

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Tübingen
Abteilung Toxikologie
Leiter: Professor Dr. M. Schwarz**

**Genexpressionsmuster nach Behandlung von Hepatomzellen
mit dem Cytokin TGF- β bzw. mit Tumorpromotoren**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Tanja Herckelrath
aus
Frankenthal/Pfalz**

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schwarz

2. Berichterstatter: Professor Dr. N. Blin

1	EINLEITUNG	1
1.1	Morphologische Charakteristika der Apoptose	1
1.2	Die Apoptose-Exekutionsmaschinerie	3
1.2.1	Rezeptorvermittelte Caspase-Aktivierung.....	4
1.2.2	Mitochondrial initiierte Caspase-Aktivierung.....	4
1.3	Zusammenhang zwischen Caspase-Aktivierung und morphologischen Zellveränderungen	5
1.4	Regulation der Apoptose	6
1.5	Dysregulation der Apoptose	8
1.6	Apoptose und Kanzerogenese	9
1.7	Die TGF-β-Superfamilie	11
1.7.1	TGF- β 1 und seine Interaktionen mit Transmembran-Rezeptoren....	12
1.7.2	Signaltransduktion durch Smad-Proteine.....	13
1.7.3	Regulation des TGF- β 1-Signalweges.....	14
1.8	TGF-β1-Wirkungen in der Leber	15
1.9	Aufgabenstellung	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien und Biochemikalien.....	21
2.1.2	Kunststoffmaterialien.....	23
2.1.3	Geräte.....	23
2.1.4	Reagenziensets.....	24
2.1.5	Zelllinie.....	26
2.1.6	Sonstige Hilfsmittel.....	27
2.2.	Methoden	27
2.2.1	Zellkulturarbeiten.....	27
2.2.1.1	Allgemeine Anmerkungen.....	27
2.2.1.2	Routinearbeiten.....	28
2.2.1.2.1	Das FTO-2B-Medium und seine Herstellung.....	28
2.2.1.2.2	Auftauen und Reaktivieren eingefrorener FTO-2B-Zellen.....	30
2.2.1.2.3	Waschen der Zellen.....	31

2.2.1.2.4	Medium-Wechsel.....	32
2.2.1.2.5	Trypsinieren der Zellen.....	33
2.2.1.2.6	Zellzählung.....	35
2.2.1.2.7	Aussäen von Zellen.....	36
2.2.1.2.7.1	Passagieren der Zellen.....	36
2.2.1.2.7.2	Aussäen einer definierten Zellzahl.....	37
2.2.1.2.8	Einfrieren von Zellen.....	37
2.2.1.3	Zellinkubation mit Apoptose-Hemmern und -Induktoren.....	38
2.2.1.3.1	Apoptoseinduktion mittels TGF- β 1.....	38
2.2.1.3.2	Behandlung von Zellen mit Apoptosehemmern.....	39
2.2.1.3.2.1	Verwendete Reagenzien und Lösungen.....	40
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	41
2.2.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA mit Trizol [®]	41
2.2.2.1.1	Verwendete Reagenzien und Lösungen.....	42
2.2.2.2	Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung.....	43
2.2.2.3	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	44
2.2.2.3.1	Herstellung eines Agarose-Gels.....	44
2.2.2.3.2	Probenauftrag.....	45
2.2.2.3.3	Gellauf.....	46
2.2.2.3.4	Analyse des Gels.....	47
2.2.2.3.5	Verwendete Reagenzien und Lösungen.....	49
2.2.2.4	DNase I-Verdau der mit Trizol [®] isolierten Gesamt-RNA.....	50
2.2.2.4.1	Verwendete Reagenzien und Lösungen.....	52
2.2.2.5	Reverse-Transkriptase-Reaktion.....	53
2.2.2.5.1	Verwendete Reagenzien und Lösungen.....	55
2.2.2.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	55
2.2.2.6.1	Verwendete Reagenzien und Lösungen.....	58
2.2.2.7	Hybridisierung, Exposition und Detektion von Atlas [™] Rat 1.2 und Atlas [™] Rat Stress Membranen.....	59
2.2.2.7.1	Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden.....	60
2.2.2.7.2	Reinigung der radioaktiv markierten cDNA mittels Säulenchromatographie.....	62
2.2.2.7.3	Bestimmung der bei der cDNA-Sondenmarkierung eingebauten Radioaktivitätsmenge.....	63

2.2.2.7.4	Hybridisierung der Membranen mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden	63
2.2.2.7.5	Verwendete Reagenzien und Lösungen.....	66
2.2.2.7.6	Exposition der Arrays.....	67
2.2.2.7.7	Strippen der Atlas™ Rat 1.2 und Atlas™ Rat Stress Arrays.....	68
2.2.2.7.7.1	Verwendete Reagenzien und Lösungen.....	69
2.2.2.7.8	Auswertung der Hybridisierungsergebnisse der Atlas™ Rat 1.2 und Atlas™ Rat Stress Arrays.....	69
3	ERGEBNISSE.....	75
3.1	Vorversuche.....	75
3.1.1	Optimierung der radioaktiven Markierung von cDNA-Sonden.....	75
3.1.2	Hybridisierungen mit ³³ P versus ³² P.....	76
3.2	Versuche mit Atlas™ Rat 1.2 Arrays.....	77
3.2.1	Vorbereitung der Versuchsreihen und Behandlung mit TGF-β1.....	77
3.2.2	RNA-Isolierung und DNase I-Verdau der Gesamt-RNA.....	78
3.2.3	Kontrolle der RNA-Qualität über PCR bzw. RT-PCR.....	82
3.2.4	Generierung radioaktiv markierter cDNA-Sonden.....	84
3.2.5	Hybridisierung und Exposition der Atlas™ Rat 1.2 Arrays.....	85
3.2.6	Auswertung der Hybridisierungsergebnisse.....	88
3.2.6.1	Auswertung I.....	88
3.2.6.2	Auswertung II.....	90
3.2.6.3	Vergleich der Auswertungen I und II.....	92
3.2.7	Vergleich der Kontrollautoradiogramme aller Versuchsreihen.....	94
3.2.8	Analyse der TGF-β1-Effekte durch Permutation der Kontrollen aus den verschiedenen Versuchsreihen.....	96
3.2.9	Einteilung der TGF-β1-regulierten Gene in Validitätsklassen.....	98
3.3	Versuche mit Atlas™ Rat Stress Arrays.....	101
3.3.1	Vorbereitung der Versuchsreihen und Behandlung mit Apoptosehemmern.....	101
3.3.2	RNA-Isolierung und DNase I-Verdau der Gesamt-RNA.....	102
3.3.3	Kontrolle der RNA-Qualität über PCR bzw. RT-PCR.....	105
3.3.4	Generierung radioaktiv markierter cDNA-Sonden.....	105

3.3.5	Hybridisierung und Exposition der Atlas™ Rat Stress Arrays.....	106
3.3.6	Auswertung der Hybridisierungsergebnisse.....	108
3.3.6.1	Vergleich der Kontroll-Autoradiogramme der drei Versuchsserien..	110
3.3.6.2	Genexpressionsmuster der verschiedenen Apoptosehemmer.....	110
4	DISKUSSION.....	115
4.1	Auswertung der mit den Expressions-Arrays erhaltenen Versuchsdaten.....	115
4.2	Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Microarray-Studien zu TGF-β1- induzierten Genexpressionsveränderungen in Hepatozyten.....	118
4.3	Welche der identifizierten Gene könnten für die Apoptoseinduktion durch TGF-β1 relevant sein?.....	121
4.4	Welche Gene könnten eine Hemmung der TGF-β1- induzierten Apoptose vermitteln?.....	124
4.5	Fazit.....	126
4.6	Ausblick.....	127
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	129
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	131
7	ANHANG.....	145
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	145
7.2	AtlasImage™ Gencodes mit zugehörigen Gennamen.....	146
7.2.1	Atlas™ Rat 1.2 Arrays.....	146
7.2.2	Atlas™ Rat Stress Arrays.....	147

1 EINLEITUNG

Die Apoptose ist eine phylogenetisch alte Form des aktiven Zelltodes mit der Aufgabe, überschüssige, beschädigte oder schädliche Zellen aus einem Organismus zu entfernen. Damit spielt sie als biologischer Regulationsprozess sowohl bei vielen physiologischen als auch pathophysiologischen Vorgängen eine Schlüsselrolle: Die Apoptose ist während der Zelldifferenzierung und Entwicklung eines Organismus beteiligt und garantiert im adulten Organismus im Zusammenspiel mit der Zellteilung die Gewebs- und Organhomöostase. Fehlfunktionen der normalen Kontrollmaschinerie rufen Fehlbildungen während der Embryogenese hervor und führen zum Auftreten verschiedenster Krankheitsbilder (Wyllie, 1980; Ellis *et al.*, 1991; Jacobson *et al.*, 1997).

1.1 Morphologische Charakteristika der Apoptose

Die Definition der Apoptose beruht auf einer morphologischen Basis und beinhaltet das Auftreten folgender charakteristischer Phänomene: Ausstülpungen der Plasmamembran, Kondensation des Chromatins an der Kernmembran, Kondensation des Cytoplasmas, Fragmentierung von Kern und Zelle und die damit verbundene Bildung von apoptotischen Körperchen, die im Anschluss von benachbarten Zellen aber auch von Gewebsmakrophagen phagozytiert und degradiert werden. Während der frühen Phase der Apoptose bleiben die Zellorganellen einschließlich der Plasmamembran intakt, so dass keine zellulären Inhaltsstoffe freigesetzt und demzufolge auch keine entzündlichen Prozesse hervorgerufen werden (Kerr, 1971; Kerr *et al.*, 1972; Bursch *et al.*, 1985; Schulte-Hermann *et al.*, 1995; Wyllie *et al.* 1980).

Aufgrund dieser Charakteristika lässt sich die Apoptose von der Nekrose, dem unphysiologischen Zelltod, der auf schwere Zellschädigungen hin auftritt, abgrenzen. Die grundlegenden Unterschiede beider Todesarten sind einander in Tabelle 1.1 gegenübergestellt. Trotzdem ist es nicht immer trivial zwischen Apoptose und Nekrose zu unterscheiden, da in Abhängigkeit von Art und Aus-

maß einer Zellschädigung beide Todesformen auch neben- oder nacheinander vorliegen können (Lennon *et al.*, 1991; Feldmann, 1997; Patel *et al.*, 1998; Schulte-Hermann *et al.*, 1995 und 1997).

Tabelle 1.1: Gegenüberstellung der Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose

Apoptose	Nekrose
physiologisch und pathologisch	nur pathologisch
reguliert	unreguliert
Zellschrumpfung verbunden mit Ab- rundung, Kern- und Cytoplasmakon- densation, Bildung apoptotischer Kör- perchen und Phagozytose durch be- nachbarte Zellen	Zellschwellung und -platzen
cytoplasmatische Organellen bleiben intakt	cytoplasmatische Organellen in Auflösung
es treten keine Entzündungs- reaktionen auf	Entzündungsreaktionen mit Vernarbungen
Energiemetabolismus intakt, Gen- transkription und Proteinsynthese involviert	Energiemetabolismus gestoppt, Gen- transkription und Proteinsynthese nicht nötig
früh im Geschehen auftretende spezi- fische DNA-Fragmentierung durch apoptoseassoziierte DNAsen („DNA- Leiter“)	zufällige Spaltung der DNA als späte Konsequenz der Freisetzung lysoso- maler Enzyme

Die Apoptose kann durch vielfältige Stimuli aus dem intra- und extrazellulären Milieu getriggert werden. In der Leber führen z. B. verschiedene Cytokine wie *Transforming growth factor-beta1* (TGF- β 1), Aktivine, *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) oder der Fas (APO-1, CD95)-Ligand zur Apoptoseinduktion. Dieselben Auswirkungen können Intoxikationen, der Entzug von Lebermitogenen oder Wachstumsfaktoren sowie DNA-schädigende Ereignisse hervorrufen (Schulte-Hermann *et al.*, 1995; Kanzler und Galle, 2000).

1.2 Die Apoptose-Exekutionsmaschinerie

Unabhängig vom auslösenden Stimulus spielen Caspasen eine zentrale Rolle bei der Ausführung der Apoptose. Die Caspasen, von denen mittlerweile vierzehn bekannt sind, bilden eine Familie spezifischer Cysteinproteasen, welche bevorzugt nach Aspartat-Resten schneiden (Thornberry *et al.*, 1998). Caspasen werden als katalytisch weitgehend inaktive Zymogene synthetisiert, die durch proteolytische Prozessierung in reife Enzyme überführt werden, welche als Heterotetramere aus jeweils zwei großen (20 kDa) und zwei kleinen (10 kDa) Untereinheiten bestehen. Grundsätzlich lassen sich die am aktiven Zelltod beteiligten Caspasen in zwei Kategorien einteilen, die Initiator-Caspasen, die v. a. bei der Einleitung der Apoptose involviert sind (Caspase 2, 8, 9 und 10) sowie die Effektor-Caspasen, welche für die proteolytische Spaltung eines breiten Spektrums zellulärer Ziele verantwortlich sind (Caspasen 3, 6 und 7). Initiator-Caspasen sind durch eine ausgedehnte, über 90 Aminosäuren umfassende N-terminale Prodomäne charakterisiert, wohingegen die Prodomänen der Effektor-Caspasen aus nur wenigen Aminosäure-Resten bestehen. Die Natur der Prodomäne korreliert mit der Art der Aktivierung der Caspasen, die i. A. über eine Caspasekaskade erfolgt, innerhalb derer die Effektor-Caspasen durch Initiator-Caspasen proteolytisch gespalten und somit in die mature Form überführt werden. Die Initiator-Caspasen selbst durchlaufen eine autokatalytische Aktivierung, welche durch Oligomerisierung aufgrund von Interaktionen ihrer Prodomäne mit anderen Proteinen ausgelöst wird (Budihardjo *et al.*, 1999; Earnshaw *et al.*, 1999; Chang und Yang, 2000; Fesik und Shi, 2001; Shi, 2002). Abhängig von der Art des Apoptosestimulus kann dazu ein extrinsischer, über die Aktivierung spezifischer Todesrezeptoren ausgelöster oder ein intrinsischer, durch Störung der intrazellulären Homöostase vermittelter Weg beschritten werden (Ashkenazi und Dixit, 1998; Ferri und Kroemer, 2001).

1.2.1 Rezeptorvermittelte Caspase-Aktivierung

Transmembranrezeptoren aus der TNF-Rezeptor-Superfamilie wie z. B. Fas (APO-1, CD95), TNFR1, D3, D4 oder D5 sind in der Lage, nach Bindung ihrer spezifischen Liganden die apoptotische Caspasekaskade zu initiieren (Ashkenazi und Dixit, 1999; Schmitz *et al.*, 2000; Strasser *et al.*, 2000; Krammer, 2000). Am Beispiel des Fas-Rezeptors, der in vielen Geweben exprimiert wird und sehr gut untersucht ist, soll im Folgenden die Aktivierung der Schlüssel-Initiator-Caspase für todesrezeptorvermittelte Wege, der Caspase-8, beschrieben werden: Durch Bindung des Fas-Liganden wird eine Homotrimerisierung des Fas-Rezeptors ausgelöst (Chan *et al.*, 2000; Siegel *et al.*, 2000). Daraufhin rekrutiert die cytoplasmatische Region des Fas-Rezeptors, welche eine sog. *death domain* (DD) enthält, ein cytosolisches Adaptermolekül, das FADD (*Fas-associated protein with death domain*), welches über seine am C-Terminus gelegene DD-Domäne an den Rezeptor bindet. Über die im N-Terminus enthaltene *death effector domain* (DED) interagiert FADD mit den beiden in der Prodomäne der Procaspase-8 gelegenen DED-Domänen und rekrutiert dadurch das Zymogen an den Rezeptor. Dieser aus dem trimerisierten Rezeptor, FADD und der Procaspase-8 gebildete Komplex wird DISC (*death inducing signaling complex*) genannt und bietet die Umgebung, in der Oligomerisation sowie autokatalytische Prozessierung der Procaspase-8 erfolgen (Chang und Yang, 2000; Krammer, 2000).

1.2.2 Mitochondrial initiierte Caspase-Aktivierung

Viele Stimuli, die Apoptose triggern, ohne einen Todesrezeptor zu aktivieren, verursachen den Austritt von Cytochrom c (Cyt c) aus den Mitochondrien ins Cytosol. Das freigesetzte Cyt c bindet an das Adaptermolekül Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor-1*), ein 130 kDa schweres Protein mit einer N-terminalen CARD-Domäne (*caspase recruitment domain*), zwei Walker-Nukleotidbindungsmotiven und einer C-terminalen Region, die mehrere *WD-40 repeats*

für intrazelluläre Liganden wie das Cyt c enthält. Die Bindung von Cyt c an Apaf-1 erhöht dessen Affinität für dATP/ATP um mehr als das Zehnfache. Die nachfolgende Anlagerung des dATP/ATPs führt zu einer stabilen Konformationsänderung des Apaf-1 und triggert die Bildung eines heptameren Apaf-1-Cyt c-Komplexes. Im Zentrum dieses Komplexes liegen sieben CARD-Domänen, über welche sieben Caspase-9 Proenzyme über deren in ihrer Prodomäne gelegene CARD-Region rekrutiert werden. Das auf diese Art und Weise gebildete Apoptosom ermöglicht die Autoprozessierung von Caspase-9 und steigert deren katalytische Aktivität um mehr als das Tausendfache. Erst diese Aktivitätssteigerung befähigt die Caspase-9 dazu, die Effektor-Caspasen-3 und -7 zu aktivieren, welche dazu ins Apoptosom rekrutiert werden (Jiang und Wang, 2000; Bratton *et al.*, 2001; Acehan *et al.*, 2002).

1.3 Zusammenhang zwischen Caspase-Aktivierung und morphologischen Zellveränderungen

Die Aktivierung von Initiator-Caspasen triggert eine Kaskade nachfolgender Caspase-Aktivierungen, wodurch ein Todesstimulus amplifiziert und verstärkt wird: So prozessiert Caspase-8 die Procaspase-3, welche wiederum Procaspase-6 aktiviert. Von der Caspase-9 ausgehend werden der Reihe nach die Proformen der Caspasen-3, -7 und -6 in die maturen Enzyme überführt. Die genannten Kaskaden stellen ein vereinfachtes Schema eines außerordentlich komplexen Netzes von Interaktionen zwischen den Caspasen selbst und anderen regulatorischen Molekülen dar, denn die Caspase-3 ist z. B. auch in der Lage, die Procaspase-9 zu aktivieren, genauso wie die Caspase-6 zur Aktivierung der Caspase-3 fähig ist (Chang und Yang, 2000; Shi, 2002). Zusätzlich gibt es Vernetzungen zwischen dem Rezeptor- und dem Cyt-c-vermittelten Weg, die über Bid, ein proapoptotisches Mitglied aus der Bcl-2-Familie, vermittelt werden. Aus diesem zunächst cytosolisch vorliegenden Protein wird durch die Caspase-8 das C-terminale Fragment tBid (*truncated Bid*) abgespalten, das daraufhin zum Mitochondrium transloziert und dort zur Cyt c-Ausschüttung und

Freisetzung weiterer Apoptose-fördernder Proteine führt (Li *et al.*, 1998; Lou *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1999). Dadurch wird das Todessignal in Zellen effektiv amplifiziert.

Die aktivierten Effektor-Caspasen spalten eine Vielzahl intrazellulärer Polypeptide, einschließlich struktureller Elemente des Cytoplasmas und Nukleus, Komponenten der DNA-Reparationsmaschinerie sowie eine Anzahl Proteinkinasen und andere Proteine, die in Signalwegen involviert sind (Stroh und Schulze-Osthoff, 1998). Zusammengenommen werden dadurch Überlebenswege unterbrochen und die architektonische Struktur der Zelle zerstört, wodurch die für die Apoptose typischen morphologischen Veränderungen hervorgerufen werden. Beispiele hierfür sind Membranausstülpungen und cytoplasmatische Veränderungen, die durch eine Caspase-3-initiierte Spaltung von Aktin und Gelsolin vermittelt werden. Die Caspase-3-bedingte Spaltung von Fodrin und FAK (*focal adhesion kinase*) führt zur Zellschrumpfung und Ablösung von Nachbarzellen und das Schneiden von Lamin A und B₁ durch Caspase-6 löst die Fragmentierung des Zellkerns aus (Chang und Yang, 2000). Auch die apoptosespezifische DNA-Spaltung, die zum Auftreten sog. DNA-Leitern führt, beruht direkt auf einer Aktivierung von Caspasen. Es wurde nachgewiesen, dass die hierfür verantwortliche DNase CAD (*caspase-activated DNase*) normalerweise in einem Komplex mit ICAD (*inhibitor of CAD*) vorliegt, wodurch CAD in einem inaktiven Zustand im Cytosol gehalten wird. Unter apoptotischen Bedingungen wird ICAD durch Caspase-3 geschnitten, woraufhin sich ICAD von der CAD löst, die nun aktive DNase in den Kern wandert und dort die chromosomale DNA degradiert (Enari *et al.*, 1998; Sakahira *et al.*, 1998; Wyllie 1998).

1.4 Regulation der Apoptose

Der große Vorteil bei der Verwendung eines proteolytischen Systems wie das der Caspasen zur Durchführung der Apoptose liegt in seiner Effizienz und Schnelligkeit, mit der es den Zelltod herbeiführt. Gleichzeitig birgt es aber die Gefahr in sich, dass eine Zelle ungewollt stirbt, wenn es zu einer akzidentiellen

Caspasen-Aktivierung kommt. Deshalb wird diese auf mehreren Ebenen durch verschiedenste zelluläre Prozesse reguliert, von denen im Folgenden einige skizziert werden.

a) Regulation auf Todesrezeptorebene

Die Fas-Rezeptor-getriggerte Caspase-Aktivierung wird zum einen am Rezeptor selbst kontrolliert, indem ohne ligandenabhängige Rezeptor-Trimerisierung keine hochaffinen Bindungsstellen für DD-Domänen vorliegen, die für die Bildung des DISC Voraussetzung sind, zum anderen verhindert das Vorliegen von FLIP (*FLICE-inhibitor protein*) im DISC die Bindung und Aktivierung der Caspase-8 (Chang und Yang, 2000).

b) Regulation durch Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie

Eine wichtige Regulationsstufe der mitochondrial vermittelten Caspase-Aktivierung ist das Ausmaß der Cyt c-Freisetzung aus den Mitochondrien, welches durch Proteine der Bcl-2-Genfamilie reguliert wird. Mitglieder dieser Familie wirken entweder proapoptotisch, wie z. B. Bax und Bad, oder antiapoptotisch, wie z. B. Bcl-2 oder Bcl-x_L (Zamzami *et al.*, 1998; Cory und Adams, 2002). Da viele dieser Proteine in der äußeren Mitochondrienmembran verankert sind oder während der Apoptose dahin translokalisiert werden, besagt die momentan vorherrschende Theorie, dass die Bcl-2-Familienmitglieder entweder selbst Poren in der Mitochondrienmembran bilden oder vorhandene Kanäle durch ihre Einwirkung derart beeinflusst werden, dass Cyt c austreten kann oder zurückgehalten wird (Kroemer *et al.*, 1997; Green und Reed, 1998; Marzo *et al.*, 1998; Chang und Yang, 2000). Da pro- und antiapoptotische Vertreter mit- oder untereinander Homo- und Heterodimere bilden können und sich dadurch in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussen, ist das in der Zelle vorliegende Verhältnis zwischen Apoptose-fördernden und -hemmenden Proteinen für die zelluläre Antwort von zentraler Bedeutung (Strasser *et al.*, 2000; Wang, 2001; Wei *et al.*, 2001).

c) Regulation durch Mitglieder der IAP-Proteinfamilie und durch das Protein Smac/DIABLO

Eine weitere Familie evolutionär konservierter Proteine, die an der Regulation der Caspasen beteiligt ist, stellen die IAP-Proteine (*inhibitor of apoptosis proteins*) dar, die in der Lage sind, mit den Caspasen-3, -7 und -9 zu interagieren und deren enzymatische Aktivität zu hemmen (Shi, 2002). Demzufolge kann beim Vorliegen einer hohen Konzentration an IAPs sowohl der mitochondriale als auch partiell der Todesrezeptor-vermittelte Apoptoseweg unterbrochen werden. Die durch IAPs vermittelte Inhibition kann durch Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI*) antagonisiert werden, indem IAP-Proteine durch Bindung an Smac/DIABLO abgefangen werden und somit nicht mehr für eine Interaktion mit Caspasen zur Verfügung stehen. Smac/DIABLO wird auf einen entsprechenden Apoptosestimulus hin zusammen mit Cyt c aus dem mitochondrialen Intermembranspalt ins Cytosol entlassen (Du *et al.*, 2000; Verhagen, *et al.*, 2000). Weil Smac/DIABLO ein viel größeres Molekül als Cyt c ist, erscheint seine zufällige Leckage aus dem mitochondrialen Intermembranspalt eher unwahrscheinlich; deshalb bietet das beschriebene Netz aus Wechselwirkungen ein Sicherheitssystem gegen das Anlaufen der Apoptose aufgrund zufälligen oder transienten Austretens von Cyt c aus den Mitochondrien.

1.5 Dysregulation der Apoptose

Aufgrund der zentralen Rolle, welche die Apoptose in der Entwicklung und der Homöostase eines multizellulären Organismus spielt, ist es nicht verwunderlich, dass Fehlregulationen zu schwerwiegenden pathologischen Konsequenzen führen (Horvitz, 1999; Jacobson *et al.*, 1997). Erhöhte Apoptoseraten zeigen sich z. B. bei viral bedingten Leiden wie AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) oder verschiedenen degenerativen Erkrankungen wie der Retinopathia pigmentosa am Auge, der Amyotrophen Lateralsklerose, spinocerebellären Ataxie, Chorea Huntington, Morbus Parkinson oder Alzheimer Demenz beim Befall

des Nervensystems. In der Leber treten die autoimmune chronische Hepatitis, die Alkohol-induzierte Hepatitis, verschiedene Virushepatitiden, die primär sklerosierende Cholangitis, die primäre biliäre Zirrhose, der Morbus Wilson und das ischämische Reperfusionstrauma auf (Thompson, 1995; Friedlander, *et al.*, 1997; Davidson und Steller, 1998; Patel *et al.*, 1998; Ona *et al.*, 1999; Martin, 1999; Yuan und Yankner, 2000). Genauso fatal sind die Folgen, wenn eine Suppression der Apoptose vorliegt. Dadurch kommt es z. B. zu Beeinträchtigungen in verschiedenen Funktionsbereichen des Immunsystems, womit Krankheiten wie das ALPS (*autoimmune lymphoproliferative syndrome*), die rheumatoide Arthritis und wahrscheinlich auch die Multiple Sklerose verbunden sind (Carson und Tan, 1995; Rieux-Laucat *et al.*, 1995; Furlan *et al.*, 1999). Des Weiteren begünstigt eine vermindert ablaufende Apoptose die Entstehung von Neoplasien in verschiedenen Organen. In der Leber sind aufgrund fehlregulierter Apoptoseabläufe das cholangiozelluläre und das hepatozelluläre Karzinom bekannt. (Schulte-Hermann *et al.*, 1995; Patel *et al.*, 1998; Hanahan und Weinberg, 2000).

1.6 Apoptose und Kanzerogenese

Die Entwicklung von Tumoren erfolgt nach heutigem Kenntnisstand in einem mehrstufigen Prozess, der sich mechanistisch in die Stufen Initiation, Promotion und Progression untergliedern lässt (siehe Abbildung 1.1). Auf diese Abläufe haben Karzinogene, die in tumorinitiierende (krebsauslösende) und -promovierende (krebsfördernde) Stoffe eingeteilt werden, entscheidenden Einfluss. Im ersten Schritt, der Initiation, werden normale Zellen durch spontan auftretende oder durch Initiatoren ausgelöste Mutationen in kritischen Genen wie den Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen in Tumorvorläuferzellen überführt (Evan und Littlewood, 1998; Schwarz und Bock, 1998). Diese initiierten Zellen, die sich in ihrem Erscheinungsbild nicht von benachbarten normalen Zellen unterscheiden, wachsen in der Promotionsphase zu morphologisch erkennbaren, präneoplastischen Läsionen (Foci) heran, wobei die Wachstumsgeschwindigkeit

keit der Läsionen entscheidend von der Zellteilungs- und Apoptoserate der zugrunde liegenden Zellen abhängt. In Versuchen zur Hepatokanzerogenese in Ratten wurde gezeigt, dass die DNA-Syntheserate und die damit verbundene Zellteilung in präneoplastischen Leberherden im Vergleich zu Normallebergewebe bis auf das Zehnfache gesteigert sind. Trotz dieser erhöhten Zellteilungsrate wiesen die Leberherde zumindest in der frühen Phase der Kanzerogenese kein oder nur ein geringes Wachstum auf. Die Erklärung für dieses Phänomen fand sich in dem Nachweis, dass die Apoptoserate in solchen Leberläsionen ebenfalls deutlich erhöht ist (Grasl-Graupp *et al.*, 1994). Tumorpromotoren wie z. B. Phenobarbital sind während der Promotion in der Lage, selektiv die Proliferationsgeschwindigkeit von Tumovorläuferzellen zu steigern, indem sie ihre Zellteilungsrate erhöhen, ihre Elimination durch Apoptose einschränken oder beide Parameter beeinflussen. Das Auftreten weiterer Mutationseignisse in einzelnen Zellen innerhalb der präneoplastischen Leberherde führt wiederum in Abhängigkeit vom Wachstums- und Absterbeverhalten der Zellen zunächst zur Entstehung benigner Tumoren. Die Entwicklung zu malignen Geschwülsten und die Zunahme an Autonomie und Metastasierungspotential der Tumorzellen erfolgt im letzten Abschnitt der Kanzerogenese und wird als Progression bezeichnet (Bursch *et al.*, 1992; Schulte-Hermann *et al.*, 1995; Schwarz *et al.*, 1995).

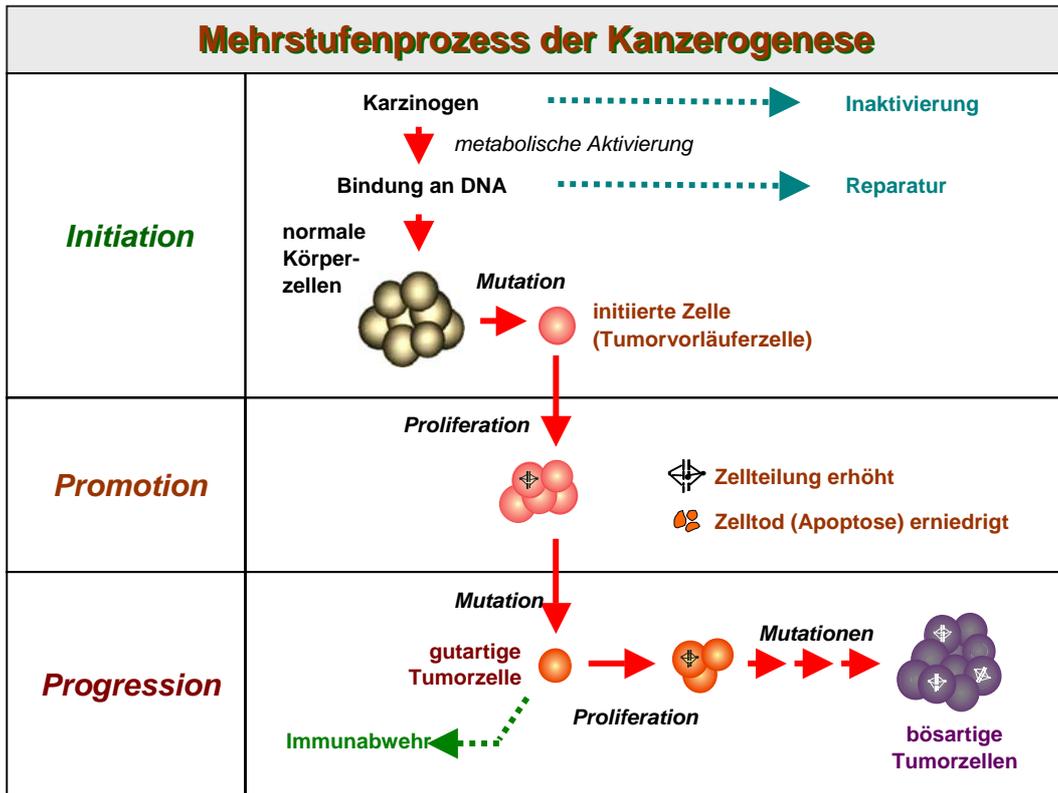


Abbildung. 1.1: Kanzerogenesemodell

1.7. Die TGF-β-Superfamilie

Transforming-growth-factor-beta-1 (TGF-β1) ist ein Mitglied der TGF-β-Superfamilie, zu der u. a. die TGF-β-Cytokine, *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *growth and differentiation factors* (GDF) und Aktivine gehören (Kingsley, 1994; Massagué, 1998). Durch diese multifunktionalen Proteine werden eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie z. B. Zellzykluskontrolle, Apoptoseinduktion, Aufbau der extrazellulären Matrix, Regulation der Zelldifferenzierung, Hämatopoese, Angiogenese, Chemotaxis Wundheilung und Immunfunktionen gesteuert (Massagué *et al.*, 1990; Schuster und Kriegstein, 2002). Generell werden diese Effekte durch Bindung der Cytokine an spezifische Transmembranrezeptoren vermittelt, welche, wie nachfolgend für TGF-β1 ausführlich beschrieben, ihre Signale über Aktivierung sog. Smad-Proteine (Smad für Sma- und Mad-homologes Protein, Sma = small body size, Mad = Mother against decapentaplegic) in den Kern weiterleiten und dort zur transkriptionellen Aktivierung oder Inhibierung entspre-

chender responsiver Gene führen. Trotz dieses allgemein gültigen Wirkprinzips wird die jeweils durch ein bestimmtes Cytokin hervorgerufene Zellantwort durch ein kompliziertes regulatorisches Netzwerk festgelegt. Sie ist u. a. abhängig von der jeweils vorliegenden Rezeptor-Kombination, der dadurch determinierten Smad-Auswahl, der Rekrutierung weiterer Proteine, durch die eine zusätzliche Zielgenspezifisierung erzielt werden kann, und nicht zuletzt vom Zelltyp und -kontext (Derynck und Zhang, 2003; Massagué, 2000).

1.7.1 TGF- β 1 und seine Interaktionen mit Transmembran-Rezeptoren

TGF- β 1 ist die am häufigsten in Säugerzellen exprimierte TGF- β -Isoform und gilt als Prototyp der TGF- β -Superfamilie. In mesenchymalen Zellen ist dieses Cytokin wachstumsstimulierend wirksam, während es in vielen epithelialen Zelltypen in der Lage ist, Wachstumsarrest zu induzieren und Apoptose auszulösen (Schuster und Krieglstein, 2002). Synthetisiert wird TGF- β 1 als inaktive Proform, die in einem Komplex mit spezifischen Bindungsproteinen sezerniert wird. Aus diesem Proteinkomplex wird die aktive Form, ein homodimeres Protein, in einem komplexen proteolytischen Prozess freigesetzt (Gleizes *et al.*, 1997; Rifkin *et al.*, 1997; Koli *et al.*, 2001). Aktiviertes TGF- β bindet an der Zelloberfläche an TGF- β -Typ II-Rezeptoren (T β R-II) und löst dadurch die Bildung eines tetrameren Rezeptor-Komplexes, der je ein TGF- β -Typ I-Rezeptor (T β R-I)- und T β R-II-Homodimer enthält, aus (Lu und Lodish, 1996). Beide T β R-Typen sind Glykoproteine mit einem kurzen extrazellulären Abschnitt, einer einzelnen Transmembranregion und einer cytoplasmatischen Domäne mit Serin/Threonin-Kinaseaktivität, unterscheiden sich aber in Größe, Molekulargewicht und Struktur. Der konstitutiv aktivierte T β R-II ist zwar in der Lage, TGF- β 1 zu binden, kann das Transduktionssignal aber nicht ohne den T β R-I weiterleiten. T β R-I liegt in einer zunächst inaktiven Konformation vor, in der eine sog. GS-Domäne seine Kinaseaktivität blockiert. Nach Ligandenbindung und Bildung des T β R-I/II-Komplexes kann der T β R-II aufgrund der engen räumlichen Nähe die GS-Domäne des T β R-I phosphorylieren, woraufhin diese das katalytische Zentrum

des T β R-I freigibt und ihn zur Interaktion mit seinen Substraten, den Smad-Proteinen, befähigt (Rich *et al.*, 2001).

1.7.2 Signaltransduktion durch Smad-Proteine

Smad-Proteine sind die direkten Substrate des aktivierten TGF- β -Rezeptorkomplexes, über welche die durch TGF- β 1 hervorgerufenen transkriptionellen Effekte vermittelt werden. In Abhängigkeit von Struktur und Funktion werden die Smad-Proteine in drei Gruppen unterteilt: die Rezeptor-spezifischen (R-Smads), die gemeinsamen (Co-Smads, „Co“ für *common*) und die inhibitorischen (I-Smads) Smads. Alle Smad-Proteine besitzen konservierte MH-Domänen (Mad homologe Domänen), die für verschiedene Smad-Funktionen wichtig sind. Eine sog. MH1-Domäne mit DNA-Bindungsaktivität liegt bei den R- und Co-Smads am N-Terminus. Die C-terminale MH2-Region findet sich bei allen Smads und vermittelt die Fähigkeit, an Rezeptoren zu binden, Oligomere zu formen, mit Co-faktoren zu interagieren und die Transkription zu beeinflussen. Solange der TGF- β 1-Signalweg ausgeschaltet ist, interagieren die MH1- und -2-Domänen eines Smad-Proteins miteinander und halten es so in einem inaktiven Zustand. Verknüpft werden die MH1- und -2-Domänen jeweils durch eine prolinreiche aber variable Verbindungsregion, die viele regulatorische Stellen wie z. B. Erkennungssequenzen für Ubiquitinligasen und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen enthält (Massagué und Chen, 2000; Massagué, 2000; Derynck und Zhang, 2003).

Der aktivierte T β R-I rekrutiert wahlweise die R-Smads 2 oder 3 und phosphoryliert die beiden letzten Serinreste ihrer am äußersten C-Terminus gelegenen SSXS-Sequenz. Dies induziert eine Konformationsänderung der Proteine, so dass ihre autoinhibitorische MH1-MH2-Domänen-Interaktion aufgehoben wird, wodurch die Smads vom Rezeptor abdissoziieren und oligomere Komplexe mit dem Co-Smad4 bilden, die dann in den Kern translozieren (Rich *et al.*, 2001). Da alle über den TGF- β -Signalweg aktivierten Smads mit ihrer MH1-Domäne die Nukleotidsequenz CAGAC erkennen und diese nur mit geringer Affinität

binden, ist die Interaktion der Smad-Komplexe mit der DNA per se nicht sonderlich selektiv und stabil (Shi *et al.*, 1998). Deshalb rekrutieren die Smad-Komplexe DNA-bindende Cofaktoren, mit deren Hilfe sowohl die Affinität zur DNA als auch die Spezifität der Erkennung regulatorischer Elemente in Zielgenen gesteigert werden. Zu diesen Cofaktoren gehören u. a. die als reine Adapter fungierenden Proteine FAST (*forkhead activin signal transducer*) und Mixer sowie verschiedene andere als Transkriptionsfaktoren bekannte Proteine wie z. B. AP-1/Jun-Fos oder TFE3 (transkription factor binding to immunoglobulin heavy constant mu enhancer 3) (Massagué und Chen, 2000).

Neben diesen Cofaktoren assoziieren die R/Co-Smad-Komplexe auch noch mit transkriptionellen Coaktivatoren und -repressoren. Zu den bekannten Transkriptionsaktivatoren gehört CBP/p300 (*CREB-binding protein*, CREB steht für *cyclic AMP-regulated enhancer-binding protein*), die Corepressoren schließen u. a. TGIF (*TG3-interacting factor*), SKI (*Sloan-Kettering Institute proto-oncogene*) und SnoN (*Ski-related novel gene N*) ein (Sun *et al.*, 1999; Wotton *et al.*, 1999). Je nachdem welche Cofaktoren, -aktivatoren und -repressoren in einer Zelle vorliegen, kann die durch TGF- β 1 hervorgerufene Genantwort in Abhängigkeit von Zellkontext und -typ sehr unterschiedlich ausfallen.

1.7.3 Regulation des TGF- β 1-Signalweges

Aufgrund der zentralen Stellung der Smad-Proteine bei der TGF- β 1-Signaltransduktion ist es nicht verwunderlich, dass ihre Aktivität auf mehreren Stufen geregelt wird. Nachfolgend sollen einige dieser Regulationsmöglichkeiten beispielhaft vorgestellt werden. Eine wichtige Rolle spielen die I-Smads, welche die Signaltransduktion durch R- und Co-Smads unterbrechen können. So verhindert z. B. das inhibitorische Smad7 die Rekrutierung und Phosphorylierung von R-Smads, indem es den T β R-I besetzt. Während die R- und Co-Smads in den meisten Zellen kontinuierlich exprimiert vorliegen, ist die Expression der I-Smads streng geregelt. Sie ist u. a. durch extrazelluläre Faktoren beeinflussbar und kann z. B. auch durch TGF- β 1 selbst induziert werden, wodurch ein autoin-

hibitorischer Rückkopplungsmechanismus ausgelöst wird (Massagué 2000; Stopa *et al.*, 2000). Die Lokalisation von R-Smads wird von SARA (Smad anchor for receptor activation), einem mit R-Smads interagierendem Protein beeinflusst, indem es diese zum einen im Ruhezustand im Cytosol hält und zum anderen ihren Zugang zum aktivierten TGF- β -Rezeptor erleichtert (Tsukazaki *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2000). Des Weiteren ist die Regulation der Smad-Aktivität in ein komplexes Netz anderer Signalwege eingebettet, wobei verschiedene MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*), die z. B. durch Wachstumsfaktoren oder Ras aktiviert werden können, von Bedeutung sind (Massagué, 2000; Derynck und Zhang, 2003).

1.8 TGF- β 1-Wirkungen in der Leber

TGF- β 1 ist, wie bereits erwähnt, ein wichtiger physiologischer Regulator der hepatischen Zellhomöostase und wirkt in der Leber sowohl Zellzyklus-arretierend als auch Apoptose-induzierend. Die Behandlung kultivierter Hepatozyten mit diesem Cytokin führt zu einer Apoptoseinduktion *in vitro* (Oberhammer *et al.*, 1991 und 1992; Schulte-Hermann *et al.*, 1995 und 1997). Ein analoger Effekt wurde auch *in vivo* in der Leber von Ratten nach Vorbehandlung mit Cyproteronacetat (CPA) nachgewiesen. In diesem Tiermodell führt die CPA-Behandlung zu einer Hyperplasie der Leber, die sich nach anschließendem CPA-Entzug durch Apoptose wieder auf ihre normale Größe zurückbildet. Werden die Tiere während der Regressionsphase mit TGF- β 1 behandelt, so wird die Apoptose in der Leber dosisabhängig deutlich erhöht (Oberhammer *et al.*, 1993 und 1996). Zudem konnte gezeigt werden, dass präapoptotische und apoptotische Ratten-Hepatozyten eine Expression des TGF- β 1-Vorläufers und in geringerem Maße auch von reifem TGF- β 1 aufweisen, sowohl in der durch CPA-Behandlung hervorgerufenen hyperplastischen Leber als auch während der Leberregression nach Entzug dieser Substanz (Bursch *et al.*, 1993). Neben TGF- β 1 sind auch diverse Activine, die ebenfalls zur TGF- β -Superfamilie gehö-

ren, in der Lage, Apoptose in Leberzelllinien verschiedener Spezies zu induzieren (Vejda *et al.*, 2003).

Auch die TGF- β 1-induzierte Apoptose wird über die zentrale Exekutionsmaschinerie der Caspasen ausgeführt. Untersuchungen an primären Hepatozyten und Hepatomzellen haben ergeben, dass die Initiator-Caspasen 8 und 9 sowie die Effektor-Caspasen 2, 3, 6 und 7 maßgeblich beteiligt sind (Inayat-Hussain *et al.*, 1997; Hung *et al.*, 1998; Buchmann *et al.*, 1999; Shima *et al.*, 1999; Freathy *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2001). Die genaue Sequenz der Caspase-Aktivierungskaskade ist allerdings noch nicht abschließend geklärt. Während Shima *et al.* (1999) eine sequentielle Aktivierung von Caspase-8 und -9 beschreiben, sehen z. B. Cain *et al.* (2001) die über Mitochondrien vermittelte Aktivierung von Caspase-9 als das primäre Ereignis an, wobei TGF- β 1 durch Freisetzung von Cyt c und anschließende Formierung des Apoptosoms zur Aktivierung dieser Caspase führt (Freathy *et al.*, 2000; Cain und Freathy, 2001; Herrera *et al.*, 2001a und b). Der Austritt von Cyt c aus den Mitochondrien wird auf eine durch TGF- β 1 ausgelöste Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zurückgeführt, da die ROS-Produktion ein sehr frühes Ereignis während der Apoptose darstellt und dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials sowie dem Austritt von Cyt c vorausgeht. Zudem konnte gezeigt werden, dass die apoptoserelevanten mitochondrialen Vorgänge durch Radikalfänger komplett unterdrückt werden können (Sánchez *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 2001a und b). Die durch TGF- β 1 induzierte ROS-Bildung kann sowohl durch Induktion extramitochondrialer Proteine als auch durch intramitochondriale Faktoren katalysiert sein, wobei ein induzierbares NADPH-Oxidase-ähnliches System eine wesentliche Rolle spielt (Herrera *et al.*, 2004). Zudem könnte TGF- β 1 einen Anstieg der ROS durch eine Herunterregulierung antioxidativ wirkender Proteine hervorrufen. Ein solcher Mechanismus konnte für die Superoxiddismutase und die Katalase nachgewiesen werden, deren Expressionsraten und enzymatische Aktivitäten durch TGF- β 1 reduziert werden (Herrera *et al.*, 2004).

An den durch TGF- β 1 vermittelten Expressionsänderungen apoptoserelevanter Gene bzw. Proteine sind auch in hepatozellulären Systemen die in Kapitel 1.7.2 beschriebenen Smad-Proteine wesentlich beteiligt (Stopa *et al.*, 2000;

Yamamura *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2001; Yoo *et al.*, 2003). So wird beispielsweise die Apoptoserate in Hepatomzellen durch eine Überexpression von Smad3 deutlich erhöht und der Einsatz von Antisense-Smad3 blockiert die TGF- β 1-induzierte Apoptose (Kim *et al.*, 2002). Des Weiteren können die TGF- β 1-Effekte auch über eine Induktion Sp-1-ähnlicher Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren der TIEG-(*TGF- β -inducible early gene*)-Familie vermittelt werden, die nach ektopischer Expression in verschiedenen Zellsystemen Apoptose hervorrufen. Da auch die Überexpression von TIEG eine Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies auslöst, ergibt sich eine interessante Parallele zu den für TGF- β 1 beschriebenen Vorgängen (Ribeiro *et al.*, 1999). Ob TIEG-Proteine unabhängig von Smads oder *downstream* von Smad-Proteinen aktiviert werden und somit als sekundäre Transkriptionsfaktoren anzusehen sind, ist bislang noch ungeklärt (Cook und Urrutia, 2000). Die apoptoserelevanten Gene, welche über die genannten Signalwege induziert bzw. reprimiert werden, sind bislang nur in Ansätzen bekannt. Eindeutig klar ist jedoch, dass für die TGF- β 1-induzierte Apoptose eine Neusynthese proapoptotischer Faktoren erforderlich ist, da sowohl die TGF- β 1-vermittelte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies als auch die Aktivierung der Caspasekaskade und die Apoptose selbst durch vorausgehende Behandlung von Hepatozyten mit dem Proteinsynthesehemmer Cycloheximid unterdrückt werden (Inayat-Hussain *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 1997; Teramoto *et al.*, 1998).

Die durch TGF- β 1 vermittelte Wachstumsinhibition und Apoptose können mit dessen Wirkung als Tumorsuppressor in Übereinstimmung gebracht werden. Deshalb ist es auch nicht verwunderlich, dass in vielen Tumoren Defekte innerhalb des TGF- β 1-Signalweges nachgewiesen werden können, wodurch die Tumorzellen gegen die antiproliferative Wirkung von TGF- β 1 teilweise oder vollkommen resistent sind. (Schuster und Kriegelstein, 2002). In Hepatomen zeigten sich Dysregulationen des TGF- β 1-Signalweges auf verschiedenen Ebenen: Zum einen konnte eine verminderte Expression bzw. mutationsbedingte Inaktivierung des M6P/IGF2-Rezeptors beobachtet werden, welche die Aktivierung des TGF- β 1-Vorläufers zum reifen Cytokin negativ beeinflusst, zum anderen wurden neben einer reduzierten Expression des TGF- β Typ II

Rezeptors auch Mutationen und funktionelle Veränderungen in Smad-Genen beschrieben, wodurch die Aufnahme und intrazelluläre Weiterleitung des TGF- β 1-Signals gestört ist (De Souza *et al.*, 1995; Thorgeirsson *et al.*, 1998; Yalciner *et al.*, 1999; Tannapfel und Wittekind, 2002).

Neben den genannten intrinsischen Veränderungen in Tumoren kann das Wachstums- und Apoptoseverhalten von Tumoren auch durch Einwirkung verschiedener endogener und exogener Substanzen wie Hormone, Medikamente oder umweltrelevanter Fremdstoffe mit tumorpromovierender Aktivität beeinflusst werden, wobei die Inhibierung der Apoptose einen zentralen Wirkmechanismus darstellt. Der epidermale Wachstumsfaktor und Insulin z. B. zeigen potente antiapoptotische Aktivität und Dexamethason ist in der Lage, die TGF- β 1-vermittelte Apoptose in Hepatomzellen fast vollständig zu blockieren (Chen *et al.*, 1998; Teramoto *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1998; Buchmann *et al.*, 1999; Shima *et al.*, 1999; Fabregat *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2000; Buenemann *et al.*, 2001). Beispiele für Verbindungen mit tumorpromovierender Wirkung sind u. a. Phenobarbital, Cyproteronacetat, Nafenopin und Tetrachlordibenzo-p-dioxin, welche die Apoptoserate von Leberzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sehr effektiv inhibieren (Schulte-Hermann *et al.*, 1995; Schwarz *et al.*, 1995; Stinchcombe *et al.*, 1995; Woerner und Schrenk, 1996; Hasmall und Roberts 1999).

1.9 Aufgabenstellung

Obwohl die Apoptoseinduktion durch TGF- β 1 in hepatozellulären Systemen in den letzten Jahren intensiv untersucht wurde, sind die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen bisher nur in Ansätzen verstanden. Die Beobachtung, dass für die TGF- β 1-induzierte Apoptose Proteinbiosynthese erforderlich ist, weist allerdings klar darauf hin, dass für die Initiierung der Apoptose eine Neusynthese proapoptotischer Faktoren essentiell ist. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, in einem globalen Ansatz zu prüfen, welche apoptoserelevanten Gene durch TGF- β 1 induziert werden. Hierfür wurden Mikroarrays des Typs AtlasTM Rat 1.2 der Firma Clontech eingesetzt, über welche die gleichzeitige Analyse von Expressionsänderungen von knapp 1 200 Genen möglich ist. Die Untersuchungen wurden mit Hepatomzellen der Linie FTO-2B, von denen bekannt ist, dass sie mit einer starken Apoptoseinduktion auf die Einwirkung von TGF- β 1 reagieren (Buchmann *et al.*, 1999; Buenemann *et al.*, 2001), durchgeführt. Die Zellen wurden über unterschiedliche Zeitspannen mit TGF- β 1 behandelt; nachfolgend wurde die Gesamt-RNA isoliert, in radioaktiv markierte cDNA umgeschrieben und mit den oben genannten Arrays hybridisiert.

Ferner wurde über dasselbe Verfahren getestet, welche Gene durch die Behandlung der Zellen mit Apoptose-inhibierenden Tumorpromotoren (Phenobarbital) und hormonartig wirkenden Arzneistoffen (Dexamethason und Insulin) in ihrer Expression beeinflusst werden. Hierfür wurde das AtlasTM Rat Stress Arraysystem der Firma Clontech eingesetzt, das ca. 200 stressassoziierte Gene umfasst.

Die Untersuchungen sollen unser grundlegendes Verständnis zur Apoptoseregulation in Hepatozyten erweitern und somit zur Beurteilung pro- und antiapoptotischer Verbindungen mit potentiell nützlicher oder schädlicher Wirkung beitragen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Aceton	Riedel-de Haen, Seelze
Agarose SEAKEM®GTG® (für RNA)	Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf
Agarose Ultra Pure (für DNA)	Gibco/BRL, Eggenstein
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenol Blau	Serva, Heidelberg
Bovine serum albumine (BSA)	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dexamethason	Sigma, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
F12/DMEM Zellkulturmedium	Gibco/BRL, Eggenstein
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco/BRL, Eggenstein
Ficoll Typ 400	Sigma, Steinheim
Heringssperma-DNA, 10 mg/ml, geschert	Stratagene, La Jolla, USA
Insulin aus Rinderpankreas	Sigma, München
Isoamylalkohol (3-Methyl-1-butanol)	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt

Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Parafinöl	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenobarbital	Th.Geyer, Renningen
Phenol Aqua-Roti, pH 4,5 - 5	Roth, Karlsruhe
RNAsin, 40 U/ μ l	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold	Packard, Groningen
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
TGF- β 1	R&D, Wiesbaden
Tris-HCl	Serva, Heidelberg
Trizol®	GIBCO/BRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Ultra Pure H ₂ O	Merck, Darmstadt
Xylene-Cyanol	Kodak, Stuttgart

Primer

Ras 12A2 und Ras 61B2	Auftragssynthese MWG Biotech AG, Ebersberg
-----------------------	---

Nukleotide

Oligo(dT) ₁₅ , 100 μ M	Roche, Mannheim
dNTPs, 5 mM und 10 mM (für PCR)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
[α ³² P]dATP, 3000 Ci/mM und 10 mCi/ml	Amersham, Freiburg

RNA-/DNA-Größenmarker

0,24 – 9,5 kb RNA Ladder	GIBCO/BRL, Eggenstein
pBR322 DNA-Msp I Digest	Biolabs, Frankfurt a. M.

2.1.2 Kunststoffmaterialien

Cryotube, 1,8 ml	Nunc, Roskilde, Dänemark
Einmalkanüle, 20G, 0,9 x 40	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalpipettenspitzen, 100; 200; 1000 µl	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalpipettenspitzen, gestopft, 100; 200; 1000 µl	Biozym Diagnostik, Hess. Oberndorf
Einmalspritze, 20 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Hybridisierungsbeutel	Tropix, Bedford, MA
Hybridisierungsgefäße, Ø 5 cm	Techne, Duxford, GB
Hybridisierungsschale	Boehringer, Mannheim
Konisches Reagenzglas Falcon, 15; 50 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg
Steritop Filter GP Express 0,22 µm, Halsgröße 45 mm	Millipore, Eschborn
Probenröhrchen 1,5; 2,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen Falcon, Ø 3,5; 6; 10 cm;	Becton-Dickinson, Heidelberg

2.1.3 Geräte

Belichtungskassetten	Siemens, Erlangen
Brutschrank BB 16 CU	Heraeus, Hanau
Cleansphere CA 100	Safetech
Hybridisierungsöfen	Labtech International, Jahnsdorf
Kamerasystem CCD-Kamera	Raytest, Straubenhardt
Mikroskop, Laborlux D	Leitz, Stuttgart
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Phosphorimage Reader Fujifilm BAS- 1500	Fuji, Japan
Phosphorimagerplatte BAS-MS 2040	Raytest, Straubenhardt
Photometer LKB Ultraspec II	Pharmacia, Freiburg

Szintillationszähler	Beckmann, München
Schüttel-Wasserbad SW-21C	Julabo, Seelbach
Sterilbank SG-400 Steril Guard Hood	Baker, BDK, Sonnenbühl- Genkingen
Thermocycler Uno Thermoblock	Biometra, Göttingen
Thermocycler Personal Cyclcr	Biometra, Göttingen

Gelkammern

Modell MPH	IBI, New Haven, USA
Horizon® 11*14	Gibco/BRL, Eggenstein

Zentrifugen

Minifuge T, Rotor Heraeus 2250	Heraeus, Hanau
Beckmann J2-21-Zentrifuge, Rotor JA-20	Beckmann, München
Eppendorf Centrifuge 5417R, Rotor F 45/30/11	Eppendorf, Hamburg
Hettich Micro Rapid K	Hettich, Tuttlingen

2.1.4 Reagenziensets

<u>DNase-I-Kit</u>	Stratagene, La Jolla, USA
DNase I 10 U/μl	
10x DNase-I-Puffer	
10x Terminations-Mix	

Reverse-Transkriptase-Kits

M-MLV-RT (200 U/μl) mit 5 x RT-Puffer	Promega, Mannheim
PowerScript™ RT mit 5 x Primärstrang-Puffer und DTT, 100 mM	Clontech, Heidelberg

Polymerase-Kit

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Taq-Polymerase, 1 U/ μ l

10 x Taq-Puffer

AtlasTM Rat 1.2 Array-Kit

Clontech, Heidelberg

Box 1

10 x dNTP-Mix zur Markierung mit dATP,
je 5 mM dCTP, dGTP und dTTP

Rat 1.2 CDS-Primer-Mix

5 x Reaktions-Puffer

MMLV Reverse Transkriptase, 100 U/ μ l

DTT, 100 mM

10 x Terminations-Mix

Rat Brain Control Poly A⁺ RNA, 0,5 μ g/ μ l*Rat Cot-1 DNA*

Deionisiertes Wasser

*Box 2*ExpressHybTM Hybridisierungslösung*Atlas NucleoSpin[®] Extraction Kit**NucleoSpin Extraction Spin Columns*

2 ml Sammelgefäße

NT2-Puffer

NT3-Puffer

NE-Puffer

Box 3

Atlas Rat 1.2 Arrays

Nylon Membran

Orientierungsgitter

Atlas™ Rat Stress Array Kit

Clontech, Heidelberg

Box 1

10 x dNTP Mix zur Markierung mit dATP,
je 5 mM dCTP, dGTP und dTTP

Rat Stress CDS Primer-Mix

5 x Reaktions-Puffer

MMLV Reverse Transkriptase, 100 U/μl

DTT, 100 mM

10 x Terminations-Mix

Rat Brain Control Poly A⁺ RNA, 0,5 μg/μl

Rat C₀t-DNA

Deionisiertes Wasser

Box 2

ExpressHyb™ Hybridization Solution

Atlas NucleoSpin® Ectraction Kit

NucleoSpin Ectraction Spin Columns

2 ml Sammelgefäße

NT2-Puffer

NT3-Puffer

NE-Puffer

Box 3

Atlas Rat Stress Arrays, 10 ng of cDNA/dot

Nylon Membran

Orientierungsgitter

2.1.5 Zelllinie

FTO-2B-Zellen, ein Subklon der gut differenzierten Ratten-Hepatomzelllinie H4IIEC3 (Killary und Fournier, 1984) wurden freundlicherweise von Professor Dr. Schütz, DKFZ Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

2.1.6 Sonstige Hilfsmittel

Computerprogramme

CCD-Kamera	Raytest, Straubenhardt
Word XP-Version	Microsoft
Excel XP-Version	Microsoft
CorelDraw 8	Corel
Corel Photo-Paint 8	Corel
AtlasImage 2.0	Clontech, Heidelberg

2.2. Methoden

2.2.1 Zellkulturarbeiten

2.2.1.1 Allgemeine Anmerkungen

In der vorliegenden Arbeit wurde mit FTO-2B-Zellen, einer gut differenzierten Hepatomzelllinie aus der Ratte, gearbeitet. Da diese Zellen in unserem Labor schon zu früheren Experimenten herangezogen worden waren, konnte für diese Arbeit sowohl auf eingefrorene Zellchargen als auch auf Erfahrungswerte im Umgang mit diesen Zellen zurückgegriffen werden, die sich in verschiedenen der im Folgenden aufgeführten Arbeitsschritte wieder finden.

Aufgetaut wurden Zellen mit einer Passagezahl von elf, die dann fortlaufend in Petrischalen in Kultur gehalten wurden, so dass die hier beschriebenen Experimente mit Zellen der Passagezahlen zwölf bis fünfunddreißig durchgeführt wurden (siehe Kapitel 2.2.1.2.2). Zur Konservierung von Zellen niedriger Passagezahlen wurden die Zellen der Passagen dreizehn und vierzehn wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren (siehe Kapitel 2.2.1.2.8).

Es hat sich bewährt, die in Kultur gehaltenen Zellen jeden Montag umzusetzen (siehe Kapitel 2.2.1.2.7.1) und jeden Mittwoch- und Freitagnachmittag ihr Medium zu wechseln (siehe Kapitel 2.2.1.2.4).

Die FTO-2B-Kulturen werden im Brutschrank bei 37 °C in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre gezogen. Alle im Folgenden aufgeführten Inkubationen im Brutschrank beziehen sich auf diese Bedingungen.

Wenn keine anderen Angaben erfolgen, werden Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm benutzt und alle angegebenen Mengen an Medium, Lösungen etc. beziehen sich auf diese Größe. Gegebenenfalls nötige Anpassungen an andere Petrischalengrößen können nach Tabelle 2.1 vorgenommen werden:

Tabelle 2.1: Medium- und PBS-Mengen bezogen auf verschiedene Petrischalendurchmesser

Ø [cm]	Medium [ml]	PBS [ml]
3,5	1,5	1,5
6	4	4
10	10	10

Tubes oder Petrischalen mit Zellkulturen sollten zur Vermeidung von Kontaminationen nur mit Handschuhen angefasst werden. Zusätzliches Desinfizieren der Handschuhe mit 70 %igem Ethanol sowie aller Flächen, auf denen die Kulturschalen abgestellt werden, ist ebenfalls vorzunehmen.

Alle Lösungen, die mit den Zellen in Kontakt kommen, werden auf 37 °C temperiert.

2.2.1.2 Routinearbeiten

2.2.1.2.1 Das FTO-2B-Medium und seine Herstellung

Zusammensetzung des FTO-2B-Mediums

F12/DMEM

10 % FKS

Penicillin/Streptomycin 100 µg/ml

Zur einfacheren Handhabung werden Portionen von jeweils 50 ml des fetalen Kälberserums in geeigneten autoklavierten Glasflaschen bei -20 °C eingefroren. Ebenso werden 10 ml Portionen eines 1:2 Penicillin-Streptomycin-Gemisches in 15 ml Falcongefäßen bei -20 °C eingefroren.

ACHTUNG: Beim Arbeiten mit Antibiotika immer Handschuhe tragen!

Herstellung des FTO-2B-Mediums

- P/S und Serum werden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut.
- In ein mind. 500 ml fassendes Becherglas werden folgende Komponenten eingewogen:

6 g FTO-2B-Trockenmedium und
1,219 g NaHCO₃

- Zu diesen Komponenten werden etwa 400 ml Aqua bidest hinzugefügt.
- Danach werden 5 ml P/S hinzugegeben und
- die Mischung so lange gerührt bis eine klare Lösung entstanden ist.
- Diese wird dann mit Hilfe eines pH-Meters ebenfalls unter Rühren auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.
(Der Rührvorgang sollte möglichst kurz gehalten werden, damit nicht unnötig viel CO₂ entweicht).

Die weiteren Schritte erfolgen unter der Sterilbank:

- Eine autoklavierte Glasflasche wird abgeflammt und
- ein Steritop Millipore-Filter (0,22 µm) wird auf sie aufgeschraubt.
- In diesen Filter wird das Medium gegossen und mit Aqua bidest auf 450 ml aufgefüllt.
- Über eine Wasserstrahlpumpe wird ein Vakuum an den Filter angelegt und das Medium in die Flasche gesaugt.

- Danach wird der Filter wieder abgeschraubt.
- Eine Serum-Flasche mit 50 ml Serum wird unter der Sterilbank geöffnet und abgeflammt;
- das Serum wird, ohne dass sich die Flaschen berühren, zum Medium dazugekippt.
- Vor dem Verschluss der Mediumflasche werden ihr Hals und ihr Deckel nochmals abgeflammt.
- Die Flasche wird noch kurz geschwenkt und dann zur weiteren Aufbewahrung in den Kühlschrank gestellt.

Die maximale Haltbarkeitsdauer des Mediums beträgt im Kühlschrank etwa einen Monat. Danach zerfällt das darin enthaltene Glutamin.

Bevor das Medium für Zellkulturen eingesetzt wird, sollte überprüft werden, ob das Medium bei der Herstellung mit Mikroorganismen kontaminiert wurde. Dazu werden 1,5 - 2 ml des Mediums auf eine 3,5 cm durchmessende Petrischale pipettiert und 2 - 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Werden danach keine mikrobiellen Verunreinigungen unter dem Mikroskop beobachtet, kann das Medium als steril angesehen und für die Zellkultur eingesetzt werden.

2.2.1.2.2 Auftauen und Rekultivieren eingefrorener FTO-2B-Zellen

Nicht in Kultur gehaltene FTO-2B-Zellen können in Containern mit flüssigem Stickstoff eingefroren und so fast unbegrenzt lange gelagert werden.

Durchführung:

- Zum Auftauen werden die Zellen in den Brutschrank gestellt.
- Unterdessen werden in ein 15 ml Falcon-Gefäß 9 ml Medium vorgelegt.

- Sobald die Zellen bis auf einen kleinen Rest aufgetaut sind, werden sie, möglichst ohne dass sich die Gefäßwände berühren, in das Medium überführt.
- Anschließend wird die Suspension bei 20 °C zentrifugiert, so dass sich die Zellen am Boden sammeln (Eppendorf-Zentrifuge: 5 min bei 1 000 rpm).
- Danach wird der Überstand vorsichtig abgesaugt und
- 5 ml neues Medium zu den Zellen gegeben.
- Die Suspension wird zweimal auf- und abpipettiert.
- Danach werden die Zellen in eine Schale von 6 cm Durchmesser überführt und
- im Brutschrank inkubiert.
- Am nächsten Tag sollte eine mikroskopische Wachstumskontrolle erfolgen.
- Befinden sich viele tote Zellen im Überstand, sollten die Zellen gewaschen werden.

Die Zellen brauchen etwa 1 - 2 Tage bis sie gut angewachsen sind.

2.2.1.2.3 Waschen der Zellen

Das Waschen ist ein Arbeitsschritt, der i. A. allen anderen Behandlungen der Zellen vorausgeht. Er dient dazu, tote Zellen aus der Kultur zu entfernen oder sie von anderen Rückständen zu befreien, die sich negativ auswirken könnten. So würden z. B. Serumrückstände aus dem Medium Trypsin inaktivieren.

Durchführung:

Im Normalfall wird das Waschen mit 10 ml PBS durchgeführt; befinden sich sehr viele tote Zellen im Überstand, kann mit 15 ml PBS gewaschen oder der

Vorgang wiederholt werden. Mehr als zweimal sollte die Prozedur allerdings nicht vorgenommen werden, da die Zellen sonst zu großen Stress erleiden.

- Das PBS wird vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C temperiert.
- Nach Entnahme der Flasche aus dem Wasserbad wird sie mit 70 %igem ETOH besprüht und abgewischt.

Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgen unter der Sterilbank:

- Der Flaschenhals wird abgeflammt,
- 10 ml PBS werden zellschonend an den inneren Rand der Kulturschale pipettiert,
- die Petrischale wird gut geschwenkt und
- das PBS wieder abgesaugt.

2.2.1.2.4 Medium-Wechsel

Um die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und die Beseitigung von Stoffwechselprodukten im Überstand zu gewährleisten, muss das Zellmedium alle drei Tage gewechselt werden.

Durchführung:

- Vor Gebrauch werden Medium und PBS im Wasserbad bei 37 °C für etwa 15 min temperiert.
- Die aus dem Wasserbad genommenen Flaschen werden mit 70 %igem ETOH abgesprüht und abgewischt.

Alle weiteren Arbeiten werden unter der Sterilbank durchgeführt:

- Die Flaschen werden am Flaschenhals-Deckel-Übergang abgeflammt, geöffnet und bereitgestellt.
- Das alte Medium über den Zellen wird abgesaugt und
- die Zellen werden mit PBS gewaschen.
- Danach werden 10 ml Medium zu den Zellen gegeben, wobei auch hier wieder an den Rand und nicht direkt auf die Zellen pipettiert wird.
- Die Kulturschale wird geschwenkt.
- Sind bei der Mediumzugabe Luftblasen entstanden, werden diese mittels einer Pasteurpipette entfernt, um einen verschlechterten Gasaustausch zu verhindern.
- Die Kulturschalen werden in den Brutschrank überführt,
- der Medium- und PBS-Flaschenhals sowie die Deckel werden wieder abgeflammt, die Flaschen verschlossen und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.1.2.5 Trypsinieren der Zellen

Durch dieses Verfahren gelingt es, die Zellen vom Petrischalenboden abzulösen und in Suspension zu bringen, ohne sie zu zerstören.

Durchführung:

Die Arbeiten werden unter der Sterilbank durchgeführt.

- Das Medium wird abgesaugt und
- die Zellen werden mit PBS gewaschen.
- Danach wird 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (1/10 der Mediummenge) auf die Zellen verteilt aufgetropft.
- Die Schale wird gut in sämtliche Richtungen bewegt, so dass sich ein gleichmäßiger Trypsinfilmm über den Zellen bildet.
- Anschließend wird die Schale 5 min im Brutschrank inkubiert.

- Danach werden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet, um zu beurteilen, wie weit ihre Ablösung vorangeschritten ist:
 - glasige Zellen haben sich abgelöst,
 - bläuliche sitzen noch fest.
- Finden sich noch viele festhaftende Zellen, wird die Inkubation wiederholt ansonsten
- werden die Petrischalen unter Drehen mehrmals kräftig auf der Unterlage aufgeklopft, um die Ablösung der Zellen zu unterstützen und eine Klumpenbildung zu vermeiden.
- Daraufhin werden 9 ml Medium auf die Zellen pipettiert und mit diesen vermischt. Das Serum im Medium inaktiviert das Trypsin und stoppt somit den Verdau.
- Um Zellaggregate zu vereinzeln, wird die Zellsuspension dreimal durch eine 20 G Kanüle in eine 20 ml Spritze aufgezogen und wieder herausgedrückt.

Dies geschieht am besten, indem

- die Kulturplatte schräg auf ihren abgenommenen Deckel gestellt wird,
 - die abgeschrägte Kanülenseite zum Aufziehen nach unten in die Ritze zwischen Schalenboden und Seitenwand platziert wird und
 - die Suspension unter mäßigem Druck und unter Drehen der Schale auf diese zurückgespritzt wird, so dass noch festsitzende Zellen abgespült werden.
- Das Ergebnis der Homogenisierung wird unter dem Mikroskop begutachtet: liegen noch größere Zellaggregate vor, werden Aufziehen und Ablassen durch die Spritze so oft wiederholt, bis ein befriedigendes Resultat vorliegt.

2.2.1.2.6 Zellzählung

Die Zellzahlbestimmung einer Kulturplatte erfolgt durch Zellzählung in der Neubauer-Kammer. Die Zählfläche einer solchen Kammer ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt.

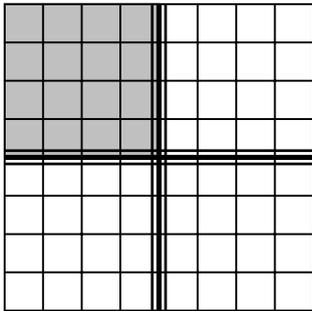


Abbildung 2.1:

Zählfläche einer Neubauer-Kammer bestehend aus vier Quadranten mit jeweils 4 x 4 Kleinquadraten. Ein Quadrant ist in der Abbildung grau unterlegt.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf eine Neubauer-Kammer mit einer Tiefe von 0,1 mm und einer Fläche von 0,002 5 mm².

Durchführung:

- 10 µl Zellsuspension werden auf den mittleren Steg der Kammer aufpipettiert.
- Unter dem Mikroskop wird grob abgeschätzt, ob in allen vier Quadranten des Großquadrates etwa gleich viele Zellen vorliegen. Ist dies der Fall, genügt es, einen Quadranten, bestehend aus 4 x 4 Kleinquadraten, auszuzählen. Variiert die Zellzahl der Quadranten stark, sollten zumindest zwei davon ausgezählt und die Zellzahl gemittelt werden.
- Aus der Anzahl der gezählten Zellen lässt sich die Gesamtzellzahl nach folgendem Schema errechnen:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellzahl} \times 10^4$$

2.2.1.2.7 Aussäen von Zellen

2.2.1.2.7.1 Passagieren der Zellen

Je weiter sich das Zellwachstum der 100 %igen Konfluenz nähert, desto schlechter werden die Wachstumsbedingungen und desto mehr Zellen sterben ab. Deshalb müssen sie immer wieder in sog. Erhaltungsschalen umgesetzt, d. h. in viel geringerer Zellzahl auf neuen Petrischalen ausgesät werden.

Wie oben erwähnt, wurde dieses Verfahren einmal wöchentlich durchgeführt. Nach diesem Zeitraum war eine Erhaltungsschale annähernd 100 % konfluent und enthielt damit ca. 4×10^7 Zellen.

Durchführung:

- Die Zellen werden trypsinisiert (siehe Kapitel 2.2.1.2.5).
- Während der Inkubation mit Trypsin werden die neuen Erhaltungsschalen mit Datum und Passagezahl versehen und
- in jede neue Erhaltungsschale werden 10 ml Medium vorgelegt.
- Bis die Trypsinierung der Zellen vollendet ist, werden die neuen Erhaltungsschalen zur CO₂-Äquilibrierung in den Brutschrank gestellt.
- Von der gewonnenen Zellsuspension werden 0,1 - 0,15 ml in jede neue Erhaltungsschale pipettiert.
- Die Zellen werden durch Über-Kreuz-Schwenken möglichst gleichmäßig im frischen Medium verteilt. (Keine kreisenden Bewegungen durchführen, sonst sitzen alle Zellen in der Schalenmitte!)
- Danach werden die Zellen in den Brutschrank überführt.

2.2.1.2.7.2 Aussäen einer definierten Zellzahl

Durchführung:

- Die Zellen werden trypsiniert (siehe Kapitel 2.2.1.2.5) und gezählt (siehe Kapitel 2.2.1.2.6).
- Danach wird die zur gewünschten Zellzahl korrespondierende Menge an Zellsuspension berechnet.
- In einem 50 ml Falcon-Gefäß werden so viele Milliliter Medium vorgelegt, dass die Gesamtmenge aus Medium und Zellsuspension 10 ml pro neue Schale ergibt.
- Die Zellsuspension wird zum Medium hinzupipettiert und
- der Ansatz wird 2 - 3mal in der Pipette aufgezogen und abgelassen, möglichst ohne dass dabei Blasen entstehen.
- Auf jede neue Schale werden 10 ml Zellsuspension gegeben.
- Möglicherweise entstandene Luftblasen werden entfernt und
- die Schalen in den Brutschrank gestellt.

2.2.1.2.8 Einfrieren von Zellen

Durchführung:

- Von einer konfluenten 10 cm durchmessenden Schale wird das Medium abgesaugt,
- die Zellen werden mit 10 ml PBS gewaschen, trypsiniert und gezählt.
- Danach werden 10 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben.
- Die Suspension wird in ein geeignetes Zentrifugationsröhrchen überführt und in der Eppendorf-Zentrifuge 5 min bei 1000 rpm und 20 °C zentrifugiert.
- Währenddessen werden 7,2 ml Medium plus 0,8 ml DMSO in einem 15 ml Falcon-Gefäß vorgelegt.

- Der Überstand über den zentrifugierten Zellen wird abgezogen und
- durch das Medium-DMSO-Gemisch ersetzt.
- Die Zellen werden durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen mittels einer Pipette resuspendiert.
- Es sollten Portionen aus mind. 2×10^6 Zellen eingefroren werden. Da eine konfluente 10 cm durchmessende Schale im Normalfall etwa 4×10^7 Zellen enthält, werden in fünf Einfrierröhrchen jeweils 1,6 ml der Suspension pipettiert.
- Diese Einfrierröhrchen werden dann zunächst 1 h auf Eis gestellt,
- im Anschluss daran über Nacht bei -70 °C gelagert und
- tags darauf zur endgültigen Aufbewahrung in den -170 °C kalten Stickstofftank überführt.

2.2.1.3 Zellinkubationen mit Apoptose-Hemmern und -Induktoren

2.2.1.3.1 Apoptoseinduktion mittels TGF- β 1

Eine Versuchsreihe besteht aus Zellen einer Passage, die 2, 4 und 8 h lang mit 5 ng/ml TGF- β 1 inkubiert werden sowie einer Kontrolle, deren Zellen 4 h lang mit 4 mM HCl/1 % BSA-Lösung, dem TGF- β 1-Lösungsmittel, behandelt werden. Die Lösungen werden den Zellen so zugesetzt, dass alle Inkubationen zum selben Zeitpunkt abgelaufen sind und die Zellen gemeinsam geerntet werden können. Das verwendete TGF- β 1 ist in 4 mM HCl mit 1 % BSA gelöst, so dass eine Arbeitslösung mit 1 μ g/ml TGF- β 1 resultiert.

Durchführung:

- Es werden vier Kulturschalen (\varnothing 10 cm) mit jeweils 7×10^6 Zellen derselben Passage pro Schale ausgesät und
- 24 h im Brutschrank inkubiert.
- Nach dieser Zeit zeigen die Zellen eine Konfluenz zwischen 35 - 50 %.
- Das Zellmedium aller Schalen wird gewechselt und

- die Zellen werden für 15 min in den Brutschrank zurückgestellt.
- Danach werden die Kulturen zeitversetzt mit 5 ng/ml TGF- β 1 bzw. mit 50 μ l des TGF- β 1-Lösungsmittels behandelt und
- entsprechend ihrer Inkubationszeiten von 8, 4 oder 2 h im Brutschrank bebrütet.
- Durch die zeitversetzten Behandlungen werden alle Zellen nach ihrer Aussaat insgesamt 32 h bebrütet und weisen eine Konfluenz zwischen 55 und 70 % auf, wenn sie geerntet werden.

2.2.1.3.2 Behandlung von Zellen mit Apoptosehemmern

Jeweils eine Versuchsreihe mit Zellen aus einer Passage wird 4, 8 bzw. 16 h lang mit den Apoptosehemmern Dexamethason, Insulin oder Phenobarbital behandelt. Die einzelnen Substanzen sollen dabei in folgenden Endkonzentrationen vorliegen:

Dexamethason:	10^{-8} M
Insulin:	10^{-7} M
Phenobarbital:	2 mM

Pro Versuchsreihe werden so viele Zellen ausgesät, dass alle Kulturschalen bei der Ernte eine Konfluenz zwischen 65 - 90 % zeigen.

Durchführung:

- pro Versuchsreihe werden vier Kulturschalen (\varnothing 10 cm) vorbereitet:
 - für die 4 und 8 h Inkubationen werden pro Schale jeweils 7×10^6 Zellen,
 - für die 16 h Inkubationen 6×10^6 Zellen pro Schale ausgesät und
- 24 h im Brutschrank inkubiert.
- Nach dieser Zeit zeigen die Zellen eine Konfluenz zwischen 40 - 60 %.

- Das Zellmedium wird gewechselt und
- die Zellen werden für 15 min in den Brutschrank zurückgestellt.
- Danach werden in jeweils eine der vier Kulturschalen 10 µl Dexamethason- oder Insulin- oder 100 µl Phenobarbital-Stammlösung pipettiert. Die letzte Kulturschale bleibt unbehandelt und dient als Kontrolle.
- Nach der Inkubationszeit von je nach Versuchsreihe 4, 8 oder 16 h zeigen die Zellen eine Konfluenz zwischen 65 - 80 % und werden geerntet.

2.2.1.3.2.1 Verwendete Reagenzien und Lösungen

Tabelle 2.2: Verwendete Reagenzien und Lösungen

Lösung	Konzentration	Lösungsmittel	Lagerung bei
Dexamethason-Stammlösung	10^{-5} M	Ethanol	-20 °C, vor Licht schützen
Phenobarbital-Stammlösung	0,2 M	PBS	4 °C, max. eine Woche haltbar
Insulin-Stammlösung	10^{-3} M	10 %iger Eisessig	-20 °C
eingesetzte Insulinlösung	10^{-4} M	Insulin-Stammlösung 1:10 in PBS	Sofortiger Verbrauch

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA mit Trizol[®]

Trizol[®] ist eine patentierte gebrauchsfertige Lösung aus Phenol und Guanidin-isothiocyanat, mit der Gesamt-RNA aus Zellen oder Geweben isoliert werden kann. Mit der Verwendung von Trizol[®] wurde eine Vereinfachung und damit Verbesserung der von Chomczynski und Sacchi (1987) entwickelten Methode zur RNA-Isolierung erreicht. Das Reagenz lässt Zellwände und -membranen aufreißen und löst Zellkomponenten auf, wobei die RNA jedoch intakt bleibt (Produktbeschreibung GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES Dezember 1999).

Um eine Degradierung der RNA zu vermeiden, werden die verwendeten Eppendorfgefäße über Nacht in DEPC-Wasser eingetaucht und danach autoklaviert. Zudem werden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt und die verwendeten Gefäße und Lösungen vorgekühlt. Des Weiteren wird mit gestopften Spitzen gearbeitet.

Durchführung:

Die Isolierung erfolgt nach einem modifizierten Protokoll auf der Grundlage der von GIBCO BRL beschriebenen Vorgehensweise.

- Das Medium über den Zellen einer Kulturschale wird abgesaugt.
- Mit einer 5 ml fassenden Eppendorfpipette werden 3 ml Trizol[®] auf den Zellrasen gegeben.
- Während einer Inkubationszeit von etwa 2 min wird mit der Pipettenspitze über den Schalenboden gekratzt bis sich eine zusammenhängende, galertartige Masse bildet, die sich in der Pipette aufziehen lässt.
- Das Lysat wird in ein vorgekühltes, phenolresistentes Zentrifugationsröhrchen überführt.
- Noch in der Schale festsitzende Zellen werden mit weiteren 3 ml Trizol[®] aus dieser pipettiert und
- mit dem übrigen Lysat vereinigt.

- Durch mehrmaliges Resuspendieren mit einer Pipette wird die Probe homogenisiert.
- Das Homogenat wird 5 min auf Eis inkubiert.
- Danach werden 1,2 ml Chloroformlösung zugegeben und
- 15 s vorsichtig geschüttelt.
- Der Ansatz wird wieder 2 - 3 min auf Eis inkubiert und
- anschließend 25 min bei 6000 g (Beckmann J2-21-Zentrifuge, Rotor JA-20:7500 rpm) und 4 °C zentrifugiert.
- Die obere wässrige Phase wird in ein neues Zentrifugationsgefäß überführt.
- Ihr werden 3 ml Isopropanol zur Fällung von Nukleinsäuren zugegeben.
- Der Ansatz wird gemischt und
- 10 min auf Eis inkubiert.
- Daraufhin erfolgt wieder eine Zentrifugation bei 4 °C und 6 000 g über 20 min (Beckmann-Zentrifuge).
- Der Überstand wird verworfen,
- das Pellet mit 6 ml 75 %igem EtOH gewaschen.
- Erneut wird 5 min bei 4 °C und 6 000 g zentrifugiert (Beckmann-Zentrifuge).
- Danach wird das RNA-Pellet 5 - 10 min vakuumgetrocknet - dabei ist darauf zu achten, dass das Pellet nicht völlig eintrocknet, da es dann kaum mehr in Lösung zu bringen ist!
- An der Gefäßwand hängende EtOH-Tropfen werden mit einem sterilen Wattetupfer entfernt.
- Das Pellet wird in 50 µl autoklaviertem DEPC-H₂O aufgenommen (eine Endkonzentration von 1 µg RNA/µl wird angestrebt).

2.2.2.1.1 Verwendete Reagenzien und Lösungen

Trizol[®]

Chloroform

Isopropanol

75 %iger EtOH

DEPC-H₂O

0,1 % DEPC in H₂O geben, 24 h rühren und anschließend autoklavieren.

2.2.2.2 Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur RNA-Quantifizierung werden die RNA-Extinktionen bei 260 und 280 nm photometrisch vermessen. Der Extinktionswert bei einer Wellenlänge von 260 nm erlaubt die Konzentrationsbestimmung der in der Probe enthaltenen Nucleinsäuren unter der Vorgabe, dass ein OD-Wert von eins annähernd einer Konzentration von 40 µg/ml RNA entspricht. Der OD-Wert sollte sich zwischen 0,05 und 1,0 bewegen, denn nur dann ist eine Linearität der Messung gegeben. Durch die Quotientenbildung zwischen den Extinktionswerten bei 260 und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}), lässt sich die Reinheit der vorliegenden RNA abschätzen. Saubere RNA-Präparationen weisen OD_{260}/OD_{280} -Werte zwischen 1,8 - 2,0 auf. Wird DEPC-versetztes Wasser als Lösemittel verwendet, ist die RNA bei einem Wert von 1,6 noch als ausreichend rein anzusehen. Ermittelt man allerdings einen niedrigeren als den oben angegebenen Wert, liegen Protein- und/oder Trizolkontaminationen vor, die eine genaue Bestimmung der RNA-Konzentration sehr erschweren (Sambrook *et al.*, 1989).

Durchführung der Messung:

- Vor Beginn der eigentlichen Messung wird ein Nullabgleich des Gerätes gegen TE-Puffer vorgenommen.
- Von der RNA-Lösung wird eine 1:400 Verdünnung (2,5 µl Probe in 997,5 µl TE-Puffer), bei hohen RNA-Konzentrationen eine 1:1000 Verdünnung (1 µl Probe in 999 µl TE-Puffer) hergestellt.
- Die Extinktionen für die Wellenlänge 260 nm und 280 nm werden vermessen und der Wert des Quotienten 260 nm/280 nm wird bestimmt.

Berechnung der RNA-Konzentration:

$$OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} : 1\ 000 = \text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

2.2.2.3 Agarose-Gel-Elektrophorese

Bei dieser Methode werden Nukleinsäuren, die bei neutralem pH-Wert negativ geladen sind, in einer Agarose-Gelmatrix aufgetrennt. Die Trennung erfolgt durch ein angelegtes elektrisches Feld, in dem die Nukleinsäuren aufgrund ihrer Ladung zur Anode wandern. Die Mobilität der Makromoleküle ist dabei von ihrer Größe und dreidimensionalen Struktur, der Agarosekonzentration, der Stärke des elektrischen Feldes und der Ionenstärke des Puffers abhängig (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.2.3.1 Herstellung eines Agarose-Gels

Je nach gewünschtem Prozentgehalt an Agarose wird eine entsprechende Menge Typ II Agarose in TAE-Puffer für RNA- bzw. in TBE-Puffer für PCR-Präparationen gelöst, indem man die anfängliche Suspension 3 - 5 min in der Mikrowelle aufkocht, so dass eine völlig klare Lösung entsteht.

Um die Konzentrationskonstanz der Agaroselösung nach dem Erhitzen zu gewährleisten, ist es zweckmäßig, eine Markierung des anfänglichen Flüssigkeitsstandes am Reaktionsgefäß vorzunehmen, so dass nach dem Lösevorgang das Volumen der Lösung leicht überprüft und gegebenenfalls die verdampfte Flüssigkeitsmenge durch Aqua bidest ersetzt werden kann.

Während des Lösevorganges wird der Schlitten der gewählten Gelkammer an seinen beiden offenen Längsseiten mit Klebeband verschlossen und der Kamm nach Reinigung mit Aceton, Ethanol und VE-Wasser in die Gelkammer eingesetzt. Im Anschluss daran wird die Agaroselösung unter fließendem Wasser auf

Handwärme abgekühlt, luftblasenfrei in den Schlitten gegossen und etwa eine halbe Stunde zum Aushärten auf ebener Standfläche stehen gelassen.

Für die im experimentellen Teil der Arbeit beschriebenen Versuche wurden, soweit nicht anders erwähnt, für RNA-Präparationen und DNase-I-verdaute RNA-Proben 1 %ige Gele aus SEA KEM GTG Agarose und für PCR-Produkte 1,5 %ige Gele aus GIBCO BRL Ultra Pure Agarose gegossen, die ca. 5 mm dick waren. Die für die verwendeten Gelkammern benötigten Substanzmengen sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: Angaben zur Herstellung 1 %iger und 1,5 %iger Agarose-Gele für unterschiedliche Gelkammern

Gelkammer	Agarose für RNA-Gel [g]	Agarose für PCR-Gel [g]	1x TAE bzw. TBE [ml]
IBI, Modell MPH	0,7	1,05	70
Gibco, Horizon®	0,8	1,20	80

2.2.2.3.2 Probenauftrag

Nach dem Aushärten des Gels wird es in die Elektrophoresekammer eingesetzt und 1 - 2 mm mit dem Laufpuffer TAE bzw. TBE bedeckt. Der Kamm sollte erst danach aus dem Gel gezogen werden, damit vermieden wird, dass sich Luftblasen in den Taschen sammeln, die später die Probe mit sich nach oben aus den Kammern reißen könnten.

Den RNA-Proben bzw. PCR-Produkten wird mindestens 1/10 Volumen 10 x Ladepuffer hinzugefügt. Danach wird kurz gevortext und die Proben werden durch Zentrifugation wieder am Gefäßboden gesammelt.

Probenansatz für eine Geltasche:

Ca. 5 µg RNA unverdaut oder DNase-I-Verdaut:	5 µl Stammlösung (~ 1 µg/µl)
10 x Ladepuffer (+):	1 µl
In TE-Puffer gelöstes PCR-Produkt:	9 µl
10 x Ladepuffer (-):	1,5 µl

Der Ladepuffer dient einem dreifachen Zweck:

1. die Dichte der Probe wird erhöht, so dass diese in die Geltasche absinkt,
2. die dunkelblaue Farbe des Ansatzes erleichtert die Beladung und
3. die Farbstoffe wandern selbst in voraussagbarer Weise zur Anode, wodurch abgeschätzt werden kann, wo sich Nukleinsäurefragmente einer bestimmten Größe während der Elektrophorese befinden.

Da sich der Ladepuffer aufgrund seiner Konsistenz schlecht pipettieren lässt, werden etwas mehr als 1/10 Volumen in der Pipette aufgezogen und zur Nukleinsäurelösung hinzugegeben. Die Proben werden vorsichtig mit einer Pipette auf das Gel geladen, so dass ein möglichst geringer Anteil aus den Geltaschen herausgewirbelt wird. Zusätzlich wird ein Marker, der wie die anderen Proben behandelt wird, mit auf das Gel aufgetragen, damit ein direkter Größenvergleich der in den einzelnen Spuren auftauchenden Nukleinsäurefragmente möglich ist.

Für Gelläufe mit RNA wurden, wenn nicht anders beschrieben, 5 µl 0,24 - 9,5 kb RNA Ladder (LIFE TECHNOLOGIES), für solche mit PCR-Produkten 5 µl pBR322 DNA-Msp I Digest (Biolabs) pro Gel eingesetzt.

2.2.2.3.3 Gellauf

Die für den Gellauf geeignete Spannung muss in Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden Nukleinsäurefragmente, dem verwendeten Laufpuffer und der Geldicke eingestellt werden.

Bei den vorliegenden Versuchen wurde eine Spannung von ca. 0,6 V/cm angelegt, da diese sowohl eine gute Trennung erlaubt, als auch die sich daraus ergebenden Stromstärken zu keiner übermäßigen Erwärmung des Gels führen:

Tabelle 2.4: Angaben zu Gelläufen in unterschiedlichen Elektrophoresekammern

Gelkammer	Spannung für TAE-Puffer [V]	Spannung für TBE-Puffer [V]	Anfangsstromstärke [mA]	Endstromstärke [mA]	Laufzeit in [h]	
					TAE	TBE
IBI, Modell MPH	70	120	90 - 110	120 -150	1 - 1,5	1,5
Gibco, Horizon®	60	110	110 - 130	130 -180	1,5 - 2	2

Da die Pufferkapazität des Tris-Acetat- (TAE-) Puffers relativ gering ist, neigt er dazu, sich während der Elektrophorese zu erschöpfen. Deshalb muss für jede neue Gel-Elektrophorese auch frischer Puffer verwendet werden. Tris-Borat- (TBE-) Puffer kann dagegen mehrfach verwendet werden.

2.2.2.3.4 Analyse des Gels

Nach dem Lauf wird das Gel 10 - 15 min in eine Ethidiumbromidlösung (EtBr) gelegt. Das EtBr interkaliert zwischen die Nukleinsäurebasen und fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht, so dass über dieses Verfahren die Lokalisation der Nukleinsäuren im Gel sichtbar gemacht werden kann. Die Nukleinsäure-detektion erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mittels einer CCD-Kamera.

Durchführung:

- Das gefärbte Gel wird auf einem in der Aufnahmekammer befindlichen Tisch so ausgerichtet, dass es einen möglichst großen Bildausschnitt einnimmt.
- Zum Scharfstellen des Bildes wird ein geeignetes Hilfsmittel - z. B. ein Lineal - möglichst eben auf das Gel gelegt und unter Aufsicht und voll geöffneter Blende solange am Objektiv gedreht, bis das Lineal samt Beschriftung scharf auf dem Computerbildschirm erscheint.
- Folgende Software-Einstellungen werden zur Aufnahme vorgenommen:

Option	Einstellung
AGC	x
Invert	0
Substract Background	0
Gamma	1
Exposure Time [s]	2
Scann-Mode	time over
Gain-Boost	0
X-Binning	0
Y-Binning	0

- Die Tür der Aufnahmekammer wird geschlossen, die UV-Lampe eingeschaltet und kurz danach die Aufnahme gestartet.
- Der durch die automatische Kontrasteinstellung unter der Bezeichnung „White Level“ eingestellte Wert ermöglicht die Abschätzung der idealen Aufnahmezeit nach folgender Formel:

$$Frames_{neu} = \frac{Frames_{alt} \times 0,9}{\text{„White-level“}}$$

- Die Aufnahme mit der nach dieser Formel berechneten Aufnahmezeit wird mit sonst unveränderten Einstellungen wiederholt, womit eine optimale Belichtung des Geles erzielt wird.
- Die Aufnahme wird gespeichert.

Anmerkungen:

Zwischen den einzelnen Aufnahmen sollte die UV-Lampe unbedingt ausgeschaltet werden, um eine Degradation der Nukleinsäuren im Gel und ein Ausbleichen der Ethidiumbromidfluoreszenz zu vermeiden.

Bei Arbeiten mit Ethidiumbromid sollten aufgrund der mutagenen Wirkung dieser Substanz unbedingt Handschuhe aus Nitril getragen werden.

2.2.2.3.5 Verwendete Reagenzien und Lösungen

10 x Gel-Ladepuffer (+)

0,25 % Bromphenol Blau

0,25 % Xylene-Cyanol

15 % Ficoll Typ 400

50 mM EDTA

Der Puffer wird bei 4 °C gelagert.

10 x Gel-Ladepuffer (-)

wie 10 x Gel-Ladepuffer (+) nur ohne Xylene-Cyanol

Der Puffer wird bei 4 °C gelagert.

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl

1 mM EDTA

pH 7,4

TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat

2 mM EDTA

pH 8,5

TBE-Puffer

90 mM Tris/HCl

110 mM Borsäure

2,5 mM EDTA

pH 8

RNA-/DNA-Größenmarker

0,24 - 9,5 bp RNA Leiter, 1 µg/µl

pBR322-*MspI*-Verdau

2.2.2.4 DNase-I-Verdau der mit Trizol[®] isolierten Gesamt-RNA

Durch einen DNase-I-Verdau werden noch in der Gesamt-RNA-Präparation vorhandene DNA-Kontaminationen entfernt, die negative Auswirkungen auf weitere Arbeitsschritte, wie z. B. die Hybridisierung von Clontech-Filtern, haben würden. Der Verdau wird mit 1 U RNase-freier DNase I pro 10 µg RNA durchgeführt. Zum Einsatz kam die DNase I von Stratagene mit einer Aktivität von 10 U/µl, die im Kit mit DNase-I-Puffer und 10 x Terminations-Mix geliefert wurde.

Durchführung:

Alle Reaktionsschritte werden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) durchgeführt.

- Folgender Ansatz wird für den DNase-I-Verdau zusammenpipettiert:

Gesamt-RNA, 1 µg/µl	50,0 µl
10 x DNase-I-Puffer	11,0 µl
DNase I, 1 U/10 µg RNA	0,5 µl
DEPC-H ₂ O	38,5 µl
	<hr/>
	100,0 µl

- Der Ansatz wird 1 h lang bei 37 °C inkubiert. Dies geschieht am besten in einer PCR-Maschine mit Deckelheizung, ist aber auch in einem einfachen Heizblock ohne beheizbaren Deckel möglich.
- Nach dieser Zeit wird die Reaktion mit 10 µl 10 x Terminations-Mix abgestoppt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wird dabei eine gute Durchmischung der Proben erreicht.
- Danach werden 100 µl einer 25:24:1 Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol zugegeben und
- der Ansatz wird 1 min lang gevortext.
- Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 10 min bei 14 000 rpm und Raumtemperatur (Eppendorf-Zentrifuge).
- Der wässrige Überstand wird in ein neues Gefäß überführt.
- Zu diesem werden 100 µl eines 24:1 Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches zupipettiert und
- der Ansatz wird 1 min lang gevortext.
- Im Anschluss wird wieder 10 min bei 14 000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge).
- Abermals wird der wässrige Überstand in ein neues Tube überführt.
- Zu ihm werden 20 µl 7,5 M NH₄OAc und 250 µl 96 %iges EtOH gegeben.
- Zur Durchmischung der Komponenten wird kurz gevortext.
- Danach wird 20 min bei 14 000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge).
- Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen.
- Das Pellet wird mit 100 µl 80 %igem EtOH gewaschen.
- Im nächsten Schritt wird 10 min bei 14 000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge).

- Wieder wird der Überstand vorsichtig abgezogen und verworfen.
- Das Pellet wird 10 min bei geöffnetem Tube luftgetrocknet.
- Danach wird die RNA in DEPC-H₂O gelöst, so dass eine RNA-Konzentration von ca. 1 µg/µl in der Lösung vorliegt. Erfahrungsgemäß erreicht man diesen Wert bei Verwendung von 15 µl.

Um zu kontrollieren, ob der DNase-I-Verdau zu einer kompletten Entfernung genomischer DNA-Fragmente geführt hat, wird anschließend eine PCR durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.2.6).

2.2.2.4.1 Verwendete Reagenzien und Lösungen

DNase-I-Kit von Stratagene

DNase I, 10 U/µl

10 x DNase-I-Puffer

10 x Terminations-Mix

7,5 M NH₄OAc-Lösung

57,1 g NH₄OAc auf 100 ml Aqua bidest. sterilfiltriert.

EtOH-Lösungen

80%ig: 80 ml 100%ige EtOH-Lösung mit 20 ml autoklaviertem DEPC-H₂O verdünnt.

96%ig: 96 ml 100%ige EtOH-Lösung mit 4 ml autoklaviertem DEPC-H₂O verdünnt.

DEPC-H₂O

0,1 % DEPC in H₂O geben, 24 h rühren und anschließend autoklavieren.

2.2.2.5 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Retroviren, die zu den eukaryontischen RNA-Viren gehören, enthalten eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die sog. Reverse Transkriptase (RT). Mit ihrer Hilfe wird nach der Infektion einer Eukaryontenzelle virale RNA in einen komplementären DNA-Strang transkribiert, so dass ein RNA-DNA-Hybrid entsteht. Durch die RNase-H-Aktivität des natürlichen Enzyms kann dann der RNA-Strang aus dem Hybrid entfernt und der verbliebene DNA-Einzelstrang repliziert werden. Auf diese Weise wird ein doppelsträngiges DNA-Molekül synthetisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die M-MLV-Reverse Transkriptase (*RNAse H (-) point Mutant*, 200 U/μl) von Promega verwendet. Dieses Enzym ist eine Mutante der Reversen Transkriptase des *Moloney Murine Leukemia* Virus, bei der durch eine Aminosäuresubstitution die RNase-H-Aktivität eliminiert wurde. Dadurch wird erreicht, dass im Vergleich zu Reversen Transkriptasen mit RNase-Aktivität eine höhere Prozentzahl an cDNAs mit voller Länge synthetisiert wird.

Da die verwendeten eukaryontischen mRNAs Poly(A)-Schwänze besitzen, kann Oligo(dT) der Reversen Transkriptase als Primer dienen. Ausgehend von diesem wird ein zur mRNA komplementärer DNA-Strang, sog. cDNA, in 5' → 3'-Richtung synthetisiert.

Durchführung:

Die Reaktion wurde nach einer im Labor etablierten Arbeitsvorschrift durchgeführt. Die einzelnen Komponenten sollten 4 °C kalt sein. Alle Pipettierschritte, bei denen RNA involviert ist, werden mit Filterspitzen und auf Eis vorgenommen. Zudem erfolgt das Pipettieren in RNase-freier Umgebung; in unserem Labor in einer Apparatur von Safetech namens *Cleansphere* CA 100.

- Zunächst wird pro Ansatz ein sog. RNA-Mix zusammenpipettiert:

- RNA-Mix:

Ultra Pure H ₂ O, RNase-frei	10,5 µl
Oligo(dT) ₁₅ , 100 µM	1,0 µl
RNA, 0,2 µg/µl	1,0 µl
	12,5 µl

Dabei werden zuerst das Wasser und die Oligo(dT)₁₅-Lösung in ein Eppendorfgefäß pipettiert und hernach die RNA-Lösung auf Eis hinzugegeben.

- Zusätzlich wird ein Kontroll-Ansatz, der sog. RT-Mix pipettiert, bei dem die RNA-Lösung des RNA-Mixes durch eine äquivalente Menge an Ultra Pure H₂O ersetzt wird.
- Alle Ansätze sowie der RT-Mix werden 10 min bei 70 °C inkubiert und
- danach sofort auf Eis abgeschreckt.
- Während der Inkubationszeit wird für jeden Ansatz sowie für den RT-Mix ein sog. Reaktions-Mix angesetzt:

- Reaktions-Mix:

5 x RT-Puffer	4,0 µl
RNAsin, 40 U/µl	0,5 µl
dNTPs, 10 mM	2,0 µl
M-MLV-RT, 200 U/µl	1,0 µl
	7,5 µl

- Jeder Ansatz sowie der RT-Mix werden nach dem Inkubationsschritt bei 70 °C und dem Abschrecken auf Eis mit je 7,5 µl Reaktions-Mix zu einer Gesamtmenge von je 20 µl vereinigt und
- 60 min bei 42 °C inkubiert.
- Danach werden alle Proben auf Eis gestellt und
- 1:10 mit TE-Puffer verdünnt, d. h., es werden 180 µl je Probe zupipettiert.
- Die Proben werden bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.2.5.1 Verwendete Reagenzien und Lösungen

Ultra Pure H₂O

RNAsin, 40 U/μl

Reverse-Transkriptase-Kit

M-MLV-RT, 200 U/μl

mit 5 x RT-Puffer

Nukleotide

Oligo(dT)₁₅, 100 μM

dNTPs, 10 mM

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl

1 mM EDTA

pH 7,4

2.2.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion werden mit Hilfe von sog. Primern, welche die interessierende Genfrequenz flankieren, spezifische DNA-Segmente vervielfältigt (Saiki *et al.*, 1988). Erreicht wird diese DNA-Amplifikation durch einen sich 25 - 35mal wiederholenden Reaktionszyklus aus Hitzedenaturierung der Doppelstrang-DNA, Anlagerung der Primer an die DNA (Annealing) und einer enzymatischen DNA-Synthese durch eine hitzestabile DNA-Polymerase, der Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Extension). Jeder dieser Schritte wird lediglich durch eine Variation der Inkubationstemperatur kontrolliert: Die Trennung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge erfolgt i. d. R. bei 95 °C, woraufhin die Reaktionsmischung auf eine Temperatur

abgekühlt wird, bei der die Primer möglichst spezifisch binden. Der theoretische Schmelzpunkt (T_M) eines Primers lässt sich mit folgender Formel abschätzen:

$$T_M = \sum GC\text{-Basenpaare} \times 4 + \sum AT\text{-Basenpaare} \times 2$$

Die Annealingtemperatur wird dann 5 °C unter der so errechneten Temperatur gewählt. Die Synthese komplementärer DNA-Stränge findet bei 72 °C im Bereich des Temperaturoptimums der Taq-Polymerase statt. Da das Enzym auch bei 95 °C weitestgehend hitzebeständig ist, erübrigt es sich, nach jedem Denaturierungsschritt neue Polymerase zuzugeben. Die Primer sind so ausgewählt, dass sie dem 5'- bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Segmentes entsprechen. Sie werden, wie auch die vier dNTPs, zu Beginn der Reaktion in großem Überschuss eingesetzt. Da die Produkte aus einer Amplifikationsrunde als Template für die nächste dienen, nimmt die Menge des gewünschten DNA-Segmentes exponentiell mit der Zyklenzahl zu. Die begrenzte Verfügbarkeit der Reaktionskomponenten führt allerdings dazu, dass nach etwa 17 Reaktionszyklen eine Abweichung vom exponentiellen Wachstum eintritt und das Maximum an zu erzielendem Amplifikat nach ca. 35 Runden vorliegt. Das vorwiegende Reaktionsprodukt wurde danach um etwa den Faktor 10^6 vermehrt. Sollen PCRs mit RNA durchgeführt werden, muss diese zunächst mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden (siehe Kap. 2.2.2.5), da RNA kein Substrat der Taq-Polymerase ist und somit nicht unmittelbar durch eine PCR amplifiziert werden kann. Eine PCR mit RNA als Ausgangsmaterial wird demzufolge als RT-PCR bezeichnet.

Die PCR diente in der vorliegenden Arbeit zum einen als Methode zum Auffinden genomischer DNA-Kontaminationen in RNA-Präparationen, zum anderen sollte durch sie gezeigt werden, dass die isolierte Gesamt-RNA nach DNase-I-Verdau intakt war. Um beides in einem gemeinsamen PCR-Verfahren nebeneinander eruieren zu können, musste eine Primerkombination gewählt werden, die ein Gen mit Intron überspannt. In diesem Fall ist bei reinen RNA-Präparationen nur ein PCR-Produkt zu erwarten, während bei Vorliegen von DNA-Kontaminationen ein zusätzliches, größeres PCR-Produkt auftreten wür-

de. Zur Abschätzung der RNA-Integrität sollte das gewählte Gen darüber hinaus eine geringe Expressionsrate in unseren Zellen aufweisen. Die Wahl fiel auf ein spezifisches Primerpaar für das sog. Ha-Ras-Gen:

Ras 12A2 (5'-Primer): 5'-GTGGGGCAGGAGCTCCTGGATTG-3'

Ras 61B2 (3'-Primer): 5'-GTGCGCATGTACTGGTCCCGCAT-3'

Für das RNA-Fragment ohne Intron ergibt sich eine Größe von 262 bp, für das intronüberspannende DNA-Fragment eine von 470 bp.

Durchführung:

Die einzelnen Pipettierschritte werden mit Filterspitzen vorgenommen. Steht eine PCR-Maschine mit Deckelheizung zur Verfügung wird diese während der gesamten Reaktion bei 110 °C gehalten. Hat der Thermoblock keine Deckelheizung, muss die Reaktionsmischung zum Schutz gegen Verdunstung mit Paraffinöl überschichtet werden. Je nach Größe der PCR-Maschine kann eine unterschiedliche Anzahl von Proben gleichzeitig gefahren werden.

- Zunächst wird in der Cleansphere ein sog. Mastermix zusammenpipettiert. Pro Reaktionsansatz werden folgende Komponenten in den aufgeführten Mengen benötigt:

DEPC-H ₂ O	29,0 µl
10 x Taq-Puffer	5,0 µl
dNTPs, 2 mM	5,0 µl
Primer 1P1, 10 µM	2,5 µl
Primer 1P3, 10 µM	2,5 µl
	44,0 µl

- Danach werden in einem geeigneten Eppendorfgefäß pro Ansatz folgende Mengen an cDNA- oder RNA-Lösung vorgelegt:

cDNA (1:10): 5 µl

Roh-RNA bzw. DNase-I-verdaute RNA: mind. 2 µg aber max. 5 µl

Die Differenz zu 5 µl wird dabei mit DEPC-H₂O ausgeglichen.

- Zu jedem Nukleinsäureansatz werden 44 µl des Mastermixes hinzugegeben.
- Zusätzlich wird ein Kontroll-Ansatz, der sog. PCR-Mix, pipettiert. Er besteht aus 44 µl Mastermix und 5 µl DEPC-H₂O.
- Alle Ansätze werden 10 min in der PCR-Maschine bei 95 °C denaturiert.
- Danach wird zu jedem Ansatz 1 µl Taq-Polymerase pipettiert.
- Anschließend werden 35 Zyklen des folgenden Programmes durchlaufen:

Schritte	Dauer	Temperatur
Denaturierung	60 s	95 °C
Annealing	60 s	65 °C
Extension	60 s	72 °C

- Abschließend wird nochmals 5 min bei 72 °C inkubiert, um eine vollständige Elongation der Fragmente zu ermöglichen.
- Die PCR-Produkte werden durch Elektrophorese in einem 1,5 %igen Agarose-Gel analysiert (siehe Kap. 2.2.2.3).

2.2.2.6.1 Verwendete Reagenzien und Lösungen

dNTPs, 2 mM

Ras-Primer 12A2 und 61B2, je 10 µM

Paraffinöl

DEPC-H₂O

0,1 % DEPC in H₂O geben, 24 h rühren und anschließend autoklavieren.

Polymerase Kit

Taq-Polymerase, 1 U/ μ l

10 x Taq-Puffer

2.2.2.7 Hybridisierung, Exposition und Detektion von AtlasTM Rat 1.2 und AtlasTM Rat Stress Membranen

Zur Erfassung von Unterschieden in der Expression von RNA aus unterschiedlich behandelten Zellkulturen können sog. Expressions-Arrays eingesetzt werden. Diese Arrays bestehen aus Zellulose-Nitrat- oder Nylon-Membranen, auf denen DNA-Fragmente unterschiedlicher Gene immobilisiert sind. Bei Inkubation dieser Membranen mit radioaktiv markierten cDNAs, die aus RNA der zu untersuchenden Zellkulturen generiert werden, binden komplementäre cDNA-Stränge an die auf den Membranen fixierten DNA-Fragmente und können detektiert werden.

Die Hybridisierungen der vorliegenden Arbeit wurden mit den Nylon-Filtersystemen AtlasTM Rat 1.2 Array und AtlasTM Rat Stress Array der Firma Clontech vorgenommen. Beide werden im Kit mit allen Reagenzien, die zur Synthese von radioaktiv markierten cDNA-Sonden und zur Hybridisierung notwendig sind, geliefert.

Der AtlasTM Rat 1.2 Array-Kit enthält vier identische Filter, auf denen jeweils 1 176 Ratten-DNAs, 9 *Housekeeping-control-DNAs* und Negativkontrollen in Form von Einzelspots mit 10 ng DNA pro Spot immobilisiert sind.

Mit dem AtlasTM Rat Stress Array-Kit werden zwei gleichartige Membranen geliefert. Auf ihnen sind jeweils Doppelspots aus 207 verschiedenen Ratten-DNAs, 9 *Housekeeping-control-DNAs* und Negativkontrollen ebenfalls in einer Menge von 10 ng DNA pro Spot adsorbiert.

Die auf den Filtern fixierten DNAs sind Fragmente unterschiedlicher von Rattenzellen exprimierter Gene. Sie besitzen eine Länge zwischen 200 und 300 Basen und sind spezifisch für die von ihnen repräsentierten Gene. Die genaue

Anordnung der einzelnen DNAs auf den Filtern und die Namen der zugehörigen Gene sind aus den von Clontech bereitgestellten Unterlagen zu entnehmen. Die Durchführung der Hybridisierung ist für beide Filterarten identisch.

Zur Synthese der radioaktiv markierten cDNA-Sonden wurde DNase-I-verdaute Gesamt-RNA verwendet, die aus FTO-2B-Zellen nach Behandlung mit TGF- β 1 bzw. verschiedenen Apoptosehemmern isoliert wurde (siehe Kap. 2.2.1.3 und 2.2.2.4).

2.2.2.7.1 Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden

Zur Herstellung der radioaktiv markierten cDNA-Sonden aus RNA wird für die Transkription anstelle der im Kit mitgelieferten M-MLV-RT die sog. PowerScriptTM Reverse Transkriptase von Clontech, Heidelberg, eingesetzt. Dieses Enzym ist eine noch leistungsfähigere Variante, so dass eine möglichst hohe Ausbeute an cDNA mit voller Länge und hohem Anteil an radioaktiv markiertem Nukleotid erzielt wird (Clontech Produktbeschreibung, 2000).

Der im Kit enthaltene dNTP-Mix enthält die Desoxynukleosid-Triphosphate dCTP, dGTP und dTTP in einer Konzentration von je 5 mM. Um die Synthese und gleichzeitige radioaktive Markierung der cDNA-Sonde zu erreichen, wurde er mit [α ³²P]dATP (3 000 Ci/mM, 10 mCi/ml) von Amersham ergänzt.

Durchführung:

Die Synthese erfolgt nach Vorschrift der Firma Clontech.

- Zunächst wird ein RNA-Mix folgender Zusammensetzung pipettiert:

- RNA-Mix:

DNase-I-verdaute RNA	5 µg (max. 5 µl)
10 x CDS-Primer	1 µl
DEPC-H ₂ O	x µl
Endvolumen	6 µl

- Der Ansatz wird 10 min bei 70 °C inkubiert und
- anschließend sofort auf Eis abgekühlt.
- Während der Inkubationszeit wird ein Master-Mix aus folgenden Komponenten hergestellt:

- Master-Mix:

5 x Reaktions-Puffer	4 µl
dNTP-Mix, 5 mM	2 µl
DTT, 100 mM	2 µl
[α ³² P]dATP, 3000 Ci/mM, 10 mCi/ml	5 µl
	13 µl

- Nachdem der RNA-Mix abgekühlt ist, wird er kurz zentrifugiert.
- Im nächsten Schritt werden dem RNA-Mix 13 µl Master-Mix zugegeben. Die Komponenten werden durch Auf- und Abpipettieren gemischt.
- Nach Zugabe von 1 µl PowerScript™ Reverse Transkriptase wird der Gesamtansatz durch Auf- und Abpipettieren gut resuspendiert.
- Die cDNA-Synthese läuft über 60 min bei 42 °C.
- Anschließend wird die Reaktion durch 15minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt.

2.2.2.7.2 Reinigung der radioaktiv markierten cDNA mittels Säulenchromatographie

Um die Zahl der unspezifischen Bindungen bei der späteren Hybridisierung auf den Arrays zu verringern, werden die markierten cDNA-Sonden über Säulenchromatographie von nichtinkorporierten Radionukleotiden und radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten kleiner 0,1 kb gereinigt.

Durchführung:

Das Verfahren entspricht der von Clontech vorgeschriebenen Vorgehensweise.

- Der cDNA-Synthese-Ansatz von 20 µl (siehe Kap. 2.2.2.7.1) wird mit 180 µl NT2-Puffer versetzt und
- in eine der sog. *NucleoSpin® Extraction Spin Column*, die zuvor auf ein 2 ml Sammelgefäß aufgesetzt wurde, pipettiert.
- Um den Durchlauf zu beschleunigen, wird 1 min bei 12 000 rpm zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge).
- Das Sammelgefäß wird danach mitsamt Durchlauf im Radioaktivabfall entsorgt und durch ein Frisches ersetzt.
- Im Anschluss werden 400 µl NT3-Puffer auf das Zentrifugationssäulchen pipettiert und
- es wird erneut 1 min bei 12 000 rpm zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge).
- Im Folgenden werden der Austausch des Sammelgefäßes, die Zugabe von 400 µl NT3-Puffer und die Zentrifugation von 1 min bei 12 000 rpm noch zweimal wiederholt.
- Danach wird das Zentrifugationssäulchen auf ein 1,5 ml fassendes Eppendorfgefäß aufgesetzt und es werden 100 µl NE-Puffer in das Säulchen gegeben.
- Bevor erneut 1 min lang bei 12 000 rpm zentrifugiert wird, um die gereinigte Probe zu eluieren, lässt man den NE-Puffer 2 min lang durch das Säulchen sickern.

- Die Proben können bei -20 °C gelagert werden.

2.2.2.7.3 Bestimmung der bei der cDNA-Sondenmarkierung eingebauten Radioaktivitätsmenge

Die Menge der in die cDNA-Sonden eingebauten Radioaktivität wurde mit einem Szintillationszähler der Firma Beckmann gemessen.

Durchführung:

- In einem geeigneten Szintillationsgefäß werden 4 ml Szintillationsflüssigkeit vorgelegt und mit 2 µl der gereinigten radioaktiv markierten cDNA-Sonde versetzt.
- Die Mischung wird mehrmals kräftig hin- und hergeschüttelt, um eine möglichst homogene Verteilung der Ingredienzien zu erreichen.
- Danach wird die Probe im ³²P-Kanal des Szintillationszählers vermessen.
- Um die Gesamtaktivität der 100 µl Ausgangs-cDNA-Sonden-Lösung zu erhalten, wird die gemessene *Count*-Zahl mit Fünfzig multipliziert.

2.2.2.7.4 Hybridisierung der Membranen mit radiaktiv markierten cDNA-Sonden

Zum Schutz der Membranen und zur Vermeidung von Artefakten sowie unspezifischem Hintergrund sollten die Filter nur am Rand und möglichst nur auf der nicht bespotteten Seite berührt werden. Zusätzlich sollte beim Umgang mit ihnen Handschuhe getragen werden.

Die für die Hybridisierung nötigen Inkubationen erfolgen in einem auf 68 °C vorgeheizten Hybridisierungsöfen mit rotierenden zylindrischen Hybridisierungsgefäßen (Ø 5 cm).

Prähybridisierung:

- Die gebrauchsfertige Hybridisierungslösung ExpressHyb™ wird in einem Schüttelwasserbad bei 68 °C solange inkubiert, bis die Lösung völlig homogen und klar ist (15 - 30 min).
- Unterdessen werden 100 µl gescherte Heringssperma-DNA (10 mg/ml) 5 min in einem Heizblock bei 95 °C denaturiert und
- anschließend sofort auf Eis abgeschreckt.
- Danach werden sie mit 10 ml ExpressHyb™ zur Hybridisierungslösung vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 68 °C temperiert.
- Die zu hybridisierende Membran wird zur Kennzeichnung am Rand beschriftet und mit einer Kanüle gelocht.
- Im Anschluss wird sie mit einer Pinzette aufgerollt und mit der bedruckten Seite nach innen in ein mit *Aqua bidest.* gefülltes Hybridisierungsröhrchen überführt.
- Das destillierte Wasser wird abgegossen, so dass sich die Membran an die Wand des Hybridisierungsröhrchens anlegen kann. Dabei ist darauf zu achten, dass die Membran an keiner Stelle mit sich selbst überlappt und sich auch keine Luftblasen zwischen Wand und Filter bilden.
- Nachfolgend wird die Hybridisierungslösung in das Röhrchen gegossen und
- die Membran 30 min lang im 68 °C warmen Hybridisierungssofen prähybridisiert.

Hybridisierung:

- Nach der Reinigung über die Säulenchromatographie liegt die cDNA-Sonde in 100 µl Lösung vor. Dieser werden 5 µl C₀t-1 DNA zugegeben.
- Bevor die radioaktiv markierte cDNA-Sonde zur Hybridisierung eingesetzt werden kann, muss sie thermisch denaturiert werden:
 - dazu wird der Ansatz gemischt,
 - 2 min im kochenden Wasserbad inkubiert und
 - danach sofort für mind. 2 min auf Eis gestellt.

- Nach Ablauf der Prähybridisierung wird die denaturierte Sonde zur Hybridisierungslösung pipettiert. Dabei ist darauf zu achten, dass die radioaktiv markierte Probe nicht unverdünnt mit der Membran in Berührung kommt.
- Die Hybridisierung findet über Nacht bei 68 °C im Hybridisierungssofen statt.

Waschungen:

- Am nächsten Tag werden die Waschlösungen I und II im Wasserbad auf 68 °C temperiert.
- Eine Plastikschaale wird in ein 68 °C warmes Schüttelwasserbad gestellt und mit 200 ml vorgewärmter Waschlösung I gefüllt.
- Das Hybridisierungsröhrchen wird aus dem Hybridisierungssofen genommen, die radioaktiv kontaminierte Hybridisierungslösung in den Radioaktivabfall entsorgt, das Röhrchen mit Waschlösung I gefüllt, kurz geschwenkt und die Waschlösung wieder abgegossen. Damit ist schon der größte Teil an freier Radioaktivität von den Filtern entfernt.
- Danach wird die hybridisierte Membran mit einer Pinzette zügig vom Hybridisierungsröhrchen in die mit Waschlösung I befüllte Plastikschaale überführt und
 - unter ständigem Schütteln 30 min lang bei 68 °C gewaschen.
 - Dieser Waschvorgang mit Waschlösung I wird weitere dreimal wiederholt.
 - Als Nächstes wird die Waschlösung I gegen 200 ml vorgewärmte Waschlösung II ausgetauscht und
 - es wird wieder 30 min bei 68 °C unter ständigem Schütteln gewaschen.
 - Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt.
 - Im Anschluss wird 5 min bei Raumtemperatur in 200 ml 2 x SSC unter mäßigem Schütteln gewaschen.

Nach dem Waschen wird die Membran mit einer Pinzette aus der Plastikschaale geholt und in einem Hybridisierungsbeutel eingeschweißt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Membran luftblasenfrei mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt ist.

2.2.2.7.5 Verwendete Reagenzien und Lösungen

DNase-I-verdaute RNA

[$\alpha^{32}\text{P}$]dATP, 3 000 Ci/mM, 10 mCi/ml

DEPC-H₂O

0,1 % DEPC in H₂O geben, 24 h rühren und anschließend autoklavieren.

PowerScript™ Reverse Transkriptase Kit von Clontech

PowerScript™ Reverse Transkriptase

5 x Reaktions-Puffer

DTT, 100 mM

Atlas™ Rat 1.2 Array-Kit von Clontech

10 x dNTP-Mix, zur Markierung mit dATP, je 5 mM dCTP, dGTP und dTTP

Rat 1.2 CDS-Primer-Mix

5 x Reaktions-Puffer

DTT, 100 mM

10 x Terminations-Mix

Rat Cot-1 DNA

ExpressHyb™ Hybridisierungslösung

Atlas NucleoSpin® Ectraction Kit

Atlas™ Rat Stress Array-Kit von Clontech

10x dNTP-Mix, zur Markierung mit dATP, je 5 mM dCTP, dGTP und dTTP

Rat Stress CDS-Primer-Mix

5 x Reaktions-Puffer

DTT, 100 mM

10 x Terminations-Mix

Rat Cot-1 DNA

ExpressHyb™ Hybridisierungslösung

Atlas NucleoSpin® Extraction-Kit

Atlas NucleoSpin® Extraction Kit*NucleoSpin® Extraction Spin Columns*

2 ml Sammelgefäße

NT2-Puffer

NT3-Puffer

NE-Puffer

2 x SSC-Lösung

1:10 Verdünnung einer 20 x SSC-Lösung

20 x SSC-Lösung

3 M NaCl

300 mM Na₃Citrat x 2H₂O

pH 7

Waschpuffer I

2 x SSC

1 % SDS

Waschpuffer II

0,1 x SSC

0,5 % SDS

2.2.2.7.6 Exposition der ArraysDurchführung:

- Die eingeschweißte, hybridisierte Membran wird mit den Spots nach oben in eine Entwicklerkassette gelegt.
- Obenauf wird eine Phosphorimagerplatte mit der weißen Seite nach unten plaziert.

- Die Kassette wird für die Dauer der Exposition verschlossen und gesichert gelagert.
- Danach wird die Radioaktivität auf der Membran über das Einlesen der Phosphorimagerplatten in ein Phosphorimager-System vermessen. In unserem Labor stand dafür eine Apparatur der Firma Fuji zur Verfügung.
- Die so erhaltenen Autoradiogramme werden in einem angeschlossenen PC gespeichert.

2.2.2.7.7 Strippen der Atlas™ Rat 1.2 und Atlas™ Rat Stress Arrays

Durch das Strippen werden die radioaktiven cDNA-Sonden wieder von den Membranen herunter gewaschen, so dass die Filter für weitere Versuche zur Verfügung stehen. Der Vorgang des Strippens kann für die Atlas™ Rat Stress Arrays mindestens dreimal wiederholt werden, ohne dass die Qualität der folgenden Hybridisierung nennenswert leidet. Die Atlas™ Rat 1.2 Membranen reagieren allerdings empfindlicher auf das Strippen: bei ihnen zeigt sich eine Zunahme der Stärke und der Unregelmäßigkeit ihres Hintergrundes mit steigender Anzahl der Strippvorgänge. Da zudem die von Clontech empfohlene Methode des Strippens wenig schonend für die Membranen ist, wurde die Prozedur in die im Folgenden beschriebene umgeändert, durch welche die Arrays weniger verzogen werden.

Durchführung:

- 1 200 ml 0,5 % SDS-Lösung werden in einem Becherglas zum Kochen gebracht und
- weiterhin bei 100 °C temperiert.
- Von dieser kochenden SDS-Lösung werden 200 ml in eine Plastikschaale gegossen und diese wird auf einen Schüttler gestellt.
- Die Membran wird mit einer Pinzette aus dem Hybridisierungsbeutel entnommen, in die Plastikschaale überführt und

- 2 min in der heißen SDS-Lösung bewegt.
- Danach wird die Flüssigkeit abgeschüttet,
- die Membran mit neuen 200 ml kochender SDS-Lösung übergossen und
- wiederum 2 min geschüttelt.
- Dieser Vorgang wird viermal wiederholt.
- Anschließend wird die Membran 2 min in 2 x SSC-Lösung geschwenkt und
- feucht in einen Hybridisierungsbeutel eingeschweißt.
- Um zu überprüfen, ob der Filter vollständig gestrippt ist, wird er fünf Tage lang in einer Entwicklerkassette unter eine Phosphorimagerplatte gelegt. Wird nach dieser Zeit noch Radioaktivität detektiert, wird der Strippvorgang wiederholt. Ist keine Radioaktivität mehr nachzuweisen, kann der Filter entweder sofort für eine neue Hybridisierung eingesetzt oder bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.2.2.7.1 Verwendete Reagenzien und Lösungen

0,5 % SDS-Lösung

2 x SSC-Lösung

2.2.2.7.8 Auswertung der Hybridisierungsergebnisse der Atlas™ Rat 1.2 und Atlas™ Rat Stress Arrays

Die durch Einlesen der Phosphorimagerplatten gewonnenen Autoradiogramme werden mit Hilfe des Software-Programmes AtlasImage™ der Firma Clontech ausgewertet.

Für diese Arbeit war die Frage nach behandlungsabhängigen Unterschieden in der Expression von Genen von Interesse. Deshalb wurden immer zwei Arrays miteinander verglichen.

Bevor allerdings ein Vergleich zwischen den Membranen erfolgen kann, muss für jedes Autoradiogramm einzeln eine Zuordnung der Hybridisierungssignale zu den auf den Membranen fixierten Genfragmenten erfolgen. Dazu sind auf jeder Membran randständige Orientierungspunkte aufgebracht, mit deren Hilfe die Koordinaten der einzelnen Spots determiniert werden können. In einem ersten Schritt werden zwei sich diagonal gegenüberliegende Orientierungspunkte markiert. Anhand dieser Zuweisungen legt das Programm ein virtuelles Gitternetz über das Autoradiogrammbild, das eine Zuordnung der Hybridisierungsspots zu den auf dem Array repräsentierten Genen ermöglicht. Die Positionen der auf dem Filter fixierten DNA-Fragmente sind dabei durch Kreise dargestellt, die im Idealfall die Spots umringen sollten. Da sich die Membranen durch die verschiedenen Arbeitsschritte während der Hybridisierung verziehen, ist das Raster i. d. R. mit der Spotverteilung nicht völlig deckungsgleich. Deshalb ist eine manuelle Nachbearbeitung der Zuordnungen erforderlich. Dabei werden hybridisierte *Housekeeping*-Gene, die je nach Membrantyp als Einzel- oder Doppelspots auftauchen und i. A. starke Signale zeigen, zur Orientierung und endgültigen Determinierung der Spots herangezogen. Nachdem die Spots über das Gitternetz einem Gen zugeordnet worden sind, berechnet das Programm die Expressionsintensität eines jeden Gens und bestimmt anhand der zwischen den Spots aufgefangenen Signale einen mittleren Hintergrundwert.

Zusätzlich bietet AtlasImageTM die Möglichkeit, nach diesem Standardverfahren Hybridisierungsartefakte zu eliminieren und lokale Hintergrundabweichungen bei der Auswertung zu berücksichtigen.

Nach erfolgter Vorbearbeitung der Autoradiogramme werden zwei von ihnen ausgewählt und miteinander verglichen. Hierbei wird zuerst eine sog. Normalisierung der Autoradiogramme vorgenommen. Dieses Verfahren dient dazu, Unterschiede in den Signalintensitäten auszugleichen, die sich durch das Aufbringen unterschiedlicher Radioaktivitätsmengen auf die Membranen oder durch unterschiedlich stark ausgeprägten unspezifischen Hintergrund ergeben haben.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Modus „globalisierte Normalisierung nach der Summenmethode“ verwendet. Bei Auswahl dieser Option wird für das zweite Autoradiogramm ein Normalisierungs-Koeffizient berechnet und auf jedes Signal dieser Hybridisierung angewendet. Weitere Details sowie die für die Berechnung des Normalisierungs-Koeffizienten herangezogene Formel sind dem *User Manual* der Firma Clontech zu entnehmen.

Durch diese Normalisierung wird dem Programm ermöglicht, zu berechnen, welche Gene relevante Intensitätsunterschiede im Sinne einer Induktion oder Inhibition zeigen. Als Grundlage für diese Berechnung stehen verschiedene Kriterien zur Auswahl. Diesen Merkmalen sind wiederum vom Programm Standardeinstellungen zugewiesen (siehe *User Manual* der Firma Clontech), die als solche benutzt oder den individuellen Wünschen des Anwenders angepasst werden können:

1. Differenz: In diesem Fall werden Unterschiede in den Absolutwerten der Hybridisierungssignale verglichen, wobei positive Werte eine Induktion und negative Werte eine Inhibition des entsprechenden Gens anzeigen. Bei den vorliegenden Auswertungen wurde als Diskriminator ein Wert von 35 gewählt.
2. Quotient: Hierbei werden Relationen zwischen den Hybridisierungssignalen miteinander verglichen, wobei Werte > 1 eine Induktion und Werte < 1 eine Inhibition des entsprechenden Gens anzeigen. Expressionsunterschiede wurden in der vorliegenden Arbeit als signifikant gewertet, wenn der Quotient > 2 (Induktion) bzw. $< 0,5$ (Inhibition) betrug.

Bei schwach bis mäßig stark exprimierten Genen werden Expressionsunterschiede am besten über den Quotienten erfasst. Dieser Parameter kann allerdings bei sehr stark exprimierten Genen ungünstig sein, wenn die zur Hybridisierung eingesetzte cDNA-Menge im Verhältnis zur aufgespotteten so hoch ist, dass dies zu einem im Sättigungsbereich liegenden Signal führt. Wird das entsprechende Gen behandlungsabhängig induziert, so wäre die Hybridisierungs-

kapazität schon so weit erschöpft, dass der Quotient zwischen beiden Signalintensitäten unter einen Wert von zwei sinken würde. Eine ähnliche Überlegung kann man für die Inhibition eines Genes anstellen, das unter Standardbedingungen in einer Expressionsrate über der Hybridisierungskapazität des Arrays liegt und unter Inhibition diese nur unwesentlich unterschreitet. In beiden Fällen lassen sich Änderungen in der Expression besser anhand der Differenz der Signalintensitäten feststellen.

Das Ergebnis der Auswertung wird über die Reportfunktion des Programmes tabellarisch zusammengefasst und enthält die in Tabelle 2.5 aufgeführten genspezifischen Charakteristika.

Es kommt vor, dass in der Spalte für den Quotienten kein Zahlenwert, sondern das Kürzel „Up“ für eine relative Intensitätszunahme oder die Bezeichnung „Down“ für eine relative Intensitätsabnahme des Signals auf Array 2 im Vergleich zu Array 1 angeführt wird. Eine reelle Berechnung des Quotienten ist in diesen Fällen nicht möglich, weil sich entweder das Gensignal des Array 1 (Up) oder das des Array 2 (Down) auf Hintergrundniveau befindet.

Alle weiteren für die Auswertung relevanten Details und zusätzlich durchgeführte Bearbeitungen werden an entsprechender Stelle im Ergebnisteil beschrieben.

Tabelle 2.5: Genspezifische Charakteristika der Autoradiogramm-Auswertung durch das Computerprogramm AtlasImage™

<i>Gene</i>	Gibt die Lokalisation des entsprechenden Genes auf der Membran in Form eines Buchstaben- und Zahlencodes an (Genauerer ist der jeweils membranspezifischen Produktbeschreibung der Firma Clontech zu entnehmen).
<i>Intensity (= Int)</i>	Gibt die berechnete Signalintensität des Genspots bei Einzelspot-Arrays (Rat 1.2 Array) bzw. den Durchschnittswert der Signalintensität des rechten und linken Spots bei Doppelspot-Arrays (Rat Stress Array) wieder.
<i>Background (= Back)</i>	Zeigt den berechneten Hintergrundwert.
<i>Adjusted Intensity (= Adj. Int)</i>	Der Wert für die angepasste Intensität eines Genspots des Arrays 1 berechnet sich aus „Intensity“ minus „Background“; für Array 2 wird dieser Wert noch mit dem Normalisierungs-Koeffizienten multipliziert.
<i>Ratio</i>	Der Quotient eines Gensignals aus Array 1 und Array 2 wird nach folgender Formel berechnet: $Ratio = Adjusted Intensity \text{ des Array 2} / Adjusted Intensity \text{ des Array 1}$
<i>Difference (= Dif)</i>	Gibt die Signaldifferenz eines Gens des Array 2 (A2) im Vergleich zu Array 1 (A1) wieder: $Difference = Adjusted Intensity A2 - Adjusted Intensity A1$
<i>Genname</i>	Diese Spalte enthält den Gennamen.

3 ERGEBNISSE

Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es sowohl Substanzen, welche das in jeder Zelle vorliegende Apoptoseprogramm in Gang zu setzen vermögen als auch solche, die seinen Ablauf verhindern.

Um untersuchen zu können, welche Veränderungen des Genexpressionsmusters durch Apoptoseinduktoren und -inhibitoren hervorgerufen werden, wurden Kulturen von FTO-2B-Zellen zum einen mit dem Apoptoseinduktor TGF- β 1 behandelt, zum anderen mit den Apoptosehemmern Phenobarbital, Insulin und Dexamethason inkubiert.

Die RNA aus diesen Zellen wurde mittels Trizol isoliert, DNase-I-verdaut und nach Überprüfung ihrer Reinheit und Integrität in radioaktiv markierte cDNA transkribiert, die als Sonde für die Hybridisierung mit den AtlasTM Rat 1.2 Array bzw. AtlasTM Rat Stress Array Filtersystemen von Clontech eingesetzt wurde.

Der AtlasTM Rat 1.2 Array umfasst 1 176 auf seiner Oberfläche immobilisierte cDNA-Sequenzen, die spezifischen Genen entsprechen; auf dem AtlasTM Rat Stress Array sind 207 cDNA-Fragmente fixiert. Somit erlauben die beiden Systeme die gleichzeitige Überprüfung einer großen Anzahl von Genen, was einen entscheidenden Vorteil gegenüber konventionellen Methoden, wie z.B. dem Northern-Blot, darstellt.

3.1 Vorversuche

3.1.1 Optimierung der radioaktiven Markierung von cDNA-Sonden

Ausgehend vom Standardprotokoll zur Sondenmarkierung der Firma Clontech wurden die ersten Transkriptionen der DNase-I-verdauten Gesamt-RNA in radioaktiv markierte cDNA-Sonden mit der M-MLV-Transkriptase durchgeführt. Laut Clontech sollte dabei die Markierungsausbeute zwischen 2 - 10 x 10⁶ cpm liegen. Erreicht wurden allerdings nur Werte zwischen 1,8 und 4,4 x 10⁶ cpm, so dass aufgrund dieser geringen Markierungsrate auf die PowerScriptTM

Transkriptase von Clontech zurückgegriffen wurde, die mit Werten bis zu 9×10^7 cpm wesentlich höhere Zählraten lieferte.

3.1.2 Hybridisierungen mit ^{33}P versus ^{32}P

Die Atlas Arrays lassen sich entweder mit ^{33}P - oder ^{32}P - markierten cDNA-Sonden hybridisieren, wobei sich laut Herstellerangaben die Zählraten der eingesetzten radioaktiv markierten Proben bei beiden Verfahren zwischen 0,5 und 20×10^6 cpm bewegen können, um zufrieden stellende Signalstärken zu erzielen. Clontech empfiehlt den Einsatz von ^{33}P , wenn eine quantitative Auswertung der Hybridisierungen mit Hilfe eines Phosphorimagers erfolgen soll, da dieses Radionuklid zu weniger Überstrahlung von Nachbarspots durch sog. Signalbluten führt und somit die Qualität der Membranen sowie die Auswertbarkeit der Ergebnisse verbessert wird.

Die Verwendung von ^{33}P -cDNA-Sonden mit einer Markierungsrate von 20×10^6 cpm pro Hybridisierung erbrachte allerdings nur sehr wenige und sehr schwache Signale, so dass radioaktiv markierte Proben mit einer Zählrate bis zu 50×10^6 cpm eingesetzt wurden. Diese Maßnahme hatte, wie auch die Verlängerung der Expositionszeit auf 80 Stunden, keine wesentliche Verbesserung der Signalstärke und -menge zur Folge.

Um zu eruieren, ob sich die für die Experimente isolierte RNA anders verhält als die von Clontech mitgelieferte Kontroll-RNA, wurde zum Vergleich eine Markierung und Hybridisierung mit dieser durchgeführt. Obwohl die aus der Kontroll-RNA angefertigten Proben laut Clontech starke Hybridisierungssignale zeigen sollten, ließen sich die Ergebnisse auch mit diesem Ausgangsmaterial nicht verbessern.

Daraufhin wurden die folgenden Markierungs- und Hybridisierungsreaktionen mit ^{32}P durchgeführt, um die Sensitivität der Methode zu steigern. Beim Einsatz dieses Nukleotides ergaben Proben mit Aktivitätsraten zwischen 7×10^6 und 7×10^7 cpm schon nach wenigen Stunden der Membranexposition auf

Phosphorimagerplatten deutliche Hybridisierungssignale und keine nennenswerte Zunahme des unspezifischen Hintergrunds bei Erhöhung der Zählrate. Aufgrund der Tatsache, dass beim Vergleich verschiedener Membranen quantitative Unterschiede in der Sondenaufbringung durch die Normalisierungsmöglichkeit des AtlasImage™ Auswerteprogramms ausgeglichen werden können, wurde die Möglichkeit genutzt, jeweils die bei einer Probenmarkierung erzielte Gesamtsondenmenge auf die Membranen aufzubringen, um möglichst alle in der Probe vorhandenen Gensequenzen durch die Hybridisierung zu erfassen. Als weitere Veränderung des Hybridisierungsprotokolles wurde ein Wechsel von chemischer Denaturierung der cDNA-Sonde vor der Hybridisierung auf eine thermische vorgenommen, was die Qualität der Hybridisierung noch etwas zu verbessern vermochte.

3.2 Versuche mit Atlas™ Rat 1.2 Arrays

Vom Typ Atlas™ Rat 1.2 Array standen vier identische Membranen zur Verfügung, die alle jeweils dreimal mit gleichartiger, radioaktiv markierter Sonden-cDNA aus drei unterschiedlichen Versuchsreihen hybridisiert worden waren.

3.2.1 Vorbereitung der Versuchsreihen und Behandlung mit TGF-β1

Jede Versuchsreihe bestand aus vier Kulturschalen mit Zellen aus derselben Passage. Die erste Versuchsreihe wurde aus Zellen der Passage 7 generiert und trägt den Namen T1, die zweite und dritte entstammen jeweils der Zellpassage 34 und haben die Namen T2 und T3 erhalten.

Mit jeder Versuchsreihe wurde gleichermaßen wie folgt verfahren: nach Aussaat von jeweils 7×10^6 Zellen pro Kulturschale und einer 24stündigen Anwachzeit wurde die Zellkonfluenz in jeder Schale bestimmt. Daraufhin wurden eine 2-, 4- und 8stündige TGF-β1-Inkubation und ein 4stündige Behandlung mit 4 mM HCl zur Generierung einer Kontrolle dergestalt vorgenommen, dass

die RNA aller Zellen zum gleichen Zeitpunkt geerntet werden konnte. Dazu wurden der ersten Kulturschale 5 ng/ml TGF- β 1 zugegeben. Nach weiteren vier Stunden wurde eine zweite Schale wiederum mit 5 ng/ml TGF- β 1 und eine dritte mit 4 mM HCl-Lösung behandelt. Noch einmal zwei Stunden später wurde die letzte Kultur mit 5 ng/ml TGF- β 1 versetzt. Alle Kulturen wurden 2 Stunden nach Behandlung der letzten Schale, also 32 Stunden nach Aussaat, aufgearbeitet. Vor dem Ernten der Zellen wurde nochmals die Zelldichte in den Schalen ermittelt.

Die jeweilige Ausgangszellzahl jeder Versuchsreihe und die daraus nach 24- bzw. 32stündigem Wachstum resultierenden Konfluenzen sind einander in Tabelle 3.1 gegenübergestellt.

Tabelle 3.1: Wachstumsverhalten der Zellen in den drei Versuchsreihen mit TGF- β 1.

Versuchsreihe	ausgesäte Zellzahl/Schale	Konfluenz nach 24h [%]	Konfluenz nach 32 h [%]
T1	7×10^6	40 - 45	60 - 65
T2	7×10^6	35 - 40	55 - 60
T3	7×10^6	40 - 50	65 - 70

Die Werte aus Tabelle 3.1 zeigen, dass sowohl innerhalb der einzelnen Versuchsreihen als auch zwischen ihnen nur geringfügige Wachstumsschwankungen der Zellen aufgetreten sind. Die Konfluenzen weichen in beiden Fällen nicht mehr als 10 % voneinander ab.

3.2.2 RNA-Isolierung und DNase-I-Verdau der Gesamt-RNA

Nach Ende der Behandlung wurde die RNA der Zellen mittels Trizol[®] isoliert, photometrisch quantifiziert und auf ihre Reinheit hin überprüft. Die Ergebnisse

der photometrischen Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen aller RNA-Proben aus den drei Versuchsreihen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2: Mengen und Qualität der in den drei Versuchsreihen isolierten Roh-RNA.

Versuchsreihe	Behandlung	RNA-Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Gesamt-RNA-Menge [μg]	Quotient E260/E280
T1	Kontrolle	4,55	227,7	2,0
	2h TGF- β 1	2,52	125,9	1,9
	4h TGF- β 1	3,96	198,1	2,0
	8h TGF- β 1	4,53	226,5	2,0
T2	Kontrolle	2,68	134,0	1,9
	2h TGF- β 1	3,49	174,3	1,9
	4h TGF- β 1	3,68	183,9	1,9
	8h TGF- β 1	2,92	145,9	1,9
T3	Kontrolle	4,02	201,0	1,9
	2h TGF- β 1	5,96	298,1	1,9
	4h TGF- β 1	4,66	233,1	1,9
	8h TGF- β 1	3,74	187,2	1,9

Aus Tabelle 3.2 ist ersichtlich, dass sich die Konzentrationen bzw. Mengen der verschiedenen RNAs in denselben Größenordnungen bewegen. Die jeweiligen Reinheitsgrade der RNAs (ausgedrückt als Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm) sind nahezu identisch.

Um mögliche DNA-Kontaminationen aus den RNA-Proben zu entfernen, wurden diese mit DNase I verdaut, da selbst kleine Spuren genomischer DNA die Hybridisierungen hätten verfälschen können. Von jeder Probe der drei Versuchsreihen wurden jeweils 100 μg RNA in einem Doppelansatz mit DNase I inkubiert. Die nach diesen Reaktionen vorliegenden RNA-Konzentrationen, die

Gesamt-RNA-Mengen sowie der Reinheitsgrad der einzelnen RNAs sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.3: RNA-Mengen und -Qualität nach DNase-I-Verdau der Roh-RNA.

Versuchsreihe	Behandlung	RNA-Konzentration nach DNase-I-Verdau [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Gesamt-RNA-Menge [μg]	Quotient E260/E280
T1	Kontrolle	1,75	52,5	2,0
	2h TGF- β 1	2,15	64,5	2,0
	4h TGF- β 1	1,29	38,7	2,0
	8h TGF- β 1	1,49	44,7	2,0
T2	Kontrolle	1,66	49,8	2,0
	2h TGF- β 1	1,86	55,8	2,0
	4h TGF- β 1	1,42	42,6	2,0
	8h TGF- β 1	1,74	52,2	2,0
T3	Kontrolle	0,61	18,3	2,0
	2h TGF- β 1	1,09	32,7	2,0
	4h TGF- β 1	1,43	42,9	2,0
	8h TGF- β 1	1,58	47,4	2,0

Bei Betrachtung der in Tabelle 3.3 aufgeführten Werte ist zu erkennen, dass die RNA-Ausbeuten nach dem DNase-I-Verdau zwar etwas variieren, aber alle RNA-Präparationen den gleichen hervorragenden Reinheitsgrad aufweisen.

Nach jeder RNA-Isolierung und nach jedem DNase-I-Verdau wurden die Proben durch Gelelektrophorese auf einem 1 %igen Agarose-Gel auf ihre Integrität hin überprüft. In der Abbildung 3.1 sind exemplarisch die RNA-Agarose-Gele einer Versuchsreihe nach RNA-Isolierung und DNase-I-Verdau der Proben gezeigt.

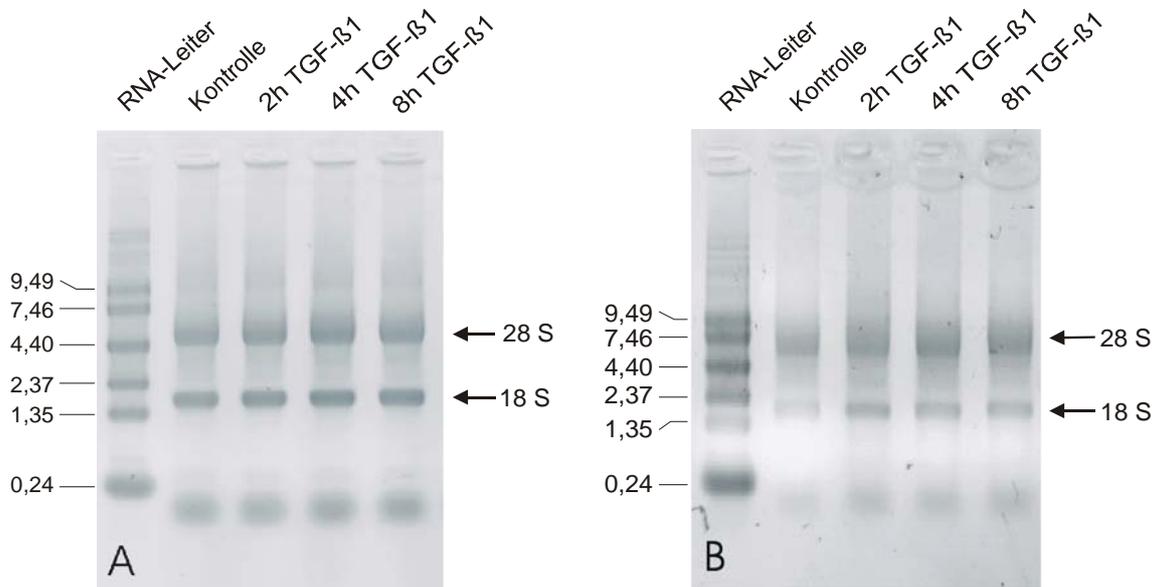


Abbildung 3.1: Analytische Agarose-Gele mit verschiedenen RNA-Präparationen einer TGF-β1-Versuchsreihe.

A: Roh-RNA-Präparationen

B: RNA-Präparation nach DNase-I-Verdau der in A gezeigten Roh-RNAs.

Auf den Bildern A und B der Abbildung 3.1 sind diskrete Banden auf der Höhe von 4,5 und 1,9 Kilobasen (kb) zu erkennen. Diese Banden repräsentieren die ribosomale 18S und 28S RNA eukaryontischer Zellen und tauchen auf, wenn die RNA intakt ist. Die zusätzlich bei kb-Werten kleiner als 0,24 erscheinenden Banden sind auf ribosomale 5S RNA und tRNA zurückzuführen.

Die Tatsache, dass in Abbildung B keine diskreten Banden mehr bei höheren kb-Werten zu sehen sind, lässt den Schluss zu, dass der DNase-I-Verdau effizient war und sich keine genomische DNA mehr in den Proben befindet. Verifiziert wurde dies durch eine anschließende RT-PCR- bzw. einfache PCR-Reaktion.

3.2.3 Kontrolle der RNA-Qualität über PCR bzw. RT-PCR

Von jeder RNA-Probe wurde vor und nach dem DNase-I-Verdau eine PCR durchgeführt. Zusätzlich wurde nach dem DNase-I-Verdau mit einem Aliquot jeder RNA-Probe eine RT-PCR vorgenommen. Dies hatte zum Ziel, mögliche Kontaminationen der Roh-RNA bzw. der DNase-I-verdauten RNA mit genomischer DNA nachzuweisen und gleichzeitig Auskunft über die Integrität der RNA zu geben, denn die RT-PCR-Reaktion kann nur gelingen, wenn die RNA intakt ist.

Die für die PCRs gewählte Primerkombination flankiert intronüberspannend einen Teilbereich des normalerweise in der Zelle nur sehr niedrig exprimierten Ha-ras-Gens. Wird RNA als Ausgangsmaterial benutzt und nach Umschreiben in die entsprechende cDNA-Sequenz für die PCR-Reaktion eingesetzt, so ist ein PCR-Produkt mit einer Länge von 262 bp zu erwarten. Taucht zusätzlich ein Fragment mit einer Basenpaarzahl von 470 auf, ist dies der Beweis für eine genomische DNA-Kontamination, da das in der genomischen DNA enthaltene Intron bei dieser Reaktion ebenfalls vervielfältigt wird und ein im Vergleich zum RNA-Produkt größeres Fragment liefert. Das Resultat einer elektrophoretischen Analyse der PCR-Produkte in einem 1,5 %igen Agarose-Gel ist in Abbildung 3.2 exemplarisch für eine Versuchsreihe dargestellt.

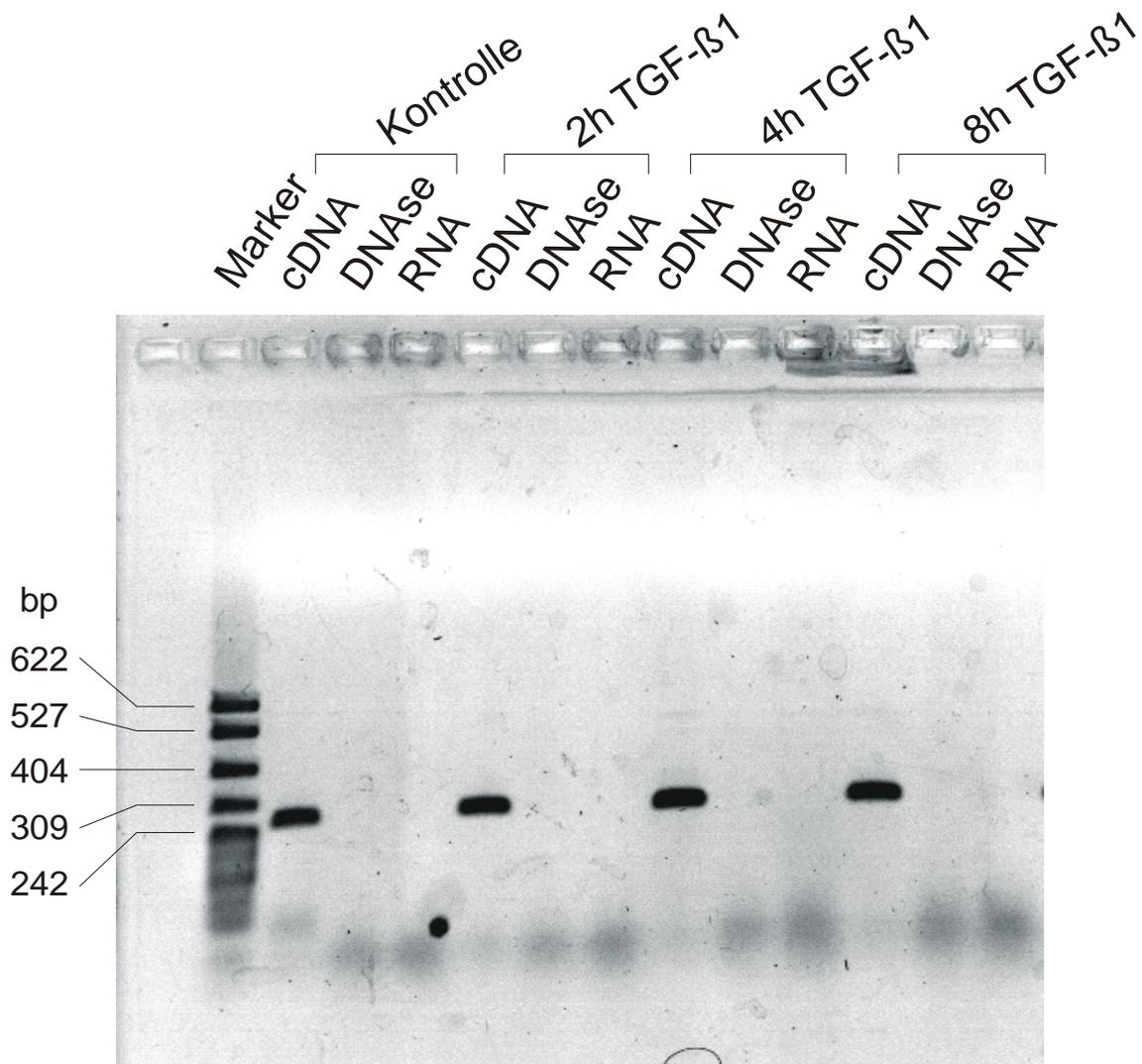


Abbildung 3.2: Auftrennung der RT-PCR- und PCR-Produkte in einem 1,5 %igen Agarose-Gel mittels Gelelektrophorese. Für die PCR-Reaktion wurde von jeder Probe cDNA aus DNase-I-verdauter RNA (cDNA), DNase-I-verdaute RNA (DNase) bzw. Roh-RNA (RNA) eingesetzt. Als Marker diente pBR 322.

In der Abbildung 3.2 zeigen sich nur nach RT-PCR (cDNA) diskrete Banden von Fragmenten, die eine Größe von 262 bp aufweisen und das Ha-ras-Gen repräsentieren. PCR-Produkte, die auf eine Kontamination mit genomischer DNA hinweisen würden, sind in diesen Präparationen nicht zu beobachten. Demzufolge waren die DNase-I-verdauten RNA-Proben für die Sondengenerierung und Hybridisierung geeignet.

3.2.4 Generierung radioaktiv markierter cDNA-Sonden

Von allen Proben jeder Versuchsreihe wurde ein Aliquot der entsprechenden RNA nach DNase-I-Verdau und positivem Reinheits- und Integritätsnachweis mittels der PowerScript™ Reversen Transkriptase in radioaktiv (^{32}P) markierte cDNA umgeschrieben. Die so generierten cDNA-Sonden wurden über Säulenchromatographie gereinigt und in einem Szintillationszähler auf ihren Radioaktivitätsgehalt hin vermessen.

Die für die einzelnen Transkriptionen eingesetzten RNA-Mengen sowie die aus den Sondenmarkierungen resultierenden Aktivitätsausbeuten sind Tabelle 3.4 zu entnehmen. Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, dass DNase-I-verdaute RNA-Mengen zwischen 2,18 und 4,30 μg zu einer in den cDNA-Sonden eingebauten Radioaktivitätsmenge von $23,6 \times 10^6$ bis $70,4 \times 10^6$ cpm führten.

Tabelle 3.4: Parameter der radioaktiven Markierung von cDNA-Sonden (^{32}P).

Versuchsreihe	Behandlung	Für die Sondengenerierung eingesetzte RNA-Menge [μg]	Markierungsausbeute [cpm]
T1	Kontrolle	3,50	$45,3 \times 10^6$
	2h TGF- β 1	4,30	$52,9 \times 10^6$
	4h TGF- β 1	2,58	$70,4 \times 10^6$
	8h TGF- β 1	2,98	$54,7 \times 10^6$
T2	Kontrolle	3,32	$46,0 \times 10^6$
	2h TGF- β 1	3,72	$44,8 \times 10^6$
	4h TGF- β 1	2,84	$39,6 \times 10^6$
	8h TGF- β 1	3,48	$37,6 \times 10^6$
T3	Kontrolle	3,05	$36,7 \times 10^6$
	2h TGF- β 1	2,18	$31,4 \times 10^6$
	4h TGF- β 1	2,86	$23,6 \times 10^6$
	8h TGF- β 1	2,68	$28,5 \times 10^6$

3.2.5 Hybridisierung und Exposition der Atlas™ Rat 1.2 Arrays

Zuerst wurden vier identische Membranen des Typs Atlas™ Rat 1.2 mit jeweils einer cDNA-Sonde aus den vier Behandlungsgruppen der Versuchsreihe T1 hybridisiert. Nachdem die Membranen hybridisiert und auf Phosphorimagerplatten expositioniert worden waren, wurden sie gestrippt und in einem zweiten Hybridisierungsdurchgang mit den korrespondierenden cDNA-Sonden aus der Versuchsreihe T2 inkubiert. Nach erneuter Exposition und anschließendem Strippen wurden die Filter zum dritten Mal mit den korrespondierenden cDNA-Sonden der Versuchsreihe T3 hybridisiert und wiederum auf Phosphorimagerplatten expositioniert.

In Tabelle 3.5 sind die Aktivitäten der eingesetzten cDNA-Sonden, die Hybridisierungsdauer mit den Membranen und die Expositionszeit der Filter auf den Phosphorimagerplatten zusammengestellt.

Tabelle 3.5: Hybridisierungsbedingungen mit cDNA-Sonden aus den drei Versuchsreihen T1, T2 und T3.

Versuchsreihe	Behandlung	eingesetzte Aktivität [cpm]	Hybridisierung [h]	Exposition [h]
T1	Kontrolle	20,0 x 10 ⁶	23,0	91
	2h TGF-β1	20,0 x 10 ⁶	23,0	91
	4h TGF-β1	20,0 x 10 ⁶	23,0	93
	8h TGF-β1	20,0 x 10 ⁶	23,0	93
T2	Kontrolle	46,0 x 10 ⁶	20,5	60
	2h TGF-β1	44,8 x 10 ⁶	20,5	60
	4h TGF-β1	39,6 x 10 ⁶	20,5	60
	8h TGF-β1	37,6 x 10 ⁶	20,5	60
T3	Kontrolle	36,7 x 10 ⁶	22,0	46
	2h TGF-β1	31,4 x 10 ⁶	22,0	46
	4h TGF-β1	23,6 x 10 ⁶	22,0	46
	8h TGF-β1	28,5 x 10 ⁶	22,0	46

Die Werte in Tabelle 3.5 illustrieren, dass für die jeweiligen Hybridisierungen Aktivitätsmengen zwischen 20×10^6 und 46×10^6 cpm eingesetzt wurden. Die Hybridisierungszeiten der Membranen mit den vier verschiedenen cDNA-Sonden aus derselben Versuchsreihe waren jeweils gleich lang gewählt. Zwischen den Versuchsreihen variierte die Dauer der einzelnen Hybridisierungen nur um maximal 2,5 h.

Um die optimale Expositionszeit der Filter mit der Phosphorimagerplatte zu ermitteln, wurden diese nach Ablauf verschieden langer Kontaktzeiten mit den Filtern in ein Phosphorimager-System eingelesen, welches die Ergebnisse der Hybridisierung in Form von Autoradiogrammen wiedergibt. Für die nachfolgende Auswertung wurde jeweils dasjenige Autoradiogramm eingesetzt, das bei möglichst geringem Hintergrund die meisten und stärksten Signale zeigte, ohne dass Überstrahlungen auftraten. Die entsprechenden optimalen Expositionszeiten sind ebenfalls in Tabelle 3.5 angegeben.

Zwei typische Autoradiogramme sind in Abbildung 3.3 exemplarisch dargestellt. Die Expositionszeiten der Membranen mit den Phosphorimagerplatten betragen jeweils 60 h.

Bei der vergleichenden Betrachtung der beiden in Abbildung 3.3 gezeigten Bilder sind schon mit bloßem Auge Unterschiede im Expressionsmuster zu erkennen. In der Abbildung B sind beispielhaft zwei Geninduktionen und zwei -suppressionen markiert.

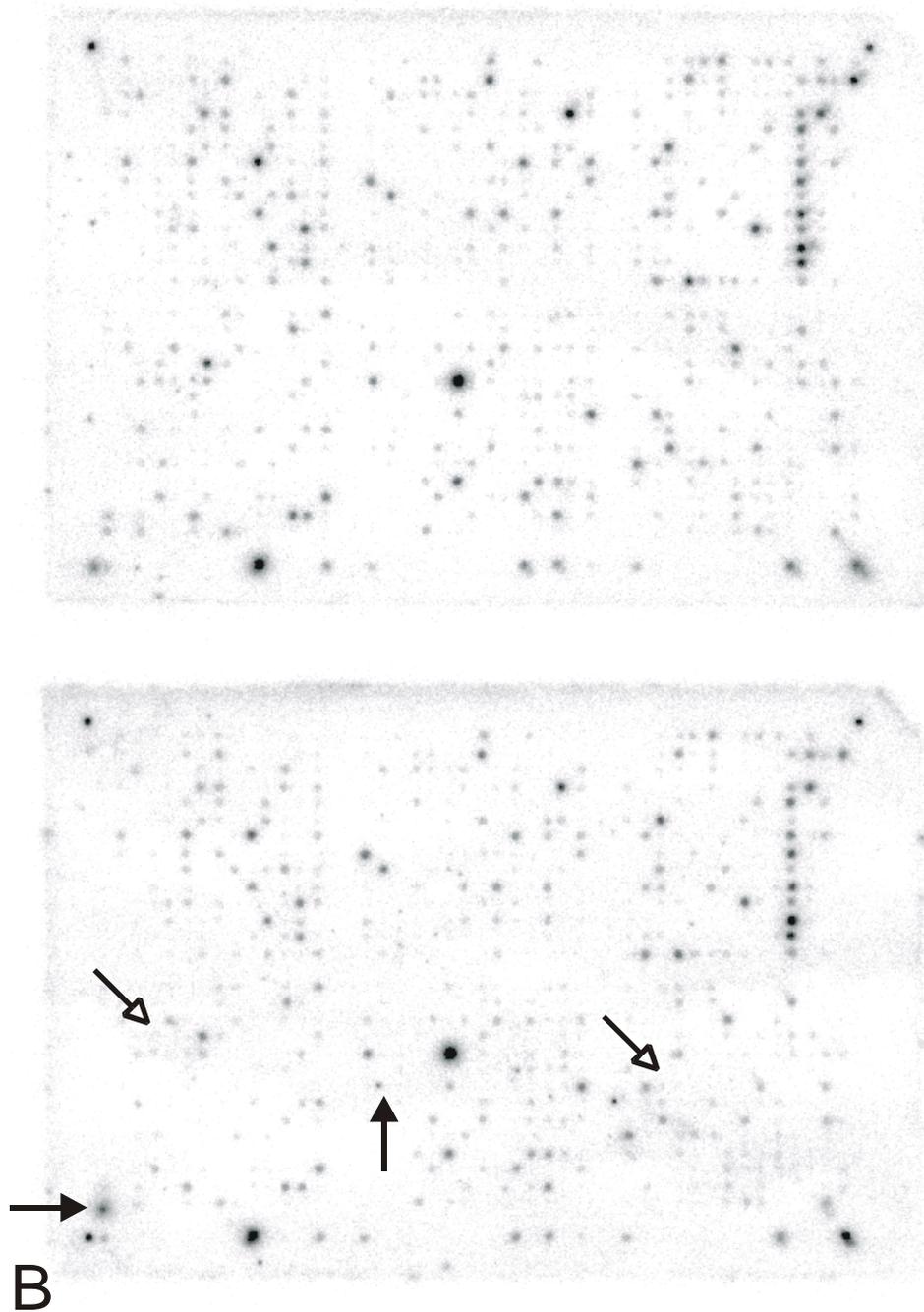


Abbildung 3.3: Exemplarische Autoradiogramme nach Hybridisierung von AtlasTM Rat 1.2-Arrays.

Bild A: Hybridisierung mit einer cDNA-Sonde aus Kontrollzellen.

Bild B: Hybridisierung mit einer cDNA-Sonde aus Zellen, die 2 h mit TGF- β 1 behandelt worden waren.

—→ Geninduktion; —▷ Gensuppression

3.2.6 Auswertung der Hybridisierungsergebnisse

Im Anschluss an die erste orientierende Betrachtung der Autoradiogramme wurde ihre detaillierte Auswertung mit dem Computerprogramm AtlasImage™ der Firma Clontech vorgenommen. Diese Software ist, wie im Methodenteil beschrieben, nach Auflage eines virtuellen Gitternetzes und Nivellierung des Hintergrundes in der Lage, die Expressionsintensitäten der einzelnen Gene von zwei Autoradiogrammen miteinander zu vergleichen. Gene, die infolge der eingestellten Auswahlkriterien Intensitätsunterschiede im Sinne einer Induktion oder Inhibition zeigen, können über die Reportfunktion des Programmes tabellarisch aufgelistet und in dieser Form gespeichert werden.

3.2.6.1 Auswertung I

Obwohl das Programm nach Vorgabe der Orientierungspunkte das Gitternetz selbständig auf das Autoradiogramm legt und die gefundenen Spots als Gene markiert, muss das Ergebnis dieses Vorgangs immer kontrolliert und gegebenenfalls editiert werden. Denn infolge der verschiedenen im Rahmen der Hybridisierung vorgenommenen Arbeitsschritte verziehen sich die Membranen, so dass eine nicht mehr völlig geradlinige Positionierung der Spots auf den Membranen resultiert. Das vom Programm aufgelegte Gitternetz ist jedoch symmetrisch. Aufgrund dessen kommt es vor, dass reale Genspots nicht als solche erkannt oder Artefakte vom Programm für Genspots gehalten werden. Solche offensichtlichen Fehler wurden auf jedem Autoradiogramm manuell korrigiert.

Daraufhin wurde innerhalb jeder Versuchsreihe das Autoradiogramm der Kontrollzellen mit den entsprechenden drei Autoradiogrammen der TGF- β 1-behandelten Zellen verglichen. Alle Gene, die nach 2-, 4- oder 8stündiger TGF- β 1-Behandlung einen gegenüber ihrer Kontrolle veränderten Intensitätsquotienten mit einem Wert von ≥ 2 oder $\leq 0,5$ zeigten, wurden als signifikant induziert bzw. inhibiert angesehen. Diese Veränderungen sind in Abbildung 3.4 für jede Versuchsreihe in Form eines Balkendiagrammes dargestellt. Die Skalierung der

Diagramme wurde logarithmisch gewählt. Das Ausmaß der Expressionsveränderung ist durch die Balkenlänge ausgedrückt. Intensitätsveränderungen, für die das Programm keinen Quotienten berechnen konnte, weil die Genexpression entweder in der Kontrolle oder in der behandelten Probe einen Wert von Null aufwies, werden in der Graphik flächenhaft bei einem Wert von Eins wiedergegeben.

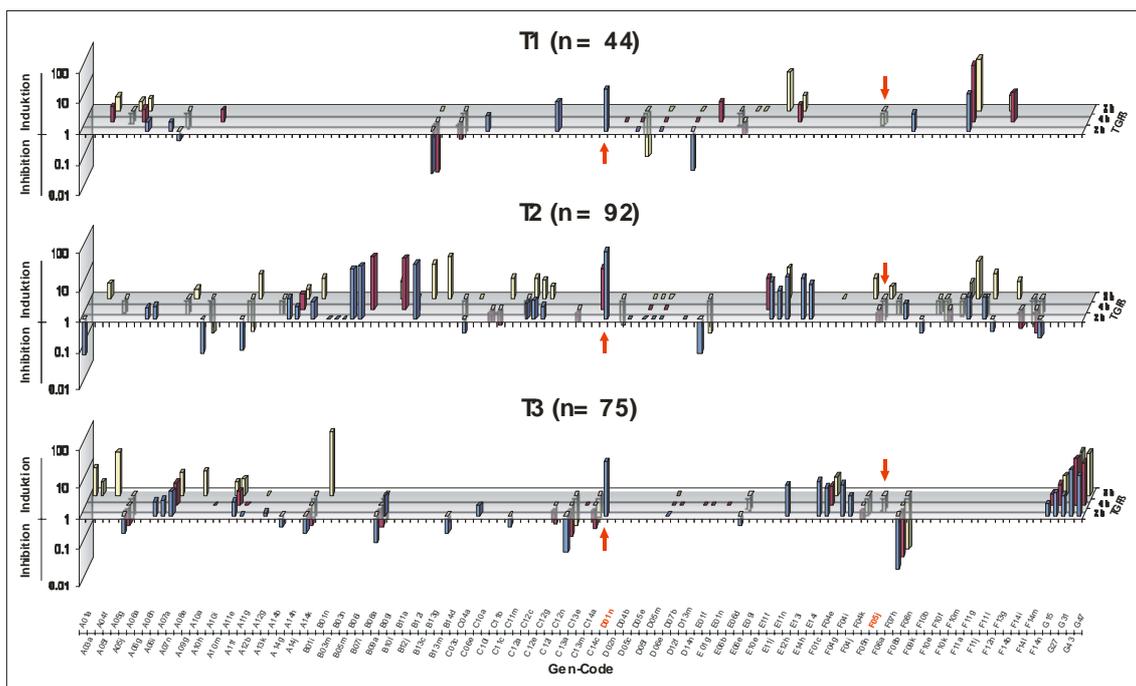


Abbildung 3.4:

Ergebnisse der Hybridisierungsversuche mit dem Atlas™ Rat 1.2 Expressions-Array aus den Versuchsserien T1, T2 und T3 (Auswertung I). Die Säulen geben die Induktions- bzw. Inhibitionsfaktoren TGF- β 1-behandelter Proben im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen an. Die Zahl (n) der in den einzelnen Versuchsserien beobachteten Expressionsänderungen ist in Klammern angegeben. Pfeile markieren Expressionsänderungen, die in identischer Form in allen Versuchsserien auftraten.

Beim Vergleich der drei Diagramme in Abbildung 3.4 fällt auf, dass die Zahl der beobachteten Expressionsveränderungen zwischen den einzelnen Versuchsserien relativ stark variiert. Lediglich zwei der Veränderungen treten in allen drei Versuchsserien in identischer Form auf.

3.2.6.2 Auswertung II

Um sicherzustellen, dass die schlechte Reproduzierbarkeit der oben aufgeführten Expressionsveränderungen nicht auf Auswertungsfehler zurückzuführen ist, wurden die Autoradiogramme in einem zweiten Auswertungsdurchgang nochmals sehr kritisch überarbeitet: Die Integration von Artefakten in die Genauswahl wurde weitestgehend dadurch ausgeschlossen, dass jedes Autoradiogramm nach Auflage des Gitternetzes in 300facher Vergrößerung betrachtet und jeder Spot eliminiert wurde, der zwar aufgrund seiner Position als Gen zu werten gewesen wäre, aber entweder bezüglich seiner Größe unter dem Durchschnitt lag oder nicht nahezu rund war.

Eine weitere Fehlerquelle liegt in der Berechnung der angepassten Signalintensität eines Spots und damit auch in der des Intensitätsverhältnisses zweier Hybridisierungssignale. In die Kalkulation beider Werte geht im Standardmodus des AtlasImageTM-Programmes nur der Mittelwert des auf der gesamten Membran vorhandenen Hintergrunds ein. Lokale Intensitätsunterschiede des Hintergrunds werden nicht berücksichtigt, obwohl diese z. T. nicht unerheblich sind. Deshalb wurde eine Hintergrundkorrektur für Spots vorgenommen, welche entweder in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem „blutenden“ Signal lagen oder sich in einem Areal befanden, dessen Hintergrund fleckig war oder in seiner Intensität von der übrigen Membran abwich. In diesen Fällen wurden die Signalstärken neben dem Standardverfahren auch über die Einstellungen *local background* und *custom external* berechnet.

Bei Verwendung des Modus *local background* wird ein Mittelwert für den das Gensignal direkt umgebenden Hintergrundbereich gebildet und für die Berechnung der angepassten Spotintensität herangezogen. Ist die Option *custom external* gewählt, kann der Benutzer ein beliebiges Areal auf der Membran markieren und einem Spot zuordnen. Die Signalstärke dieses Spots wird dann in Bezug auf die mittlere Intensität des zugewiesenen Hintergrundbereiches berechnet. Verschwand ein im Standardmodus gefundener Spot bei einer der modifizierten Intensitätsberechnungen im Hintergrund, wurde er von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Veränderte sich die Intensität eines Spots durch

die zusätzlichen Kalkulationen, wurde für die weiteren Schritte immer die Einstellung beibehalten, die den niedrigsten Signalwert erbrachte.

Mit diesen nacheditierten Autoradiogrammen wurde dann ebenso wie in der Auswertung I beschrieben verfahren: das Kontroll-Autoradiogramm jeder Versuchsreihe wurde mit den übrigen Autoradiogrammen derselben Versuchsreihe verglichen, um signifikant in der Expression veränderte Gene herauszufiltern.

Die Anzahl der nach den Auswertung I und II in jeder Versuchsreihe aufgetretenen Expressionsänderungen ist für die unterschiedlichen TGF- β 1-Behandlungszeiträume in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Tabelle 3.6: Anzahl signifikanter Genexpressionsveränderungen in den Versuchsreihen T1, T2 und T3 nach Auswertung I (I) und II (II).

Versuchsreihe	Zahl der Veränderungen nach						Gesamtzahl aufgetretener Veränderungen	
	2h TGF- β 1		4h TGF- β 1		8h TGF- β 1			
	I	II	I	II	I	II	I	II
T1	12	7	14	12	18	14	44	33
T2	36	32	14	12	42	44	92	88
T3	29	16	23	13	23	12	75	41

Für die Ergebnisse aus der Auswertung II ergibt sich ein ähnliches Bild wie für die aus der Auswertung I: auch hier variiert die Zahl der beobachteten Expressionsveränderungen zwischen den einzelnen Versuchsreihen noch relativ stark. Obwohl sich das Gesamtbild der Genexpressionsveränderungen in Bezug auf die Homogenität der Ergebnisse durch die manuelle Nachbearbeitung der Autoradiogramme nicht wesentlich verbessert hat, wurden durch die aufwendige und sorgfältige Editierung mögliche Artefakte weitestgehend eliminiert, wodurch die Validität der Ergebnisse gesteigert wird.

3.2.6.3 Vergleich der Auswertungen I und II

Nachfolgend wurden die Ergebnisse der Auswertung I mit denen der Auswertung II verglichen, um zu sehen, welche Gemeinsamkeiten zwischen ihnen bezüglich der Genexpressionsmuster bestehen. In Tabelle 3.7 sind exemplarisch für die Versuchsreihe T1 die in den Auswertungen I und II nach den verschiedenen TGF- β 1-Behandlungszeiträumen aufgetretenen Genexpressionsveränderungen einander gegenübergestellt.

Anhand der Gegenüberstellung der beiden Auswertungen ist ersichtlich, dass die stringente Zweitauswertung sowohl zum Verlust vorhandener als auch zum Auftreten neuer Expressionsänderungen führte. Da nach stabilen Genexpressionsveränderungen gesucht wurde, waren nur diejenigen von Interesse, die zumindest bei einem TGF- β 1-Behandlungszeitraum in beiden Auswertungen auftraten. Betrachtet man deshalb statt der Gesamtzahl an Expressionsänderungen die Zahl der betroffenen Gene, welche korrespondierende Veränderungen bei einem oder mehreren Untersuchungszeitpunkten zeigten, so beläuft sich deren Summe auf siebzehn. Diese Gene sind in der Tabelle 3.7 durch Schattierung hervorgehoben.

Gen-Code	2h TGF- β 1		4h TGF- β 1		8h TGF- β 1	
	I	II	I	II	I	II
A05f			x	x	x	x
A05j				x	x	
A06a					x	x
A06g			x	x	x	x
A06h	x	x				
A07n	x	x		x		x
A08e	x	x			x	x
A10m			x			
B13g	x	x	x	x	x	x
C03c			x	x	x	x
C10l	x					
C11d				x		x
C12l		x				x
C12n	x					
D01n	x	x				
D04b			x			
D05e	x		x		x	
D06e	x		x		x	
D14n	x		x		x	
E01n			x	x		
E06d					x	x
E06e			x	x		
E09i					x	
E10e					x	
E11n					x	x
E13i			x	x	x	x
F05j					x	x
F09k	x					
F11g	x	x	x	x	x	x
F13g					x	
F14b			x	x		

Tabelle 3.7:

Genexpressionsveränderungen, die in der Versuchsreihe T1 in den beiden Auswertungen I bzw. II nach unterschiedlichen TGF- β 1-Behandlungszeiträumen gefunden wurden. Das Symbol „x“ markiert, unter welchen Behandlungsbedingungen und in welcher Auswertung eine Expressionsveränderung aufgetreten ist. Korrespondierende Veränderungen in beiden Auswertungen sowie die zugehörigen Gen-Codes wurden schattiert. Zur Bezeichnung der Gene wurden die vom AtlasImageTM-Programm verwendeten Koordinatencodes eingesetzt. Die entsprechenden Gennamen sind dem Anhang (Kapitel 7.2) zu entnehmen.

Die in den Auswertungen I und II der verbleibenden zwei Versuchsreihen T2 und T3 gefundenen Expressionsveränderungen wurden einander in der gleichen Weise gegenübergestellt wie für Versuchsreihe T1 gezeigt. Die Ergebnisse dieser Vergleiche sind für alle drei Versuchsreihen in Tabelle 3.8 zusammengefasst:

Tabelle 3.8: Anzahl der Gene, die in den Auswertungen I und II bei zumindest einem TGF- β 1-Behandlungszeitpunkt eine Expressionsveränderung zeigten.

Versuchsreihe	Summe veränderter Gene in Auswertung I	Summe veränderter Gene in Auswertung II	Summe der in beiden Auswertungen veränderten Gene
T1	29	19	17
T2	73	64	44
T3	46	29	18

Tabelle 3.8 zeigt für die Versuchsreihe T2 eine gegenüber den anderen beiden Versuchsreihen deutlich abweichende Anzahl von Genen, die unter gleichen TGF- β 1-Behandlungsbedingungen in beiden Auswertungen expressionsverändert sind.

Aufgrund dieser noch immer zwischen den Versuchsreihen bestehenden Diskrepanz hinsichtlich der Genexpressionsveränderungen, wurden nachfolgend weitere mögliche Ursachen abgeklärt.

3.2.7 Vergleich der Kontroll-Autoradiogramme aller Versuchsreihen

Bisher waren die Genexpressionsveränderungen, unabhängig davon, um welche Auswertung es sich handelte, dadurch ermittelt worden, dass die aus der 2-, 4- und 8stündigen TGF- β 1-Behandlung resultierenden Autoradiogramme mit dem Kontroll-Autoradiogramm aus derselben Versuchsreihe verglichen wurden.

Bei dieser Vorgehensweise wären Divergenzen bei den Kontrollen der einzelnen Versuchsserien extrem kritisch, da sie sich auf alle Vergleiche mit den jeweiligen TGF- β 1-Behandlungsgruppen auswirken. Deshalb wurde im Folgenden abgeklärt, ob und in welchem Ausmaß die verschiedenen Kontroll-Autoradiogramme variieren. Dazu wurden die Kontroll-Autoradiogramme paarweise bezüglich ihrer Signalkonstanz miteinander verglichen.

In Tabelle 3.9 ist für jeden durchgeführten Paarvergleich die Summe der Gene wiedergegeben, deren Expression sich auf den zwei miteinander verglichenen Autoradiogrammen unterscheidet.

Tabelle 3.9: Vergleich der Kontroll-Autoradiogramme aus den Versuchsreihen T1, T2 und T3. Angegeben ist die Summe der expressionsveränderten Gene bei den jeweiligen Paarvergleichen.

„I“: Auswertung I, „II“: Auswertung II, „-“: Vergleich nicht durchgeführt

	T2 I	T3 I	T1 II	T2 II	T3 II
T1 I	38	15	3	-	-
T2 I	-	37	-	38	-
T3 I	37	-	-	-	4
T1 II	-	-	-	35	6
T2 II	-	-	35	-	25

Die Ergebnisse aus Tabelle 3.9 lassen erkennen, dass auch die Kontroll-Autoradiogramme zwischen den verschiedenen Versuchsserien und Auswertungen nicht stabil sind. Die größten Unterschiede zeigen sich bei Gegenüberstellungen, in welche die Autoradiogramme der Versuchsreihe T2 involviert sind, wobei die höchste Diskrepanz zwischen den Autoradiogrammen der Auswertungen I und II auftritt. Bei den übrigen Vergleichen sind die Abweichungen der Genexpressionen nicht so gravierend, für die Auswertungen I und II der anderen beiden Versuchsreihen gibt es sogar kaum Unterschiede.

3.2.8 Analyse der TGF- β 1-Effekte durch Permutation der Kontrollen aus den verschiedenen Versuchsreihen

Aufgrund der Unterschiede zwischen den verschiedenen Kontroll-Autoradiogrammen wurde ein Kreuzvergleich vorgenommen, bei dem jedes Zwei-, Vier- und Achtstunden TGF- β 1-Autoradiogramm nicht nur mit der Kontrolle aus der eigenen Versuchsreihe verglichen wurde, sondern auch mit den Kontrollen aus den beiden anderen Versuchsreihen. Diese Permutation wurde sowohl für alle Autoradiogramme der Auswertung I als auch der Auswertung II vorgenommen und sollte als Nachweis der Validität von Genexpressionsveränderungen dienen, wenn diese mehrfach gegen unterschiedliche Kontrollen auftraten.

Nach dieser Methode waren bei insgesamt 244 Genen Expressionsveränderungen zu beobachten. Da aber viele dieser Expressionsveränderungen nur einmal innerhalb eines Kreuzvergleiches zu beobachten waren oder bei mehrfachem Auftreten z. T. gegensinnige Verläufe (d.h. Induktion versus Inhibition) zeigten und somit eine schlechte Reproduzierbarkeit aufwiesen, wurden für die weitere Auswertung nur diejenigen Gene berücksichtigt, deren Expressionsveränderungen entweder nur Induktionen oder nur Suppressionen waren.

Die vierzehn nach dieser Selektion übrig gebliebenen Gene sind in Tabelle 3.10 aufgeführt. Die Zahlen in dieser Tabelle geben an, gegen wie viele Kontrollen eine Genexpressionsveränderung aufgetreten war. Anhand ihrer Position kann ersehen werden, in welcher Auswertung einer Versuchsreihe und unter welchen TGF- β 1-Behandlungsbedingungen diese Veränderungen vorgekommen sind.

Tabelle 3.10: Gene mit ausschließlich gleichsinnigen Expressionsveränderungen nach Permutation der Kontrollen aus den Versuchsreihen T1-T3. Die Zahlenwerte 1 - 3 geben an, gegen wie viele Kontrollen eine Expressionsveränderung auftrat. Die beiden Auswertungen sind mit „I“ bzw. „II“ gekennzeichnet. Die Versuchsreihen (T1, T2 oder T3) sowie die TGF- β 1-Behandlungszeiträume (2, 4 oder 8 h) sind ebenfalls angegeben. Die Genbezeichnungen entsprechen den vom AtlasImageTM-Programm verwendeten Koordinatencodes. Die Gennamen sind dem Anhang Kapitel 7.2 zu entnehmen.

Gen-Code	Expressionsveränderung	2h TGF- β 1						4h TGF- β 1						8h TGF- β 1					
		T1		T2		T3		T1		T2		T3		T1		T2		T3	
		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
A05f	Induktion	1	1	2	2			2	2					2	2	1	1	1	
A05i	Induktion	1	2					2	2					2	2				
A06g	Induktion			1	1		1	2	3					2	3				
A06i	Induktion	2	2	1	1	3	3	1	1			1	1	1	1			1	1
A07a	Induktion	2	2			2	1	2	2					2	2		1		
A08e	Inhibition	1	2											3	3	3	3		
C03c	Inhibition					2	2	2	2			1	1	2	2	2	2	1	1
C12a	Inhibition			1		1	1					2	2			2	2	2	2
D01n	Induktion	3	3	3	3	3													
D02c	Induktion	2	2					2	2					2	2				
D06e	Inhibition	2		2		2		2		2		2		2		2		2	
F05j	Inhibition	1	1	1	1			1	1	3	3			3	3	3	3	1	
F06a	Induktion	1	1	1	1			2	2					2	2	2	2		
F11g	Induktion	2	2	2	1			3	3					3	3	2	2		

Aus Tabelle 3.10 wurden im Weiteren diejenigen Gene herausgefiltert, deren Hybridisierungsergebnisse Grund zu der Annahme liefern, dass es sich bei den gefundenen Expressionsveränderungen um tatsächlich in den Zellen stattfindende Induktionen oder Inhibitionen handelt.

3.2.9 Einteilung der TGF- β 1-regulierten Gene in Validitätsklassen

Eine absolut valide Reproduzierbarkeit einer Expressionsveränderung läge vor, wenn ein Gen zumindest zu einem Zeitpunkt in allen Versuchsreihen und in beiden Auswertungen gegen alle Kontrollen eine stabile Veränderung zeigte. Dieses Ereignis ist allerdings bei keinem der untersuchten Gene aufgetreten. Deshalb wurden Kriterien mit abnehmender Härte definiert, nach denen die Gene verschiedenen Validitätsklassen zugeordnet wurden. Diese Validitätsklassen spiegeln die Wahrscheinlichkeit wider, mit der eine beobachtete Genexpressionsveränderung einem realen Ereignis in den Zellen entspricht. Je höher die Klassenzugehörigkeit eines Gens ist, desto verlässlicher ist das erzielte Hybridisierungsergebnis.

Für die Aufnahme eines Gens in die Klasse I müssen folgende Mindestanforderungen erfüllt sein:

- 1) Eine Expressionsveränderung muss mindestens zu einem Zeitpunkt in mindestens zwei Versuchsreihen gegen alle drei Kontrollen stabil sein.
- 2) Die Expressionsveränderungen müssen in beiden Auswertungen beobachtbar sein.

Die der Validitätsklasse I angehörenden Gene sind in Tabelle 3.11 aufgeführt.

Tabelle 3.11: Gene der Validitätsklasse I

Neben dem Gennamen und -code ist die Art der Expressionsveränderung und die entsprechende TGF- β 1-Behandlungszeit aufgeführt.

Die „Ratio“ gibt den Mittelwert des Quotienten der jeweiligen Expressionsveränderungen an (Näheres zum „Quotient“ siehe Kapitel 2.2.2.7.8 unter Material und Methoden).

Gen-Code	Gename	TGF-β1-Behandlungszeit [h]	Expressionsveränderung	Ratio
A08e	Prothymosin-alpha (PTMA)	8	Inhibition	0,41
D01n	Galaninprecursor (GALN;GAL)	2	Induktion	113,33
F05j	PDGF-associated protein	8	Inhibition	0,34

Einer zweiten Validitätsklasse gehören alle diejenigen Gene an, deren Expressionsveränderungen:

- 1) mindestens zu einem Zeitpunkt in einer Versuchsreihe gegen alle drei Kontrollen stabil sind und in einer zweiten Versuchsreihe zum selben Zeitpunkt gegen mindestens zwei Kontrollen auftreten.
- 2) in beiden Auswertungen beobachtbar sind.

Gene, welche diese Anforderungen erfüllen, sind in Tabelle 3.12 zusammengestellt.

Tabelle 3.12: Gene der Validitätsklasse II

Neben dem Gennamen und -code ist die Art der Expressionsveränderung und die entsprechende TGF- β 1-Behandlungszeit aufgeführt.

Die „Ratio“ gibt den Mittelwert des Quotienten der jeweiligen Expressionsveränderungen an (Näheres zum „Quotient“ siehe Kapitel 2.2.2.7.8 unter Material und Methoden).

Gen-Code	Gename	TGF- β 1-Behandlungszeit [h]	Expressionsveränderung	Ratio
A06i	Id-3; DNA-binding protein inhibitor; HLH protein	2	Induktion	3,09
F11g	Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	8	Induktion	24,49

Damit ein Gen in die Validitätsklasse III aufgenommen wird, werden folgende Anforderungen an seine Expressionsveränderung gestellt:

- sie muss mindestens zu einem Zeitpunkt in zwei Versuchsreihen gegen zwei Kontrollen auftreten und in beiden Auswertungen vorhanden sein **oder**
- sie muss sich in allen drei Versuchsreihen in einer Auswertung zu allen Zeitpunkten zeigen.

Die Gene der Validitätsklasse III sind in der Tabelle 3.13 gezeigt.

Tabelle 3.13: Gene der Validitätsklasse III.

Neben dem Gennamen und -code ist die Art der Expressionsveränderungen und die entsprechende TGF- β 1-Behandlungszeit aufgeführt.

Die „Ratio“ gibt den Mittelwert des Quotienten der jeweiligen Expressionsveränderungen an (Näheres zum „Quotient“ siehe Kapitel 2.2.2.7.8 unter Material und Methoden).

Gen-Code	Genname	TGF- β 1-Behandlungszeit [h]	Expressionsveränderung	Ratio
C03c	Alcohol dehydrogenase A subunit; Alcohol dehydrogenase class 1 (ADH1)	8	Inhibition	0,24
C12a	40S ribosomal protein T17 (RPT17)	8	Inhibition	0,38
F06a	ADP-ribosylation factor 5 (ART1)	8	Induktion	3,51
D06e	5-Hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B; 5-HT1B	2,4,8	Inhibition	Down

3.3 Versuche mit Atlas™ Rat Stress Arrays

Mit Hilfe der Atlas™ Rat Stress Membranen sollten die Auswirkungen einer Zellbehandlung mit den Apoptosehemmern Dexamethason, Insulin und Phenobarbital auf das Genexpressionsmuster der Zellen untersucht werden.

3.3.1 Vorbereitung der Versuchsreihen und Behandlung mit Apoptosehemmern

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente mit den Membranen des Typs Atlas™ Rat Stress wurden die Versuchsreihen S1, S2 und S3 bestehend aus jeweils vier Kulturschalen mit FTO-2B-Zellen der Passage 11, 12 bzw. 13

angesetzt. Die pro Kulturschale ausgesäte Zellzahl richtete sich nach der jeweiligen für die Versuchsreihe vorgesehenen Behandlungszeit von 4, 8 oder 16 h mit den Apoptosehemmern Phenobarbital, Insulin und Dexamethason.

Nach einer 24stündigen Anwachszeit wurde die Zelldichte in den Kulturschalen bestimmt und jeweils eine Schale jeder Versuchsreihe mit Phenobarbital, Insulin oder Dexamethason in der jeweiligen Endkonzentration von 2 mM, 10^{-7} M bzw. 10^{-8} M inkubiert. Der vierte Zellansatz jeder Versuchsreihe blieb unbehandelt und diente als Kontrolle. Nach der für jede Versuchsreihe spezifischen Bebrütungszeit wurden die Zellen nach einer weiteren Konfluenzbestimmung geerntet.

Die detaillierten Angaben zu den drei Versuchsreihen sind in Tabelle 3.14 zusammengefasst. Aus dieser Tabelle ist zu entnehmen, dass die Zellen aller Versuchsreihen ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigten.

Tabelle 3.14: Daten zu den Versuchsreihen S2, S3 und S1.

Versuchsreihe	ausgesäte Zellzahl	Konfluenz nach 24h [%]	Behandlungszeit [h]	Konfluenz beim Ernten [%]
S1	7×10^6	40 - 50	4	65 - 70
S2	7×10^6	40 - 50	8	70 - 80
S3	6×10^6	40 - 45	16	80 - 90

3.3.2 RNA-Isolierung und DNase-I-Verdau der Gesamt-RNA

Nach der für jede Versuchsreihe spezifischen Behandlungszeit mit den Apoptosehemmern Phenobarbital, Insulin und Dexamethason wurde die RNA der Zellen mittels Trizol[®] isoliert, photometrisch quantifiziert und auf ihre Reinheit hin überprüft. Die Ergebnisse der photometrischen Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen aller RNA-Proben aus den drei Versuchsreihen sind in Tabelle 3.15 aufgeführt.

Tabelle 3.15: Mengen und Qualität der in den drei Versuchsreihen isolierten Roh-RNA.

Versuchsreihe	Behandlung	RNA-Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Gesamt-RNA-Menge [μg]	Quotient E_{260}/E_{280}
S1	Kontrolle	6,40	320,0	1,9
	4h Dexa	7,14	357,0	1,9
	4h Insulin	7,12	356,0	1,9
	4h Pheno	8,29	414,5	1,9
S2	Kontrolle	7,72	386,0	1,9
	8h Dexa	8,04	402,0	2,0
	8h Insulin	8,70	435,0	2,0
	8h Pheno	9,65	482,5	2,0
S3	Kontrolle	9,81	490,5	2,0
	16h Dexa	8,32	416,0	2,0
	16h Insulin	10,39	519,5	1,9
	16h Pheno	9,86	493,0	1,9

Dexa = Dexamethason; Pheno = Phenobarbital

Aus Tabelle 3.15 ist ersichtlich, dass sich die Konzentrationen bzw. Mengen der verschiedenen RNAs in denselben Größenordnungen bewegen und ihre jeweiligen Reinheitsgrade nahezu identisch sind.

Um mögliche DNA-Kontaminationen aus den RNA-Proben zu entfernen, wurden diese mit DNase I verdaut, da selbst kleine Spuren genomischer DNA die Hybridisierungen hätten verfälschen können. Von jeder Probe der drei Versuchsreihen wurden jeweils 100 μg RNA in einem Doppelansatz mit DNase I inkubiert. Die nach diesen Reaktionen vorliegenden RNA-Konzentrationen, die Gesamt-RNA-Mengen sowie der Reinheitsgrad der einzelnen, ausgedrückt als Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm, sind in Tabelle 3.16 zusammengefasst.

Tabelle 3.16: RNA-Mengen und -Qualität nach DNase-I-Verdau der Roh-RNA.

Versuchsreihe	Behandlung	RNA-Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Gesamt-RNA-Menge [μg]	Quotient E_{260}/E_{280}
S1	Kontrolle	0,79	23,7	2,0
	4h Dexa	0,86	25,8	2,0
	4h Insulin	1,03	30,9	2,0
	4h Pheno	1,45	43,5	2,0
S2	Kontrolle	0,64	19,2	2,0
	8h Dexa	1,24	37,2	2,0
	8h Insulin	1,03	30,9	2,0
	8h Pheno	1,10	33,0	2,0
S3	Kontrolle	1,06	31,8	2,0
	16h Dexa	1,36	40,8	2,0
	16h Insulin	1,58	47,4	2,0
	16h Pheno	1,39	41,7	2,0

Dexa = Dexamethason; Pheno = Phenobarbital

Bei Betrachtung der in Tabelle 3.16 aufgeführten Werte ist zu erkennen, dass die RNA-Ausbeuten nach dem DNase-I-Verdau nur etwas variieren und alle RNA-Präparationen den gleichen hervorragenden Reinheitsgrad aufweisen.

Nach jeder RNA-Isolierung sowie nach jedem DNase-I-Verdau wurden die Proben durch Gelelektrophorese auf einem 1 %igen Agarose-Gel zum einen auf ihre Integrität zum anderen auf Verunreinigungen mit genomischer DNA hin überprüft. Neben den für die ribosomale RNA typischen 18S und 28S Banden tauchten auf den Gelen keine größeren Fragmente auf, wodurch bestätigt wurde, dass die RNA intakt war und sich keine Verunreinigungen mit genomischer DNA in den Proben befanden. Es ergab sich jeweils ein der in Abbildung 3.1 gezeigten Elektrophoresen äquivalentes Gelbild.

Im Anschluss wurden die mittels Gelelektrophorese erzielten Ergebnisse durch RT-PCR bzw. einfache PCR verifiziert.

3.3.3 Kontrolle der RNA-Qualität über PCR bzw. RT-PCR

Um die Integrität der RNAs zu bestätigen und nachzuweisen, dass die Proben frei von Kontaminationen mit genomischer DNA waren, wurde wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben mit einem Aliquot jeder RNA-Probe eine PCR vor und nach DNase-I-Verdau sowie eine RT-PCR nach DNase-I-Verdau durchgeführt. Für intakte und reine RNA-Präparationen ergab sich ein dem in Abbildung 3.2 gezeigten Gelelektrophoresebild äquivalentes Ergebnis: In den Spuren, welche mit den PCR-Produkten der Roh-RNA-Proben und denen der DNase I verdauten Proben beladen waren, fanden sich keine Banden. Die Spur mit dem RT-PCR-Produkt zeigte eine Bande bei 262 bp. Nur solche DNase-I-verdauten RNA-Proben, die intakt und frei von Kontaminationen mit genomischer DNA waren, wurden für die anschließende Sondengenerierung und Hybridisierung verwendet.

3.3.4 Generierung radioaktiv markierter cDNA-Sonden

Von jeder Probe wurde ein Aliquot RNA nach DNase-I-Verdau und positivem Reinheits- und Integritätsnachweis mittels der PowerScript™ Reversen Transkriptase in radioaktiv markierte cDNA umgeschrieben (^{32}P). Die so generierten cDNA-Sonden wurden über Säulenchromatographie gereinigt und in einem Szintillationszähler auf ihren Radioaktivitätsgehalt hin vermessen. Die für die einzelnen Transkriptionen eingesetzten RNA-Mengen sowie die aus den Sondenmarkierungen resultierenden Aktivitätsausbeuten sind der Tabelle 3.17 zu entnehmen.

Tabelle 3.17: Parameter der radioaktiven Markierung von cDNA-Sonden (^{32}P).

Versuchsreihe	Behandlung	eingesetzte RNA-Menge [μg]	Markierungsausbeute[cpm]
S1	Kontrolle	3,1	$25,1 \times 10^6$
	4h Dexa	3,0	$23,9 \times 10^6$
	4h Insulin	3,0	$26,7 \times 10^6$
	4h Pheno	2,9	$30,9 \times 10^6$
S2	Kontrolle	3,2	$24,8 \times 10^6$
	8h Dexa	3,1	$26,8 \times 10^6$
	8h Insulin	3,1	$29,8 \times 10^6$
	8h Pheno	3,3	$24,8 \times 10^6$
S3	Kontrolle	2,1	$20,2 \times 10^6$
	16h Dexa	2,7	$21,9 \times 10^6$
	16h Insulin	3,1	$26,0 \times 10^6$
	16h Pheno	2,3	$22,6 \times 10^6$

Dexa = Dexamethason; Pheno = Phenobarbital

Wie in Tabelle 3.17 aufgeführt, wurden DNase-I-verdaute RNA-Mengen zwischen 2,1 und 3,3 μg transkribiert, die zu einer in den cDNA-Sonden eingebauten Radioaktivitätsmenge von $20,2 \times 10^6$ bis $30,9 \times 10^6$ cpm führte.

3.3.5 Hybridisierung und Exposition der AtlasTM Rat Stress Arrays

Für die Hybridisierungen standen vier identische Membranen des Typs AtlasTM Rat Stress zur Verfügung. Jede dieser Membranen wurde dreimal mit den jeweils korrespondierenden cDNA-Sonden aus den drei Versuchsreihen S1, S2 und S3 hybridisiert. Zwischen den einzelnen Hybridisierungen wurden die Filter auf Phosphorimagerplatten exponiert und anschließend gestrippt, so dass sie weitestgehend rückstandsfrei für den folgenden Hybridisierungsdurchgang zur Verfügung standen.

Für die jeweiligen Hybridisierungen wurden die in Tabelle 3.17 aufgeführten Aktivitätsmengen eingesetzt. Die Hybridisierungszeiten der Membranen mit den vier verschiedenen cDNA-Sonden aus derselben Versuchsreihe waren jeweils gleich lang gewählt und lagen für die Versuchsreihe S1 bei 21 h, für S2 bei 20 h und für S3 bei 21,5 h.

Um die optimale Expositionszeit der Filter mit der Phosphorimagerplatte zu ermitteln, wurde diese nach Ablauf verschieden langer Kontaktzeiten mit den Filtern in ein Phosphorimager-System eingelesen, welches die Ergebnisse der Hybridisierung in Form von Autoradiogrammen wiedergibt. Für die nachfolgende Auswertung wurde für jede Behandlung aus jeder Versuchsreihe dasjenige Autoradiogramm in einem PC gespeichert, das bei möglichst geringem Hintergrund die meisten und stärksten Signale mit möglichst wenig Überstrahlungen zeigte. Die optimalen Expositionszeiten lagen zwischen 60 und 63 h.

In Abbildung 3.5 ist ein typisches Autoradiogramm der Atlas™ Rat Stress Membranen dargestellt.



Abbildung 3.5: Typisches Autoradiogramm nach Hybridisierung von Atlas™ Rat Stress Membranen. Auf diesen Membranen sind die einzelnen Genfragmente als Doppelspots aufgetragen. Auf dem rechten unteren Quadranten ist bis auf ein *Housekeeping Gene* keine DNA fixiert.

3.3.6 Auswertung der Hybridisierungsergebnisse

Die Auswertung der Autoradiogramme wurde mit dem Computerprogramm AtlasImage™ der Firma Clontech vorgenommen. Diese Software ist, wie im Methodenteil beschrieben, nach Vorgabe von Orientierungspunkten in der Lage, ein virtuelles Gitternetz über die Autoradiogramme zu legen, wodurch Spots erkannt und einem Gen zugeordnet werden.

Da auf den Membranen des Typs Atlas™ Rat Stress die einzelnen Gene nicht wie bei den Atlas™ Rat 1.2 Membranen durch Einzel- sondern durch Doppelspots definiert werden, ist bei ihnen die Zuordnung von Spot zu Gen weniger

stör anfällig gegen Artefakte. Trotz dieses Vorteils, musste aber dennoch eine manuelle Korrektur der Gitternetzaufgabe erfolgen.

Nachdem die Genspots erfasst worden sind, berechnet das Programm die Expressionsintensität eines jeden Gens und bestimmt anhand der zwischen den Spots aufgefangenen Signale einen mittleren Hintergrundwert. Zusätzlich werden bei Membranen mit Doppelspots die Intensitäten beider zu einem Paar gehörenden Spots miteinander verglichen. Wird dabei das sog. *Left-Right-Error-Limit* unterschritten, zeigt das Programm einen Fehler an. Dieses *Left-Right-Error-Limit* spiegelt den maximal zulässigen Quotienten der Signalintensitäten beider Spots wider und ist folgendermaßen definiert:

$(\text{Intensität des schwächeren Spots} / \text{Intensität des stärkeren Spots}) \times 100 = \text{Left-Right-Error-Limit}$

Bei allen Auswertungen wurde der in der Standardeinstellung vorgegebene Wert von 70 beibehalten.

Des Weiteren fand für die Intensitätsberechnungen der Spots nicht nur die im Standardmodus vorgesehene durchschnittliche Hintergrundintensität Verwendung, sondern es wurden auch lokale Schwankungen des Hintergrundrauschens berücksichtigt. Wie in Kapitel 3.2.6.2 beschrieben, wurden dazu die Einstellungen *local background* und *custom external* verwendet. Veränderte sich die Intensität eines Spots durch diese zusätzlichen Kalkulationen, wurde für die weiteren Schritte immer die Einstellung beibehalten, die den niedrigsten Signalwert erbrachte. Verschwand ein Spot bei einer der modifizierten Intensitätsberechnungen im Hintergrund, wurde er von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Diese Maßnahmen konnten zur Folge haben, dass ein zuvor detektiertes Unterschreiten des *Left-Right-Error-Limits* aufgehoben wurde oder dass ein solcher Fehler neu auftrat. Im letzteren Falle wurde das Spotpaar eliminiert.

3.3.6.1 Vergleich der Kontroll-Autoradiogramme der drei Versuchsserien

Zunächst wurden die Kontroll-Autoradiogramme der verschiedenen Versuchsserien in jeder möglichen Kombination paarweise miteinander verglichen, um festzustellen, ob ihre Genexpressionsmuster identisch sind oder Unterschiede aufweisen. Dabei traten Varianzen in den Genexpressionsmustern auf, die mit drei Ausnahmen nicht als zeitabhängige Induktionen oder Suppressionen der Gene zu werten waren. Um diese Schwankungen auszugleichen, wurde über die Option *Average Several Arrays* des AtlasImageTM Programmes ein Kontroll-Autoradiogramm generiert, das die gemittelten Signalintensitäten der drei Kontroll-Autoradiogramme zeigte. Dieses Durchschnitts-Kontroll-Autoradiogramm (dKo) diente im Weiteren als Referenz für die Beurteilung der Geninduktion oder -inhibition nach Behandlung der Zellen mit den Apoptosehemmern Dexamethason, Insulin und Phenobarbital.

3.3.6.2 Genexpressionsmuster der verschiedenen Apoptosehemmer

Zur Klärung der Frage, welche Veränderungen des Genexpressionsmusters durch die verschiedenen Apoptoseinhibitoren hervorgerufen werden, wurde jedes Autoradiogramm mit dem Durchschnitts-Kontroll-Autoradiogramm verglichen. Als signifikant im Sinne einer Induktion bzw. Inhibition wurden Veränderungen des Intensitätsquotienten von ≥ 2 oder $\leq 0,5$ gewertet. Die Zahl der beobachteten Expressionsänderungen ist in Tabelle 3.18 für jeden der drei Apoptoseinhibitoren separat aufgeführt.

Tabelle 3.18: Zahl der Expressionsveränderungen, die nach 4, 8 bzw. 16 h Behandlungszeit mit Dexamethason, Insulin oder Phenobarbital beobachtet wurden.

Inhibitor	Behandlungszeit		
	4h	8h	16h
Dexa	52	13	65
Insulin	26	15	58
Pheno	50	25	46

Dexa = Dexamethason; Pheno = Phenobarbital

Anschließend wurde der Frage nachgegangen, welche Gene bezüglich ihrer Induktion oder Inhibition einen Zeitgang aufweisen. Dieses Kriterium wurde von den Genen 4N (*bcl-x*; *bcl2-L1*) und 20G (*NADPH-cytochrome P450 reductase* (CPR); POR) erfüllt: beide zeigen unter Dexamethasonbehandlung eine mit der Zeit zunehmende Induktion. Bei Insulin und Phenobarbital wurden keine Gene gefunden, die einen durchgehenden Zeitgang aufweisen.

Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Apoptoseinhibitoren gleichartige oder unterschiedliche Expressionsänderungen hervorrufen, wurde nach Genen gesucht, auf welche die Behandlungen mit allen drei Apoptosehemmern dieselben Auswirkungen haben:

1. Gene, die zu allen drei Zeitpunkten von allen drei Apoptosehemmern in ihrer Expression verändert werden, konnten nicht gefunden werden.
2. Zwei Gene (AtlasImage™ Code 6I = *FK506-binding protein 12* (FKBP12) und 7L = *Crystallin alpha B* (CRYAB)) zeigten sowohl nach vier- als auch nach sechzehnständiger Inkubation mit allen drei Apoptoseinhibitoren eine Induktion.
3. Gene, die lediglich bei einem Behandlungszeitraum mit allen drei Apoptosehemmern eine Veränderung zeigten, sind in Tabelle 3.19 aufgeführt. Die Art der Veränderung (Induktion oder Inhibition) sowie der Zeitraum,

bei dem diese Expressionsveränderung auftrat, sind mit dem Symbol „x“ markiert.

Tabelle 3.19: Gene, welche nach einem Behandlungszeitraum durch alle drei Apoptoseinhibitoren (Dexamethason, Insulin und Phenobarbital) in ihrer Expression verändert wurden. Das Symbol „x“ markiert den Behandlungszeitraum, nach dem eine Genexpressionsveränderung auftrat, sowie die Art dieser Veränderung.

Die den Gen-Codes zugehörigen Gennamen sind dem Anhang Kapitel 7.2.2 zu entnehmen.

Gen-Code	Induktion	Inhibition	Behandlungszeit		
			4h	8h	16h
1C		x	x		
1M		x			x
3H	x				x
3N	x		x		
4C	x				x
4I	x				x
5K	x				x
6B	x				x
6E	x				x
6F	x				x
6H		x	x		
6J	x				x
6O	x				x
7E	x				x
7G	x				x
7H		x	x		
7I		x	x		
8D	x				x
8E	x		x		

Fortsetzung Tabelle 3.19

Gen-Code	Induktion	Inhibition	Behandlungszeit		
			4h	8h	16h
8F	x				x
8L	x				x
8M	x		x		
9F	x				x
9N	x		x		
9O	x				x
10B	x				x
10D	x				x
11D	x				x
11G	x				x
11H	x		x		
14B	x				x
18G	x				x
18H	x				x
20C	x				x
20H	x				x
23D	x				x

Es fällt auf, dass die in Tabelle 3.19 aufgeführten Gene vornehmlich nach sechzehnständiger Inkubation durch die verschiedenen Apoptosehemmer induziert werden, eine Inhibition wurde nur bei fünf Genen beobachtet.

Im Weiteren wurde ermittelt, welche Gene durch zwei Inhibitoren nach zumindest zwei Behandlungszeiträumen expressionsverändert waren:

1. Auch bei dieser Betrachtung fand sich kein Gen, das zu allen drei Zeitpunkten in gleicher Weise von zwei Apoptosehemmern beeinflusst worden wäre.

2. Diejenigen Gene, welche nach zwei Behandlungszeiträumen Veränderungen in ihrem Expressionsmuster zeigten, sind in Tabelle 3.20 aufgelistet.

Tabelle 3.20: Gene, welche durch zwei der drei Apoptoseinhibitoren nach zwei Behandlungszeiträumen gleichsinnig in ihrer Expression verändert wurden. Das Symbol „x“ markiert, durch welche Apoptoseinhibitoren und nach welchen Behandlungszeiträumen gleichartige Genexpressionsveränderungen auftraten sowie die Art der Veränderung.

Gen-Code	Induktion	Inhibition	Behandlung			Behandlungszeit		
			Dexa	Insulin	Pheno	4h	8h	16h
4N	x		x	x		x		x
10B	x		x		x	x		x
14D	x		x		x	x		x
20G	x		x	x			x	x
22E		x	x	x		x	x	

Dexa = Dexamethason; Pheno = Phenobarbital; 4N = Bcl-2-like protein 1 (BCL2L1), Bcl-X; 10B = *Cyclin G-associated kinase* (GAK); 14D = *RecA-like protein HsRad51, DNA repair protein RAD51 homolog*; 20G = NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR), POR; 22E = *Organic cation transporter 1A* (OCT1A)

Anhand der Ergebnisse zeigt sich, dass die drei ausgewählten Apoptosehemmer Dexamethason, Insulin und Phenobarbital partiell überlappende Induktions- und Inhibitionsspektren besitzen, wobei neben den in Tabelle 3.20 aufgeführten Genen, die durch zumindest zwei Verbindungen induziert wurden, vor allem FKBP12 und CRYAB, die durch alle drei Verbindungen induziert wurden, von besonderem Interesse sind (siehe Kapitel 4.4).

4 DISKUSSION

Die in dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsstudien sollten zur Klärung der Frage beitragen, welche Gene an der durch TGF- β 1 ausgelösten Apoptose beteiligt sind. Als Zellsystem dienten Hepatomzellen der Linie FTO-2B, von denen bekannt ist, dass sie auf die Einwirkung von TGF- β 1 mit einer starken Apoptoseinduktion reagieren (Buchmann *et al.*, 1999; Buenemann *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde an denselben Zellen untersucht, wie ihr Genexpressionsmuster durch antiapoptotische Verbindungen beeinflusst wird. Hierfür wurden die Zellen mit einem Tumorpromotor (Phenobarbital) bzw. zwei hormonartig wirksamen Substanzen (Dexamethason, Insulin) behandelt. Durch die Verwendung von cDNA-Expressions-Arrays konnten bei den TGF- β 1-Versuchsreihen 1 176 Gene (AtlasTM Rat 1.2 Array) und bei den Versuchen mit den antiapoptotischen Verbindungen 207 Gene (AtlasTM Rat Stress Arrays) simultan in einem Hybridisierungsgang auf Expressionsveränderungen hin überprüft werden.

4.1 Auswertung der mit den Expressions-Arrays erhaltenen Versuchsdaten

Zur Erfassung der TGF- β 1-vermittelten Genexpressionsveränderungen wurden drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt, bei denen jeweils RNAs aus Kontrollzellen sowie aus 2, 4 bzw. 8 Stunden mit TGF- β 1 behandelten Zellen isoliert und für Hybridisierungen mit den AtlasTM Rat 1.2 Arrays eingesetzt wurden. Obwohl die Versuchsbedingungen konstant gehalten, aus den Zellkulturen RNA-Mengen annähernd gleicher Quantität und Qualität isoliert und die von Clontech vorgegebenen Arbeitsvorschriften für die Sondengenerierung und -markierung sowie die Hybridisierungs- und Expositionsbedingungen optimiert wurden, waren die in den drei Versuchsreihen erzielten Hybridisierungsergebnisse bei Verwendung der Standardauswertung sehr heterogen. Deshalb wurde die im Ergebnisteil beschriebene, äußerst aufwendige zusätzliche Auswertung durchgeführt, bei welcher zunächst jeder einzelne Signalspot auf den erhalte-

nen Autoradiogrammen bezüglich möglicher Artefakte kontrolliert und gegebenenfalls manuell nacheditiert wurde. Anschließend wurden Kreuzvergleiche vorgenommen, innerhalb derer jedes Autoradiogramm der verschiedenen TGF- β 1-Behandlungszeiträume mit den Kontrollen aller Versuchsreihen verglichen wurde. Gene, die bei diesen Permutationen gegen alle Kontrollen stabile Veränderungen zeigten, d. h. durchgehend induziert oder inhibiert waren, wurden entsprechend der im Ergebnisteil aufgeführten Auswahlkriterien einer von drei Validitätsklassen zugeordnet. Die auf diese Art und Weise herausgefilterten Gene sind in Tabelle 4.1 aufgelistet, wobei Gene der Klasse I die höchste Priorität besitzen. Vier dieser Gene waren durch TGF β im Vergleich zu Kontrollen induziert, während fünf der Gene eine erniedrigte Expression aufwiesen. Unter den induzierten Genen befindet sich auch das PAI-1 (*Plasminogen activator inhibitor-1*)-Gen, dessen Expression ca. 25fach im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen induziert wurde. PAI-1 wurde in der Literatur mehrfach als TGF- β 1-reguliertes Gen in unterschiedlichen Zelltypen, darunter auch Hepatomzellen, beschrieben. Zudem konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die regulatorische Promotorregion dieses Gens TGF β /Smad-responsive Elemente enthält (Keeton *et al.*, 1991; Riccio *et al.*, 1992; Song *et al.*, 1998). Durch das Auffinden dieses Gens in der vorliegenden Expressionsstudie wird die Validität des gewählten Auswerteverfahrens erhärtet.

Tabelle 4.1: Gene, die durch Behandlung von FTO-2B-Zellen mit TGF- β 1 in ihrer Expression verändert wurden (Details siehe Ergebnisteil 3.2.8)

Validitätsklasse	Genname	Zeitpunkt des Effektes [h]	Effekt
I	Prothymosin-alpha (PTMA)	8	Inhibition
I	Galaninprecursor (GALN;GAL)	2	Induktion
I	PDGF-associated protein	8	Inhibition
II	Id-3; DNA-binding protein inhibitor; HLH protein	2	Induktion
II	Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	8	Induktion
III	Alcohol dehydrogenase A subunit; Alcohol dehydrogenase class 1 (ADH1)	8	Inhibition
III	40S ribosomal protein S17 (RPS17)	8	Inhibition
III	ADP-ribosylation factor 5 (ARF5)	8	Induktion
III	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B; 5-HT1B	2, 4, 8	Inhibition

In einer zweiten Versuchsserie wurden Genexpressionsveränderungen, die durch verschiedene antiapoptotische Substanzen hervorgerufen werden, analysiert. Hierfür wurden FTO-2B-Zellen mit Phenobarbital, Insulin bzw. Dexa-

methason über 4, 8 bzw. 16 Stunden behandelt, und anschließend wurden die Genexpressionsmuster mit Hilfe der AtlasTM Rat Stress Arrays ermittelt. Da alle drei Verbindungen jeweils nur in einer Versuchsserie getestet wurden, können die Ergebnisse in Anbetracht der oben für TGF- β 1 beschriebenen Probleme mit der Reproduzierbarkeit des verwendeten Systems nur als grob orientierend eingestuft werden. Trotzdem wäre bei Induktion einheitlicher oder überlappender Expressionsmuster durch die verschiedenen Apoptosesuppressoren zu erwarten, dass zumindest die wichtigsten antiapoptotischen Kandidatengene aufgefunden werden, da für jede Verbindung Daten aus jeweils drei Untersuchungszeitpunkten vorlagen. Die Auswertung der Versuchsergebnisse ergab kein durchgehend einheitliches Induktions- oder Inhibitionsspektrum der drei ausgewählten Apoptosesuppressoren; es konnten jedoch drei interessante Gene identifiziert werden. Eines dieser Gene ist Bcl-x, dessen Protein (Bcl-x_L), wie in der Einleitung beschrieben, eine ausgeprägte antiapoptotische Aktivität besitzt. Eine Induktion des Bcl-x_L-Proteins durch Dexamethason wurde bereits früher in FTO-2B-Zellen beschrieben, während Insulin in diesen Untersuchungen keinen Effekt zeigte (Buenemann *et al.*, 2001). Zwei weitere hochinteressante Gene, die durch alle drei Apoptosesuppressoren induziert wurden, sind FKBP12 (*FK506 binding protein 12*) und CRYAB (*crystallin alpha B*). Diese beiden Proteine können an unterschiedlichen Stellen in den Apoptoseprozess eingreifen und sollen nachfolgend etwas detaillierter vorgestellt werden (siehe Kapitel 4.4).

4.2 Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Microarray-Studien zu TGF- β 1-induzierten Genexpressionsveränderungen in Hepatozyten

Um zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich TGF- β 1-induzierter Genexpressionsveränderungen mit denen anderer Microarray-Studien vergleichbar sind, wurde die Literatur auf solche Analysen hin durchgesehen. Tatsächlich wurden zu diesem Thema in den letzten Jahren verschiede-

ne Untersuchungen mit ganz unterschiedlichen Zellsystemen publiziert. Zwei dieser Untersuchungen, die sich auf hepatozelluläre Systeme beziehen, sollen nachfolgend kurz diskutiert werden.

In einer bereits im Jahr 2000 veröffentlichten Studie wurden Mäuse mit drei unterschiedlichen adenoviralen Vektorkonstrukten infiziert, von welchen eines ein Transgen für TGF- β 1 trug und zur Expression dieses Proteins in der Leber führte. Mit Hilfe eines 588 Gene fassenden Maus-cDNA-Arrays der Firma Clontech wurden die Unterschiede im Genexpressionsmuster in der Leber von vektorinfizierten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Mäusen untersucht. Insgesamt wurden aus der Gesamtzahl der detektierten Expressionsveränderungen zwanzig Gene als signifikant verändert herausselektiert, von denen dreizehn durch das TGF- β 1-Transgen in ihrer Expression beeinflusst worden waren (Haberberger *et al.*, 2000). Von diesen Genen sind nur zwei, nämlich das für IGFBP-1 und Cathepsin L, auch auf den in dieser Arbeit verwendeten AtlasTM Rat 1.2 Arrays enthalten. Beide Gene zeigten allerdings in TGF- β 1-behandelten FTO-2B Hepatomzellen keine signifikanten Expressionsveränderungen. Bei der Suche nach verwandten Genen auf den AtlasTM Rat 1.2 Arrays, z. B. aus der Gruppe der Glutathion-S-Transferasen, Interleukine oder Interferon-induzierbaren Proteine, die sich unter den als verändert beschriebenen Genen befinden, wurden ebenfalls keine Übereinstimmungen gefunden. Diese Diskrepanzen könnten darin begründet sein, dass in der Arbeit von Haberberger *et al.* (2000) wesentlich kleinere Expressionsunterschiede als signifikant gewertet wurden, als es in der hier vorliegenden Arbeit der Fall war. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass bei den Untersuchungen mit den vektorinfizierten Mäusen Leberhomogenate eingesetzt wurden, so dass außer Hepatozyten auch andere Zelltypen, die TGF- β 1-abhängigen Expressionsveränderungen unterliegen können, im Probenmaterial enthalten waren. Im Gegensatz dazu wurde bei den Versuchen mit FTO-2B-Zellen eine homogene Zellpopulation verwendet.

In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie (Coyle *et al.*, 2003) wurden FaO-Zellen, ebenfalls eine Ratten-Hepatomlinie, über vier, acht bzw. sechzehn Stunden mit TGF- β 1 behandelt und die daraus resultierenden Genexpressionsveränderungen über Microarrays detektiert, auf denen rund 5 500 Gene aufge-

druckt waren. Diese Studie ist prinzipiell ähnlich aufgebaut wie die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, lediglich die TGF- β 1-Dosis (0,5 versus 5 ng/ml) sowie der Beobachtungszeitraum (4 - 16 versus 2 - 8 Stunden) sind etwas unterschiedlich. Diese Unterschiede könnten eventuell für die vergleichende Interpretation der Ergebnisse relevant sein. In der genannten Publikation wurden insgesamt 142 Gene gefunden, die zeitabhängige Expressionsveränderungen nach TGF- β 1-Behandlung zeigten, wobei 32 Gene durch TGF- β 1 induziert und 110 Gene reprimiert wurden. Zusätzlich wurden 119 Gene beschrieben, die durch Vorbehandlung mit einem Caspase-Inhibitor (Z-VAD-fmk) in ihrer Expression beeinflusst worden waren und möglicherweise an sekundären Stressreaktionen der Zellen beteiligt sind. Die differentiell exprimierten Gene wurden in drei Gruppen eingeteilt: 25 Gene, welche für Komponenten des Cytoskeletts oder der extrazellulären Matrix kodieren, 26 durch TGF- β 1 induzierte Gene, die mit Apoptose in Verbindung gebracht werden können und alle einen deutlichen Zeitgang zeigten sowie 9 herunterregulierte Gene, welche für Proteine aus antioxidativen Stoffwechselwegen kodieren (Coyle *et al.*, 2003). Von den in der Publikation namentlich genannten Genen sind insgesamt zwölf ebenfalls auf dem AtlasTM Rat 1.2 Array enthalten, fünf aus der Gruppe der Apoptose-assoziierten Gene (BAD, ANX1, SCA1, BTG1 und WEE1) sowie zwei aus der Antioxidantien-Gruppe (GLCLC und GSS) und fünf aus der mit Caspase-Inhibitor vorbehandelten Gruppe (CD5, MX1, IGFBP-1, BTG2 und GADD153). Allerdings zeigten diese Gene bei den in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Hybridisierungen entweder keine Expressionsveränderungen (SCA1, BTG1, WEE1, GLCLC, CD5, MX1 und GADD153) oder nur geringe (BAD, ANX1 und BTG2) oder variable Effekte (GSS und IGFBP-1), die aufgrund der eingesetzten stringenten Auswertekriterien nicht als signifikant gewertet wurden.

Die Frage, warum keine Übereinstimmungen der hier vorliegenden Hybridisierungsergebnisse mit den publizierten Daten gefunden werden konnten, lässt sich nicht eindeutig beantworten. Eine wichtige Rolle spielen sicherlich die von den einzelnen Arbeitsgruppen angewandten Auswerteverfahren bzw. angelegten Auswertekriterien. Möglicherweise führte das in dieser Arbeit benutzte,

durch die mangelnde Stabilität des Systems bedingte strikte Auswerteverfahren dazu, dass vorhandene Geninduktionen oder -inhibitionen verloren gingen, wodurch die tatsächliche Zahl an Expressionsveränderungen unterschätzt wird. Außerdem könnten Unterschiede in den verwendeten Zellsystemen, wie z. B. Sensitivität gegenüber TGF- β 1 sowie im experimentellen Design (TGF- β 1-Dosis bzw. „Dosisäquivalente“ der adenoviralen Vektorkonstrukte; Zeitpunkte der Probenaufarbeitung und dadurch erfassbare Expressionsveränderungen) von Bedeutung sein.

4.3 Welche der identifizierten Gene könnten für die Apoptoseinduktion durch TGF- β 1 relevant sein?

Die in Tabelle 4.1 aufgelisteten Gene wurden in der vorliegenden Arbeit als TGF- β 1-responsiv in FTO-2B-Zellen identifiziert. Nicht alle dieser Gene müssen jedoch zwangsläufig direkt an der Induktion von Apoptose durch TGF- β 1 beteiligt sein. Deshalb sollen nachfolgend nur diejenigen Gene kurz diskutiert werden, für die aus der Literatur eindeutige Beziehungen zum Prozess der Apoptose bekannt sind.

A. PAI-1:

PAI-1 ist ein bekanntes TGF- β 1 Zielgen, das auch in FTO-2B-Zellen durch TGF- β 1-Behandlung deutlich induziert wurde. Eine zwischen den Versuchsreihen variable Induktion trat bereits nach 2stündiger Behandlung auf, ein nach den Auswahlkriterien signifikanter Effekt wurde erst nach acht Stunden beobachtet.

PAI-1 ist ein Inhibitor der Urokinase- und *Tissue-type* Plasminogenaktivatoren und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Fibrinolyse, Wundheilung, Angiogenese, Umbau der Extrazellulärmatrix und Tumorentstehung (Stefansson *et al.*, 2003; Rakic *et al.*, 2003). Durch Hemmung der Vitronectin-abhängigen Zelladhäsion ist PAI-1 in der Lage, die Apoptose von vaskulären Zellen zu beschleunigen und ist dadurch zumindest indirekt in den Apopto-

seprozess involviert (Al-Fakhri *et al.*, 2003). In Versuchen mit PAI-1-knockout-Mäusen konnte umgekehrt gezeigt werden, dass in diesen Tieren die Tumorentwicklung nach Implantation von Fibrosarkomzellen langsamer abläuft als in entsprechenden Kontrolltieren mit intakter PAI-1-Expression, wobei der PAI-1-Verlust sowohl zu einer verringerten Proliferations- als auch einer erhöhten Apoptoserate in Tumoren der Knockout-Tiere führte (Gutierrez *et al.*, 2000). Diese Effekte sind vermutlich wiederum indirekt und auf eine reduzierte Angiogenese zurückzuführen.

B. Galanin:

Die Expression von Galanin war in unstimulierten FTO-2B Kontrollen praktisch nicht nachweisbar und konnte durch Behandlung mit TGF- β 1 innerhalb von zwei Stunden ca. 110fach induziert werden. Die Galaninexpression zeigte somit den stärksten und über alle Versuchsreihen stabilsten Induktionseffekt. Die Expressionserhöhung von Galanin war transient und lag nach 4stündiger TGF- β 1-Behandlung bereits wieder auf dem Niveau von Kontrollzellen.

Galanin ist ein multifunktionelles Neuropeptid, das vor allem im peripheren und zentralen Nervensystem exprimiert wird und an zahlreichen biologischen und pathologischen Vorgängen beteiligt ist. So spielt es z. B. eine Rolle bei der Modulation der Acetylcholinfreisetzung und Neuroregeneration sowie bei neurologischen Erkrankungen wie Alzheimer (Wynick *et al.*, 2001; Vrontakis, 2002). Die Effekte von Galanin werden durch Aktivierung spezifischer G-Proteingekoppelter Rezeptoren, von denen bei Säugern bis heute drei identifiziert wurden (GalR1-3), vermittelt. Neben den seit längerem bekannten Funktionen im Nervensystem konnte kürzlich eine Beteiligung von Galanin an der Apoptoseregulation in Thymozyten nachgewiesen werden. Ausgehend von der Beobachtung, dass eine Behandlung von juvenilen, 20 Tage alten Ratten mit Galanin zu einer Reduktion des Thymusgewichts führt, konnten Trejter *et al.* (2002) durch *In-vitro*-Studien zeigen, dass die Apoptoserate unreifer Thymozyten durch Behandlung mit Galanin ca. 10fach im Vergleich zu Kontrollzellen gesteigert wird. Dieser Effekt war an eine ligandenabhängige Aktivierung von Galaninrezepto-

ren gebunden, da die Apoptoseinduktion durch gleichzeitige Gabe eines Galaninrezeptor-Antagonisten komplett unterbunden werden konnte (Trejter *et al.* 2002). Aufgrund dieser Beobachtungen kann spekuliert werden, dass die TGF- β 1-induzierte Apoptose in FTO-2B-Zellen möglicherweise über einen autokrinen bzw. parakrinen Mechanismus durch Galanin vermittelt wird. Diese Hypothese könnte in einem zukünftigen Projekt durch analoge Versuche in FTO-2B-Zellen mit Galanin bzw. TGF- β 1 und Galaninrezeptor-Antagonisten verifiziert werden.

C. Prothymosin- α :

Die Expression von Prothymosin- α wurde in FTO-2B-Zellen durch Inkubation mit TGF- β 1 reprimiert. Nach 8stündiger Behandlung waren die Expressionsspiegel im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen um mehr als die Hälfte reduziert.

Prothymosin- α ist ein in praktisch allen Säugerzellen exprimiertes Protein mit vorwiegend nukleärer Lokalisation, dessen biologische Funktion über lange Zeit kontrovers diskutiert wurde (Segade und Gómez-Márquez, 1999; Pineiro *et al.*, 2000). Nach heutigem Kenntnisstand spielt Prothymosin- α eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellproliferation und Apoptose sowie bei der Tumorentstehung. So konnte z. B. gezeigt werden, dass die Expressionshöhe dieses Proteins in Brusttumoren mit der Prognose der Patienten korreliert, wobei Personen mit hohen Prothymosin- α -Gehalten in Brusttumoren ein höheres relatives Risiko für Metastasierungen und eine geringere Überlebenschance aufweisen als solche mit geringer Expression (Magdalena *et al.*, 2000). Auch menschliche hepatozelluläre Karzinome weisen erhöhte Prothymosin- α -Gehalte auf (Wu *et al.*, 1997).

Viele Zellen reagieren auf eine Wachstumsstimulation mit einer Erhöhung der Prothymosin- α -Expression; so wurden auch während der Leberregeneration erhöhte Mengen dieses Proteins in Rattenhepatozyten beschrieben (Bustelo *et al.*, 1991). Umgekehrt führt die Eliminierung von Prothymosin- α , z. B. durch Behandlung von Zellen mit Antisense-Oligonukleotiden, zu einer Proliferations-

hemmung und Induktion von Apoptose (Rodríguez *et al.*, 1999). Das Auftreten von Apoptose nach Depletion von Prothymosin- α weist auf eine antiapoptotische Wirkung dieses Proteins hin, die durch Überexpression des Proteins in HeLa-Zellen bestätigt werden konnte (Evstafieva *et al.*, 2003). Interessanterweise wird Prothymosin- α während der Apoptose durch Caspasen proteolytisch gespalten, wodurch seine subzelluläre Lokalisation verändert und die apoptosesupprimierende Wirkung ausgeschaltet wird (Evstafieva *et al.*, 2000 und 2003).

Der Mechanismus der antiapoptotischen Wirkung von Prothymosin- α wurde in einer eleganten Studie von Jiang *et al.* (2003) aufgeklärt. Diese Autoren konnten zeigen, dass Prothymosin- α in der Lage ist, die Bildung des Apoptosoms und damit die Aktivierung von Caspase-9 zu unterdrücken, wobei Zellen, bei welchen Prothymosin- α durch RNA-Interferenz mit inhibitorischen RNAi-Molekülen ausgeschaltet wurde, eine erhöhte Apoptosesensitivität aufwiesen (Jiang *et al.*, 2003). Insgesamt lässt sich die hemmende Wirkung von Prothymosin- α auf die Apoptose direkt mit der onkogenen Eigenschaft dieses Proteins in Verbindung bringen.

Die Beobachtung, dass die Transkription von Prothymosin- α in FTO-2B-Zellen unter TGF- β 1-Einwirkung heruntergeregelt wird, läuft konform zu den Ergebnissen der oben vorgestellten Arbeiten. Da die Prothymosin- α -Spiegel erst nach 8stündiger Behandlung deutlich reduziert waren, ist allerdings unklar, ob der Verlust dieses Proteins direkt für die Auslösung der Apoptose durch TGF- β 1 verantwortlich ist oder nur die Exekution der Apoptose begünstigt.

4.4 Welche Gene könnten eine Hemmung der TGF- β 1-induzierten Apoptose vermitteln?

A. FKBP12:

Die Expression von FKBP12 (*FK506 binding protein 12*) wurde durch alle drei untersuchten antiapoptotischen Verbindungen (Phenobarbital, Insulin und Dexamethason) in FTO-2B-Zellen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen

induziert, und könnte somit einen zentralen Angriffspunkt für die Hemmung der TGF- β 1-induzierten Apoptose durch diese Substanzen darstellen.

FKBP12 gehört zur Gruppe der Immunophiline und ist z. B. an der Vermittlung immunsuppressiver Wirkungen von Makroliden wie Rapamycin beteiligt (Huang *et al.*, 2003). Bestimmte Makrolid-Derivate werden zur Zeit auch für die Tumorthherapie entwickelt, wobei das therapeutische Wirkprinzip auf ihrer Bindung an FKBP12 und einer dadurch bedingten Inaktivierung nachgeschalteter Kinase-signalwege beruht (Dancey und Sausville, 2003). Eine der wichtigen physiologischen Funktionen von FKBP12 liegt darin, die accidentielle Aktivierung des TGF- β 1-Rezeptorsystems und somit eine Signalübertragung unter suboptimalen Bedingungen zu unterdrücken (Wang und Donahoe, 2004). Bei Abwesenheit von TGF- β 1 bindet FKBP12 an die GS-Domäne von TGF- β -Typ-I Rezeptoren (T β R-I) und stabilisiert diese in einer inaktiven Konformation (Wang *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Huse *et al.*, 1999). Nach Bindung des TGF- β -Liganden und Bildung des T β R-I/T β R-II-Rezeptorkomplexes führt die Phosphorylierung der GS-Domäne des T β R-I durch T β R-II dazu, dass FKBP12 vom Rezeptor abdissoziiert, wodurch T β R-I seine aktive Konformation einnimmt (Huse *et al.*, 2001). Der aktivierte T β R-I ist dann in der Lage, rezeptorabhängige Smad-Proteine zu binden, die nach Phosphorylierung die Signalweiterleitung in den Kern bewerkstelligen (siehe Einleitung 1.7.2). Aufgrund der inhibitorischen Wirkung von FKBP12 auf das TGF- β -Rezeptorsystem ist eine direkte Beteiligung dieses Proteins bei der Hemmung der TGF- β 1-induzierten Apoptose in FTO-2B-Zellen durch Phenobarbital, Insulin und Dexamethason wahrscheinlich.

B. CRYAB:

Ein weiteres Gen, das durch alle drei untersuchten antiapoptotischen Verbindungen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen induziert wurde, ist CRYAB (*crystallin alpha B; α B-crystallin*). CRYAB gehört zur Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine, die als *Chaperone* z. B. an Proteinfaltungsprozessen beteiligt sind und durch unterschiedliche Stressbedingungen induziert werden

können. Verschiedene Hitzeschockproteine sind in der Lage, die durch diverse Stimuli ausgelöste Apoptose zu unterdrücken (Takayama *et al.*, 2003).

Antiapoptotische Wirkungen von CRYAB werden als ein zentraler Mechanismus bei der Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Chemotherapeutika diskutiert (Wittig *et al.*, 2002). CRYAB spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose von Myokardzellen. So konnte z. B. gezeigt werden, dass die differenzierungsabhängige Apoptose von Myoblasten durch Überexpression von CRYAB unterdrückt wird (Kamradt *et al.*, 2002). Darüber hinaus kann die stressinduzierte Apoptose von Myozyten durch Induktion und Phosphorylierung von CRYAB deutlich gehemmt werden (Hoover *et al.*, 2000; Morrison *et al.*, 2003). Die antiapoptotische Wirkung von CRYAB beruht auf einer Interferenz mit der Aktivierung der Effektor-Caspase-3, wobei die autokatalytische Prozessierung und Reifung zur voll aktiven Form durch Bindung von CRYAB an eine partiell prozessierte Zwischenform dieser Caspase unterbunden wird. Somit greift CRYAB an einer zentralen Schaltstelle in der Phase der Apoptose-Exekution ein und kann dadurch sowohl die über Todesrezeptoren als auch die mitochondrial vermittelte Apoptose hemmen (Kamradt *et al.*, 2001).

Die Induktion von CRYAB durch Phenobarbital, Insulin und Dexamethason in FTO-2B-Zellen könnte erklären, warum diese Verbindungen noch relativ spät im Apoptoseprozess protektiv wirksam sind (Buchmann *et al.*, 1999). Da in den vorliegenden Untersuchungen zwei Gene identifiziert wurden (FKBP12 und CRYAB), die durch alle drei Verbindungen induziert werden, lässt sich möglicherweise ein gemeinsamer Wirkmechanismus für diese aus ganz unterschiedlichen Substanzgruppen stammenden Apoptosesuppressoren postulieren.

4.5 Fazit

Der entscheidende Vorteil von Filtersystemen zur Analyse von Genexpressionsmustern liegt darin, dass sich in einem Arbeitsgang sehr viele Expressionsveränderungen simultan erfassen lassen. Allerdings sollte der benötigte Zeit- und Arbeitsaufwand zur Auswertung und Selektion stabil auftretender Gen-

expressionsveränderungen nicht unterschätzt werden. Nicht zuletzt aufgrund der Probleme mit der Reproduzierbarkeit der Hybridisierungsergebnisse bei dem verwendeten System ist dieses Verfahren alleine nicht ausreichend, um zuverlässige Aussagen über relevante Expressionsveränderungen treffen zu können. Deshalb sollte zumindest eine weitere Detektionstechnik zur Verifizierung der erzielten Hybridisierungsergebnisse herangezogen werden. Hier bieten sich quantitative PCR-Verfahren (z. B. über LightCycler-PCR) oder Western-Analysen auf Proteinebene an. Dennoch stellt das gewählte Verfahren eine geeignete Screeningmethode dar, mit der potentiell relevante Gene für die Apoptoseinduktion durch TGF- β 1 sowie die antiapoptotische Wirkung von Phenobarbital, Insulin und Dexamethason identifiziert werden können.

4.6 Ausblick

Aufgrund der Tatsache, dass die Apoptose, wie in der Einleitung beschrieben, in zahlreiche physiologische Vorgänge wie die Organo- und Ontogenese sowie die Organhomöostase im adulten Organismus involviert ist und ihre Dysregulation zu einer Vielzahl von Krankheiten beiträgt, bietet sich die Modulation von Apoptose als Angriffspunkt für therapeutische Intervention bei unterschiedlichen Dysfunktionen an. Grundlegende Voraussetzung hierfür ist ein fundiertes Verständnis der zugrunde liegenden apoptotischen Signalwege und der an der Signaltransduktion und Apoptoseausführung beteiligten Komponenten.

Das Cytokin TGF- β 1, zu dessen spezifischen Funktionen u. a. die Kontrolle von Zelldifferenzierung, Proliferation und Aktivierungszustand des Immunsystems gehören, ist in der Lage, Apoptose in vielen Körperzellen auszulösen (Letterio *et al.*, 1998; Schuster und Kriegelstein, 2002). So wird auch die Erhaltung der Organhomöostase in der Leber entscheidend durch TGF- β 1 beeinflusst und Fehlsteuerungen im TGF- β 1-Signalweg können zu verschiedenen Erkrankungen beitragen. Erhöhte TGF- β 1-Expressionsraten finden sich z. B. bei chronischen Lebererkrankungen, die mit fibrotischem Umbau des Lebergewebes einhergehen (Patel *et al.*, 1998). Deshalb richtet sich die Forschung darauf, Medi-

kamente zu entwickeln, die antifibrotisch wirken, indem sie TGF- β 1 abfangen oder in die TGF- β 1-Synthese und den TGF- β 1-Signalweg eingreifen. In vielen Krebszellen wiederum ist die Apoptose zum Erliegen gekommen, entweder durch Störungen in proapoptotischen Signalwegen oder durch Überexpression antiapoptotischer Signalmoleküle. Nach heutigen Erkenntnissen wirken die meisten der verwendeten Chemotherapeutika wie auch die Strahlentherapie über die Induktion von Apoptose. Demzufolge könnten Defekte im apoptotischen Programm ein Therapieversagen begünstigen oder gar verursachen (Lowe und Lin, 2000). In solchen Fällen wäre es von großem Nutzen, wenn es möglich wäre, Apoptose in Krebszellen selektiv zu induzieren. Diese beiden exemplarisch genannten Krankheitsbilder zeigen, dass therapeutische Ansätze sowohl zur Reduktion überschießender als auch zur Rekonstitution verminderter Apoptose verfolgt werden müssen, durch welche die Höhe der Apoptoserate je nach Bedarf manipuliert werden kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

TGF- β 1 ist ein Cytokin, das in Hepatozyten neben Wachstumsarrest auch Apoptose auslösen kann. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, zur Klärung der Frage beizutragen, welche Gene für die durch TGF- β 1 induzierte Apoptose verantwortlich sind. Hierfür wurden Mikroarrays des Typs AtlasTM Rat 1.2 der Firma Clontech eingesetzt, über welche die gleichzeitige Analyse von Expressionsänderungen in knapp 1200 Genen möglich ist. Die Untersuchungen wurden mit Hepatomzellen der Linie FTO-2B, die auf eine TGF- β 1-Behandlung mit einer starken Apoptoseantwort reagieren, durchgeführt. Nach Hybridisierung der Arrays mit cDNAs aus drei unabhängigen Versuchsreihen wurden die Genexpressionsmuster von Kontrollzellen und TGF- β 1-behandelten Zellen kreuzweise miteinander verglichen und die Gene mit den stabilsten Expressionsänderungen wurden den Validitätsklassen I - III wie folgt zugeordnet:

- I: *Prothymosin- α , Galaninprecursor, PDGF-associated protein (HASPP28)*
- II: *Inhibitor of DNA binding 3/dominant negative helix-loop-helix protein, plasminogen activator inhibitor-1*
- III: *alcohol dehydrogenase 1/alcohol dehydrogenase A subunit, 40S ribosomal protein S17, ADP-ribosylation factor 5, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B*

Zumindest für Prothymosin- α und Galanin ist aufgrund von Literaturrecherchen eine direkte Beteiligung an der Apoptoseregulation wahrscheinlich, für PAI-1 erscheint eine indirekte Beteiligung möglich. In einer weiteren Versuchsserie wurde untersucht, ob die antiapoptotischen Verbindungen Dexamethason, Insulin und Phenobarbital ihre protektive Wirkung über die Induktion einheitlicher Genexpressionsmuster vermitteln. Hierfür wurden die jeweiligen Expressionsmuster mit Hilfe von AtlasTM Rat Stress Arrays, die ca. 200 Gene umfassen, analysiert. Zwei der identifizierten Gene, FKBP12 (*FK506 binding protein 12*) und CRYAB (*α B-crystallin*), wurden durch alle drei Verbindungen induziert, wodurch sich gemeinsame Angriffspunkte sowohl auf der Ebene der TGF- β 1-Rezeptoraktivität (FKBP12) als auch bei der Aktivierung der Caspase-3 (CRYAB) ergeben könnten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., and Akey, C. W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* **9**, 423 - 432
- Adams, J. M. and Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322 - 1326
- Al-Fakhri, N., Chavakis, T., Schmidt-Wöll, T., Huang, B., Cherian, S. M., Bobryshev, Y. V., Lord, R. S. A., Katz, N., and Preissner, K. (2003) Induction of apoptosis in vascular cells by plasminogen activator inhibitor-1 and high molecular weight kininogen correlates with their anti-adhesive properties. *Biol. Chem.* **384**, 423 - 435
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998) Death receptors: signalling and modulation. *Science* **281**, 1305 - 1308
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 255 - 260
- Bratton, S. B., Walker, G., Srinivasula, S. M., Sun, X. M., Butterworth, M., Alnemri, E. S., and Cohen, G. M. (2001) Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J.* **20**, 998 - 1001
- Buchmann, A., Willy, C., Buenemann, C. L., Stroh, C., Schmiechen, A., and Schwarz, M. (1999) Inhibition of transforming growth factor beta1-induced hepatoma cell apoptosis by liver tumor promoters: characterization of primary signalling events and effects on CPP32-like caspase activity. *Cell Death Differ.* **6**, 190 - 200
- Buenemann, C. L., Willy, C., Buchmann, A., Schmiechen, A., and Schwarz, M. (2001) Transforming growth factor- β 1-induced Smad signalling, cell-cycle arrest and apoptosis in hepatoma cells. *Carcinogenesis* **22** (3), 447 - 452
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 269 - 290
- Bursch, W., Taper, H. S., Lauer, B., and Schulte-Hermann, R. (1985) Qualitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death (apoptosis) during regression of rat liver hyperplasia. *Virchows Arch. Cell Patho.* **50**, 153 - 166
- Bursch, W., Oberhammer, F., and Schulte-Hermann, R. (1992) Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends. Pharm. Sci.* **13**, 245 - 251

- Bursch, W., Oberhammer, F., Jirtle, R. L., Askari, M., Sedivy, R., Grasl-Kraupp, B., Purchio, A. F., and Schulte-Hermann, R. (1993) Transforming growth factor- β 1 as a signal for induction of cell death by apoptosis. *Br. J. Cancer* **67**, 531 - 536
- Bustelo, X. R., Otero, A., Gómez-Márquez, J. and Freire, M. (1991) Expression of the rat prothymosin α gene during T-lymphocyte proliferation and liver regeneration. *J. Biol. Chem.* **266**, 1443 - 1447
- Cain, K. and Freathy C. (2001) Liver toxicity and apoptosis: role of TGF- β 1, cytochrome c and the apoptosome. *Toxicol. Lett.* **120**, 307 - 315
- Carson, D. A. and Tan, E. M. (1995) Apoptosis and rheumatic disease. *Bull. Rheum. Dis.* **44**, 1 - 3
- Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., and Lenardo, M. J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signalling. *Science* **288**, 2351 - 2354
- Chang, H. Y. and Yang, C. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 821 - 846
- Chen, Y. G., Liu, F., and Massagué, J. (1997) Mechanism of TGF β receptor inhibition by FKBP12. *EMBO* **16**, 3866 - 3876
- Chen, R. H., Su, Y. H., Chuang, R. L. C., and Chang, T. Y. (1998) Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene* **17**, 1959 - 1968
- Choi, K. S., Lim, I. K., Brady, J. N., and Kim, S. J. (1998) ICE-Like protease (caspase) is involved in transforming growth factor beta1-mediated apoptosis in FaO rat hepatoma cell line. *Hepatology* **27**, 415 - 421
- Chomczynski, P and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156 - 159
- Cook, T. and Urrutia, R. (2000) TIEG proteins join the Smads as TGF- β -regulated transcription factors that control pancreatic cell growth. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **278**, G513 - G512
- Cory, S. and Adams, J. M. (2002) The bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 647 - 656
- Coyle, B., Freathy, C., Gant, T. W., Roberts, R. A., and Cain, K. (2003) Characterization of the transforming growth factor- β 1-induced apoptotic transcriptome in FaO hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 5920 - 5028

- Dancey, J. and Sausville, E. A. (2003) Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat. Rev.* **2**, 296 - 313
- Derynck, R. and Zhang, Y. E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* **425**, 577 - 584
- Davidson, F. F. and Steller, H. (1998) Blocking apoptosis prevents blindness in *Drosophila* retinal degeneration mutants. *Nature* **39**, 587 - 591
- De Souza, A. T., Hankins, G. R., Washington, M. K., Orton, T. C., and Jirtle, R. L. (1995) M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nat. Genet.* **11**, 447 - 449
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by elimination IAP inhibition. *Cell* **102**, 33 - 42
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383 - 424
- Ellis, R. E., Yuan, J., and Horvitz, H. R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **7**, 663 - 698
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43 - 50
- Evan, G. and Littlewood, T. (1998) A matter of life and cell death. *Science* **281**, 1317 - 1322
- Evstafieva, A. G., Belov, G. A., Kalkum, M., Chichkova, N. V., Bogdanov, A. A., Agol, V. I., and Vartapetian, A. B. (2000) Prothymosin alpha fragmentation in apoptosis. *FEBS Lett.* **467**, 150 - 154
- Evstafieva, A. G., Belov, G. A., Rubtsov, Y. P., Kaklum, B. J., Chichkova, N. V., Sukhacheva, E. A., Gogdanov, A. A., Pettersson, R. F., Agol, V. I., and Vartapetian, A. B. (2003) Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin alpha. *Exp. Cell Res.* **284**, 211 - 223
- Fabregat, I., Herrera, B., Fernandez, M., Alvarez, A. M., Sánchez, A., Roncero, C., Ventura, J. - J., Valverde, A. M., and Benito, M. (2000) Epidermal growth factor impairs the cytochrome c/caspase-3 apoptotic pathway induced by transforming growth factor beta in rat fetal hepatocytes via a phosphoinositide 3-kinase-dependent pathway. *Hepatology* **32**, 528 - 535
- Feldmann, G. (1997) Liver apoptosis. *J. Hepatol.* **26** (Suppl. 2), 1 - 11

- Ferri, K. F. and Kroemer, G. (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* **3**, 255 - 263
- Fesik, S. W. and Shi, Y. (2001) Controlling caspases. *Science* **294**, 1477 - 1478
- Freathy, C., Brown, D. G., Roberts, R. A., and Cain, K. (2000) Transforming growth factor-beta1 induces apoptosis in rat FaO hepatoma cells via cytochrome c release and oligomerization of Apaf-1 to form a similar to 700-kd apoptosome caspase-processing complex. *Hepatology* **32**, 750 - 760
- Friedlander, R. M., Gangliardini, V., Wang, J., Brown, R. H., and Yuan, J. (1997) Protection in an ALS model by a dominant negative ICE inhibitor. *Nature* **388**, 31 - 38
- Furlan, R., Martino, G., Galbiati, F., Poliani, P. L., Smiroldo, S., Bergami, A., Desina, G., Comi, G., Flavell, R., Su, M. S., and Aadorini, L. (1999) Caspase-1 regulates the inflammatory process leading to autoimmune demyelination. *J. Immunol.* **163**, 2403 - 2409
- Gleizes, P. - E., Munger, J. S., Nunes, I., Harpel, J. G., Mazzieri, R., Noguera, I. and Rifkin, D. B. (1997) TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells* **15**, 190 - 197
- Grasl-Kraupp, B., Bursch, W., Ruttkay-Nedecky, B., Wagner, A., Lauer, B., and Schulte-Hermann, R. (1994) Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9995 - 9999
- Grenn, D. R. and Reed, J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309 - 1312
- Gross, A., Yin, X. - M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S. J. (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* **274**, 1156 - 1163
- Gutierrez, L. S., Schulman, A., Brito-Robinson, T., Noria, F., Ploplis, V. A., and Castellino, F. J. (2000) Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res.* **60**, 5839 - 5847
- Haberberger, T. C., Kupfer, K., and Murphy, J. E. (2000) Profiling of genes which are differentially expressed in mouse liver in response to adenoviral vectors and delivered genes. *Gene Ther.* **7**, 903 - 909
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57 - 70

- Hasmall, S. C. and Roberts, R. A. (1999) The perturbation of apoptosis and mitosis by drugs and xenobiotics. *Pharmacol. Ther.* **82**, 63 - 70
- Herrera, B., Alvarez, A. M., Sánchez, A., Fernández, M., Roncero, C., Benito, M., and Fabregat, I. (2001a) Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *FASEB J.* **15**, 741 - 751
- Herrera, B., Fernández, M., Alvarez, A. M., Roncero, C., Benito, M., Gil, J., and Fabregat, I. (2001b) Activation of caspases occurs downstream from radical oxygen species production, Bcl-xL down-regulation, and early cytochrome c release in apoptosis induced by transforming growth factor beta in rat fetal hepatocytes. *Hepatology* **34**, 548 - 556
- Herrera, B., Murillo, M. M., Álvarez-Barrientos, A., Beltrán, J., Fernández, M., and Fabregat, I. (2004) Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor- β in fetal rat hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 16 - 26
- Horvitz, H. R. (1999) Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* **59**, 1701 - 1706
- Hoover, H. E., Thuerauf, D. J., Martindale, J. J., and Glembotski, C. C. (2000) α B-crystallin gene induction and phosphorylation by MKK6-activated p38. *Biol. Chem.* **275**, 23825 - 23833
- Huang, S., Bjornsti, M. A., and Houghton, P. J. (2003) Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. *Cancer Biol. Ther.* **2** (3), 222 - 232
- Hung, W. C., Chang, H. C., and Chuang, L. Y. (1998) Transforming growth factor beta1 potently activates CPP32-like proteases in human hepatoma cells. *Cell. Signal.* **10**, 511 - 515
- Huse, M., Chen, Y - G., Massagué, J., and Kuriyan, J. (1999) Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF β receptor in complex with FKBP12. *Cell* **96**, 425 - 436
- Huse, M., Muir, T. W., Xu, L., Chen, Y. - G., Kuriyan, J., and Massagué, J. (2001) The TGF β receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol. Cell* **8**, 671 - 682
- Inayat-Hussain, S. H., Couet, C., Cohen, G. M., and Cain, K. (1997) Processing/activation of CPP32-like proteases is involved in transforming growth factor beta(1)-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* **25**, 1516 - 1526
- Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 637 - 643

- Jang, C. - W., Chen, C. - H., Chen, C. - C., Chen, J. - Y., Su, Y. - H., and Chen, R. - H. (2001) TGF- β induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat. Cell Biol.* **4**, 51 - 58
- Jiang, X. and Wang, X. (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 31199 - 31203
- Jiang, X., Kim, H. - E., Shu, H., Zhao, Y., Zhang, H., Kofron, J., Donnelly, J., Burns, D., Ng, S. - C., Rosenberg, S., and Wang, X. (2003) Distinctive roles of PHAP proteins and Prothymosin- α in a death regulatory pathway. *Science* **299**, 223 - 226
- Kamradt, M. C., Chen, F., and Cryns, V. L. (2001) The small heat shock protein α B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and Caspase-8-dependent activation of Caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. *Biol. Chem.* **276**, 16059 - 16063
- Kamradt, M. C., Chen, F., Sam, S., and Cryns, V. L. (2002) The small heat shock protein α B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting Caspase-3 activation. *Biol. Chem.* **277** (41), 38731 - 38736
- Kanzler, S. and Galle, P. R. (2000) Apoptosis and the liver. *Semin. Cancer Biol.* **10**, 173 - 184
- Keeton, M. R., Curriden, S. A., van Zonneveld, A. - J., and Loskutoff, D. J. (1991) Identification of regulatory sequences in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene responsive to transforming growth factor β . *J. Biol. Chem.* **266** (34), 23048 - 23052
- Kerr, J. F. R. (1971) Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* **105**, 13 - 20
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239 - 257
- Kim, B. - C., Mamura, M., Choi, K. S., Calabretta, B., and Kim, S. - J. (2002) Transforming growth factor β 1 induces apoptosis through cleavage of BAD in a Smad3-dependent mechanism in FaO hepatoma cells. *Mol. Cell Biol.* **22**, 1369 - 1378
- Kingsley, D. M. (1994) The TGF- β superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* **8**, 133 - 146

- Koli, K., Saharinen, J., Hyytiäinen, M., Penttinen, C., and Keski-Oja, J. (2001) Latency, activation, and binding proteins of TGF- β . *Microsc. Res. Techniq.* **52**, 354 - 362
- Krammer, P. H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789 - 795
- Kroemer, G., Zamzami, N., and Susin, S. A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* **18**, 44 - 51
- Lennon, S. V., Marin, S. J., and Cotter, T. G. (1991) Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* **24**, 203 - 214
- Letterio, J. L. and Robert, A. B. (1998) Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 137 - 161
- Li, H., Zhu, H., Xu, C., and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491 - 501
- Lowe, S. W. and Lin, A. W. (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21**, 485 - 495
- Lu, K. X. and Lodish, H. F. (1996) Signalling by chimeric erythropoietin-TGF- β receptors: Homodimerization of the cytoplasmic domain of the type I TGF- β receptor and heterodimerization with the type II receptor are both required for intracellular signal transduction. *EMBO J.* **15**, 4485 - 4496
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998) BID, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481 - 499
- Magdalena, C., Dominguez, F., Loidi, L., and Puente, J. L. (2000) Tumour prothymosin alpha content, a potential prognostic marker for primary breast cancer. *Brit. J. Cancer* **82**, 584 - 90
- Martin, J. B. (1999) Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1970 - 1980
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S. A., Beutner, G., Brdieszka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J. D., and Kroemer, G. (1998) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* **187**, 1261 - 1271
- Massagué, J., Cheifetz, S., Boyd, F. T., Anders, J. L. (1990) TGF- β receptors and TGF- β binding proteoglycans: Recent progress in identifying their functional properties. *Ann. NY Acad. Sci* **593**, 59 - 72

- Massagué, J. (1998) TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 753 - 791
- Massagué J. (2000) How cells read TGF- β signals. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 169 - 178
- Massagué, J. and Chen, Y. - G. (2000) Controlling TGF- β signalling. *Genes & Dev.* **14**, 627 - 644
- Morrison, L. E., Hoover, H. E., Thuerauf, D. J., and Glembotski, C. C. (2003) Mimicking phosphorylation of α B-crystallin on serine-59 is necessary and sufficient to provide maximal protection of cardiac myocytes from apoptosis. *Circ. Res.* **92**, 203 - 211
- Oberhammer, F., Bursch, W., Parzefall, W., Breit, P., Erber, E., Stadler, M., and Schulte-Hermann, R. (1991) Effects of transforming growth factor β on cell death of cultured rat hepatocytes in primary culture. *Cancer Res.* **51**, 2478 - 2485
- Oberhammer, F., Pavelka, M., and Sharma, S. (1992) Induction of apoptosis in cultures hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor β 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5408 - 5412
- Oberhammer, F., Bursch, W., Tiefenbacher, R., Fröschl, G., Pavelka, M., Purchio, T., and Schulte-Hermann, R. (1993) Apoptosis is induced by transforming growth factor β 1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of the DNA. *Hepatology* **18** (5), 1238 - 1246
- Oberhammer, F., Nagy, P., Tiefenbacher, R., Fröschl, G., Bouzahzah, B., Thorgeirsson, S. S., and Carr, B. (1996) The antiandrogen cyproterone acetate induces synthesis of transforming growth factor β 1 in parenchymal cells of the liver accompanied by an enhanced sensitivity to undergo apoptosis and necrosis without inflammation. *Hepatology* **23** (2), 329 - 337
- Ona, V. O., Li, M., Vonsattel, J. P., Andrews, L. J., Khan, S. Q., Chung, W. M., Frey, A. S., Menon, A. S., Li, X. J., Stieg, P. E., Yuan, J., Penney, J. B., Young, A. B., Cha, J. H., and Foster, R. M. (1999) Inhibition of Caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* **399**, 263 - 267
- Patel, T., Roberts, L. R., Jones, B. A., and Gores, G. J. (1998) Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Semin. Liver Dis.* **18**, 105 - 114
- Pineiro, A., Cordero, O. J., and Nogueira, M. (2000) Fifteen years of prothymosin alpha: contradictory past and new horizons. *Peptides* **21**, 1433 - 1446

- Rakic, J. M., Maillard, C., Jost, M., Bajou, K., Masson, V., Devy, L., Lambert, V., Foidart, J. M., and Noel, A. (2003) Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 463 - 473
- Ribeiro, A., Bronk, S. F., Roberts, P. J., Urrutia, R., and Gores, G. (1999) The transforming growth factor β 1-inducible transcription factor, TIEG1, mediates apoptosis through oxidative stress. *Hepatology* **30**, 1490 - 1497
- Riccio, A., Pedone, P. V., Lund, L. R., Olesen, T., Steen Olsen, H., and Andreasen, P. A. (1992) Transforming growth factor β 1-responsive element: closely associated binding sites for USF and CCAAT-binding transcription factor-nuclear factor I in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene. *Mol. Cell. Biol.* **12** (4), 1846 - 1855
- Rich, J. N., Borton, A. J., and Wang, X. - F. (2001) Transforming growth factor- β signalling in cancer. *Microsc. Res. Techniq* **52**, 363 - 373
- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I. A., Debatin, K. M., Fischer, A., and de Villarty, J. P. (1995) Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* **268**, 1347 - 1349
- Rifkin, D. B., Gleizes, P. E., Harpel, J., Nunes, I., Munger, J., Mazzieri, R., and Noguera, I. (1997) Plasminogen/plasminogen activator and growth factor activation. *Ciba Found. Symp.* **212**, 105 - 115
- Roberts, R. A., James, N. H., and Cosulich, S. C. (2000) The role of protein kinase B and mitogen-activated protein kinase in epidermal growth factor and tumor necrosis factor alpha-mediated rat hepatocyte survival and apoptosis. *Hepatology* **31**, 420 - 427
- Rodriguez, P., Vinuela, J. E., Alvarez-Fernandez, L., and Gómez-Márguez, J. (1999) Prothymosin alpha antisense oligonucleotides induce apoptosis in HL-60 cells. *Cell Death Differ.* **6**, 3 - 5
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487 - 91
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96 - 99
- Sánchez, A., Alvarez, A. M., Benito, M., and Fabregat, I. (1996) Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *J. Biol. Chem.* **271**, 7416 - 7422

- Sánchez, A., Álvarez, A. M., Benito, M., and Fabregat, I. (1997) Cycloheximide prevents apoptosis, reactive oxygen species production, and glutathione depletion induced by transforming growth factor beta in fetal rat hepatocytes in primary culture. *Hepatology* **26**, 935 - 943
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Agarose Gel Electrophoresis. In: *Molecular Cloning a laboratory manual*, CSH, Second Edition, Kapitel 6
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) DNA/RNA qualification. In: *Molecular Cloning a laboratory manual*, CSH, Second Edition, Kapitel 6
- Schmitz, I., Kirchhoff, S., and Krammer, P. (2000) Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 1123-1136
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Grasl-Kraupp, B., Torok, L., Ellinger, A., and Mullauer, L. (1995a) Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* **82/83**, 143 - 148
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W., and Grasl-Kraupp, B. (1995b) Active cell death (apoptosis) in liver biology and disease. *Prog. Liver Dis.* **13**, 1 - 35
- Schulte-Hermann, R., Grasl-Kraupp, B., and Bursch, W. (1995) Apoptosis and hepatocarcinogenesis. In: *Liver Regeneration and Carcinogenesis*, Kapitel 7, 141 - 178
- Schulte-Hermann, R., Zimmermann-Trosiener, I., Barthel, G., and Bursch, W. (1995) DNA synthesis, apoptosis and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. *Cancer Res.* **50**, 5127 - 5135
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Löw-Baselli, A., Wagner, A., and Grasl-Kraupp, B. (1997) Apoptosis in the liver and its role in hepatocarcinogenesis. *Cell Bio. Toxicol.* **13**, 339 - 348
- Schuster, N. and Kriegelstein, K. (2002) Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis. *Cell Tissue Res.* **307**, 1 - 14
- Schwarz, M., Buchmann, A., and Bock, K. - W. (1995) Role of cell proliferation at early stages of hepatocarcinogenesis. *Toxicol. Lett.* **82/83**, 27 - 32
- Schwarz, M. und Bock, K. - W. (1998) Mechanismen der Entstehung fremdstoffbedingter Krebsformen. In: *Handbuch der molekularen Medizin: Tumorerkrankungen*. Eds.: D. Ganten und K. Ruckpaul, Springer-Verlag, Berlin pp. 27 - 49
- Segade, F. and Gómez-Márquez, J. (1999) Prothymisin α . *J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 1243 - 1248

- Shi, Y., Wang, Y.-F., Jayaraman, L., Yang, H., Massagué, J., and Pavletich, N. (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: Insights on DNA-binding in TGF- β signalling. *Cell* **94**, 585 - 594
- Shi, Y. (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* **9**, 459 - 470
- Shima, Y., Nakao, K., Nakashima, T., Kawakami, A., Nakata, K., Hamasaki, K., Kato, Y., Eguchi, K., and Ishii, N. (1999) Activation of caspase-8 in transforming growth factor-beta-induced apoptosis of human hepatoma cells. *Hepatology* **30**, 1215 - 1222
- Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y., and Lenardo, M. J. (2000) Fas preassociation required for apoptosis signalling and dominant inhibition by pathogenetic mutations. *Science* **288**, 2354 - 2357
- Song, C. - Z., Siok, T. E., and Gelehrter, T. D. (1998) Smad4/DPC4 and Smad3 mediate transforming growth factor- β (TGF- β) signalling through direct binding to a novel TGF- β -responsive element in the human plasminogen activator inhibitor-1 promoter. *J. Biol. Chem.* **273**, 29287 - 29290
- Stefansson, S., McMahon, G. A., Petitclerc, E. and Lawrence, D. A. (2003) Plasminogen activator inhibitor-1 in tumor growth, angiogenesis and vascular remodelling. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 1545 - 1564
- Stinchcombe, S., Buchmann, A., Bock, K. W., and Schwarz, M. (1995) Inhibition of apoptosis during 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. *Carcinogenesis* **16**, 1271 - 1275
- Stopa, M., Anhof, D., Terstegen, L., Gatsios, P., Gressner, A. M., and Dooley, S. (2000) Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor β (TGF- β)-induced activation of Smad7. *J. Biol. Chem.* **275**, 29308 - 29317
- Strasser, A., O'Conner, L., and Dixit, V. M. (2000) Apoptosis signalling. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 217 - 245
- Sun, Y., Liu, X., Ng-Eaton, E., Lodish, H., and Weinberg, R. A. (1999) SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor- β signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12442 - 12447
- Takayama, S., Reed, J.C. and Homma, S. (2003) Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* **22 (56)**, 9041 - 9007
- Tannapfel, A. and Wittekind, C. (2002) Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchows Arch.* **440**, 345 - 352

- Teramoto, T., Kiss, A., and Thorgeirsson, S. S. (1998) Induction of p53 and Bax during TGF-beta1 initiated apoptosis in rat liver epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 56 - 60
- Thompson, C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456 - 1462
- Thorgeirsson, S. S., Teramoto, T., and Factor, V. M. (1998) Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Semin. Liver Dis.* **18**, 115 - 122
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312 - 1316
- Trejter, M., Brelinska, R., Warchol, J.B., Butowska, W., Neri, G., Rebuffat Gottardo, L., and Malendowicz, L. K. (2002) Effects of galanin on proliferation and apoptosis of immature rat thymocytes. *J. Mol. Med.* **10**, 183 - 186
- Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF-beta receptor. *Cell* **95**, 779 - 791
- Vejda, S., Erlach, N., Peter, B., Drucker, C., Rossmannith, W., Pohl, J., Schulte-Hermann, R., and Grusch, M. (2003) Expression of activins C and E induces apoptosis in human and rat hepatoma cells. *Carcinogenesis* **24**, 1801 - 1809
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43 - 53
- Vrontakis, M. E. (2002) Galanin: A biologically active peptide. *Curr. Drug Target. CNS Neurol. Disord.* **1**, 531 - 541
- Wang, T., Li, B. Y., Danielson, P. D., Shah, P. X., Rockwell, S., Lechleider, R. J., Martin, J., Manganaro, T., and Konahoe, P. K. (1996) The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGFβ family type I receptors. *Cell* **86**, 435 - 444
- Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **15**, 2922 - 2933
- Wang, T. and Donahoe, P. K. (2004) The immunophilin FKBP12: a molecular guardian of the TGF-beta family type I receptors. *Front. Biosci.* **9**, 619 - 631

- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727 - 730
- Wittig, R., Nessling, M., Will, R.D., Mollenhauer, J., Salowsky, R., Münstermann, E., Schick, M., Helmbach, H., Gschwindt, B., Korn, B., Kioschis, P., Lichter, P., Schadendorf, D., and Poustka, A. (2002) Candidate genes for cross-resistance against DNA-damaging drugs. *Cancer Res.* **62**, 6698 - 6705
- Woerner, W. and Schrenk, D. (1996) Influence of liver tumor promoters on apoptosis in rat hepatocytes induced by 2-acetylaminofluorene, ultraviolet light, or transforming growth factor beta1. *Cancer Res.* **56**, 1272 - 1278
- Wotton, D., Lo, R. S., Lee, S., and Massagué, J. (1999) A SMAD transcriptional corepressor. *Cell* **97**, 29 - 39
- Wu, C. G., Habib, N. A., Mitry, R. R., Reitsma, P. H., van Deventer, S. J. H., and Chamuleau, R. A. F. M. (1997) Overexpression of hepatic Prothymosin alpha, a novel marker for human hepatocellular carcinoma. *Brit. J. Cancer* **76** (9), 1199 - 1204
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., and Currie, A. R. (1980) Cell death: The significance of Apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251 - 306
- Wyllie, A. (1998) An endonuclease at last. *Nature* **391**, 62 - 63
- Stroh, C. and Schulze-Osthoff, K. (1998) Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ.* **5**, 997 - 1000
- Wynick, D., Thompson, S. W. N., and McMahon, S. B. (2001) The role of galanin as a multi-functional neuropeptide in the nervous system. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**, 73 - 77
- Xu, L., Chen, Y.G. and Massagué, J. (2000) The nuclear import function of SMAD2 is masked by SARA and unmasked by TGF- β -dependent phosphorylation. *Nature Cell Biol.* **2**, 559 - 562
- Yakicier, M. C., Irmak, M. B., Romano, A., Kew, M., and Ozturk, M. (1999) Samd2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **18**, 4879 - 4883
- Yamamoto, M., Fukuda, K., Miura, N., Suzuki, R., Kido, T., and Komatsu, Y. (1998) Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: A possible association with Bcl-xL induction. *Hepatology* **27**, 959 - 966

- Yamamura, Y., Hua, X., Bergelson, S., and Lodish, H. F. (2000) Critical role of Smads and AP-1 complex in transforming growth factor- β -dependent apoptosis. *J. Biol. Chem.* **17**, 36295 - 36302
- Yoo, J., Ghiassi, M., Jirmanova, L., Balliet, A. G., Hoffman, B., Fornace Jr., A. J., Liebermann, D. A., Böttinger, E. P., and Roberts, A. B. (2003) Transforming growth factor- β -induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 43001 - 43007
- Yuan, J. and Yankner, B. A. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* **407**, 802 - 809
- Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A., and Kroemer, G. (1998) Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* **16**, 2265 - 2282

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ATP	Adenosintriphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Asp	Aspartat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CD5	<i>T-cell surface glycoprotein CD5 precursor</i>
cDNA	<i>complimentary deoxyribonucleic acid</i>
Cyt c	Cytochrom c
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPC-H ₂ O	mit DEPC behandeltes Wasser
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fas	FS-7-associated cell surface
FKS	Fetales Kälberserum
G	Guanosin
Glu	Glutamat
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	<i>Personal Computer</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
P/S	Penicillin / Streptomycin
RNA	<i>Ribonucleic acide</i>
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i>
T	Tyrosin

TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor-β1</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
tRNA	<i>transfer ribonucleic acide</i>
VE	Vollentsalzt

7.2 AtlasImage™ Gencodes mit zugehörigen Gennamen

7.2.1 Atlas™ Rat 1.2 Arrays

A05f	Jun-D; <i>c-jun-related transcription factor</i>
A05i	I-kB (<i>I-kappa B</i>) <i>alpha chain, RL/IF-1 gene product</i>
A05j	<i>Signal transducer & activator of transcription 3 (STAT3);</i>
A06a	<i>LIM domain protein CLP36, homologous to rat RIL</i>
A06g	<i>DNA-binding protein inhibitor ID1</i>
A06h	<i>Id-2; DNA-binding protein inhibitor, HLH protein</i>
A06i	<i>Id-3, DNA-binding protein inhibitor, HLH protein</i>
A07a	<i>G1/S-specific cyclin D1 (CCND1)</i>
A07n	<i>P55cdc; cell division control protein 20</i>
A08e	<i>Prothymosin-alpha (PTMA)</i>
A10m	<i>Cysteine-rich protein 2 (CRP2); ESP1</i>
B13g	<i>Amphiphysin II (AMPH2)</i>
C03c	<i>Alcohol dehydrogenase A subunit; alcohol dehydrogenase class 1 (ADH1)</i>
C10l	<i>Acetylcholinesterase, T subunit, glycolipid-anchored</i>
C11d	<i>60S ribosomal protein L44; L36A</i>
C12a	<i>40S ribosomal protein T17 (RPT17)</i>
C12l	<i>Clusterin (CLU); testosterone-repressed prostate message 2 (TRPM2); apolipoprotein J; sulfated glycoprotein 2 (SGP2); dimeric acid glycoprotein (DAG)</i>

C12n	<i>Huntington disease gene homolog</i>
D01n	<i>Galanin precursor (GALN; GAL)</i>
D02c	<i>Insulin receptor precursor (INSR, IR)</i>
D04b	<i>Platelet activating factor receptor</i>
D05e	<i>Beta 1 adrenergic receptor (ADRB1R)</i>
D06e	<i>5-Hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B; 5-HT1B</i>
D14n	<i>Thrombopoietin</i>
E01n	<i>BTG2 protein precursor; NGF-inducible anti-proliferative protein PC3</i>
E06d	<i>Early growth response protein 1 (EGR1); nerve growth factor-induced protein A (NGFI-A)</i>
E06e	<i>Gastric inhibitory polypeptide precursor (GIP); glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i>
E09i	<i>Phosphorylase kinase, catalytic subunit</i>
E10e	<i>GSK-3 alpha; glycogen synthase kinase-3 alpha;</i>
E11n	<i>Nuclear tyrosine phosphatase; PRL-1; affects cell growth</i>
E13i	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(I) alpha 2 subunit (GNAI2); adenylate cyclase-inhibiting G alpha protein</i>
F05j	<i>PDGF-associated protein</i>
F06a	<i>ADP-ribosylation factor 5 (ARF5)</i>
F09k	<i>Proteasome component C2</i>
F11g	<i>Plasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1)</i>
F13g	<i>Ovalbumin upstream promoter gamma nuclear receptor rCOUPg</i>
F14b	<i>Placoglobin</i>

7.2.2 Atlas™ Rat Stress Arrays

1C	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT)</i>
1M	<i>Alpha1-antitrypsin promoter binding protein 2 (ATBP2)</i>

- 3H *Mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8; PRKM8); c-jun N-terminal kinase 1 (JNK1); stress-activated protein kinase 1 (SAPK1)*
- 3N *Mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MAP kinase kinase 5; MAPKK5; MAP2K5; PRKMK5)*
- 4C *SPS1/Ste20 homolog KHS1 [rat homolog of human]*
- 4I *Serine/threonine-protein kinase PAK-gamma; p21-activated kinase 2 (PAK2)*
- 4N *Bcl-2-like protein 1 (BCL2L1), Bcl-X*
- 5K *Heat shock 90-kDa protein A (HSP90A; HSPCA); HSP86*
- 6B *Heat shock 60-kDa protein (HSP60); 60-kDa chaperonin (CPN60); GroEL homolog; mitochondrial matrix protein P1; p60 lymphocyte protein*
- 6E *Heat shock 10-kDa protein (HSP10); chaperonin 10 (CPN10)*
- 6F *HSC70-interacting protein (HIP)*
- 6H *P23; 23-kDa progesterone receptor-associated protein [rat homolog of human]*
- 6J *FKBP-rapamycin-associated protein (FRAP); rapamycin target protein (RAFT1)*
- 6O *T-complex protein 1 alpha subunit (TCP1-alpha); CCT-alpha (CCTA; CCT1)*
- 7E *Heme oxygenase 1 (HO1; HMOX1)*
- 7G *Calnexin (CANX)*
- 7H *Calreticulin (CALR); calregulin; calcium-binding protein 3 (CABP3); HACBP; ERP60*
- 7I *Tumor rejection antigen 1 (TRA1); GP96 homolog; 94-kDa glucose-regulated protein (GRP94); endoplasmic reticulum chaperonin [rat homolog of human]*
- 7L *Crystallin alpha B (CRYAB)*
- 8D *Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 (ERF1); TB3-1; C11 protein [rat homolog of human]*

-
- 8E NAD(P)H dehydrogenase; quinone reductase; DT-diaphorase; azoreductase; phyloquinone reductase; menadione reductase; NMOR1
- 8F Probable protein disulfide isomerase P5; calcium-binding protein 1 (CABP1)
- 8L 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150)
- 8M 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78); immunoglobulin heavy chain binding protein (BIP); steroidogenesis-activator polypeptide; HSPA5
- 9F Cyclin-dependent kinase 7 (CDK7); CDK-activating kinase (CAK); 39-kDa protein kinase; homolog of *Xenopus* MO15
- 9N G1/S-specific cyclin E (CCNE)
- 9O G2/M-specific cyclin G (CCNG)
- 10B Cyclin G-associated kinase (GAK)10D
- 11D Manganese-containing superoxide dismutase 2 (Mn SOD2)
- 11G Mdm2 protein; p53-associated protein + mdm2-A + mdm2-C [rat homolog of human]
- 11H DNA topoisomerase I (TOP1) [rat homolog of human]
- 14B Growth arrest & DNA damage-inducible protein (GADD45); DNA damage-inducible transcript 1 (DDIT1)
- 14D RecA-like protein HsRad51, DNA repair protein RAD51 homolog
- 18G Multidrug resistance protein (MDR1); P-glycoprotein (PGY1)
- 18H Multidrug resistance protein 2 (MDR2); P-glycoprotein (PGY2)
- 20C Bleomycin hydrolase (BLM hydrolase; BLMH; BMH)
- 20G NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR), POR
- 20H Long chain-specific acyl-CoA dehydrogenase (LCAD; ACADL)

22E *Organic cation transporter 1A (OCT1A)*

23D *Plectin*

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. M. Schwarz danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Materialien sowie für die freundliche Unterstützung in allen Belangen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. A. Buchmann, der mir mit großem Engagement zur Seite gestanden und in zahlreichen Diskussionen mit wertvollen Ratschlägen weitergeholfen hat.

Bei Fr. J. Mahr bedanke ich mich für die Orientierungshilfen im Labor und ihre praktische Unterweisung im Umgang mit Zellkulturen.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Name:	Herckelrath
Vorname:	Tanja
Geburtsdatum:	29.06.1971
Geburtsort:	Frankenthal/Pfalz
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig, keine Kinder

Ausbildung

Schule

1977-1981	Besuch der Grundschule in Beindersheim
1981-1990	Staatliches Leininger Gymnasiums in Grünstadt
26. Mai 1990	Abitur

Studium

Okt. 1990 – Feb.1991	Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
----------------------	--

März 1991 – Sep. 1997

Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Okt. 1994 – Okt. 1995	Einjähriges studienbegleitendes Praktikum am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, München
März 1996	Erste, vorgezogene Diplomprüfung in organischer Chemie
Dez. 1996	Diplomprüfung in Biochemie und Pharmakologie/ Toxikologie
Feb. 1997 – Sep. 1997	Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel „Biochemische Bestimmung von Apoptosemarkern in Hepatomzellen“ im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen bei Prof. Dr. M. Schwarz

April 1997 – Nov. 2003

Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

März 1999	Ärztliche Vorprüfung
April 2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Sep. 2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Okt. 2002 – Sep.2003	Durchführung des Praktischen Jahres
25. Nov. 2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung