

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus dem Institut für

Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie

des Zentrums für Experimentelle Medizin

Direktor: Prof. Dr. T. Eschenhagen

Etablierung eines experimentellen Modells zur funktionellen Charakterisierung von genetischen Varianten des Progesteronrezeptors

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von Justus Stenzig
aus Rosengarten

Hamburg 2010

Als Dissertation angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am 20.05.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, Vorsitzender: Prof. Dr. T. Eschenhagen

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. H. Ehmke

Prüfungsausschuss, 3. Gutachterin: Prof. Dr. G. Rune

1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Der Progesteronrezeptor	1
1.2	Die Transkriptvarianten A und B des Progesteronrezeptors	2
1.3	Polymorphismen im PGR-Gen	3
1.4	Klinische Bedeutung der SNPs im PGR-Gen	4
1.5	Ziele	5
1.6	Versuchskonzept	7
2	<u>Material und Methoden</u>	8
2.1	Material	8
2.1.1	PGR-cDNA-Klone	8
2.1.2	Vektoren	14
2.1.2.1	pAdTrack-CMV	14
2.1.2.2	pAdEasy-1	15
2.1.3	Bakterienstämme	16
2.1.3.1	TOP 10 F ['] -Zellen	16
2.1.3.2	BJ 5183-Ad-1-Zellen	16
2.1.4	Eukaryotische Zelllinien	17
2.1.4.1	HEK293-Zellen	17
2.1.4.2	T47D-Y-Zellen	17
2.2	Methoden	17
2.2.1	Bakteriologische Methoden	17
2.2.1.1	Herstellung von chemisch kompetenten TOP 10 F ['] -Zellen	17
2.2.1.2	Herstellung von BJ 5183-Ad-1-Zellen	18
2.2.2	Methoden zur Manipulation von Nukleinsäuren	18
2.2.2.1	Restriktionsverdau	18
2.2.2.2	Ligation	21
2.2.2.3	Agarosegelelektrophorese	22
2.2.2.4	Präzipitation von Restriktions- und Ligationsprodukten	23
2.2.2.5	Aufreinigung von Reaktionsprodukten	23
2.2.2.6	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	24
2.2.2.7	Transformation chemisch kompetenter E.coli-Bakterien TOP 10 F [']	25
2.2.2.8	Elektroporation kompetenter E.coli-Bakterien BJ 5183	25
2.2.2.9	Vereinzelnung von Bakterienklonen und Flüssigkultur	26
2.2.2.10	PCR-basierte Methoden	26

2.2.2.11	Plasmidextraktion aus E.coli-Bakterien	36
2.2.3	Adenovirales Expressionssystem	37
2.2.3.1	Rekombinations-Colony-PCR	40
2.2.4	Zellbiologische Methoden	41
2.2.4.1	Kultur von HEK293-Zellen und T47D-Y-Zellen	41
2.2.4.2	Beschichten von Zellkulturschalen	41
2.2.4.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen	42
2.2.4.4	Aussäen, Passagieren und Ernten von Zellen	42
2.2.4.5	Transfektion von HEK293-Zellen	43
2.2.4.6	Virusanzucht und Aufbereitung	43
2.2.4.7	Western-Blot	45
2.2.4.8	Radioaktivitäts-Bindungs-Assay	47
2.2.4.9	EIA	48
2.2.4.10	Proteinkonzentrationsbestimmung für EIA und quantitativen Western-Blot	48
2.2.4.11	DNA-Extraktion aus Viren zur Sequenzierung	50
2.2.4.12	Zellernte für quantitative <i>real-time</i> -PCR	50
2.3	Substanzen, Lösungen, Geräte und Hilfsmittel	51
2.3.1	Substanzen	51
2.3.2	Lösungen	53
2.3.3	Hilfsmittel und Geräte	55
3	<u>Ergebnisse</u>	58
3.1	Experimentelle Strategie	58
3.2	Umklonierung	60
3.3	Amplifikation des Ligationsproduktes	62
3.4	Überprüfung der Ligation	62
3.5	Integration der PGR-Expressionskassette in das adenovirale Genom	64
3.6	Virusanzucht	70
3.7	Analyse der exprimierten Rezeptoren	72
3.7.1	Western-Blot	72
3.7.2	Sequenzierung	73
3.7.3	Progesteronbindung	76
3.8	Titrierung	77
3.9	Quantifizierung der mRNA progesteronregulierter Gene	81

<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	<u>87</u>
4.1	Vorliegende funktionelle Daten	87
4.2	Klinische Aspekte	90
4.3	Ausblick	93
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>94</u>
<u>6</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>96</u>
<u>7</u>	<u>Danksagung</u>	<u>101</u>
<u>8</u>	<u>Lebenslauf</u>	<u>102</u>
<u>9</u>	<u>Eidesstattliche Versicherung:</u>	<u>103</u>

1 Einleitung

1.1 Der Progesteronrezeptor

Der humane Progesteronrezeptor (PGR) ist ein Steroidhormonrezeptor und damit ein ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor. Als Steroidhormonrezeptor besitzt er den gleichen modularen Aufbau wie andere Vertreter dieser Rezeptorklasse, beispielsweise der Östrogenrezeptor oder der Vitamin-D-Rezeptor. Und wie diese verfügt auch der Progesteronrezeptor – vereinfacht dargestellt – über drei funktionelle Domänen, eine ligandenbindende Domäne (E-Domäne), eine DNA-bindende Domäne (C-Domäne) sowie eine weitere Domäne (A/B-Domäne), in der die transkriptionsbeeinflussenden Eigenschaften lokalisiert sind (Tsai et al. 1994) (Abbildung 2). In seiner inaktivierten Form liegt der Progesteronrezeptor mit verschiedenen Proteinen komplexiert vor, die im Falle seiner Aktivierung wiederum seine Funktion beeinflussen, so etwa mit den Hitzeschockproteinen (hsp) hsp90, hsp70 und hsp56 (Smith et al. 1990). Nach Hormonbindung zerfällt dieser Komplex, und der hormonbesetzte Rezeptor mit veränderter Konformation und verändertem Phosphorylierungszustand dimerisiert und wird in den Kern transloziert (Guiochon-Mantel et al. 1991), wo er an eine komplexe DNA-Sequenz bindet. Zur Bindung ist innerhalb dieses Enhancers als Grundelement eine sich mehrfach wiederholende Sequenz (*direct repeat*) von ca. 15 Basenpaaren vonnöten, das progesteronresponsive Element (Strähle et al. 1987). In DNA-gebundener Form nimmt der dimerisierte, progesterongebundene Rezeptor seine Aufgabe als Aktivator, oder – seltener – als Repressor der Transkription progesteronregulierter Gene wahr (Grone-meyer 1991).

Das PGR-Gen ist auf dem Chromosom 11q22-23 lokalisiert, umspannt ca. 100 kbp und besteht aus acht Exons, von denen die Exons zwei bis acht relativ kurz sind (117-306 bp), während das erste Exon wesentlich länger ist (2,4 kbp; Rousseau-Merck et al. 1987; Misrahi et al. 1993), die Introns werden mit Buchstaben bezeichnet (A-G).

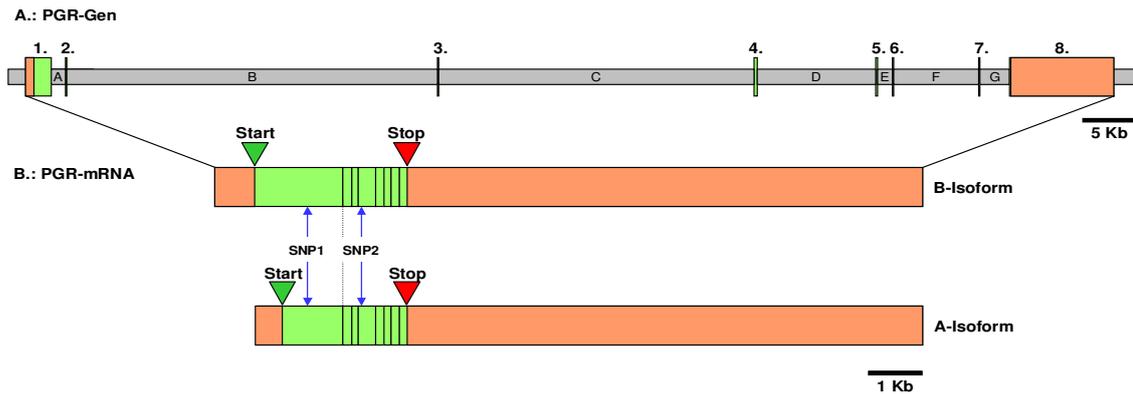


Abbildung 1: Exon-Intron-Struktur des PGR-Gens. Kodierende Exon-Anteile grün dargestellt, untranslatierte Exon-Regionen (UTR) rot, Introns grau.

Als Wildtyp-Sequenz wird heute im Allgemeinen die von Misrahi et al. 1993 beschriebene Basensequenz angesehen (NM_000926.2).

1.2 Die Transkriptvarianten A und B des Progesteronrezeptors

Vom PGR existieren zwei Isoformen, die sich sowohl in ihrer physiologischen Funktion als auch in ihrer mengenmäßigen Relation zueinander in verschiedenen Geweben deutlich unterscheiden. Beide Isoformen werden mit Hilfe zweier verschiedener Promotoren vom selben Gen transkribiert (Kastner et al. 1990). Dabei hat die Isoform PGR-B eine Länge von 933 Aminosäuren, während der A-Isoform PGR-A die N-terminalen 164 Aminosäuren fehlen und sie damit nur 769 Aminosäuren lang ist. Der PGR-A verfügt über zwei Transaktivierungsdomänen: Die Aktivationsfunktionen AF1 und AF2, der PGR-B zusätzlich über eine dritte Aktivierungsdomäne, AF3 (Sartorius et al. 1994).

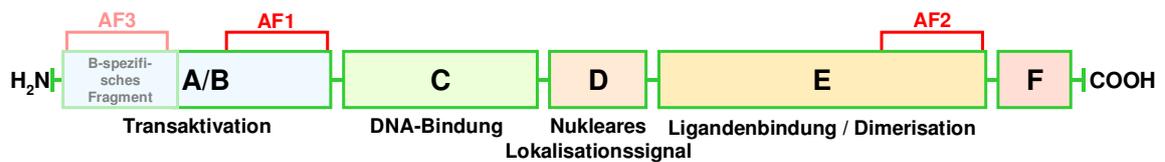


Abbildung 2: Modularer Aufbau des Progesteronrezeptors

Das für die B-Isoform spezifische Fragment mit seiner Aktivierungsfunktion AF3 ist als solches gekennzeichnet. Die einzelnen Domänen sind vereinfacht dargestellt mit ihrer Hauptfunktion gekennzeichnet. Der F-Domäne ist derzeit keine spezifische Funktion sicher zugeschrieben.

Die beiden Transkriptvarianten nehmen insofern unterschiedliche physiologische Aufgaben wahr, als dass sie die Transkription zum Teil unterschiedlicher Gene aktivieren, bzw. reprimieren und sich in Überschneidungsbereichen in ihrer Aktivität zum Teil deutlich unterscheiden (Richer et al. 2002, Tung et al. 2006). Wenn auch keine direkt entgegengesetzte Aktivität besteht, so kann doch PGR-A die Funktion von PGR-B in Anwesenheit von Progesteron modulieren und abschwächen (Richer et al. 2002, Vegeto et al. 1993). Insgesamt erscheint die Anzahl der durch PGR-B regulierten Gene deutlich größer und auch seine regulatorische Aktivität ausgeprägter. Über die Hälfte der bekannten von beiden PGR-Isoformen regulierten Gene kodiert für membrangebundene Proteine (Richer et al. 2002), was zunächst überraschen mag, betrachtet man die auf den Gesamtorganismus bezogene Funktion von Progesteron.

1.3 Polymorphismen im PGR-Gen

Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) in der DNA sind ein häufiger (>1% einer gegebenen Population) Grund für abweichende Aktivität von Genprodukten von derjenigen ihrer Wildtypform. Zugleich stellen Veränderungen eines einzelnen Nukleotids damit eine Ursache nicht nur interindividueller Unterschiede, sondern auch hereditärer Erkrankungen dar. Man spricht von Mutationen, wenn die Abweichungen seltener sind als 1% und wenn sie klar mit einem Krankheitsphänotyp assoziiert sind.

Man unterscheidet zwischen intronischen und exonischen SNPs. Letztere können den Kodierbereich betreffen, müssen dies aber nicht, da reife mRNAs von Eukaryoten nicht translatierte Abschnitte in der 3'- und 5'-Region besitzen. Polymorphismen, die in der Kodierregion liegen, müssen nicht zwingend zu einer Veränderung der Primärstruktur des Proteins führen, da der genetische Code degeneriert ist. Sowohl Polymorphismen in Introns als auch solche in nicht kodierenden Exonabschnitten können dennoch biologische Effekte ausüben, da sie die Funktion regulatorischer Sequenzen, wie zum Beispiel die transkriptionelle Aktivität, die mRNA-Stabilität oder das Splicing beeinflussen (Mooney 2005).

Etwa ein Tausendstel des menschlichen Genoms stellt sich auf diese Weise variabel dar (Taillon-Miller et al. 1998). Insgesamt ergeben sich damit für das menschliche Genom über vier Millionen SNPs (Mooney 2005), davon immerhin über 45000 kodierende, nicht synonyme SNPs (Reumers et al. 2005), die den im Mittel größten Effekt auf die Genfunktion haben dürften.

Einzelnukleotid-Mutationen sind für viele sowohl monogenetische, als auch polygenetische Erkrankungen und Prädispositionen unterschiedlicher Ausprägung verantwortlich. Das Spektrum ist dabei vielfältig und reicht von Erkrankungen, bei denen die Mutation unmittelbar die Funktionseinschränkung eines einzelnen Proteins und damit wiederum den Phänotyp zu Folge hat, wie zum Beispiel der Muskeldystrophie Duchenne, bis hin zu komplexen polygenetischen Prädispositionen, wie bei der essentiellen Hypertonie (Doris 2002). Der Übergang zwischen Krankheitsprädisposition durch SNPs und physiologischer interindividueller Variation ist zum Teil fließend, andere Einzelnukleotid-Mutationen dagegen stellen unumstrittene Krankheitsursachen dar.

Das PGR-Gen liegt bei einem Großteil der kaukasischen Bevölkerung in einer im Folgenden Wildtypform genannten Form vor (Misrahi et al. 1993). Auch beim PGR-Gen sind zahlreiche SNPs bekannt, von denen allerdings den meisten aufgrund ihrer Seltenheit keine klinische Relevanz zuzuschreiben ist. Von besonderer Wichtigkeit erscheint jedoch ein Muster von Einzelnukleotidpolymorphismen, welches mit einer intronischen Alu-Insertionsmutation im Intron G kosegregiert (De Vivo et al. 2002, Schweikert et al. 2004).

Bei der Insertion handelt es sich um eine PROGINS genannte Alu-Sequenz der Subfamilie PV/HS-1 von 306 Basenpaaren Länge. Die Insertion ist 897 Basenpaare *downstream* der 3'-Grenze des Exons 7 im Intron G gelegen (Rowe et al. 1995). Die Alu-Sequenz enthält zudem ein halbes östrogenresponsives Element, welches zu erhöhter Transkription des Allels mit der PROGINS-Mutation in Anwesenheit von 17- β -Östradiol und dem Transkriptionsfaktor SP1 führt (Romano et al. 2007). Diese Insertion tritt mit einer Allelhäufigkeit von etwa 9 bis 19% auf (Pearce et al. 2008), wobei eine Kopplung mit drei SNPs der Kodierregion beschrieben wurde. Einer dieser SNPs ist stumm (Exon 5: c.C2310T, His770His) während die anderen beiden mit einer Veränderung der Aminosäuresequenz einhergehen (Exon 1: c.G1031C, Ser344Thr; Exon 4: c.G1978T, Leu660Val). Die beiden Polymorphismen c.G1031C und c.G1978T betreffen die zweite beziehungsweise erste Position eines Triplets, während c.C2310T die dritte Position trifft. Aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes ist ein Basenaustausch an dritter Position seltener mit einem daraus resultierenden Aminosäureaustausch verbunden.

1.4 Klinische Bedeutung der SNPs im PGR-Gen

SNPs können zur Disposition für das Auftreten von Erkrankungen beitragen oder aber den Krankheitsverlauf modulieren. Daher lag es nahe, auch in dem bei Kaukasiern nicht seltenen SNP-Muster des PGR-Gens und der damit assoziierten PROGINS-Insertion eine Ursache für die Prädisposition zu verschiedenen Erkrankungen zu vermuten.

Und tatsächlich geschieht dies seit der Erstbeschreibung der PROGINS-Mutation (Rowe et al. 1995). Der Großteil der diesbezüglichen Forschung widmet sich der durch den selteneren Haplotyp verursachten möglichen Prädisposition für maligne Erkrankungen, wie dem Ovarialkarzinom, Mammakarzinom oder Endometriumkarzinom (u.a. D'Amora et al. 2009, Leite et al. 2008, Pearce et al. 2008, Johnatty et al. 2008, Gomes et al. 2007). Aber auch benigne Erkrankungen wie die Endometriose oder wiederholte Frühgeburten werden als durch den Polymorphismus begünstigte Erkrankungen diskutiert (u. a. Coulam et al. 2008, De Carvalho et al. 2007, van Kaam et al. 2007, Schweikert et al. 2004). Aus der physiologischen Funktion von Progesteron und seinem Rezeptor ergibt sich zwanglos die Vermutung eines Bezugs zu diesen Erkrankungen.

Progesteron spielt im weiblichen Organismus eine wichtige Rolle bei der Regulation des Menstruationszyklus, der Reproduktion und der Geschlechtsdifferenzierung. So wirkt es unter anderem auf die Dezidualisierung der Uterusschleimhaut hin, die Voraussetzung für die Embryoimplantation ist, es hemmt die uterine Kontraktilität und fördert das Wachstum des Uterus, ist also eine Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft (Clarke et al. 1990, Graham JD et al. 1997, Pepe et al. 1995). Zugleich hemmt es die Laktation während der Schwangerschaft, zusätzlich werden immunmodulatorische Effekte diskutiert (Szekeres-Bartho et al. 2001).

1.5 Ziele

Die Zahl der Studien, die sich mit dem klinischen Effekt der PROGINS-Mutation und der damit assoziierten SNPs befassen, ist groß. Über 30 Studien untersuchten den Zusammenhang mit Erkrankungen wie Endometriose und Leiomyomen bis hin zu vertiginösen Beschwerden und Migräne (Joshi et al. 2009, Lee et al. 2007).

Im Gegensatz dazu sind Untersuchungen zu den funktionellen Effekten der Polymorphismen rar und lediglich Romano et al. und Agoulnik et al. haben sich bisher mit dieser Fragestellung befasst (Romano et al. 2007, Agoulnik et al. 2004), mit zum Teil widersprüchlichen Resultaten. Beide Studien arbeiteten mit einem Luciferase-Reporter-Assay-System, welches die unterschiedliche Transaktivierung beziehungsweise Transrepression prinzipiell zu beschreiben vermag. Die Änderung der Transkription natürlicherweise progesterongesteuerter Gene in Abhängigkeit von den verschiedenen Varianten des Progesteronrezeptors wird aber unter Umständen nur unzureichend abgebildet.

Ziel der Arbeit war daher die Etablierung eines experimentellen Systems, mit dem der Einfluss der von De Vivo et al. (2002) erstmals beschriebenen SNPs auf die Transkription einzeln und unabhängig von der PROGINS-Insertionsmutation in einem zellbasierten Modell untersucht werden kann.

Am Ende der Arbeit sollte eine Sammlung der unterschiedlichen Varianten des Progesteronrezeptors zur Überexpression in verschiedenen Zelltypen bereitstehen sowie ein geeignetes *readout*-System.

Als *readout*-System für die Aktivitätsunterschiede bot sich eine Messmethode an, mit der möglichst präzise das Ausmaß der Transkription bestimmt werden kann, also die Quantifizierung der mRNA deutlich progesteronregulierter Gene mittels quantitativer *real-time*-PCR (im Folgenden rt-PCR). Es sollten also letztendlich eine Reihe von rt-PCR-Reaktionen in optimierter Form zur Verfügung stehen, wobei die Auswahl dieser progesteronregulierten Gene auf der Grundlage der Daten von Richer et al. (2002) geschehen sollte, die eine Reihe geeigneter Gene identifiziert hatten.

Als Überexpressionssystem bot sich ein adenovirales Vektormodell an, zum einen aus technischen Gründen, da sich die zur Optimierung gewählten und am besten geeigneten T47D-Y-Zellen als schwer transfizierbar erwiesen. Voraussetzung für die gezielte Überexpression der Varianten des PGR-Gens ist, dass die gewählten Zellen selbst keinen PGR exprimieren. Daher boten sich die zu diesem Zweck vielfach erprobten T47D-Y Zellen an, eine Mammakarzinomzelllinie, die diese Voraussetzung erfüllt (Sartorius et al. 1994, Richer et al 2002).

Zum anderen aber auch erscheint dieses Modell im Hinblick auf die von Romano et al. (2007) erhobenen Befunde günstig, sehen diese doch einen Faktor für die differente Aktivität der SNP-Varianten des Progesteronrezeptors in der unterschiedlichen posttranslationalen Modifikation, die in verschiedenen Zelltypen deutlich variieren kann. So sollte nun mit dem adenoviralen Vektormodell ein bequemes Werkzeug zur Überexpression der PGR-Varianten in verschiedenen, auch schwer transfizierbaren Zelltypen zur Verfügung stehen. Mithilfe dieses Modells können in Zukunft Daten gewonnen werden, die über Rezeptor-Bindungsassays oder DNA-Bindungsassays wie die Chromatin-Immunopräzipitation hinausgehen.

Ein weiterer entscheidender Vorteil des Modells sollte die Möglichkeit sein, die Effekte der beiden SNPs in Zusammenschau ebenso wie einzeln zu betrachten, zumal in der Frage Uneinigkeit besteht, in welchem Ausmaß die SNPs mit der PROGINS-Insertion kosegregieren.

So kommen beispielsweise De Vivo et al. (2002) und Schweikert et al. (2004) zu dem Schluss, dass G1031C/Ser344Thr im Exon 1 zum Genotyp zugehörig sei, während Agoulnik et al. und Romano et al. diese Ansicht nicht teilen (Romano et al. 2007, Agoulnik et al. 2004).

1.6 Versuchskonzept

Zur Überexpression der verschiedenen Varianten des PGR-Gens sollte ein Expressionsvektor verwendet werden. Zu diesem Zweck wurde pTracer-CMV2 gewählt. Als Ausgangsmaterial zur Generierung der cDNA diente sowohl genomische DNA aus dem Blut gesunder Probanden als auch DNA aus der kultivierten Zelllinie EFM-192A (Rau et al. 1994). Die kodierende DNA wurde mittels PCR vervielfältigt, dabei enthielten die Primer zum späteren Zusammenfügen der cDNA Restriktionsschnittstellen. Das Einfügen der SNPs mittels zielgerichteter Mutagenese (*site directed mutagenesis*) geschah im Vektor PCR-II, das Zusammenfügen der cDNA im Vektor pBluescribe.

Nachdem eine Transfektion der gewählten Ziellinie T47D-Y nicht sicher gelang und in Zusammenschau mit den Daten von Romano et al. ein Adenoviruskonstrukt als Expressionssystem günstiger erschien, sollten die fertigen Varianten des PGR-Genes in den Vektor pAdTrack-CMV umklontiert und anschließend mit pAdEasy-1 zur Adenovirus-DNA mit integrierter PGR-cDNA rekombiniert werden. Die so gewonnene Adenovirus-Typ-V-DNA sollte dann in HEK293-T-Zellen transfiziert und das Adenovirus Typ V exprimiert und anschließend vervielfältigt und aufgereinigt werden. Gleichzeitig sollten quantitative rt-PCR-Reaktionen für eine relevante Anzahl besonders deutlich progesteronregulierter Gene etabliert und optimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 PGR-cDNA-Klone

Zu Beginn der Arbeit lagen die verschiedenen Varianten der PGR-cDNA bereits in klonierter Form im Expressionsvektor pTracer-CMV2 vor, sie waren in der Arbeitsgruppe durch A. Schweikert generiert worden.

Es existierten folgende Varianten, wobei das PGR-cDNA-Insert bei den PGR-B-Isoformen 95 Basenpaare (bp) *upstream* des Startcodons der Transkriptvariante B, im Fall der -kürzeren- A-Isoformen 63 bp *upstream* des Startcodons der Transkriptvariante A begann und bei beiden Isoformen 40 bp *downstream* des Stopcodons endete. Die Tabelle 1 listet die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PGR-Varianten auf.

Tabelle 1: In der vorliegenden Untersuchung verwendete PGR-Varianten

Transkriptvariante	SNPs	Kürzel im Folgenden
A	—	A _{wt}
A	G1031C	A ₁
A	G1978T	A ₂
A	G1031C & G1978T	A _{1/2}
B	—	B _{wt}
B	G1031C	B ₁
B	G1978T	B ₂
B	G1031C & G1978T	B _{1/2}

Da diese DNA-Fragmente als Ausgangsmaterial verwendet wurden, wird im Folgenden beschrieben, wie diese cDNAs erstellt und kloniert wurden.

Um die cDNAs zu generieren, wurde zunächst die PGR-cDNA in ihrer Wildtypform kloniert und später wurden durch zielgerichtete Mutagenese die zu untersuchenden genetischen Varianten erzeugt. Die cDNA wurde in vier Abschnitten mittels PCR amplifiziert und die resultierenden cDNA-Fragmente in den Vektor pCR-II kloniert, in dem auch die zielgerichtete Mutagenese geschah. Die Primer beim ersten Amplifikationsschritt enthielten jeweils eine stumme Mutation. Diese stumme Mutation erzeugte eine Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease. Dadurch wurde ein Zusammenfügen der gesamten PGR-cDNA aus den vier Einzelfragmenten ermöglicht.

Die amplifizierten Fragmente wurden im Vektor pBluescribe zusammengesetzt, aus dem das Insert wiederum in den Vektor pTracer-CMV2 umkloniert wurde.

Als Basis zur Vervielfältigung der einzelnen Genabschnitte diente zum einen aus Blut extrahierte genomische DNA zum anderen cDNA aus kultivierten Zellen der Mammakarzinomzelllinie EFM 192-A.

Im ersten Schritt wurde DNA gesunder Probanden mit Hilfe des NucleoSpin Blood-Kits (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers extrahiert und die so gewonnene DNA anschließend mittels PCR amplifiziert. Dabei wurde ein 831 Basenpaare langes Fragment 1 mit den Primern PGR-FL-1Fw und PGR-FL-1Rv, sowie ein 866 Basenpaare langes Fragment 2 mit den Primern PGR-FL-2Fw und PGR-FL-2Rv erzeugt, unter Verwendung des Expand-High-Fidelity-PCR-Systems (Roche Applied Science). Das mit Hilfe der Primer PGR-FL-1Fw und PGR-FL-1-Rv erzeugte Fragment begann dabei 95 Basenpaare *upstream* vom Startcodon der PGR-Isoform B, beziehungsweise 586 Basenpaare *upstream* vom Startcodon der Isoform A und endete im Exon 1. Fragment 2 (Primer PGR-FL-2-Fw und PGR-FL-2-Rv) endete ebenfalls im - mit 2380 bp sehr großen - Exon 1.

Der Primer PGR-FL-1Fw enthielt eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease Kpn1. PGR-FL-1Rv und PGR-FL-2Fw überschritten sich in einer Länge von 17 Basen und enthielten beide eine XhoI-Schnittstelle, PGR-FL-2Rv wiederum eine EcoRV-Schnittstelle.

Die Fragmente 3 und 4 von 604, beziehungsweise 705 bp Länge wurden über das Intermediat einer cDNA amplifiziert, da es sich hierbei um Exon-überspannende Fragmente handelt, die Introns jedoch nicht mit kloniert werden sollten. Die Fragmente 1 und 2 beschränken sich dagegen auf das Exon 1 und konnten daher mit genomischer DNA als Ausgangsmaterial erstellt werden.

Für die Fragmente 3 und 4 wurde RNA aus der Zelllinie EFM-192A verwendet. Die Amplifikation des erwünschten DNA-Abschnittes geschah im Fall des Fragmentes 3 gemeinsam mit der reversen Transkription mit dem OneStep-RT-PCR-Kit (QIAGEN), mit den Primern PGR-Pre-R3-Fw/Rv, da die Schnittstellen generierenden Primer für das Fragment 3 über zu schwache Bindungseigenschaften verfügten, als dass mit ihnen direkt aus einer geringen Menge cDNA das Fragment 3 hätte amplifiziert werden können. Erst nach Aufreinigung der RT-PCR-Produkte wurde die so gewonnene cDNA mit den die Restriktionsschnittstellen enthaltenden Primern PGR-FL-3-Fw/Rv weiter amplifiziert (Expand-High-Fidelity-PCR-System, Roche Applied Science). Fragment 4 wurde analog erstellt (Primer PGR-Pre-R4-Fw/Rv und PGR-FL-4-Fw/Rv). Die Klonierung dieser beiden Fragmente erfolgte also nach *nested-PCR*.

Die Poly-A-Enden der PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung (E.Z.N.A. Cycle-Pure-Kit, PeqLab) verwendet, um jene jeweils in den Vektor pCR-II (Bestandteil des TA-Cloning-Kits, Invitrogen) zu ligieren. Anschließend Transformation des Ligationsansatzes in TOP 10 F[']-Zellen (Invitrogen), Bakterienkultur und Plasmidextraktion (Nucleospin-Plasmid-Kit, Macherey-Nagel) diente der sicheren Amplifikation einer ausreichenden Menge der entstandenen vier Plasmide.

Zur Herstellung des kürzeren (302 bp) Fragmentes 1 der A-Isoform diente eine PCR mit den Primern PGR-IsoA-Fw und PGR-FL-1-RV und dem Fragment 1 der Isoform B als Edukt. Weitere Prozessierung des Isoform-A-Fragmentes 1, wie für die anderen im vorigen Absatz beschrieben, führte zu einem fünften pCR-II Vektor mit diesem Fragment als Insert.

Die verschiedenen Fragmente der klonierten PGR-cDNA im Vektor pCR-II wurden im Anschluss jeweils vollständig sequenziert. Dieses Vorgehen war zwingend notwendig, um fehlerfreie cDNA-Inserts als Ausgangsmaterial für die nachfolgenden Schritte zu verwenden.

Das Einfügen der SNPs in die Fragmente 2 und 3 geschah durch zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe des QuikChange Site-Directed Mutagenesis-Kit (Stratagene), also einer PCR-basierten Methode, die auf Amplifikation mit Primern, die die gewünschte Mutation enthalten, basiert. Die SNPs wurden mit den Primern PGR-Mut1-Fw/Rv, beziehungsweise PGR-Mut2-Fw/Rv, im Vektor pCR-II eingefügt.

Die bereits im ersten PCR-Schritt eingefügten Restriktionsschnittstellen ermöglichten nachfolgend ein Ausschneiden der einzelnen Fragmente der PGR-cDNA, die als Inserts im Vektor pCR-II vorlagen. So konnte das Fragment 1 mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und XhoI aus pCR-II exzediert werden, das Fragment 2 mit XhoI und EcoRV. Auch die Primer der folgenden Fragmente überschneiden sich jeweils teilweise und enthielten eine Restriktionsschnittstelle. So konnte Fragment 3 mit EcoRV und SpeI, Fragment 4 mit SpeI und NotI exzediert werden und diese Fragmente anschließend in Reihenfolge aneinander ligiert werden.

Im Vektor pBluescript liegen die Restriktionsschnittstellen in gleicher Reihenfolge, wie sie an den Enden der einzelnen Fragmente der PGR-cDNA eingefügt wurden. So konnte pBluescript an seiner *multiple cloning site* (MCS) mit den Endonukleasen KpnI und XhoI geschnitten werden, was zum Wegfall eines kleinen, 16 bp langen Fragmentes aus der MCS von pBluescript führt und anschließend das erste Fragment hinein ligiert werden. Dann wiederum wurde mit XhoI und EcoRV ein kleines, diesmal 27 bp langes Fragment aus der MCS im direkten Anschluss an das bereits eingefügte Fragment 1 der PGR-cDNA exzediert, an dessen Stelle das Fragment 2 trat.

So wurde schrittweise die gesamte PGR-cDNA zusammengefügt, sowohl in ihrer Wildtypform, als auch in den verschiedenen SNP-Varianten und sowohl in der A-Isoform, als auch in der B-Isoform, so dass schließlich alle acht Varianten der PGR-cDNA im Vektor pBluescript vorlagen.

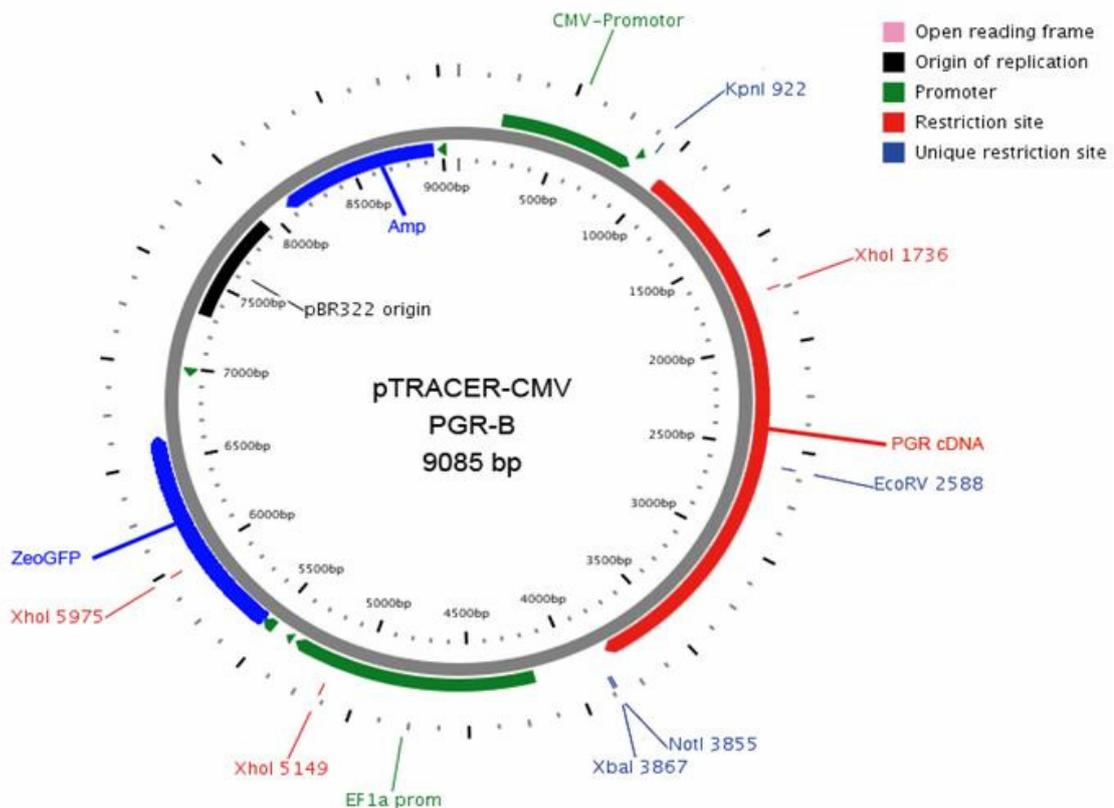


Abbildung 3: Karte des Vektors pTracer-CMV mit eingefügter PGR-cDNA.

Im Einzelnen geschah dies so, dass nach dem Restriktionsverdau von pBluescript der Vektor jeweils mit Hilfe des E.Z.N.A. Cycle-Pure-Kits (PeqLab), welches kleinere Oligonukleotide zuverlässig zu entfernen vermag, aufgereinigt wurde, um eine Religation des wenige bp langen Fragmentes der MCS zu verhindern. Das jeweilige Insert aus pCR-II wurde durch Gelelektrophorese mit nachfolgender Gelextraktion mit dem QiaQuick Gel Extraction-Kit (QIAGEN) vom Vektorrest gereinigt. Nach Ligation des gewünschten Fragments in pBluescribe konnte nach Transformation des Ligationsansatzes in TOP 10 F'-Zellen durch Übernachtskultur und nachfolgende Plasmidextraktion jeweils eine ausreichende Menge des Vektors für den nächsten Arbeitsschritt erzeugt werden.

Das ursprünglich vorgesehene experimentelle System sah eine direkte Transfektion von T47D-Y-Zellen mit der jeweiligen PGR-cDNA im Expressionsvektor pTracer-CMV2 vor.

Dieser Vektor enthält zur einfachen optischen Kontrolle der erfolgten Transfektion ein Fusionsprotein aus einer Cycle 3-Variante des Grün Fluoreszierenden Proteins (Cramer et al. 1996), und einem Protein, das eine Resistenz gegen das Zytostatikum Zeocin bewirkt. Die Transkription des Fusionsgens steht unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven hEF-1 α -Promotors.

Die acht verschiedenen Varianten der PGR-cDNA wurden daher mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und NotI, die anfänglich in die Primer PGR-FL-1-Fw bzw. PGR-IsoA-Fw und PGR-FL-4-Rv eingefügt worden waren und die cDNAs flankieren, ausgeschnitten und mittels Gelextraktion aufgereinigt. Anschließend wurden sie jeweils in den Vektor pTracer-CMV2 ligiert, der zuvor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten worden war. Eine Übersicht über die in der Generierung der cDNA-Klone verwendeten Primer gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Primer, die zur Herstellung der verschiedenen PGR-cDNAs verwendet wurden.

Primername	Sequenz	Restriktionsschnittstelle
PGR-FL-1-Fw	TtggTaccTCCCTCTGCCCCTATAT	KpnI / Acc65I
PGR-IsoA-Fw	GgtaccGAACTTCCCGAAGATCCAC	KpnI / Acc65I
PGR-FL-1-Rv	CACCCAGAGctcgagGTTT	XhoI
PGR-FL-2-Fw	GCAAACctcgagCTCTGG	XhoI
PGR-FL-2-Rv	GGCCTgatatcCGAGCTG	EcoRV
PGR-Pre-R3-Fw	CCTGCACTCGGCCTCAAC	-
PGR-FL-3neu-Fw	CGCAGCTCGgatatcAGG	EcoRV
PGR-FL-3-Rv	CCTAGTTGATTAAGactagtCAGCAA	SpeI
PGR-Pre-R3-Rv	GACTACTGAAAGAAGTTGCCTCTCG	-
PGR-Pre-R4-Fw	AACACAAAACCTGACACCTCCA	-
PGR-FL-4-Fw	TTTGCTGactagtCTTAATCAACTAGG	SpeI
PGR-FL-4-Rv	TTgcgccgcCACAAAATTTAATTCTTTA	NotI
PGR-Pre-R4-Rv	TGGGTAAACAAAACAGTTAAACATTC	-
PGR-Seq-1A-Fw	ACACCTTGCTGAAGTTTCG	-
PGR-Seq-1B-Rv	AGCTGTCTCCAACCTTGAC	-
PGR-Seq-2B-Fw	GAGCGACCCCATCCAGAC	-
PGR-Seq-2B-RV	CAGACGAGACTGAGGCACTG	-
PGR-Seq-3A-Fw	GGTCCTTGAGGTCGAAAAT	-
PGR-Seq-4A-Fw	CCCAGTTTGAGGAGATGAGG	-
PGR-Mut1-Fw	TTGCCCCGCCGCGGACTTCACCCTGTGCCT	-
PGR-Mut1-Rv	AGGCACAGGGTGAAGTCCGCGCGGGGCAA	-
PGR-Mut2-Fw	TCTCCACAGCCATTGGCGTTCCAAA	-
PGR-Mut2-RV	GCATCTGCCCACTGACATGTTTGTAGGATCTCC	-

Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung der cDNAs verwendet wurden, sind in Kleinbuchstaben hervorgehoben.

2.1.2 Vektoren

2.1.2.1 pAdTrack-CMV

Der Vektor pAdTrack-CMV ist Teil des weiter unten beschriebenen pAdEasy-Systems zur vereinfachten Generierung rekombinanter Adenoviren. Der Vektor wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Vogelstein (Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, Johns Hopkins University, Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt.

Er enthält zwei hintereinander geschaltete Expressionskassetten, welche jeweils aus einem ubiquitär aktiven CMV-Promotor sowie einem nachgeschalteten Polyadenylierungssignal bestehen. Die erste Expressionskassette enthält eine *multiple cloning site* (MCS) und dient der Integration eines Fremdgens, die zweite ein GFP-Gen, welches zur späteren vereinfachten Identifikation infizierter Zellen durch das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) dient. Bei dem Grün Fluoreszierenden Protein handelt es sich um ein kleines, ursprünglich aus der Qualle *Aequoria victoria* stammendes Protein, welches bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 509 nm grün fluoresziert.

Innerhalb der MCS findet sich jeweils eine Schnittstelle für KpnI und NotI, in einer Orientierung, die das spätere Einfügen der klonierten PGR-cDNA mit Hilfe der flankierenden Schnittstellen ermöglicht.

Zudem enthält der Vektor längere Sequenzen, die zu Abschnitten im Vektor pAdEasy-1 homolog sind und eine spätere Rekombination mit diesem Vektor ermöglichen. Ein Replikationsursprung dient der Replikation des Plasmids in kompetenten Bakterien, ein Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion transformierter Bakterien.

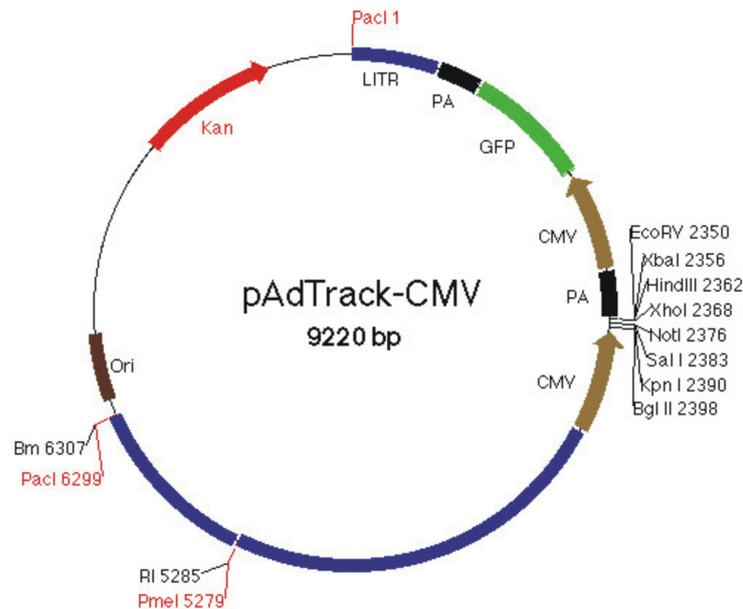


Abbildung 4: Aufbau des Plasmids pAdTrack-CMV.

LITR: Linke invertierte terminale Wiederholungssequenz (*Left inverted terminal repeat*), PA: Polyadenylierungssignal, GFP: Grün Fluoreszierendes Protein, CMV: Cytomegalieviruspromotor, Ori: *Origin* der Replikation, Kan: Kanamycin-Resistenzgen, Pacl: Pacl-Schnittstellen zur Linearisierung des Plasmids pAdEasy-1 nach homologer Rekombination, PmeI: Singuläre Schnittstelle für PmeI zur Linearisierung vor homologer Rekombination. Blau dargestellt: Mit pAdEasy-1 homologe Sequenzen. Nach He et al. (1998).

2.1.2.2 pAdEasy-1

pAdEasy-1 ist ebenfalls Bestandteil des weiter unten beschriebenen AdEasy-Systems zur vereinfachten Generierung rekombinanter Adenoviren und wurde, wie auch pAdTrack-CMV, von der Arbeitsgruppe Vogelstein zur Verfügung gestellt. pAdEasy-1 beinhaltet die DNA-Sequenz des in der E1-Region und in der E3-Region deletierten Adenovirus Serotyp 5 (Ad5dE13). Ein *origin of replication* ermöglicht die Amplifikation des Vektors in kompetenten Bakterien, ein Ampicillin-Resistenzgen die Selektion transformierter Bakterien mit dem Antibiotikum Ampicillin.

Zusätzlich enthält pAdEasy-1 die bereits beim Vektor pAdTrack-CMV genannten mit ihm homologen Abschnitte zur Rekombination der beiden Vektoren.

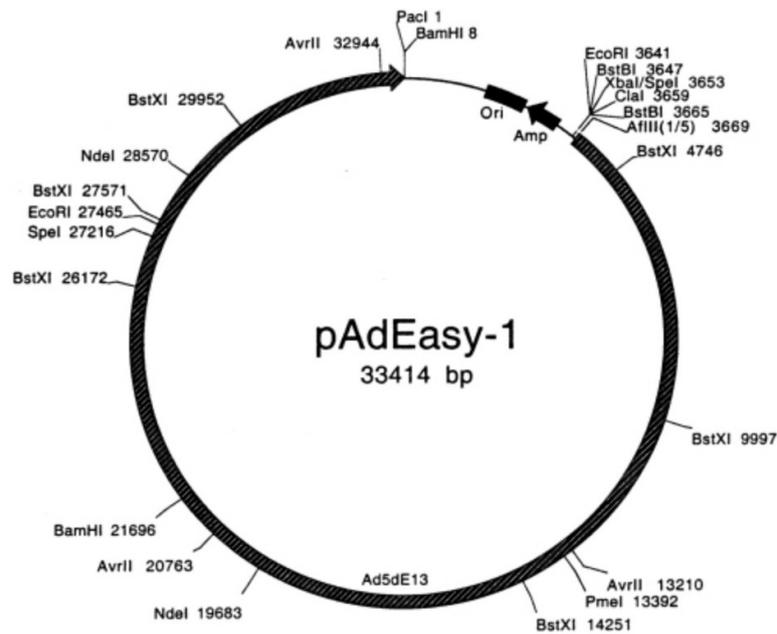


Abbildung 5: pAdEasy-1.

Ori: Replikationsursprung, Amp: Ampicillin-Resistenzgen. Die homologen Sequenzen liegen unmittelbar *upstream* der PacI-Schnittstelle (Position 1) sowie unmittelbar *upstream* von Eco RI (Position 3641). Nach He et al. (1998).

2.1.3 Bakterienstämme

2.1.3.1 TOP 10 F'-Zellen

Bei den verwendeten TOP 10 F'-Zellen handelt es sich um einen kommerziell erhältlichen E.coli-Stamm, der sich durch seine Überexpression des Lac-Repressorgens für *Blue-White-Screening* auszeichnet, er enthält außerdem das F-Episom. Es wurden TOP 10 F'-Zellen (Genotyp F' {*lacI_q* Tn10 (Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*) der Firma Invitrogen, Bestandteil des TOPO-TA-Kits verwendet. Diese Bakterien wurden in chemisch kompetenter Form, das heißt zur Hitzeschocktransformation geeignet, verwendet. Aufgrund des großen Bedarfes an TOP 10 F'-Zellen wurden diese nach einem eigenen Protokoll vermehrt.

2.1.3.2 BJ 5183-Ad-1-Zellen

BJ 5183-Zellen sind ebenfalls E.coli-Zellen, sie exprimieren die Rekombinase *recA* und wurden zur homologen Rekombination im Rahmen des Systems zur vereinfachten Generierung rekombinanter Adenoviren benötigt. Sie lagen bereits nach Vortransformation mit dem Plasmid pAdEasy-1 vor.

Sie wurden in elektrokompetenter Form, also geeignet zur Transformation mit fremdem Genmaterial durch Elektroporation, verwendet. Die verwendeten Zellen hatten den Genotyp *endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Strr)* [pAdEasy-1 (**Ampr**)]. Aufgrund des hohen Bedarfes wurden auch sie nach einem eigenen Protokoll vermehrt.

2.1.4 Eukaryotische Zelllinien

2.1.4.1 HEK293-Zellen

HEK293-Zellen sind seit längerem kultivierte Zellen menschlicher Herkunft. Wenig differenzierte Zellen aus embryonalem Nierengewebe (*human embryonic kidney*) wurden mit den Genen E1A und E1B des Adenovirus Ad5 stabil transfiziert (Graham FL et al. 1977). Durch Expression der adenoviralen E1-Gene komplementieren diese Zellen die an sich – durch Fehlen dieser Gene – defekte Replikationsfähigkeit des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Serotyp-5-Adenovirus aus dem AdEasy-System. Somit ist das Ad5 in der Lage, in den verwendeten HEK293-Zellen repliziert zu werden.

2.1.4.2 T47D-Y-Zellen

T47D-Y-Zellen wurden als Zelllinie ausgewählt, um die Funktion der Progesteronrezeptorisoformen nach Transduktion zu analysieren. Bei dieser Zelllinie handelt sich um eine Sublinie der Mammakarzinomzelllinie T47D, die die Expression des endogenen PGR-Gens verloren hat (Sartorius et al. 1994, Horwitz et al. 1982). Die verwendeten Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Kathryn B. Horwitz (University of Colorado Health Science Center, Denver, Colorado, USA) zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Bakteriologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung von chemisch kompetenten TOP 10 F⁻-Zellen

Zunächst wurden 20 ml LB-Medium (*Luria-Bertani-Broth*) mit etwa 1 µl TOP 10 F⁻-Zellsuspension angeimpft und über Nacht bei 120 rpm und 37 °C schüttelinkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 1 ml der entstandenen Suspension in einen autoklavierten Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml ΨB-Medium überführt und dieser bis zu einer OD₅₅₀ (optische Dichte bei 550 nm Lichtwellenlänge) von 0,3 erneut unter gleichen Bedingungen schüttelinkubiert. Von dieser Suspension wurden 25 ml in einen sterilen Erlenmeyer-Kolben mit 500 ml ΨB-Medium überführt und weitere 2 Stunden inkubiert.

Die Suspension wurde darauf 5 min bei 4 °C Außentemperatur auf Eis gelagert und anschließend auf 10 auf 4 °C vorgekühlte 50 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 5 °C und 1300 G für 8 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das entstandene Pellet jeweils mit 7,5 ml Puffer TfBI resuspendiert. Der Inhalt je zweier Zentrifugenröhrchen wurde zusammengeführt und die nunmehr 5 mit je 15 ml gefüllten Röhrchen für 30 min in Eiswasser inkubiert. Nach anschließender erneuter Zentrifugation mit gleichen Parametern wie zuvor und Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit je 2 ml Puffer TfBII resuspendiert. Zuletzt wurden je 200 µl in ein 2 ml-Gefrier-Schraubgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Herstellung von BJ 5183-Ad-1-Zellen

Es wurden zunächst 20 ml LB-Medium mit etwa 1 µl Stammsuspension angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 120 rpm schüttelinkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde mit 1 ml der entstandenen Suspension ein Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml sterilem LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,7 unter gleichen Bedingungen wie zuvor schüttelinkubiert. Nachdem 25 ml dieser Suspension in einen Erlenmeyer-Kolben mit weiteren 500 ml sterilem LB-Medium überführt worden waren und dieser für 2 Stunden unter den obigen Bedingungen schüttelinkubiert und anschließend für eine Stunde auf Eis inkubiert, wurde das Volumen auf 10 bei 4 °C vorgekühlte 50 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4 °C und 1300 G und Abgießen des Überstandes wurden die Pellets in zusammen 50 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Nach zweimaliger Wiederholung des letzten Resuspensions- und Zentrifugationsschrittes wurde das zuletzt entstandene Pellet in einer zehnpromzentigen steril filtrierten Glycerinlösung aufgenommen und anschließend je 200 µl dieser Suspension in 2 ml-Gefrier-Schraubgefäßen in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Methoden zur Manipulation von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen, zuerst 1962 von Dussoix und Arber beschrieben, sind prokaryotische Enzyme, die wenige Basenpaare lange spezifische Sequenzen einer DNA-Doppelhelix erkennen und in beiden Strängen der Helix an ebenfalls spezifischen Stellen den DNA-Strang hydrolytisch spalten. Bei den Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen Typ II handelt es sich zumeist um Palindrome, die innerhalb der Erkennungssequenz des Enzyms liegen.

Restriktionsendonukleasen werden dazu genutzt, DNA-Moleküle in spezifische Fragmente zu zerteilen und zugleich spezifische Enden (überlappende „*sticky ends*“, oder solche ohne Strangüberhang, stumpfe-, also „*blunt ends*“) zu erzeugen, um verschiedene DNA-Fragmente anschließend durch Ligation miteinander verbinden zu können.

Die aufgeführten Ansätze wurden zum Teil geringfügig variiert.

Tabelle 3: Erster Restriktionsverdau der pTracer-Konstrukte

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
PGR cDNA pTracer-Konstrukte	2,34 µg
KpnI	3 µl
10x BSA	5 µl
10x NEB-Puffer 1	5 µl
aqua ad iniectabilia	auf 50 µl
Endvolumen	50 µl
Bedingungen: über Nacht, 37 °C	

Tabelle 4: Erster Restriktionsverdau von pAdTrack-CMV

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
DNA pAdTrack-CMV	1 µl
KpnI	3 µl
10x BSA	5 µl
10x NEB-Puffer 1	5 µl
aqua ad iniectabilia	36 µl
Endvolumen	50 µl
Bedingungen: über Nacht, 37 °C	

Tabelle 5: Zweiter Restriktionsverdau der pTracer-Konstrukte und pAdTrack-CMV, DNA nach Umfällung als Festsubstanz eingesetzt

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
DNA pTracer-Konstrukte	(-)
NotI	3 μ l
10x BSA	5 μ l
10x NEB-Puffer 3	5 μ l
aqua ad iniectabilia	37 μ l
Endvolumen	50 μ l
Bedingungen: über Nacht, 37 °C	

Tabelle 6: Kontrolle der Ligation PGR-Insert in pAdTrack-CMV

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
DNA pAdTrack-CMV	8 μ l
Acc65I	2 μ l
NotI	2 μ l
10x BSA	6 μ l
10x NEB-Puffer 3	6 μ l
aqua ad iniectabilia	36 μ l
Endvolumen	50 μ l
Bedingungen: 3 Stunden, 37 °C	

Tabelle 7: Linearisation der pAdTrack-CMV-Konstrukte

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
DNA pAdTrack-CMV	auf 1 μ g
PmeI	2 μ l
10x BSA	2 μ l
10x NEB-Puffer 4	2 μ l
aqua ad iniectabilia	auf 20 μ l
Endvolumen	20 μ l
Bedingungen: über Nacht, 37 °C	

Tabelle 8: Kontrolle der Rekombinationsprodukte

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
DNA Rekombinationsprodukt	10 µl
Pacl	1 µl
10x BSA	2 µl
10x NEB-Puffer 3	2 µl
aqua ad iniectabilia	5 µl
Endvolumen	20 µl
Bedingungen: 3 Stunden, 37 °C	

Tabelle 9: Linearisation der rekombinanten pAdEasy-1-Virusplasmide nach Amplifikation

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
DNA Rekombinationsprodukt	auf 3 µg
Pacl	2 µl
10x BSA	8 µl
10x NEB-Puffer 3	8 µl
aqua ad iniectabilia	auf 80 µl
Endvolumen	80 µl
Bedingungen: über Nacht, 37 °C	

2.2.2.2 Ligation

Unter einer Ligation versteht man das Verknüpfen von doppelsträngigen DNA-Fragmenten mit zumeist überlappenden Enden mit Hilfe des Enzyms DNA-Ligase. Verwendet wurde T4-DNA-Ligase, ein EC 6.5.1.1-Enzym des Bakteriophagen T4 (New England Biolabs), das in der Lage ist, in DNA-Einzelstrangbrüchen wie auch zwischen Fragmenten mit kurzen, komplementären überlappenden Enden die Ausbildung kovalenter Phosphodiesterbrücken zu katalysieren. Das Enzym wurde zuerst 1968 von B. Weiss ausführlich beschrieben.

Tabelle 10 : Ligation der PGR-cDNA-Konstrukte in pAdTrack-CMV

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
DNA PGR-Konstrukt	5 μ l
DNA pAdTrack-CMV	1 μ l
10x Ligationspuffer	1 μ l
T4-DNA-Ligase	1 μ l
aqua ad iniectabilia	2 μ l
Endvolumen	10 μ l
Bedingungen: über Nacht, 14 °C	

2.2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Moleküle mit einer Nettoladung, wie z.B. auch DNA, wandern im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der elektrischen Feldstärke, der Nettoladung des Moleküls und dem Reibungskoeffizienten, der wiederum von Molekülgröße und -konformation wie auch dem umgebenden Medium abhängt. Kleinere Moleküle wandern im elektrischen Feld schneller durch ein Gel als große Moleküle, weshalb, unter Annahme ähnlicher Konformation und relativer Ladung, mit Hilfe der Elektrophorese eine Auftrennung der DNA-Fragmente ihrer Größe nach möglich ist. Als Trägermedium werden in der DNA-Elektrophorese unter anderem Agarosegele verwendet. Die DNA wird durch Interkalierung von in dem Gel enthaltenem Ethidiumbromid in den Doppelstrang unter UV-Licht sichtbar. Es fanden 0,6-prozentige, 0,8-prozentige sowie einprozentige Gele Verwendung.

Für ein einprozentiges Agarosegel wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TBE (Tris-Base-Borsäure-EDTA-Puffer) durch Aufkochen im Mikrowellenofen gelöst, 5 μ l Ethidiumbromidlösung je 100 ml wurden hinzugegeben, die Lösung gemischt und in einen Gelschlitten gegeben. Ein Gelkamm wurde in die Lösung gehängt, der während des Aushärtens des Gels Taschen im Gel bildete. Nach dem Aushärten wurde der Kamm gezogen, der Gelschlitten in eine mit TBE gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt und die Taschen mit den DNA-Proben bestückt.

Die DNA-Lösung wurde vorher in Abhängigkeit vom Lösungsvolumen mit der jeweils benötigten Menge sechsfach konzentriertem Ladepuffer (6x *loading dye*) versetzt. Nach Colony-PCR beispielsweise sah der verwendete Ansatz im Wesentlichen folgendermaßen aus:

Es wurden 12,5 μ l PCR-Produkt und 2 μ l Ladepuffer durch Auf- und Abpipettieren gemischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert.

Als Größenstandard wurden je nach Bedarf eine 100 bp-Leiter oder eine 1 kb-Leiter parallel über das Gel aufgetrennt. Nach dem Laden wurde eine Spannungsquelle angeschlossen und die Proben für ca. 1 Stunde bei 80-200 V (je nach Größe der Kammer und der Fragmente) aufgetrennt.

2.2.2.4 Präzipitation von Restriktions- und Ligationsprodukten

Um Produkte von Restriktionsendonukleaseverdauen und Ligationen von Pufferbestandteilen und Enzym zu befreien, wurden diese gefällt, getrocknet und anschließend resuspendiert. Im Einzelnen geschah dies so:

Der Ansatz einer Ligation oder Restriktion wurde mit dem Dreifachen seines eigenen Volumens an Ethanol versetzt, vortex-gemischt und anschließend 15 min bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13600 G für 10 min und Absaugen des Überstandes konnte das *Pellet* wie gewünscht entweder in einem neuen Reaktionsansatz oder aber zum Beispiel in Wasser aufgenommen werden.

2.2.2.5 Aufreinigung von Reaktionsprodukten

Die Aufreinigung restriktionsverdauter Vektoren von kurzen Oligonukleotiden aus ihrer MCS wurde mit Hilfe des E.Z.N.A Cycle-Pure-Kits nach Angaben der Herstellerfirma PeqLab durchgeführt. Das Funktionsprinzip entspricht dem weiter unten bei der Beschreibung des QIAquick Gel-Extraction-Kits geschilderten, wobei die kurzen Oligonukleotide nicht an die Säulenmatrix zu binden vermögen und daher mit eluiert werden.

Dazu wurde die DNA-Probe mit dem Vier- bis Fünffachen ihres Volumens an CP-Puffer versetzt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Diese Lösung wurde auf eine Säule des E.Z.N.A Cycle-Pure-Kits pipettiert und diese 1 min bei 10000 G und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Zentrifugats wurden 750 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und diese erneut 1 min bei 10000 G und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und der Waschschrift wiederholt. Zum Trocknen der Säulen wurden diese 1 min bei 10000 G und Raumtemperatur zentrifugiert. Es wurde überprüft, ob die Außenwand der Säulen trocken war, bevor diese in neue sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt wurden. Zur Elution wurden 50 µl Wasser direkt auf den weißen Filter der Säule pipettiert und diese erneut 1 min bei 10000 G und Raumtemperatur zentrifugiert.

2.2.2.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Das Prinzip der DNA-Extraktion aus Agarosegelen beruht auf der unterschiedlichen Bindungsfähigkeit von DNA-Fragmenten an eine Silica-Membran bei variablen pH- und Salzkonzentrations-Bedingungen.

Durch Zugabe eines Bindungspuffers, der über eine hohe Salzkonzentration und einen niedrigen pH-Wert verfügt, zu einem DNA-enthaltenden Agarosegelfragment, wird zum einen das Agarosegel wieder verflüssigt, zum anderen bindet die DNA in diesem Hochsalzmillieu an die Silica-Membran einer Trägersäule. Da die Bindung der DNA an die Silica-Membran pH-Wert-abhängig ist (optimale Bindung bei $\text{pH} \leq 7.5$), enthält der Bindungspuffer zusätzlich 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, Enzymen und Oligonukleotiden gereinigt. Die Elution der an die Silica-Membran gebundenen DNA erfolgt pH-Wert-abhängig mit Hilfe eines leicht alkalischen Puffers ($\text{pH} 8.5$) oder Wasser.

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

Die DNA-Probe wurde abgewogen, indem zunächst das Gewicht eines leeren 2 ml-Reaktionsgefäßes bestimmt wurde und dieses dann von demjenigen des mit der Probe befüllten- subtrahiert wurde. Zu einem bestimmten Gelgewicht wurde das Dreifache dieses Gewichtes an QG-Puffer gegeben. Danach wurde die Probe für 10 min bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 550 rpm im Thermoblock schüttelinkubiert. Nachdem sich das Gel durch die Inkubation vollständig gelöst hatte, wurde die Probe vortex-gemischt. Zur Überprüfung der regelrechten pH-Wert-Verhältnisse, und damit der Bindungsbedingungen der DNA an die Silica-Membran, wurde die gelbe Farbe des in der Suspension enthaltenen Indikators durch optische Überprüfung gewährleistet. Dann wurde zum Ansatz ein Gelvolumen Isopropanol hinzugefügt, unter der Annahme einer Dichte von 1 kg/dm^3 . Die Lösung wurde vortex-gemischt, 750 μl davon auf die QIAquick-Spin-Säule pipettiert und bei 12000 G und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Zentrifugats wurde mit dem Rest der Lösung analog verfahren. In einem nächsten Schritt wurden 400 μl QG-Puffer auf die Säule gegeben und diese bei 12000 G 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 12000 G und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen, im Anschluss wurde eine erneute Zentrifugation für 30 s bei 12000 G und Raumtemperatur durchgeführt. Die Säule wurde in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß 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 10000 G und Raumtemperatur mit Wasser eluiert.

2.2.2.7 Transformation chemisch kompetenter E.coli-Bakterien TOP 10 F'

Diese zuerst 1944 von Avery, McCarty und MacLeod beschriebene Methode dient dem Einbringen von Fremd-DNA in Bakterienzellen, wobei zumeist zirkuläre DNA-Moleküle Verwendung finden (Avery et al. 1944).

Zunächst werden die Bakterienzellen mit dem aufzunehmenden Plasmid auf Eis inkubiert. Dies führt zur Kondensation des Plasmidkonstruktes an der Zellwand. Der nachfolgende Hitzeschock sorgt für eine zeitlich begrenzte erhöhte Permeabilität der Zellwand, während derer das Plasmid in das Bakterium aufgenommen wird.

Im Einzelnen geschah dies so: Die Plasmidlösung wurde zunächst zur besseren Durchmischung kurz vortex-gemischt, anschließend anzenrifugiert und auf Eis vorgekühlt. Die chemisch kompetenten Bakterien wurden von -80 °C Lagerungstemperatur auf Eis aufgetaut. 20 µl der Bakteriensuspension wurden darauf in das sterile Gefäß überführt, welches die Plasmidlösung enthielt und der Reaktionsansatz durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und anschließend 45 min auf Eis inkubiert.

Der Hitzeschock wurde durch Überführen des Reaktionsgefäßes in einen auf 42 °C vorgeheizten Thermoblock für 35 s appliziert. Nach Zugabe von 200 µl SOC-Medium (*super optimal broth (SOB) with catabolite repression*) bei 37 °C wurde das Reaktionsgemisch für 45 min bei 37 °C und 300 rpm schüttelinkubiert und anschließend auf antibiotikahaltigen, auf Raumtemperatur vorgewärmten Agarplatten ausplattiert. Dabei wurden je 100 µl des Reaktionsgemisches auf einer Agarplatte mittels einer aus einer Pasteurpipette geformten dreieckförmigen Plattieröse verteilt und die Agarplatten bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.2.8 Elektroporation kompetenter E.coli-Bakterien BJ 5183

Ein weiteres Verfahren zur Transformation geeigneter, kompetenter Bakterien ist die Elektroporation (Neumann et al. 1982). Die Elektroporation oder Elektrotransformation kam bei Rekombinase A-positiven E.coli-Bakterien des Stammes BJ 5183 zum Einsatz.

Bei diesem Verfahren dient ein kurzer elektrischer Schlag zur reversiblen Permeabilisierung der Zellmembran, nachdem auch hier die DNA durch Vorinkubation auf Eis an die Zellmembran angelagert wird.

Zunächst wurde ein Aliquot von 40 µl Bakteriensuspension in seinem sterilen Reaktionsgefäß auf Eis aufgetaut, dann mit 0,7 µg Plasmid-DNA in 10 µl Wasser versetzt und durch sanftes Auf- und Abpipettieren gemischt. Diese Suspension wurde dann in eine Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand überführt und im Schlitten des Elektroporationsgerätes einem kurzen Spannungspuls von 2,1 kV bei 200 Ω ausgesetzt. Unmittelbar im Anschluss an diese Elektroporation wurde die Suspension nach Zugabe von 200 µl SOC-Medium bei Raumtemperatur in ein neues steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 45 min bei 37 °C und 300 rpm schüttelinkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach demjenigen nach Hitzeschocktransformation.

2.2.2.9 Vereinzeln von Bakterienklonen und Flüssigkultur

Um eine möglichst große Menge an rekombinanten Plasmiden zu erhalten, wurden nach Transformation und Inkubation über Nacht monoklonale Bakterienkulturen von den beimpften Agarplatten gepickt und eine Übernacht-Flüssigkultur angelegt.

Versuchsbedingungen: Nach einer Inkubationszeit von etwa 12 Stunden wurden die Agarplatten dem Brutschrank entnommen. Um ausschließlich monoklonale Kolonien zu erhalten, wurden nur solche Kolonien weiterverwendet („gepickt“), die klar begrenzt waren, eine runde Form aufwiesen und an keine anderen Kolonien auf der Platte Anschluss hatten. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden die Kolonien vorsichtig von der Platte abgetragen, unter Vermeidung der Mitnahme einer nennenswerten Agarmenge. Für jede neue Kolonie wurde eine neue Pipettenspitze verwendet.

Zur Vermehrung der Bakterien wurden Übernacht-Flüssigkulturen 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-Stammlösung versetzt. Die so angelegte Übernachtskultur wurde für mindestens 12 Stunden bei 37 °C und 100 rpm in einem sterilen 15 ml-Zentrifugengefäß im Schüttelinkubator inkubiert.

2.2.2.10 PCR-basierte Methoden

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* „PCR“) dient der zellfreien exponentiellen Amplifikation kürzerer DNA-Abschnitte *in vitro*. Diese Reaktion, 1983 von K. Mullis erstmals in ihrer heutigen Form angewandt und 1986 ausführlich beschrieben (Mullis et al. 1986), verläuft in mehreren, sich zyklisch wiederholenden Schritten.

Diesen zyklischen Schritten Denaturierung, *Annealing* und Elongation geht ein längerer Denaturierungsschritt voraus. Die PCR vervielfältigt dabei einen DNA-Abschnitt zwischen zwei kurzen, gegenläufigen und zu an beiden Enden des zu vervielfältigenden Abschnittes gelegenen Sequenzen komplementären Oligonukleotiden, den *Primern* der Reaktion. Zunächst muss der zu vervielfältigende DNA-Muster-Doppelstrang, das sogenannte *Template*, in zwei Einzelstränge denaturiert werden; dies geschieht durch Hitzedenaturierung.

Im nächsten Schritt, dem *Annealing*, hybridisieren sich die Primer durch Erniedrigung der Reaktionstemperatur an ihre komplementären Sequenzen. Eine DNA-Polymerase synthetisiert dann einen vom 3'-OH-Ende des Primers ausgehenden, zum *Template* komplementären DNA-Strang in Richtung auf den jeweils anderen Primer (Elongation). Dieser neue Strang steht im nächsten Zyklus seinerseits als *Template* zur Verfügung, so dass, die ausreichende Zugabe von Primer vorausgesetzt, durch zyklische Wiederholung der Reaktion eine exponentielle Amplifikation des Ursprungs-*Template* möglich ist.

In Praxi wird diese Reaktion 20- bis 50-fach wiederholt. Der vielfach nötige Hitzedenaturierungsschritt setzt für die darauf folgende Elongation eine hitzestabile DNA-Polymerase voraus, die mit der Taq-Polymerase aus dem thermophilen *Deinococcus-Bakterium thermus aquaticus*, beziehungsweise neueren, für den Laborgebrauch gentechnisch adaptierten Derivaten zur Verfügung steht.

Im Laufe der Arbeit kamen verschiedene Enzyme, Primer und Reaktionsansätze zum Einsatz, die im Folgenden kurz dargestellt werden sollen.

Colony-PCR

Die PCR-Reaktionen, welche der Verifizierung einer erfolgten Transformation und anschließenden Amplifikation des transformierten Plasmids dienen, wurden als modifizierte Colony-PCR ausgeführt. Das Prinzip der Colony-PCR beruht auf der Tatsache, dass die Bestandteile einiger weniger Bakterien im Reaktionsansatz einer robusten PCR-Reaktion diese nicht zu stören vermögen. Zugleich dient der Denaturierungsschritt der PCR-Reaktion dem Aufschluss des Bakteriums und der Freisetzung der DNA, die dann für die Amplifikation zur Verfügung steht. Dies macht man sich zunutze, um Bakterien auf bestimmte Gene, in diesem Fall das hineintransformierte Plasmid, zu untersuchen.

Üblicherweise geschieht dies so, dass die Pipettenspitze, die, wie oben beschrieben, zum Picken einer Bakterienkolonie Verwendung fand, vor dem endgültigen Überführen der gepickten Kultur in das das LB-Medium enthaltende Zentrifugenröhrchen kurz in ein

Reaktionsgefäß mit einem geeigneten PCR-Ansatz getaucht wird. So wird eine geringe Menge Bakterien in das PCR-Tube überführt und es kann verifiziert werden, ob der Klon das gewünschte Gen enthält, bevor die Übernacht-Flüssigkultur überhaupt inkubiert wird. Auf diese Weise kann am nächsten Tag mit großer Sicherheit vorausgesagt werden, ob ein Zentrifugenröhrchen, aus dessen Bakterieninhalt eine Plasmidextraktion ausgeführt wird, das gewünschte Plasmid enthält.

Bei den gegebenen Versuchsbedingungen konnte dieses Verfahren nicht in dieser Art und Weise verwendet werden, da die angeimpften Agarplatten mit der Plasmidlösung, welche zur Transfektion der ausplattierten Bakterien Verwendung gefunden hatte, zu stark mit dem Insert der Ligation kontaminiert waren, was zu einer erhöhten Zahl falsch positiver Colony-PCR-Reaktionen geführt hätte. Daher wurden die Reaktionen mit je 1 µl Bakteriensuspension aus den Übernacht-Flüssigkulturen durchgeführt.

Bei der weiter unten ausführlich beschriebenen Rekombinations-Colony-PCR dagegen konnte eine klassische Colony-PCR eingesetzt werden, da das Entstehen eines Amplifikates eine Rekombination voraussetzte, für die wiederum eine Transformation nötig war, so dass die Gefahr der Kontamination mit freier Plasmidlösung keine Rolle spielte.

Es kam Taq-Polymerase von den Firmen PeqLab und Invitrogen zum Einsatz.

Quantitative *real-time*-PCR

Die quantitative *real-time*-PCR ist eine PCR-basierte Methode zur relativen Quantifizierung geringer DNA-Mengen. Das Prinzip beruht auf der Interkalierung eines Fluoreszenzfarbstoffes in doppelsträngige DNA (dsDNA). Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist in Lösung nicht nachweisbar und erst seine Bindung an dsDNA lässt ihn als Farbstoff aktiv werden. Führt man nun eine PCR durch, erhöht sich, wie oben beschrieben, mit jedem Zyklus die Menge an doppelsträngiger DNA im Reaktionsgemisch. Dies führt, wenn der Reaktionsansatz einen geeigneten Fluoreszenzfarbstoff enthält, wiederum zu einer exponentiellen Zunahme der Fluoreszenz des Reaktionsgemisches bei einer definierten Wellenlänge. Das Ausmaß des exponentiellen Anstieges wiederum variiert in Abhängigkeit der eingesetzten DNA-Menge. Diese Tatsache kann zur ihrer Quantifizierung genutzt werden, wenn man den Anstieg der Fluoreszenz zeitgleich mit der Durchführung der PCR-Reaktion bestimmt, wie es mit einem *real-time-cycler* möglich ist. Die quantitative *real-time*-PCR fand unter Verwendung der Reagenzien aus dem QuantiTect SYBR-Green-PCR-Kit (Qiagen) statt.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode genutzt, um mRNA PGR-regulierter Gene zu quantifizieren, was deren reverse Transkription zu cDNA voraussetzt.

Diese geschah mit Hilfe der reversen-Transkriptase-Reaktion (RT).

Reverse Transkription

Mit Hilfe der reversen Transkription ist es möglich, eine zu einer RNA-Sequenz komplementäre cDNA zu synthetisieren. Bei dieser cDNA (*complementary DNA*) handelt es sich um ein einzelsträngiges Molekül, dessen Basensequenz komplementär zu einer zugrunde liegenden mRNA ist. Eine solche reverse Transkription der RNA ist nur mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase möglich. Die hierzu verwendeten DNA-Polymerasen sind rekombinante retrovirale Enzyme. Diese erzeugen während der reversen Transkription ein RNA-DNA-Hybrid und ermöglichen so die Synthese einer komplementären cDNA mit einer RNA als Template. Eingesetzt wurde hierzu SuperScript III Reverse Transkriptase (Invitrogen).

Die Reaktion umfasst drei Schritte. Zunächst wird ein erster Reaktionsansatz bei 65 °C für 5 min erhitzt, um eine Denaturierung der RNA zu erreichen. Es folgt eine Inkubation auf Eis für wenigstens eine Minute, um den Denaturierungsvorgang zu stoppen. Die eigentliche Reaktion findet dann bei 50 °C nach Zugabe der Polymerase und nötigen Cofaktoren in einem programmierbaren Thermocycler statt und wird anschließend durch fünfminütige Inkubation bei 85 °C beendet.

Im ersten Ansatz werden 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 folgt eine Inkubation auf Eis für mindestens 1 min, um den Vorgang der Denaturierung zu unterbrechen. Dieser Reaktionsansatz wird vorsichtig mit einem zweiten Ansatz, der aus 2 µl 10x RT-Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNase out und 1 µl Superscript besteht, gemischt. Danach erfolgte die Synthese für 50 Minuten bei 50 °C. Durch fünfminütige Inkubation bei 85 °C wurde die RT inaktiviert.

Temperatur	Zeit
65 °C	5 min
0 °C	1 min
50 °C	50 min
85 °C	5 min

Temperaturbedingungen der Reaktion

Die so entstandene cDNA steht dann für die folgende quantitative *real-time*-PCR zu Verfügung.

Sequenzierung

Mit Hilfe der Methode der modifizierten Polymerase-Kettenreaktion mit Kettenabbruch ist es möglich, die genaue Basenabfolge kürzerer DNA-Fragmente zu bestimmen. Zusätzlich zu den Desoxyribonukleotiden (dNTPs), wie sie als Substrat für eine PCR benötigt werden, werden vier unterschiedliche, mit jeweils einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxyribonukleotide (ddATP, ddCTP, ddTTP und ddGTP) eingesetzt. Wird nun ein solches Didesoxyribonukleotid beim so genannten *Cycle sequencing* in die DNA eingebaut, 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. Da nun an jedem Punkt der neu synthetisierten DNA mindestens ein Kettenabbruch stattfindet, lässt sich durch die Fluoreszenzmarkierung jedes einzelnen Fragmentes unterschiedlicher Länge das Nukleotid am Ende und damit, durch Sortierung durch Elektrophorese, letztendlich die genaue Basenfolge determinieren.

Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurde wiederholt der gleiche Reaktionsansatz verwendet. Für einen einfachen Ansatz wurden 4 µl Aai, 5,5 µl 2,5x Puffer und 2 µl Sequenziermix (enthält die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Didesoxynukleotide) vortex-gemischt. Danach wurden 1,5 µl *Forward*-Primer (10 µM) und 7 µl der zu sequenzierenden DNA in den Ansatz gegeben und dieser vortex-gemischt. Die Sequenzierung erfolgte in beiden Orientierungen durch Verwendung unterschiedlicher Primer, um 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	

Temperaturbedingungen des *Cycle sequencing*

Nach Abschluss des *Cycle sequencing* wurde die DNA gefällt. Es wurden 80 µl 0,3 M Natriumacetat (NaAc) und 300 µl Ethanol p.a. hinzugefügt, der Ansatz vortex-gemischt und für mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz 10 min bei 4 °C und 16100 G zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das *Pellet* bei 37 °C im Schüttelinkubator bei offenem Reaktionsgefäß getrocknet.

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

Primer der PCR-basierten Methoden

Sämtliche verwendeten Primersequenzen wurden mit Hilfe des Online-Programms Primer3 (Steve Rozen/sourceforge.net) erstellt. Synthese von MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer gibt die Tabelle **11**.

Tabelle 11: PCR-Primer

Primer-Name	Sequenz	Funktion
PGR-Seq-1A-Fw	ACACCTTGCCTGAAGTTTCG	Colony-PCR Umklonierung
PGR-Seq-1B-Rv	AGCTGTCTCCAACCTTGAC	Colony-PCR Umklonierung
PGR-FL-1-Fw	TTGGTACCTCCCTCTGCCCTATAT	Sequenzierung B-Isoform
PGR-Seq-1B-Rv	AGCTGTCTCCAACCTTGAC	Sequenzierung B-Isoform
PGR-IsoA-Fw	GGTACCGAACTTCCCGAAGATCCAC	Sequenzierung
PGR-Seq-2B-Rv	CAGACGAGACTGAGGCACTG	Sequenzierung
Just1	CAGCCTTCCCGATTTC	Sequenzierung
Just2	GTGGTCTAAATCATTGCCAGG	Sequenzierung
PGR-FL-4-Fw	TTTGTGACTAGTCTTAATCAACTAGG	Sequenzierung
PGR-FL-4-Rv	TTGCGGCCGCCACAAAATTTAATTCTTA	Sequenzierung
EasyReko	CAGGGCCAGCTGAACATAAT	Rekombinations-Colony-PCR
TrackReko	CCTGACGAGCATCACAAAA	Rekombinations-Colony-PCR
FKBP5-Fw	TCCCTCGAATGCAACTCTCT	quantitative <i>real-time</i> -PCR
FKBP5-Rv	TCTCCAAAACCATATCTTGGTC	quantitative <i>real-time</i> -PCR
EZF-Fw	CCCAATTACCCATCCTTCCT	quantitative <i>real-time</i> -PCR
EZF-Rv	ACGGTAGTGCCTGGTCAGTT	quantitative <i>real-time</i> -PCR
HSD11B2-Fw	TCATCACCGGCTGTGACTC	quantitative <i>real-time</i> -PCR
HSD11B2-Rv	CCGCATCAGCAACTACTTCA	quantitative <i>real-time</i> -PCR
G6PC-Fw	TGCCCTGATAAAGCACTTC	quantitative <i>real-time</i> -PCR
G6PC-Rv	GAGGAAAATGAGCAGCAAGG	quantitative <i>real-time</i> -PCR
TGFB3-Fw	GCAGAAGGATCACCACAACC	quantitative <i>real-time</i> -PCR
TGFB3-Rv	GTTTCATGGACCCACTTCCAG	quantitative <i>real-time</i> -PCR
GAS6-Fw	AGTGCCTGGAGGAGCTGT	quantitative <i>real-time</i> -PCR
GAS6-Rv	GAAGAAGTTGCCCATGAGGT	quantitative <i>real-time</i> -PCR
NEDD9-Fw (HEF1)	TTTCATCTAGCGCTGCACTC	quantitative <i>real-time</i> -PCR
NEDD9-Rv (HEF1)	ATGACGGTCAGGATGTCTCC	quantitative <i>real-time</i> -PCR
P2RY2_Fw	GGCACCTGAGAGGAGAAG	quantitative <i>real-time</i> -PCR
P2RY2-Rv	CCATTGATGGTGTCAATCCA	quantitative <i>real-time</i> -PCR
RASSF-Fw	CTGAAGCTGCTGCTCAACAA	quantitative <i>real-time</i> -PCR
RASSF-Rv	GGCTATCTCCTCCAGCCTCT	quantitative <i>real-time</i> -PCR
Vil2-Fw	GAACAGACCTTTGGCTTGGGA	quantitative <i>real-time</i> -PCR
Vil2-Rv	AGACGTGGGGCATAAAACAC	quantitative <i>real-time</i> -PCR
GAPD-Fw	AGGTGAAGGTCGGAGTCAAC	quantitative <i>real-time</i> -PCR
GAPD-Rv	TTGATTTTGGAGGGATCTCG	quantitative <i>real-time</i> -PCR

Reaktionsansätze der PCR-basierten Methoden

Tabelle 12: Colony-PCR Umklonierung

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
Taq-Polymerase	0,125 µl
10x Puffer (Invitrogen)	1,25 µl
Primer Fw (100 pM/µl)	0,375 µl
Primer Rv (100 pM/µl)	0,375 µl
dNTP-Mix (2,5 mM)	0,25 µl
Q-Solution (QIAGEN)	2,5 µl
Bakterienkulturmedium	1 µl
Aqua ad iniectabilia	6,625 µl
Endvolumen	12,5 µl

Tabelle 13: Rekombinations-Colony-PCR

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
Taq-Polymerase	0,125 µl
10x Puffer (Invitrogen)	1,25 µl
Primer Fw (100 pM/µl)	0,375 µl
Primer Rv (100 pM/µl)	0,375 µl
dNTP-Mix (2,5 mM)	0,25 µl
Q-Solution (QIAGEN)	2,5 µl
Aqua ad iniectabilia	7,625 µl
Endvolumen	12,5 µl

Tabelle 14: Amplifikation zur Sequenzierung, Fragmente 1 und 3

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
Taq-Polymerase	0,5 µl
10x Puffer (Invitrogen)	5 µl
Primer Fw (100 pM/µl)	1 µl
Primer Rv (100 pM/µl)	1 µl
dNTP-Mix (2,5 mM)	1,1 µl
DNA-Lösung	3 µl
Aqua ad iniectabilia	38,4 µl
Endvolumen	50 µl

Tabelle 15: Amplifikation zur Sequenzierung, Fragment 2

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
Taq-Polymerase	0,5 µl
10x Puffer (Invitrogen)	5 µl
Primer Fw (100 pM/µl)	1 µl
Primer Rv (100 pM/µl)	1 µl
dNTP-Mix (2,5 mM)	1,1 µl
DNA-Lösung	3 µl
Q-Solution (QIAGEN)	10 µl
Aqua ad iniectabilia	28,4 µl
Endvolumen	50 µl

Tabelle 16: Sequenzierreaktion

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
Aqua ad iniectabilia	2 µl
Big Dye-Reaktionsmix	5,5 µl
Sequenzierpuffer	7 µl
Sequenzierprimer	1,5 µl
Plasmid	4,0 µl
Endvolumen	20 µl

Tabelle 17: quantitative *real-time*-PCR P2RY2

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
QuantiTect SYBR-Green	10 µl
Glycerin 5%	4 µl
Primer Fw (100 pM/µl)	0,15 µl
Primer Rv (100 pM/µl)	0,15 µl
cDNA	5 µl
Aqua ad iniectabilia	0,7 µl
Endvolumen	20 µl

Tabelle 18: quantitative *real-time*-PCR RASSF2

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
QuantiTect SYBR-Green	10 μ l
Primer Fw (100 pM/ μ l)	0,25 μ l
Primer Rv (100 pM/ μ l)	0,25 μ l
cDNA	5 μ l
Aqua ad iniectabilia	4,5 μ l
Endvolumen	20 μ l

Tabelle 19: quantitative *real-time*-PCR Vil2, FKBP5, HSD11B2, NEDD9, Fum, GAPDH

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
QuantiTect SYBR-Green	10 μ l
Primer Fw (100 pM/ μ l)	0,15 μ l
Primer Rv (100 pM/ μ l)	0,15 μ l
cDNA	5 μ l
Aqua ad iniectabilia	4,7 μ l
Endvolumen	20 μ l

Tabelle 20: quantitative *real-time*-PCR TGFB3

Reagenzien (Konzentrationen)	Menge
QuantiTect SYBR-Green	10 μ l
Q-Solution (Qiagen)	4 μ l
Primer Fw (100 pM/ μ l)	0,15 μ l
Primer Rv (100 pM/ μ l)	0,15 μ l
cDNA	5 μ l
Aqua ad iniectabilia	0,7 μ l
Endvolumen	20 μ l

Cycler-Programme

Tabelle 21: Colony-PCR und Rekombinations-Colony-PCR

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94 °C	3 min	1
94 °C	20 s	35
56 °C	20 s	
72 °C	40 s	
72 °C	4 min	1
4 °C	permanent	1

Tabelle 22: Amplifikation der PGR-cDNA zur Sequenzierung (*touch-down*)

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94 °C	2 min	1
94 °C	20 s	35
60 °C -0,1 °C/Zyklus	20 s	
68 °C	2 min	
68 °C	5 min	1
4 °C	permanent	1

2.2.2.11 Plasmidextraktion aus E.coli-Bakterien

Um Plasmide aus Bakterien zu isolieren, werden diese zunächst zentrifugiert und das dadurch entstandene Pellet in einem alkalischen Puffer gelöst, der eine Zellyse induziert (u. A. Birnboim et al. 1979). Das Lysat wird darauf in einem stark salzhaltigen Puffer neutralisiert, das dadurch entstehende Hochsalzmilieu bietet optimale Bedingungen für die Adhärenz der DNA an die Silica-Membran einer zentrifugierbaren Trägersäule. Anschließende Waschschrte dienen dazu, die adhärenente DNA von makromolekularen Zellkomponenten und Salzen zu befreien.

In einem leicht alkalischen Milieu (pH 8,5) ist das Bindungsverhalten der Plasmid-DNA an die Trägersäule wiederum so schwach, dass die DNA mit einem solchen Puffer oder sogar mit Wasser ausgewaschen werden kann. Zur Plasmid-DNA-Präparation wurde das NucleoSpin Plasmid-Plasmidextraktionskit der Firma Macherey-Nagel verwendet.

Im Einzelnen geschah dies so: Die 10 ml Zellsuspension aus einer Übernacht-Flüssigkultur wurden in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen für 10 min bei 1300 G und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgegossen und das Bakterienpellet in 250 µl Puffer A1 resuspendiert, bis keine Zellflocken mehr sichtbar waren. Die Suspension wurde aus den 15 ml-Zentrifugenröhrchen in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 250 µl Puffer A2 zur Lyse der Bakterien wurde das Reaktionsgefäß zur Durchmischung mehrfach invertiert, es folgte eine Inkubation von max. 5 min bei Raumtemperatur. Zur Neutralisation des Lysates wurden wiederum 300 µl Puffer A3 hinzugefügt. Nach erneutem mehrmaligem Umwenden des Gefäßes folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 16100 G zur Trennung der Zelltrümmer von der in Lösung befindlichen DNA. Der entstandene Überstand wurde mittels einer Pipette vorsichtig vom Pellet getrennt, auf eine Säule des NucleoSpin-Kits überführt und erneut 1 min bei 16100 G und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl auf 37 °C vorgewärmter Puffer AW auf die Säule des NucleoSpin Kits gegeben und diese im Anschluss 1 min bei 16100 G und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Zentrifugats und Zugabe von 600 µl Puffer A4 auf die Säule folgte eine weitere einminütige Zentrifugation bei 16100 G. Das Zentrifugat wurde wiederum verworfen und die Säule zur Trocknung 2 min bei 16100 G zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues, steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und es wurden 50 µl Puffer AE direkt auf die Membran pipettiert. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA durch Zentrifugation bei 16100 G für eine Minute eluiert.

2.2.3 Adenovirales Expressionssystem

Das Typ-5-Adenovirus ist ein effizientes und vielseitig einsetzbares Werkzeug zur Genübertragung und –expression in Zellkulturen und Tiermodellen und wurde auch beim Menschen zur Gentherapie eingesetzt. Nahezu sämtliche beim Menschen vorkommende Zelltypen lassen sich mit ihnen infizieren, so dass sie als Expressionssystem dienen können, wo eine Transfektion unter Umständen versagt.

Adenoviren des Serotyps 5 sind zugleich nur gering pathogen und da sie nicht in das Genom integriert werden, vermutlich nicht onkogen. Das verwendete Adenovirus enthält darüber hinaus Deletionen (in den Regionen E1 ($\Delta E1$, Ad5 Nukleotide 1 - 3533) und E3 ($\Delta E3$, Ad5 Nukleotide 28130 - 30820)) in seinem Genom, die seine Pathogenität einschränken, da die E3-Region für die Umgehung der Immunantwort des Wirtsorganismus eine entscheidende Rolle spielt und ihr Fehlen außerdem eine Replikation unmöglich macht. Die Modifikation dient zugleich der Verkürzung des Virusgenoms, so dass bis zu 7,5 kb Fremd-DNA aufgenommen werden können, ohne die Enkapsidation der viralen DNA einzuschränken (Benihoud et al., 1999; Bett et al., 1993).

Nach der Arbeit von He et al. (1998) steht ein seit längerem auch kommerziell erhältliches System zu ihrer vereinfachten Generierung zur Verfügung.

Das Klonieren der zu exprimierenden cDNA in die DNA des Adenovirus wäre dabei langwierig und technisch anspruchsvoll, handelt es sich doch beim Virusgenom um ein 33,4 kb langes zirkuläres Genom. Anstatt nun die cDNA direkt einzufügen, wählt man einen Umweg und kloniert zunächst in den Vektor pAdTrack-CMV, der später als Transfervektor fungiert.

Anschließend wird durch homologe Rekombination mit dem viralen Genom - welches als Plasmid pAdEasy-1 vorliegt - und damit zugleich Integration der Expressionskassette in die virale E1-Region, das rekombinante adenovirale Genom erzeugt. Diese Rekombination findet in Rekombinase-*recA*-positiven E.coli-Bakterien des Stammes BJ 5183 statt.

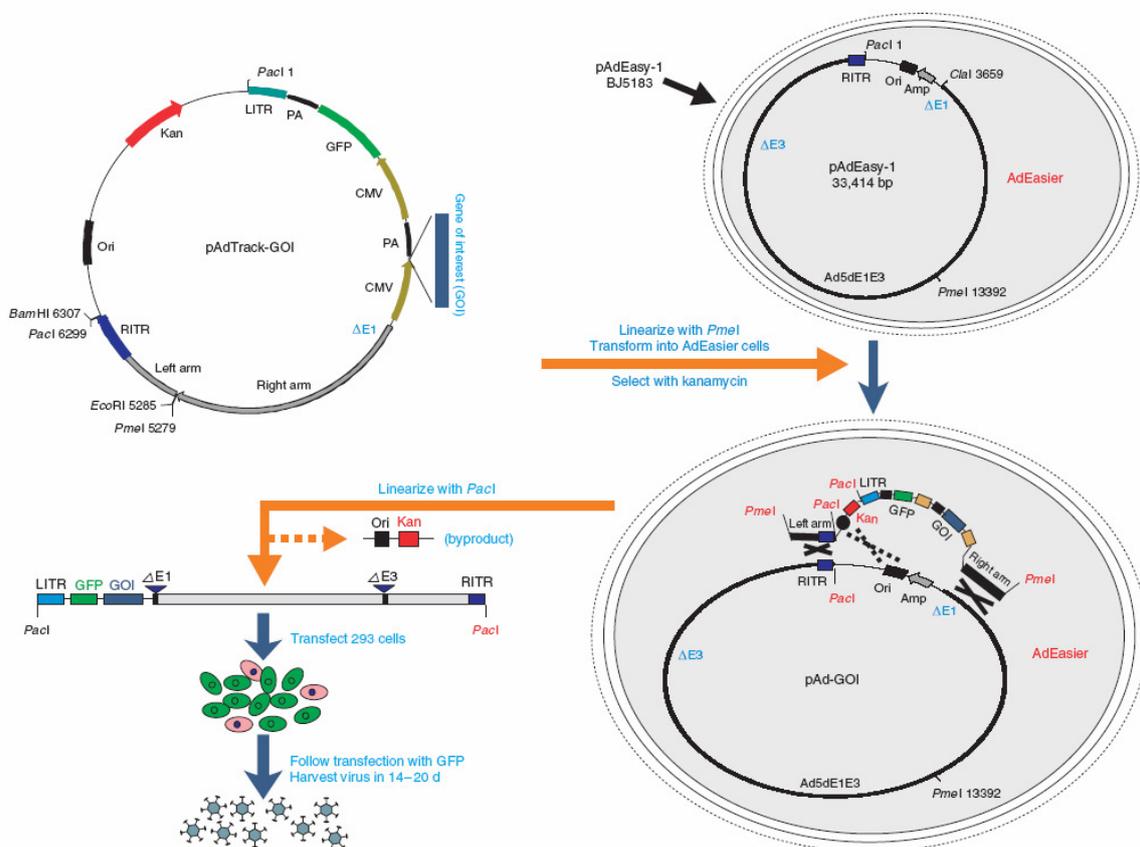


Abbildung 6: Schematische Darstellung des adenoviralen Expressionssystems. Die kodierende Sequenz des Zielgens wurde in den Transfervektor pAdTrack-CMV kloniert (cDNA hier als „gene of interest-GOI“ bezeichnet). Das erhaltene Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease Pme I linearisiert und mit dem Virusgenom (pAdEasy-1) durch Transformation in E. coli BJ 5183 (in mit pAdEasy-1 vortransformierter Form auch „AdEasier-Zellen“) zur homologen Rekombination gebracht. Über das Kanamycin-Resistenzgen (Kan) wurde auf rekombinante Plasmide selektioniert. Das mit der Restriktionsendonuklease PacI linearisierte rekombinante Virusgenom wurde in HEK293-Zellen transfiziert, welche die Fähigkeit besitzen, die Deletionen ($\Delta E1$, $\Delta E3$) im Virusgenom zu komplementieren und somit infektiöse, replikationsdefiziente, rekombinante Adenoviren zu bilden. Für eine Erklärung der einzelnen funktionell relevanten Regionen der beteiligten Vektoren siehe Vektordesektion im Kapitel „Material“. Modifizierte Graphik nach Luo 2007.

Im Einzelnen geht man dabei wie im Folgenden beschrieben vor:

Die cDNA, zu deren Überexpression das Virus später dienen soll, wird zunächst in die MCS des Vektors pAdTrack-CMV kloniert. So entsteht die vollständige, später in das Virusgenom integrierte Expressionskassette, bestehend aus einem CMV-Promotor, der folgenden Fremd-cDNA und dem zur Stabilisierung der später transkribierten mRNA nötigen folgenden Polyadenylierungssignal. Durch Transformation des Vektors in E.coli-Bakterien wird dann eine ausreichende Menge amplifiziert, wobei in diesem Fall hitzekompetente Bakterien zum Einsatz kamen. Das auf pAdTrack-CMV kodierte Kanamycin-Resistenzgen dient dabei der Selektion der transformierten Bakterien. Nach Extraktion des Plasmides wird dieses mit Hilfe der Restriktionsendonuklease PmeI linearisiert. pAdTrack-CMV enthält eine singuläre PmeI-Schnittstelle zwischen den beiden mit pAdEasy-1 homologen Sequenzen. So entsteht durch den Restriktionsverdau eine linearisierte Form mit den homologen Sequenzen zu beiden Enden des Vektors. Dies ist Voraussetzung für die nun folgende Rekombination.

Zur Rekombination wird pAdTrack-CMV in den Rekombinase-*recA*-positiven E.coli-Stamm BJ 5183 transformiert, in diesem Fall wurden elektrokompente Bakterien verwendet. Die Rekombinase A integriert den Vektor in das Virusgenom unter Austausch gegen ein Fragment von pAdEasy-1, welches den *origin of replication* und das Ampicillin-Resistenzgen enthält. Das Kanamycin-Resistenzgen von pAdTrack-CMV wird dabei ebenso in das Virusgenom integriert wie der *origin of replication*, so dass weiterhin die Selektion transformierter Bakterienklone durch Kultur in Kanamycin-haltigem Medium möglich ist.

Eine Rekombination kann jedoch nicht nur zwischen den beiden homologen Sequenzen stattfinden, sondern ist auch zwischen der einen Homologiesequenz (sogenannte „*right arm homology*“) und dem – ebenfalls homologen – *origin of replication*. In diesem Fall verbleibt in pAdEasy-1 ein mit 1854 bp längeres DNA-Fragment zwischen dem *origin* und der „*left arm homology*“ als im Falle des regelrechten Austausches gegen diesen Bereich aus pAdTrack-CMV. Bei pAdTrack-CMV ist dieser Bereich nur 307 bp lang.

Diese Tatsache kann genutzt werden, um mit Hilfe eines Kontrollverdaues mit Pacl zu überprüfen, ob die Rekombination zwischen den beiden Plasmiden wie gewünscht stattgefunden hat. Im Falle der korrekten Rekombination findet sich in einer an den Verdau anschließenden Elektrophorese ein 3,0 kbp großes und ein etwa 40 kbp großes Fragment, im Falle einer Rekombination über den *origin* findet sich anstelle des 3,0 kbp großen Fragmentes ein Fragment von 4,5 kbp Länge.

Da diese Prozedur nach Transformation der Plasmide und Ausplattieren der transformierten BJ 5183-Bakterien das anschließende Vereinzeln, Anlegen einer Übernachtkultur, Plasmidaufreinigung und Kontrollschneiden mit anschließender Elektrophorese voraussetzt, gestaltet sie sich recht aufwendig.

2.2.3.1 Rekombinations-Colony-PCR

Zur Vereinfachung der Kontrolle auf regelrechte Rekombination wurde eine PCR zu diesem Zweck etabliert. Diese PCR wurde als Colony-PCR ausgeführt, das heißt, von der über Nacht kultivierten Agarplatte wurden einzelne Kolonien gepickt und direkt in ein PCR-Reaktionsgefäß mit einem bereits vorgefertigten Reaktionsgemisch überführt. Die Primer dieser Reaktion liegen dabei zum einen in der homologen Region „*left arm homology*“ im Vektor pAdEasy-1, zum anderen downstream des homologen *origin of replication* im Vektor pAdTrack-CMV (auch möglich mit dem Transfervektor pShuttle-CMV). Auf diese Weise entsteht ausschließlich bei stattgehabter Rekombination ein Amplifikat und dies sowohl bei regelrechter Rekombination, als auch bei inkorrekt Rekombination über den *origin*. Auch hier gestattet die Fragmentlänge die Unterscheidung zwischen beiden Formen der Rekombination und auch hier ist das Fragment der PCR der regelrechten Rekombination mit 1438 bp kürzer als das der inkorrekten mit 3095 bp.

Auf diese Weise kann bereits am Tag nach der Co-Transfektion die Rekombination beurteilt werden und dies unter Umgehung verhältnismäßig aufwendiger Plasmidpräparationen mit anschließendem Restriktionsverdau.

Das regelrecht rekombinierte Virusplasmid wird anschließend, zur Herstellung einer ausreichenden Menge zur anschließenden Transfektion in HEK293-Zellen, erneut in E.coli-Bakterien transformiert und durch Bakterienkultur amplifiziert. Anschließend steht es nach Plasmidaufreinigung und Linearisation mit der Restriktionsendonuklease PacI sowie anschließender Fällung und Resuspension zur Transfektion bereit.

Nach Transfektion in HEK-Zellen kann die Virusproteinexpression über die Expression des nach Rekombination in das Virusgenom integrierten GFP-Gens verfolgt werden. Nach Aufreinigung der Viren dient das GFP wiederum zur Kontrolle der erfolgten Infektion.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Kultur von HEK293-Zellen und T47D-Y-Zellen

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 unter einer Sterilwerkbank mit laminarem Fluss und mit autoklavierten Instrumenten beziehungsweise Lösungen oder mit kommerziell steril erhältlichen Instrumenten/Lösungen durchgeführt.

Die Zellen wurden sämtlich in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre kultiviert. Als Nährmedium wurde für die HEK293-Zellen DMEM (*Dulbecco's Minimal Essential Medium*) mit 1% v/v Penicillin-Streptomycinlösungszusatz, 1% v/v Glutaminlösung und 10% v/v fötalem Kälberserum (FCS, inaktiviert) verwendet. Die T47D-Y-Zellen wurden im gleichen Medium kultiviert, mit dem Unterschied, dass das FCS *charcoal-stripped*, das heißt durch Aktivkohle von Steroidverunreinigungen befreit und MEM ohne Indikator Phenolrot zum Einsatz kam, um einer Verfälschung der Ergebnisse durch die Steroidhormonrezeptor-aktivierenden Eigenschaften von Phenolrot beziehungsweise Steroidverunreinigungen vorzubeugen.

Bei einer Bedeckung von über 90% des Bodens einer Zellkulturschale (über 90% Konfluenz) wurden die Zellen spätestens passagiert.

2.2.4.2 Beschichten von Zellkulturschalen

Um eine bessere Haftung der Zellen auf dem Boden der Zellkulturschalen, beziehungsweise -Flaschen zu gewährleisten, wurden ihre Böden mit Kollagen beschichtet.

Die auf Eis aufbewahrte Kollagenlösung (4 mg/ml) wurde dazu mit einer gekühlten, sterilfiltrierten phosphatgepufferten Salzlösung (*phosphate buffered saline*, 1x PBS-Lösung) 1:100 verdünnt. Es wurden 45,5 ml 1x PBS mit 500 µl Kollagen-Lösung versetzt und gründlich gemischt. 5 ml dieser Kollagen/PBS-Lösung wurden beispielsweise in eine kleine Zellkulturflasche gegeben und deren Boden durch Schwenken der Flasche benetzt, wobei die benötigte Menge abhängig von der Größe der Zellkulturflasche ist. Mit Hilfe einer Pipette wurde die verbliebene 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 in das Aufbewahrungsgefäß zur Weiterverwendung zurückgegeben.

2.2.4.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

In Schraubgefäßen bei -80 °C eingefrorene Zellen, wie die von Kathryn B. Horwitz zur Verfügung gestellten T47D-Y-Zellen, müssen zügig aufgetaut und in Kultur gebracht werden, da sie gegen ungünstige Umweltbedingungen in aufgetautem Zustand sehr empfindlich sind.

Dazu wurde ein Schraubgefäß bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und sein Inhalt vor der Entnahme mit etwas ebenfalls auf 37 °C vorgewärmtem Zellkulturmedium versetzt, bevor dieser entnommen wurde. Diese Suspension wurde zur Reinigung vor Aussaat in 5 ml Zellkulturmedium in einem 15 ml Zentrifugegefäß überführt und 5 min bei ~100 G und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellen wie unten beschrieben auf eine kollagenierte kleine Zellkulturflasche ausgesät.

Zum erneuten Einfrieren wurden Zellen zunächst, wie unten beschrieben, von ihrer Zellkulturschale gelöst. Nach Zentrifugation wurde das Pellet allerdings nicht in Zellkulturmedium aufgenommen, sondern in Cryomedium. Die Zellen wurden in 1 ml Cryomedium (50% MEM, 40% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und anschließend in einem sterilen 1,5 ml-Schraubgefäß bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.4.4 Aussäen, Passagieren und Ernten von Zellen

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

Das Nährmedium wurde aus den Zellkulturschalen abgesaugt und beispielsweise 5 ml Trypsin-Lösung auf eine Schale mit 15 cm Durchmesser gegeben. Zur gleichmäßigen Verteilung des Trypsins wurde die Schale leicht geschwenkt. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde es einige Minuten auf den Platten belassen. Nachfolgend wurde dieser Trypsinierungsvorgang durch Zugabe von 5 ml FCS-haltigem Nährmedium gestoppt. Nach Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml-Zentrifugegefäß wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren die Zellen vereinzelt. Danach folgte ein 5 minütiger Zentrifugationsschritt bei ~60 G. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in der für die folgende Aussaat nötigen Menge Nährmedium resuspendiert, beispielsweise in 30 ml für zwei 15 cm durchmessende Zellkulturschalen. Die so gewonnene Zellsuspension wurde je nach gewünschter Zelldichte in geeigneter Weise verteilt. In dem Fall, dass eine bestimmte Zelldichte nötig war, wurde die Zellkonzentration mit Hilfe eines CASY-Zellzählers (Schärfe-Systeme / innovatis AG) durch optische Dichtemessung bei Kapillardurchströmung bestimmt und die Suspension in Abhängigkeit von Zellkulturschalengröße und Konzentration entsprechend verdünnt.

2.2.4.5 Transfektion von HEK293-Zellen

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Es existieren viele unterschiedliche Transfektionsmethoden.

Bei dem verwendeten Transfektionsreagens Fugene der Firma Roche Diagnostics GmbH handelt es sich um eine Kombination verschiedener Lipide, welche nicht in der Lage sind, Liposomen auszubilden. Stattdessen bilden sich Mizellen mit positiv geladener Oberfläche, durch die negativ geladene Nukleinsäuren für die Einschleusung in Zellkulturzellen gebunden werden können. Diese Technik, die sowohl für Zelllinien als auch für Primärzellen eingesetzt werden kann, weist nur geringe Zytotoxizität auf. Die Kontrolle der Transfektionseffizienz gelingt durch die auf dem transfizierten Plasmid pAdEasy-1 lokalisierte Expressionskassette für GFP. Erfolgreich transfizierte Zellen können so durch ihre grüne Fluoreszenz bei 509 nm leicht unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgemacht werden.

Zur Transfektion des Plasmides pAdEasy-1 in HEK293-Zellen zur anschließenden Virusproduktion wurden 0,5 µg Plasmid-DNA in 10 µl Wasser eingesetzt. Zunächst wurden 48,5 µl serumfreies DMEM in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt. Dann wurden 1,5 µl Fugene 6-Transfektionsreagens direkt in das Medium pipettiert, um Kontakt des Transfektionsreagens mit der Kunststoffwand des Reaktionsgefäßes zu verhindern, bei dem es zur Anlagerung des Reagens an die Kunststoffwand kommen würde. Der Inhalt des Gefäßes wurde für eine Sekunde vortex-gemischt. Dieser Mischvorgang wurde nach Zugabe der 10 µl Plasmidlösung wiederholt. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung tropfenweise auf ein Well einer 12-well-Zellkulturschale gegeben.

2.2.4.6 Virusanzucht und Aufbereitung

Virusanzucht

Da die Virusmenge, die nach der Transfektion eines wells einer 6-well-Zellkulturschale von den an der Schale adhärenen HEK293-Zellen produziert wird, nicht für mehrere Experimente ausreicht, macht man sich die Tatsache zunutze, dass die bei der Lyse infizierter HEK-Zellen frei werdenden Viruspartikel ihrerseits neue HEK-Zellen zu infizieren vermögen.

Nach der Transfektion wurde also abgewartet, bis ein Großteil der Zellen lysiert war und das sie umgebende Medium reich an Viren. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen, mitsamt der enthaltenen Zelltrümmer und in einem 15 ml-Zentrifugengefäß bei 4 °C und

150 G für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand konnte nun für die Infektion einer größeren Zellkulturschale verwendet werden.

Dazu wurde von einem well einer am Vortag ausgesäten 6-well-Schale, deren Boden zu etwa 50% mit Zellen bedeckt war, das Medium abgenommen und verworfen. Der virushaltige Überstand wurde vorsichtig auf die Schale getropft und diese für 45 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Zellkulturmedium auf die für die Zellkulturschalengröße übliche Menge aufgefüllt, zum Beispiel 4 ml bei einem well einer 6-well-Zellkulturschale. Nach erneuter Lyse der Zellen stand das virushaltige Medium wiederum zur Infektion einer noch größeren Zellkulturschale zur Verfügung.

Auf diese Weise wurden sukzessive zunächst eine 10 cm-Schale, dann eine 15 cm-Schale und schließlich drei 15 cm-Schalen für jedes Virus infiziert. Die Zellen der zuletzt infizierten drei 15 cm-Schalen wurden schließlich zur endgültigen Viruspräparation verwendet.

Viruspräparation

Das Prinzip der Viruspräparation besteht in der Aufreinigung durch Gradienten-Ultrazentrifugation in einem Cäsiumchloridgradienten und anschließender Dialyse.

Hierzu wurden zunächst jeweils drei annähernd zu 100% mit kurz vor der Lyse stehenden HEK293-Zellen bedeckte 15 cm-Zellkulturschalen verwendet, also mit solchen Zellen, die schon kugelige Form annahmen und unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich grün fluoreszierten.

Von diesen Zellkulturschalen wurde vorsichtig das Medium abgesaugt, bis auf einen kleinen Rest, mit dem mit einer Pipette die Zellen vorsichtig abgespült wurden. Die abgelösten Zellen aller drei Zellkulturschalen konnten so zusammen in einem 50 ml-Zentrifugengefäß zentrifugiert werden. Das Zellpellet wurde nach Absaugen und Verwerfen des Überstandes in 7 ml Zellkulturmedium resuspendiert und das Medium auf eine 10 cm-Zellkulturschale gebracht. Im Brutschrank wurden die Zellen über Nacht zur Lyse belassen.

Am nächsten Tag wurde das virushaltige Medium der über Nacht inkubierten 10 cm-Zellkulturschale mitsamt der Zelltrümmer in ein 15 ml-Zentrifugengefäß überführt und in diesem dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C im Wasserbad wieder aufgetaut, um eventuell noch nicht lysierte Zellen zu zerstören und die enthaltenen Viren freizusetzen. Das Gefäß wurde im Anschluss für 10 min bei 4 °C und 1300 G zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde auf einen vorher geschichteten Cäsiumchloridgradienten in einem Ultrazentrifugengefäß geschichtet.

Der dreischichtige Cäsiumchloridgradient wurde durch Unterschichten der jeweils weniger dichten Lösungen mit den dichteren mit Hilfe einer Spritze mit langer Kanüle aufgebaut.

Das Zentrifugengefäß wurde bei 80000 G und 10 °C im Vakuum für 2:08 Stunden ohne Zentrifugenbremse zentrifugiert.

Nach Abnahme der obersten farblich abgesetzten Bande mit einer Pipette wurde die unterste - virushaltige - Bande mit einer 2 ml-Pipette abgenommen und in einem neuen Ultrazentrifugengefäß mit 12 ml der mitteldichten Cäsiumchloridlösung vermischt, dann bei ansonsten gleichen Bedingungen für 20 Stunden erneut zentrifugiert.

Nach diesem Zentrifugationsschritt demarkierte sich eine scharfe, schmale, graublaue Bande. Diese wurde nach Einspannen des Zentrifugengefäßes mit einer 1 ml-Spritze mit dünner Kanüle unter Durchstechen der Gefäßwand abgezogen. Die erhaltene Viruslösung wurde in eine Dialysekassette überführt und zweimal gegen einen Liter PBS für zwei Stunden, anschließend gegen einen Liter *2x Virus Storage Buffer* über Nacht dialysiert. Nachfolgend wurde durch Auswiegen das Volumen bestimmt und der gleiche Volumenanteil 100% Glycerin hinzugegeben. Die Virussuspension wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Unter den gewählten Bedingungen können die Viren unter relativ geringem Aktivitätsverlust auch über längere Zeit gelagert werden.

2.2.4.7 Western-Blot

Das Western-Blot-Verfahren ist ein Verfahren zur spezifischen Detektion von Proteinen mittels Antikörpern gegen geeignete Epitope der nachzuweisenden Proteine. Es wurde in seiner heutigen Form zuerst 1979 von Towbin et al. ausführlich beschrieben.

Zunächst wird die Proteinlösung mit dem Zielprotein in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die Proteine nach ihrer Größe getrennt werden. Ein optisch sichtbar markierter, parallel laufender Größenstandard ermöglicht dabei, die Größe des vom Antikörper detektierten Proteins zu bestimmen. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden in einem zweiten Schritt in einem orthogonal zu ihrer ursprünglichen Laufrichtung ausgerichteten Feld aus dem Gel heraus auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran transferiert („geblottet“). Hier können sie mittels Antikörpern sichtbar gemacht werden, wobei vorher die Membran mit Protein gesättigt werden muss, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu minimieren. Dies geschieht mit Lösungen von fettarmem Milchpulver oder bovinem Serumalbumin (BSA).

Nach Inkubation mit einem für das gesuchte Protein spezifischen Antikörper inkubiert man die Membran erneut, mit einem meist gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper. Dieser ist kovalent an ein Meerrettich-Peroxidase-Molekül gekoppelt.

Nach Zugabe eines unter Chemolumineszenz umgesetzten Substrates der Meerrettich-Peroxidase kann die Reaktion und damit mittelbar das Protein durch Schwärzung eines auf die Membran aufgelegten Röntgenfilmes oder durch Messung der kumulativen Lichtemission in einer Dunkelkammer mit einer geeigneten Kamera sichtbar gemacht werden.

Proteinextraktion

Zur Detektion des Progesteronrezeptors, sowohl in HEK293-Zellen als auch in T47D-Y-Zellen wurden diese zunächst geerntet und die Proteine extrahiert. Dazu wurden auf ein well einer 6-well-Zellkulturschale nach vorsichtigem Absaugen des Zellkulturmediums 400 µl RIPA-Puffer (Radioimmunopräzipitationsassaypuffer) gegeben und die Zellkulturschale für 10 min bei 4 °C inkubiert. Der Puffer mit den nunmehr lysierten Zellen wurde abgenommen und in sterile, vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. In diesen wurde das Lysat für 10 min bei 4 °C und 13600 G zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert.

Blotbedingungen

25 µl des Proteinextraktes wurden zunächst in einem 12% Acrylamid enthaltenden Gel nach Denaturierung (65 °C für 10 min im Thermoblock) und Zugabe von 5 µl Laemmli-Puffer bei 90 V im elektrischen Feld für 1 Stunde in einer mit Laufpuffer gefüllten Kammer aufgetrennt. Der Transfer geschah in einer mit Blotpuffer gefüllten Kammer bei 400 mA für 1:45 Stunden. Im Anschluss wurde der Blot auf einem Orbitalschwenker viermal für 5 min in TBST gewaschen und in 5% BSA für weitere 5 min geblockt. Nach erneutem viermaligem Waschen wurde der Blot mit Primärantikörper Maus anti-PGR 1/1000 in 5% Milchpulver oder BSA in TBST auf einem Rollmischer 2 Stunden inkubiert. Wiederum wurde der Blot viermalig in TBST gewaschen und mit dem Sekundärantikörper anti-Maus-POX 1/10000 für eine Stunde auf dem Rollmischer inkubiert. Nach vier weiteren Waschschritten wurde der Blot mit ECL-Lösung (Amersham Biosciences) entwickelt. Es wurde eine solche Menge der Lösung auf den Blot gegeben, dass diese den Blot gerade vollständig bedeckte, der benetzte Blot zwischen zwei Kopierfolien gegeben und die Autolumineszenz anschließend in einer Gelfotokammer gemessen.

Signalquantifizierung

Zur Angleichung der Rezeptorproteinmengen kam das Western-Blot-Verfahren auch quantitativ zum Einsatz. Hierzu wurde das Lumineszenzsignal über einen bestimmten Zeitraum digital erfasst und die kumulative Lumineszenz eines definierten Areals, in diesem Fall also einer Rezeptorproteinbande, computergestützt gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GeneSnap (CHEMI Genius² Bio Imaging System, Syngene, Cambridge, United Kingdom).

2.2.4.8 Radioaktivitäts-Bindungs-Assay

Zur Überprüfung der Fragestellung, ob die überexprimierten Varianten des Progesteronrezeptors in der Lage sind, Progesteron zu binden, kam ein Radioaktivitäts-Bindungs-Assay zum Einsatz.

Bei diesem Verfahren wurden intakte, lebende Zellen mit einem mit Tritium radioaktiv markierten Liganden des Progesteronrezeptors inkubiert. Das radioaktive Promegeston bindet während der Inkubationszeit quantitativ an seine intrazellulären Rezeptoren. Überschüssiger, nicht gebundener Radioligand wurde anschließend ausgewaschen und die Zellen daraufhin von der Zellkulturschale abgelöst und lysiert. Im Anschluss konnte durch die Bestimmung der Radioaktivität mittels eines Szintillationszählgerätes der gebundene Radioligand quantifiziert werden. So konnte bei bekannter Rezeptordichte (siehe Kapitel Titrierung, Ergebnisteil) die Hormonbindungsfähigkeit der Rezeptorvarianten untereinander und mit der unspezifischen Bindungskapazität nicht infizierter und demnach nicht PGR-exprimierender Zellen verglichen werden.

Zunächst wurden 6-well-Schalen mit einer standardisierten Zellzahl derart infiziert, dass davon ausgegangen werden konnte, dass nach 24 h jeweils die gleiche Menge Rezeptorprotein trotz verschiedener Varianten in jedem well vorlag. Die Konzentration des Radioliganden Promegeston wurde auf einen Wert im hohen physiologischen Bereich von 11,49 nM eingestellt. Nach einer einstündigen Inkubation mit 600 µl Hormonlösung in RPMI-Medium bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit je 1 ml RPMI bei 4 °C ohne Promegeston gespült. Die anschließende Zugabe von 1 ml 1 N NaOH diente der Zellyse, nach etwa 5 Minuten wurde die Lösung durch Zugabe von 1 ml 1 N HCl neutralisiert und in einem Szintillatortgefäß mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt. Die Messung erfolgte im Anschluss für 3 Minuten pro Gefäß in einem Szintillationszähler.

2.2.4.9 EIA

Zur Virustitrierung diente neben dem weiter oben beschriebenen Western-Blot-Verfahren auch das EIA-Verfahren (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, englisch ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)). Dabei handelt es sich um ein dem Western-Blot ähnliches antikörperbasiertes Verfahren zur Quantifizierung von Proteinen. Ein gegen ein Epitop des zu detektierenden Proteins gerichteter Antikörper ist dabei an eine feste Phase, in diesem Fall an den Boden einer 96-well-Platte gekoppelt. Die Proteinlösung wird in einem well dieser Platte eine definierte Zeit inkubiert, wobei es zur quantitativen Bindung des Proteins an den Antikörper kommt. Nach Abnehmen der Lösung inkubiert man, wie beim Western-Blot, die Platte mit einer Lösung, die einen zweiten, gegen ein anderes Epitop des zu detektierenden Proteins gerichteten Antikörper enthält. An diesen wiederum bindet man einen Sekundärantikörper, welcher eine Farbreaktion katalysiert, die zur quantitativen Auswertung des EIA dient.

Zur Detektion des Progesteronrezeptors wurde das kommerziell erhältliche NR Sandwich PR ELISA-Kit der Firma active motif verwendet.

Zellernte und Proteinextraktion für EIA

Zur Proteinextraktion aus infizierten T47D-Y-Zellen für einen folgenden EIA wurde nach dem modifizierten Herstellerprotokoll folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurde ein für den Test verwendetes zu etwa 70% konfluentes well einer 6-well-Zellkulturschale durch Absaugen von Zellkulturmedium befreit. Das well wurde zweimalig vorsichtig mit PBS-Lösung gespült, daraufhin 500 µl active-motif-Lysispuffer zugegeben und die Zellkulturschale für 10 min auf einem Orbitalschwenker bei 4 °C inkubiert. Die verbleibenden Zellen wurden mit Hilfe einer 1000 µl-Mikropipette von der Kulturschale abgespült und das Zellysate in ein auf 4 °C vorgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation bei 14000 G und 4 °C für 10 min wurden 400 µl Überstand vorsichtig abgenommen und für den EIA verwendet, beziehungsweise bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.4.10 Proteinkonzentrationsbestimmung für EIA und quantitativen Western-Blot

Um einer Verfälschung des Ergebnisses des EIA durch eine je nach well der Zellkulturschale unterschiedliche geerntete Gesamt-Proteinmenge vorzubeugen und damit eine Konzentrationsbestimmung des Progesteronrezeptors, keine Mengenbestimmung, zu ermöglichen, musste die Proteinkonzentration der Zellernte bestimmt werden. Dies gelang mit Hilfe eines Bradford-Assay.

Diese Methode (Bradford, 1976) basiert auf der Farbveränderung einer sauren Coomassie Brilliant Blau G 250-Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration der umgebenden Lösung. Der Farbveränderung liegt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nach 595 nm zugrunde, die bei Proteinbindung erfolgt.

Bei bekannter Proteinkonzentration konnte durch geeignete Verdünnung die Konzentration der unterschiedlichen Proben auf denselben Wert eingestellt werden. Zur Standardisierung wurde eine Verdünnungsreihe von BSA in Lysis-Puffer erstellt, mit Endkonzentrationen von 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 und 5 mg/ml BSA. Zu jeweils 5 µl dieser Standardlösungen, beziehungsweise Probenlösung wurden 5 µl einer 1 N NaOH-Lösung und 100 µl Bradford-Stammlösung 1:4 in Wasser verdünnt gegeben und die Färbung auf einer 96-well-Schale in einem automatisierten Photometer (Tecan) gemessen, wobei jede Proteinkonzentration doppelt gemessen wurde.

Unter Angleichung der Proteinkonzentration wurde der EIA wie folgt nach Herstellerangaben in Doppelbestimmung durchgeführt: Pro well der Mikrotiterplatte des EIA-Kits wurden 5 µg Protein eingesetzt und die Proteinlösung auf 50 µl mit Lysis-Puffer aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurden wells mit 50 µl Lysis-Puffer, als Positivkontrolle 5 µg des vom Hersteller mitgelieferten Extraktes aus T47D-Zellen verdünnt in Lysis-Puffer verwendet. Die Mikrotiterplatte wurde mit einem Deckel abgedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschwenker bei 100 rpm inkubiert. Anschließend wurde jedes well dreimal mit je 200 µl Waschpuffer gefüllt und dieser jeweils durch Invertieren der Platte und Ausklopfen auf Filterpapier wieder entfernt. Nach Zugabe von jeweils 50 µl PGR-Antikörperlösung wurde die Mikrotiterplatte wie zuvor inkubiert und im Anschluss erneut dreifach gewaschen. Nach Zugabe von jeweils 50 µl des Meerrettichperoxidasegekoppelten Sekundärantikörpers wurde die Platte ein drittes Mal für eine Stunde schüttelinkubiert und im Anschluss viermal gewaschen. Zuletzt wurden zu jedem well 100 µl Entwicklungslösung gegeben und die Platte 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis die am stärksten gefärbten Lösungen etwa mittelblau erschienen, dann 100 µl Stop-Lösung zugegeben, was zu einem Farbumschlag von Blau zu Gelb führte. Die Färbung der Lösung wurde kolorimetrisch-quantitativ bei 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 655 nm in einem automatisierten Photometer (Tecan) ausgelesen. Dabei wurden Mehrfachbestimmungen an 4 verschiedenen Positionen jedes wells und zeitlich versetzte Mehrfachmessungen durchgeführt, deren Ergebnisse gemittelt wurden.

2.2.4.11 DNA-Extraktion aus Viren zur Sequenzierung

Die DNA der Viren sollte aufgrund der besonderen Wichtigkeit der vollständig erhaltenen Sequenz zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der enthaltenen SNPs unmittelbar vor ihrer Verwendung sequenziert werden. Dies machte eine DNA-Extraktion aus Viruslösung nötig, die mit dem modifizierten Herstellerprotokoll des eigentlich zur DNA-Extraktion aus Agarosegelen bestimmten QIAquick Gel Extraction-Kit (Qiagen) gelang.

Dazu wurden 200 µl hochtitrige Viruslösung in Zellkulturmedium mit 600 µl Puffer QG für 10 min bei 50 °C inkubiert, um die Viruskapside aufzuschließen. Nach Zugabe von 200 µl Isopropanol wurde die Lösung auf zwei zum Kit gehörige Säulen verteilt und für 1 min bei 10000 G zentrifugiert. Nach weiteren Zentrifugierschritten unter gleichen Bedingungen mit 500 µl Puffer QG, beziehungsweise 750 µl Puffer PE pro Säule und einem Trockenschritt folgte dann die Elution mit jeweils 50 µl Wasser bei 80 °C.

2.2.4.12 Zellernte für quantitative *real-time*-PCR

Die Ernte der T47D-Y-Zellen zur RNA-Extraktion geschah mit den Kits RNeasy und QIAshredder (beide Qiagen) nach Herstellerangaben. Das Prinzip der RNA-Extraktion mit einer Silica-Membransäule ist dabei ähnlich dem weiter oben beschriebenen Prinzip zur Plasmidextraktion aus Bakterien. Ein Guanidinium-Thiocyanat-haltiger Puffer zur Lyse der Zellen gewährleistet dabei die Inaktivierung der im Zelllysate enthaltenen RNAsen. Das Ernten der Zellen von einer zu etwa 70% konfluenten infizierten 6-well-Zellkulturschale erfolgte dabei folgendermaßen:

Das Zellkulturmedium der verwendeten Schale wurde zunächst vollständig abgesaugt und die Zellen anschließend durch Zugabe von 0,5 ml Trypsin-EDTA für 15 Minuten von der Schale gelöst. Mit dem noch auf dem well befindlichen Trypsin wurden die Zellen mit einer Pipette vollständig abgelöst und in jeweils 1 ml vorher bereitgestelltes serumhaltiges Medium überführt. Die Zelllösung wurde im Anschluss bei 400 G und 15 °C für 10 Minuten zentrifugiert, danach der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Zellpellet konnte mit je 350 µl RLT-Puffer aus dem RNeasy-Kit lysiert werden. Dieser zelllysathaltige Puffer wurde auf je eine Zentrifugensäule aus dem QIAshredder-Kit überführt. Nach Homogenisierung des Lysates durch Zentrifugation durch die Säulen bei 4 °C und 16100 G für 2 min wurde eine der Menge des Zentrifugates entsprechende Menge Ethanol 70% hinzugefügt und die Lösung durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die so entstandenen 700 µl Lösung wurden bei 8000 G und 4 °C für je 15 s durch eine Säule des RNeasy-Kits zentrifugiert und die RNA damit an die Säule gebunden.

Das Zentrifugat wurde verworfen und jede Säule bei gleichen Zentrifugierbedingungen zunächst mit 700 µl Puffer RW1, dann zweimal mit 500 µl Puffer RPE gewaschen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 16100 G für 1 min ohne Zugabe von Puffer zur Trocknung der Säule konnte die RNA mit je 35 µl RNase-freiem Wasser bei 8000 G innerhalb 1 min eluiert werden. Die RNA-Lösung wurde bis zur Verwendung zur reversen Transkription bei -80 °C aufbewahrt. Vor reverser Transkription wurde die RNA-Menge aus den unterschiedlichen parallelen Experimenten angeglichen, durch Photometrierung und anschließende Verdünnung auf die jeweils gleiche Konzentration.

2.3 Substanzen, Lösungen, Geräte und Hilfsmittel

2.3.1 Substanzen

- Acrylamid 30%: AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Agar: Bacto Agar, Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
- Agarose:
 - Electrophoresis Grade, invitrogen Ltd., Paisley, UK
 - Small DNA Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
- Ampicillin: SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Anti-Maus-Polyklonaler Antikörper, Meerrettichperoxidase-gekoppelt: SIGMA Corporation St. Louis, MO, USA
- Anti-Progesteronrezeptor-Antikörper (Maus): Calbiochem Corporation, San Diego, CA, U SA
- Ammoniumpersulfat: APS, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- Bovines Serumalbumin: BSA, SIGMA Corporation, St. Louis, MO, USA
- Bromphenolblau: Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- CaCl₂: Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Complete Protease Inhibitor: Roche Applied Science, Indianapolis, USA
- CsCl: Roth Chemie GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- DMEM: Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- DNA-Längenstandard: GeneRuler 100 bp Plus und 1 kb, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
- Doppelt destilliertes Wasser: Aqua ad iniectabilia: Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
- dNTP-Mix, PCR-Reagenzien: Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- ECL: ECL-Plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA

- Ethanol: J.T. Baker, 7400 AA Deventer, Niederlande
- Ethidiumbromid: Fluka Biochemica, Buchs, Schweiz
- E.Z.N.A. Cycle Pure-Kit: PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
- Fötales Kälberserum: FCS, Gibco, invitrogen Ltd., Paisley, UK
- Glukose: Roth Chemie GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Glycerin: Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Hefeextrakt: Bacto Yeast Extract, Becton, Dickinson and Company, Sparks USA
- Heses: SIGMA Corporation, St. Louis, MO, USA
- Kanamycin: Gibco, invitrogen Ltd., Paisley, UK
- KOAc: Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
- 6x loading dye (Ladepuffer): Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
- MEM: Gibco, invitrogen Ltd., Paisley, UK
- 2-Mercaptoethanol: SIGMA Corporation, St. Louis, MO, USA
- Methanol: J.T. Baker, 7400 AA Deventer, Netherlands
- $MgSO_4$: Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
- $MnCl_2$: Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
- MOPS: Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
- NaCl: J.T. Baker, 7400 AA Deventer, Netherlands
- NaF: Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
- NaH_2PO_4 : Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Na_3VO_4 : Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
- Natriumlaurylsulfat: SDS, SIGMA Corporation, St. Louis, MO, USA
- Nonidet P 40: SIGMA Corporation St. Louis, MO, USA
- NucleoSpin Plasmid-Kit: MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
- Oligonukleotide (Primer): MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
- QIAquick Gel Extraction-Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- QIAshredder-Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA
- Penicillin: Gibco, invitrogen Ltd., Paisley, UK
- Pepton: Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
- Phosphatgepufferte Salzlösung: PBS, Gibco, invitrogen Ltd., Paisley, UK
- Ponceau S: SIGMA Corporation, St. Louis, MO, USA
- Progesteron: SIGMA Corporation, St. Louis, MO, USA
- Promegeston, Tritium-markiert: Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences Boston, MA, USA
- RbCl: Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

- Restriktionsendonukleasen: New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
- RNeasy Mini-Kit: Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- Super Script III First Strand Synthesis System for RT-PCR: invitrogen Ltd., Paisley, UK
- Streptomycin: Gibco, invitrogen Ltd., Paisley, UK
- SYBR-Green Fluoreszenzfarbstoff: QuantiTect SYBR Green, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- Szintillationsflüssigkeit: Ultima Gold, Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences Boston, MA, USA
- Taq-Gold-Polymerase: Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
- Taq-Polymerase, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
- TEMED: Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- Transfektionsreagens: Fugene 6 Transfection Reagent, Roche Applied Science, Indianapolis, USA
- Tris Base: Trisma base, SIGMA Corporation St. Louis, MO, USA
- Tris-HCl: SIGMA Corporation, St. Louis, MO, USA
- Trypsin: Trypsin-EDTA 0,5%, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
- Trypton: Bacto Tryptone, Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
- TWEEN 20: SIGMA Corporation, St. Louis, MO, USA

2.3.2 Lösungen

Lösung	Ansatz	Endkonzentration
Agarnährboden	7,5 g Agar suspendiert in 500 ml LB-Medium, nachfolgend autoklaviert	1,5 mg/ml
Ampicillin	40 mg Ampicillin in 8 ml Wasser gelöst	50 µg/ml
Blotpuffer	10x -Stammlösung: 60,5 g Tris, 288 g Glycin in 2 l Wasser gelöst. Für 2 l 1x- Puffer: 200 ml Stammlösung, 1400 ml Wasser, 400 ml MetOH	25 mM Tris 192 mM Glycin
Ethidiumbromid	10 mg in 1 ml Wasser gelöst, zum Gebrauch 1:10 mit Wasser verdünnt	1 mg/ml
Kanamycin	120 mg Kanamycin in 4 ml Wasser gelöst	30 µg/ml
Laemmli	6x -Stammlösung: 2,4 g SDS, 20 mg Bromphenolblau, 2,4 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 12 g Glycerol, aufgefüllt auf 20 ml mit Wasser, 1,86 g DTT	
LB-Medium (low salt)	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl mit demineralisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert, pH 7,4	

Lysis-Puffer für EIA	20 mM HEPES pH 7,5, 400 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 10 mM NaF, 10 µM Na ₂ MoO ₄ , 1 mM Na ₃ VO ₄ , 20% Glycerol, 0,5% NP 40, 1 Tab Complete Protease-Inhibitor auf 50 ml	
Loading dye 6x	18,9 g Glycerin, 25 mg Bromphenolblau und 30 mg Xylencyanol mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt	
ΨB-Medium	5 g Hefeextrakt, 20 g Pepton 140, 5 g MgSO ₄ , pH mit KOH auf 7,6 eingestellt, auf 1 l mit Wasser aufgefüllt, autoklaviert.	
RIPA	Auf 500 ml: 5 g Nonidet P40, 5 g NaDOC, 0,5 g SDS, 870 mg NaH ₂ PO ₄ , 4,38 g NaCl, 1050 g NaF; pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt, 1 Tab. Complete auf 50 ml	1% NP40, 1% NaDOC, 0,1% SDS, 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, 50 mM NaF
SOC Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 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 1 M MgCl ₂ Lösung und 20 ml sterile 1 M Glukoselösung dazugeben	
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	
TBS/T	Für 10x -Stammlösung: 242,2 g Tris, 175,32 g NaCl, mit 37% HCl auf pH 7,5 eingetellt; für TBST Zugabe von 0,2% v/v Tween	1 M Tris, 1,5 M NaCl
TfBI-Puffer	5 g RbCl, 12,3 ml KOAc 1 M, 4,1 ml CaCl ₂ 1 M, 20,5 ml MnCl ₂ 1 M, 61,5 g Glycerin. Mit Wasser auf 410 ml aufgefüllt, pH-Wert auf 5,8 mit Essigsäure eingestellt.	30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 15% Glycerin
TfBII-Puffer	1,5 ml MOPS 1 M pH 6,5, 11,25 ml CaCl ₂ 1 M, 1,5 ml RbCl 1 M, 22,5 g Glycerin. Mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt, pH mit 1 N KOH auf 5,8 eingestellt.	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl, 15% Glycerin
Western-Blot-Sammelgel	5,6 ml Wasser, 1,7 ml Acrylamid 30%, 2,5 ml Tris pH 8,8, 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10% APS, 0,01 ml TEMED; für 4 kleine Gele	
Western-Blot-Trenngel 10%	4,8 ml Wasser, 2,5 ml Acrylamid 40%, 2,5 ml Tris pH 8,8, 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10% APS, 0,004 ml TEMED; für 2 kleine Gele	
Western-Blot-Trenngel 12%	4,3 ml Wasser, 3,0 ml Acrylamid 40%, 2,5 ml Tris pH 8,8, 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10% APS, 0,004 ml TEMED; für 2 kleine Gele	

2.3.3 Hilfsmittel und Geräte

- Arzneiwaage: OHAUS Precision Advanced, OHAUS Corp., Florham, NJ, USA
- CHEMI Genius², Bio Imaging System, Syngene, Cambridge, United Kingdom
- EIA-Kit: NR Sandwich PR ELISA, active motif, Carlsbad, CA, USA
- Elektrophorese-Kammern und Zubehör
 - Hölzel E 452, H. Hölzel GmbH, Wörth, Deutschland
 - Sub-Cell GT, Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA
 - 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
- Feinstwaage: Sartorius Genius, Sartorius Machatronik AG, Göttingen, Deutschland
- Fluoreszenzmikroskop: Zeiss Axiovert 25 / mbq 52 ac, Zeiss, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland
- Heizblöcke:
 - Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - ThermoStat Plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Inkubatoren:
 - Heraeus B5050E, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland
 - Heraeus HeraCell 240, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland
 - Julabo WS 60, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
- Küvetten: Präzisionsküvetten aus Quarzglas, Hellma GmbH, Müllheim, Deutschland
- Mikroliterspritze: Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
- Multiply-PCR-Ketten, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Orbitalschwenker: Heidolph Polymax 2040, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland
- PCR-Cycler:
 - ABI Prism 7900 H Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
 - Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
 - Hybaid PCR-Sprint, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Photometer: Smart Spec 3000, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Pipetten: Eppendorf, Hamburg, Deutschland

- Pipettenspitzen: Biosphere Filter Tips, 10 µl, 100 µl und 1000 µl, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Pipettierhilfe: Brand Accu-Jet, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
- 1,5 ml-Reaktionsgefäße: Sarstedt Safe-Seal, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Reinstwassersystem: Milli-Q Plus, Ultra Pure Water System, Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
- Rollinkubator: Fröbel Labortechnik CAT RM 5, Lindau, Deutschland
- Sterilwerkbank: Sterilwerkbank Klasse 2, Hera Safe, Typ HS 12, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland
- 1,5 ml-Schraubgefäße: Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
- Schüttel-Inkubator: Scientific C25 Incubator Shaker, New Brunswick, Edison New York, USA
- Szintillationsgefäße: Poly-Q-Vial, Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences Boston, MA, USA
- Szintillationszähler Wallac 1409: Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences Boston, MA, USA
- Ultrazentrifugengefäße: Beckman Centrifuge Tubes Polyallomer, Beckman Coulter Inc. Palo Alto, CA, USA
- UV-Geldurchleuchtungstisch: Bachofer 312 nm, Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland
- Vollpipetten: SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Vortex-Mischer: Boskamp Mixomat, Boskamp GmbH, Hersel, Deutschland
- Wasserbad-Schüttelinkubator: Gesellschaft für Labortechnik mbH, Hannover-Vinhorst, Deutschland
- Western-Blot-Kammern und Zubehör: Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- Western-Blot-Membran: Hybond-ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
- Western-Blot-Proteinstandard: Bio-Rad Precision Plus Protein Western C, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- Western-Blot-Stromquelle: EC 250-90, E-C Apparatus Corporation, Holbrook, NY, USA
- Zellkultur-Medium: Dulbecco's MEM 1x, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Zellkulturschalen 10 cm, 15 cm, Zellkulturflaschen 75 cm² : SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- Zellkulturschalen 6-well, 12-well, 96-well: Greiner Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
- Zellschaber: Cell Scraper, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

- Zellzähler: CASY, innovatis AG, Reutlingen, Deutschland
- Zentrifugen:
 - Beckman Coulter J-6B, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
 - Beckman Coulter L-90 K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
 - Eppendorf Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - Eppendorf Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - Eppendorf Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - Hettich Universal 30 RF, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
- 15 ml und 50 ml-Zentrifugenröhrchen, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 Experimentelle Strategie

Um ein experimentelles System zur funktionellen Charakterisierung von Varianten des Progesteronrezeptors zu schaffen, musste zunächst die cDNA isoliert und in ein geeignetes Überexpressionssystem kloniert werden. Zu Beginn der Arbeit lag die cDNA in bereits klonierter Form im Expressionsvektor pTracer-CMV vor. Die Strategie bis zu diesem Punkt ist Kapitel 2.1.1 Methoden zu entnehmen.

Nach der Wahl des Adenovirus Typ 5 als endgültiges Expressionssystem musste die PGR-cDNA zunächst in den Transfektorvektor pAdTrack-CMV umklont werden und im Folgenden in Rekombinase A-positiven Bakterien durch homologe Rekombination in die adenovirale DNA, welche als Vektor pAdEasy-CMV vorlag, integriert werden. Die adenovirale DNA mit der PGR-Expressionskassette wurde isoliert und zur Transfektion in HEK-Zellen verwendet, in denen die Virusamplifikation stattfand. Das Virus wurde aufgereinigt und zur Infektion von T47D-Y-Zellen verwendet. Diese Zellen verfügen über keine endogene PGR-Expression, so dass sie verwendet werden können, um die verschiedenen Varianten des PGR-Genes gezielt und in physiologischer Konzentration zu exprimieren.

Die Konzentration des Progesteronrezeptors wurde zunächst parallel per EIA und Western-Blot bestimmt und nachfolgend standardisiert, um schließlich 16 Zellkulturschalen mit einer jeweils etwa gleichen Zellzahl infizieren zu können, davon je zwei zur Expression der selben Variante des PGR-Genes. In diesen 16 Zellpopulationen wurde nun die gleiche Menge Progesteronrezeptor exprimiert und jeweils eine von zwei die gleiche Variante des PGR-Genes exprimierenden Zellpopulationen für eine definierte Zeitspanne mit Progesteron inkubiert. Dies ermöglicht einen Vergleich der Transaktivierungs-, beziehungsweise Transrepressionsaktivität der verschiedenen Varianten des Rezeptors über die Quantifizierung der mRNA stark progesteronregulierter Gene. Als Vergleich wurden Zellen mitgeführt, die mit einem ausschließlich GFP-exprimierenden Ad5 (AV44) infiziert wurden, bei dem die zweite Expressionskassette also leer verblieb.

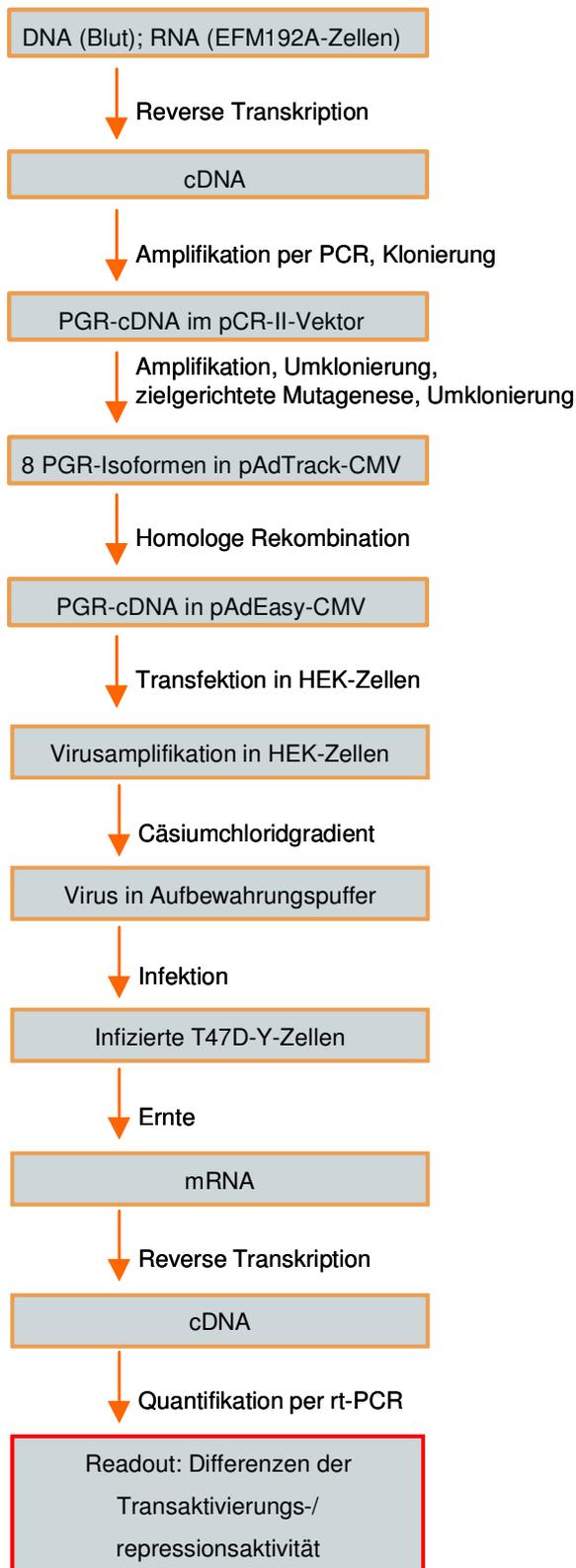


Abbildung 7: Ablaufschema der wichtigsten Arbeitsschritte.

3.2 Umklonierung

Zu Beginn der Arbeit lagen die acht verschiedenen Varianten der PGR-cDNA bereits in klonierter Form im Vektor pAdTrack-CMV vor. Wie in Kapitel 2.1 ausführlich beschrieben, wurde zunächst eine cDNA einzelner Abschnitte des PGR-Gens erstellt und diese einzelnen Abschnitte später durch Restriktionsverdau und anschließende Ligation zusammengesetzt. Da bei dieser Strategie zum Zusammenfügen des Gens und zu seiner Introdution in geeignete Vektoren Primer verwendet worden waren, die Restriktionschnittstellen enthielten, lag das PGR-Gen in einer geringfügig veränderten Form vor. Als Referenzsequenz diente, wie eingangs erwähnt, die 1993 von Misrahi et al. publizierte (NM_000926.2). In diese Sequenz waren im Rahmen der vorhergehenden Klonierung folgende stumme Mutationen eingefügt worden: c.G725A (zum Einfügen einer XhoI-Schnittstelle), c.C1573A, c.C1576T (zum Einfügen einer EcoRV-Schnittstelle) und c.A2148T (zum Einfügen einer SpeI-Schnittstelle). Das Konstrukt verfügte zudem *upstream* vom Startcodon über einen intronischen Überhang von 95 bp Länge mit einer KpnI-Schnittstelle an seinem Ende und einen Überhang von 38 bp *downstream* des Stopcodons, mit einer NotI-Schnittstelle an seinem Ende.

Um die Effekte der SNPs einzeln studieren zu können, ihren Einfluss auf die verschiedenen Isoformen und ihr Zusammenspiel, wurden beide Isoformen A und B jeweils mit beiden und nur einem von beiden SNPs durch zielgerichtete Mutagenese erstellt, so dass am Ende acht Varianten vorlagen (A_{wt} , A_1 , A_2 , A_{12} ; B_{wt} , B_1 , B_2 , B_{12}).

Erster Schritt der vorliegenden Arbeit musste es also sein, die PGR-Inserts aus dem Vektor pTracer-CMV in pAdTrack-CMV umzuklonieren, in jenen Transfervektor, der der späteren Rekombination in das Ad5-Genom diente.

Hierzu wurde die pTracer-CMV-DNA zunächst photometriert und für den folgenden Restriktionsverdau mit KpnI die Menge an pTracer-CMV-DNA auf 2,34 µg eingestellt, eine Menge, die sich empirisch als günstig erwiesen hatte (Tabelle 3). Da ein paralleler Verdau nicht gelang, wurde er sequentiell ausgeführt. Nach einer Reaktion über Nacht wurde die DNA jeweils gefällt, auf diese Weise gereinigt und mit einem Restriktionsansatz mit NotI resuspendiert. Nach erneutem Verdau über Nacht (Tabelle 5) konnte dieser Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt werden und das oben beschriebene PGR-Insert unter Zuhilfenahme des QIAquick Gel Extraction-Kit isoliert werden.

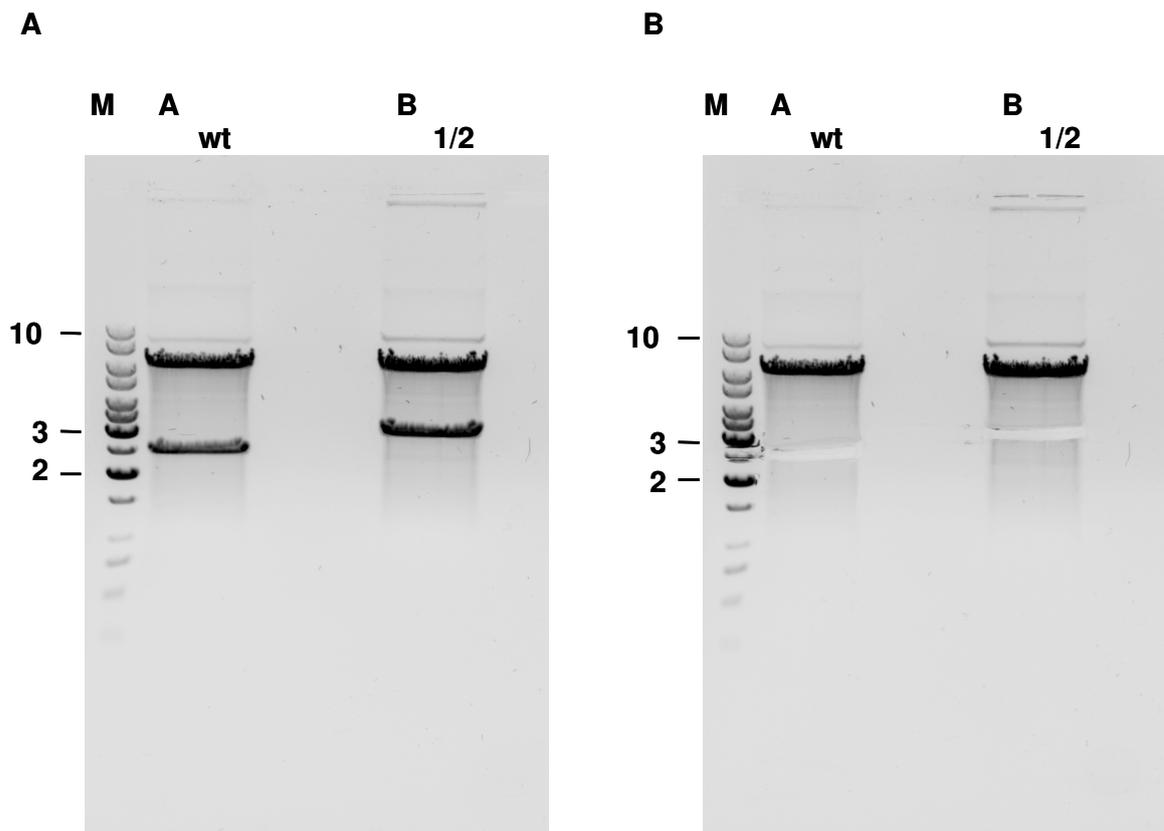


Abbildung 8: Gelextraktion des PGR-Inserts nach Restriktionsverdau der pTracer-Konstrukte am Beispiel von A_{wt} und $B_{1/2}$. A: Agarosegel vor Ausschneiden der Insert-Bande, B: Nach Ausschneiden der Insert-Bande. M: 1 kb-Leiter. Laufbedingungen: 0,6% Agarose, 60 V, 100 min.

Zeitgleich wurde der Vektor pAdTrack-CMV mit denselben Restriktionsendonukleasen verdaut (Tabelle 4 und Tabelle 5), um auf diese Weise ein kleines Oligonukleotid aus der MCS des Vektors zu entfernen und damit zugleich geeignete Enden des nunmehr linearisierten Plasmides zu generieren, die eine spätere Ligation des PGR-Inserts erlauben sollten. Die derart enzymatisch verdaute pAdTrack-CMV-Lösung wurde anschließend mit dem E.Z.N.A Cycle Pure-Kit gereinigt, um das Oligonukleotid zu entfernen und eine Religation zu verhindern. Durch den Verdau und die Aufreinigung entfällt ein 7 bp langes Oligonukleotid und so genannte „klebrige Enden“ der DNA entstehen, die jeweils einen spezifischen und in diesem Fall 3 Basen langen Überhang haben und es erlauben, das Insert nach seinem Verdau in der richtigen Orientierung einzuklonieren.

Die Ligation zwischen pAdTrack-CMV und dem PGR-Insert geschah über Nacht und bei 14 °C im Thermoblock (Tabelle 10). Das Ligationsprodukt wurde im nächsten Schritt zur Amplifikation in chemisch kompetente E.coli-Bakterien TOP 10 F' transformiert.

3.3 Amplifikation des Ligationsproduktes

Nach der ursprünglichen Klonierung des PGR-Gens und der Bereitstellung der acht verschiedenen Varianten im Vektor pTracer-CMV waren die PGR-Regionen aller acht Konstrukte sequenziert worden. Es konnte also mit ausreichender Sicherheit von der regelrechten Sequenz aller Konstrukte, welche als Ausgangsmaterial vorlagen, ausgegangen werden. Da PCR-Schritte durch die nicht vollständige Sequenztreue der Taq-Polymerase leicht zur ungewollten Introdution von Punktmutationen führen können, deren Inzidenz mit zunehmender Länge des PCR-Produktes zusätzlich ansteigt, sollte in der vorliegenden Arbeit auf PCR-Schritte verzichtet werden. Bei der funktionellen Analyse der SNPs reicht der Natur der Sache gemäß ein generell funktionsfähiges Protein an sich nicht aus; die vollständige Gewährleistung der Richtigkeit der übrigen Sequenz ist essentiell um eine Verfälschung der Ergebnisse durch zufällige Punktmutationen zu vermeiden.

So sollte die Amplifikation der Ligationsprodukte, wie auch spätere DNA-Amplifikationen in E.coli-Bakterien stattfinden, da sich diese durch eine mit 10^{-10} bis 10^{-9} Fehler pro repliziertem Basenpaar außerordentlich niedrige Fehlerrate auszeichnen, was in großen Teilen ihren zuverlässigen Korrektur- („*proof reading*“) Mechanismen geschuldet ist (Mo et al.1996, Fujii et al. 1999). Damit ist die Replikationstreue in E.coli-Bakterien wesentlich höher als die selbst spezieller und kostenintensiver Taq-Polymerase-Varianten, die bei wenigstens 4×10^{-7} und damit 400 mal höher liegt (z. B. Herstellerinformation Bio-Rad).

Der Ligationsansatz wurde also nach Inkubation über Nacht in E.coli-Bakterien TOP 10 F['] transformiert. Da die im Ligationsansatz enthaltenen Enzyme und Puffer die Transfektion nicht nennenswert zu stören vermögen, wurde ein Teil des Ligationsansatzes direkt zur Transformation verwendet (Kap. 2.2.2.7). Die transformierten Bakterien wurden auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausplattiert, was eine Selektion der Transformanden ermöglicht, da pAdTrack-CMV über ein Kanamycin-Resistenzgen verfügt. Die über Nacht inkubierten Agarplatten wurden im Folgenden verwendet, um eine kanamycinhaltige LB-Flüssigkultur mit einer Kolonie anzupflanzen, die erneut über Nacht inkubiert wurde (Kap. 2.2.2.11).

3.4 Überprüfung der Ligation

Da mit den acht verschiedenen Varianten des PGR-Gens gleichzeitig eine größere Zahl an Reaktionen parallel durchgeführt werden musste, bot es sich an, das Ligationsprodukt aus PGR-Insert und pAdTrack-CMV nicht durch Kontrollverdauere jeweils mehrerer Plasmide aus mehreren Flüssigkulturen zu überprüfen.

Dieses Prozedere hätte jeweils die Plasmidextraktion aus mehreren Übernacht-Flüssigkulturen, einen Restriktionsansatz und eine Gelelektrophorese erfordert. Da eine hohe Zahl von pAdTrack-CMV-Vektoren offenbar nicht regelrecht restriktionsverdaut waren, was wiederum zu einer hohen Zahl religierter Vektoren, also solcher, die zirkulär und transformiert waren, nicht aber das PGR-Insert enthielten führte, wurde stattdessen die Ligation durch Colony-PCR überprüft. Auf diese Weise war ein höherer Durchsatz gleichzeitiger Überprüfungen möglich. Dabei konnte (Kap. 2.2.2.10) jedoch keine klassische Colony-PCR durchgeführt werden, da sich die Agarplatte der ersten Übernacht-Inkubation als zu stark mit Ligationsansatz kontaminiert erwies, was zu einer vergrößerten Zahl falsch positiver PCR-Reaktionen führte, zumal beide verwendeten Primer innerhalb des Inserts lagen. Es wurde daher die Colony-PCR aus der Übernacht-Flüssigkultur des folgenden Tages ausgeführt.

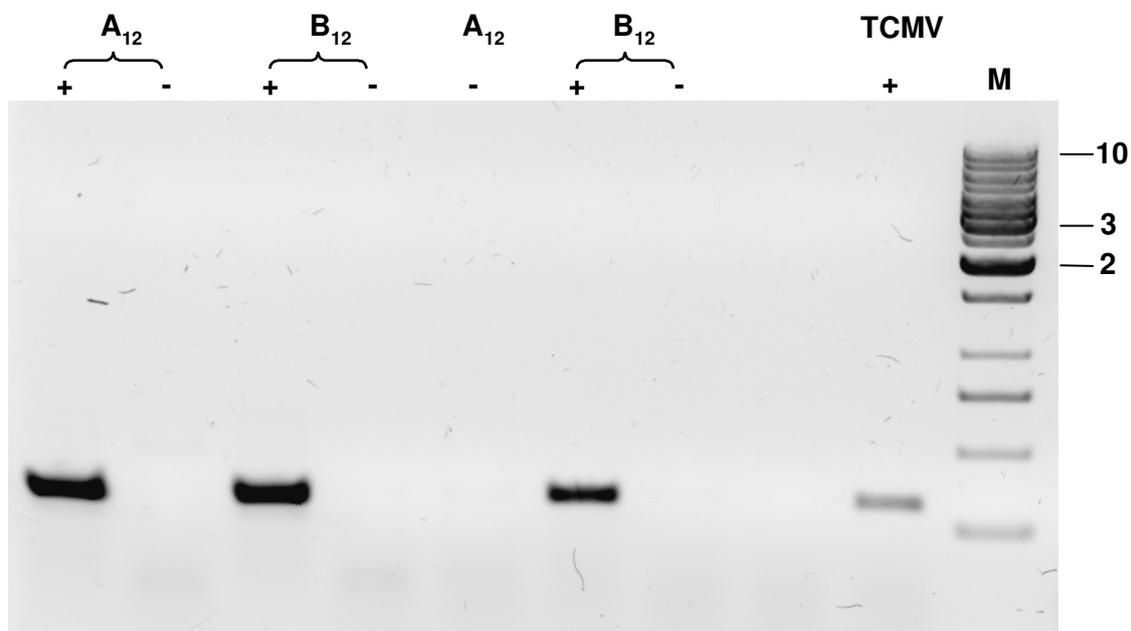


Abbildung 9: Beispiel einer Colony-PCR. Positive Klone mit + bezeichnet, solche bei denen von einer Religation von pAdTrack-CMV auszugehen ist mit -. M: 1 kb-Leiter, TCMV: Auf das Gel aufgetragener Vektor pAdTrack-CMV als Größenstandard. Laufbedingungen: 0,8% Agarose, 60 V, 80 min.

Aus den in der Colony-PCR positiven Übernacht-Flüssigkulturen wurde eine Plasmidextraktion mit Hilfe des Nucleospin Plasmid-Kits ausgeführt (Kap. 2.2.2.11) und die Plasmid-DNA zur definitiven Kontrolle der richtigen Ligation kontrollverdaut (Tabelle 6).

Dabei wurde statt KpnI Acc65I verwendet, die beiden Enzyme schneiden an derselben Erkennungssequenz, Acc65I eignet sich jedoch aufgrund der von den drei Enzymen benötigten Pufferkonditionen eher zum parallelen Restriktionsverdau mit NotI als KpnI.

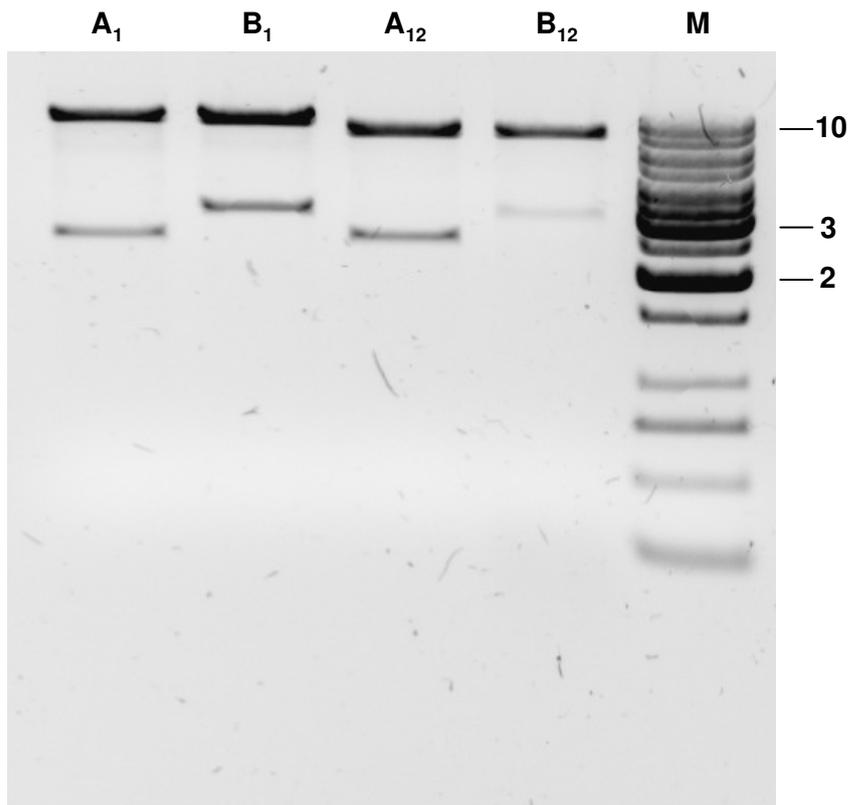


Abbildung 10: Beispiel für den Kontrollverdau von pAdTrack-CMV-Konstrukten nach Einklonierung des PGR-Inserts. M: 1 kb-Leiter. Laufbedingungen: 0,8% Agarose, 80 V, 45 min.

3.5 Integration der PGR-Expressionskassette in das adenovirale Genom

Die Integration der aus jeweils einer Variante der PGR-cDNA sowie einem davorgeswitchten ubiquitär aktiven CMV-Promotor und einem hinter die cDNA geschalteten Polyadenylierungssignal bestehenden Expressionskassette sollte durch homologe Rekombination nach He et al. (1998) geschehen (Kap. 2.2.3).

Für die Rekombination wurden jeweils 0,7 µg der aus einer Übernacht-Flüssigkultur aus einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen aus dem vorherigen Arbeitsschritt stammenden pAdTrack-CMV-PGR-DNA verwendet. Diese Plasmid-DNA wurde mit PmeI linearisiert (Tabelle 7), durch Fällen mit Ethanol gereinigt und durch Elektroporation in Rekombinase A-positive E.coli-Bakterien des Stammes BJ 5183 transformiert (Kap. 2.2.2.8).

Die Selektion der Transformanden fand dabei weiter auf kanamycinhaltigen Nährböden beziehungsweise durch kanamycinhaltige Flüssigkultur statt. Dies ist möglich, da das Kanamycin-Resistenzgen des Vektors pAdTrack-CMV bei der homologen Rekombination mit in pAdEasy-CMV, also die adenovirale DNA integriert wird. pAdEasy-CMV verfügt dagegen lediglich über ein Ampicillin-Resistenzgen.

Diese Selektion der Transformanten sagt jedoch nichts über die regelrechte Rekombination aus, schließlich ist ein Überleben der transformierten Bakterien auch möglich, ohne dass eine Rekombination stattfindet, allein durch die Präsenz von pAdTrack-CMV und seiner Kanamycinresistenz. Und auch die unerwünschte Rekombination über den beiden Vektoren gemeinsamen *origin of replication* anstelle der *left arm homology* ist damit nicht ausgeschlossen. Als zusätzliche Überprüfung ist daher der beschriebene Kontrollverdau, beziehungsweise die nun etablierte Rekombinations-Colony-PCR vonnöten.

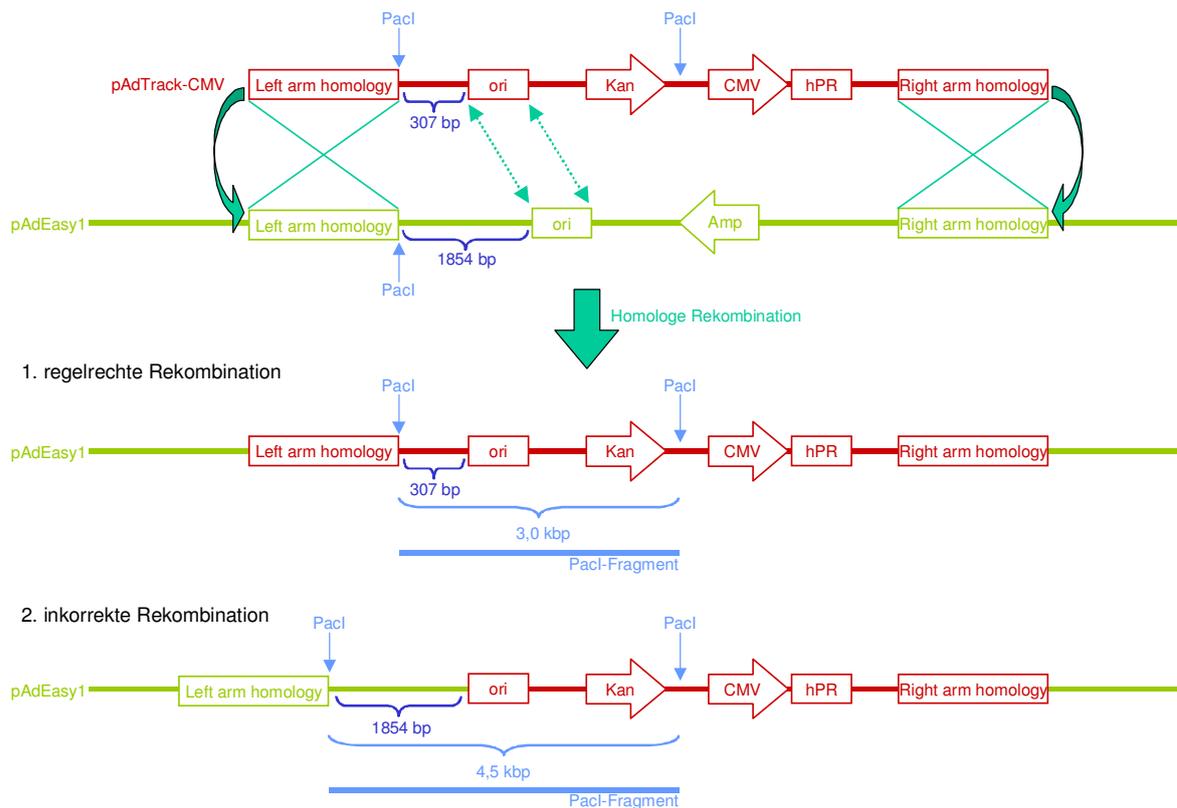


Abbildung 11: Prinzip des Kontrollverdaues mit PaclI zur Überprüfung der regelrechten Rekombination. Nach Integration des linearisierten Vektors pAdTrack-CMV durch homologe Rekombination über beide Regionen der Homologie (*left arm* beziehungsweise *right arm homology*) ergibt ein Restriktionsverdau mit PaclI ein etwa 3,0 kbp langes Fragment (1.). Bei Rekombination über den *origin of replication* dagegen ergibt sich ein etwa 4,5 kbp langes Fragment (2.). Dies ist durch die längere nicht kodierende Sequenz zwischen Ori und *left arm homology* in pAdEasy1 zu erklären, welche im Regelfall durch die kürzere von pAdTrack-CMV ersetzt wird, bei Rekombination über den Ori jedoch als solche erhalten bleibt. ori: *origin of replication*, CMV: CMV-Promotor, Kan: Kanamycin-Resistenzgen, Amp: Ampicillin-Resistenzgen, PGR: PGR-cDNA.

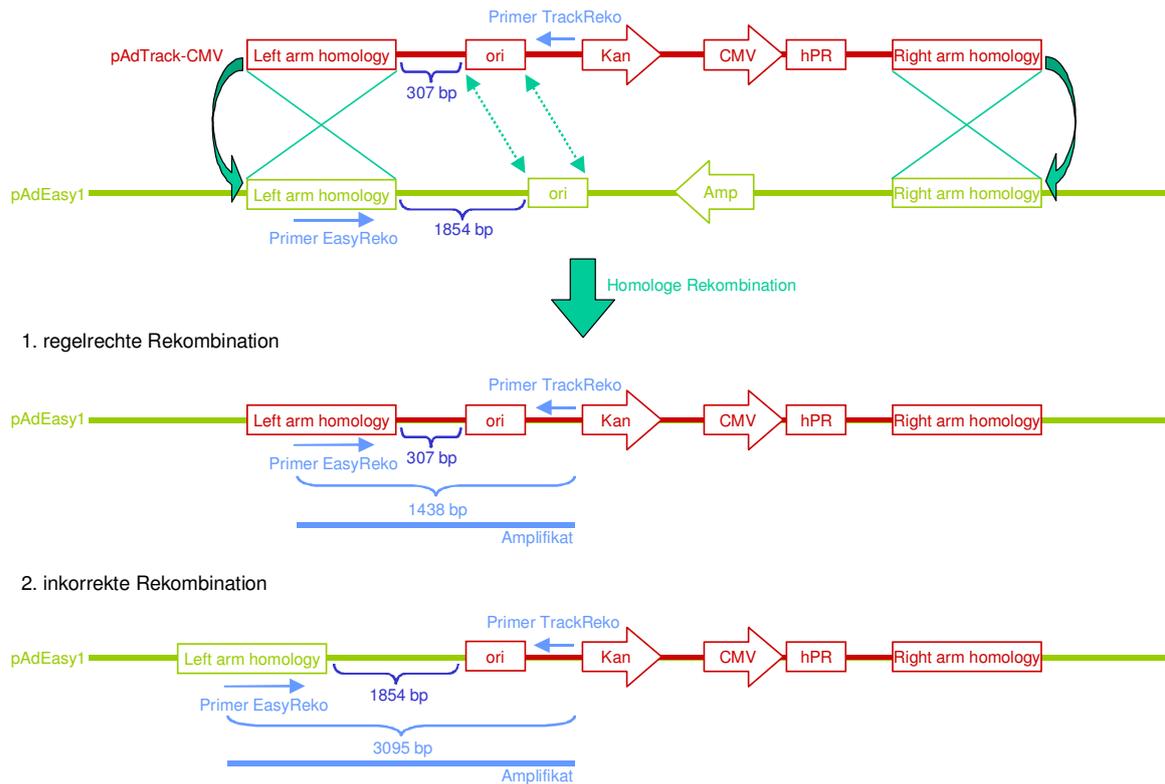


Abbildung 12: Prinzip der Rekombinations-Colony-PCR zur Überprüfung der regelrechten Rekombination. Nach Integration des linearisierten Vektors pAdTrack-CMV durch homologe Rekombination über beide Regionen der Homologie (*left arm* beziehungsweise *right arm homology*) ergibt eine PCR mit den bezeichneten Primern EasyReko und TrackReko ein Amplifikat von 1438 bp Länge (1.). Bei Rekombination über den *origin of replication* dagegen ergibt sich ein 3095 bp langes Amplifikat (2.). Dies ist durch die längere nicht kodierende Sequenz zwischen *Ori* und *left arm homology* in pAdEasy1 zu erklären, welche im Regelfall durch die kürzere von pAdTrack-CMV ersetzt wird, bei Rekombination über den *Ori* jedoch als solche erhalten bleibt. *ori*: *origin of replication*, CMV: CMV-Promotor, Kan: Kanamycin-Resistenzgen, Amp: Ampicillin-Resistenzgen, PGR: PGR-Gen.

Wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben, wurde die Rekombinations-Colony-PCR zu dem Zweck der Beschleunigung des Verfahrens entwickelt, gestattet sie doch das einfache Überprüfen einer Vielzahl von Kolonien auf regelrechte Rekombination zur selben Zeit, ohne eine zusätzliche Übernacht-Flüssigkultur und ohne Plasmidextraktion und Kontrollverdau. Selbst bei Berücksichtigung des von He et al. und ihren Nachfolgern beschriebenen Verfahrens, nur die kleinsten Kolonien weiterzuverwenden, da sich diese empirisch als am ehesten solche mit regelrechter Rekombination erwiesen hatten, war die Ausbeute gering, so dass sich die Entwicklung einer PCR-basierten Methode bei der nötigen Konstruktion von acht Adenoviren zur gleichen Zeit anbot.

Bereits der erste Versuch zeigte die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Systems und die Eignung der Primer.

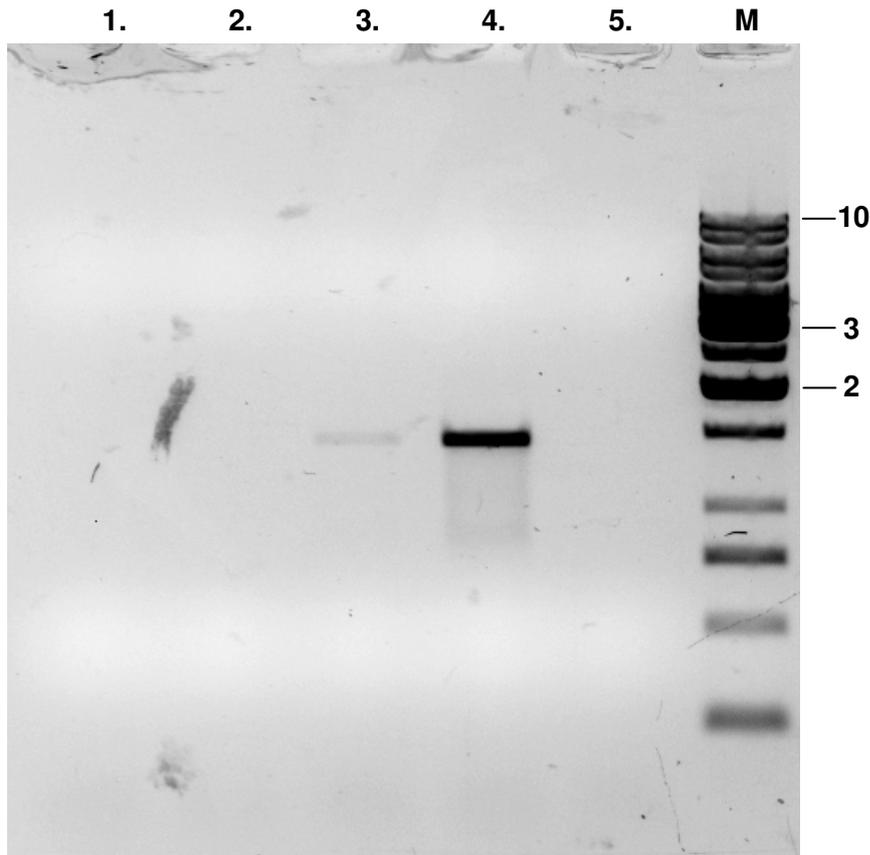


Abbildung 13: Erster Versuch der Etablierung der Rekombinations-Colony-PCR. 1.: Plasmid-DNA aus einer Co-Transfektion von pAdTrack-CMV und pAdEasy1, bei der ein Kontrollschnitt mit Pacl ergeben hatte, dass keine Rekombination stattgefunden hatte. 2.: Plasmid-DNA aus einer Co-Transfektion von pAdTrack-CMV und pAdEasy1, bei der ein Kontrollschnitt mit Pacl ergeben hatte, dass Rekombination über den *origin* stattgefunden hatte. 3.: Plasmid-DNA aus einer Co-Transfektion von pAdTrack-CMV und pAdEasy1, bei der ein Kontrollschnitt mit Pacl ergeben hatte, dass Rekombination regelrecht stattgefunden hatte. 4.: Plasmid-DNA aus einer Co-Transfektion von pAdTrack-CMV und pAdEasy1, bei der ein Kontrollschnitt mit Pacl ergeben hatte, dass Rekombination regelrecht stattgefunden hatte und die bereits zur Virusproduktion verwendet worden war (pAdEasy-shRNA-I1-DNA von Dr. Jasmin Singh, Institut für Experimentelle Pharmakologie, Hamburg). 5.: Leerkontrolle. M: 1 kb-Leiter. Laufbedingungen: 0,8% Agarose, 80 V, 1 h.

Weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen führte schließlich zu reproduzierbaren Ergebnissen und auch bei unerwünschter Rekombination über den *origin* zu einem Produkt der erwarteten Größe.

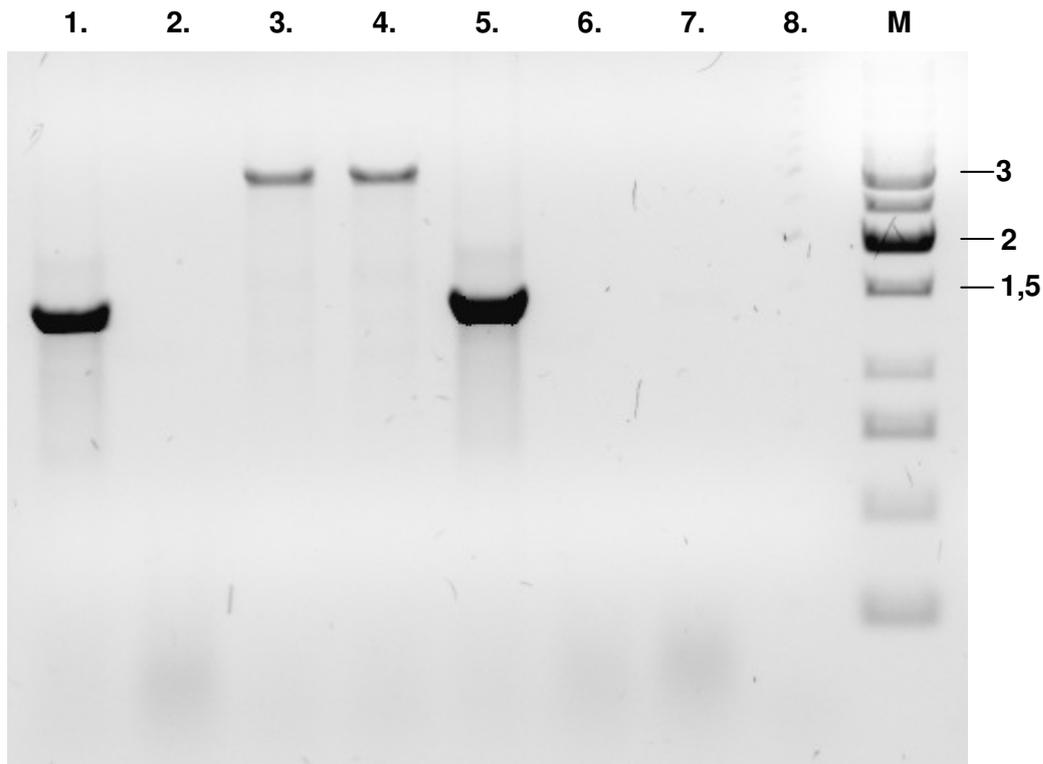


Abbildung 14: Beispiel einer späteren Rekombinations-Colony-PCR. 1., 5.: Plasmid-DNA, die sich durch einen folgenden Kontrollverdau mit Pacl als regelrecht rekombiniert bestätigte, erwartete Amplifikatlänge 1438 bp. 2., 6., 7.: Plasmid-DNA, bei der keine Rekombination stattgefunden hatte. 3., 4.: Erwartete Fragmentgröße bei unerwünschter Rekombination über den *origin* (3095 bp). M: 1 kb-Leiter. Laufbedingungen: 0,8% Agarose, 75 V, 1 h.

Nach der Bestätigung der regelrechten Rekombination durch Rekombinations-Colony-PCR wurden die betreffenden Klone gepickt, Übernacht-Flüssigkulturen angelegt und aus diesen mit Hilfe des Nucleospin Plasmid-Kits die Plasmid-DNA extrahiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Ethanol-Fällung gereinigt, photometriert, resuspendiert und anschließend 3 µg DNA mit Pacl verdaut und zur endgültigen Bestätigung der Rekombination von diesen 0,375 µg elektrophoretisch aufgetrennt.

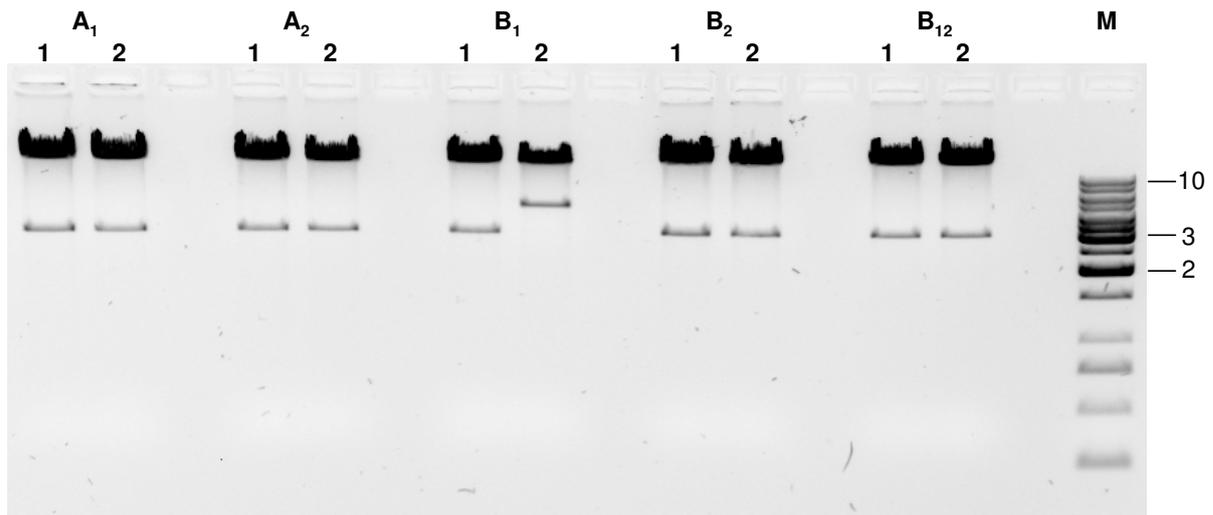


Abbildung 15: Beispiel des endgültigen PaclI-Kontrollverdaues der rekombinanten pAdEasy1-PGR-Konstrukte. Jeweils zwei unterschiedliche Klone/Präparationen dargestellt. Sämtliche Rekombinationen zeigten sich erwartungsgemäß mit einer zweiten 3 kb-Bande (Ausnahme zweiter Klon der Isoform B₁ mit 4,5 kb-Bande). M: 1 kb-Leiter. Laufbedingungen: 0,8% Agarose, 85 V, 65 min.

In Abbildung 15 fällt dabei die Plasmid-DNA eines Klones auf, deren Kontrollverdau mit PaclI statt des erwarteten 3 kb-Fragmentes das 4,5 kb-Fragment der unerwünschten Rekombination über den *origin* liefert (B₁ #2). Dies steht im Kontrast zur dazugehörigen Rekombinations-Colony-PCR, die regelrechte Rekombination zu zeigen schien. Allerdings ist es kein unbekanntes Phänomen, dass in einem Klon beide Formen der Rekombination stattfinden, wie viele Kontrollverdaureaktionen und auch Rekombinations-Colony-PCR-Reaktionen zeigten. Es ist ebenfalls bekannt, dass im Verlaufe der weiteren Prozessierung und Kultivierung dieses Klons sich ein Tochterklon mit einer Form der rekombinanten Plasmid-DNA gegen die andere durchsetzt. So ist auch dieses Ergebnis am ehesten zu werten. Zwar setzt sich zumeist die quantitativ stärker vertretene Kopie des Plasmids durch, in einigen Fällen aber, wie in diesem auch, eine Kopie, die nicht einmal auf initialen Kontrollverdau-Gelen beziehungsweise hier Rekombinations-Colony-PCR-Gelen eindeutig zu identifizieren war.

Die jeweils restliche mit PaclI verdaute Plasmid-DNA (2,625 µg) wurde erneut durch Ethanol-Fällung gereinigt, in 52,5 µl Wasser resuspendiert (Endkonzentration 0,05 µg/µl) und zur folgenden Transfektion weiterverwendet.

3.6 Virusanzucht

Das wie oben beschrieben entstandene pAdEasy1-PGR-Konstrukt, also die in Plasmidform vorliegende DNA des an sich replikationsdefizienten Adenovirus Serotyp 5 mit der darin integrierten PGR-cDNA-Expressionskassette und einer dem Vektor pAdTrack-CMV entstammenden GFP-Expressionskassette wurde zur Transfektion in HEK-Zellen verwendet. Wie in Kap. 2.1.4.1 beschrieben, sind HEK-Zellen durch ihr stabil transfiziertes E1A und E1B-Gen in der Lage, die Replikationsdefizienz des Ad5 zu kompensieren. Sie können daher zur Virusanzucht verwendet werden. Eine 1 cm-Zellkulturschale mit HEK-Zellen (50% Konfluenz) pro Virus-DNA-Isoform wurde daher mit Hilfe des Fugene 6-Transfektionsreagens mit 0,5 µg Plasmid-DNA in 10 µl Wasser transfiziert (2.2.4.5). Spätestens nach drei Tagen war durch die Expression des auf der Plasmid-DNA kodierten GFP die erfolgreiche Transfektion der HEK-Zellen zu beobachten.

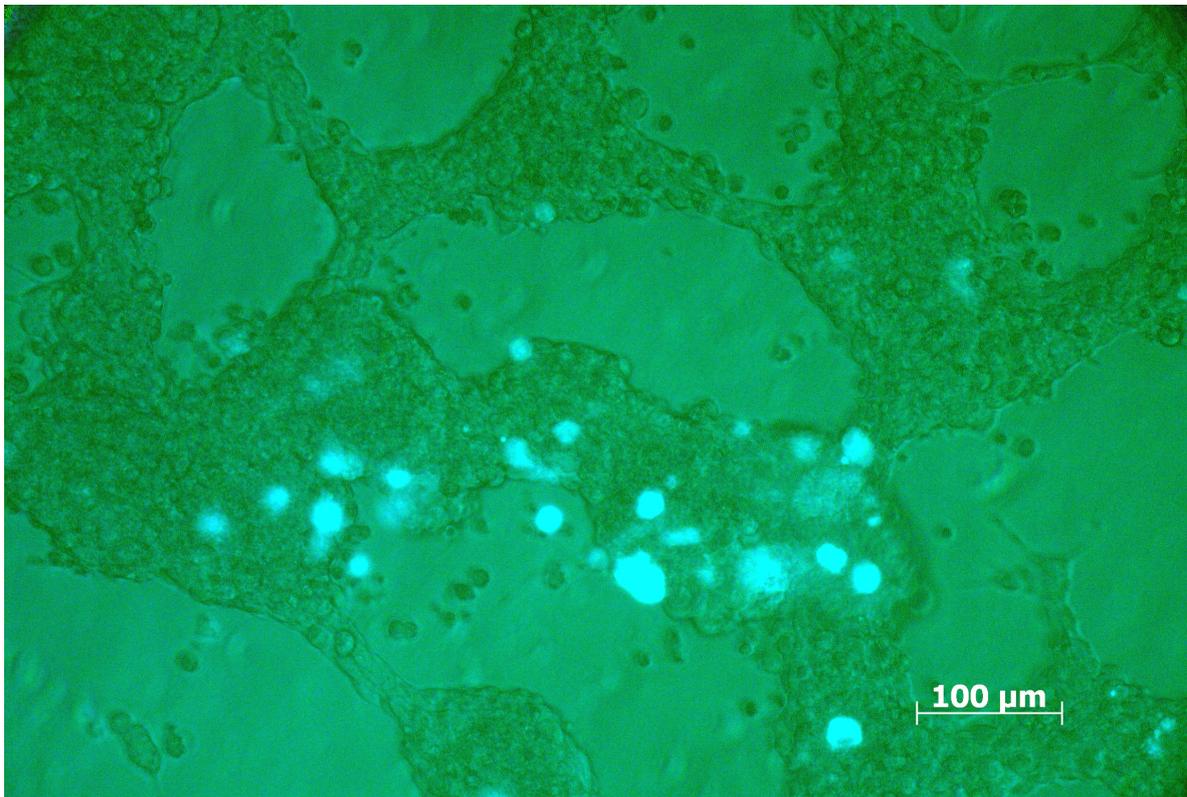


Abbildung 16: Mit AdEasy1-PGR B_{wt} transfizierte HEK293-Zellen, drei Tage nach Transfektion. Fluoreszenz bei 509 nm Wellenlänge, Vergrößerung 200x.

Mit zunehmender Virusreplikation begannen die Zellen, zu ballonieren und wenig später zu lysieren, bedingt durch die hohe Zahl zytoplasmatisch gelegener Viruspartikel. Die zunehmende Lyse der HEK-Zellen unter bis dahin weiter verlaufender Virusproduktion führt zu einer zunehmenden Virusanreicherung im umgebenden Medium.

Das Medium kann daher zur Infektion weiterer, wiederum virusproduzierender HEK-Zellen verwendet werden (Kap. 2.2.4.6). Die Infektionsfähigkeit des so erstellten Virus konnte nach Abnahme des Mediums aus der zunächst transfizierten 1 cm-Schale nach weiteren 2 Tagen an einer 6 cm-Zellkulturschale mit 50% konfluenten HEK-Zellen gezeigt werden. Diese infizierten Zellen zeigten bereits nach 24 Stunden erste grüne Fluoreszenz und nach zwei Tagen das Vollbild vor der im Anschluss beginnenden Lyse.

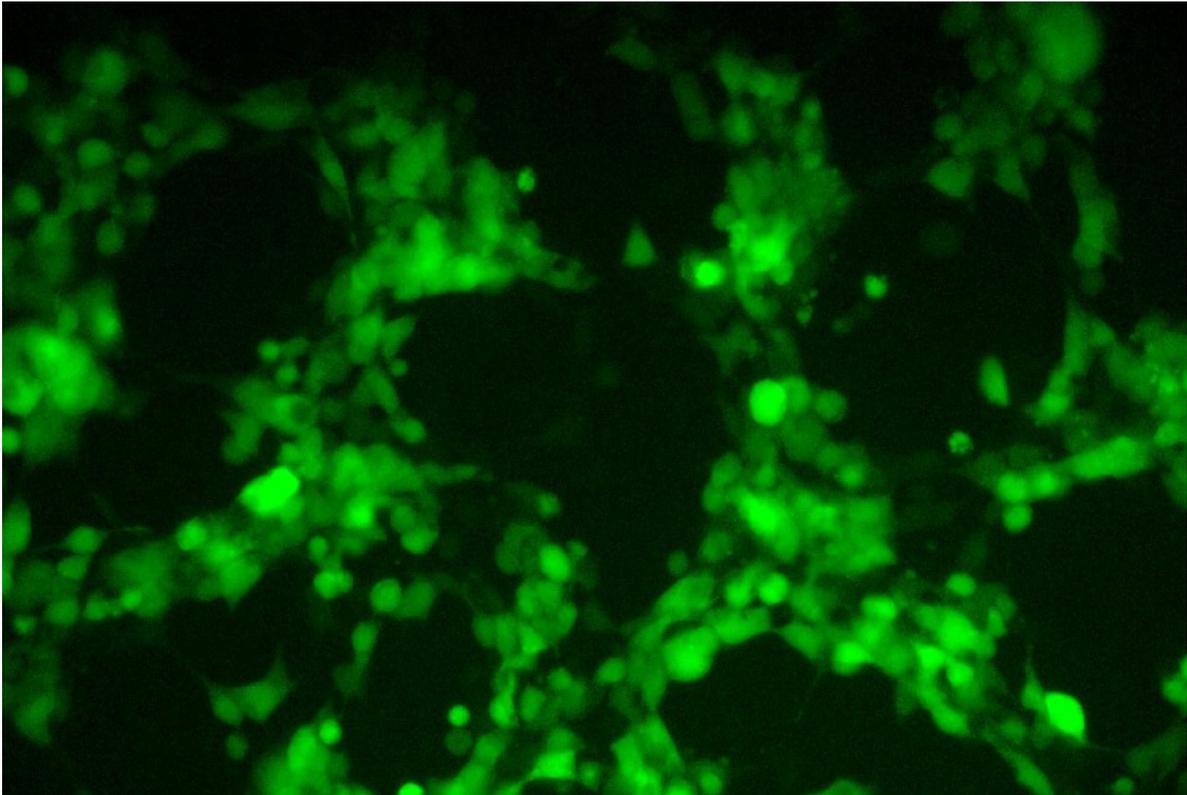


Abbildung 17: Mit AdEasy1-PGR-B_{wt} infizierte HEK293-Zellen, zwei Tage nach Infektion mit Medium/Überstand der vorhergehenden Transfektion. Fluoreszenz bei 509 nm Wellenlänge, Vergrößerung 200x.

So konnten sukzessive größere Zellkulturschalen infiziert werden (Kap. 2.2.4.6) und letztlich die Viren aus Überstand und HEK-Zellen jeweils dreier 15 cm-Zellkulturschalen pro Variante des Rezeptors/Virus präpariert werden. Dies geschah durch Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation und anschließende Dialyse gegen *Virus Storage Buffer*, in dem die Viren bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt wurden. Die letzten Präparationsschritte erfolgten erst nach der im Folgenden beschriebenen Analyse der Rezeptoren.

3.7 Analyse der exprimierten Rezeptoren

3.7.1 Western-Blot

Nach der Verifikation der Infektionsfähigkeit der Adenoviren und Präparation einer ausreichenden Menge sollten die Progesteronrezeptor-Varianten, die nach Infektion von infizierten Zellen exprimiert wurden, charakterisiert werden. So sollte das Vorhandensein der jeweils richtigen Variante für die folgenden Experimente sichergestellt werden. Dazu wurde zunächst mit den bereits präparierten Viren je ein well einer 6-well-Zellkulturschale mit T47D-Y-Zellen infiziert, da bei diesen Zellen sicher davon ausgegangen werden kann, dass die Charakterisierung der Rezeptor-Varianten nicht durch endogen exprimierten Rezeptor verfälscht wird (Kap. 2.1.4.2). Die Zellen wurden wie beschrieben geerntet, eine erste Charakterisierung sollte mittels Western-Blot erfolgen.

Zunächst wurde ein Blot für nur drei Rezeptorvarianten ausgeführt, da nur diese bis dahin in ausreichender Menge zur Verfügung standen (Kap. 2.2.4.7).

Dieser Blot hatte ein unerwartetes Ergebnis. Die Variante A_{12} zeigte eine unerwartet geringe Größe des Rezeptorproteins, bei unbeeinträchtigtter Antikörperbindung.

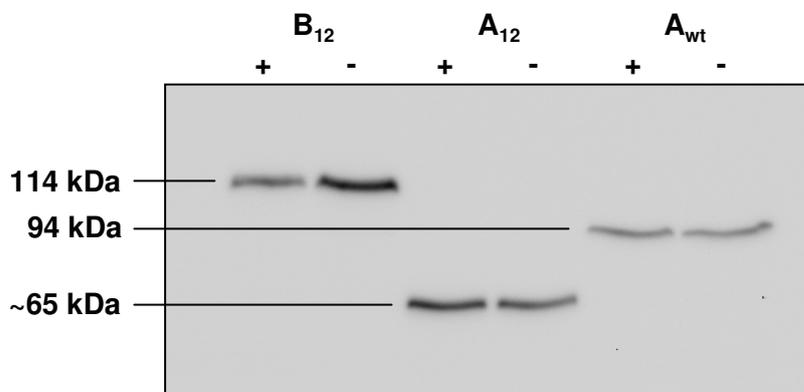


Abbildung 18: Erster Western-Blot, nach Expression der Progesteronrezeptor-cDNA der Viruskonstrukte. +/- Inkubation der Zellen mit (10 $\mu\text{m}/\text{ml}$, 24 h), beziehungsweise ohne Progesteron. Ernte am sechsten Tag nach Infektion (siebter Tag nach Aussaat). Die Varianten A_{wt} und B_{12} zeigen die erwartete Größe, A_{12} zeigt ein auf etwa 65 kDa trunkiertes Protein. Detektion mit Maus-Anti-Progesteron-Antikörper (Calbiochem), Blotbedingungen siehe Kap. 2.2.4.7.

Unter der Vermutung, dass es sich bei dem Rezeptorprotein A_{12} um ein durch Kettenabbruch trunkiertes Protein handelte, sollten sämtliche PGR-Inserts nun sequenziert werden.

Obwohl keine PCR-Schritte seit der letzten Sequenzierung zur Anwendung gekommen waren, war es tatsächlich zu einer Kettenabbruchmutation gekommen, was die Vermutung nahelegt, dass die Replikationstreue der beteiligten Replikationssysteme, also jenen von E.coli und auch der HEK-Zellen nicht ohne weiteres als vollständig angenommen werden kann. Zumindest bei der Analyse von SNPs, wo gerade auch geringe Aktivitätsdifferenzen eben durch Punktmutationen untersucht werden sollen, scheint daher eine Sequenzierung möglichst in einem Stadium kurz vor der Verwendung eines Konstruktes zwingend.

3.7.2 Sequenzierung

Unter der Annahme, dass potenziell jeder beteiligte Organismus für die Punktmutation verantwortlich sein kann, sollten die Varianten der PGR-cDNA direkt auf der Ebene der Virus-DNA sequenziert werden. Dies setzt wiederum eine im Laboralltag einfach anzuwendende Methode der Aufreinigung von Virus-DNA zur Sequenzierung voraus.

Unter der Annahme, dass der detergenzienhaltige Puffer zur Zersetzung von Gelbestandteilen aus dem QIAquick Gel Extraction-Kit, der zugleich optimale Bindungsbedingungen für darin enthaltene DNA an eine Silica-Membran bietet, zumindest bei erhöhter Temperatur auch in der Lage sein sollte, Adenoviruskapside aufzuschließen, wurde dieses Kit zur DNA-Extraktion verwendet. Das Herstellerprotokoll wurde weitgehend beibehalten, das Gelvolumen durch ein gleiches Volumen virushaltigen Zellkulturmediums ersetzt und der Elutionsschritt aufgrund der Größe der DNA erleichtert, durch die Verwendung von Wasser bei 80 °C.

Die so gewonnene DNA stand zwar prinzipiell zur Sequenzierung zur Verfügung, jedoch nicht in ausreichender Menge. Um dieser Tatsache entgegenzuwirken, wurde die DNA in zwei (kürzere A-Isoformen), beziehungsweise drei (längere B-Isoformen) Fragmenten mittels PCR amplifiziert, bevor diese sequenziert wurden. Es handelte sich um drei teilweise überlappende Fragmente von 917, 908 und 702 bp Länge, die mit den Primerpaaren PGR-IsoA-Fw/ PGR-Seq-2B-Rv, Just1/ Just2 und PGR-FL-4-Fw/ PGR-FL-4-Rv entstanden (Tabelle 14, Tabelle 15 und Tabelle 22). Die Sequenzierreaktionen wurden mit den gleichen Primern ausgeführt (Tabelle 16).

Im Fall des kürzeren Rezeptorproteins der A₁₂-Variante konnte die Trunkierung als durch eine Rasterschubmutation mit Deletion eines Argininrestes 1382 bp *downstream* des Startcodons bedingt bestätigt werden. Durch diesen Rasterschub kommt es zum vorzeitigen Auftreten eines Stopcodons auf Höhe der cDNA-Basen 2018-2020.

Das Virus zur Expression der Rezeptorvariante A₁₂ musste demnach in gleicher Technik erneut kloniert, rekombiniert und in Zellkultur zur Expression gebracht werden.

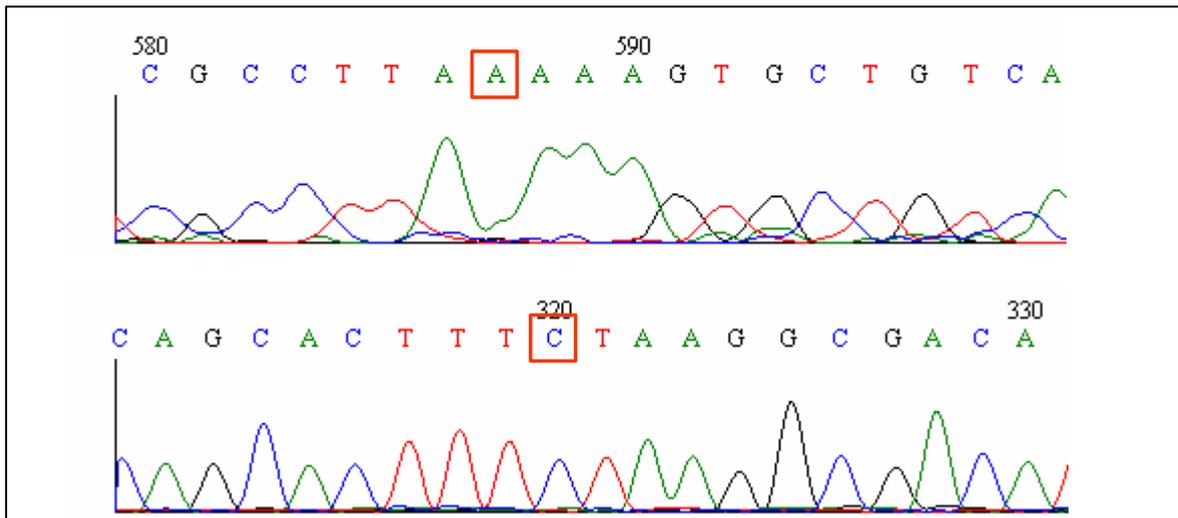


Abbildung 19: Vergleich der Sequenzierdaten des von der unerwarteten Deletion betroffenen Bereiches (Variante A₁₂). Die obere Sequenz zeigt die initiale, mit Deletion behaftete Sequenz in konventioneller 5'-3'-Richtung. Deletionsbereich rot gerahmt: Der Kettenabbruch zeigt, dass hier (c.1382) eine Deletion vorliegen muss, vereinbar mit den Fluoreszenzpeaks. Die Referenzsequenz beinhaltet hier einen Guanidylrest, im Einklang mit dem unteren Teil der Abbildung, der die Sequenz des komplementären Stranges in 3'-5'-Orientierung nach erneuter Klonierung und Virusproduktion zeigt.

Die übrige Sequenzierung bestätigte zum einen die Konformität der Konstrukte mit der Referenzsequenz, abgesehen von den oben genannten zur Klonierung notwendigen stummen Mutationen, zum anderen das regelrechte Vorliegen der gewünschten SNPs.

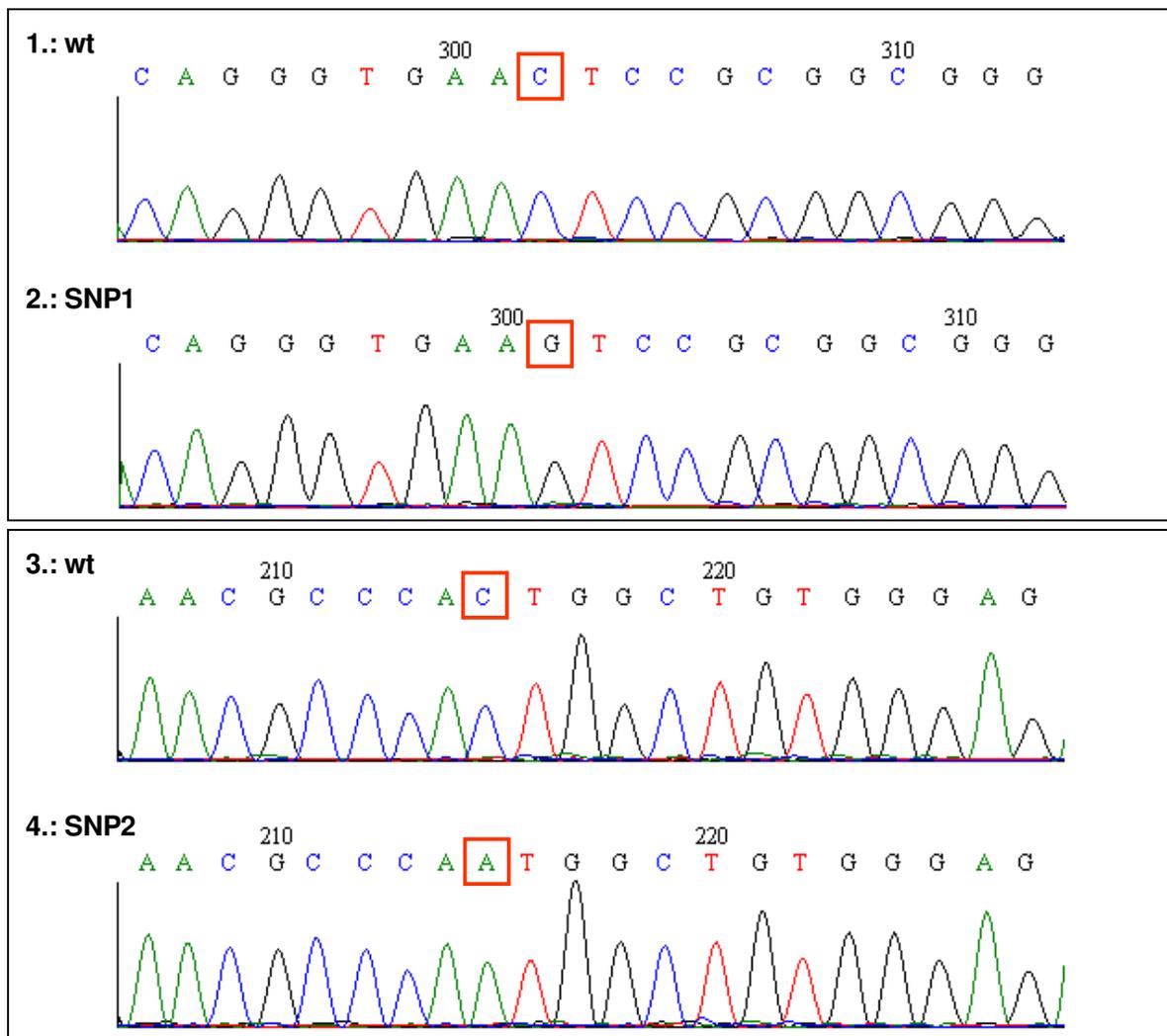


Abbildung 20: Übersicht der verschiedenen SNPs in Sequenzierdaten, die betreffenden Basen jeweils rot hervorgehoben. Alle Sequenzen zeigen technisch bedingt jeweils den komplementären Strang in 3'-5'-Orientierung. 1.: Wildtyp-Form im Bereich des SNP1 (c.G1031C), am Beispiel der Variante A₂, 2.: SNP1 (c.G1031C), am Beispiel der Variante A₁, 3.: Wildtyp im Bereich des SNP2 (c.G1978T), am Beispiel der Variante A_wt, 4.: SNP2 (c.G1978T), am Beispiel der Variante A₂.

Zusätzlich zur Bestätigung der Richtigkeit der Sequenzen der einzelnen Konstrukte sollte deren Expression verifiziert werden, so dass vor der eigentlichen *large-scale*-Viruspräparation eine parallele Western-Blot-Analyse sämtlicher Rezeptorproteine erfolgte. Dies diente zugleich als erster Schritt der Optimierung der Blot-Bedingungen, zumal das Western-Blot-Verfahren im Folgenden auch quantitativ zur Angleichung der Virustiter verwendet werden sollte. Die Expression sämtlicher Rezeptorproteine konnte dabei erwartungsgemäß bestätigt werden. Zur Expression wurden erneut T47D-Y-Zellen verwendet, diesmal ohne Stimulation durch Progesteron (Kap.2.2.4.1).

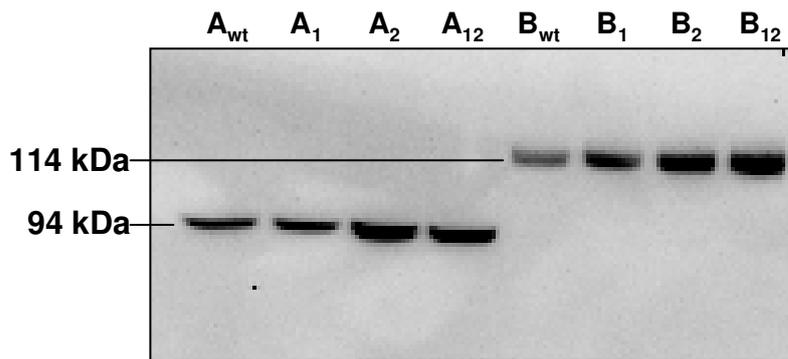


Abbildung 21: Western-Blot nach Ernte von mit den acht verschiedenen Viruskonstrukten infizierten T47D-Y-Zellen. Zellernte von je einem well einer 6-well-Zellkulturschale, am zweiten Tag nach Infektion, dritter Tag nach Aussaat. Sämtliche Rezeptorproteine werden exprimiert und weisen die erwartete Größe auf. Detektion mit Maus-Anti-Progesteronrezeptor-Antikörper (Calbiochem), Blotbedingungen siehe Kap. 2.2.15.

3.7.3 Progesteronbindung

Die prinzipielle Fähigkeit sämtlicher Isoformen des überexprimierten Progesteronrezeptors, Progesteron zu binden, sollte ebenfalls überprüft werden. Zugleich stellte dies ein Vorexperiment dar, um später auch quantitativ die Hormonbindungskapazität in Abhängigkeit von Isoform und SNP-Variante überprüfen zu können.

Diese Überprüfung, mit der gezeigt werden konnte, dass sämtliche Rezeptorformen Progesteron regelrecht zu binden in der Lage sind, gelang mit Hilfe eines Radioaktivitäts-Bindungs-Assays mit Tritium-markiertem Promegeston (Kap. 2.2.4.8).

Im Vergleich mit den Zellen, die zuvor mit dem Kontrollvirus AV44 infiziert worden waren, zeigte sich in den PGR-exprimierenden Zellen eine deutlich höhere Hormonbindungskapazität.

Die Bindung wurde für jede Variante in zwei wells einer 6-well-Zellkulturschale durchgeführt und das Lysat jeder Schale doppelt gemessen. Anschließend wurden die ermittelten Werte gemittelt.

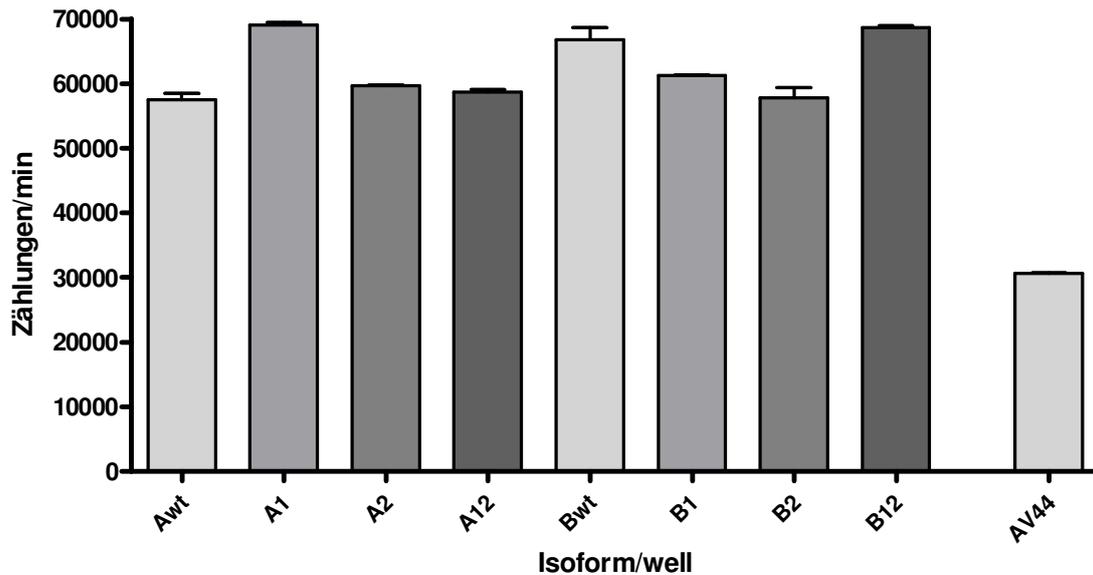


Abbildung 22: Radioaktivitäts-Bindungs-Assay mit Tritium-markiertem Promegeston. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwertes aus Doppelbestimmungen.

3.8 Titrierung

Um die Unterschiede der intrinsischen Aktivität der Rezeptor-Varianten unter verschiedenen Bedingungen evaluieren zu können, ist in den unterschiedlichen Experimenten eine Angleichung der Rezeptormenge unter den verschiedenen Varianten vonnöten. Eine Angleichung der Viruskonzentrationen und somit indirekt der -mengen ist dafür nicht ausreichend. Sowohl Unterschiede der Aktivität, mit der die Rezeptorproteine transkribiert werden, als auch Unterschiede in der Translationsaktivität, der RNA-Prozessierung und nicht zuletzt auch der posttranslationalen Modifikation, Proteinstabilität und -halbwertszeit können die Vergleichbarkeit stark beeinträchtigen und damit dem Ziel des direkten Aktivitätsvergleichs der Rezeptorvarianten entgegenstehen.

Eine direkte Quantifizierung der Rezeptormenge unter standardisierten und reproduzierbaren experimentellen Bedingungen war daher nach der Viruspräparation (Kap. 2.2.4.6 und 3.6) erforderlich. Für diese Quantifizierung wurden verschiedene Strategien auf ihre Brauchbarkeit hin untersucht. Es kamen die Verfahren Western-Blot, Slot-Blot, Dot-Blot und EIA zur Anwendung.

Letztendlich erschien eine Kombination aus Western-Blot und EIA am ehesten Erfolg versprechend. Die Titrierung geschah dabei so, dass eine bestimmte Zahl T47D-Y-Zellen mit einer definierten Menge Virus infiziert wurde. Die Zellzahl wurde dabei so gewählt, dass sie mit derjenigen späterer Experimente zur mRNA-Quantifikation übereinstimmen sollte.

Diese Vorgehensweise ermöglicht es, aus dem Western-Blot-Signal, beziehungsweise dem EIA-Signal auf die nötige einzusetzende Virusmenge rückzurechnen. Es wurde dabei ein Virus aus den acht verwendeten gewählt, welches günstige Eigenschaften in Bezug auf Zellkulturparameter, wie Dauer bis zur GFP-Expression, Dauer bis zur Zellkugelung und Anteil der fluoreszierenden Zellen bei der gewählten Infektionsdosis aufwies. Unter der Annahme, auf diese Weise eine geeignete Infektionsdosis eingestellt zu haben, konnte nach Blot und EIA die Infektionsdosis der anderen Viren wiederum so eingestellt werden, dass am Ende die gleiche Menge Rezeptor vorlag. Dies setzt die Annahme der Linearitätsbeziehung zwischen Signal und Rezeptormenge voraus, die beim Western-Blot bei Verwendung von Konzentrationen in geeigneten Grenzen vielfach erprobt ist, im EIA wurde die Linearitätsbeziehung überprüft und bestätigt. Ein linearer Zusammenhang zwischen Infektionsdosis und Rezeptormenge ist nicht vonnöten. Durch Infektion mit einer ganzen Serie von wells einer 6-well-Zellkulturschale mit absteigenden Konzentrationen konnte ein Funktionszusammenhang zwischen Rezeptormenge und Infektionsdosis gesichert werden und die Infektionsdosis bis zum Vorliegen gleicher Rezeptormengen innerhalb der Werte der Verdünnungsreihe intrapoliert werden. Abweichungen konnten durch erneute Infektionsserien und folgende Blots schrittweise, bis zur vollständigen Angleichung der Rezeptormenge empirisch angeglichen werden.

Als geeignet erwies sich eine Infektionsdosis, die bei den meisten der acht Viren in der Größenordnung von 5 μ l Virusstammlösung pro 500 μ l Medium eines wells einer 6-well-Zellkulturschale lag (1%). Die Virusstammlösung wurde mit 500 μ l Zellkulturmedium gemischt und für eine Stunde auf einem well belassen, danach mit weiteren 1,5 ml Zellkulturmedium aufgefüllt. Diese Infektionsdosis führte zu einer deutlich sichtbaren GFP-Expression nach 24 h, die Zellernte erfolgte nach 48 h, ohne dass nennenswerte Zellballonierung oder Ablösung bis dahin eintrat. Die Zellmenge wurde so gewählt, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Infektion etwa 50% Konfluenz aufwiesen. Unvermeidliche Differenzen in der Zellmenge durch unterschiedliche Aussaat und Wachstumskinetik wurden durch Standardisierung der Proteinmenge der Zellernte ausgeglichen (Kap. 2.2.4.10).

Nach ersten Blots (Abbildung 21), die die erwartete Größe der exprimierten Rezeptorproteine bestätigten, und im Hinblick auf die erfolgte Sequenzierung sämtlicher Konstrukte auf der Ebene der vollständigen Viren erschien es zunächst nicht sinnvoll, für die Titrierung das quantitative Western-Blot-Verfahren zu wählen. Eine Überprüfung der Proteingröße war im Verlauf nicht weiter notwendig, so dass auf die vorausgehende Proteinelektrophorese verzichtet werden und die Titrierung zunächst durch Dot-Blot umgesetzt werden sollte. Dieses Vorgehen erwies sich jedoch als nicht zweckmäßig.

Ein zu hohes unspezifisches Hintergrundsignal verhinderte die sichere Quantifizierung des spezifischen Signals durch die Lumineszenzdetektion der Rezeptorproteine.

Verdünnungsfaktor: 1 1/2 1/4 1/8

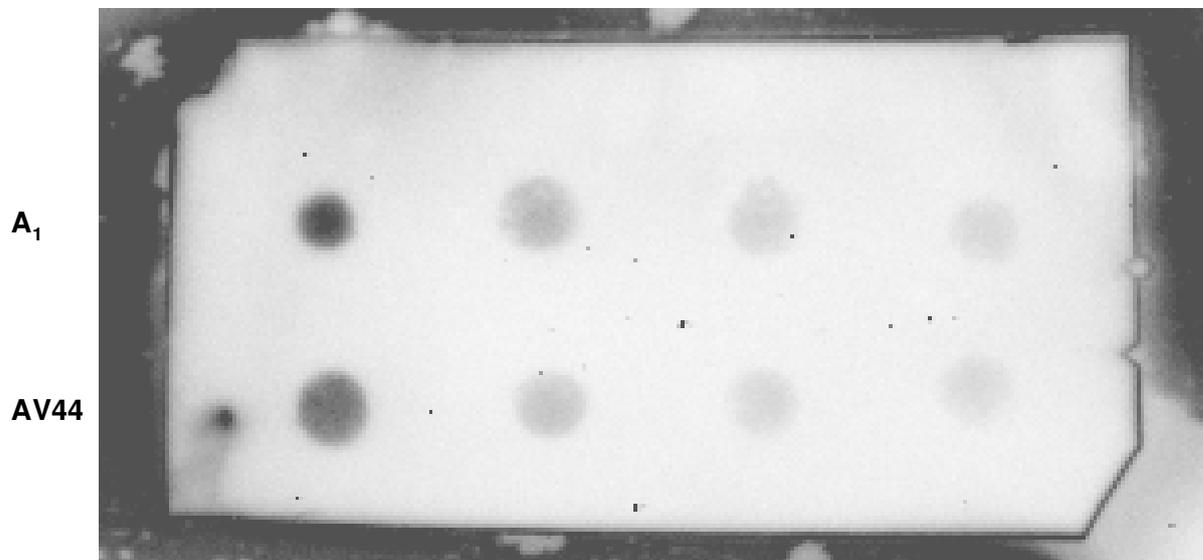


Abbildung 23: Beispiel eines Dot-Blots, wie er zur Quantifizierung der Rezeptorproteine verwendet werden sollte. Der Blot zeigt eine Verdünnungsreihe von Zellysat aus einer Standard-Ernte von T47D-Y-Zellen, infiziert mit der Adenovirus-Variante A₁ (obere Reihe), beziehungsweise dem Kontrollvirus AV44. Der Blot diente zum einen der Überprüfung der Linearitätsbeziehung zwischen Signalmenge und Proteinmenge, die gegeben zu sein scheint, zum anderen der Abschätzung der unspezifischen Signalmenge. Zwischen unspezifischer Bindung und spezifischer Bindung ist kein Unterschied erkennbar. Blotbedingungen: PVDF-Membran, Probenauftrag je 10 µl. Weiteres Prozedere analog Western-Blot (Kap. 2.2.4.7).

Der exemplarisch dargestellte Dot-Blot steht dabei für eine Reihe von Versuchen, bei denen das Problem des zu hohen unspezifischen Hintergrundes nicht behoben werden konnte. Beim quantitativen Western-Blot-Verfahren hingegen besteht dieses Problem nicht, da sich der Hintergrund auf Grund der verschiedenen Größen der hintergrundbildenden Proteine über einen größeren Bereich außerhalb der quantifizierten relevanten Bande verteilt und nur ein vernachlässigbar geringer Anteil im Bereich der spezifischen Lumineszenz zu liegen kommt.

Beim Slot-Blot ergibt sich wiederum das gleiche Problem der Überlagerung durch unspezifische Hintergrundlumineszenz, so dass quantitative Western-Blots die vielversprechendsten Ergebnisse lieferten. Die Quantifikation erfolgte computergestützt mit dem Programm GeneSnap.

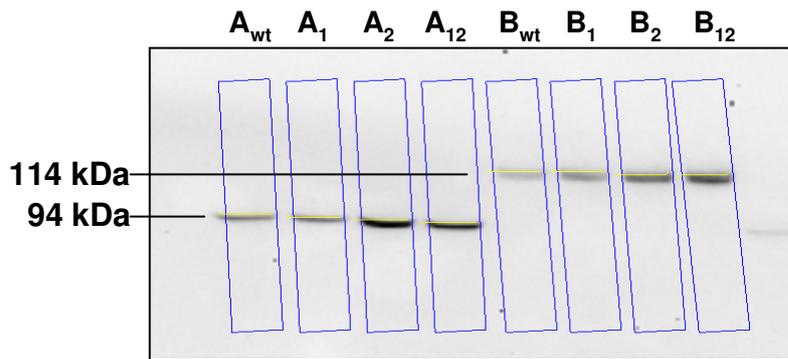


Abbildung 24: Beispiel für die Quantifikation der Rezeptormengen zur Titrierung durch quantitativen Western-Blot. Zellernte von je einem well einer 6-well-Zellkulturschale, am zweiten Tag nach Infektion, dritter Tag nach Aussaat. Detektionsfelder für die Hintergrundberechnung und automatische Bandenerfassung zur Quantifikation mit GeneSnap eingezeichnet. Detektion mit Maus-Anti-Progesteronrezeptor-Antikörper (Calbiochem), Blotbedingungen siehe Kap. 2.2.4.7.

Eine weitere Möglichkeit zur Titrierung, die erprobt wurde und sich als geeignet erwies, war die Quantifikation per EIA. Hierzu wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet (NR Sandwich PR ELISA, active motif).

Auch hier wurde jeweils ein well einer 6-well-Zellkulturschale mit 5 µl Virusstammlösung wie oben beschrieben infiziert und die Zellen nach 48 Stunden geerntet (Kap. 2.2.4.12). Da weiterhin von unvermeidlichen Differenzen der Menge des Zellextraktes durch Ungenauigkeit der Zellernte ausgegangen werden musste, wurde die Proteinkonzentration des Lysates erneut durch entsprechende Verdünnung angeglichen (Kap. 2.2.4.10). Sämtliche Rezeptorvarianten konnten mit den verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern detektiert werden, die Linearität der optischen Dichte im Verhältnis zur eingesetzten Rezeptormenge in den für die Experimente geeigneten Grenzen konnte an einer Verdünnungsreihe eines Proteinextraktes gezeigt werden.

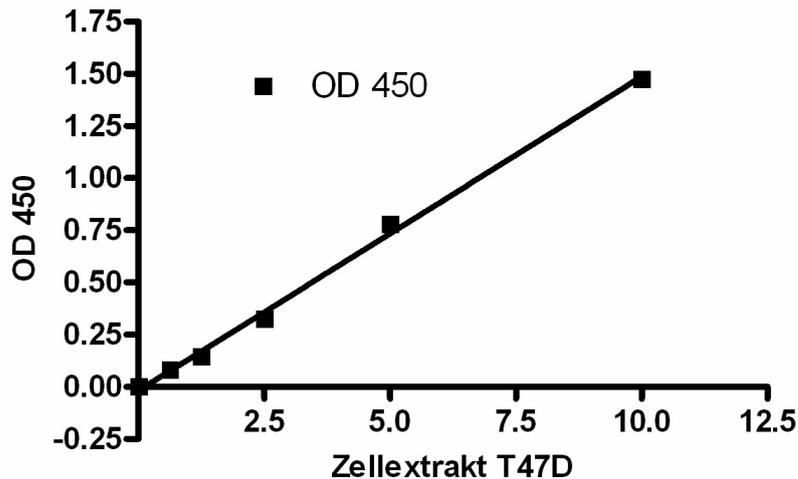


Abbildung 25: Darstellung der Linearitätsbeziehung zwischen eingesetzter Zellextraktmenge (in µg) und optischer Dichte bei 450 nm Lichtwellenlänge im EIA. Referenzwellenlänge 655 nm, automatische Hintergrundkorrektur, Doppelbestimmung, $r^2=0,9973$, $p<0,0001$.

Auf diese Weise konnte für jede Virus-Isoform ein Verdünnungsfaktor bestimmt werden, der bei den folgenden Experimenten zum Einsatz kam und bei dem eine gleich starke Expression sämtlicher Isoformen des Rezeptors gewährleistet war. Das Vorgehen bei dieser neuen Titrierung konnte zudem etabliert und die Tauglichkeit der Methoden gezeigt werden.

Tabelle 23: Ergebnisse der Virustitrierung

Isoform	Virusstammlösung für 2 wells einer 6-well-Schale
A _{wt}	18,1 µl
A ₁	17,4 µl
A ₂	28,9 µl
A ₁₂	7,5 µl
B _{wt}	5,7 µl
B ₁	1,8 µl
B ₂	28,0 µl
B ₁₂	21,2 µl

3.9 Quantifizierung der mRNA progesteronregulierter Gene

Zum Vergleich der unterschiedlichen Aktivität der einzelnen Varianten des Progesteronrezeptors sollten quantitative rt-PCR Reaktionen für Gene unter starker Kontrolle des Progesteronrezeptors optimiert werden.

Es wurden 10 Gene unter besonderem Einfluss des Progesteronrezeptors nach Daten von Richer et al. (2002) gewählt. Dabei wurden sowohl solche unter einem Transaktivierungseinfluss als auch solche unter Transrepressionseinfluss gewählt und solche mit gleichsinniger wie auch verschiedener Regulation durch beide Isoformen des Rezeptors.

Tabelle 24: Durch PGR regulierte Gene (Richer et al. 2002)

Gen	Regulation durch PR-A	Regulation durch PR-B
VIL2	5,4	12,7
FKBP54	3,3	9,4
EZF	7,5	6,0
HSD11B2	6,5	22,6
NEDD9	4,7	-
GAS6	-	23,1
RASSF2	-	10,2
TGFB3	-3	-1,8
P2RY2	-	-4,2

Zusätzlich zu den in der Tabelle genannten Quantifikationsreaktionen wurde eine quantitative rt-PCR für die mRNA des Gens GAPDH etabliert, also eines Gens, welches bekanntermaßen konstitutionell in unterschiedlichsten Geweben gleichermaßen aktiv ist und mit großer Wahrscheinlichkeit nicht unter dem Einfluss des Progesteronrezeptors oder assoziierter Signalwege steht. Dieses Gen dient, unter der Annahme gleicher Aktivität in mit den verschiedenen Adenovirusvarianten infizierten Zellen, der Standardisierung der eingesetzten cDNA-Menge und damit wiederum der RNA-Menge und damit Zellmenge. Wie beim quantitativen Western-Blot sind Differenzen in der geernteten Zellmenge bei parallel durchgeführten Experimenten unvermeidlich. Daher dient, wie die Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge beim oben beschriebenen Western-Blot, hier die Verifikation der Mengengleichheit an eingesetzter Gesamt-RNA durch Photometrierung und später der erneute Vergleich durch rt-PCR-Quantifikation des *housekeeping*-Gens GAPDH der Standardisierung der Messungen auf die gleiche eingesetzte Zelllysatzmenge.

So kann nun der Einfluss der verschiedenen hormonegebundenen Rezeptorvarianten auf die Transkription gemessen werden, wobei hier Effekte von Unterschieden in Hormonbindungsfähigkeit, DNA-Bindungsfähigkeit und Transaktivierungseffizienz der einzelnen Varianten nicht differenziert werden können, sondern der Schwerpunkt bewusst auf dem daraus resultierenden Endergebnis liegt.

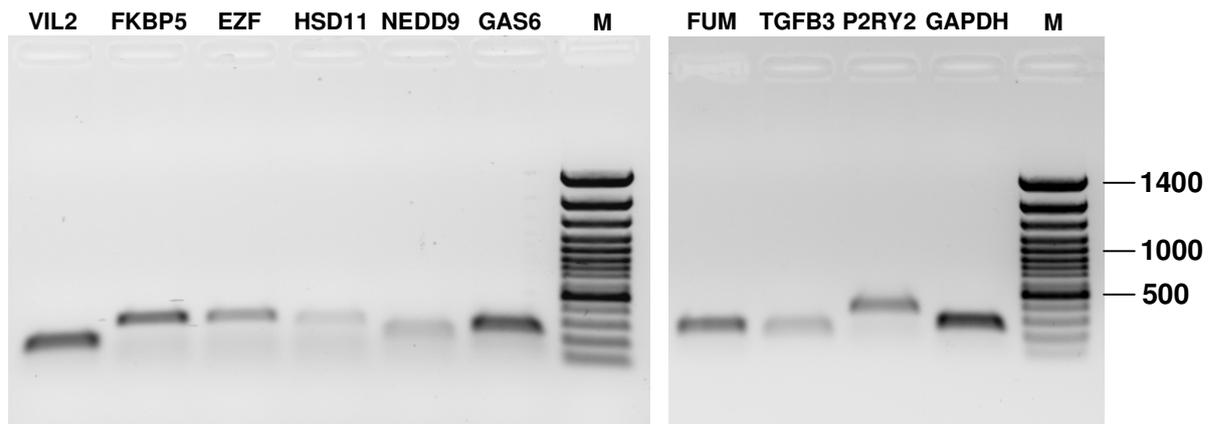
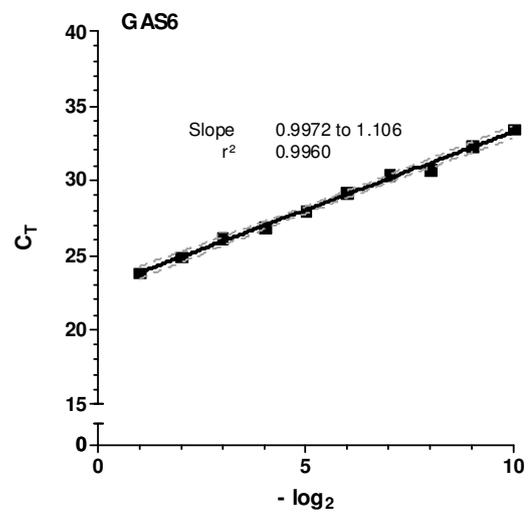
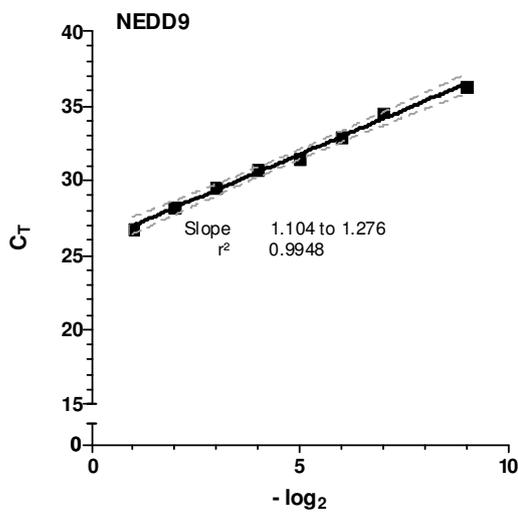
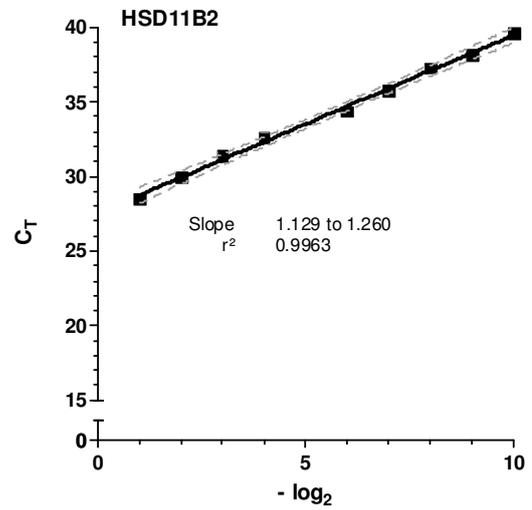
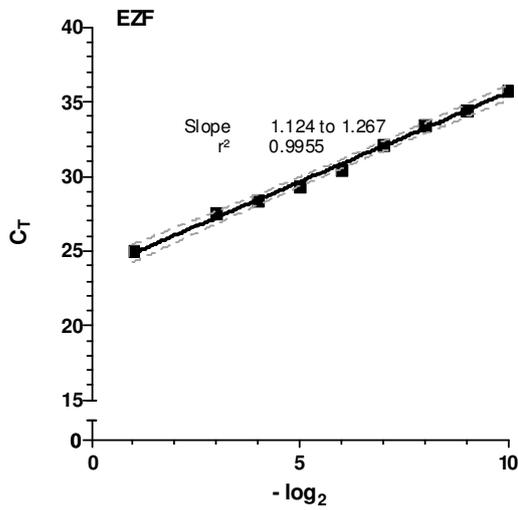
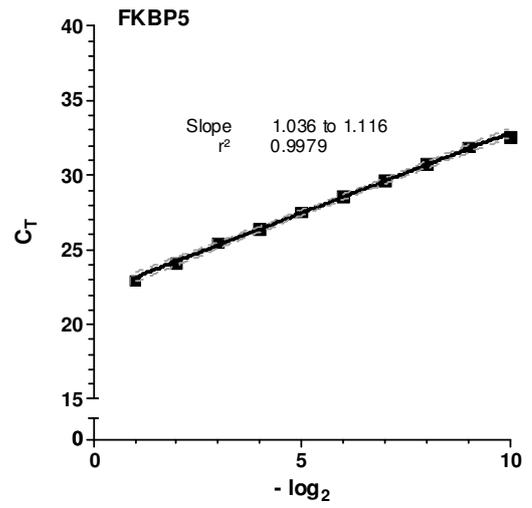
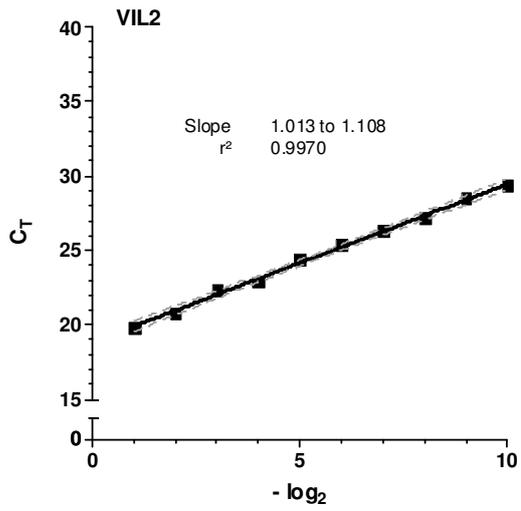


Abbildung 26: Zur Veranschaulichung der Funktionsfähigkeit sämtlicher quantitativer *rt-PCR*-Reaktionen wurden diese im *real-time-PCR*-Gerät ausgeführt und die Produkte im Anschluss auf einem Agarosegel aufgetrennt. Bedingungen der PCR und der reversen Transkription siehe Kap. 2.2.10 und 2.2.17. Laufbedingungen : 0,8% Agarose, 80 V, 30 min. M: 100 bp-DNA-Längenstandard.

Bei der quantitativen *real-time-PCR* ist für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse die Linearität zwischen eingesetzter RNA-Menge und Fluoreszenzsignalanstieg Voraussetzung.

Mit der quantitativen *rt-PCR*-Messung der RNA für sämtliche verwendete Gene einer Verdünnungsreihe von cDNA konnte der lineare Zusammenhang gesichert werden. Dabei wurde cDNA verwendet, die durch eine reverse Transkription von aus mit dem A_{wt} -Virus infizierten T47D-Y-Zellen extrahierter RNA entstand. Die experimentellen Bedingungen wurden so gewählt, wie sie auch zur eigentlichen Verwendung des Messsystems vorgesehen sind (Kap. 2.2.2.10 und 2.2.4.17). Die Konzentration der eingesetzten RNA wurde unmittelbar nach der Ernte photometrisch bestimmt und die Konzentrationen untereinander durch entsprechende Verdünnung angeglichen.



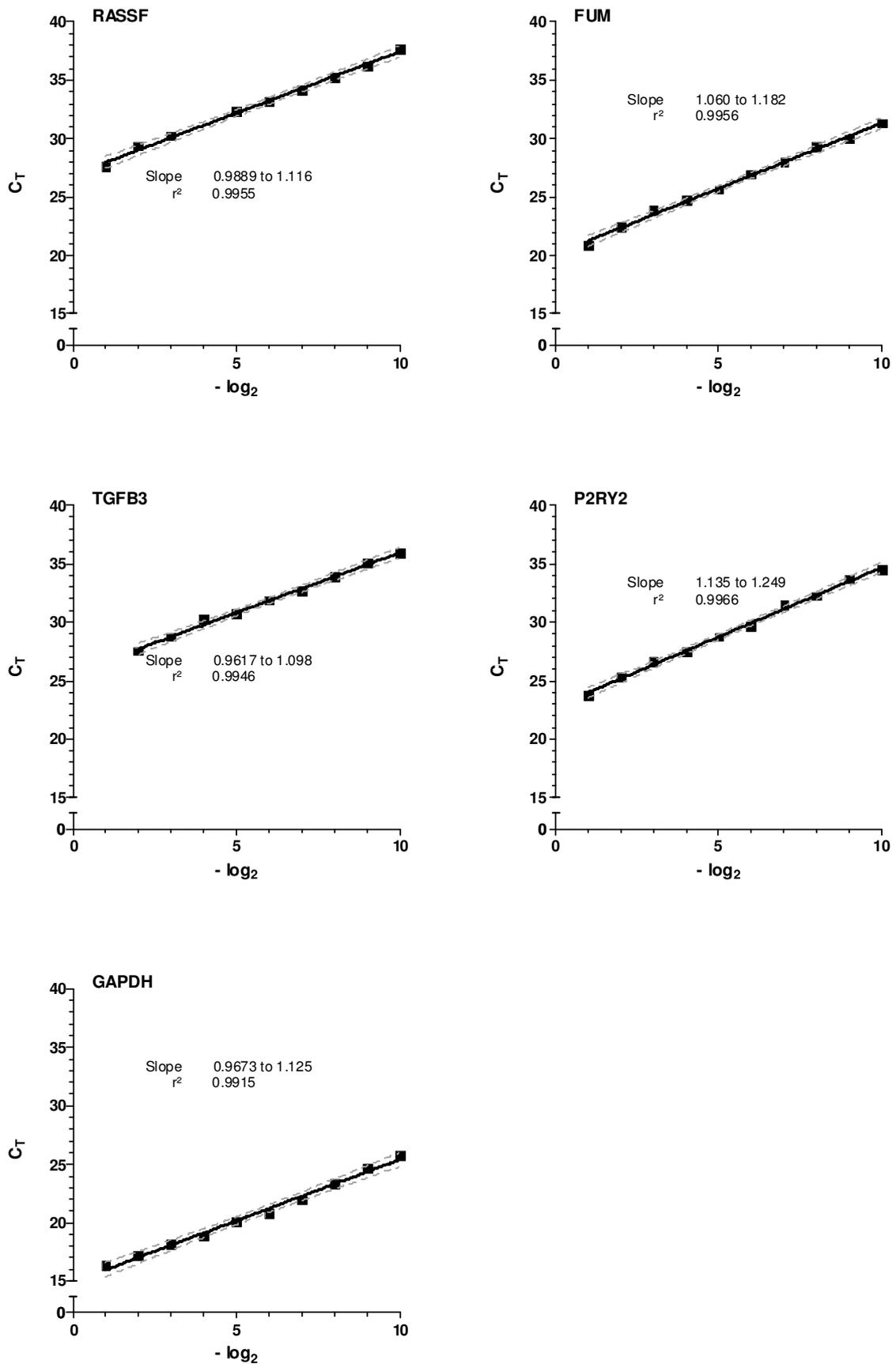


Abbildung 27: Linearitätsprüfung der quantitativen rt-PCR-Reaktionen. CT (*cycle threshold*) aufgetragen gegen den negativen natürlichen Logarithmus der Verdünnungsstufe.

Demnach wird einer Verfälschung des Endergebnisses auf unterschiedliche Weise vorgebeugt: Unterschieden der Wachstumsbedingungen der Zellen wird zum einen durch Aussaat jeweils einer genau definierten Menge Zellen (2 Millionen Zellen pro well einer 6-well-Zellkulturschale) und Durchführung jeweils eines vollen Satzes von acht Experimenten parallel vorgebeugt. Dies dient zugleich einer ersten Angleichung der Menge an geernteter Gesamt-RNA. Eine zusätzliche Kontrolle besteht in der Infektion eines weiteren wells einer 6-well-Schale mit dem AV44-Kontrollvirus. Nach Ernte der RNA wird deren Konzentration photometrisch bestimmt und die für die reverse Transkription eingesetzte RNA standardisiert. Zuletzt werden die Ergebnisse der quantitativen rt-PCR-Reaktionen mit jenen für das angenommen jeweils gleich stark exprimierte Gen GAPDH korreliert. So wird dreifach einer Verfälschung der Ergebnisse durch unterschiedliche eingesetzte Gesamt-RNA-Mengen vorgebeugt.

Das Mitführen jeweils eines parallel durchgeführten Experimentes zur Quantifikation der mRNA von Zellen, die mit dem nicht zur PGR-Expression führenden Kontrollvirus AV44, mit zweiter leerer Expressionskassette infiziert wurden, erlaubt das Ausschließen von Differenzen in der Genexpression, die auf PGR-unabhängige Progesteroneffekte zurückzuführen sein könnte, und die Beobachtung solcher Effekte, die auf der Infektion an sich beruhen.

4 Diskussion

Die klinische Bedeutung von Einzelnukleotidpolymorphismen im Gen des Progesteronrezeptors (PGR-Gen) ist seit langem umstritten und wird es vermutlich auch noch länger bleiben. Umso mehr verwundert es, dass einer sehr großen Zahl klinischer Studien nur einige wenige gegenüberstehen, die sich mit der funktionellen Bedeutung im engeren Sinne beschäftigen, also mit der Aktivitätsänderung des Rezeptorproteins auf molekularer Ebene, die sich aus den SNPs ergibt.

Mit der vorliegenden Arbeit steht nun ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem zur Klärung dieser Frage beigetragen werden kann.

Bereits bei der Erstbeschreibung der PROGINS genannten Alu-Insertionsmutation, die zu nahezu 100% mit den untersuchten Polymorphismen zu kosegregieren scheint (De Vivo et al. 2002, Schweikert et al. 2004), wurde ein Zusammenhang mit dem Ovarialkarzinom vermutet. Das Ovarialkarzinom ist zugleich die Erkrankung, zu der auch heute, 14 Jahre nach der Erstbeschreibung, am häufigsten ein Zusammenhang gesehen wird. Die PROGINS-Insertion wurde in dieser Arbeit bei der funktionellen Charakterisierung außer Acht gelassen, da die unterschiedliche Aktivität der kanonischen Rezeptorvarianten selbst bestimmt werden sollte. Die PROGINS-Insertion könnte aber durch Veränderung der Transkriptionsrate, der Splicing-Effizienz oder aber des Splice-Musters zusätzliche Effekte ausüben, die hier naturgemäß nicht untersucht werden konnten. Damit unterscheidet sich die Arbeit deutlich von jener von Romano et al. 2007, die ähnliche Messungen mit Hilfe eines Minigen-Konstruktes, welches die PROGINS-Insertion enthielt, vorgenommen haben.

4.1 Vorliegende funktionelle Daten

Die funktionelle Charakterisierung der genetischen Varianten beschränkt sich zurzeit auf zwei größere Arbeiten: Zum einen die bereits genannte von Agoulnik et al. (2004), zum anderen jene von Romano et al. (2007). Beide Studien arbeiten unter anderem mit einem Luciferase-Reporter-Assay, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wie sie mit dem vorliegenden experimentellen System erzielt werden sollen.

Zur Einordnung der vorliegenden Arbeit in den aktuellen Forschungsstand gilt es zunächst klarzustellen, dass in dieser Arbeit drei SNPs als zum veränderten Haplotyp zugehörig angesehen werden. Dies ist bei Agoulnik und Romano nicht der Fall.

Diese sehen ein vollständiges Kopplungsdysequilibrium nur zwischen der PROGINS-Mutation und den Mutationen c.G1978T (Leu660Val) und c.C2310T (His770His).

Die letztere wurde in dieser Arbeit außer Acht gelassen, da, wie erwähnt, die funktionellen Differenzen der Rezeptorproteine untersucht werden sollten, der SNP c.C2310T aber stumm ist. Die Entscheidung, auch den SNP c.G1031C (Ser344Thr) als zum Haplotyp gehörig in die Arbeit aufzunehmen, fiel vor allem im Hinblick auf die Daten von Schweikert et al. (2004), die in unserer Arbeitsgruppe entstanden. Zudem ermöglicht das vorliegende System auch eine Untersuchung allein der funktionellen Konsequenzen des Aminosäureaustausches Leu660Val. Schweikert et al. kamen zu der Entscheidung Ser344Thr hinzuzuzählen, da alle 33 sequenzierten Allele mit dem SNP-Muster in ihrer Studie auch über diese Mutation verfügten. Aber auch DeVivo et al. (2002) sahen in einer Studie mit 68 Patienten beide Mutationen in vollständigem Kopplungsdysequilibrium, wie auch Modugno (2004). Ein Polymorphismus der Promotorregion c.-331 G/A wird heute zumeist als nicht mit der PROGINS-Insertion gekoppelt angesehen (u. a. Pijnenborg et al. 2005). Funktionelle Daten zur Bedeutung des SNP Ser344Thr liegen bis heute also nicht vor.

Aus den genannten Studien von Agoulnik und Romano ist dagegen bis heute folgendes bekannt:

1. Transkription

Die c.G1978T/PROGINS-Variante wird in transient transfizierten Zellen stärker exprimiert (Agoulnik et al. 2004). In heterozygoten Zellen menschlicher Herkunft variiert die Relation zu der Wildtypvariante des PGR abhängig von Zelltyp und Östrogenexposition, bedingt durch das genannte halbe östrogenresponsive Element innerhalb der PROGINS-Insertion, das unter Östrogeneinfluss die Transkription der PROGINS-Variante steigert (Romano et al. 2007).

2. Stabilität der PGR-mRNA

Die Stabilität der Rezeptor-Prä-mRNA mit der PROGINS-Insertion ist gegenüber der Wildtypform reduziert. Romano et al. vermuten als Ursache die Bindung von SR-Proteinen aus der Familie der Splicing-Faktoren, die an purinreiche Regionen nahe der 5'-UTR binden. Diese Regionen kommen auch in PROGINS vor und reduzieren über noch nicht vollständig geklärte Mechanismen die Stabilität. Eine weitere von Romano et al. diskutierte Möglichkeit ist die Bildung doppelsträngiger RNA in der Insertionsregion, mit RNA-Transkripten anderer Alu-Insertionen, was zum dsRNA-induzierten RNA-Abbau führen könnte.

Wie klar zu sein scheint, dass PROGINS die Prä-mRNA-Stabilität reduziert, ist auch deutlich, dass PROGINS nicht in den Exons der reifen mRNA abgebildet wird, auch wenn die Insertion eine Konsensus-Splice-Donor-Site und eine Splice-Akzeptor-Site enthält (Romano et al. 2007).

3. Stabilität und Eigenschaften der Rezeptorproteine

Der bisher untersuchte SNP scheint die Translokationsfähigkeit des Rezeptors in den Zellkern nicht zu beeinträchtigen (Romano et al. 2007). Auf die Rezeptorkonformation und seine posttranslationale Modifikation sowie seine Degradation hingegen scheint der untersuchte SNP Leu660Val einen Einfluss zu haben. Romano et al. (2007) fanden ein verändertes Trypsinverdauemuster und eine abgeschwächte Phosphorylierung für die 660Val-Variante. Sowohl Romano et al. (2007) als auch Agoulnik et al. (2004) gehen von einer verlängerten Halbwertszeit der SNP-Variante aus.

4. Hormonbindungskapazität und Transaktivationsaktivität

Die Hormonbindungskapazität war durch den untersuchten Leu660Val-Polymorphismus nicht verändert (Agoulnik et al. 2004). Die Änderung der untersuchten Transaktivierungsaktivität variierte in Abhängigkeit des untersuchten Zelltyps zum Teil gar gegensinnig (Romano et al. 2007). Dies zeigt einen besonderen Vorteil der Expression der Rezeptorvarianten durch ein adenovirales Expressionssystem, da die Aktivität der Varianten in Gewebetypen gemessen werden kann, die solchen ähnlich sind, in denen diese Aktivität von Bedeutung ist. Zugleich deutet dieses Erkenntnis auf ein besonderes Problem bei der Interpretierbarkeit der bereits vorliegenden Daten von Romano et al. (2007) und Agoulnik et al. (2004) hin: Die Experimente zur Transaktivierung wurden in Hamsterzellen (*Cricetulus griseus*, CHO-Zellen), beziehungsweise Affenzellen (*Chlorocebus djambjensis* COS-1), nicht aber Zellen menschlicher Herkunft durchgeführt. Die Cofaktorausstattung verschiedener Zelllinien aber ist entscheidend für die Variation der Aktivität des PGR. Dies stellt gerade für das von Romano et al. verwendete Luciferase-Reporter-Assay mit MMTV-Promotor (*mouse mammary tumour virus*) ein Problem dar (Li und O'Malley 2003) und ist sicherlich auch für das sehr ähnliche Experiment von Agoulnik et al. mit einem GRE₂-Promotor im Reporterplasmid von Bedeutung. So ist beispielsweise von einer deutlich differierenden Ausstattung mit den PGR-bindenden Proteinen SRC-1, SRC-3 und CBP in CHO-Zellen gegenüber T47D-Y-Zellen auszugehen (Li et al. 2003). Inwieweit nun die Aktivität der Rezeptorvarianten unter physiologischen Bedingungen gemessen wurde, sei also dahingestellt.

Sämtliche bis heute vorliegenden Studien zur funktionellen Charakterisierung der Varianten des Progesteronrezeptors lassen den SNP Ser344Thr außer Acht. Zudem liefern sie zwar teils nützliche Daten, aber unter zum Teil stark von der Realität abweichenden experimentellen Bedingungen. Eine Zusammenfassung der genannten Einzelergebnisse zu einer funktionellen Gesamtcharakteristik ist zudem nicht möglich, was zum Teil der Tatsache geschuldet ist, dass die einzelnen Experimente unter stark voneinander abweichenden Bedingungen stattfanden.

Das nun vorliegende System zur funktionellen Charakterisierung der genetischen Varianten des Progesteronrezeptors soll mit seiner vielfältigen Einsetzbarkeit dazu beitragen, die aufgezeigten Lücken im Kenntnisstand zu schließen.

4.2 Klinische Aspekte

Die klinische Relevanz der schon erhobenen Daten und ihrer noch folgenden Vervollständigung erscheint hoch. Dies ist zunächst einmal nahezu unabhängig von der Tatsache, ob die PROGINS-assoziierten SNPs zu einer funktionellen Beeinträchtigung der PGR-Signalkaskade führen. Die Vielzahl der klinischen Studien, die sich mit der Thematik beschäftigen, zeigt das fortbestehende Interesse, die Bedeutung des PROGINS-Haplotyps für die Prognose verschiedener Erkrankungen besser zu verstehen. Die Anzahl der klinischen Studien, die die Bedeutung des PGR-Polymorphismus untersuchen, nimmt stetig zu, das Gleiche gilt für die Zahl der in den Studien eingeschlossenen Patienten. Dennoch mangelt es noch an einer klaren Aussage zur klinischen Bedeutung und praktischen Konsequenzen.

1. Ovarialkarzinom

Schon die Erstbeschreibung nennt den PROGINS-Haplotyp in Zusammenhang mit dem Ovarialkarzinom (Rowe et al. 1995). Das Ovarialkarzinom war auch in der Folge die am häufigsten mit der genetischen Variante assoziierte Erkrankung. Diese Assoziation liegt nahe, seit niedrige Konzentrationen an PGR in Zellen eines Ovarialkarzinoms als prognostisch ungünstig gelten (Slotman et al. 1989), wenn auch diese Erkenntnis umstritten ist (De Sousa et al. 2007). So könnten auch Funktionsstörungen des Rezeptors mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sein. Zugleich hat diese Vermutung zu einer nahezu unüberschaubaren Flut an Publikationen mit zum Teil sehr geringen Patientenzahlen und dementsprechend wenig validen Aussagen geführt (Modugno 2004). So finden beispielsweise Romano et al. (2006) den PROGINS-Haplotyp signifikant häufiger bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom als bei gesunden Kontrollen. Demgegenüber findet Modugno keinen Zusammenhang (2004).

Die bisher größte Studie schloss lediglich 124 Patienten ein (Pearce et al. 2008). Ein großer Teil dieser Studien allerdings wurde kürzlich zu einer größeren Metastudie zusammengefasst. Pearce et al. (2008) kommen in dieser multinationalen Fall-Kontroll-Metastudie mit insgesamt 4788 Patienten und 7614 Kontrollen zu dem Schluss, dass der PROGINS-Haplotyp und der SNP Leu660Val nicht mit einem veränderten Ovarial-Karzinomrisiko einhergehen. Darüber hinaus konnte bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom kein Zusammenhang mit einer veränderten Prognose beobachtet werden. Selbst in dieser größeren Metaanalyse bleiben allerdings durchaus Fragen offen, betrachtet man die histologischen Typen des Ovarialkarzinoms genauer. So finden Pearce et al. beispielsweise eine erhöhte *odds ratio* für das endometrioide Ovarialkarzinom bei Trägern des PROGINS-Haplotyps (OR=1,22, 95% CI: 1,01–1,46, p=0,037).

2. Mammakarzinom

Auch zur Assoziation des Mammakarzinoms mit dem PROGINS-Haplotyp existiert inzwischen eine Metastudie mit insgesamt 7390 Patienten und 8435 Kontrollen, die die Daten aller größeren bisher durchgeführten Untersuchungen zusammenfasst (Johnnatty et al. 2008). Die Zahl der betrachteten Studien zum Mammakarzinom ist mit sieben geringer als in der Metaanalyse zum Ovarialkarzinom (n=12). Die Metaanalyse fasst Fall-Kontroll-Studien mit teilweise konträren Ergebnissen zusammen. Insgesamt gelangen Johnnatty et al. (2008) zu dem Ergebnis, dass das Mammakarzinom insbesondere mit dem SNP Leu660Val zwar assoziiert sein könnte, gelangen aber zu keiner statistischen Signifikanz (OR=1,06; 95% CI: 0,97–1,15 für Heterozygote). Ähnlich wie beim Ovarialkarzinom weisen auch hier Details der Ergebnisse auf weiteren Aufklärungsbedarf hin. So zeigen Johnnatty et al. (2008), dass das Allel Leu660Val, betrachtet man es über alle Nichtträger, Heterozygoten und Homozygoten als Kontinuum, mit einem Allel-Dosiseffekt in Bezug auf das Mammakarzinomrisiko behaftet ist (OR=1,07; 95% CI: 1,02–1,13, p=0,01). Die Metaanalyse beinhaltet zudem stark abweichende Ergebnisse. Dies geht von Daten von Wang-Gohrke et al. (2000), die dem PROGINS-Haplotyp in einer Studie mit 554 Fällen und 559 Kontrollen einen protektiven Effekt in Bezug auf das Mammakarzinom zuschreiben (OR=0,76, 95% CI: 0,76-1,00) bis hin zu jenen von Romano et al. (2006), die dem PROGINS-Haplotyp in einer Studie mit 546 Patienten und 543 Kontrollen einen für das Mammakarzinom prädisponierenden Effekt zuschreiben (OR=1,3, 95% CI: 0,9-1,8, p=0,06).

3. Endometriose

In Bezug auf die Bedeutung des PROGINS-Haplotyps für die Prädisposition zur Endometriose scheint die Situation fast ebenso unklar wie im Zusammenhang mit Ovarialkarzinom und Mammakarzinom. Größere Metaanalysen fehlen hier gänzlich.

Die Tatsache, dass das PGR-Gen in Endometriosegewebe exprimiert wird (Nisolle et al. 1997) und das Expressionsmuster der beiden Isoformen von normalem Endometriumgewebe abweicht (Misao et al. 1999), legt eine Assoziation der Endometriose mit dem PROGINS-Haplotyp nahe. Doch auch hier fehlt es den vorliegenden Studien zu einer verlässlichen Aussage an Patienten und damit an *Power*. So widersprechen sich die Ergebnisse der bisher veröffentlichten Studien teilweise.

Wieser et al. (2002) beschreiben in einer Studie mit 95 Fällen und 107 Kontrollen eine signifikante Assoziation (OR=2,63, 95% CI: 1,3–5,2, p=0,004). Ein ähnliches Ergebnis berichten Lattuada et al. (2004) in einer Studie mit 131 Fällen und 127 Kontrollen (OR=1,7, 95% CI: 1,0-2,8). Auch wenn nun van Kaam et al. (2007) dieses Ergebnis nicht reproduzieren konnten (OR=1,49, 95% CI: 0,83–2,65, p=0,18), existieren zumindest keine gegensätzlichen Ergebnisse. Dies spricht dafür, dass derzeit die Endometriose als die Erkrankung angenommen werden muss, welche am ehesten als mit dem PROGINS-Haplotyp assoziiert angesehen werden kann.

Zu den bereits erwähnten Erkrankungen tritt eine Vielzahl anderer, für die ein Einfluss des PROGINS-Haplotyps vermutet und auch untersucht worden ist. Was jedoch für die gynäkologischen Krankheitsbilder vom Ovarialkarzinom bis zur Endometriose gilt, trifft für die weiteren untersuchten Erkrankungen umso mehr zu: Alle Assoziationen sind bisher in kleineren Studien untersucht worden und zu allen existiert nicht mehr als eine Studie, so dass es hier noch viel eher an verlässlichen Daten mangelt.

Zwar finden beispielsweise Ho et al. 2004 eine signifikante Assoziation zwischen Angststörungen und dem PROGINS-Haplotyp, jedoch darf vor dem Hintergrund der Patientenzahl von 72 und dem ausufernden Konfidenzintervall (95% CI: 1,7-6,9, OR=3,5, p=0,0009) sowie der Aussage der übrigen Studien und einer fehlenden Diskussion in folgenden Veröffentlichungen zum Thema an der Verlässlichkeit der Aussage gezweifelt werden.

Daten von Pijnenborg et al. (2005) in Bezug auf das Endometriumkarzinom oder Ehn et al. (2007) erscheinen zwar, wie einige der größeren Studien und Metaanalysen, ebenfalls vielversprechend, aber allein nicht vollständig aussagekräftig. Insgesamt also erscheint eine Untermauerung der vielen Verdachtsmomente bezüglich der Auswirkung der Einzelnukleotidpolymorphismen des PGR-Gens mit Hilfe verlässlicher funktioneller Daten wünschenswert, wenn nicht gar unerlässlich.

4.3 Ausblick

Die Klärung der Frage, inwieweit einzelne Polymorphismen des PGR-Gens zur Prädisposition auch zu nicht-gynäkologischen Erkrankungen in verschiedenen Konstellationen mit und ohne PROGINS-Insertion beitragen, ist in absehbarer Zeit aus den Daten der derzeit explodierenden Zahl genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) zu erwarten. DNA-Microarrays mit immer enger abbildendem Raster werden in naher Zukunft auch die wichtigsten Einzelnukleotidpolymorphismen des PGR-Genes mit erfassen. Dies wird sicherlich auch zunehmend bei Patienten mit jenen Erkrankungen zum Einsatz kommen, welche mit diesen Polymorphismen assoziiert sind. Da eine immer größere Zahl von Patienten und gesunden Probanden nahezu vollständig genotypisiert wird, sollte es bald möglich sein, Datenbanken mit diesen SNP-Daten zu nutzen, um eine Anzahl von Individuen mit nahezu jedem Phänotyp, mit nahezu jedem Genotyp in Bezug auf Kandidatengene abzugleichen und so Assoziationen fast beliebig aufzudecken.

Die heute vorliegenden Daten legen jedoch bereits heute einen funktionellen Effekt des PROGINS-Haplotyps und der mit ihm assoziierten Einzelnukleotidpolymorphismen nahe, auch wenn sie nicht alle völlig schlüssig erscheinen mögen.

Das vorliegende experimentelle Modell zur funktionellen Charakterisierung von Varianten des Progesteronrezeptors ist nicht nur geeignet, die fehlende Gesamtcharakteristik der Aktivität dieser Varianten unter verschiedenen Bedingungen zu ergänzen. Darüber hinausgehende charakterisierende Messungen einzelner Schritte der beteiligten Signalkaskade sind ebenfalls prinzipiell möglich. So können beispielsweise mit den in gleicher Menge unter gleichen Bedingungen exprimierten Rezeptorvarianten vergleichende Bindungsassays mit radioaktiv markierten Liganden durchgeführt werden.

Zur Klärung der seit langem diskutierten Frage, inwieweit die betrachteten, mit einem Aminosäureaustausch im Progesteronrezeptor einhergehenden Einzelnukleotidpolymorphismen des PGR-Gens funktionelle Konsequenzen nach sich ziehen, vermag das im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte experimentelle Modell hoffentlich entscheidend beizutragen.

5 Zusammenfassung

Kodierende Einzelnukleotidpolymorphismen können die Funktion eines Proteins beeinflussen und stellen dann oft vererbare Risikofaktoren für die verschiedensten Erkrankungen dar. Insbesondere in Genen, deren Produkte an zellzyklusregulierenden Prozessen beteiligt sind, können sie auch zu proliferativen Erkrankungen prädisponieren.

Der Progesteronrezeptor ist ein Beispiel eines zellzyklusregulierenden Proteins, in dessen Gen seit längerem Einzelnukleotidpolymorphismen bekannt sind, die mit einer intronischen Alu-Insertion gekoppelt sind. Bis heute ist unklar, ob diese zwei Varianten zu Funktionsunterschieden des Proteins führen und wenn ja, in welchem Ausmaß. Die Funktion des Rezeptors und die Tatsache, dass zwei von drei zum Haplotyp gehörigen Einzelnukleotidpolymorphismen die Aminosäuresequenz ändern, legt die Vermutung nahe, dass dieser Haplotyp zu Erkrankungen der weiblichen Reproduktionsorgane prädisponieren könnte. Klinische Studien konnten bisher keine eindeutige Antwort auf diese Frage liefern, auch wenn ein Einfluss auf Inzidenz und Schwere des Ovarialkarzinoms und insbesondere der Endometriose und habituellen Aborten wahrscheinlich ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein experimentelles System zu etablieren, mit dem die durch die kodierenden Einzelnukleotidpolymorphismen entstehenden unterschiedlichen Varianten des Progesteronrezeptors funktionell charakterisiert werden können. Im Vordergrund steht die Beantwortung der Frage, ob die verschiedenen Varianten des Progesteronrezeptors die Genexpression von Zielgenen in quantitativ oder qualitativ unterschiedlicher Weise beeinflussen. Darüber hinaus sollte das etablierte System zugleich zur Klärung von mechanistischen Detailfragen dienen können.

Zu diesem Zweck wurde für die zelluläre Überexpression beider bekannten Isoformen des Progesteronrezeptors A und B mit jeweils einem von beiden Einzelnukleotidpolymorphismen oder der Kombination beider Varianten jeweils ein Adenovirus generiert. Diese insgesamt acht Adenoviren enthalten die verschiedenen cDNA-Varianten hinter einem ubiquitär aktiven CMV-Promotor, der die Überexpression der Rezeptoren in einer Vielzahl von Geweben ermöglicht. Zusätzlich wird bicistronisch ein grün fluoreszierendes Protein exprimiert, was die erfolgreiche Transduktion von Zellen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar macht.

Da die Überexpressionsexperimente mit den Varianten des Rezeptors ohne Interferenz mit endogen vorhandenen Progesteronrezeptoren durchgeführt werden sollten, waren Zellen vonnöten, die diesen endogen nicht exprimieren. Daher wurde für die adenovirale Überexpression der Rezeptorvarianten die Mammakarzinom-Zelllinie T47D-Y gewählt. Als kritisch stellte sich heraus, das Expressionsniveau der acht Varianten exakt anzugleichen, da zu erwarten ist, dass mögliche Unterschiede in der Funktion der Varianten sich als quantitativ gering erweisen. Dadurch könnten bereits leichte Abweichungen des Rezeptor-Expressionsniveaus zu falsch positiven Ergebnissen bei der mRNA-Quantifikation PGR-regulierter Gene führen. Daher wurden die Viren in ihrer Konzentration gründlich titriert, Zielparameter war dabei zunächst die im Western-Blot gemessene Konzentration der Progesteronrezeptoren, die später per EIA erneut überprüft und angeglichen wurde. Zusätzlich wurden die Hormonbindungseigenschaften der Varianten durch Radioligandenbindungsexperimente untereinander verglichen. Für die eigentlich Kernfrage nach dem Effekt auf die Genexpression wurden quantitative rt-PCR-Reaktionen für die Messung der mRNA-Konzentration von 10 Genen optimiert, die bekanntermaßen unter besonders starker Transaktivierungs-, beziehungsweise -repressionsaktivität des Rezeptors stehen.

Der systematische Vergleich von mRNA-Konzentration, regulatorischer Aktivität, Protein-Konzentration und Hormonbindung lässt in Zukunft Aussagen über die mRNA-Stabilität und die Affinität und Bindungskapazität der Varianten zu. Das nun etablierte System zur funktionellen Charakterisierung von genetischen Varianten des Progesteronrezeptors wird in Zukunft hoffentlich dazu beitragen können, die Frage zu klären, ob tatsächlich funktionelle Unterschiede bestehen, welcher Mechanismus diesen Funktionsunterschieden der Varianten zugrunde liegt und ob mit einer klinischen Relevanz dieser Variabilität zu rechnen ist.

6 Literaturverzeichnis

- AgoulNIK IU, Tong XW, Fischer DC, Körner K, Atkinson NE, Edwards DP, Headon DR, Weigel NL, Kieback DG (2004) A germline variation in the progesterone receptor gene increases transcriptional activity and may modify ovarian cancer risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(12): 6340-7.
- Avery OT, MacLeod CM, McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J. Exp. Med.* 79:137–158.
- Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 440-447.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6): 1513-23.
- Bett AJ, Prevec L, Graham FL (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* 67: 5911-5921.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7; 72: 248-54.
- Clarke CL, Sutherland RL. (1990) Progesterin regulation of cellular proliferation. *Endocr. Rev.* 11(2): 266–301.
- Coulam CB, Jeyendran RS, Roussev R (2008) Association of progesterone receptor polymorphisms with recurrent implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer. *J. Assist. Reprod. Genet.* 25(4):119-22.
- Cramer A, Whitehorn EA, Tate E, Stemmer WP (1996) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol.* 14(3):315-9.
- D'Amora P, Maciel TT, Tambellini R, Mori MA, Pesquero JB, Sato H, Girão MJ, Guerreiro da Silva ID, Schor E (2009) Disrupted cell cycle control in cultured endometrial cells from patients with endometriosis harboring the progesterone receptor polymorphism PROGINS. *Am. J. Pathol.* Jul; 175(1): 215-24. Epub 2009 Jun 4.
- De Carvalho CV, Nogueira-De-Souza NC, Costa AM, Baracat EC, Girão MJ, D'Amora P, Schor E, da Silva ID (2007) Genetic polymorphisms of cytochrome P450c17alpha (CYP17) and progesterone receptor genes (PROGINS) in the assessment of endometriosis risk. *Gynecol. Endocrinol.* 23(1): 29-33.
- De Sousa Damião R, Fujiyama Oshima CT, Stávale JN, Gonçalves WJ (2007) Analysis of the expression of estrogen receptor, progesterone receptor and chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I in ovarian epithelial cancers and normal ovaries. *Oncol. Rep.* 18(1): 25-32.
- De Vivo I, Huggins GS, Hankinson SE, Lescault PJ, Boezen M, Colditz GA, Hunter DJ (2002) A functional polymorphism in the promoter of the progesterone receptor gene associated with endometrial cancer risk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99(19): 12263–12268.
- Doris PA (2002) Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease: common variant hypothesis. *Hypertension* 39(2 Pt 2): 323-31.
- Dussoix D, Arber W (1962) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 5:18-36.

- Fujii S, Akiyama M, Aoki K, Sugaya Y, Higuchi K, Hiraoka M, Miki Y, Saitoh N, Yoshiyama K, Ihara K, Seki M, Ohtsubo E, Maki H (1999) DNA replication errors produced by the replicative apparatus of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 289(4): 835-50.
- Govindan S, Ahmad SN, Vedicherla B, Kodati V, Jahan P, Rao KP, Ahuja YR, Hasan Q (2007) Association of progesterone receptor gene polymorphism (PROGINS) with endometriosis, uterine fibroids and breast cancer. *Cancer Biomark.* 3(2): 73-8.
- Graham JD, Clarke CL. (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 18(4): 502-19.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36(1): 59-74.
- Gronemeyer H. (1991) Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu. Rev. Genet.* 25: 89-123.
- Guiochon-Mantel A, Lescop P, Christin-Maitre S, Loosfelt H, Perrot-Appianat M, Milgrom E. (1991) Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J.* 10(12): 3851-9.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 3;95(5): 2509-14.
- Ho HP, Westberg L, Annerbrink K, Olsson M, Melke J, Nilsson S, Baghaei F, Rosmond R, Holm G, Björntorp P, Andersch S, Allgulander C, Eriksson E. (2004) Association between a functional polymorphism in the progesterone receptor gene and panic disorder in women. *Psychoneuroendocrinology* 29(9): 1138-41.
- Horwitz KB, Mockus MB, Lessey BA (1982) Variant T47D human breast cancer cells with high progesterone-receptor levels despite estrogen and antiestrogen resistance. *Cell.* 28(3): 633-42.
- Johnatty SE, Spurdle AB, Beesley J, Chen X, Hopper JL, Duffy DL, Chenevix-Trench G (2008) Progesterone receptor polymorphisms and risk of breast cancer: results from two Australian breast cancer studies. *Breast Cancer Res. Treat.* 109(1): 91-99.
- Joshi G, Pradhan S, Mittal B. (2009) Role of the oestrogen receptor (ESR1 PvuII and ESR1 325 C-->G) and progesterone receptor (PROGINS) polymorphisms in genetic susceptibility to migraine in a North Indian population. *Cephalalgia.* Aug 10 [Epub ahead of print].
- van Kaam KJ, Romano A, Schouten JP, Dunselman GA, Groothuis PG (2007) Progesterone receptor polymorphism +331G/A is associated with a decreased risk of deep infiltrating endometriosis. *Hum. Reprod.* 22(1): 129-35.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H (1990) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9(5): 1603-14.
- Lattuada D, Somigliana E, Viganò P, Candiani M, Pardi G, Di Blasio AM (2004) Genetics of endometriosis: a role for the progesterone receptor gene polymorphism PROGINS? *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 61(2): 190-4.
- Lee H, Sininger L, Jen JC, Cha YH, Baloh RW, Nelson SF (2007) Association of progesterone receptor with migraine-associated vertigo. *Neurogenetics.* 8(3): 195-200.
- Leite DB, Junqueira MG, de Carvalho CV, Massad-Costa AM, Gonçalves WJ, Nicolau SM, Lopes LA, Baracat EC, da Silva ID (2008) Progesterone receptor (PROGINS) polymorphism and the risk of ovarian cancer. *Steroids.* 73(6): 676-80.

- Li X, O'Malley BW (2003) Unfolding the action of progesterone receptors. *J. Biol. Chem.* 10; 278(41): 39261-4.
- Li X, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (2003). Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol. Cell. Biol.* (11): 3763-73.
- Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, Sharff KA, Luu HH, Haydon RC, Kinzler KW, Vogelstein B, He TC (2007) A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat. Protoc.* 2(5): 1236-47.
- Misao R, Iwagaki S, Fujimoto J, Sun W, Tamaya T (1999) Dominant expression of progesterone receptor form B mRNA in ovarian endometriosis. *Horm. Res.* 52(1): 30-4.
- Misrahi M, Venencie PY, Saugier-veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E (1993) Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1216(2): 289–92.
- Mo JY, Schaaper RM (1996) Fidelity and error specificity of the alpha catalytic subunit of Escherichia coli DNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* 271(31):18947-53.
- Modugno F (2004) Ovarian cancer and polymorphisms in the androgen and progesterone receptor genes: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 159(4): 319-35.
- Mooney S (2005) Bioinformatics approaches and resources for single nucleotide polymorphism functional analysis. *Brief. Bioinform.* 6(1): 44-56.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1:263-73.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1(7): 841–5.
- Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J (1997) Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil. Steril.* 68(5):912-9.
- Pearce CL, Wu AH, Gayter SA, Bayle AE, Beck BA, Beesley J, Chanock S, Cramer DW, DiCioccio R, Edwards R, Fredricksen ZS, Garcia-Closas M, Goode EL, Green AC, Hartmann LC, Hogdall E, Kjaer SK, Lissowska J, McGuire V, Modugno F, Moysich K, Ness RB, Ramus SJ, Risch HA, Sellers TA, Song H, Stram DO, Terry TL, Webb PM, Whiteman DC, Whittemore AS, Zheng W, Pharoah PDP, Chenevix-Trench G, Pike MC, Schildkraut J, Berchuck A (2008) Progesterone receptor variation and risk of ovarian cancer is limited to the invasive endometrioid subtype: results from the ovarian cancer association consortium pooled analysis. *British Journal of Cancer* 98(2), 282 – 288.
- Pepe GJ, Albrecht ED (1995) Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr. Rev.* 16(5): 608–48.
- Pijnenborg JM, Romano A, Dam-de Veen GC, Dunselman GA, Fischer DC, Groothuis PG, Kieback DG (2005) Aberrations in the progesterone receptor gene and the risk of recurrent endometrial carcinoma. *J. Pathol.* 2005 Apr; 205(5): 597-605.
- Rau et al. (1994) *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 120 suppl: R108.
- Reumers J, Schymkowitz J, Ferkinghoff-Borg J, Stricher F, Serrano L, Rousseau F (2005) SNPeffect: a database mapping molecular phenotypic effects of human non-synonymous coding SNPs. *Nucleic Acids Res.* 33: 527-532.

- Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB (2002) Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 277(7): 5209-18.
- Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R (1987) Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. *Hum. Genet.* 77(3): 280-2.
- Romano A, Delvoux B, Fischer DC, Groothuis P (2007) The PROGINS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. *J. Mol. Endocrinol.* 38(1-2): 331-50.
- Romano A, Lindsey PJ, Fischer DC, Delvoux B, Paulussen AD, Janssen RG, Kieback DG (2006) Two functionally relevant polymorphisms in the human progesterone receptor gene (+331 G/A and progins) and the predisposition for breast and/or ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 101(2): 287-95.
- Rowe SM, Coughlan SJ, McKenna NJ, Garrett E, Kieback DG, Carney DN, Headon DR (2002) Ovarian carcinoma-associated TaqI restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. *Cancer Res.* 1; 55(13): 2743-5.
- Sartorius CA, Groshong SD, Miller LA, Powell RL, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB (1994) New T47D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B- and A-receptors: only antiprogestin-occupied B-receptors are switched to transcriptional agonists by cAMP. *Cancer Res.* 15;54(14): 3868-77.
- Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB (1994) A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol. Endocrinol.* 8(10): 1347-60.
- Slotman BJ, Kühnel R, Rao BR, Dijkhuizen GH, de Graaff J, Stolk JG (1989) Importance of steroid receptors and aromatase activity in the prognosis of ovarian cancer: high tumor progesterone receptor levels correlate with longer survival. *Gynecol. Oncol.* 33(1): 76-81.
- Smith DF, Schowalter DB, Kost SL, Toft DO (1990) Reconstitution of progesterone receptor with heat shock proteins. *Mol. Endocrinol.* 4(11): 1704-11.
- Strähle U, Klock G, Schütz G (1987) A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 84: 7871-75.
- Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szere day L. (2001) Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int. Immunopharmacol.* 1(6): 1037-48.
- Taillon-Miller P, Gu Z, Li Q, Hillier L, Kwok PY (1998) Overlapping genomic sequences: treasure trove of single-nucleotide polymorphisms. *Genome Res.*, Vol. 8(7): 748-754.
- Towbin H, Au J, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 76(9):4350-4.
- Tsai MJ, O'Malley BW (1994) Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 451-86.
- Tung L, Abdel-Hafiz H, Shen T, Harvell DM, Nitao LK, Richer JK, Sartorius CA, Takimoto GS, Horwitz KB (2006) Progesterone receptors (PR)-B and -A regulate transcription by different mechanisms: AF-3 exerts regulatory control over coactivator binding to PR-B. *Mol. Endocrinol.* 20(11): 2656-70.

- Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP (1993) Human Progesterone Receptor A Form Is a Cell- and Promoter-Specific Repressor of Human Progesterone Receptor B Function. *Molecular Endocrinology* 7: 1244-1255.
- Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, Fareed GC, Richardson CC (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* 10; 243(17): 4543-55.
- Wieser F, Schneeberger C, Tong D, Tempfer C, Huber JC, Wenzl R. (2002) PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometriosis. *Fertil. Steril.* 77(2): 309-12.

7 Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Eschenhagen, nicht nur für die Überlassung des spannenden und vielseitigen Themas, sondern auch für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei der Durchführung und schriftlichen Abfassung der Arbeit.

Herrn Dr. Thomas Rau möchte ich für die hervorragende Betreuung der Arbeit danken, die gekennzeichnet war durch Fachkompetenz und auch durch ein sehr persönliches Verhältnis. Viele Stunden gemeinsamer Arbeit waren so nicht nur produktiv und lehrreich, sondern oft auch ungemein kurzweilig.

Ein großer Dank gilt allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie. Diese Arbeit wäre ohne ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft so sicher nicht möglich gewesen und ohne das unvergleichlich herzliche Arbeitsklima und die kontinuierliche moralische Unterstützung auch wesentlich schwieriger. Was praktische Unterstützung und die hervorragende Atmosphäre betrifft, möchte ich in diesem Zusammenhang besonders auch Angelika Piasecki und Nicola Peters hervorheben, die mir als technische Assistentinnen viele Labortechniken vertraut gemacht haben. Die Arbeit in diesem Institut hat mir bis heute viel Freude bereitet und ich habe über die Arbeit hinaus viele gute Freunde gewonnen, so dass ich die Zeit im Labor als außerordentliche Bereicherung gesehen habe und noch heute täglich sehe.

Für moralische Unterstützung im Labor und darüber hinaus möchte ich außerdem insbesondere meiner guten Freundin und Kollegin Jasmin Singh danken.

Ohne die aufopfernde Hilfe meiner Eltern Gisela und Bernd Stenzig und die guten Ratschläge meines Bruders Philipp Stenzig wäre diese Arbeit ohnehin nicht möglich gewesen. Bei ihnen möchte ich mich zum Abschluss für den großartigen familiären Rückhalt, das Vertrauen und nicht zuletzt für die Tatsache, dass sie mich überhaupt so weit gebracht haben, bedanken.

8 Lebenslauf

Justus Stenzig, geboren am 18.06.1980 in Hamburg, ledig
Eltern Dr. Bernd Stenzig und Gisela Stenzig, geborene Koch

Schulbildung

1985 - 1990	Grundschule Vahrendorf/ Niedersachsen
1990 - 1999	Friedrich-Ebert-Gymnasium in Hamburg-Hamburg, Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08.1999 - 07.2000	Zivildienst, Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe Allgemeines Krankenhaus Harburg, Hamburg
-------------------	---

Hochschulausbildung

10.2000 - 04.2001	Studium der Physik an der Universität Hamburg
04.2001 - 03.2003	Vorklinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
03.2003	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04.2003 - 11.2007	Klinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
08.2006 - 07.2007	Praktisches Jahr, Hamburg, Sion und Lausanne/Schweiz
11.2007	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Approbation

Berufstätigkeit

04.2008 - 10.2008	Assistenzarzt in der Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Asklepios Klinikum Altona, Hamburg
Seit 11.2008	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Experi- mentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

9 Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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: