Gaedigk et al. 2005). Dieser Splicingfaktor ist nach bisherigen Untersuchungen mit einer Splicing-aktivierenden Wirkung in Exons verbunden. Der Verlust von exonischen SF2/ASF-Bindungsstellen ist beispielsweise als Ursache für die proximale spinale Muskelatrophie (SMA) identifiziert worden. Bei der SMA handelt es sich um ein pädiatrische neuromuskuläre Erkrankung, die autosomal-rezessiv vererbt wird. Durch eine Zerstörung der α -Motoneurone im Rückenmark kommt es zu einer symmetrischen Muskelschwäche und Atrophie der proximalen Bein-, Arm- und später der Rumpfmuskulatur. Die genetische Ursache der Erkrankung findet sich in einem homozygoten Verlust des SMN1-Gens auf Chromosom 5q13. Ein paraloges Gen, das sowohl bei Gesunden als auch bei Erkrankten vorkommt, ist das SMN2-Gen. Obwohl beide Gene eine hohe Übereinstimmung in ihrer Basensequenz zeigen und für zwei Proteine mit identischer Primärstruktur kodieren, ist das SMN2-Gen nur partiell funktionsfähig. Der entscheidende Unterschied zwischen SMN1 und SMN2-Gen findet sich in einem einzelnen Basenaustausch C>T an Position +6 im Exon 7. Diese Mutation führt beim SMN2-Gen zu einer ineffizienten Einfügung des Exon 7 in die mRNA (Lorson et al. 1999; Monani et al. 1999). Bei 80% der mRNAs fehlt durch Exoskipping das Exon 7. Das daraus resultierende abberante Protein ist instabil und inaktiv, wodurch es bei homozygoten Merkmalsträgern zur Ausprägung der Erkrankung kommt. Die Ursache für die schweren Auswirkungen der Mutation liegt in der Unterbrechung eines SF2/ASF-abhängigen exonic splicing enhancer, welcher an

Position +6 im Exon 7 beginnt (Cartegni ,Kraimer 2002). Die Darstellung der genetischen Grundlage der proximalen spinalen Muskelatrophie zeigt die Bedeutung, die dem Splicingfaktor SF2/ASF und dem ihn bindenden ESE zukommen kann. Bislang wurde SF2/ASF allerdings nur im Zusammenhang mit ESE untersucht. Über die möglichen Auswirkungen von SF2/ASF auf ISEs ist noch nichts bekannt.

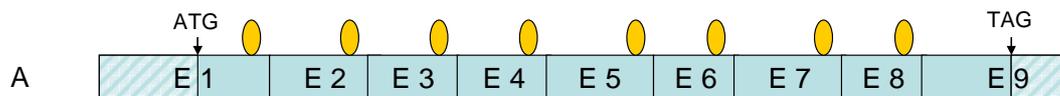
Nonsense-mediated decay (NMD)

Ein sehr wichtiger Kontrollmechanismus, der die Entstehung von enzymatisch inaktiven Proteinvarianten reduziert, ist der nonsense-mediated decay (NMD). Durch den NMD werden fehlerhafte mRNAs, die z.B. durch alternatives Splicing entstanden sind, abgebaut. Die Identifikation solcher mRNAs erfolgt über premature termination codons (PTC). Diese PTCs können durch Mutation in einer Gensequenz, Transkriptionsfehler, alternatives Splicing oder fehlerhaftes Splicing entstehen. Die beiden letztgenannten Prozesse können dazu führen, dass ein Stopcodon aus einem retinierten intronischen Abschnitt in die mRNA eingefügt. Das Fehlsplicing kann auch zu einer Verschiebung des Leserasters führen, die dann ebenfalls zum Auftreten eines aberranten Stopcodons führen kann. Mehr als 30% der mRNAs, die durch alternatives Splicing entstehen, enthalten ein PTC, welches den NMD aktiviert. Jedoch führen nicht alle PTCs zum nonsense mediated decay. Ein wichtiger Faktor, der bestimmt, ob ein Stopcodon den NMD aktiviert, ist der Abstand zur folgenden Exon-Exon-Grenze. PTCs bei denen die nächste Exon-Exon-Grenze mehr als 50-55 nt. downstream gelegen ist, werden dem NMD zugeführt. Reguläre Stopcodons lösen den NMD nicht aus, da sie entweder innerhalb des letzten Exons gelegen sind und somit keine Exon-Exon-Grenze mehr folgt oder, wenn sie nicht im letzten Exon liegen, die folgenden Exon-Exon-Grenzen innerhalb der nächsten 50-55 nt. downstream liegen. Die Annahme, dass die Entfernung zur nächsten Exon-Exon-Grenze das entscheidende Kriterium für die Erkennung eines PTCs ist, wird dadurch unterstützt, dass Gene, die keine Introns und somit auch keine Exon-Exon-Grenzen enthalten, nicht einem NMD unterworfen sind (Lejeune ,Maquat 2005).

Damit Exon-Exon-Grenzen als solche erkannt werden können, müssen diese während des Splicings markiert werden (Maquat 2004). Zunächst binden die cap-bindenden Proteine (CBP80 und CBP20) an das 5'-Ende der noch ungespleißten primären RNA. Danach bindet das poly(A)-bindende Protein (PABP2) an den Polyadenylatschwanz des 3'-Endes der primären RNA. Im nachfolgenden Splicing werden die nicht kodierenden Introns entfernt und die dabei entstehenden Exon-Exon-Grenzen durch den so genannten exon junction complex (EJC) markiert. Der EJC besteht aus einem Proteinkomplex, der mindestens folgende Komponenten enthält: RNPS1 (RNA-binding

protein prevalent during S phase), SRm160 (serin/arginine-related matrix protein of 160 kDa), REF/ALY (RNA and export factor), Y14, UAP56 (U2 snRNP auxiliary factor of 65 kDa associated protein of 56 kDa). Ein so zusammengesetzter EJC bindet im Rahmen des Splicings ~20-24 nt. oberhalb jeder Exon-Exon-Grenze, wodurch diese markiert wird. An den EJC binden noch weitere Faktoren, die eine wichtige Rolle für den NMD spielen. Zu diesen Faktoren gehören: UPF2, UPF3 oder UPF3X und NXF1/TAP (nuclear export factor1, tyrosine-kinase-interacting protein-associated protein).

Das mit diesen Proteinen dekorierte primäre Transkript wird nachfolgend im ersten Durchgang der Translation an (pioneer round) zum ersten Mal von Ribosomen in ein Protein übersetzt. Diese pioneer round kann vermutlich sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma stattfinden. Wenn die mRNA keine aberranten vorzeitigen Stopcodons enthält, werden die mRNPs in einen stabilen Initiationskomplex der Translation umgewandelt. Diese Umwandlung findet statt, indem die EJCs und die dazugehörigen assoziierten UPF-Proteine entfernt werden. CBP80 und CBP20 werden gegen den Initiationsfaktor eIF4E und PABP2 durch PABP1 ausgetauscht. Anschließend an diese Umwandlung kann eine stabile Translation der mRNA erfolgen (Abb. 20)



vor der *pioneer round*



nach der *pioneer round*

Abbildung 20: Darstellung eines mRNA-Modells des CYP2D6 vor und nach dem ersten Translationsdurchlauf (*pioneer round*) bei nicht vorliegendem premature termination codon (PTC). Diese Konstellation ist zu finden beim *1 und *2-Allel. **A:** vor der *pioneer round*: dekoriertes primäres mRNA-Transkript. Mit senkrechten Pfeilen (\downarrow) wurden das Start- und Stopcodon der Translation markiert. Die nicht-translatierten Bereiche sind schraffiert dargestellt. Die gelben Ellipsen stellen den exon junction complex (EJC) dar. E= Exon. **B:** nach der *pioneer round*: mRNA wie sie bei einer stabilen Translation vorliegt. EJCs wurden entfernt und die mRNA der stabilen Translation zugeführt.

Wenn während der pioneer round der Translation ein vorzeitiges Stopcodon auftritt, das mehr als 50-55 nt. upstream von der nächsten Exon-Exon-Grenze entfernt ist, wird der nonsense-mediated decay (NMD) eingeleitet (Abb. 21).

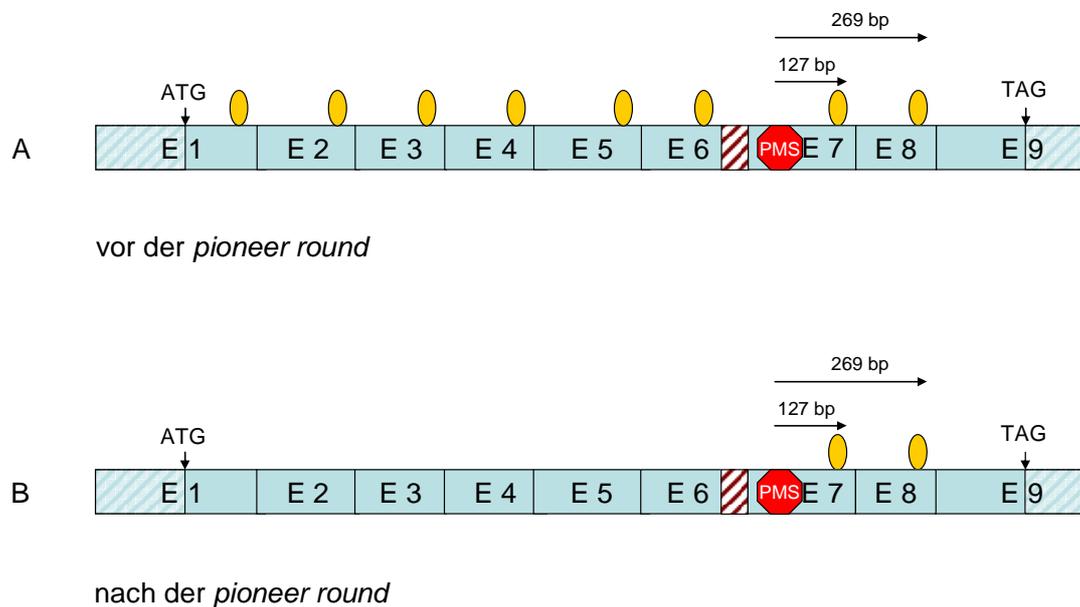


Abbildung 21: Darstellung eines mRNA-Modells des CYP2D6 vor und nach dem ersten Translationsdurchlauf (*pioneer round*) bei vorliegendem *premature termination codon* (PTC). Dieses Modell stellt das *41-Allel dar. **A:** vor der *pioneer round*: dekoriertes primäres mRNA-Transkript. PMS ist in Form eines roten Stop-Zeichens dargestellt. Über den waagerechten Pfeilen sind die Entfernungen zu den nächsten beiden *downstream* liegenden Exon-Exon-Grenzen angegeben. Rot schraffiert dargestellt ist der intronische Anteil, der durch den SNP 2988G>A beim Splicing in die mRNA eingefügt wird. Restliche Beschriftung ist analog zu der in Abbildung 1. **B:** nach der *pioneer round*: Die EJC bis zum *premature termination codon* wurden entfernt, die beiden *downstream* des PMS liegenden EJC bleiben erhalten. Nachfolgend wird der NMD induziert und die mRNA abgebaut.

Eine entscheidende Rolle für die Einleitung des NMD spielen die mit dem EJC assoziierten Proteine UPF2, UPF3/UPF3X und UPF1, welcher nicht fest mit dem EJC verbunden ist. Wahrscheinlich beginnt der NMD am 5'-Ende mit dem Decapping gefolgt von einem weiteren Abbau der mRNA in 5'-3'-Richtung mit Hilfe von Exonukleasen. Auch in 3'-5'-Richtung wird die mRNA durch Exonukleasen abgebaut, nachdem am 3'-Ende eine Deadenylierung durch eine Poly(A)-Ribonuklease (PARN) erfolgt ist (Maquat 2004).

Mögliche Auswirkungen des Intronpolymorphismus der *41-Variante

Nach dieser genaueren Betrachtung des Splicingvorgangs und der beeinflussenden Faktoren wird deutlich, dass auch einzelne Punktmutationen in intronischen

Abschnitten starke Auswirkungen auf das Splicing und die daraus entstehenden Produkte haben können.

Wie bereits dargestellt, wäre durch Translation des größeren Spliceprodukts ein trunkiertes Protein zu erwarten, dem die essentielle Häm-bindende Domäne der P450-Proteine fehlt. Darüber hinaus zeigt eine Analyse der Exon-/Intron-Struktur, das aufgrund der Lage des vorzeitigen Stopcodons in Relation zur nächsten Exon-Exon-Grenze, dass das Transkript dem nonsense-mediated decay zugeführt werden kann.

Das vorzeitige Stopcodons befindet sich 127 bp oberhalb der nachfolgenden Exon-Exon-Grenze, so dass der Abstand mehr als 50-55 bp beträgt, und somit der nonsense mediated decay sehr wahrscheinlich aktiviert wird. Dies würde bedeuten, dass das alternative Transkript nicht translatiert, sondern abgebaut wird, so dass aus dem abberanten Spliceprodukt kein Protein entsteht. Dieser Zusammenhang könnte möglicherweise die reduzierte CYP2D6-Expression in der humanen Leber bei Trägern des *41-Allels erklären.

Offene Fragen

Die Ergebnisse der Studie legen nahe, dass der Polymorphismus 2988G>A im Intron 6 des *41-Allels einen Einfluss auf die verwendeten Splicestellen nimmt. Dadurch wird der nachfolgende Splicingprozess und das dabei entstehende Produkt verändert. Da die Untersuchungen COS7-Zellen und nicht an humanen Hepatozyten durchgeführt wurden, bleibt offen, ob die Ergebnisse auch auf humane Leberzellen übertragbar sind. Die Tatsache, dass bei der *1- und der *2-Variante unabhängig von der Konzentration nur das erwartete Spliceprodukt der Größe 316 bp nachgewiesen werden konnte, zeigt jedoch, dass bei diesen beiden Konstrukten das Zellsystem der COS7-Zellen die zu erwartenden Ergebnisse erbrachte. Dies macht wahrscheinlich, dass auch die Ergebnisse der *41-Variante das in vivo zu erwartende Bild darstellen.

Es stellt sich die Frage, ob die durch das Minigen gewonnenen Ergebnisse auf das vollständige humane Gen übertragbar sind. Bei einem Minigen handelt es sich um ein artifizielles Konstrukt, das nur einige wenige Bestandteile des Gesamtgens enthält. Das in der vorliegenden Studie untersuchte Minigen umfasst nur den Bereich von Intron 5 bis Intron 7. Minigen-Konstrukte sind eine etablierte Technik zur Untersuchung des Splicings und der Auswirkungen von Mutationen in splicing enhancer und splicing silencer. Der Vorteil besteht in einer deutlichen Vereinfachung der Untersuchungsbedingungen. Für das vollständige CYP2D6-Gen müssen zahlreiche Intermediärprodukte erwartet werden, die eine Analyse des Splicingvorgangs erschweren.

Der mögliche Effekt der Gendosis auf die Entstehung der einzelnen Spliceprodukte in vivo lässt sich nicht abschließend beurteilen. In der Untersuchung zeigte sich, dass bei hoher Gendosis nur das reguläre Spliceprodukt, bei mittlerer Gendosis ausschließlich das abberante Spliceprodukt und bei sehr niedriger DNA-Dosis gar kein Produkt nachweisbar ist. Das letztgenannte Ergebnis ist mit einem Exonskipping vereinbar.

Ob dieses Exonskipping durch den vom SNP 2988G>A unterbrochenen splicing enhancer im Intron 6 ausgelöst wird, lässt sich durch die bislang durchgeführten Experimente nicht mit Sicherheit feststellen. Allerdings ist es nahe zu vermuten, dass der Verlust dieses ESE zu dem beobachteten Exon-Skipping beiträgt.

. Derzeit ist nicht bekannt, ob bei IM durch Medikamente oder andere Umwelteinflüsse durch Modulation des Splicings das Verhältnis der Transkripte in Richtung der korrekt gespligten Variante verschoben werden kann.

Zusammengefasst konnte die vorgelegte Untersuchung mehrere Effekte des 2988G>A Polymorphismus auf das Splicing eines CYP2D6-Minigenes dokumentieren. Dabei konnte je nach den experimentellen Bedingungen sowohl ein aberrantes Transkript als auch Exonskipping beobachtet werden. Diese Untersuchungen stützen die Annahme, dass die 2988A-Variante ursächlich für die funktionellen Effekte des CYP2D6*41-Allels sind.

5 Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele: Die katalytische Aktivität des hepatischen Enzyms Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6) zeigt große interindividuelle Unterschiede. Der Phänotyp des intermediate metabolizers ist durch eine deutlich reduzierte enzymatische Aktivität charakterisiert. Dieser Phänotyp wird bei Kaukasiern v.a. bei Trägern des *41-Allels beobachtet, die gleichzeitig ein Null-Allel oder ein weiteres *41-Allel besitzen. Die genetische Variation 2988A im Intron 6 gilt als Signaturpolymorphismus des *41-Allels. Diese Studie untersuchte, ob der Polymorphismus 2988G>A im Intron 6 auch funktionell bedeutsam ist, indem das Splicing des CYP2D6 Gens beeinflusst wird.

Methoden: Ausgehend von genomischer DNA von phänotypisierten Patienten wurde zunächst durch PCR ein genomischer Abschnitt des CYP2D6-Gens amplifiziert und kloniert. Die Patienten waren homozygot für das *1, das *2 bzw. das *41-Allel. Der Bereich vom Intron 5 bis Intron 7 wurde in den Exon-Trapping Vektor pSPL3 kloniert und die richtige Basenabfolge der drei Minigen-Konstrukte durch Sequenzierung verifiziert. Das Splicing wurde nach Transfektion in eukaryotische Zellen untersucht. Die RNA wurde extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Das Splicing wurde durch PCR und nested PCR sowie Sequenzierung untersucht.

Ergebnisse und Beobachtungen: Bei den Genkonstrukten des *1 und *2-Allels wurde nur ein Spliceprodukt nachgewiesen, welches in Größe und Basenabfolge dem erwarteten Produkt (316 bp) entspricht. Im Falle des *41-Allels wurde neben dem regulären Produkt noch ein aberrantes Transkript (359 bp) nachgewiesen, das durch Verwendung einer alternativen Splicedonorsite entstand, die durch die Variation 2988A im Intron 6 bedingt ist. Bei sehr niedriger Konzentration ließ sich trotz gelungener Transfektion und intaktem Konstrukt kein Spliceprodukt nachweisen, das sowohl Exon 6 als auch Exon 7 des CYP2D6-Gens enthielt.

Praktische Schlussfolgerungen: Der Polymorphismus 2988G>A ist funktionell bedeutsam. Bei Vorliegen der 2988A-Variante tritt neben dem physiologischen Spliceprodukt ein aberrantes Spliceprodukt auf, das Teile des Introns 6 enthält. Prüft man die funktionellen Effekte der zusätzlichen Basen, so ergibt sich eine Leserasterverschiebung im C-terminalen Abschnitt und ein vorzeitiges Stopcodon. Das Protein dürfte nicht-funktionell sein, da die Häm-Bindungsstelle deletiert ist. Das Transkript kann zudem dem nonsense-mediated decay unterworfen werden, da das vorzeitige Stopcodon diesen Mechanismus vermutlich aktivieren kann. Der Polymorphismus kann darüber hinaus ein Exonskipping zumindest eines der untersuchten Exons auslösen. Zusammenfassend können alle drei Mechanismen (Frameshift/Deletion), Nonsense mediated decay und Exonskipping zu der Verminderung der *41-assoziierten enzymatischen Aktivität beitragen.

6 Literaturverzeichnis

- Binder G, Brown M, Parks JS (1996) Mechanisms responsible for dominant expression of human growth hormone gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 4047-50
- Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*, 72: 291-336
- Brett D, Hanke J, Lehmann G, Haase S, Delbruck S, Krueger S, Reich J, Bork P (2000) EST comparison indicates 38% of human mRNAs contain possible alternative splice forms. *FEBS Lett*, 474: 83-6
- Caceres JF, Kornblihtt AR (2002) Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet*, 18: 186-93
- Cartegni L, Krainer AR (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet*, 30: 377-84
- Cogan JD, Phillips JA, 3rd, Schenkman SS, Milner RD, Sakati N (1994) Familial growth hormone deficiency: a model of dominant and recessive mutations affecting a monomeric protein. *J Clin Endocrinol Metab*, 79: 1261-5
- Cogan JD, Prince MA, Lekhakula S, Bunday S, Futrakul A, McCarthy EM, Phillips JA, 3rd (1997) A novel mechanism of aberrant pre-mRNA splicing in humans. *Hum Mol Genet*, 6: 909-12
- Committee HCPCAN (2006). Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee.
- Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjoqvist F (1995) Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther*, 274: 516-20
- Eichelbaum M, Kroemer HK, Fromm MF (1997) Impact of P450 genetic polymorphism on the first-pass extraction of cardiovascular and neuroactive drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, 27: 171-199
- Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ (1979) Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol*, 16: 183-7
- Faustino NA, Cooper TA (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*, 17: 419-37
- Gaedigk A, Ndjountche L, Leeder JS, Bradford LD (2005) Limited association of the 2988g > a single nucleotide polymorphism with CYP2D641 in black subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 77: 228-30; author reply 230-1
- Gonzalez FJ, Vilbois F, Hardwick JP, McBride OW, Nebert DW, Gelboin HV, Meyer UA (1988) Human debrisoquine 4-hydroxylase (P450IID1): cDNA and deduced amino acid sequence and assignment of the CYP2D locus to chromosome 22. *Genomics*, 2: 174-9
- Gough AC, Smith CA, Howell SM, Wolf CR, Bryant SP, Spurr NK (1993) Localization of the CYP2D gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. *Genomics*, 15: 430-2
- Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K, Stuvén T, Eichelbaum M (1998) Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics*, 8: 15-26
- Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science*, 302: 2141-4
- Kan Z, Rouchka EC, Gish WR, States DJ (2001) Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs. *Genome Res*, 11: 889-900

- Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ (1989) The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet*, 45: 889-904
- Lecomte CM, Renard A, Martial JA (1987) A new natural hGH variant--17.5 kd-- produced by alternative splicing. An additional consensus sequence which might play a role in branchpoint selection. *Nucleic Acids Res*, 15: 6331-48
- Lejeune F, Maquat LE (2005) Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol*, 17: 309-15
- Löffler G, Petrides P (1998). *Transkription und Posttranskriptionale Modifikation. Biochemie und Pathobiochemie*, Springer. 6. Auflage: 247-251.
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 6307-11
- Lovlie R, Daly AK, Matre GE, Molven A, Steen VM (2001) Polymorphisms in CYP2D6 duplication-negative individuals with the ultrarapid metabolizer phenotype: a role for the CYP2D6*35 allele in ultrarapid metabolism? *Pharmacogenetics*, 11: 45-55
- Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL (1977) Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet*, 2: 584-6
- Maquat LE (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 89-99
- Matlin AJ, Clark F, Smith CW (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 386-98
- Mironov AA, Fickett JW, Gelfand MS (1999) Frequent alternative splicing of human genes. *Genome Res*, 9: 1288-93
- Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C (2001) Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res*, 29: 2850-9
- Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet*, 8: 1177-83
- Moseley CT, Mullis PE, Prince MA, Phillips JA, 3rd (2002) An exon splice enhancer mutation causes autosomal dominant GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 847-52
- Nelson DR (2003) Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution. *Arch Biochem Biophys*, 409: 18-24
- Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW (2004) Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*, 14: 1-18
- Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, Kondo S, Nikaido I, Osato N, Saito R, Suzuki H, et al. (2002) Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature*, 420: 563-73
- Pagani F, Baralle FE (2004) Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet*, 5: 389-96
- Raimundo S, Fischer J, Eichelbaum M, Griese EU, Schwab M, Zanger UM (2000) Elucidation of the genetic basis of the common 'intermediate metabolizer' phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics*, 10: 577-81
- Raimundo S, Toscano C, Klein K, Fischer J, Griese EU, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM (2004) A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 76: 128-38

- Rau T, Heide R, Bergmann K, Wuttke H, Werner U, Feifel N, Eschenhagen T (2002) Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. *Pharmacogenetics*, 12: 465-72
- Ring B, Wrighton S (2000). Industrial viewpoint: Application of in vitro drug metabolism in various phases of drug development. *Metabolic Drug Interactions*. R. Levy, K. Thummel, W. Trager, P. Hansten and M. Eichelbaum. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins: 29-39.
- Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I (1997) Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*, 60: 284-95
- Sachse C, Brockmoller J, Hildebrand M, Muller K, Roots I (1998) Correctness of prediction of the CYP2D6 phenotype confirmed by genotyping 47 intermediate and poor metabolizers of debrisoquine. *Pharmacogenetics*, 8: 181-5
- Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, Thanaraj TA, Soreq H (2005) Function of alternative splicing. *Gene*, 344: 1-20
- Stryer L (1996). *RNA-Synthese und Spleissen*. Biochemie. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH: 905-906.
- Stuven T, Griese EU, Kroemer HK, Eichelbaum M, Zanger UM (1996) Rapid detection of CYP2D6 null alleles by long distance- and multiplex-polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics*, 6: 417-21
- Wilkinson G (2001). *Pharmacokinetics*. Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th edition. Hardman JG, Limbird LE and G. G. A. New York, McGraw-Hill: 3-29.
- Zavolan M, Kondo S, Schonbach C, Adachi J, Hume DA, Hayashizaki Y, Gaasterland T (2003) Impact of alternative initiation, splicing, and termination on the diversity of the mRNA transcripts encoded by the mouse transcriptome. *Genome Res*, 13: 1290-300

7 Abkürzungsverzeichnis

Aai	Aqua ad iniectabilia
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
DDT	Dithiothreitol
ddATP	Didesoxyadenosin-5'-triphosphat
ddCTP	Didesoxycytidin-5'-triphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosin-5'-triphosphat
ddTTP	Didesoxythymidin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
EJC	<i>Exon junction complex</i>
EM	<i>Extensive metabolizer</i>
F	<i>Forward</i>
g	Schleuderziffer
GIT	Guanidinium-Isothiocyanat
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
h	Stunde
IM	<i>Intermediate metabolizer</i>
IPTG	Isopropyl-[beta]-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kV	Kilovolt
LB-Medium	Luria Broth Medium
LD	<i>Loading dye</i> , Ladepuffer
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
Min.	Minute
ml	Milliliter
MR	<i>Metabolic ratio</i> , metabolischer Quotient
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
n	Anzahl
NMD	<i>Nonsense-mediated decay</i>
Nr.	Nummer
NTC	<i>No template control</i> , Kontrolle ohne DNA, "Wasserkontrolle"
nt	Nukleotide
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PM	<i>Poor metabolizer</i>
PTC	<i>Premature termination codon</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase PCR</i>
R	<i>Reverse</i>

s	Sekunde, Si-Einheit sek
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
UM	<i>Ultrarapid metabolizer</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-[beta]-D-Galactopyranosid
NaAc	Natriumacetat
ÜNK	Über-Nacht-Kulturen
V	Volt
Wt	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

8 Danksagung

Herrn Professor Dr. Thomas Eschenhagen danke ich für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit und für die geduldige, kritische und freundliche Unterstützung während der gesamten Studie.

Mein Dank gilt insbesondere auch Herrn Dr. Thomas Rau, der die Arbeit von der Konzeption bis zur Auswertung und Aufarbeitung der Daten hilfreich, zuverlässig, kritisch und ideenreich betreut hat.

Frau Ines Diepenbruck hat mich tatkräftig bei allen Arbeiten im Labor unterstützt. Ihr gilt dafür ebenfalls ein besonderer Dank.

Allen Mitarbeitern des Arbeitsbereiches für Experimentelle Pharmakologie der Universität Hamburg danke ich herzlich für ihre freundliche Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke meinen Eltern für ihre immer fortwährende Unterstützung, ihre Ratschläge und Liebe.

Meiner Schwester Ines danke ich dafür, daß sie nicht nur eine tolle Schwester ist, sondern auch meine beste Freundin.

Meinem Freund David Smyth danke ich dafür, dass er mir immer liebevoll und hilfreich zur Seite steht.

9 Lebenslauf

Name	Silke Juliane Diepenbruck
Geburtsdatum	10. Januar 1980
Geburtsort	Hamburg
Eltern	Dr. Klaus-Peter Diepenbruck Christel Diepenbruck, geb. Thomas
Geschwister	Ines Christina Diepenbruck

Schulbildung

1986 -1990	Grundschule Weusthoffstraße Hamburg
1990 -1997	Heisenberg-Gymnasium Hamburg
1997 -1999	Lessing-Gymnasium Hamburg
Schulabschluss	Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung

August 1999 - Mai 2000	Ausbildung zur staatlich anerkannten Übersetzerin für die Sprachen Deutsch/Englisch
------------------------	---

Hochschulausbildung

seit Oktober 2000	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
März 2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: