Aus der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. W. T. Knoefel

Charakterisierung des humanen Gens nma ein neuer Antagonist der Wirkung des BMP4

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christiane Napp

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. K.-M. Schulte

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. S. R. Bornstein

Inhalt

Selle

Α.	Einleitung	1
В.	Material und Methoden	4
B.I.	Isolierung humaner nma-DNA	4
B.I.1.	Identifizierung nma-haltiger Klone aus einer Cosmidlibrary	4
B.I.2.	Gewinnung der Cosmid-DNA	4
B.I.2.1	Herstellung der Agarplatten	4
B.I.2.2	Bakterienzucht und Lagerung	5
B.I.2.3	Cosmid-Isolation	6
B.I.3.	Auswahl geeigneter Cosmid-DNA	9
B.I.3.1	Auswahl der Oligonukleotide zur Amplifikation des	
	nma-Gens	9
B.I.3.2	Polymerasekettenreaktionsbedingungen	11
B.I.3.3	Darstellung der Amplimere mittels Gelelektrophorese	11
B.II.	Sequenzierung des menschlichen nma-Gens	12
B.II.1.	DNA-Sequenzierung der Amplifikate der Cosmid-DNA	12
B.II.1.1	Amplifikationsbedingungen	12
B.II.1.2	Kontrolle und Quantifizierung der Amplifikationsprodukte	
	durch Agarosegelelektrophorese	13
B.II.2.	Aufreinigung der Amplifikationsprodukte vor der Sequenzierung	14
B.II.2.1	Säulenchromatographische Abtrennung der Oligonukleotide	14
B.II.2.2	Aufreinigung spezifischer Desoxyribonukleinsäuren durch	
	Elution aus Agarosegelen	14
B.II.3.	Cycle-Sequencing der Amplifikationsprodukte	14
B.II.3.1	Thermosequenasereaktion	15
B.II.3.2	Fällung der Reaktionsprodukte	15
B.II.4.	Polyacrylamidgelelektrophoretische Auftrennung der	
	Sequenzierprodukte mit Fluoreszenzdetektion im	
	halbautomatischen Sequenator ABI 377	16

B.II.5. B.II.5.1	Auswertung der Chromatogramme der Sequenzierprodukte Regelung der Signalstärkeverhältnisse	17 17
B.II.5.2	Auswertung der Sequenzchromatogramme unter Verwendung von Datenverarbeitungsprogrammen	17
B.III.	Zellinien	18
B.III.1.	Herkunft der Hep G2 Zellinie	18
B.III.2.	Herstellung einer stabil transfizierten Zellinie	18
B.III.2.1	Bakterienzucht und Transformation	19
B.III.2.2	Plasmid-Isolation	21
B.III.2.3	Linearisierung des Vektors	23
B.III.2.4	Vorbereitung der Zellen	24
B.III.2.5	Transfektion	24
B.III.2.6	Selektion	24
B.IV.	Nachweis des Zielproteins in stabil transfizierten Zellen	26
B.IV.1.	Proteinisolation aus transfizierten Zellen	26
B.IV.2.	Gelelektrophorese und Western Transfer	27
B.IV.2.1	Elektrophoresegerät und Laufbedingungen	28
B.IV.2.2	Puffer der Gelelektrophorese	28
B.IV.2.3	Transfergerät und Laufbedingungen	29
B.IV.2.4	Puffer des Westerntransfer	29
B.IV.3.	Western Immundetection, Lumineszenz,	29
B.IV.3.1	Puffer/ Blockierungslösung	30
B.IV.3.2	Primärer Antikörper	30
B.IV.3.3	Sekundärer Antikörper	30
B.IV.3.4	Waschlösung	30
B.IV.3.5	Chemilumineszenz Substrat	31
B.V.	Zellzählungs- und Proliferationsversuche	31
B.V.1.	Rekonstitution der Wachstumsfaktoren	31

B.V.2.	Bestimmung der Proliferationsaktivität untransfizierter und	
	transfizierter Hep G2 Zellen mit Zell Proliferations Reagenz	
	WST-1 (4- [3- (lodophenyl)- 2- (4- Nitrophenyl)- 2H- 5-	
	Tetrazolio]- 1, 3- benzene Disulfonat)	32
C.	Ergebnisse	33
C.I.	Analyse des Gens	33
C.I.1.	Gensequenz des menschlichen nma-Gens	33
C.I.2.	Polymorphismus des Introns	34
C.I.3.	Genkarte nma-Gen	35
C.II.	Transfektionsergebnisse	36
C.III.	Die Proliferationsaktivität von Hep G2 Zellen unter der Wirkun	g
	verschiedener Wachstumsfaktoren ohne den Einfluss des	
	nma-Gens	37
C.III.1.	Der Einfluss von TGFß in Abhängigkeit von der Konzentration	
	auf die Proliferationsaktivität untransfizierter Hep G2 Zellen	
	in 5% FKS	37
C.III.2.	Der Einfluss von TGFß in einer Konzentration mit maximaler	
	Hemmwirkung auf die Proliferationsaktivität von stabil mit dem	
	pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen in 5% FKS	38
C.III.3.	Der Einfluss von Aktivin A in Abhängigkeit von der Konzentration	
	auf die Proliferationsaktivität untransfizierter Hep G2 Zellen	
	in 5% FKS	39
C.III.4.	Der Einfluss von Aktivin A in einer Konzentration mit maximaler	
	Hemmwirkung auf die Proliferationsaktivität von stabil mit dem	
	pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen in 5% FKS	40
C.III.5.	Der Einfluss von Inhibin A auf die Proliferationsaktivität von stabil	
	Mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierter Hep G2 Zellen	
	in 5% FKS	41
C.III.6.	Der Einfluss von Inhibin B auf die Proliferationsaktivität von stabil	
	mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen	

	in 5% FKS	42
C.III.7.	Der Einfluss von Follistatin auf die Proliferationsaktivität von stabil	
	mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen	
	in 5% FKS	43
C.III.8.	Der Einfluss von BMP4 auf die Proliferationsaktivität von stabil mit	
	dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen	
	in 5% FKS	44
C. IV.	Die Proliferationsaktivität von Hep G2 Zellen unter der	
	Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren unter	
	Einfluss des nma-Gens	45
C.IV.1.	Der Einfluss von TGFß in maximaler Hemmkonzentration auf die	
	Proliferationsaktivität von stabil mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma	
	transfizierten Hep G2 Zellen im Vergleich zu stabil mit dem pcDNA	
	3.1Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen in 5% FKS	45
C.IV.2.	Der Einfluss von Aktivin A in maximaler Hemmkonzentration	
	auf die Proliferationsaktivität von stabil mit dem	
	Vektor pcDNA 3.1 nma transfizierten Hep G2 Zellen im Vergleich	
	zu stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten	
	Hep G2 Zellen in 5% FKS	46
C.IV.3.	Der Einfluss von Inhibin A auf die Proliferationsaktivität von stabil	
	mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma transfizierten Hep G2 Zellen im	
	Vergleich zu stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten	
	Hep G2 Zellen in 5% FKS	47
C.IV.4.	Der Einfluss von Inhibin B auf die Proliferationsaktivität von stabil	
	Mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma transfizierten Hep G2 Zellen im	
	Vergleich zu stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten	
	Hep G2 Zellen in 5% FKS	48
C.IV.5.	Der Einfluss von Follistatin auf die Proliferationsaktivität von stabil	
	Mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma transfizierter Hep G2 Zellen im	
	Vergleich zu stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten	
	Hep G2 Zellen in 5% FKS	49

C.IV.6.	Der Einfluss von BMP4 auf die Proliferationsaktivität von stabil	
	mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma transfizierten Hep G2 Zellen im	
	Vergleich zu stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten	
	Hep G2 Zellen in 5% FKS	50
CV	Zusammenfassung der Ergebnisse	52
C.V.1	Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzanalyse	52
CV2	Zusammenfassung der Ergebnisse der Proliferationsversuche	52
C.V.2.1	Der Einfluss des nma-Gens auf das Wachstum von	52
	Hep G2 Zellen unter der Wirkung von TGFß	52
C.V.2.2	Der Einfluss des nma-Gens auf das Wachstum von	
	Hep G2 Zellen unter der Wirkung von Aktivin A	53
C.V.2.3	Der Einfluss des nma-Gens auf das Wachstum von	
	Hep G2 Zellen unter der Wirkung von Inhibin A	53
C.V.2.4	Der Einfluss des nma-Gens auf das Wachstum von	
	Hep G2 Zellen unter der Wirkung von Inhibin B	54
C.V.2.5	Der Einfluss des nma-Gens auf das Wachstum von	
	Hep G2 Zellen unter der Wirkung von Follistatin	54
C.V.2.6	Der Einfluss des nma-Gens auf das Wachstum von	
	Hep G2 Zellen unter der Wirkung von BMP4	54
D.	Diskussion	56
Ε.	Zusammenfassung	65
F.	Literatur	66
G.	Lebenslauf	69
Н.	Danksagung	70

— v -

A. Einleitung

TGFß und Aktivin sind ubiquitär exprimierte parakrine Peptidwachstumsfaktoren (Ten Dijke et al. 2002 [1] Roberts, Sporn 1990 [2]). Sie haben entscheidenden Einfluss auf die Morphogenese des Gewebsverbandes durch Vermittlung lokaler und systemischer Regulationssignale für Wachstum und Differenzierung von Zellen. Von besonderer Bedeutung sind die Wirkungen dieser Moleküle bei der Entstehung von Grenzflächen, insbesondere auch bei der Regulation epithelialen Zellwachstums.

TGFß ist ein Disulfidhomodimer aus zwei je 112 Aminosäuren grossen Polypeptiden. Das biologisch aktive TGFß-Dimer bindet extrazellulär an eine hochaffine, membranständige Proteinbindungsstelle, die als TGFß-Rezeptor Typ-II bezeichnet wird (Derynck et al. 1997 [3]). Nach der Bindung heterodimerisiert dieser Rezeptor mit dem Typ-I-Rezeptor. Dadurch entsteht als Effektoreinheit eine aktivierte, transmembranäre Serin/Threonin-Kinase, durch die eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt wird. Aktivine gehören ebenfalls zur TGFß-Überfamilie der Polypeptidwachstumsfaktoren, zu denen neben TGFß 1 auch bone morphogenetic proteins (BMP) und der Müllerfaktor gezählt werden. Auch Aktivine sind Dimere, wobei Aktivin A wie TGFß 1 ein Homodimer ist, dass aus ßa-Untereinheiten besteht. Wie TGFß bindet auch Aktivin A an einen hochaffinen Typ-II-Rezeptor, der dann ligandenspezifisch einen Typ-I-Rezeptor rekrutiert (Carcamo et al. 1994 [4], Lewis et al. 2000 [5]). Die Interaktion zwischen Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren erfolgt über eine 20 bis 30 Aminosäuren lange Glycin- und Serin-reiche Domäne. Ein wiederum analoges duales Rezeptorsystem besteht für die BMP-Signalkaskade (Ten Dijke et al. 2002 [1]). Alle drei Signalkaskaden konvergieren auf ein Netzwerk zytosolischer Proteinkinasen, smad 1 bis smad 7(Ten Dijke et al. 2002 [1]).

Allen drei Signalwegen ist gemeinsam, dass bei der Rekrutierung der Typ-l-Rezeptoren je nach Ligand eine breite Vielfalt zum Teil trunkierter und damit ineffizienter Typ-I-Rezeptorenvarianten mit dem Typ-II-Rezeptor in Verbindung treten können. Dieses System ist besonders bei den Aktivinrezeptoren in Form der Typ-I-Rezeptor-Splicevarianten ALK 1 bis ALK 5 (Xu et al. 1994 [6], Alexander et al. 1996 [7]) untersucht. Die pathophysiologische Relevanz der differenziellen Expression

1

solcher trunkierter Typ-I-Rezeptorvarianten ist an den Modellen Hypophyse (Alexander et al. 1996 [7]) und Schilddrüse (Schulte et al. 2000 [8], 2001 [9]) nachgewiesen.

Am Modell des Xenopus wurde von einer Signalblockade von TGFß, BMP und Aktivin berichtet (Onichtchouk et al. 1999 [10]) (Abbildung 1). Als ursächlich wurde die Heterodimerisierung eines Proteins mit dem Namen BAMBI identifiziert, dass statt des üblichen Typ-I-Rezeptors mit dem jeweiligen Typ-II-Rezeptor interagiert. Dabei unterscheidet sich das BAMBI-Protein von den konventionellen Typ-I-Rezeptoren durch das Fehlen einer intrazellulären Serin-/Threoninkinase-Domäne, wenngleich die katalytischen Schleifen dieser Rezeptorkinase teilweise vorhanden sind. Das BAMBI-Protein des Xenopus ist evolutionär hoch konserviert und zeigt eine Übereinstimmung von 89% in der Aminosäurensequenz und 83% in der Gensequenz mit dem bislang nicht näher charakterisierten Gen des Menschen, dass in der Genbank unter dem Namen nma (Genbanknummer: U23070) abgelegt ist.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Bedeutung des nma Genproduktes bei der Proliferationsregulation durch Liganden der TGFß-Superfamilie zu prüfen. Hierzu verwendeten wir ein bekanntes Modell TGFß empfindlicher humaner Hepatomzellen. Im einzelnen galt es, das humane nma-Gen zu identifizieren, zu amplifizieren und zu sequenzieren. Ausserdem war zu klären, inwiefern die Proliferationsaktivität unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren der TGFß-Superfamilie wie z.B. TGFß1, Aktivin A, BMP4 und anderen Peptidwachstumsfaktoren (Inhibin A/B, Follistatin) beeinflusst wird, und ob der Einfluss des nma-Gens dieses Verhalten ändert.

Abbildung 1:



B. Material und Methoden

B.I. Isolierung humaner nma-DNA

B.I.1. Identifizierung nma-haltiger Klone aus einer Cosmidlibrary

Die DNA des humanen nma-Gens wurde aus mit Cosmid transduzierten E. coli Bakterien isoliert. Die Klone, die das gesamte menschliche Genom enthalten, wurden beim Deutschen Human Genome Project (DHGP) gefischt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Sequenz der nma-cDNA ist aufgrund der unter der Genbanknummer U23070 in der Genbank veröffentlichen Sequenz bekannt. Zur Identifizierung der geeigneten Klone wurde die codierende Sequenz des nma-Gens aus dem pcDNA 3.1 Vektor (Fa. Invitrogen, weitere Informationen siehe unter B.II. Zellinien) ausgeschnitten aufgereinigt und durch Nicktranslation mit radioaktivem Phosphor P₃₂ markiert. Klone, die mit der markierten DNA hybridisierten, konnten als geeignet identifiziert werden. Die Identifikation der Klone erfolgte beim DHGP.

Acht Klone wurden als geeignet identifiziert und zur Gewinnung von nma-Gen-DNA übersandt.

B.I.2. Gewinnung der Cosmid-DNA

Die Isolation der DNA zur Sequenzierung des nma-Gens erfolgte aus Cosmidtransduzierten E.coli Bakterien.

B.I.2.1 Herstellung der Agarplatten

Die Anzüchtung der Bakterien erfolgte zuerst auf Agarplatten. Die fertige Agarmischung ImMedia Amp Agar (Fa. Invitrogen) zur Herstellung der Platten enthielt 10g Trypton, 5g NaCl, 5g Hefeextrakt und 12g Agar pro Liter. Der pH-Wert war mit NaOH 5M auf 7,5 eingestellt, die Konzentration von Ampicillin betrug 100µg/ml. Eine Tüte Agar-Mischung wurde mit 100ml Ecotainer Wasser (steriles Wasser, Fa. B. Braun) versetzt und in der Mikrowelle ca. 2-3 Minuten erhitzt. Waren in dem Gemisch keine Schlieren mehr zu sehen, so wurden nach kurzer Abkühlzeit je 10ml der Flüssigkeit auf eine sterile Petrischale von 100mm Durchmesser aufgebracht. Die Platten wurden mit einem Deckel versehen, umgedreht, und in Alufolie verpackt, bei 4°C gelagert.

B.I.2.2 Bakterienzucht und Lagerung

Zur Anzucht der als geeignet identifizierten Klone wurden die E.coli Bakterien zuerst auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C für 24h inkubiert. Einzelne Kolonien wurden dann entnommen und auf einer frischen Platte über 24h weiter propagiert. Später erfolgte die Anzucht grösserer Bakterienmengen in Flüssigmedium. Zur Gewinnung der Gen-DNA wurden die Cosmide dann aus den angezüchteten Klonen isoliert.

Zur Anzucht einer grösseren Menge des Klones wurden die Klone nun in ein 15ml Falcon-Röhrchen mit 10ml Medium (ImMedia Amp Liquid 100 μ g/ml, Fa. Invitrogen) umgesiedelt und horizontal bei 37°C geschüttelt. Zur Herstellung des Mediums wurde eine Tüte Medienpulver mit 200ml Ecotainer Wasser versetzt und in der Mikrowelle 2 bis 3 Minuten erhitzt. Erschien das Medium klar, war es gebrauchsfertig. Das fertige Flüssigmedium hatte die gleiche Zusammensetzung wie das fertige Agarprodukt nur ohne Agar. Zeigte sich ein dichtes Wachstum (ca.4x10⁹ Bakterien pro Milliliter), so wurde das Bakteriengemisch in 100ml Medium gegeben, auf 15ml Falcon-Röhrchen zu je 10ml verteilt und unter gleichen Bedingungen weiter geschüttelt.

Um das Bakteriengemisch über längere Zeit lagern zu können, wurde eine Glycerol Stammlösung hergestellt. Dies erfolgte durch die Vermengung von 8,5ml des Bakteriengemisches mit 1,5ml Glycerol (Fa. Sigma p.a.). Das Gemisch konnte nun bei –80°C gelagert werden.

5

B.I.2.3 Cosmid-Isolation

Die Isolation der Cosmide aus dem Bakteriengemisch erfolgte mit dem Plasmid Maxi Protocol der Firma Qiagen.

Vorbereitung der Puffer

Vor Beginn des Isolationsvorgangs wurden die im Isolationssystem enthaltenen Puffer vorbereitet. Hierzu wurden 20µl RNAse A zu 20ml des Puffer P1 hinzugegeben und vermischt. Die Mischung wurde bei 4°C gelagert. 40ml Ethanol 100% p.a. wurden zum Endotoxin-freien Wasser des Isolationssystems zugesetzt. Puffer P2 wurde auf Präzipitate überprüft und, wenn vorhanden, auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Der Puffer P3 wurde sofort auf Eis gesetzt. Die Puffer QBT, QC, OF, TE waren ebenfalls im System enthalten.

Isolationsverfahren

Nach Zentrifugation von 500ml einer dicht gewachsenen Bakterienkultur über 15 Minuten bei 4000UpM wurde der Überstand abgeschüttet und das Pellet in 20ml Puffer P1 in einem 50ml Falconröhrchen durch Mischen mit dem Vortex resuspendiert. Die Lösung wurde in ein weiteres 50ml Falconröhrchen umgefüllt. Hiernach erfolgte die Zugabe von 20ml Puffer P2. Die Mischung wurde sechsmal geschwenkt und dann 5 Minuten bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Schliesslich wurden 20ml Puffer P3 hinzugefügt, die Mischung wieder sechs mal geschwenkt und sofort für 10 Minuten auf Eis gesetzt. Derweil erfolgte die Äquibrilierung der Qiagen 500 tip Säule durch Aufbringen von 10ml Puffer QBT und das Durchlaufen der Flüssigkeit in ein Auffanggefäss. Das Cosmidgemisch wurde bei 20000g bei 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und das Lysat ohne Partikel zu verschleppen abgehoben. War das Lysat nicht ganz klar, wurde es durch einen Whatman-Filter gefiltert und nochmals zentrifugiert. Dann wurde das Filtrat der Säule zugesetzt und der Durchlauf verworfen. Zweimal 30ml Puffer QC wurden auf die Säule gegeben, und der Durchlauf wurde ebenfalls verworfen. Die Elution erfolgte durch den Zusatz von 1ml Puffer QF. Das Eluat wurde verworfen. Dann wurde die Säule mit dreimal 5ml Puffer OF (vorgewärmt auf 50°C im Wasserbad) eluiert und in einem sterilen 50ml Falconröhrchen aufgefangen. Nach Zugabe von 10,5ml Isopropanol p.a. und kurzem Schwenken wurde das Gemisch 30 Minuten bei 11000UpM bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet 5-10 Minuten an der Luft getrocknet. Puffer TE wurde mit Ecotainer Wasser 1:4 verdünnt und das Pellet in 500µl Puffer aufgenommen. 10µl der Cosmidstammlösung wurden mit sterilem Wasser 1:20 verdünnt und zur Quantifizierung zurückgestellt. Der Rest der fertigen Cosmid-DNA-Lösung wurde bei –20°C gelagert. Sobald die Konzentration der Stammlösung bekannt war, wurde ein 20µg Cosmid enthaltendes Volumen abgenommen, im Rotationsverdampfer lyophilisiert und bei –80°C gelagert.

Spektrophotometrische Quantifizierung der Cosmidmenge

100µl der 1:20 verdünnten Lösung wurden in den Spektrophotometer gegeben und bei 260nm gemessen. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm etwa 50µg/ml doppelsträngiger DNA.

Quantifizierung der Cosmidmenge mittels Gelelektrophorese

Neben der Mengenbestimmung mittels des Photometers wurde ausserdem eine Quantifizierung der Cosmidmenge durch eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurden unterschiedliche Konzentrationen des Cosmides und zweier Marker auf ein Gel aufgetragen. Von dem 1:20 verdünnten Eluat nach der Cosmidisolation wurden je 1, 5 und 10μ l in die Geltaschen gegeben, von den Markern Φ x174 Mac III und Lambda Hind III je 100, 500, 1000ng. Nach der Elektrophorese konnten neben der Cosmidgrösse auch die Cosmidmenge durch einen Vergleich mit den Markerbanden abgeschätzt werden.

Elektrophoresegerät und Laufbedingungen:

Elektrophoresegerät: Kamm:

Bio Rad Sub Cell GT MINI 15 Einfülltaschen, Dicke 1mm, Breite 5mm, Tiefe 3mm

Die Laufbedingungen wurden auf 110V und 20-30 Minuten standardisiert.

Puffer der Agarosegelelektrophorese

Es wurde ein 1x Tris Borat EDTA Puffer als Laufpuffer und ein 2,5x Tris Borat EDTA Puffer zu Herstellung des Agarosegels verwand. Der 1x Puffer wurde durch Verdünnung von 200ml 5x TBE mit 800ml bidestilliertem Wasser, der 2,5x Puffer wurde durch Verdünnung von 500ml 5xTBE mit 500ml bidestilliertem Wasser hergestellt.

Zusammensetzung des 5x TBE: 0,445M Tris Borat, 0,01M EDTA

Als Laufpuffer wurde ein Puffer der Firma Sigma verwendet (Sigma Gel Loading Solution).

Herstellung des Agarosegels

Zur Herstellung der Gele wurde Agarose (Fa. Gibco) mit folgenden Eigenschaften verwendet: Sulfat <0,351%, Feuchtigkeit <10,1%, Elektroendodesmose (-mr) 0,10-0,15, Gelstärke eines 2% w/v Gels >999,99g/cm² Giesstemperatur einer 2% w/v Lösung 39-42°C.

0,8 g Agarose wurde mit 100ml 2,5xTBE Puffer vermischt. Nach Erhitzen in der Mikrowelle bei 750 Watt für drei Minuten und kurzer Abkühlphase auf etwa 40°C wurden 2µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml Fa. Sigma) zugefügt. Dann wurde das Gel gegossen.

8

Fotodokumentation

Die bildliche Darstellung des Agarosegels erfolgte unter UV-Licht (8mv/cm²) mit einer Belichtungszeit von einer Sekunde und einer Blendeneinstellung von 5,6.

B.I.3. Auswahl geeigneter Cosmid-DNA

Die isolierte DNA musste auf Beinhaltung des vollständigen nma-Gens kontrolliert werden. Hierzu wurde die DNA mit Primern amplifiziert, die die cDNA-Sequenz des Gens vollständig umspannen. In der Gelelektrophorese konnten Amplifikationsprodukte auf Ihre Länge überprüft werden. Entsprachen die Produkte den erwarteten bp-Längen, so konnte die Vollständigkeit der nma-DNA erwartet werden.

B.I.3.1 Auswahl der Oligonukleotide zur Amplifikation des nma-Gens

Die Primer wurden auf Grundlage der bekannten cDNA Sequenz des nma-Gens selbst entworfen und im Auftrag durch Oligonukleotidsyntese hergestellt (Firma Pharmacia).

<u>Oligonukleotide</u>

Primer	5'-3' Sequenz	Bindungsstelle
		in Sequenz
Nma1f	ggg agc tgc ggc gga tac	12-29
Nma 1f2	gag aac ggc cgc tag cgg	64-81
Nma 1f3	cgt gcg tcc cta gag tcg	121-138
Nma 1f4	cat gcc ctg cgc gct ccg	286-303
Nma2f	atg gat cgc cac tcc agc	373-90
Nma3f	cat ggc tgc ctg gac tc	571-87
Nma4f	cct gag gat gct tcg aag	878-905
Nma5f	gga gtc tta tct gaa cta cac	1160-1177
Nma1r	gac gcc ccg cac ggc c	371-356
Nma1r2	gct gga gtg gcgatc cat	390-373
Nma1r3	cgg agc gcg cag ggc atg	303-286
Nma2r	caa tgt ggg tat ggt ggt g	660-642
Nma3r	gta gtg caa acg gga gag	958-942
Nma4r	tca tac gaa ttc cag ctt c	1155-1139
Nma5r	caa gat gta gaa gct tac ata g	1478-1461

Nach Amplifikation von nma-cDNA (aus Vektoramplifikation) mit verschiedenen Primerkombinationen und Bestimmung der Länge der Amplifikationsprodukte durch Gelelektrophorese konnten Primerkombinationen identifiziert werden, die ein einziges Amplimer und eine aufgrund der Primerlokalisationen erwartete Amplimerlänge produzierten.

10 -

Am Ende wurden folgende Primerkombinationen als geeignet identifiziert und zur Kontrolle der Cosmid-DNA verwendet.

	5'-3' Sequenz	Bindungs-	Amplimer	Bindungs-
		stelle	Länge in bp	stelle
1f-1r	ggg agc tgc ggc gga tac	12-29	360	12-371
	gac gcc ccg cac ggc c	371-356		
1f4-2r	cat gcc ctg cgc gct ccg	286-303	375	286-660
	caa tgt ggg tat ggt ggt g	660-642		
3f-4r	cat ggc tgc ctg gac tc	571-587	585	571-1155
	tca tac gaa ttc cag ctt c	1155-1138		
5f-5r	gga gtc tta tct gaa cta cac	1160-1177	319	1160-
	caa gat gta gaa gct tac ata g	1478-1461		1478

Nach Amplifikation der nma-DNA (aus Cosmidisolation) mit der ausgewählten Primerkombination, Bestimmung der Länge der DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese und Vergleich mit den entsprechenden Amplimeren der cDNA konnte ein geeigneter Klon, dessen Cosmid die vollständige DNA des nma-Gens enthält, identifiziert werden. Durch Längenvergleiche der Amplifikationsprodukte konnte bereits hier vermutet werden, ob ein DNA-Amplimer ein Intron enthält. Durch die nachfolgende Sequenzierung der nma-DNA wurde das Gen weiter charakterisiert.

B.I.3.2 Polymerasekettenreaktionsbedingungen

PCR-Ansatz und PCR-Bedingungen waren die gleichen wie unter Punkt B.II.1.1

B.I.3.3 Darstellung der Amplimere mittels Gelelektrophorese

Alle Amplimere wurden durch Agarosegelelektrophorese getrennt. Dazu wurden 1% Agarosegele mit 5µl Polymerasekettenreaktionsgemisch nach erfolgter Polymerasekettenreaktion und 2% Ladungspuffer (Fa. Sigma) beschickt und die Fragmente einer Elektrophorese unterworfen. Die Banden wurden gegen einen aufgetragenen Molekulargewichtsstandard 1 Kb plus (Fa. Gibco BRL) verglichen. Als Positivkontrolle wurden 25ng HFL (humane fetale Leber) verwendet, als Negativkontrolle nucleasefreies Wasser. Die Herstellung des Agarosegels und der Puffer sowie die Fotodokumentation erfolgten unter gleichen Bedingungen wie bei Punkt B.I.2.3 (Seite 8). Es wurde jedoch ein einprozentiges Agarosegel hergestellt unter Verwendung von 1g Agarose.

Elektrophoresegerät und Laufbedingungen:

Elektrophoresegerät:	Bio Rad Sub Cell GT MINI
Kamm:	15 Einfülltaschen, Dicke 1mm, Breite 5mm,
	Tiefe 3mm

Die Laufbedingungen wurden auf 110V und 20-30 Minuten standardisiert.

B.II. Sequenzierung des menschlichen nma-Gens

B.II.1. DNA-Sequenzierung der Amplifikate der Cosmid-DNA

Zur Sequenzierung wurden verschiedene Primerkombinationen aus den oben aufgelisteten Oligonukleotiden verwendet.

B.II.1.1 Amplifikationsbedingungen

Polymerasekettenreaktionsbedingungen

Denat.: Denaturierung, Anl.: Anlagerung der Oligonukleotide, Syn.: Synthese, Ext.: Extension, Temp.: Temperatur in Grad Celsius, Zeit: Zeit in Sekunden

Denat.	Denat.	Denat.	Denat.	<u>Anl.</u>	<u>Anl.</u>	<u>Syn.</u>	<u>Syn.</u>	<u>Ext.</u>	<u>Ext.</u>	Zyklen
<u>Temp.</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temp.</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temp.</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temp</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temp.</u>	<u>Zeit</u>	<u>anzahl</u>
<u>94</u>	<u>180</u>	<u>94</u>	<u>30</u>	<u>55</u>	<u>30</u>	<u>72</u>	<u>90</u>	<u>72</u>	<u>600</u>	<u>35</u>

Polymerasekettenreaktionsansätze

Die 30µl Reaktionsvolumen der DNA enthielten folgende Reagenzien:

Matrize (DNA, 10-20ng/µl)	4,0µl
Oligonukleotid(5pmol/µl)	1,5µl
Taq MasterMix (Fa. Qiagen)	15µl
nukleasefreies Wasser (Fa. Promega)	9,5µl

B.II.1.2 Kontrolle und Quantifizierung der Amplifikationsprodukte durch

Agarosegelelektrophorese

Alle Amplimere wurden durch Agarosegelelektrophorese getrennt. Dazu wurden 1% Agarosegele mit Polymerasekettenreaktionsgemisch 5μl nach erfolgter Polymerasekettenreaktion und 2% Ladungspuffer (Fa. Sigma) beschickt und die Fragmente einer Elektrophorese unterworfen. Die Banden wurden mit einem aufgetragenen Molekulargewichtsstandard 1 Kb plus (Fa. Gibco BRL) verglichen. Der Molekulargewichtsstandard wurde in drei verschiedenen Mengen aufgetragen $(0,25, 0,5 \text{ und } 1\mu\text{g} \text{ entsprechend } 25, 50 \text{ und } 100\text{ng in der } 1650 \text{ bp-Bande})$, so dass eine quantitative Abschätzung der Desoxyribonukleinsäure möglich war. Als Positivkontrolle wurden 25ng HFL (humane fetale Leber) als Negativkontrolle nucleasefreies Wasser verwendet. Die Herstellung des Agarosegels und der Puffer, sowie die Fotodokumentation erfolgten unter gleichen Bedingungen wie bei Punkt B.I.2.3 (Seite 8). Es wurde jedoch ein einprozentiges Agarosegel hergestellt unter Verwendung von 1g Agarose.

Elektrophoresegerät und Laufbedingungen:

Elektrophoresegerät:	Bio Rad Sub Cell GT MINI
Kamm:	15 Einfülltaschen, Dicke 1mm, Breite 5mm,
	Tiefe 3mm

Die Laufbedingungen wurden auf 100V und 120 Minuten standardisiert.

B.II.2. Aufreinigung der Amplifikationsprodukte vor der Sequenzierung

Um eine eindeutige DNA-Sequenz zu gewährleisten, mussten die bei der Polymerasekettenreaktion aufgetretenen unspezifischen Nebenprodukte und Oligonukleotide entfernt werden. Hierzu standen zwei Verfahren zur Verfügung.

B.II.2.1 Säulenchromatographische Abtrennung der Oligonukleotide

Vor Auftragen des Polymerasekettenreaktionsgemisches auf das Agarosegel wurde dieses von Oligonukleotidresten mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen) gereinigt. Die Amplifikationsprodukte wurden mit 100µl Bindungspuffer versetzt. Dann erfolgte die säulenchromatographische Reinigung der DNA unter mehrfachen Wasch- und Elutionsschritten. Einzelheiten der Prozedur finden sich in der Anleitung des Herstellers.

B.II.2.2 Aufreinigung spezifischer Desoxyribonukleinsäuren durch Elution aus Agarosegelen

Unspezifische Nebenprodukte der PCR, die nach der elektrophoretischen Auftrennung im Gel sichtbar wurden, konnten mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen) aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und dann in die Sequenzierung eingebracht werden.

Die Amplifikationsprodukte wurden nach Gelelektrophorese unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, mit drei Volumenanteilen Gellysepuffer versetzt und für zehn Minuten bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zusatz von einem Volumenanteil Isopropanol p.a. (Fa.Sigma) erfolgte die säulenchromatographische Aufreinigung der DNA unter mehrfachen Wasch-und Elutionsschritten. Einzelheiten der Prozedur finden sich in der Anleitung des Herstellers.

B.II.3. Cycle-Sequencing der Amplifikationsprodukte

Der ABI 377 DNA Sequencer detektierte die Fluoreszenz der vier verschiedenen Farbstoffe, die für die Identifikation der Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin in der Thermosequenasereaktion in das Polymerasekettenreaktionsprodukt integriert wurden. Jeder Farbstoff emittierte bei Anregung durch den Laser Licht verschiedener Wellenlänge, so dass alle vier basenspeziefischen Farbstoffe in einer Gelspur detektiert werden konnten. Der Kettenabbruch der Cycle-Sequencing PCR-Reaktion erfolgte durch Farbstoffterminatoren.

"Dye"-Terminatoren, AmpliTaqDNA Polymerase und dNTP's wurden dem Reaktionsansatz als fertiger Reaktionsansatz (ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) der Firma Perkin Elmer zugesetzt. Einzelheiten finden sich in der Arbeitsanleitung des Herstellers.

B.II.3.1 Thermosequenasereaktion

Die Thermosequenasereaktion erfolgte im Stufenzyklusverfahren auf dem Thermocycler GeneAmp 2400 der Firma Perkin Elmer. Zum Ansatz wurden autoklavierte und nucleasefreie 200µl Eppendorffgefässe verwendet. Das Volumen eines Thermosequenaseansatzes betrug 10µl.

Denaturierung	96°C	10sec.
Anlagerung der Oligonukleotide	50°C	5sec.
Extension	60°C	4min.

Die Reaktion durchlief jeweils 50 Zyklen.

10µl des Thermosequenaseansatzes enthielten folgende Reagenzien:

Matritze (DNA, 10-20ng/μl)	1-7µl
Terminator Mix	2μl
Oligonukleotide (10pmol/µl)	1μl
Nucleasefreies Wasser (Fa. Promega)	ad 10µl

B.II.3.2 Fällung der Reaktionsprodukte

10 μl 3M Natriumacetat, pH 5,2 und 250μl absoluter Alkohol (p.a., Fa. Riedel-de-Haen) wurden in einem 1,5ml Eppendorffgefäss bei Raumtemperatur vorgelegt. 10μl Sequenzierprodukt wurden mit 90μl bidest. Wasser versetzt. Nach Mischen auf dem Vortex folgte die Zentrifugation bei 5030xg für 30 Minuten. Der Überstand wurde dekantiert, der Rest abgehoben. Das Sediment wurde mit 350µl Ethanol p.a. 70% v/v gewaschen, anschliessend unter Vakuum getrocknet und dann mit Ladungspuffer versetzt. Alle Schritte der Fällungsreaktion erfolgten bei Raumtemperatur. Als Laufpuffer wurde Dextran Blau (Fa. Roth) in einer Konzentration von 50mg/ml in EDTA-Lösung, 25M, pH 8,0 gelöst. Als Gebrauchslösung wurde ein Teil der Stammlösung mit fünf Teilen Formamid (pH 8,3, Fa. Sigma) verdünnt. Das Formamid war zuvor über Amberlite deionisiert und dann filtriert worden (Filter Fa. Nalgene, Porengrösse 0,2µm).

B.II.4. Polyacrylamidgelelektrophoretische Auftrennung der Sequenzierprodukte mit Fluoreszenzdetektion im halbautomatischen Sequenator ABI 377 (Fa. PE Biosytems)

Die beiden Glasplatten der Elektrophoreseeinheit wurden zunächst in mehreren Reinigungschritten unter Verwendung von fliessendem Wasser, destilliertem Wasser, NaOH, 5M und Isopropanol p.a. (Fa. Merck) gereinigt. Nach dem Zusammenbau der Gelkammern erfolgte das Giessen des Polyacrylamidgels. Das Polyacrylamidgel setzt sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

Harnstoff (Fa.GibcoBRL)	21,0g
PAA (40% Stammlösung, Fa.Sigma)	6,3ml
Aqua bidest.	22,1ml
10x TBE	6,0ml

Die Reagenzien wurden für 30 Minuten auf dem Magnetrührer mit 1g Amberlite (Fa. Serva, p.a.) durchmischt und nach Vorlage von 6ml 10x TBE Puffer über eine Vakuumpumpe durch einen Filter (Fa. Nalgene, Porengrösse 0,2µm) abgesaugt. Dann wurde das Gemisch für fünf Minuten entgast. Nach Zugabe von 350µl Ammoniumpersulfat 10% w/v und 15µl TEMED ((N,N,N',N'-Tetraethyethylendiamin), Fa.Sigma) folgte das Giessen des Gels mit Hilfe einer Giessaparatur. Nach einer Polymerisierungszeit von 2 bis 20 Stunden bei Raumtemperatur folgte der Einbau

der Gelkammern in das Sequenziergerät und das Beladen des Gels mit den in 1µl Laufpuffer gelösten Reaktionsprodukten der Thermosequenasereaktion.

B.II.5. Auswertung der Chromatogramme der Sequenzierprodukte

B.II.5.1 Regelung der Signalstärkeverhältnisse

Zur Optimierung der internen Kalibrierung der spurenspezifischen Signalstärkeverhältnisse wurden die Farbstoffartefakte im Voreluat sowie auch die nicht sequenzspezifischen Signale im hochmolekularen Bereich (>600bp) entfernt. Die Kalibrierung der Spur erfolgte somit durch das Sequenzsignal.

<u>B.II.5.2</u> Auswertung der Sequenzchromatogramme unter Verwendung von Datenverarbeitungsprogrammen (Lasergene Navigator)

Die Rohdaten der Datenverarbeitungsversion (ABI Prism 377 XL collection, Fa. PE Biosystems) der vorliegenden Sequenzen wurden in das Programm EditSeg der Firma GATC überführt. Dort wurden sie zusammen mit der in der Genbank publizierten Sequenz des nma-Gens eingelesen (Genbanknummer U23070). Das Chromatogramm wurde Basenpaar um Basenpaar gelesen und mit der Wildtypsequenz verglichen. Sequenzanteile ohne eindeutige Sequenzfestlegung $"uber \ge 2$ Basenpaare wurden aus der Sequenzanalyse entfernt. Wurde dadurch der lesefähige Seguenzanteil so beschränkt, dass nicht mehr der komplette Abschnitt auswertbar war, so wurde eine neue Polymerasekettenreaktion und Sequenzierung des Abschnitts durchgeführt. Eine Sequenz wurde als nicht eindeutig definiert, wenn der Hintergrund > 5% der minimalen Sequenzamplitude betrug. Alle zur Verfügung stehenden eindeutigen Sequenzdaten wurden nach Entfernung fehlerhafter Sequenzabschnitte in ein sogenanntes Conting überführt. Dabei wurden die Sequenzergebnisse des Vorwärts- und Rückwärtsstranges sowie anfällige Sequenzdaten wiederholter Amplifikationen in den sequenzhomologen Abschnitten übereinandergelegt. Die Daten wurden so zusammengeführt und mit der in jede Einzeldatei eingeladenen vollständigen genomischen Sequenz des humanen nma-Gens verglichen.

B.III. Zellinien

B.III.1. Herkunft der Hep G2 Zellinie

Als Zellkultur wurden menschliche Hepatomzellen, die Hep G2 Zellen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) verwand. Die Zellen wurden 1975 aus dem Tumorgewebe eines fünfzehnjährigen argentinischen Jungen mit einem hepatozellulären Karzinom gewonnen. Die Zellen produzieren nachgewiesenermassen folgende Proteine: Alpha Fetoprotein, Albumin, alpha2 Makroglobulin, alpha1 Antitrypsin, Transferrin, alpha1 Antichymotrypsin, Haptoglobin, Ceruloplasmin, Plasminogen, Komplement (C3, C4), C3 Aktivator, Fibrinogen, alpha1 Säure Glycoprotein, alpha2 HS Glycoprotein, ß Lipoprotein und retinolbindendes Protein. Die Zellen wachsen epithelial, einschichtig und sind adhärent. Immunologisch zeigen sich sie sich Zytokeratin-positiv und negativ für und Desmin. Endothel, GFAP. Neurofilament Vimentin. Sie sind nachgewiesenermassen frei vom Epstein-Barr Virus, Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus, Humane Herpes Virus 8, Human Immunodeficiency Virus, Human T-cell Leucaemia Virusl/II. Zytogenetisch sind die hyperdiploiden Zellen wie folgt charakterisiert: 52(47-52)<2n>XY, +2, +14, +17, +20, +2mar, t(1;21) (p22.2;p11-12, i(17g)/der(17)t(17;17)(p11;q11).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 250ml Kulturflaschen (Cellstar, Fa. Greiner bioone), in Standardmedium, DMEM/HAM F12 1:1 Medium (Fa. Gibco) und 10% v/v, fetales Kälberserum (FKS, 3 Minuten hitzeinaktiviert bei 56°C, Fa. Gibco) unter Standardbedingungen (37°C und 3% v/v CO₂) im Brutschrank.

B.III.2. Herstellung einer stabil transfizierten Zellinie

Zur stabilen Transfektion des nma Gens in Hep G2 Zellen war die Verwendung eines bifunktionalen, prokaryotisch propagierbaren und eukaryotisch exprimierbaren Vektors mit dem Zielgen und einer Zeocinresistenz als späterem Selektionsfaktor sowohl für E.coli Bakterien (zur Vektorweiterverarbeitung) als auch für die Hep G2 Zellen (spätere Transfektion) nötig. Es wurde der Vektor pcDNA 3.1 (Fa.Invitrogen) verwendet. Der Vektor wurde sowohl als Leervektor, als auch mit bereits einklonierter Sequenz der cDNA des nma-Gens erworben.



Abbildung 2: Vektor pcDNA 3.1

B.III.2.1 Bakterienzucht und Transformation

Zur Herstellung einer ausreichenden Menge von Plasmiden wurden E.coli Bakterien (OneShot TOP10 E.coli, Fa. Invitrogen) mit dem vorbereiteten Vektor transformiert und auf Agarplatten ausgesät. Nach Inkubation konnte ein Klon isoliert und weiter propagiert werden. Zur Gewinnung des reinen Plasmides wurde der Vektor dann aus den angezüchteten Klonen isoliert.

Herstellung der Agarplatten

Nach der Transformation erfolgte die Selektion und die Klonierung der Bakterien auf Agarplatten. Die fertige Agarmischung ImMedia Zeo Agar (Fa. Invitrogen) zur

Herstellung der Platten enthielt 10g Trypton, 5g NaCl, 5g Hefeextrakt und 12g Agar pro Liter. Der pH-Wert war mit NaOH 5M auf 7,5 eingestellt, die Konzentration an Zeocin betrug 25µg/ml. Eine Tüte Agar-Mischung wurde mit 100ml Ecotainer Wasser versetzt und in der Mikrowelle ca. 2-3 Minuten erhitzt. Waren in dem Gemisch keine Schlieren mehr zu sehen, wurden nach kurzer Abkühlzeit je 10ml der Flüssigkeit auf eine sterile Petrischale von 100mm Durchmesser aufgebracht. Die Platten wurden mit einem Deckel versehen, umgedreht und in Alufolie verpackt bei 4°C gelagert.

Transformation und Klonierung

Zur Transformation wurde ein Gefäss mit 50µl Bakteriengemisch One Shot TOP10 E.coli gelagert bei –80°C auf Eis aufgetaut. 2µl des fertig erworbenen Vektorgemisches (Fa. Invitrogen) wurden dem Bakteriengemisch zugesetzt. Zur Vermengung wurde die Lösung nur gedreht, nicht auf- und abpipettiert. Schliesslich erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Zur nachfolgenden Erhitzung wurde ein Wasserbad auf eine Temperatur von 42°C gebracht, das Gefäss für 30 Sekunden in das Bad gehalten und dann sofort wieder auf Eis gesetzt. Nun erfolgte der Zusatz von 250µl SOC Medium (Fa. Invitrogen), dass zuvor auf Raumtemperatur gebracht wurde. Das Medium enthielt 2%Trypton, 0,5% Hefe Extrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄ und 20mM Glucose. Dann wurde das Gemisch bei 37°C für eine Stunde horizontal geschüttelt. Schliesslich wurden je 50µl der Lösung auf eine auf 37°C vorgewärmte Agarplatte aufgetragen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Klonierung wurde am nächsten Tag eine einzelne Kolonie entnommen, auf einer weiteren Agarplatte ausgestrichen und unter gleichen Bedingungen über Nacht inkubiert.

Bakterienzucht und Lagerung

Zur Anzucht einer grösseren Menge der Klone wurden sie in ein 15ml Falcon-Röhrchen mit 10ml Medium (ImMedia Zeo Liquid 25µg/ml, Fa. Invitrogen) umgesiedelt und horizontal bei 37°C geschüttelt. Zur Herstellung des Mediums wurde eine Tüte Mediumpulver mit 200ml Ecotainer Wasser versetzt und in der Mikrowelle 2 bis 3 Minuten erhitzt. Erschien das Medium klar, war es gebrauchsfertig. Das fertige Flüssigmedium hatte die gleiche Zusammensetzung wie das fertige Agarprodukt nur ohne Agar. Zeigte sich ein dichtes Wachstum (ca.4x10⁹ Bakterien pro Milliliter), so wurde das Bakteriengemisch in 100ml Medium gegeben, verteilt auf 15ml Falcon-Röhrchen zu je 10ml und unter gleichen Bedingungen weiter geschüttelt.

Um das Bakteriengemisch über längere Zeit lagern zu können, wurde eine Glycerol Stock Solution hergestellt. Dies erfolgte durch die Vermengung von 8,5ml des Bakteriengemisches mit 1,5ml Glycerol. Das Gemisch konnte nun bei –80°C gelagert werden.

B.III.2.2 Plasmid-Isolation

Die Isolation der Plasmide aus dem Bakteriengemisch erfolgte mit dem EndoFree Plasmid Maxi Protocol der Firma Qiagen.

Vorbereitung der Puffer

Vor Beginn des Isolationsvorgangs wurden die im Isolationssystem enthaltenen Puffer vorbereitet. Hierzu wurde das Gefäss (20µl) der RNAse A zu einer Flasche (20ml) des Puffer P1 hinzugegeben und vermischt. Die Mischung wurde bei 4°C gelagert. 40ml Ethanol 100% p.a. wurden zum Endotoxin-freien Wasser des Isolationssystems zugesetzt. Puffer P2 wurde auf Präzipitate überprüft und wenn vorhandenen auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Der Puffer P3 wurde sofort auf Eis gesetzt. Die Puffer ER, QBT, QC, QN, TE, waren ebenfalls im System enthalten.

Isolationsvorgang

Das Glycerolbakteriengemisch wurde aus dem Kühlschrank entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach Zentrifugation von 50ml des Gemisches über 15 Minuten bei 4000UpM wurde der Überstand abgeschüttet und das Pellet in 10ml Puffer P1 in einem 50ml Falconröhrchen durch Mischen mit dem Vortex resuspendiert. Die Lösung wurde in ein weiteres 50ml Falconröhrchen umgefüllt. Hiernach erfolgte die Zugabe von 10ml Puffer P2. Die Mischung wurde sechsmal geschwenkt und dann 5 Minuten bei RT inkubiert. Schliesslich wurden 10ml Puffer P3 hinzugefügt, die Mischung wieder sechs mal geschwenkt und sofort auf den Qiafilter Cartridge gegossen. Es folgte eine Inkubation von 10 Minuten bei RT. Dann wurde das Käppchen des Filtergefässes abgenommen, und ein 50ml Falcongefäss zum Auffangen darunter gestellt. Ein Spritzenkolben wurde aufgesetzt und durchgedrückt, das Filtergefäss wurde verworfen. 2,5ml Puffer ER wurden dem Filtrat zugesetzt, die Lösung zehnmal geschwenkt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Derweil erfolgte die Äquibrilierung der Qiagen 500 tip Säule durch Aufbringen von 10ml Puffer QBT und das Durchlaufen der Flüssigkeit in ein Auffanggefäss. Nun wurde das Filtrat zugesetzt und der Durchlauf verworfen. Zweimal 30ml Puffer QC wurden auf die Säule gegeben, und der Durchlauf wurde ebenfalls verworfen. Die Elution erfolgte durch den Zusatz von 15ml Puffer QN. Das Eluat wurde in einem 50ml sterilen Falcongefäss aufgefangen. Nach Zugabe von 10,5ml Isopropanol p.a. und kurzem Schütteln wurden je 2ml in sterile Eppendorffgefässe überführt. Die Gefässe wurden 30 Minuten bei 15000UpM bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Nach Zugabe von je 500µl Endotoxin freiem Ethanol 70% wurden die Lösungen wieder unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet 5-10 Minuten an der Luft getrocknet. 300µl Puffer TE wurden nun an der Hinterwand des ersten Röhrchens ablaufen gelassen, alles zweimal pipettiert und in das nächste Eppendorffgefäss überführt. Dies wurde solange fortgeführt bis zum Schluss die gesamte DNA in 300µl in einem Rörchen vereinigt war. Zur Vermeidung von Verlusten wurden die Röhrchen noch einmal kurz abzentrifugiert und die Reste eingesammelt. 10µl der Plasmidstammlösung wurden mit Ecotainer Wasser 1:20 verdünnt und zur Quantifizierung zurückgestellt. Der Rest der fertigen Plasmid DNA Lösung wurde bei -20°C gelagert. Sobald die Konzentration der Stammlösung bekannt war, wurden 20µg abgenommen, im Rotationsverdampfer lyophilisiert und bei –80°C gelagert.

B.III.2.4 Linearisierung des Vektors

Als Vorbereitung zur späteren Transfektion wurde das zirkuläre Plasmid pcDNA 3.1 nma (Fa. Invitrogen) mittels eines Restriktionsenzymverdaus mit dem Enzym Nru I (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) linearisiert. Neben dem Enzym wurde der 10x Puffer Typ H (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) benötigt. Für den Versuchsansatz wurden 10µg Plasmid, 25U Enzym (Konzentration 10U/µl) und 5µl 10x Puffer Typ H mit Ecotainer Wasser ad 50µl zusammengefügt. Im Endansatz setzte sich der Puffer wie folgt zusammen: 100mM Tris HCl, (Trishydroxymethylaminomethanhydrochlorid) pH 7,5, 100mM MgCl₂, 10mM Dithiothreitol, 1M NaCl, 0,1% w/v BSA (bovines Serum Albumin). Inkubiert wurde über Nacht bei 37°C. Die Kontrolle des Vorgangs erfolgte durch Gelelektrophorese auf einem 1% w/v Agarosegel gegen ungeschnittenes pcDNA 3.1 nma Plasmid. Als molarer Längengewichtsstandard wurde die 1Kb Plus DNA Leiter (Fa. Invitrogen) verwand.

Elektrophoresegerät und Laufbedingungen:

Elektrophoresegerät:	Bio Rad Sub Cell GT MINI
Kamm:	15 Einfülltaschen, Dicke 1mm, Breite 5mm,
	Tiefe 3mm

Die Laufbedingungen wurden auf 110V und 20 bis 30 Minuten standardisiert.

Herstellung der Puffer und des Agarosegeles wie auch die Fotodokumentation erfolgten wie unter Punkt B.I.2.3 (Seite 8). Es wurde jedoch ein einprozentiges Gel hergestellt unter Verwendung von 1g Agarose.

B.III.2.5 Vorbereitung der Zellen

Als Vorbereitung zur Transfektion wurden die Zellen der Hep G2 Zellinie am Vortag mit Trypsin EDTA Lösung (Trypsin EDTA Lösung 0,05% w/v/ 0.02%v/v in Phosphatpuffer ohne Magnesium und Kalzium, Fa. Biochrom KG) versetzt. Sie wurden so ausgesät, dass die Konfluenz am Versuchstag etwa 50% bis 80% betrug und schliesslich 18h bei Standardbedingungen inkubiert. Vor Zusatz des Transfektionsgemisches wurden die Zellen einmal mit 10ml kaltem PBS (Phosphatpuffer ohne Magnesium und Kalzium, 50mM Kaliumphosphat pH 7,2, 150mM NaCl, Fa. Gibco) gewaschen und dann mit frischem Medium versetzt.

B.III.2.6 Transfektion

Die Transfektion erfolgte unter Verwendung des Effectene Transfektions Reagent Kit (Fa. Qiagen). Die Versuchsanordnung enthielt Puffer EC, Verstärker (1mg/ml) und Effectene Transfection Reagenz (1mg/ml). Zur Herstellung des Transfektiongemisches wurden 2µg DNA pcDNA 3.1 nma mit Puffer EC ad 300µl vermischt. Anschliessend wurden 16µl Verstärker hinzugefügt. Nach Durchmischung mittels Vortexbehandlung und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erhielt der Ansatz 60µl Effectene Reagenz. Nach weiterer Durchmischung und Inkubation von 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung in 3 ml Standardmedium gegeben und tropfenweise den vorbereiteten Zellen zugesetzt. Die Zellen wurden nach Transfektion für 5 Tage unter Standardbedingungen in Standardmedium inkubiert.

B.III.2.7 Selektion

Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde ein Selektionsmedium verwendet. Dies bestand aus Standardmedium, dem Zeocin (Zeocin-Stammlösung 100mg/ml, Fa. Invitrogen) zu einer Endkonzentration von 200µg/ml zugesetzt wurde. Hierzu wurden 400µl Stammlösung Zeocin mit 200ml Standardmedium vermischt. Zur Überprüfung der Selektion wurde eine Kontrollkultur mit untransfizierten Zellen in Selektionsmedium mitgeführt. In beiden Kulturflaschen verringerte sich die Anzahl

der Zellen kontinuierlich. Die transfizierten Zellen bildeten mit der Zeit Zellhaufen von überlebenden Zellen aus, während die Kontrollkultur nach sechs Wochen keine sichtbar lebende Zelle mehr enthielt. Einzelne transfizierte Klone wurden nach sechs Wochen isoliert und getrennt kultiviert.

Die Zellinie eines Kontrollklones wurde unter Verwendung des nicht linearisierten Leervektors pcDNA 3.1 unter gleichen Bedingungen hergestellt. In präliminären Experimenten wurde deutlich, dass die Linearisierung des Vektors auf die Transfektionseffizienz keinen Einfluss hat.

B.IV. Nachweis des Zielproteins in stabil transfizierten Zellen

B.VI.1. Proteinisolation aus transfizierten Zellen

Zur Proteinisolation aus den transfizierten Zellen wurden die folgenden Gerätschaften verwendet. Die Entnahme der Zellen aus der Kulturflasche erfolgte mittels eines Schabers. Zur Klärung der später lysierten Zellen wurde der Qia Shredder (Fa. Qiagen) verwendet, ein eppendorffgefässähnliches Röhrchen mit einer Filtermembran. Die Aufreinigung des Proteins erfolgte unter Verwendung des 12 tube Magnet (Fa. Qiagen), und über Ni-NTA magnetische Agarosekugeln (Fa. Qiagen). Die 24 Enden des Magneten liegen den Näpfen einer abnehmbaren 96-Napf-Platte an und können so deren magnetischen Inhalt anziehen. Die Agarosekugeln haben einen mittleren Durchmesser von 50µm, der Durchmesser schwankt von Kugel zu Kugel zwischen 20 bis 70µm. Sie enthalten magnetische Partikel. An ihre Oberfläche sind stark chelatbildende Nitrioltriacetat-Gruppen gebunden. Sie sind durch Chelatbindung beladen mit Nickel, der mit dem 6x-Histidin-Schwanz unseres Zielproteins binden kann. Die Agarosekugeln liegen als 5% v/v Suspension vor mit einer Proteinbindungskapazität von 300µg/ml.

<u>Puffer</u>

Zur Proteinisolation und Aufreinigung wurden verschiedene Puffer benötigt

Zellsammelpuffer:

PBS Phosphatpuffer ohne Magnesium und Kalzium

Gemeinsame Stammlösung der folgenden Puffer:

50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, Tween 20 0,05%, pH8,0

Zur Herstellung von einem Liter Stammlösung wurden 6,9g Na₂HPO₄, 17,54g NaCl und Tween 20 10% (Monolaurat Tween 20R, Fa. Sigma) zusammengefügt und mit Ecotainer Wasser ad 1000ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit 1N NaOH auf 8,0 eingestellt.

Lysispuffer, Waschpuffer:

Zur Herstellung des Lysispuffer wurden 300ml der Stammlösung 6ml 1M Imidazol (1.3-Diaza-2,4-cyclopentadien, Fa. Sigma) hinzugegeben. Die Lösung enhielt somit 20mM Imidazol.

Elutionspuffer:

Zur Herstellung des Lysispuffer wurden 300ml der Stammlösung 75ml 1M Imidazol hinzugegeben. Die Lösung enhielt somit 250mM Imidazol.

Zur Vorbereitung wurden die Zellen zweimal mit 10ml kaltem PBS gewaschen. Nach Zusatz von 10ml Zellsammelpuffer und kurzer Inkubation wurden die Zellen mit dem Schaber abgekratzt, 5 Minuten bei 1000g zentrifugiert und in 500µl Lysispuffer resuspendiert. Durch dreimaliges Einfrieren im -80°C Kühlschrank und Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Zellen lysiert. Die Klärung des Lysates erfolgte über den QIA Shredder durch Zentrifugation bei 15000Upm. Das Lysat wurde mit 5M NaCI-Lösung 1M NaCl versetzt ad und nach Zugabe von 15µl Agarosekugelsuspension zwei Stunden bei 4°C geschaukelt. Das Lysat wurde dann auf einer 96-Napf-Platte verteilt. Es folgten zwei Waschschritte auf dem Magneten mit 1ml Waschpuffer. Zur Ablösung des Proteins wurden 50µl Elutionspuffer zugesetzt. Die Proben wurden in einem Eppendorffgefäss vereinigt.

B.IV.2. Gelelektrophorese und Western Transfer

In der Gelelektrophorese wurde das Zielprotein durch seine Wandereigenschaften im elektrischen Feld aufgrund seiner Grösse und Ladung identifizierbar. Zum immunologischen Nachweis musste die Proteinbande mittels Western Transfer vom Gel auf eine Membran übertragen werden.

B.IV.2.1 Elektrophoresegerät und Laufbedingungen

Elektrophoresegerät:	Novex X- Cell Sure Lock Elektrophoresis Cell (Fa.
	Invitrogen)
Gelplatten:	NuPage Bis Tris Gel, 12%, 1mm, 10 well (Fa
	Invitrogen)

Die Laufbedingungen wurden auf 200V standardisiert. Die Laufzeit betrug etwa 35 bis 50 Minuten.

B.IV.2.2 Puffer der Gelelektrophorese

NuPage MOPS SDS Laufpuffer 20x (3- (N- morpholino) Propansulfat) (Fa. Invitrogen):

Tris Base (Trishydroximethylaminomethan) 60,6g (1M), SDS (Natrium-dodecyl-Sulfat) 10g (69.3mM), EDTA 3g (20,5mM), ultrareines Wasser ad 500ml

NuPage SDS Probenpuffer 4x (Fa. Invitrogen):

Glycerol4g,TrisBase0,682g,TrisHCl(Trishydroxymethylaminomethanhydrochlorid)0,666g,LDS(Dodecyl-Lithiumsulfat)0,800g,EDTA 0,006g,Serva BlueG2500,75mleiner 1% Lösung,Phenol Rot 0,25mleiner 1% Lösung

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit etwa einem Drittel Probenpuffer versetzt und dann 10 Minuten bei 90°C denaturiert. Der MOPS Puffer wurde mit Ecotainer Wasser 1:20 verdünnt. Als Marker wurde die 6x-His-Proteinleiter der Firma Qiagen und der Novex-SeeBlue-Plus2-Proteinstandart (Fa. Invitrogen) benutzt. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel entnommen, auf die Nitrozellulosemembran des Transfersystems gelegt und zwischen zwei Filterpapieren und vier Schwämmen, ebenfalls Teile des Transfersystems, gestapelt. Dieses "Sandwich" wurde in das Transfermodul geklemmt. Durch ein elektrisches Feld im Transfersystem erfolgte dann die Übertragung des Zielproteins auf die Membran.

B.IV.2.3 Transfergerät und Laufbedingungen

Transfergerät:	Novex X- Cell Sure Lock Electrophoresis Cell, X-
	Cell II Blot Module
Nitrocellulosemembran:	Novex NC- Membrane Filterpaper Sandwich, $0,2\mu m$
	Porengrösse.

Blotting Pads: Novex Sponge Pad for X- Cell II Blotting

Die Transferbedingungen wurden auf 30V und eine Stunde standardisiert.

B.IV.2.4 Puffer des Westerntransfer

NuPage Transferpuffer 20x (Fa. Invitrogen):

Bizin(N,N-bis[2-Hydroxyethyl]glycin)10,2g(500mM),BisTris(bis[2-Hydroxyethyl]iminotris[hydroximethyl]methan;2-bis[2-Hydroxymethyl]amino-2-[hydroxymethyl]-1,3-propanediol)13,08g(500mM),EDTA0,75g(20,5mM),Chlorobutanol 1mM, ultrareines Wasser ad 125ml.

Die Gebrauchslösung des Transferpuffers wurde aus 850ml Ecotainer Wasser, 50ml Transferpuffer 20x und 100ml Ethanol zusammengestellt.

B.IV.3. Western Immundetection, Lumineszenz

Der Nachweis des Zielproteins erfolgte mit dem Western Breeze Chemiluminescent Kit α Maus (Fa. Invitrogen.) Als primärer Antikörper gegen die carboxyterminale 6x-His-Gruppen des Zielproteins wurde der Penta-His- Antikörper frei von bovinem fetalem Albumin (Fa. Qiagen) verwendet. Der mit alkalischer Phosphatase konjugierte sekundäre Antikörper (Western Breeze Kit) band während des Detektionsvorgangs an den primären Antikörper. Die Protein-Antikörperkomplexe konnten dann durch Umsatz eines Substrates durch die alkalische Phosphatase mit Hilfe eines Röntgenbildes sichtbar gemacht werden.
B.IV.3.1 Puffer/ Blockierungslösung

Zum Proteinnachweis wurden verschiedene Puffer und Blockierungslösungen benötigt.

Blocker/Diluent Part A: Konzentrierte gepufferte Salzlösung mit Detergent (Western Breeze Kit)

Blocker/Diluent Part B:

Konzentrierte Hammessten Kasein Lösung (Western Breeze Kit)

Zur Herstellung der Blockierungslösung wurde 14ml Ecotainer Wasser mit 4ml Blocker Diluent Part A vermischt, danach 2ml Blocker Diluent Part B (Western Breeze Kit) hinzugefügt.

B.IV.3.2 Primärer Antikörper

100µg Penta-His-Antikörper wurden mit 1ml Ecotainer Wasser à 200µl aliquotiert. 10µl der Antikörperstammlösung wurden mit 10ml der Blockierungslösung zur Antikörperarbeitslösung vermischt. Das Falconröhrchen mit der Arbeitslösung wurde mit Alufolie abgedunkelt.

B.IV.3.3 Sekundärer Antikörper

Fertiglösung von alkalische Phosphatase konjugierten hochaffinen Anti Maus IgG Antikörpern (Western Breeze Kit)

Der sekundäre Antikörper war gebrauchsfertig im Western Breeze Kit erhalten.

B.IV.3.4 Waschlösung

Washsolution: Konzentrierte gepufferte Salzlösung mit Detergent (Western Breeze Kit)

Die Waschlösung bestand aus einer Mischung von 150ml Ecotainer Wasser und 10ml Washsolution.

B.IV.3.5 Chemilumineszenz Substrat

Das komplette Nitroblock-II-Enhancing Reagenz wurde zu CDP-Star, dem Chemilumineszenz-Substrat für die alkalische Phosphatase (beide Western Breeze Kit) hinzugegeben.

Alle Wasch- und Detektionsvorgänge erfolgten in einer Plastikschale auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Nach dem Westerntransfer wurde die Nitrozellulosemembran zweimal 5 Minuten in 20ml Ecotainer Wasser gewaschen. Danach wurde sie in 10ml Blockierungslösung gelegt und 30 Minuten inkubiert. Nach zwei fünfminütigen Waschvorgängen erfolgte eine Inkubation von 60 Minuten in der Arbeitslösung des primären Antikörpers. Nach vier fünfminütigen Waschvorgängen in jeweils 20ml Waschlösung wurde die Membran für 30 Minuten in 10ml der sekundären Antikörperlösung gelegt. Es folgten drei fünfminütige Waschvorgänge in je 20ml Waschlösung und drei zweiminütige Waschvorgänge in je 20ml Ecotainer Wasser. Auf einer durchsichtigen Plastikfolie wurde die Membran mit 2,5ml Chemilumineszent Substrat benetzt und 5 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Die Färbelösung wurde mit einem Filterpapier entfernt. Nach Auflegen einer zweiten Klarsichtfolie wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert und der Film entwickelt.

B.V. Zellzählungs- und Proliferationsversuche

B.V.1. Rekonstitution der Wachstumsfaktoren

Die Rekonstitution des lyophilisierten TGFß 1 (Transforming Growth Faktor ß1, Fa. Sigma) erfolgte mittels einer Rekonstitutionslösung (HCL 4mM, Rinderserumalbumin (BSA) 1mg/ml). Die Rekonstitutionslösung wurde aus 9860 μ l PBS Puffer mit 40 μ l HCl und 100 μ l BSA zusammengesetzt. 1 μ g TGFß 1 wurde mit 1ml Rekonstitutionslösung versetzt. Die Lösung wurde in sterile Eppendorffgefässe à 100 μ l aliquotiert und bei –20°C gelagert.

Die Rekonstitution des lyophilisierten Aktivin A (rhAktivin A Fa. R&D Systems, 10µg) erfolgte mittels einer Rekonstitutionslösung aus sterilem PBS und 1mg/ml BSA. Die

Rekonstitutionslösung wurde aus 9900µl PBS Puffer und 100µl BSA zusammengesetzt. 10µg Aktivin A wurden mit 10 ml der Rekonstitutionslösung versetzt. Die Lösung wurde in sterile Eppendorffgefässe à 100µl aliquotiert und bei – 20°C gelagert. Die Rekonstitution der Wachstumsfaktoren BMP4, Inhibin A und B und Follistatin (alle Fa. R&D Systems) erfolgte nach dem Schema des Aktivin A.

B.V.2. Bestimmung der Proliferationsaktivität untransfizierter und transfizierter Hep G2 Zellen mit dem Zell Proliferations Reagenz WST-1 (4- [3- (lodophenyl)-2- (4- Nitrophenyl)- 2H- 5- Tetrazolio]- 1, 3- benzene Disulfonat)

Der WST-1 Test zur Erfassung der Proliferationsaktivität adhärenter kultivierter Zellen wurde bei der Firma Boehringer Mannheim erworben (Zell Proliferations Reagenz WST-1). Die Aussaat der Zellen erfolgte auf 96 Napf-Platten à 4000 Zellen pro Napf in je 150µl Medium. Bei untransfizierten Zellen kam grundsätzlich das Standardmedium zur Anwendung, bei transfizierten Zellen das Selektionsmedium.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellkulturen mit Trypsin EDTA versetzt, einer Vitalfärbung mit Trypanblau unterzogen, in der Neubauerkammer gezählt und nach erneuter Aussaat für weitere 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle auf Adhärenz der Zellen wurden die Testsubstanzen TGFß 1, Aktivin A, BMP4, Inhibin A, Inhibin B und Follistatin in jeweils 50µl Medium zugesetzt. Die Messung erfolgte je nach Versuchsansatz 15 Minuten bis 3 Stunden nach Zugabe der Wachstumsfaktoren oder 5 bis 14 Tage nach Aussaat der Zellen. Am Messtag wurde in jede Vertiefung 10µl des WST-1 Reagenz zugesetzt. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen je nach Versuchsansatz 15 Minuten bis 3 Stunden inkubiert. Nach Durchmischung für 60 Sekunden auf einem Plattenschüttler wurde im Mikrotiterplattenleser (Fa. SLT; Easy Reader EAR 400 AT) die Extinktion bei 450nm und einer Referenzwellenlänge von 690nm bestimmt. Der Messwert wurde durch Substraktion des bei Referenzwellenlänge erhaltenen Wertes von dem Wert bei Messwellenlänge errechnet. Jedem Messwert liegen die Messpunkte von sechs Näpfen zu Grunde.

C. Ergebnisse

C.I. Analyse des Gens

C.I.1. Gensequenz des menschlichen nma-Gens

Abbildung 3: Sequenzanalyse des nma-Gens

Die sequenzierten DNA-Anteile umfassen die gesamte codierende Sequenz, 780 Basenpaare (bp440-1222 der DNA, bp 373-1155 der cDNA), für ein 260 Aminosäuren langes Protein. Sie enthalten ein Intron in Position 805 (738 der cDNA), dass die Länge von 437 Basenpaaren hat.

1	cggggcggtg	caggccggct	cccggcgcgg	ggcgctattt	acggcgcgga	gccggagaga
61	cctgggctgg	cgcgggcggg	agctgcggcg	gatacccttg	cgtgctgtgg	agaccctact
121	ctcttcgctg	agaacggccg	ctagcgggga	ctgaaggccg	ggagcccact	cccgacccgg
181	ggctagcgtg	cgtccctaga	gtcgagcggg	gcaagggagc	cagtggccgc	cgacggggga
241	ccgggaaact	tttctgggct	cctgggcgcg	ccctgtagcc	gcgctccatg	ctccggcagc
301	ggcccgaaac	ccagccccgc	cgctgacggc	gcccgccgct	ccgggcaggg	cccatgccct
361	gcgcgctccg	ggggtcgtag	gctgccgccg	agccggggct	ccggaagccg	gcggggggcgc
421	cgcggccgtg	cggggcgtca	atggatcgcc	actccagcta	catcttcatc	tggctgcagc
481	tggagctctg	cgccatggcc	gtgctgctca	ccaaaggtga	aattcgatgc	tactgtgatg
541	ctgcccactg	tgtagccact	ggttatatgt	gtaaatctga	gctcagcgcc	tgcttctcta
601	gacttcttga	tcctcagaac	tcaaattccc	cactcaccca	tggctgcctg	gactctcttg
661	caagcacgac	agacatctgc	caagccaaac	aggcccgaaa	ccactctggc	accaccatac
721	ccacattgga	atgctgtcat	gaagacatgt	gcaattacag	agggctgcac	gatgttctct
781	ctcctcccag	gggtgaggcc	tcaggtaggt	ggaagccgtt	tctaaccaga	atgcctgcct
841	gatctataga	cttgtgacag	ccacgacttt	gtatgtctgc	tattgatttt	gttgttaatg
901	taattagaga	caccagaggg	agaagcctgg	ctggatgcaa	agatgcatct	tgattgagtg
961	gcttttatgt	ctgagcatta	gatgtctgtc	tacataatag	gttttgcctg	tttttcaac
1021	Lattttgaaga	cattaaaagg	ccattacatc	tcagtaatga	cagtctgtaa	acaaatgcgt
1081	Lttgtaagctt	cttcagatag	ttttgcaatg	ttttctaaat	atcgttgatt	taattgtaag
1141	Lcttctttta	atggaattct	tggttaaaat	gaattgatga	ttatgaatat	ccctaggagg
1201	Lagttagcatg	gagtttgatc	attttctttg	tactccttta	ggacaaggaa	acaggtatca
1261	L gcatgatggt	agcagaaacc	ttatcaccaa	ggtgcaggag	ctgacttctt	ccaaagagtt
1321	Lgtggttccgg	gcagcggtca	ttgccgtgcc	cattgctgga	gggctgattt	tagtgttgct
1381	Ltattatgttg	gccctgagga	tgcttcgaag	tgaaaataag	aggctgcagg	atcagcggca
1441	Lacagatgctc	tcccgtttgc	actacagctt	tcacggacac	cattccaaaa	aggggcaggt
1501	Ltgcaaagtta	gacttggaat	gcatggtgcc	ggtcagtggg	cacgagaact	gctgtctgac
1561	Lctgtgataaa	atgagacaag	cagacctcag	caacgataag	atcctctcgc	ttgttcactg
1621	L gggcatgtac	agtgggcacg	ggaagctgga	attcgtatga	cggagtctta	tctgaactac
1681	Lacttactgaa	cagcttgaag	gccttttgag	ttctgctgga	caggagcact	ttatctgaag
1741	Lacaaactcat	ttaatcatct	ttgagagaca	aaatgacctc	tgcaaacaga	atcttggata
1801	Ltttcttctga	aggattattt	gcacagactt	aaatacagtt	aaatgtgtta	tttgctttta
1861	Laaattataaa	aagcaaagag	aagactttgt	acacactgtc	accagggtta	tttgcatcca
1921	Lagggagctgg	aattgagtac	ctaaataaac	aaaaatgtgc	cctatgtaag	cttctacatc
1981	Lttgatttatt	gtaaagattt	aaaagaaata	tatatattt	gtctgaaatt	taatagtgtc
2041	Ltttcataaat	ttaactggga	aacgtgagac	agtacatgtt	aattatacaa	atggccattt
2101	L gctgttaata	atttgttctc	aactctagga	tgtggcttgg	tttttttt	tctcttttct
2161	Lttttaaaca	agaccaagat	cttgcttatt	cttccatgtg	cctgtgtaat	tttcttacag
2221	Ltgtggagttt	ctaaatgtat	actgaccatc	ttttagtgtc	t	

C.I.2. Polymorphismus des Introns

Abbildung 4: CT-Polymorphismus des 437bp langen Introns in Position des 13 bp nach der 5`Splice-Site





Abbildung 5:

Die Genkarte als Übersicht über das menschliche nma-Gen zeigt noch einmal die Position der cDNA und des entdeckten Introns im Gen und die wichtigsten Amplimere, ihre Längen und Primer.



C.II. Transfektionsergebnisse

Nma-Proteinnachweis in der Zellkultur nach stabiler Transfektion

Legende: Histidinleiter 2,5ng, 1/2/3: je 10µl Aufgereinigtes Zellysat



Abbildung 6:

Die Gelelektrophorese wurde zur Identifizierung des nma-Proteins in stabil transfizierten Hep G2 Zellen durchgefürt. Nach Isolations-und Aufreinigungsschritten wurde das Substanzgemisch durch Gelelekrophorese aufgetrennt. Das 780bp lange nma Protein kodiert für 260 Aminosäuren und ist so in Höhe der 25Kd Bande zu finden.

C.III. Die Proliferationsaktivität von Hep G2 Zellen unter der Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren ohne den Einfluss des nma-Gens

C.III.1. Der Einfluss von TGF-ß1 in Abhängigkeit von der Konzentration auf die relative Proliferationsaktivität untransfizierter Hep G2 Zellen in 5% FKS



Abbildung 7:

Hep G2 Zellen, untransfiziert, wurden in 100µl DMEM/HAM 1:1 Medium mit 5% FKS und 200µg/ml Zeocin, mit je 4000 Zellen pro Napf ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden 50µl Medium pro Napf (Zusammensetzung s.o.) mit je 0,05ng/ml, 0,1ng/ml, 0,5ng/ml 1ng/ml, 2,5ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml und 50ng/ml TGF-ß1 hinzu gegeben und erneut 24 Stunden inkubiert. Am fünften Tag nach Aussaat wurden 10µl/Napf Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 zugefügt und nach 3 Stunden Inkubation die Aktivität der Mitochondrien durch den Umsatz des Proliferationsreagenz zu Formazan photometrisch bei λ =450nm und einer Referenz λ = 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die relative Proliferationsaktivität der Zellen angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Extinktionswerte der TGF-ß1 ausgesetzten Zellen wurde durch den Extinktionswert der Kontrolle geteilt und durch Multiplikation mit 100 ebenfalls in Prozent angegeben. ***=p<0.001

C.III.2. Der Einfluss von TGF-ß1 in einer Konzentration mit maximaler Hemmwirkung auf die relative Proliferationsaktivität von stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen in 5% FKS



Abbildung 8:

Hep G2 Zellen, stabil transfiziert mit dem Kontrollvektor, wurden in 100µl DMEM/HAM 1:1 Medium mit 5% FKS und 200µg/ml Zeocin, mit je 4000 Zellen pro Napf ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden 50µl Medium pro Napf (Zusammensetzung s.o.) mit je 25ng/ml TGF-ß1 hinzu gegeben und erneut 24 Stunden inkubiert. Am fünften Tag nach Aussaat wurden 10µl/Napf Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 zugefügt und nach 3 Stunden Mitochondrien Inkubation die Aktivität der durch den Umsatz des Proliferationsreagenz zu Formazan photometrisch bei λ =450nm und einer Referenz λ = 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die relative Proliferationsaktivität der Zellen angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Extinktionswerte der jeweiligen Kontrolle wurde aleich 100% gesetzt. Die Extinktionswerte der TGF-ß1 ausgesetzten Zellen wurde durch den Extinktionswert der Kontrolle geteilt und durch Multiplikation mit 100 ebenfalls in Prozent angegeben. ***=p<0,001

C. III.3. Der Einfluss von Aktivin A in Abhängigkeit von der Konzentration auf die relative Proliferationsaktivität untransfizierter Hep G2 Zellen in 5% FKS



Abbildung 9:

Hep G2 Zellen, untransfiziert, wurden in 100µl DMEM/HAM 1:1 Medium mit 5% FKS und 200µg/ml Zeocin, mit je 4000 Zellen pro Napf ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden 50µl Medium pro Napf (Zusammensetzung s.o.) mit je 0,05ng/ml, 0,1ng/ml, 0,5ng/ml 1ng, 2,5ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml und 50ng/ml Aktivin A hinzu gegeben und erneut 24 Stunden inkubiert. Am fünften Tag nach Aussaat wurden 10µl/Napf Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 zugefügt und nach 3 Stunden Inkubation die Aktivität der Mitochondrien durch den Umsatz des Proliferationsreagenz zu Formazan photometrisch bei λ =450nm und einer Referenz λ = 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die relative Proliferationsaktivität der Zellen angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Extinktionswerte der jeweiligen Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Die Extinktionswerte der Aktivin A ausgesetzten Zellen wurde durch den Extinktionswert der Kontrolle geteilt und durch Multiplikation mit 100 ebenfalls in Prozent angegeben.

C.III.4. Der Einfluss von Aktivin A in einer Konzentration mit maximaler
Hemmwirkung auf die relative Proliferationsaktivität von stabil mit dem pcDNA
3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen in 5% FKS



Abbildung 10:

Hep G2 Zellen, stabil transfiziert mit dem Kontrollvektor, wurden in 100µl DMEM/HAM 1:1 Medium mit 5% FKS und 200µg/ml Zeocin, mit je 4000 Zellen pro Napf ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden 50µl Medium pro Napf (Zusammensetzung s.o.) mit je 50ng/ml Aktivin A hinzu gegeben und erneut 24 Stunden inkubiert. Am fünften Tag nach Aussaat wurden 10ul/Napf Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 zugefügt und nach 3 Stunden Inkubation Mitochondrien durch die Aktivität der den Umsatz des Proliferationsreagenz zu Formazan photometrisch bei λ =450nm und einer Referenz λ = 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die relative Proliferationsaktivität der Zellen angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Extinktionswerte der jeweiligen Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Die Extinktionswerte der Aktivin A ausgesetzten Zellen wurde durch den Extinktionswert der Kontrolle geteilt und durch Multiplikation mit 100 ebenfalls in Prozent angegeben. ***=p<0,001

C.III.5. Der Einfluss von Inhibin A auf die relative Proliferationsaktivität von stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen in 5% FKS



Abbildung 11:

Hep G2 Zellen, stabil transfiziert mit dem Kontrollvektor wurden in 100µl DMEM/HAM 1:1 Medium mit 5% FKS und 200µg/ml Zeocin, mit je 4000 Zellen pro Napf ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden 50µl Medium pro Napf (Zusammensetzung s.o.) mit je 100ng/ml Inhibin A hinzu gegeben und erneut 24 Stunden inkubiert. Am fünften Tag nach Aussaat wurden 10µl/Napf Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 zugefügt und nach 3 Stunden Inkubation die Aktivität der Mitochondrien durch den Umsatz des Proliferationsreagenz zu Formazan photometrisch bei λ =450nm und einer Referenz λ = 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die relative Proliferationsaktivität der Zellen angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Extinktionswerte der jeweiligen Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Die Extinktionswerte der Inhibin A ausgesetzten Zellen wurde durch den Extinktionswert der Kontrolle geteilt und durch Multiplikation mit 100 ebenfalls in Prozent angegeben.

C.III.6. Der Einfluss von Inhibin B auf die relative Proliferationsaktivität von stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen in 5% FKS



Abbildung 12:

Hep G2 Zellen, stabil transfiziert mit dem Kontrollvektor wurden in 100µl DMEM/HAM 1:1 Medium mit 5% FKS und 200µg/ml Zeocin, mit je 4000 Zellen pro Napf ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden 50µl Medium pro Napf (Zusammensetzung s.o.) mit je 100ng/ml Inhibin B hinzu gegeben und erneut 24 Stunden inkubiert. Am dritten Tag nach Aussaat wurden 10µl/Napf Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 zugefügt und nach 3 Stunden Inkubation die Aktivität der Mitochondrien durch den Umsatz des Proliferationsreagenz zu Formazan photometrisch bei λ =450nm und einer Referenz λ = 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die relative Proliferationsaktivität der Zellen angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Extinktionswerte der jeweiligen Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Die Extinktionswerte der Inhibin B ausgesetzten Zellen wurde durch den Extinktionswert der Kontrolle geteilt und durch Multiplikation mit 100 ebenfalls in Prozent angegeben.

C.III.7. Der Einfluss von Follistatin auf die relative Proliferationsaktivität von stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen in 5% FKS



Abbildung 13:

Hep G2 Zellen, stabil transfiziert mit dem Kontrollvektor, wurden in 100µl DMEM/HAM 1:1 Medium mit 5% FKS und 200µg/ml Zeocin, mit je 4000 Zellen pro Napf ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden 50µl Medium pro Napf (Zusammensetzung s.o.) mit je 10ng/ml Follistatin hinzu gegeben und erneut 24 Stunden inkubiert. Am dritten Tag nach Aussaat wurden 10µl/Napf Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 zugefügt und nach 3 Stunden Inkubation Aktivität der Mitochondrien durch die den Umsatz des Proliferationsreagenz zu Formazan photometrisch bei λ =450nm und einer Referenz λ = 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die relative Proliferationsaktivität der Zellen angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Extinktionswerte der jeweiligen Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Die Extinktionswerte der Follistatin ausgesetzten Zellen wurde durch den Extinktionswert der Kontrolle geteilt und durch Multiplikation mit 100 ebenfalls in Prozent angegeben.

C.III.8. Der Einfluss von BMP4 auf die relative Proliferationsaktivität von stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierter Hep G2 Zellen in 5% FKS



Abbildung 14:

Hep G2 Zellen, stabil transfiziert mit dem Kontrollvektor, wurden in 100µl DMEM/HAM 1:1 Medium mit 5% FKS und 200µg/ml Zeocin, mit je 4000 Zellen pro Napf ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden 50µl Medium pro Napf (Zusammensetzung s.o.) mit je 10ng/ml bzw.100ng/ml BMP4 hinzu gegeben und erneut 24 Stunden inkubiert. Am fünften Tag nach Aussaat wurden 10µl/Napf Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 zugefügt und nach 3 Stunden den Inkubation die Aktivität Mitochondrien durch der Umsatz des Proliferationsreagenz zu Formazan photometrisch bei λ =450nm und einer Referenz λ = 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die relative Proliferationsaktivität der Zellen angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Extinktionswerte der jeweiligen Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Die Extinktionswerte der BMP4 ausgesetzten Zellen wurde durch den Extinktionswert der Kontrolle geteilt und durch Multiplikation mit 100 ebenfalls in Prozent angegeben. ***=p<0,001

C.IV. Die Proliferationsaktivität von Hep G2 Zellen unter der Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren unter Einfluss des nma-Gens

C.IV.1. Der Einfluss von TGF-ß1 in maximaler Hemmkonzentration auf die relative Proliferationsaktivität von stabil mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma transfizierten Hep G2 Zellen im Vergleich zu stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen in 5% FKS



Abbildung 15:

Hep G2 Zellen, stabil transfiziert mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma und dem Kontrollvektor, wurden in 100µl DMEM/HAM 1:1 Medium mit 5% FKS und 200µg/ml Zeocin, mit je 4000 Zellen pro Napf ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden 50µl Medium pro Napf (Zusammensetzung s.o.) mit je 25ng/ml TGF-ß1 hinzu gegeben und erneut 24 Stunden inkubiert. Am fünften Tag nach Aussaat wurden 10µl/Napf Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 zugefügt und nach 3 Stunden Inkubation die Aktivität der Mitochondrien durch den Umsatz des Proliferationsreagenz zu Formazan photometrisch bei λ =450nm und einer Referenz λ = 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die relative Proliferationsaktivität der Zellen angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Extinktionswerte der jeweiligen Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Die Extinktionswerte der TGF-ß1 ausgesetzten Zellen wurde durch den Extinktionswert der Kontrolle geteilt und durch Multiplikation mit 100 ebenfalls in Prozent angegeben. ***=p<0,001

C.IV.2. Der Einfluss von Aktivin A in maximaler Hemmkonzentration auf die relative Proliferationsaktivität von stabil mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma transfizierten Hep G2 Zellen im Vergleich zu stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen in 5% FKS



Abbildung 16:

Hep G2 Zellen, stabil transfiziert mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma und dem Kontrollvektor, wurden in 100µl DMEM/HAM 1:1 Medium mit 5% FKS und 200µg/ml Zeocin, mit je 4000 Zellen pro Napf ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden 50µl Medium pro Napf (Zusammensetzung s.o.) mit je 50ng/ml Aktivin A hinzu gegeben und erneut 24 Stunden inkubiert. Am fünften Tag nach Aussaat wurden 10µl/Napf Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 zugefügt und nach 3 Stunden Inkubation die Aktivität der Mitochondrien durch den Umsatz des Proliferationsreagenz zu Formazan photometrisch bei λ =450nm und einer Referenz λ = 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die relative Proliferationsaktivität der Zellen angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Extinktionswerte der jeweiligen Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Die Extinktionswerte der Aktivin A ausgesetzten Zellen wurde durch den Extinktionswert der Kontrolle geteilt und durch Multiplikation mit 100 ebenfalls in Prozent angegeben.

***=p<0,001

C.IV.3. Der Einfluss von Inhibin A auf die relative Proliferationsaktivität von stabil mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma transfizierten Hep G2 Zellen im Vergleich zu stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen in 5% FKS



Abbildung 17:

Hep G2 Zellen, stabil transfiziert mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma und dem Kontrollvektor, wurden in 100µl DMEM/HAM 1:1 Medium mit 5% FKS und 200µg/ml Zeocin, mit je 4000 Zellen pro Napf ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden 50µl Medium pro Napf (Zusammensetzung s.o.) mit je 100ng/ml Inhibin A hinzu gegeben und erneut 24 Stunden inkubiert. Am fünften Tag nach Aussaat wurden 10µl/Napf Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 zugefügt und nach 3 Stunden Inkubation die Aktivität der Mitochondrien durch den Umsatz des Proliferationsreagenz zu Formazan photometrisch bei λ =450nm und einer Referenz λ = 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die relative Proliferationsaktivität der Zellen angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Extinktionswerte der Inhibin A ausgesetzten Zellen wurde durch den Extinktionswert der Kontrolle geteilt und durch Multiplikation mit 100 ebenfalls in Prozent angegeben.

C.IV.4. Der Einfluss von Inhibin B auf die relative Proliferationsaktivität von stabil mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma transfizierten Hep G2 Zellen im Vergleich zu stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen in 5% FKS



Abbildung 18:

Hep G2 Zellen, stabil transfiziert mit dem Vektor pcDNA 3.1nma und dem Kontrollvektor, wurden in 100µl DMEM/HAM 1:1 Medium mit 5% FKS und 200µg/ml Zeocin, mit je 4000 Zellen pro Napf ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden 50µl Medium pro Napf (Zusammensetzung s.o.) mit je 100ng/ml Inhibin B hinzu gegeben und erneut 24 Stunden inkubiert. Am dritten Tag nach Aussaat wurden 10µl/Napf Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 zugefügt und nach 3 Stunden Inkubation die Aktivität der Mitochondrien durch den Umsatz des Proliferationsreagenz zu Formazan photometrisch bei λ =450nm und einer Referenz λ = 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die relative Proliferationsaktivität der Zellen angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Extinktionswerte der Inhibin B ausgesetzten Zellen wurde durch den Extinktionswert der Kontrolle geteilt und durch Multiplikation mit 100 ebenfalls in Prozent angegeben.

C.IV.5. Der Einfluss von Follistatin auf die relative Proliferationsaktivität von stabil mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma transfizierten Hep G2 Zellen im Vergleich zu stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen in 5% FKS



Abbildung 19:

Hep G2 Zellen, stabil transfiziert mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma und dem Kontrollvektor, wurden in 100µl DMEM/HAM 1:1 Medium mit 5% FKS und 200µg/ml Zeocin, mit je 4000 Zellen pro Napf ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden 50µl Medium pro Napf (Zusammensetzung s.o.) mit je 100ng/ml Follistatin hinzu gegeben und erneut 24 Stunden inkubiert. Am dritten Tag nach Aussaat wurden 10µl/Napf Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 zugefügt und nach 3 Stunden Inkubation die Aktivität der Mitochondrien durch den Umsatz des Proliferationsreagenz zu Formazan photometrisch bei λ =450nm und einer Referenz λ = 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die relative Proliferationsaktivität der Zellen angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Extinktionswerte der jeweiligen Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Die Extinktionswerte der Follistatin ausgesetzten Zellen wurde durch den Extinktionswert der Kontrolle geteilt und durch Multiplikation mit 100 ebenfalls in Prozent angegeben.

C.IV.6. Der Einfluss von BMP4 auf die relative Proliferationsaktivität von stabil mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma transfizierten Hep G2 Zellen im Vergleich zu stabil mit dem pcDNA 3.1 Leervektor transfizierten Hep G2 Zellen in 5% FKS





Abbildung 20:

Hep G2 Zellen, stabil transfiziert mit dem Vektor pcDNA 3.1 nma und dem Kontrollvektor wurden in 100 μ l DMEM/HAM 1:1 Medium mit 5% FKS und 200 μ g/ml Zeocin, mit je 4000 Zellen pro Napf ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden 50 μ l Medium pro Napf (Zusammensetzung s.o.) mit je 10ng/ml bzw.100ng/ml BMP4 hinzu gegeben und erneut 24 Stunden inkubiert. Am

fünften Tag nach Aussat wurden 10µl/Napf Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 zugefügt und nach 3 Stunden Inkubation die Aktivität der Mitochondrien durch den Umsatz des Proliferationsreagenz zu Formazan photometrisch bei λ =450nm und einer Referenz λ = 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die relative Proliferationsaktivität der Zellen angegeben in Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Die Extinktionswerte der jeweiligen Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Die Extinktionswerte der BMP4 ausgesetzten Zellen wurde durch den Extinktionswert der Kontrolle geteilt und durch Multiplikation mit 100 ebenfalls in Prozent angegeben.

C.V. Zusammenfassung der Ergebnisse

C.V.1. Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzanalyse

Die cDNA des menschlichen nma-Gens kodiert von bp373-1155, also 780bp, für ein 260 Aminosäuren langes Protein. Die DNA konnte amplifiziert und daraufhin sequenziert werden, wobei die Sequenz die gesamte cDNA umfasst. Hierbei wurde ein 437bp langes Intron zwischen Position 737 und 738 der cDNA entdeckt und sequenziert. Das Intron enthält in Position 13 nach der 5'Splice-Site einen CT-Polymorphismus.

C.V.2. Zusammenfassung der Ergebnisse der Proliferationsversuche

Mit dem WST1-Test wurde die relative Proliferation der Hep G2 Zellen durch den Umsatz von WST1-Reagenz zu Formazan in den Mitochondrien der Zellen messbar gemacht. Das Proliferationsverhalten der Zellen unter Einfluss eines bestimmten Wachstumsfaktors wurde auf die Wachstumsaktivität unbehandelter Zellen als Kontrollen bezogen. Im Mittelpunkt des Interesses stand der Vergleich des Proliferationsverhaltens von stabil mit dem nma-Gen transfizierten Zellen zu Leervektor-transfizierten Zellen unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren.

C.V.2.1 Der Einfluss des nma-Gens auf das Wachstum von Hep G2 Zellen unter der Wirkung von TGF-ß1

TGF-ß1 hemmt das Wachstum untransfizierter Hep G2 Zellen konzentrationsabhängig und in niedrigen Konzentrationen. So ist ein Hemmeffekt am fünften Tag nach Faktorenzugabe in 5% FKS bereits bei einer Konzentration von 0,05ng/ml nachweisbar, in 1% FKS bei einer Konzentration von 0,5ng/ml. Die maximale Hemmwirkung liegt in 5% FKS bei einer Konzentration von 1,0ng/ml und in 1% FKS bei einer Konzentration von 2,5ng/ml. TGF-ß1 hat somit eine hochpotente Hemmwirkung auf das Wachstum von Hep G2 Zellen.

Die stabile Transfektion mit dem nma-Gen verändert das Proliferationsverhalten von Hep G2 Zellen unter der Wirkung von TGF-ß1 nicht. Selbst bei einer Konzentration mit mehr als maximaler Hemmwirkung (25ng/ml) ist keine Empfindlichkeitsveränderung der Zellen gegenüber dem Wachstumsfaktor TGF-ß1 im Vergleich zu leer transfizierten Zellen nachzuweisen.

C.V.2.2 Der Einfluss des nma-Gens auf das Wachstum von Hep G2 Zellen unter der Wirkung von Aktivin A

Aktivin А hemmt das Wachstum untransfizierter Нер G2 Zellen konzentrationsabhängig und in niedrigen Konzentrationen. So ist ein Hemmeffekt am fünften Tag nach Faktorenzugabe in 5% FKS bei einer Konzentration von 2,5ng/ml nachweisbar, in 1% FKS bei einer Konzentration von 10,0 ng/ml. Die maximale Hemmwirkung liegt in 5% FKS bei einer Konzentration von 5,0ng/ml und in 1% FKS bei einer Konzentration von 10ng/ml. Aktivin hat somit eine hochpotente Hemmwirkung auf das Wachstums von Hep G2 Zellen ist jedoch weniger wirksam als der Wachstumsfaktor TGF-ß1.

Die stabile Transfektion mit dem nma-Gen verändert das Proliferationsverhalten von Hep G2 Zellen unter der Wirkung von Aktivin A nicht. Selbst bei einer Konzentration mit maximaler Hemmwirkung (25ng/ml) ist keine Empfindlichkeitsveränderung der Zellen gegenüber dem Wachstumsfaktor Aktivin A im Vergleich zu leer transfizierten Zellen nachzuweisen.

C.V.2.3 Der Einfluss des nma-Gens auf das Wachstum von Hep G2 Zellen unter der Wirkung von Inhibin A

Inhibin A hat keinen Einfluss auf das Wachstum von Leervektor-transfizierten Hep G2 Zellen. Selbst bei Konzentrationen von 100ng/ml konnte in wiederholten Experimenten keine regelmässige Wachstumsveränderung durch den Wachstumsfaktor nachgewiesen werden.

Ebenso veränderte sich die Proliferationsaktivität von stabil mit dem nma-Gen transfizierten Zellen unter dem Einfluss von Inhibin A in Konzentrationen von 100ng/ml nicht. So bewirkt der Einfluss des nma-Gens keine Empfindlichkeitsveränderung der Zellen gegenüber der Wirkung von Inhibin A.

C.V.2.4 Der Einfluss des nma-Gens auf das Wachstum von Hep G2 Zellen unter der Wirkung von Inhibin B

Inhibin B hat drei Tage nach Zugabe zur Zellkultur keinen Einfluss auf das Wachstum von Leervektor-transfizierten Hep G2 Zellen. Selbst bei Konzentrationen von Experimenten 100ng/ml konnte in wiederholten keine regelmässige Wachstumsveränderung durch den Wachstumsfaktor nachgewiesen werden. Ebenso veränderte sich die Proliferationsaktivität von stabil mit dem nma-Gen transfizierten Zellen unter dem Einfluss von Inhibin B in Konzentrationen von So bewirkt der Einfluss 100ng/ml nicht. des nma-Gens keine Empfindlichkeitsveränderung der Zellen gegenüber der Wirkung von Inhibin B.

C.V.2.5 Der Einfluss des nma-Gens auf das Wachstum von Hep G2 Zellen unter der Wirkung von Follistatin

Follistatin hat in einer Dosis von 10ng/ml drei Tage nach Zugabe zur Zellkultur keinen Einfluss auf das Wachstum von Leervektor-transfizierten Hep G2 Zellen. Bei Konzentrationen von 10ng/ml konnte in wiederholten Experimenten keine regelmässige Wachstumsveränderung durch den Wachstumsfaktor nachgewiesen werden.

Ebenso veränderte sich die Proliferationsaktivität von stabil mit dem nma-Gen transfizierten Zellen unter dem Einfluss von Follistatin in Konzentrationen von 10ng/ml nicht. So bewirkt der Einfluss des nma-Gens keine Empfindlichkeitsveränderung der Zellen gegenüber der Wirkung von Follistatin.

C.V.2.6 Der Einfluss des nma-Gens auf das Wachstum von Hep G2 Zellen unter der Wirkung von BMP4

BMP4 steigert das Wachstum leer transfizierter Hep G2 Zellen. Sowohl bei Konzentrationen von 100ng/ml als auch bei Konzentrationen von 10ng/ml wurde fünf Tage nach Wachstumsfaktorzugabe, in 5% FKS eine hoch signifikante Steigerung der Proliferationsaktivität unter der Wirkung von BMP4 im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen.

BMP4 hemmt hingegen das Wachstum von stabil mit dem nma-Gen transfizierten Hep G2 Zellen. Sowohl bei Konzentrationen von 100ng/ml als auch 10ng/ml wurde fünf Tage nach Wachstumsfaktorzugabe, in 5% FKS eine hoch signifikante Hemmung der Proliferationsaktivität unter der Wirkung von BMP4 im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen. Die Unterschiede im Wachstumsverhalten der Hep G2 Zellen wurden in mehreren Experimenten regelmässig nachgewiesen.

D. Diskussion

Das Ziel der Untersuchung war es, das menschliche Genäquivalent des BMP-Funktionsantagonisten BAMBI zu identifizieren. Ferner sollte geklärt werden, ob dem humanen strukturhomologen Gen und Genprodukt eine ähnliche biologische Funktion zukommt wie dem Froschgen (BAMBI) und dem Zebrafischgen (nma). Aus einer Cosmidlibrary konnten wir das humane nma-Gen amplifizieren und sequenzieren. Das Ergebnis ist in Abbildung 3, 4 und 5 (C. Ergebnisse) dargestellt.

Das Ergebnis unserer Sequenzierarbeit konnten wir mit zwei alternativen humanen nma-Gensequenzen, beide veröffentlicht von Chikri et al (2000), vergleichen. Unsere überlappenden Sequenzen enthalten weder das 387bp-Intron der ersten Sequenzierung, noch das 82bp-Intron der zweiten Gensequenz Chikris. Das Ergebnis und weitere Unterschiede in Genlänge und Sequenz sind in Abbildung 21 dargestellt. Zur Erstellung der im Internet abgelegten Sequenz von Chikri liegen keine publizierten Informationen vor. Es ist offen, inwiefern es sich um Pseudogene (Mighell et al. 2000 [11]) handelt. Die von Degen et al. (1996 [12]) publizierte nma-Gensequenz ist in keiner uns zugänglichen Datenbank auffindbar.

Ein Vergleich der Genstruktur des menschlichen nma-Gens mit nma-Genen anderer Spezies und Gattungen war nicht möglich, da für diese keine genomischen Daten vorliegen.

Eine Rechner-gestützte Hybridisierungssimulation ergab eine Lokalisation der von uns zu identifizierenden Gensequenz auf Chromosom 10 in der Region p11.2-12.3. Dies bestätigt die durch Degen et al. durch radioaktive Hybridisierung direkt erhaltene Lokalisation [12]. Im Genom des Zebrafisch ist das nma-Gen nahe dem svil-Gen gelegen. Zebrafisch-svil ist das Ortholog eines menschlichen 205kDa Faktin Bindungsproteins, dem Supervillin, das auf Chromosom 10 in der Region 11.2 lokalisiert ist. Dies weist auf eine konservierte Syntenie zwischen nma und svil von Mensch und Zebrafisch hin und festigt die Vermutung, dass es sich um orthologe Gene handelt (Tsang et al.2001 [13]).



Abbildung 21: Gensequenzvergleich nma

57

Die Analyse der Aminosäuresequenz zeigt, dass das menschliche nma-Gen für ein putatives Cystein-reiches transmembranäres Protein codiert, das eine grosse Ähnlichkeit zum nma-Protein des Zebrafisch (Übereinstimmung 62%) und zum BAMBI Protein (Übereinstimmung 89%) aufweist (siehe Abbildung 22). Trotz kleiner Sequenzunterschiede ist klar ersichtlich, dass die drei Proteine zur gleichen Familie gehören.

Sequenzübereinstimmungen von 27% bzw. 29 % konnten zwischen den hydrophilen Cystein reichen Ligandenbindungsdomänen von ALK7/ALK6 und der extrazellulären Domäne des nma-Proteins beobachtet werden. Alle drei verglichenen Domänen enthalten die typische 9 Aminosäuren Cysteinbox. ALK7 hat in Bezug auf die Kinase Domäne in der Gruppe der Typ-I-Rezeptoren am meisten Ähnlichkeit mit ALK5 (TGFß Typ-I-Rezeptor) (Inman GJ et al. 2002 [14]). ALK7 ist der Typ-I-Rezeptor des nodalen Faktors, einem weiteren Liganden der TGF-ß Superfamilie (Bodestam et al. 2001 [15]). ALK6 ist der spezifische Typ-I-Rezeptor des BMP4 und 7 (Baker et al.[16]). Auch ALK2, Typ-I-Rezeptor von BMP4 /7 und Aktivin, ALK 3, Typ-I-Rezeptor von BMP4, und ALK4, Typ-I-Rezeptor von Aktivin, (Baker et al.[16]) zeigen in dieser Domäne Übereinstimmungen von 24% (ALK2), 25% (ALK3) und 18% (ALK4) mit den typischen Merkmalen der Ligandenbindungsdomäne. ALK3, 4 und 7 sind im Sequenzvergleich mit nma in Abbildung 23 beispielhaft dargestellt. Die Übereinstimmungen in der Ligandbindungsdomäne lassen vermuten, dass das nma-Protein als Rezeptor mit den genannten Liganden der TGFß-Superfamilie interagieren kann. Jedoch ist sein intrazellulärer Anteil relativ kurz und lässt eine Typ-I-Rezeptor typische intrazelluläre Serin-Threonin-Kinase Domäne vermissen, so dass die Postrezeptorkaskaden nicht wie üblich funktionieren.

Trunkierte Typ-I-Rezeptorproteine werden auch in anderen Bereichen der TGFß-Superfamilie beschrieben. So sind beim Menschen neben dem vollständigen ALK4 Rezeptor, einem Typ-I-Rezeptor des Aktivins auch, trunkierte Unterformen bekannt. ALK4-2 und ALK4-3 entstehen durch alternatives Splicing als verkürzte Rezeptorvarianten (Schulte et al. 2000 [8], 2001 [9], Xu et al. 1994 [6]). Sie sind unter anderem in Schilddrüsengewebe nachgewiesen und zeigen unterschiedliche Expressionsmuster in gesundem Drüsengewebe, Strumazellen und in Schilddrüsenkarzinomen.

Abbildung 22: Aminosäurensequenzvergleich

Hnma	MDRHSSYIFIWLQLELCAMAVLLTKGEIRCYCDAAHCVATGYMCKSELSA
Zfnma	MDR***LVSLWFQLELCAMAVLLTKGEIRCYCDAPHCVATGYMCKSELNA
BAMBI	MDRHSSLISLWLQLELCAMAVLLTKGEIRCYCDAPQCVATGYMCKSELNA
Hnma	CFSRLLDPQNSNSPLTHGCLDSLASTTDICQAKQARNHSGTTIPTLECCH
Zfnma	CFTKVLDPLNTNSPLTHGCVDSLLNSADVCSSKNVDISSGSSSP*VECCH
BAMBI	CFTKLLYPQNTNSPLTHGCLDSLGSTTEPCKGSAVQNPTAAPTLRLECCH
Hnma	EDMCNYRGLHDVLSPPRGEASGQGNRYQHDGSRNLITKVQELTSSKELWF
Zfnma	DDMCNYRGLHD*LTHPRGDS***TDRYHSS*NQNLITRVQELASAKEVWF
BAMBI	EDMCNYRGLHDVLSHPRSDASGPGGRHQHDNTRNLITKVHELTSSKELWF
Hnma	RAAVIAVPIAGGLILVLLIMLALRMLRSENKRLQDQRQQMLSRLHYSFHG
Zfnma	RAAVIAVPIAGGLILVLLIMLALRMLRSENKRLQAQRQQMLSRLHYSFHG
BAMBI	RAAVIAVPIAGGLILVLLIMLALRMLRSENKRLKDQRQQMLSRLHYSFHG
Hnma	*HHSKKGQVAKLDLECMVPVSGHENCCLTCDKMRQADLSN*****DKIL
Zfnma	HHHAKKGHVAKLDLECMVPVTGHENCCLTCDKLRQTDLCTGGGSGGERLL
BAMBI	*HHSKKGQVAKLDLECMVPVTGHENCCLTCDKLRHTDLSN*****DKII
Hnma	SLVHWGMYSGHGKLEFV
Zfnma	SLVHWGMYTGHGKLEFV
BAMBI	SLVHWGMYSGHGKLEFV

Legende: Aminosäuresequenz von humanem nma, Zebrafisch-nma und BAMBI. Übereinstimmende Sequenzabschnitte sind hervorgehoben. Unterstrichene Regionen enthalten die Signalsequenz und die transmembranäre Domäne.

Abbildung 23: Vergleich der Ligandenbindungsdomänen von ALK3/6/7 und nma

Sequenzvergleich nma und ALK6

NmaDICQAKQARNHSGTTIP----TLECCHE-DMCNYRGLHDVLSP115Q R+ T IP ++ECC E + CN + LH L PALK6-----QCRD---TPIPHQRRSIECCTERNECN-KDLHPTLPP112

Sequenzvergleich nma und ALK7

Nma :14LELCAMAVLLTKGEIRCYCDAAHCVATGYMCKSELSACFSRLLDPQNSNSP L L A A L+ G ++C C C ++ + C++E AC++ ++ ALK7:13LLLLAAAAELSPG-LKCVC--LLCDSSNFTCQTE-GACWASVM------

NmaLTHGCLDSLASTTDICQAK-QARNHSGTTIPTLECCHEDMCN
YRGLHDVLSLT+G+ S+ + QHS+ ECCD CNLH+ALK7LTNGKEQVIKSCVSLPELNAQVFCHSSNNVTKTECCFTDFCNNITLHLPTA

- Nma PPRGEASG122 P G
- ALK7 SPNAPKLG110

Sequenzvergleich nma und ALK3

Nma :28IRCYCDAAHCV--ATGYMCKSELSACFSRLLDPQNSNSPLTHGCLDSLASTT
 ++CYC + HC A C + CF+ + + L GC+ S
ALK3:59LKCYC-SGHCPDDAINNTCITN-GHCFAIIEEDDQGETTLASGCMKYEGSDF

Legende: Cystein-Residuen und die 9 Aminosäuren Cysteinbox (CCX{4-5}CN) sind hervorgehoben. + bezeichnet strukturell nah verwandte Aminosäuren, deren Austausch die Proteinstruktur hochwahrscheinlich nicht beeinflusst. Die Syntenie von humanem nma und Zebrafisch-nma und die strukturelle Ähnlichkeit der beiden nma-Proteine und des BAMBI-Proteins weisen auf eine mögliche Ähnlichkeit in ihrer Funktion und ihrem Funktionsmechanismus hin.

Wir haben Einfluss des menschlichen den nma-Gens auf die Proliferationsmodulation durch Mitglieder der TGFß-Superfamilie an menschlichen Zellen getestet. Als Model TGFß-modulierter Proliferationsaktivität verwendeten wir die gut differenzierte Hepatomzellinie Hep G2. Die Zellen weisen die für menschliche Hepatozyten typische Empfindlichkeit gegenüber TGFß und andere Liganden der TGF_B-Superfamilie auf. Darüber hinaus sind sie durch zahlreiche Differenzierungsmarker der menschlichen Leberzelle charakterisiert wie z.B. durch die Produktion folgender Proteine: Alpha Fetoprotein, Albumin, alpha2 Makroglobulin, Haptoglobin, Ceruloplasmin, Plasminogen, Komplement (C3, C4), C3 Aktivator und Fibrinogen oder die immunologisch positive Reaktion auf Zytokeratin.

Proliferationsaktivität BMP4 steigerte die leer transfizierter menschlicher Hepatomzellen in niedrigen Konzentrationen hoch signifikant. Diese deutliche Proliferationssteigerung menschlicher Hepatomzellen unter dem Einfluss von BMP4 wurde unserer Kenntnis nach noch nicht beschrieben. Die stabile Transfektion mit dem nma-Gen veränderte das Proliferationsverhalten der Hep G2 Zellen. Statt einer Aktivitätssteigerung zeigte sich ein ausgeprägte, hoch signifikante Aktivitätshemmung. In Anwesenheit des nma-Gens wirkt BMP4 also inhibierend.

In Experimenten mit den Wachstumsfaktoren TGF-ß1 und Aktivin A hatte das nma-Gen keinen Einfluss auf die Hemmung der Wachstumsaktivität von Leberzellen durch die beiden Liganden. Inhibin A, Inhibin B und Follistatin zeigten von vorne herein keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Hep G2 Zellen. Damit lässt dieses Modell keine Rückschlüsse auf die Wirkung des nma-Gens im Kontext der ohnehin wachstumsirrelevanten Faktoren zu.

Auch die Gene von Xenopus und Zebrafisch beeinflussen die Signalwirkung von Wachstumsfaktoren der TGFß Superfamilie. In Xenopusembryonen werden durch die Mikroinjektion von BMP4-und Aktivin-mRNA ausgelöste Differenzierungsimpulse durch die Koinjektion mit BAMBI gehemmt. (Onichtchouk et al. 1999 [10]).

61

Tsang et al. beschrieben, dass die ektopische Expression von Zebrafisch-nma in Xenopus- und Zebrafischembryonen zu Differenzierungsvariationen in den Keimblättern führt und damit zu Phenotypen, die eine BMP-Inhibition kopieren [13].

Die Ähnlichkeit der Struktur des humanem nma-Proteins zu den Typ-I-Rezeptoren lässt eine Interaktion mit den Liganden der TGFß Superfamilie und den dazugehörigen Typ-II-Rezeptoren vermuten.

Zebrafisch-nma und BAMBI binden in vitro auch in Anwesenheit von drei verschiedenen BMP-II-Rezeptoren nicht an BMP2 oder BMP4. TGFß kann nur als TGFß-Typ-II-Rezeptor-Ligand-Komplex gebunden werden, nicht aber allein (Onichtchouk et al. 1999 [10], Tsang et al. 2000 [13]). BAMBI-Expression verringert ausserdem die Menge von TßR1-TßRII-Rezeptorkomplexen, indem es den Komplex möglicherweise destabilisiert oder den Platz des Typ-I-Rezeptors einnimmt. Es verringert zusätzlich die Menge der homodimerisierten Typ-I-Rezeptoren, die für eine Signalwirkung Voraussetzung sind. Abbildung 1 zeigt ein Modell der möglichen Rezeptorinteraktion (Onichtchouk et al. 1999 [10]). Ungeklärt bleibt, warum weder BAMBI noch Zebrafisch-nma BMP2 binden können, obwohl sie doch BMP-Funktionsantagonisten sind. Bemerkenswert ist ausserdem, dass die Bindung von TGFß mit BAMBI und Zebrafisch-nma im Komplex mit einem Typ-II-Rezeptor möglich ist, aber dennoch keine Auswirkungen auf die TGFß-Signaltransduktion beschrieben wurden. Auch wir konnten keinen Einfluss des humanen nma-Gens auf die Proliferationsmodulation von TGFß nachweisen. Andere Antagonisten der BMP-Signalwirkung sind Noggin und Chordin und die Proteine der DAN-Familie Ceberus, DAN und Gremlin. Sie binden mit hoher Affinität an BMPs und verhindern so die Interaktion des Liganden mit den Rezeptoren (Piccolo et al. 1996 [17], Zimmermann et al. 1996 [18], Hsu et al 1998 [19]). Diese Interaktion scheint auf einer in Teilen der BMP-Struktur ähnlichen Domäne der Antagonisten zu beruhen. Humanes nma hat jedoch Ähnlichkeit mit den Typ-I-Rezeptoren. Seine Homologe BAMBI und Zebrafisch-nma können BMPs nicht binden, eine Interaktion in Form eines trunkierten Typ-I-Rezeptor liegt also näher. Auch eine Antagonisierung auf Ebene der Smad-Proteine lässt die Struktur des nma-Proteins nicht vermuten.

Eine ausgeprägte Expression von humanem nma wurde in Nierenmark, Plazenta und Milz festgestellt, geringere Expressionsgrade in Nierenrinde, Leber, Prostata und Darm. Keine Expression konnte in Lunge und Muskel nachgewiesen werden (Degen et al. 1996 [12]). Über die Expressionsregulation und mögliche Koexpressionsmuster des humanem nma ist nichts bekannt. Die Expression von Zebrafisch-nma und BMP4 und BMP2 zeigen in der Entwicklung des Zebrafisch das gleiche Profil (Kishimoto 1997 [20], Nguyen 1998 [21]). Die Aktivierung des Zebrafisch-nma ist nicht von der BMP-Signalwirkung abhängig, jedoch das Fortdauern seiner Expression (Tsang et al. 2000 [13]). BAMBI Expression wird durch BMP4 Signalwirkung induziert, sie folgt im Xenopusembryo der BMP4 Expression (Onichtchouk et al. 1999 [10]). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass BMP nicht nur Zebrafisch-nma und BAMBI reguliert, sondern auch, dass die beiden Proteine mit der Regulation der BMP-Signalwirkung in Verbindung stehen.

Humanes nma, Zebrafisch-nma und BAMBI scheinen zwischen den Spezies hochkonservierte, orthologe Gene zu sein, denn sie zeigen als putative transmembranäre Proteine grosse Übereinstimmungen in Ihrer Nukleotid- und Proteinsequenz, Zebrafisch und Mensch lassen eine Syntenie zwischen dem nma-Gen und dem svil-Gen beobachten. Alle drei Typen beeinflussen die BMP4-Signalwirkung.

BAMBI und Zebrafisch-nma scheinen eine Rolle als morphogenetische Faktoren in der Embryogenese ihrer Spezies zu spielen, indem sie die Wirkung von BMP-Wachstumsfaktoren modulieren. Die Injektion von Zebrafisch-nma-RNA in Zebrafischembryonen verursachte zum Beispiel eine Expansion der Neuralplatte und führte zur Ausbildung von Phenotypen ähnlich dorsalisierten Mutationen. Nmainjizierte Zebrafischembryonen zeigten bei einigen Exemplaren einen kompletten Verlust von Kammzellen und bei der Mehrzahl eine Lateralisation der Kammzell-Domäne (Tsang et al. 2000 [13]). Diese Modulation der BMP-Wachstumsfaktoren geschieht möglicherweise in Form eines negativen Feedbackmechanismus, denn die Expression von BAMBI und Zebrafisch-nma wird durch BMP reguliert, ihre vermehrte Expression hemmt jedoch die BMP-Signalwirkung. Die Expression der beiden Gene ist in einigen Regionen der Keimblätter vermehrt, aber in anderen vermindert und kann dadurch lokal die Differenzierung der Gewebe beeinflussen. Nma-RNA ist zu Beginn der Gastrulation auf die ventrale Seite des Zebrafischembryo begrenzt, die Konzentration fällt in dorsaler Richtung ab. Während der weiteren Entwicklung wird nma in der am weitesten anterioren und der caudalen Region des Embryos exprimiert. Die anteriore Expression wird weiter fortgesetzt. Es entwickelt sich hier die dorsale Retina und die *hatching gland*. Die posteriore Expression wird auf die Oberfläche des Ektoderm des Rumpfes begrenzt. Andere Regionen der nma-Expression in der weiteren Entwicklung sind die dorsale Seite des ZNS, die Ohr-Vesikel und später die Brustflossenknospen (Tsang et al. 2000 [13]).

Das menschliche nma-Gen wird in vielen Regionen des menschlichen Körpers exprimiert. Der Schluss liegt nahe, dass auch das humane nma Gen an der Morphogenese der einzelnen Körperregionen beteiligt ist. Durch lokale Expression und lokale Hemmung der BMP-Signalwirkung könnten Grenzflächen entstehen, die bei der Ausformung von Organen beteiligt sind. So wurde zum Beispiel an verschiedenen Modellen beobachtet, dass BMP4 eine entscheidende Rolle in der Induktion der Leberknospe durch endodermale Zellen spielt. Es induziert die Expression von GATA 4, erwirkt Differenzierung zu kompetenten Leberzellen und induziert die Leber Genexpression, während es die des Pankreas in der endodermalen Entwicklung hemmt. Ausserdem ist BMP4 für eine adäguate Einwanderung der Leberzellen in das septum transversum während der Leberentwicklung nötig (Rossi, Dunn 2001, [22]). Nma Expression könnte also bereits in der Entwicklungsphase der Leber einen bedeutenden Einfluss nehmen. Kenntnisse über die modulierende Funktion solcher Morphogene würden einen grossen Schritt im Verständnis der Regulation der menschlichen Entwicklung bedeuten und in Zukunft vielleicht sogar die Ausformung menschlicher Organe ausserhalb des menschlichen Körpers möglich machen.

Vor kurzem wurde ausserdem Cripto ein humaner Rezeptorantagonist identifiziert, der die Aktivin Signalwirkung durch Formierung mit Aktivin Typ-II-Rezeptoren zu einem Rezeptorkomplex blockiert (Gray, Harrison 2003, [23]). Dieses Gen wurde zuerst als putatives Onkogen von einer menschlichen Teratokarzinom Zellinie isoliert (Ciccodicola 1989, [24]). Auch das humane nma-Gen konnte zuerst aus humanen Melanomzellen isoliert werden (Degen 1996, [12]). Nma wurde im Gegensatz zu Cripto, noch nicht im Kontext menschlicher Erkrankungen untersucht. Unsere Untersuchungen weisen jedoch auf eine Rolle des nma-Gens nicht nur in der Entwicklung sondern auch in der Onkogenese menschlicher Leberzellen hin. Auch andere Organfunktionen, die durch Faktoren der TGFß-Superfamilie reguliert werden, könnten durch Expression des nma-Gens beeinflusst werden.

E. Zusammenfassung

Transforming growth factor ß, Aktivin und bone morphogenetic protein sind parakrin aktive Peptidwachstumsfaktoren der TGFß-Superfamilie. Sie haben entscheidenden Einfluss auf die Morphogenese und den Erhalt des Gewebsverbandes. Im Modell des Xenopus wurde das BAMBI-Protein als ein Hemmstoff der BMP-und Aktivin-Signalwirkung identifiziert. Das Produkt des homologen Zebrafisch-Gen inhibiert nur BMP. Ein Strukturvergleich legt auch für das menschliche nma-Genprodukt eine ähnliche Wirkung nahe. Wir haben deshalb das menschliche nma-Gen aus einer Cosmidlibrary identifiziert und sequenziert. Die in einen Expressionsvektor klonierte cDNA wurde in Transfektionsversuchen menschlicher Hepatomzellen mit bekannter Regulierbarkeit durch Liganden der TGFß-Superfamilie funktionell geprüft.

- 1. Die genomische Sequenzierung bestätigte die publizierte cDNA-Sequenz und fand ein Intron von 437bp Länge.
- Transfektion und Überexpression des nma-Genproduktes in Hepatomzellen konvertieren die Proliferationsregulation durch BMP von einem Wachstumsfaktor zu einem Wachstumsinhibitor. Die Proliferationsregulation durch TGFß und Aktivin bleibt unberührt.

Zusammenfassend belegen unsere Experimente, dass das nma-Gen dem BAMBI-Gen des Xenopus nicht nur homolog ist, sondern auch eine analoge Funktion in der Regulation der Signalvermittlung durch Liganden der TGFß-Superfamilie ausübt. Nach dem Nachweis trunkierter Varianten der ALK-Rezeptoren handelt es sich hiermit um den zweiten Fall einer negativen Regulation morphogeneserelevanter Signaltransduktion.
F. Literatur

- Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S. Regulation of cell proliferation by smad proteins. Journal of Cellular Physiologie, 2002, 191:1-16
- 2. **Roberts, AB**, Sporn MB. The transforming growth factor-beta. In: Sporn MB, Roberts AB, eds. Peptide growth factors and their receptors, Part I, Vol 95. Berlin: Springerverlag 419-472
- Derynck, R, Feng XH. TGF-beta receptor signalling. Biochim Biophys Acta, 1997. 1333(2): F105-50
- Carcamo J, Weis FM, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massague J. Type-I receptors specify growth-inhibitory and transscriptional responses to transforming growth factor beta and activin. Mol Cell Biol, 1994. 14: 3810-21
- Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, Vale W. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. Nature, 2000. 404: 411-14
- Xu J, Matsuzaki K, McKeehan K, Wang F, Kann M, Mc Keehan WL. Genomic structure and cDNAs predict that four variants in the kinase domain of serin/threonin receptors arise by alternative splicing and and poly(A) addition. Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91: 7957-61
- 7. Alexander JM, Bikkal HA, Zervas NT, Laws ER Jr, Klibanski A. Tumorspecific expression and alternate splicing of messenger ribonucleic acid encoding activin/transforming growth factor beta receptors in human pituitary adenomas. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1996, 81: 783-90
- Schulte K-M, Jonas C, Krebs R, Röher HD. Activin a and activin receptors in human thyroid: A link to the female predominance of goiter. Horm Metab Res, 2000, 32:390-400

9. Schulte K-M, Jonas C, Krebs R, Röher HD. Aktivin A and activin receptors in thyroid cancer. Thyroid, 2001, 11(1):3-14 10. **Onichtchouk** D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, Niehrs C. Silencing of transforming growth factor beta by the pseudoreceptor BAMBI. Nature, 1999, 401: 480-84 Mighell AJ, Smith NR, Robinson PA, Markham AF. Vertebrate 11. pseudogenes. FEBS Lett, 2000, 468(2-3): 109-14 Degen WG, Wetermann MA, van Groningen JJ, Cornelissen IM, 12. Lemmers JP, Agterbos MA, Geurts van Kessel A, Swart GW, Bloemers HP. Expression of nma, a novel gene, inversely correlates with the metastatic potential of human melanoma cell lines and xenografts. Int J Cancer, 1996, 65: 460-65 13. Tsang M, Kim R, de Caestecker MP, Kudoh T, Roberts AB, Dawid IB. Zebrafish nma is involved in TGFbeta family signalling. Genesis, 2000, 28(2): 47-57 14. Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS. SB-431542 is a specific inhibitor of transforming growth factor beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK), receptors ALK4, ALK5, and ALK7. Mol Pharmacol, 2002, 62(1): 65-74 Bondestam J, Huotari MA, Moren A, Ustinov J, Kaivo-Oja N, 15. Kallio J, Horelli-Kuitunen N, Aaltonen J, Fujii M, Moustakas A, Ten Dijke P, Otonkoski T, Ritvos O. CDNA cloning, expression studies and chromosome mapping of human type I serin/threonine kinase receptor ALK7. Cytogenet Cell Genet, 2001, 95(3-4): 157-62 16. Baker JC, Harland RM. From receptor to nucleus: The smad pathway. Current Opinion in Genetics and Development 1997, **7**: 467-73 Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. Dorsoventral 17. Patterning in Xenopus. Inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP4. Cell, 1996, 86: 589-98

- Zimmermann LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. The spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic Protein. Cell, 1996, 86(4): 599-606
- Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. Mol Cell, 1998, 1: 673-83
- 20. KishimotoY, Lww KH, Zon L, Hammerschmidt M, Schulte-Merker S. The molecular nature of Zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning. Development, 1997, **124**: 4457-466
- 21. Nguyen VH, Schmid B, Trout J, Connors SA, Ekker M, Mullins MC. Ventral and lateral regions of the zebrafish gastrula. Including the neural crest progenitors, are established by a BMP2/swirl pathway of genes. Dev Biol, 1998, 199:93-110
- 22. **Rossi** JM, Dunn NR, Hogan BLM, Zaret KS. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. Genes and Development, 2001, **15**:1998-2009
- 23. **Gray** PC, Harrison CA, Vale W. Cripto forms complex with activin and type II activin receptors and can block activin signalling. PNAS, 2003, **100**:5193-5198
- 24. Ciccodicola A, Dono R, Obici S, Simeone A, Zollo M, Persico MG. Molecular characterization of a gene of the 'EGF family' expressed in undifferentiated human NTERA2 teratocarcinoma cells. EMBO, 1989, 8:1987-1991

G. Lebenslauf

Name:	Christiane Napp
Geboren	08.12.75 in Neuss
Schulbildung 1982 – 1986 1986 – 1995	Grundschule St. Peter in Neuss Erzbischhöfliches Gymnasium Marienberg Neuss Abitur 1995
Praktikum Februar – März 1997	New York State Psychiatric Institute Psychiatrische Klinik der Universität Columbia, New York
Studium 1995 – 1997	Studium der Rechtswissenschaften an der Universität
1997 – 2003	Studium der Humanmedizin an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf Praktisches Jahr: Akademisches Lehrkrankenhaus Marienhospital Düsseldorf, (Chirurgie, Gynäkologie)
März 1999 März 2000 März 2002 Mai 2003	Physikum 1.Staatsexamen 2. Staatsexamen 3. Staatsexamen
Famulaturen Juli 1999	Herzchirurgie, Prof. Dr. H. H. Sievers,
September 1999	Psychiatrische Klinik der Universität Düsseldorf
März 2001	Plastische Chirurgie, Prof. Dr. R. Olbrisch, Florence Nightingale Krankenhaus Düsseldorf
August 2001	Innere Medizin, Dr. H. Heyers, Johanna Etienne Krankenhaus Neuss
Praktikum Juli - August 2003	CCBRT Hospital Dar es Salaam, Tansania Klinik für Kinderorthopädie, plastische und rekonstruktive
Seit 15.10.03	ÄIP in der Klinik für Algemein-und Bauchchirurgie Allgemeines Krankenhaus Altona Chefarzt Prof. Dr. W. Teichmann

H. Danksagung

Herrn PD Dr. med. Klaus-Martin Schulte danke ich für die freundliche Überlassung des Themas. Mein besonderer Dank gilt ihm für die hervorragende Betreuung, für seine Anleitung zur selbständigen Arbeit, die intensive Diskussion und Hilfe bei der Lösung von Problemen und die Möglichkeit zu lernen.

Ich danke Herrn Dr. Andreas Beyer und Herrn Dr. Karl Köhrer für Ihren grossen Beitrag zu dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ausserdem Lars Bansemir, der nicht nur ein tatkräftiger Mitarbeiter war, sondern auch immer wieder für Motivation und gute Laune gesorgt hat.

Vielen Dank auch an Frau Bosily und Frau Alemazkour für ihre Mithilfe.

Zuletzt ein Dankeschön an alle die, die mir bei den vielen kleinen Dingen auf dem Weg zur Fertigstellung der Arbeit geholfen haben.

Zusammenfassung:

Charakterisierung des humanen Gens nma ein neuer Antagonist der Wirkung des BMP4

Transforming growth factor ß, Aktivin und bone morphogenetic protein sind parakrin aktive Peptidwachstumsfaktoren der TGFß-Superfamilie. Sie haben entscheidenden Einfluss auf die Morphogenese und den Erhalt des Gewebsverbandes. Im Modell des Xenopus wurde das BAMBI-Protein als ein Hemmstoff der BMP-und Aktivin-Signalwirkung identifiziert. Das Produkt des homologen Zebrafisch-Gen inhibiert nur BMP. Ein Strukturvergleich legt auch für das menschliche nma-Genprodukt eine ähnliche Wirkung nahe. Wir haben deshalb das menschliche nma-Gen aus einer Cosmidlibrary identifiziert und sequenziert. Die in einen Expressionsvektor klonierte cDNA wurde in Transfektionsversuchen menschlicher Hepatomzellen mit bekannter Regulierbarkeit durch Liganden der TGFß-Superfamilie funktionell geprüft.

- 1. Die genomische Sequenzierung bestätigte die publizierte cDNA-Sequenz und fand ein Intron von 437bp Länge.
- Transfektion und Überexpression des nma-Genproduktes in Hepatomzellen konvertieren die Proliferationsregulation durch BMP von einem Wachstumsfaktor zu einem Wachstumsinhibitor. Die Proliferationsregulation durch TGFß und Aktivin bleibt unberührt.

Zusammenfassend belegen unsere Experimente, dass das nma-Gen dem BAMBI-Gen des Xenopus nicht nur homolog ist, sondern auch eine analoge Funktion in der Regulation der Signalvermittlung durch Liganden der TGFß-Superfamilie ausübt. Nach dem Nachweis trunkierter Varianten der ALK-Rezeptoren handelt es sich hiermit um den zweiten Fall einer negativen Regulation morphogeneserelevanter Signaltransduktion.

Gesehen und genehmigt : Gez. Priv.-Doz. Dr. med. K.-M. Schulte