Aus der Klinik für Anästhesiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Klaus Peter

Die Bedeutung von Genveränderungen bei Tyrosinphosphatasen: Mutationsanalyse der Phosphatase *hVH-5* und Charakterisierung eines hierbei gefundenen Pseudogens *ψhVH-5*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ingemarie Berger
aus
Augsburg
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Thiel, Prof. Dr. A. Ullrich
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. B. F. Becker
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. R. Haas
	Prof. Dr. W. Neupert
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	10.11.2005

Man muss das Unmögliche versuchen,
um das Mögliche zu erreichen.

(Hermann Hesse, 1877-1962)

für meine Eltern

1. EINLEITUNG ***1***

1.1 Zelluläre Wachstumskontrolle **1**
1.1.1 Signaltransduktion durch Tyrosinkinasen und Phosphatasen 1
1.1.2 Intrazelluläre Signalübertragung und Regulation der Genexpression 4

1.2 Tyrosinphosphatasen – eine Übersicht **5**
1.2.1 Struktur und Funktion von Proteintyrosinphosphatasen 5
1.2.2 Dual-spezifische Phosphatasen 7
1.2.3 Die Phosphatase hVH-5 7

1.3 Fehlregulation von Signalwegen durch Genveränderungen **9**
1.3.1 Onkogene 9
1.3.2 Tumorsuppressorgene und Loss Of Heterozygosity (LOH) 10

1.4 Aufgabenstellung **12**

2. MATERIAL UND METHODEN ***13***

2.1 Bezugsquellennachweis **13**
2.1.1 Chemikalien 13
2.1.2 Enzyme 14
2.1.3 „Kits" und Verbrauchsmaterial 14
2.1.4 Medien 15
2.1.5 Zellkulturmedien 16
2.1.6 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer 16
2.1.7 Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper 18
2.1.8 Plasmide 20
2.1.9 Oligonukleotide 21

2.2 Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE) **24**
2.2.1 Molekulare Grundlagen der Heteroduplexformation 24
2.2.2 Funktionsprinzipien und molekularer Hintergrund von CSGE 25
2.2.3 Methodischer Ablauf 26

2.3 Molekularbiologische Methoden **29**
2.3.1 Arbeiten mit RNA und Synthese von cDNA 29
2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion 30
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA 32
2.3.4 Enzymatische Behandlung von DNA 32
2.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten 34
2.3.6 Restriktion-Fragment-Längen-Polymorphismus Analyse (PCR- RFLP) 34
2.3.7 Sequenzierung 35
2.3.8 DNA-Präparation in kleinem Maßstab („Miniprep“) 36
2.3.9 DNA-Transfer in *E.coli* Bakterien 36

2.4 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen **37**
2.4.1 Allgemeine Zellkulturtechniken 37
2.4.2 Transfektion von 293 Zellen mit Plasmid-DNA 37

2.5 Proteinanalytische Methoden **38**
2.5.1 Tritonlyse von Zellen 38
2.5.2 Proteinbestimmung 38
2.5.3 Immunpräzipitation von Proteinen 39
2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 39
2.5.5 Tricin-Sodiumdodecylsulfat-Gelelektrophorese 40

2.5.6 Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen 41
2.5.7 Transfer von Proteinen durch das *Semidry*-Verfahren 41
2.5.8 Immundetektion (Immunoblot-Analyse) 42
2.5.9 Herstellen eines Kaninchen-polyklonalen-Antiserums α ψhVH-5 43

3. ERGEBNISSE ***..... 44***

3.1 Expressionsanalyse der Phosphatase hVH-5 44
3.1.1 Amplifikation von hVH-5 aus cDNA mittels PCR 44
3.1.2 Real-time PCR: Quantitative Expressionsanalyse von hVH-5 46

3.2 Mutationsanalyse von hVH-5 in Zelllinien 47
3.2.1 Identifizierung von Heteroduplexbanden mittels CSGE-Analyse 47
3.2.2 Sequenzanalyse von hVH-5 Exon 1 50
3.2.2.1 PCR-Produkte mit Heteroduplexbildung bei der CSGE 50
3.2.2.2 PCR-Produkte mit Homoduplexbildung bei der CSGE 51
3.2.3 Bestimmung des hVH-5 Genotyps durch RFLP 52
3.2.3.1 RFLP-Analyse an cDNA-Proben 52
3.2.3.2 Vergleich von Ergebnissen des RFLP an genomischer DNA und cDNA 54
3.2.4 Sequenzanalyse von klonierten hVH-5 – PCR-Fragmenten 57
3.2.5 Datenbankrecherche zur Sequenzlokalisation im Genom 59

3.3 Das Pseudogen von hVH-5 62
3.3.1 Klassifizierung des Pseudogens der Phosphatase hVH-5 62
3.3.2 ψhVH-5 wird in vivo transkribiert 64
3.3.3 Die Nukleinsäuresequenz des hVH-5 Pseudogens 66
3.3.3.1 Vergleich von hVH-5 – Gensequenzen im Genom 66
3.3.3.2 Transkription von ψhVH-5 in Normalgeweben 68
3.3.4 Die Proteinsequenz von ψhVH-5 69
3.3.4.1 Bestimmung des Leserahmens 69
3.3.4.2 Vergleich von verschiedenen hVH-5 Proteinsequenzen 72
3.3.4.3 Versuch eines Proteinnachweises mittels Antikörper 72

4. DISKUSSION ***..... 74***

4.1 Vom Mutationsnachweis bei hVH-5 zum Pseudogen hVH-5 74

4.2 ψ (Psi) hVH-5 – ein Pseudogen 76

4.3 Die Expression des hVH-5 Pseudogens 79

4.4 Mögliche Interationen und Funktionen des hVH-5 Pseudogens 80
4.4.1 Proteinebene 80
4.4.2 RNA-Ebene 82

5. ZUSAMMENFASSUNG ***..... 84***

6. LITERATURVERZEICHNIS ***..... 86***

ABKÜRZUNGEN ***..... 97***

ANHANG: ETABLIERUNG CSGE ***..... 99***

LEBENSLAUF ***..... 103***

1. EINLEITUNG

Maligne Tumore zählen mitunter zu den häufigsten Todesursachen der heutigen Gesellschaft. Die Aufklärung von molekularen Unterschieden zwischen Normal- und Krebszellen ist nicht nur eine Grundlage zum Verständnis der Tumorinduktion, sondern eröffnet auch neue Wege für die Prävention und Behandlung von Krebserkrankungen. Viele Onkogene leiten sich von Genen ab, denen eine essentielle Rolle in der Wachstumsregulation zufällt.

1.1 ZELLULÄRE WACHSTUMSKONTROLLE

Das Zellwachstum wird durch eine Vielzahl von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, Hormonen und Zytokinen reguliert. Der erste Schritt in der Wechselwirkung des Wachstumsfaktors mit der Zielzelle ist die Bindung an einen spezifischen Membranrezeptor. Dadurch werden verschiedenste Signalkaskaden angeschaltet und wichtige Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose, aber auch Zellbewegung, Adhäsion und Zellstoffwechsel gesteuert. Der Phosphorylierung von Tyrosinresten kommt innerhalb dieser Signalkaskaden ein wesentlicher Stellenwert zu, obwohl dieser Anteil an Proteinphosphorylierung nur etwa 0.05% bis 0.1% zur Gesamtphosphorylierung zellulärer Proteine beiträgt (Hunter und Sefton, 1980). Die Dauer und das Ausmaß dieser Phosphorylierungen werden durch eine ausgewogene, dynamisch regulierte Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) und Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) bestimmt. Störungen im Ablauf oder der Regulation dieser Signalübertragungen können drastische Veränderungen im feinen Regelwerk der Zelle bewirken und somit zur Entstehung von Krebs führen (Aaronson, 1991).

1.1.1 Signaltransduktion durch Tyrosinkinasen und Phosphatasen

RTKs sind integrale Membranproteine, die auf der extrazellulären Seite (aminoterminaler Bereich) eine Ligandenbindungsdomäne und im zytosolischen Abschnitt eine Tyrosinkinase-Domäne besitzen (Yarden und Ullrich, 1988). Aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft werden RTKs in 19 verschiedene Familien unterteilt (Plowman et al., 1994; van der Geer et al., 1994). Diese Subklassen werden nach ihren natürlichen Liganden benannt (Fantl et al.,

1993). Bis auf wenige Ausnahmen, wie den Rezeptoren der Insulin-Familie, handelt es sich bei den transmembranen RTKs um Monomere (Greenfield et al., 1989; Seifert et al., 1989.; Heldin et al., 1989; Hammacher et al., 1989). Durch Bindung eines spezifischen Liganden wird eine Dimerisierung benachbarter Rezeptoren herbeigeführt, die eine Aktivierung der intrinsischen Kinaseaktivität bewirkt und zur gegenseitigen intermolekularen Transphosphorylierung mehrerer Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne führt (Ullrich und Schlessinger, 1990; Schlessinger 1995). Adaptorproteine, die an die Phosphotyrosinreste von RTKs binden, sind für die Weiterleitung der Signale an zytoplasmatische oder kernlokalisierte Zielproteine verantwortlich (Cantley et al., 1991). Das Ausmaß dieser Tyrosinphosphorylierung von Zielproteinen wird sowohl von der Aktivität der RTKs als auch von Proteintyrosinphosphatasen bestimmt, denn PTPs können spezifisch Phosphatreste abspalten, d.h. sie sind für die Dephosphorylierung von Tyrosinresten verantwortlich. Dadurch stellen sie elementare Komponenten von vielen Signalübertragungswegen dar (Saxena et al., 2000; Feng et al., 1994). Nach heutiger Vorstellung können PTPs einen negativen oder auch positiven Einfluss auf die Signalübertragung durch RTKs haben (Hunter et al, 1994). Mögliche Regulationsmechanismen werden in Abbildung 1 und 2 veranschaulicht (nach Sun et al., 1994).

Die Signalübertragung der RTKs kann durch PTPs in zweifacher Weise negativ beeinflusst werden: PTPs können sowohl aktivierte, phosphorylierte RTKs als auch phosphorylierte Substratproteine wieder dephosphorylieren und inaktivieren, wodurch der Signalweg unterbrochen wird.

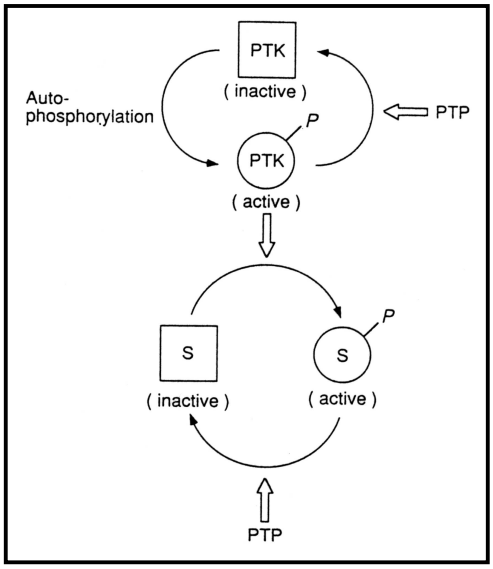


Abb. 1: Funktionen von Proteintyrosinphosphatasen in Signalwegen: negative Regulation der Signalübertragung

Eine negativ regulatorische Funktion in der Signaltransduktion von RTKs bestätigten die ersten Experimente mit PTPs. So führt die Expression einer frei im Zytoplasma diffundierenden carboxyterminalen Deletionsmutante der T-Zell-Phosphatase in BHK-Zellen nicht nur zu einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums (Cool et al., 1990), sondern verhindert auch die Transformation von Fibroblasten durch v-fms (Zander et al., 1993), der onkogenen Variante des CSF-1 Rezeptors. Einen analogen Effekt besitzt die Koexpression von PTP1B auf die

transformierende Aktivität des HER2/neu Onkogens (Brown-Shimer et al., 1992).

Andererseits gibt es zytoplasmatische RTKs, die durch signalgesteuerte Tyrosinphosphorylierung inaktiviert werden. Hier können PTPs eine positive Regulation der Signalübertragung durch RTKs ausüben. Dies ergibt sich beispielsweise aus der Möglichkeit zur Dephosphorylierung des negativ regulatorischen Phosphotyrosinrestes im Carboxyterminus von Kinasen der src-Familie.

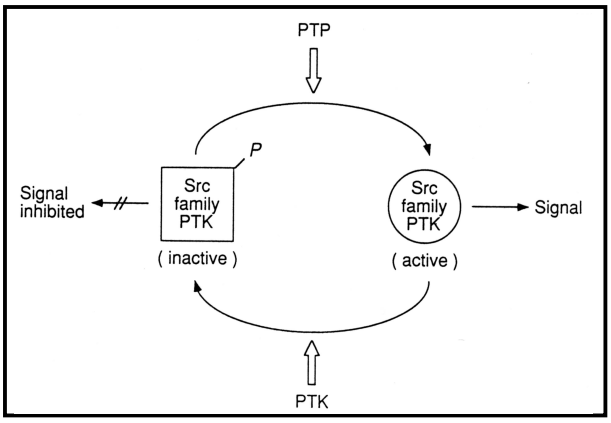


Abb. 2: Funktionen von Proteintyrosinphosphatasen in Signalwegen: positive Regulation der Signalübertragung am Beispiel der src-Kinase

Eine Überexpression von PTPα in Fibroblasten führt über die anhaltende Aktivierung von c-src zur Transformation dieser Zellen (Zheng et al., 1992). Ebenfalls mit einer Aktivierung von c-src korreliert die neuronale Differenzierung von PTPα überexprimierenden Zellen bei Stimulation mit Vitamin-A-Säure, während nicht transfizierte P19 Zellen zu endo- und mesodermalen Zellen differenzieren (den Hertog et al., 1993). Das wohl am besten untersuchte Beispiel für eine Aktivierung von Kinasen der src-Familie durch eine Phosphotyrosinphosphatase ist die Rolle von CD45 in der Aktivierung von T-Zellen (Mustelin und Burn, 1993). CD45 wurde als ein typisches Oberflächenantigen lymphoider und myeloider Zellen kloniert (Thomas et al., 1985), jedoch erst die Entdeckung der Homologie zu PTP1B identifizierte CD45 als Phosphotyrosinphosphatase (Tonks et al., 1988). In T-Zellen bewirkt CD45 die Dephosphorylierung des carboxyterminalen negativ regulatorischen Phosphotyrosinrestes und damit die Aktivierung der src-ähnlichen Kinasen lck und fyn (Mustelin und Altman, 1990; Mustelin et al., 1992; Biffen et al., 1994). Beide Kinasen assoziieren neben anderen intrazellulären Tyrosinkinasen mit dem T-Zell-Rezeptorkomplex und vermitteln stimulationsabhängig Effekte, die zur T-Zell Aktivierung führen (Weiss und Littmann, 1994). Dabei belegen die Analysen CD45-negativer T-Zellen die essentielle Funktion dieser Phosphatase in der Signaltransduktion des T-Zell Rezeptors (Pingel und Thomas, 1989).

1.1.2 Intrazelluläre Signalübertragung und Regulation der Genexpression

Signalproteine, die mit aktivierten RTKs interagieren, binden an spezifische Phosphotyrosinreste durch SH2 (src-homology)-Domänen (Mayer und Baltimore, 1993; Pawson, 1995) oder PTB (phosphotyrosine binding)-Bindungsmotive (Kavanaugh et al., 1995). Das Grb2-Protein (Grb: Growth factor receptor binding protein) ist als Komponente der Signalübertragung von Wachstumsfaktoren und des Ras-Signal Wegs (siehe unten) identifiziert worden (Lowenstein et al., 1992). Grb2 ist über seine SH3-Domäne konstitutiv an die prolin-reiche Domäne des GTP-GDP-Austauschers Sos (son of sevenless) gebunden, der das Signal an das Ras-Protein weiterleiten kann (Hologado-Madruga et al., 1996). Weitere Komponenten dieser Signalkaskade sind Raf (als MAPKKK: mitogen activated protein kinase kinase kinase), MEK1/2 (MAPKK) und ERK (MAPK) (Lewis et al., 1998). Nach Aktivierung wird die MAPK rasch in den Zellkern transloziert und phosphoryliert dort bestimmte Transkriptionsfaktoren (Wasylyk et al., 1998). Durch diesen hier stark vereinfacht geschilderten Mechanismus wird das Prinzip dargestellt, wie die Expression von Genen in der Zelle gesteuert wird.

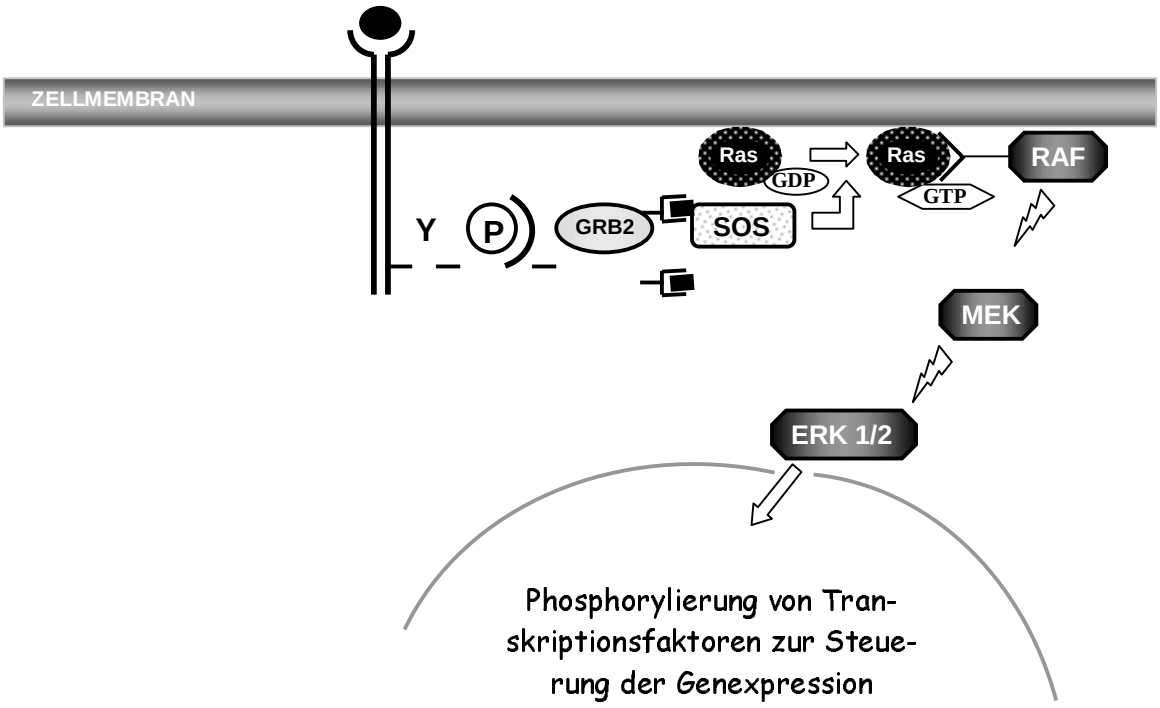


Abb. 3: Schematische Darstellung des Ablaufs der intrazellulären Signalübertragung (nach Lewis et al., 1998)

1.2 TYROSINPHOSPHATASEN – EINE ÜBERSICHT

Die biologisch wichtige Bedeutung der PTPs wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass Defekte in der Aktivität dieser Enzyme zu phänotypisch nachweisbaren Fehlfunktionen führen können. Bereits kurz nachdem Tyrosinkinasen entdeckt wurden, gab es erste Hinweise auf eine mögliche Existenz der Aktivität von PTPs (Friis et al., 1979). Ausgehend von Erkenntnissen des humanen Genomprojektes (HUGO) wird angenommen, dass in der menschlichen Erbinformation etwa 500 unterschiedliche Sequenzinformationen für PTPs verschlüsselt sind (Hooft van Huijsduijnen, 1998). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden lediglich weniger als 100 PTPs beschrieben und charakterisiert.

1.2.1 Struktur und Funktion von Proteintyrosinphosphatasen

Wie in Abb. 4 schematisch dargestellt ist, zeigt die Familie der PTPs eine enorme strukturelle Diversität, was auf vielfältige zelluläre Funktionen ihrer Mitglieder hinweist. Die Gemeinsamkeit aller PTPs besteht aus einer katalytischen Domäne, d.h. jenes Proteinfragmentes, das für die Abspaltung des Phosphatrestes verantwortlich ist. Die Phosphatasedomäne umfasst einen Bereich von etwa 250 Aminosäuren und enthält verschiedene hoch konservierte Bereiche (Fischer et al., 1991; Pot und Dixon, 1992). Zentrales Motiv, welches ebenfalls als katalytisches Zentrum der PTP-Domäne gilt, ist die Peptidsequenz (I/V)HC*XAGXGR(S/T)G (X steht für jede beliebige Aminosäure) (Dixon, 1995). Mutationsanalysen mittels unterschiedlicher biochemischer Methoden konnten zeigen, dass der Cysteinrest innerhalb dieses konservierten Motivs (C*) essentielle Bedeutung für die enzymatische Aktivität des Proteins hat. Auch einzelne Veränderungen an verschiedenen anderen Aminosäureresten innerhalb dieses katalytischen Zentrums beeinträchtigen die Phosphataseaktivität (Zhang und Dixon, 1994). Abgesehen von jener gemeinsamen katalytischen Domäne weisen die PTPs jedoch z.T. erhebliche Unterschiede auf. Man teilt diese Proteine in zwei Untergruppen auf, innerhalb derer sich wiederum bestimmte Familien unterscheiden lassen:

Die rezeptorähnlichen PTPs besitzen ein Transmembranelement. Dieses verbindet den meist großen extrazellulären Proteinanteil mit dem intrazellulären Bereich. Aufgrund gemeinsamer Strukturmerkmale in der extrazellulären Domäne werden PTPs dieser Untergruppe in fünf verschiedene Klassen eingeteilt (Li et al., 2000).

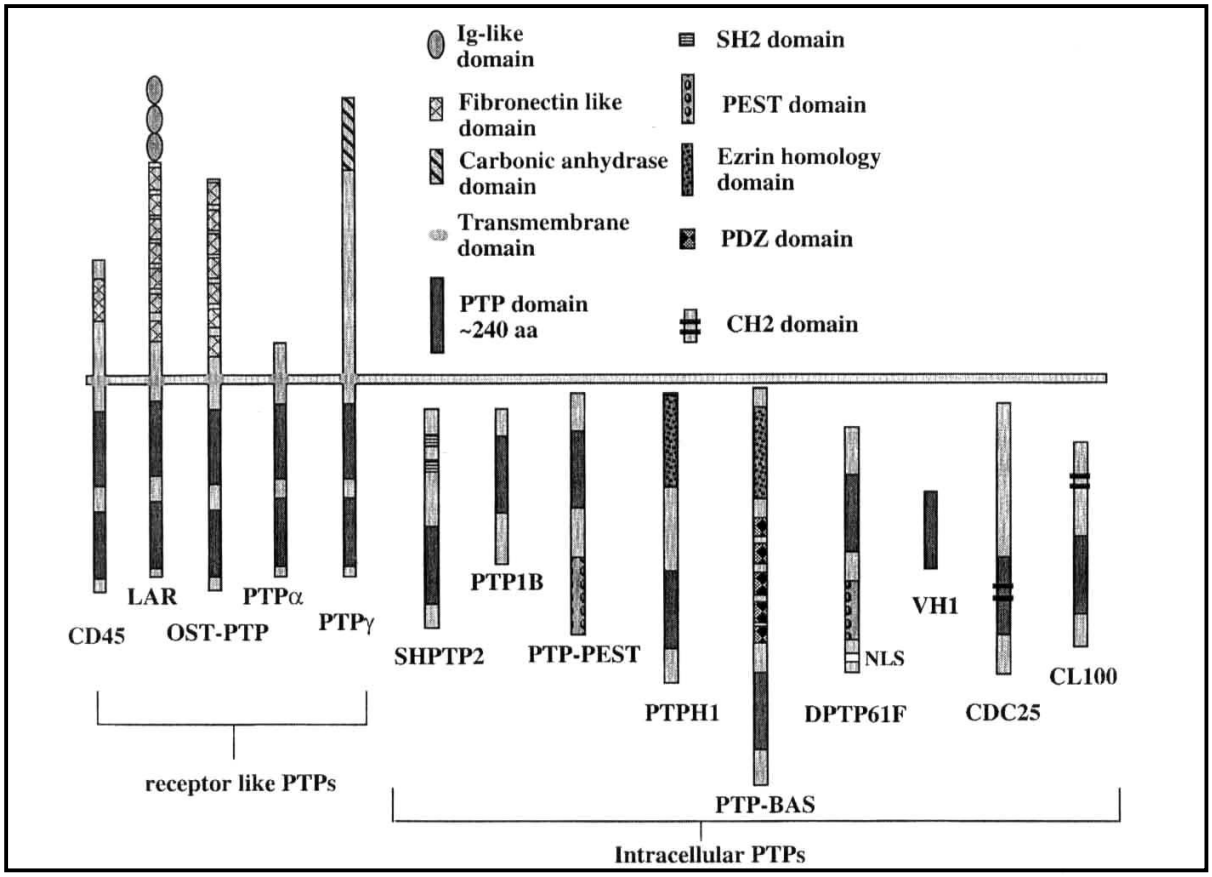


Abb. 4: Die Familie der Phosphotyrosin-Phosphatasen (nach Li et al., 2000)
Schematische Übersicht der transmembranösen (links) und zytoplasmatischen (rechts) PTPs

Bei zytoplasmatischen PTPs finden sich neben der katalytischen Domäne verschiedenste andere Strukturdomänen, die von Mauro und Dixon (1994) als „Adressen“ für eine spezifische subzelluläre Lokalisation bezeichnet wurden. Die Lokalisation spielt eine entscheidende Rolle für die Steuerung ihrer enzymatischen Aktivität. Beispielsweise enthalten PTP1B (Charbonneau et al., 1989; Guan et al., 1990; Chernoff et al., 1990) und TC-PTP (Cool et al., 1989; Swarup et al., 1991; Mosinger et al., 1992) einen carboxyterminalen, hydrophoben Sequenzbereich, der PTP1B im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Frangioni et al., 1992; Woodford-Thomas et al., 1992) bzw. TC-PTP im perinukleären Raum (Cool et al., 1990) verankert.

1.2.2 Dual-spezifische Phosphatasen

Eine besondere Subgruppe unter den zytoplasmatischen PTPs stellt die Klasse der dual-spezifischen Phosphatasen (DUSPs) dar: Sie können sowohl die Abspaltung einer Phosphatgruppe von Tyrosin- als auch von Serin- und Threoninresten katalysieren und weisen geringe Homologien zu anderen Mitgliedern der PTPs auf (Guan et al., 1991; Sun et al., 1993; Ward et al., 1994; Streuli et al., 1996).

Der Prototyp der DUSPs ist VH1. Dieses Gen mit offenem Leserahmen wurde erstmals im Jahre 1991 beschrieben. Ein Zusammenhang mit Infektionen des Vaccinia Virus schien offensichtlich (Guan et al., 1991). Heute werden PTPs dieser Familie oft mit dem Kürzel hVH-x, wie z.B. hVH-5, benannt. Der Name wurde aufgrund von Sequenzhomologien zu diesem ersten Klon vergeben und steht hierbei für homolog of vaccinia virus H1 phosphatase gene clone 5. Zahlreiche Publikationen der letzten Jahre berichten davon, dass diese PTPs im Zellzyklus und in der Regulation von MAPK-Kaskaden eine wesentliche Bedeutung haben (Zheng und Guan, 1993; Ward et al., 1994). Seit der Klonierung von VH1 wurden viele neue Mitglieder dieser Genfamilie identifiziert. Dazu gehören beispielsweise CL 100/MKP-1 (Charles et al., 1993), PAC1 (Rohan et al., 1993), hVH-2/MKP-2 (Guan et al., 1995), hVH-3/B23 (Ishibashi et al., 1994), MKP-3/PYST1 (Mourey R.J. et al., 1996; Muda et al., 1996), B59 (Shin et al., 1997), MKP-4 (Muda et al., 1997), MKP-5 (Tanoue et al., 1999) und hVH-5 (Martell et al., 1995).

1.2.3 Die Phosphatase hVH-5

Die Phosphatase hVH-5 (homologue of vaccinia virus H1 phosphatase gene clone 5) wurde aus einer humanen fetalen Gehirn-DNA-Bank kloniert (Martell et al., 1995). Im Jahr 1996 berichtete Theodosiou über das murine Genhomolog M3/6, welches sich bei der Maus auf Chromosom 7 detektieren lässt und 90% Übereinstimmung mit dem menschlichen Protein zeigt. Mittels Northern-Blot konnte nachgewiesen werden, dass Kopien des humanen Gens als mRNA existieren und sich über sechs Exons erstrecken. Auch Informationen über das Vorhandensein eines intronlosen Pseudogens auf Chromosom 10q11.2 sind bekannt (Nesbit et al., 1997).

Das hVH-5-Gen kodiert für eine Sequenz von 625 Aminosäuren, deren Funktionsanalyse eine Phosphataseaktivität aufweist. Man konnte das Gen folglich der Familie der dual-spezifischen Phosphatasen zuordnen. Ein Alignment dieser Aminosäureabfolge mit anderen Proteinse-

quenzen der Datenbank des HUGO zeigt, dass dieses Gen starke Ähnlichkeit mit Mitgliedern der Familie der DUSPs hat, wie beispielsweise mit PAC-1 (36%) oder hVH-1 (34%) (Rohan et al., 1993; Keyse et al., 1992). Weitere Untersuchungen des Proteins offenbarten zwei konservierte Bereiche, die allen DUSPs gemeinsam sind.

Wie alle DUSPs ist auch hVH-5 im Zytoplasma lokalisiert und beinhaltet verschiedene funktionelle Domänen und Erkennungsmotive: Zwei Regionen wurden als cdc25 homology domains (CH2 Domänen) auf Grund der Ähnlichkeit zur PTP cdc25 benannt. Weiterhin existiert eine katalytische Domäne mit "dualer" Spezifität. Die "Pest-Side" zeichnet sich durch ein überdurchschnittlich häufiges Auftreten der Aminosäure Prolin aus und wird für die Stabilisierung des Proteins verantwortlich gemacht. Darüber hinaus treten Erkennungsmotive für Rezeptortyrosinkinasen auf, wie z.B. für PKA (Proteinkinase A), PKC, MAPK und cdc2 (Nesbit et al., 1997).

Genauso wie M3/6 ist hVH-5 ein spezifischer Negativregulator bestimmter Mitglieder der MAPK-Familie: SAPK und p38 (Johnson et al., 2000). Bis heute wurden in eukaryontischen Zellen fünf Mitglieder der MAPK-Familie identifiziert. Die wichtigsten sind extrazellulär regulierte Kinase (ERK), stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) oder c-Jun amino-terminal kinase (JNK) und der p38-Signalweg (Matsuguchi et al., 2001). p38 ist verantwortlich für Wachstum, Differenzierung und Apoptose. Die Regulation des SAPK Signalwegs ist ebenfalls von großer Bedeutung, da dieser Weg eine obligatorische Bedeutung für die Embryonalentwicklung und den programmierten Zelltod hat (Johnson et al., 2000).

Beschrieben wurde eine Expression von hVH-5 beim Menschen in verschiedenen Anteilen des Gehirns, im Skelettmuskel und im Herz, nicht jedoch in Placenta, Leber, Niere und Pankreas. Nesbit und Mitarbeiter (1997) haben hVH-5 durch in situ Hybridisierungen im Chromosomenabschnitt 11p15.5 lokalisiert, einem Bereich, der zu bekannten loss of heterozygosity (LOH)-Lokalisationen bei vielen Krebsarten, u.a. Brustkrebs zählt (siehe 1.3.2). So betont Nesbit (1997), dass weitere funktionelle Untersuchungen von hVH-5 eine wichtige Rolle spielen, um dessen mögliche Rolle bei der Karzinogenese herauszufinden.

1.3 FEHLREGULATION VON SIGNALWEGEN DURCH GENVERÄNDERUNGEN

Wie eine Zelle wächst und sich teilt, wird normalerweise von einem ausgewogenen Verhältnis positiver, proliferationsfördernder Einflüsse zu negativen, proliferationshemmenden Faktoren bestimmt. Eine Störung der Teilungsaktivität kann folglich entweder durch Fehlfunktionen der positiv wirkenden Signale oder auch durch fehlregulierte Mechanismen bei der Negativregulation zustande kommen.
Wenn teilungsfördernde Signale unverhältnismäßig stark aktiv sind, wird die betroffene Zelle aufgrund des Wachstumsvorteils die Ausbildung eines Tumors begünstigen. Der gleiche Effekt wird erzielt, wenn die negativen, dämpfenden Elemente der mitogenen Signalwege nicht mehr funktionieren, da ein Überschuss an positiven Signalen die Tumorentstehung fördert. Aufgrund der großen Anzahl von Proteinen, die am Netzwerk der Wachstumskontrolle beteiligt sind, liegt es nahe, dass Mutationen bzw. Fehlfunktionen sehr vieler Gene mit einer Störung der Wachstumskontrolle und Bildung von malignen Tumoren korrelieren.

1.3.1 Onkogene

Es lassen sich zwei wesentliche funktionelle Veränderungen unterscheiden, welche als molekulare Ursache für die Tumorentstehung verantwortlich gemacht werden.
Zum einen können Gene durch Mutationen oder Fehlregulationen aktiv an der malignen Transformation beteiligt sein: Manche Vertreter von Retroviren verursachen Tumore in Tieren wie Mäusen oder Hühnern (Palmieri et al., 1989). Retroviren enthalten RNA, welche sie mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA umschreiben. So kann eine ursprünglich virale Erbinformation in die DNA der Wirtszellen integriert werden. Schon bald nach der Entdeckung solcher Onkogene wurde nachgewiesen, dass es sich bei diesen um mutierte Formen der Gene normaler zellulärer Proteine handelt (Alitalo et al., 1986). Die Onkogene der Retroviren werden mit dem Präfix "v" (z.B. v-src, v-fms) versehen, während die unveränderten zellulären Varianten Protoonkogene bezeichnet werden und mit dem Präfix "c" (z.B. c-src, c-fms) gekennzeichnet sind.
Es stellte sich ebenfalls heraus, dass Protoonkogene auch ohne virale Beteiligung in Onkogene umgewandelt werden können. Wesentliches Kennzeichen von Onkogenen ist die dominante Implikation, d.h. Mutationen werden bereits phänotypisch sichtbar, wenn im diploiden

Chromosomensatz nur eine Kopie betroffen ist (Bisphop, 1991). Genveränderungen, die ein Protoonkogen zum Onkogen aktivieren, betreffen verschiedenste Mechanismen der Funktion und Regulation dieses Proteins (Baserga, 1994). So haben Ergebnisse aus der Wissenschaft der letzten Jahre verdeutlicht, dass die Mehrzahl der Protoonkogene für Proteine kodiert, die an der Übertragung und Ausführung mitogener Signale in direkter oder indirekter Weise beteiligt sind. Mechanismen der Aktivierung dieser Gene zu Onkogenen kommen beispielsweise durch Konzentrationserhöhung (vermehrte Expression, erhöhte Stabilität, Genamplifikation) oder Strukturveränderung (erhöhte Aktivität, erniedrigte Regulierbarkeit, Hybridproteine mit geänderter Aktivität) zustande.

1.3.2 Tumorsuppressorgene und Loss Of Heterozygosity (LOH)

Als Tumorsuppressorgene (TSG) werden Gene bezeichnet, deren Inaktivierung aufgrund von Mutation oder Deletion die Entstehung von Tumoren begünstigt. Ihre Funktion besteht darin, einen negativen, dämpfenden Einfluss auf die Tumorgenese auszuüben, bzw. diese zu verhindern (Marshall, 1991). Manchmal werden TSG auch als „Anti-Onkogene“ bezeichnet. Dieser Name ist jedoch nicht ganz korrekt gewählt, denn ebenso wie den Onkogenen fallen den TSG im Regelwerk der Zelle eine Vielzahl von Aufgaben zu.

Das humane Retinoblastom-Gen (RB) wurde als erstes Tumorsuppressorgen beim Menschen identifiziert und charakterisiert. Ein Retinoblastom ist ein seltener, aggressiver kindlicher Augentumor der Retina, der sich familiär gehäuft beobachten lässt (Cavenee et al., 1983). Genetische Untersuchungen bestätigten, dass diese Erkrankung mit einem Defekt auf dem Chromosomenabschnitt 13q14 assoziiert ist. Bei dieser Erkrankung müssen zwei aufeinanderfolgende Mutationen (two hits) den gleichen Genbereich betreffen, um eine normale Zelle in eine Tumorzelle zu verwandeln:

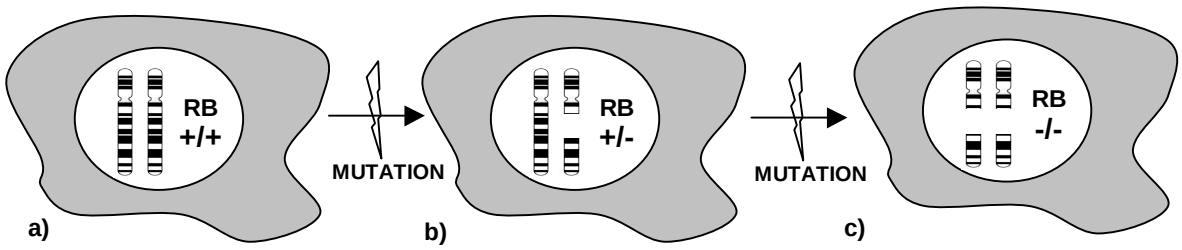


Abb. 5: Die „two-hit“ Hypothese nach Knudson (1971)

a) normale somatische Zelle
b) somatische Zelle einer Person mit familiärem Retinoblastom
c) Tumorzelle

Alfred Knudson stellte im Jahr 1971 als Erster die „two-hit“ Hypothese auf, welche die erblich bedingte Prädisposition für Krebserkrankungen verdeutlicht. Während beim gesunden Menschen zwei intakte Kopien des RB-Gens vorliegen (RB +/+), ist beim Träger eines erblichen Karzinoms ein Allel des TSG (hier RB) durch eine Mutation (erster „hit“) inaktiviert (RB +/-). Obwohl mutierte TSGs durch einen dominaten Erbgang an die Nachkommen weitergegeben werden, entsteht Krebs erst, wenn eine Neumutation (zweiter „hit“) auch die zweite Kopie des RB (RB -/-) betrifft. Fast immer kommt es zu so einem „second hit“ durch Fehler in der mitotischen Rekombination oder durch Non-Disjunktion, d.h. fehlende Trennung homologer Chromosomen in der Reduktionsteilung. Daraus folgt ein Fehlen weiter Bereiche essentieller Chromosomenabschnitte (Huynh et al., 1996). Es muss betont werden, dass erbliche Defekte eines TSGs sich bis jetzt auf zellulärer Ebene immer als rezessiv erwiesen haben, da der Verlust einer Kopie dieses Gens so lange still bleibt, bis das ursprünglich normale Allel ebenfalls inaktiviert wird. Knudson’s Hypothese wurde durch epidemiologische Daten aus Studien an Patienten mit einer Erkrankung am Neuroblastom, Phäochromozytom und Wilms Tumor bestätigt (Henry et al., 1989).

Eine zusätzliche Manifestation der „two-hit hypothesis“ ist der „Loss Of Heterozygosity“ (LOH). Dies hat die Suche nach Tumorsuppressorgenen sowohl bei familiären als auch sporadischen Krebserkrankungen stark beeinflusst, denn im Umkehrschluss erlaubt Knusdon’s Modell: Genetische Instabiliäten auf bestimmten chromosomalen Loci (LOH), welche bei Patienten einer bestimmten Tumorart häufig beobachtet werden, können u.U. Aufschluss über einen Zusammenhang zwischen möglicherweise mutierten TSGs und einer bestimmten Tumorart geben (Chen et al., 1992).

CDR	Gene(s)
1p36.1–36.2	*MDG1* and *BRCD2*
2q21.3–23.3	*FAP*
3p14.1	*FHIT*
5q21.1–21.3	*APC*
6q15	*MYB*
6q22.1–23.1	*MYB* and *ROS1*
6q25.2–27	*hZAC* and *ESR-1*
7q31.1–31.31	*CAV-1*
8p22–21.3	*N33*
8q24	*MYC*
9p21	*CDKN2A* and *CDKN2B*
10q23.31–23.33	*SNCG*, and *PTEN*
11p15	*ST5*, *TSG101* and *HRAS*
11q13.1	*EMS1* and *INT-2*
11q23.3	*ATM*
13q12.3	*BRCA2*
13q14.2–14.3	*RB1*
14q32.11–31	*OGR1*
16q11.2–22.1	*CDH1*
16q22.3–24.3	*CDH13*
17p13.3	*BCPR*
17p13.1	*TP53*
17q21.23	*BRCA1*
18q21.1–21.3	*DCC*
22q12.3	*RRP22* and *NF2*
22q13.1	*ST13*

Abb. 6: Die 26 häufigsten LOH-kodierenden Regionen (CDR) und mögliche betroffene Gene bei Brustkrebs

Auf diese Hypothese bauend, begannen zahlreiche klinische Studien zur Erforschung häufiger LOH-Raten. Robert J. Osborne und seine Gruppe veröffentlichten im Jahre 2000 eine Zusammenstellung aus Daten von insgesamt 143 LOH-Brustkrebs-Studien. Zusätzlich zu den bisher schon bekannten „hot spots“ BRCA1 und BRCA2 wurden 24

weitere Regionen auf 16 verschiedenen Chromosomen identifiziert (siehe Abb. 6).
Derartige "gene-maps" sind wertvolle Anhaltspunkte und eine wichtige Ausgangsbasis für Wissenschaftler im Bereich der Grundlagenforschung. Eine Charakterisierung sowie Expressions- und Mutationsanalysen von Genen, die in diesen Chromosomenbereichen liegen, können neue Erkenntnisse in Bezug auf die Pathogenese dieser komplexen multifaktoriellen Erkrankung bieten.

1.4 AUFGABENSTELLUNG

Die Entstehung maligner Tumore wird unter anderem mit Genveränderungen von Tumorsuppressorgenen assoziiert. Für die Regulation von zellulärem Wachstum und Differenzierung spielen Tyrosinphosphatasen als Negativregulatoren von Wachstumssignalen die Rolle eines Tumorsuppressorgens. Genetische Instabilitäten (LOH) an gewissen chromosomalen Loci, die auffallend häufig bei Patienten beobachtet werden, welche von einer bestimmten malignen Tumorerkrankung betroffen sind, geben Hinweise auf die Lage solcher potentieller Tumorsuppressorgene im menschlichen Genom.
Beim familiären Mammakarzinom korreliert eine LOH-Region (Chromosom 11p15.5) mit der Genlokalisation einer Tyrosinphosphatase: hVH-5. Aus diesem Grund soll untersucht werden, ob Genveränderungen dieser Phosphatase existieren. Möglicherweise stehen diese in Zusammenhang mit der Entstehung des Mammakarzinoms. Daher soll in dieser Arbeit eine Expressions- sowie Mutationsanalyse von hVH-5 in Brustkrebszelllinien im Vordergrund stehen. Um ein zeitsparendes und effektives Mutationsscreening aller Genabschnitte zu ermöglichen, soll zu Beginn der Arbeit eine neue Methode für die Mutationssuche, Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE), etabliert werden.
Ein eventueller Fund einer Genveränderung der hVH-5 Phosphatase soll durch eine Sequenzierungsanalyse und Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) bestätigt werden. Weiterhin soll diese neu beschriebene Genveränderung durch andere Untersuchungen, wie z.B. Transkriptions- und Expressionsanalysen etc. genauer charakterisiert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 BEZUGSQUELLENNACHWEIS

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Firma, Ort
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit
Agarose	Gibco, Eggenstein
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS	Bio-Rad, München
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bisacrylpiperazine	Fluka, Buchs
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue	Serva, Heidelberg
Desoxynukleotide	Boehringer, Mannheim
Didesoxynukleotide	Pharmacia, Freiburg
Dimethyldichlorsilan	Sigma, Taufkirchen
DMSO	Sigma, Taufkirchen
DTT	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Ethylen Glycol	Sigma, Taufkirchen
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenstein
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Formamid	Merck, Darmstadt
HEPES	Serva, Heidelberg
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein

Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
MOPS	Biomol, Haub
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenglycol 4000	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
SDS	Roth, Karlsruhe
Taurin	Sigma,Taufkirchen
TEMED	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Xylol	Merck, Darmstadt

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
PCR-Beads	Pharmacia, Freiburg
Restriktionsenzyme	Pharmacia, Freiburg
	Boehringer, Mannheim
	Biolabs, England
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Trypsin	Gibco, Eggenstein

2.1.3 „Kits" und Verbrauchsmaterial

ECL Kit	NEN, Brüssel
QIAEX Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
DNA blood mini Kit	Qiagen, Hilden
Light Cycler Master SYBR Green I Kit	Roche, Mannheim
Filterpapier 3MM	Whatman, USA
Hyperfilm MB	Amersham, Braunschweig
Kodak X-omat AR	Kodak, Stuttgart
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
	Nunclon, Dänemark
	Falcon, U.K.
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
Sterilfilter 0.22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Sterilfilter 0.45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Zellulosenitrat 0.45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel

2.1.4 Medien

Medium für *E.coli* Bakterien

LB-Medium	1,0	%	Trypton
	0,5	%	Hefeextrakt
	1,0	%	NaCl
			pH 7,2

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5% Agar zugesetzt.

Bei Bedarf wurden dem Medium 100 µg/ml Ampicillin nach dem Autoklavieren hinzugegeben.

2.1.5 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien sowie alle Zusätze wurden von der Firma Gibco (Eggenstein) bezogen, fetales Kälberserum stammte von der Firma Sigma (Taufkirchen).

Nährmedien:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 mg/ml Glukose

RPMI 1640 Medium

McCoy's 5a Medium

Leibovitz's Medium

Einfriermedium: 90% FCS, 10% DMSO

Zusätze:

Bei Bedarf wurden L-Glutamin, Pyruvat oder Insulin nach Empfehlungen von ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) zugegeben.

2.1.6 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Alle hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. War es notwendig, den pH-Wert eines Puffers einzustellen, so ist die dazu verwendete Säure bzw. Base in Klammern aufgeführt.

BBS (2x)	50	mM	BES
	280	mM	NaCl
	1,5	mM	Na_2HPO_4
			pH 6.96 (NaOH)
CSGE-Gelmix	10	%	PAA
	99:1	ratio	PAA/1,4 bisacryloylpiperazine
	10	%	ethylene glycol
	0.07	%	TEMED
	0.5	x	TTE

CSGE-DNA-Auftragungspuffer	50	%	Glycerol
	0.25	%	Xylencyanol
	0.25	%	Bromphenolblau
DNA-Auftragungspuffer (6 x)	0,25	%	Bromphenolblau
	0,25	%	Xylencyanol
	30,0	%	Glyzerin
	100,0	mM	EDTA (pH 8,0)
Laemmli-Puffer (2x)	187,5	mM	Tris/HCl (pH 6,8)
	6,0	%	SDS
	30,0	%	Glyzerin
	0,01	%	Bromphenolblau
	5,0	%	ß-Mercaptoethanol
NET (10x)	150,0	mM	NaCl
	5	mM	EDTA
	50	mM	Tris
	0,05	%	Triton X-100
			pH 7,4 (HCl)
PBS	13,7	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	80,9	mM	Na_2HPO_4
	1,5	mM	KH_2PO_4
			pH 7,4 (HCl)
RNA-Auftragungspuffer (2x)	48,0	%	Formamid
	17,0	%	Formaldehyd
	11,0	%	Glyzerin
	0,1	%	Bromphenolblau
SD-Transblot	50,0	mM	Tris/HCl (pH 7,5)
	40,0	mM	Glycin

	20,0	%	Methanol
	0,004	%	SDS
TAE (10x)	400	mM	Tris/Acetat
	10	mM	EDTA
			pH 8,0 (Eisessig)
TBE (10x)	890	mM	Tris
	890	mM	Borsäure
	2	mM	EDTA
TE	10,0	mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	1,0	mM	EDTA (pH 8,0)
TTE (20x)	1.78	M	Tris
	570	mM	Taurin
	4	mM	EDTA
Tris-Glycin-SDS (10x)	248,0	mM	Tris/HCl (pH 7,5)
	1918,0	mM	Glycin
	1,0	%	SDS

2.1.7 Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper

Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaft	Referenz
E.coli DH5 α F'	F'/end A1 hsd R 17 ($r_K^- m_K^+$) gln V44+ hi-1 recA1 gyr (Nal^r) rel A1 Δ (lac ZYA -argF) U 169 deo (ϕ80dlacΔ(lacZ) M 15)	NEB

Zelllinien

Zellinie	Ursprung	Referenz
BT 20	Adenokarzinom, Mamma	ATCC
BT 474	duktales Karzinom, Mamma	ATCC
BT 549	duktales Karzinom, Mamma	ATCC
HEK 293	humane embryonale Nierenfibroblasten,	ATCC;
	transformiert mit Adenovirus Typ V DNA	Graham et al., 1977
MCF-7	Adenokarzinom, Mamma	ATCC
MDA-MB-175	duktales Karzinom, Mamma	ATCC
MDA-MB-231	Adenokarzinom, Mamma	ATCC
MDA-MB-361	Adenokarzinom, Mamma (Metastasen)	ATCC
MDA-MB-435s	duktales Karzinom, Mamma	ATCC
MDA-MB-436	Adenokarzinom, Mamma	ATCC
MDA-MB-453	Adenokarzinom, Mamma	ATCC
MDA-MB-468	Adenokarzinom, Mamma	ATCC
SkBr3	Adenokarzinom, Mamma	ATCC
T 47 D	duktales Karzinom, Mamma	ATCC
ZR 75-1	Adenokarzinom, Mamma	ATCC

Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden zur Immunpräzipitation oder als primäre Antikörper zur Detektion in der Immunoblot-Analyse eingesetzt.

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
α HA	Maus, monoklonal gegen HA (s.u.)	Sigma (Taufkirchen)
α VSV	Maus, monoklonal gegen VSV (s.u.)	Sigma (Taufkirchen)
α hVH-5	Kaninchen, polyklonal gegen hVH-5	eigene Arbeit

Die bei der Immundetektion von Proteinen verwendeten sekundären Antikörper waren mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert.

Antikörper	**Verdünnung**	**Bezugsquelle**
Ziege gegen Maus	1 : 10000	Sigma (Taufkirchen)
Ziege gegen Kaninchen	1 : 20000	BioRad (München)

2.1.8 Plasmide

Ausgangsvektoren

Vektor	**Eigenschaften**	**Referenz**
pBluescript II	ColE1 ori, (MCS), LacZ, f1(+)ori, Amp^r	Stratagene, USA (KS)
pcDNA3	Expressionsvektor, Amp^r, CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl	Invitrogen, USA

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren

Vektoren	**Eigenschaften**	**Referenz**
pcDNA3 HA	Expressionsvektor, Tag mit Erkennungssequenz gegen Hämatoxillin	J. Bange (MPI für Biochemie, München)
pcDNA3 VSV	Expressionsvektor, Tag mit Erkennungssequenz gegen *Vesicular stomatitis virus*	J. Bange (MPI für Biochemie, München)
pBluescript II hVH-5	gesamte Phosphatase hVH-5	Martell et al., 1997
pcDNA3 hVH-5	die gesamte Phosphatase hVH-5	diese Arbeit

2.1.9 Oligonukleotide

*Folgende Angaben beziehen sich auf die Nukleotidsequenz von humanem **hVH-5** mit der Nummer **U27193** im NCBI-Datennetz (www.ncbi.nlm.nih.gov):*

	Oligo-Name:
Primerpaar (Fragment 329 bp)	
5’ CATGGCTGGGGACCGGCTCCCG 3’ Forward-Primer hVH-5 Exon 1 (cDNA 134-155)	**DUSP EX 1** **FW**
5’ CTCAGCAGGATGGAGAGGAAGC 3’ Reverse-Primer hVH-5 Exon 2 (cDNA 463-442)	**DUSP EX 1** **RV**

Primerpaar (Fragment 226 bp)	
5’ CATGGCTGGGGACCGGCTCCCG 3’ Forward-Primer hVH-5 Exon 1 (cDNA 134-155)	**DUSP EX 1** **FW**
5’ TGCGTGCAGCCGGCTGGATGAG 3’ Reverse-Primer hVH-5 Exon 1(cDNA 360-339)	**De1g** **RV**

Primerpaar (Fragment 142 bp)	
5’ TCGATAAAGCCAAGCTCTCC 3’ Forward-Primer hVH-5 light cycler (cDNA 829-848)	**F 3**
5’ CCTGTCCTTCACGAACCTGT 3’ Reverse-Primer hVH-5 light cycler (cDNA 971-952)	**R 3**

*Oligonukleotidpaar zur spezifischen Amplifikation des Pseudogens **ψhVH-5**:*

Primerpaar (Fragment 202 bp)	
5’ GGCTCCCGAGGAAGATGATGGAC 3’ Forward-Primer ψhVH-5 EX 1 Pseudo FW	**PSEUDO FW**
5’ ATTTGGCTGCGTGTGGCCAGCCA 3’ Reverse-Primer ψhVH-5 EX 1 Pseudo RV	**PSEUDO RV**

*Nachfolgende Primersequenzen beziehen sich auf humanes **v-erb-b2:***

Primerpaar (Fragment 194 bp)	
5’ CGGAATTGGAAAACCGCGGACGCCTG 3’ Forward-Primer zur Amplifikation von v-erb-b2	**HER 2 int. FW**
5’ CGGGATCCGTCTGTCTCGTCAATGT 3’ Reverse-Primer zur Amplifikation von v-erb-b2	**HER 2 int. RV**

*Die mit den unten beschriebenen Primern amplifizierte Nukleotidsequenz ist der humane **eukaryontische Elongationsfaktor 1a**:*

Primerpaar (Fragment 192 bp)	
5’ CACACGGCTCACATTGCAT 3’ Forward-Primer Elongationsfaktor 1a	**EF 1a FW**
5’ CACGAACAGCAAAGCGA 3’ Reverse-Primer Elongationsfactor 1a	**EF 1a RV**

Humaner FGFR 4 *wurde mit folgenden Oligonukleotiden amplifiziert:*

Primerpaar (Fragment 168 bp)	
5' GACCGCAGCAGCGCCCGAGGCCAG 3' Forward-Primer FGFR4	**FGFR4 FW**
5' AGAGGGAAGCGGGAGAGCTTCTG 3' Reverse-Primer FGFR 4	**FGFR4 RV**

Die Angabe zu verwendeten Oligonukleotiden bezieht sich auf humanen

Faktor VIII Exon 14*:*

Primerpaar (Fragment 381 bp)	
5’ TACATACAGTGACTGGCACT 3’ Forward-Primer Faktor VIII Exon 14	**14 F1**
5’ GACCACTGGGTTGAGGTGGC 3’ Reverse-Primer Faktor VIII Exon 14	**14 F**

2.2 CONFORMATION SENSITIVE GEL ELECTROPHORESIS (CSGE)

Eine Methode zum Mutationsnachweis bei DNA

Die von Ganguli (1993) entwickelte Methode CSGE (Conformational Sensitive Gel Electrophoresis) ist geeignet, um auf schnelle und einfache Weise ein Mutationsscreening an einer großen Anzahl von DNA-Proben durchzuführen. Das Funktionsprinzip von CSGE basiert auf dem unterschiedlichen Wanderungsverhalten von DNA-Heteroduplexen im Vergleich zu Homoduplexen während der Auftrennung in einem mild denaturierenden PAA-Gel-System.

2.2.1 Molekulare Grundlagen der Heteroduplexformation

Die Tatsache, dass Basenfehlpaarungen in der DNA eine Konformationsänderung bewirken (Bhattacharyya et al., 1989), stellte den wissenschaftlichen Hintergrund dar, welcher zur Entwicklung dieser Methode führte. Mittels NMR (Woodson et al., 1988) und x-ray-Analysen (Joshua-Tor et al., 1992) konnte gezeigt werden, dass Heteroduplexe, abhängig von bestimmten Bedingungen in das DNA-Molekül hinein- oder herausragen. Solche Heteroduplexe ergeben sich, wenn PCR-Fragmente, die eine Mutation beinhalten, durch einen Denaturierungs- und Syntheseschritt (siehe Abb. 10) mit der entsprechenden Wildtyp-DNA gepaart werden. Dadurch entsteht auf molekularer Ebene entweder eine „bubble“ (beide Basen nach innen rotiert) oder die falsch gepaarten Basen ragen von einander weg, was zu einer „bulge“ führt (Bhattacharyya et al., 1989). Derartige Konformationsanordnungen sind jedoch nicht hinreichend, um bei einer einfachen elektrophoretischen Auftrennung der DNA ein unterschiedliches Wanderungsverhalten von Homo- und Heteroduplexen herbeizuführen (Ganguli et al., 1993).

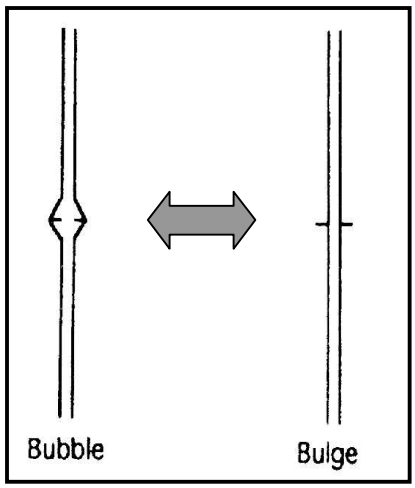


Abb. 7: Konformationsänderungen der DNA durch Basenfehlpaarungen

2.2.2 Funktionsprinzipien und molekularer Hintergrund von CSGE

Insertionen, Deletionen oder Punktmutationen der DNA können auf einfache Weise in einem mittels PCR amplifizierten Genfragment sichtbar gemacht werden: wenn dem PAA-Gelsystem mild-denaturierend wirkende Chemikalien wie Formamid und Ethylen-Glycol in einem bestimmten Konzentrationsverhältnis hinzugefügt werden, führt dies dazu, dass spezi-

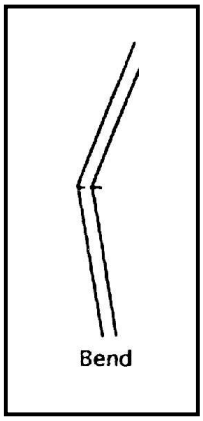


Abb. 8: Anordnung fehlgepaarter Basen im mild denaturierenden PAA-Gelsystem unter Zusatz von Formamid und Ethylen-Glycol

fisch DNA-Fehlpaarungen sichtbar werden (Lee et al., 1981). Es entsteht dabei folgendes Phänomen: Während des elektrophoretischen Laufes im mild denaturierenden Gel ordnet sich die „mismatch"-Stelle (Fehlpaarung) derart an, dass eine Base in das Molekül hineinragt und die andere nach außen rotiert (Ganguli et al., 1993). Hierauf folgt in weiten Teilen der DNA eine Veränderung der Konformation, was schließlich die Ursache für das unterschiedliche Wanderungsverhalten von DNA Homoduplexen (korrekte Basenpaarungen) und Heteroduplexen darstellt. Es wurde festgestellt, dass eine solche Mutationsanalyse jedoch nur Aussage über Genveränderungen gibt, die 50 bp und mehr von Beginn und Ende des PCR-Fragments entfernt sind (Williams et al., 1998). Dieser wesentliche Faktor muss bei der Analysestrategie und Auswahl von Oligonukleotiden mit einbezogen werden.

2.2.3 Methodischer Ablauf

Der Mutationsnachweis kann sowohl bei DNA mit heterozygoter Genmutation als auch bei homozygot mutierter Genausprägung erfolgen:

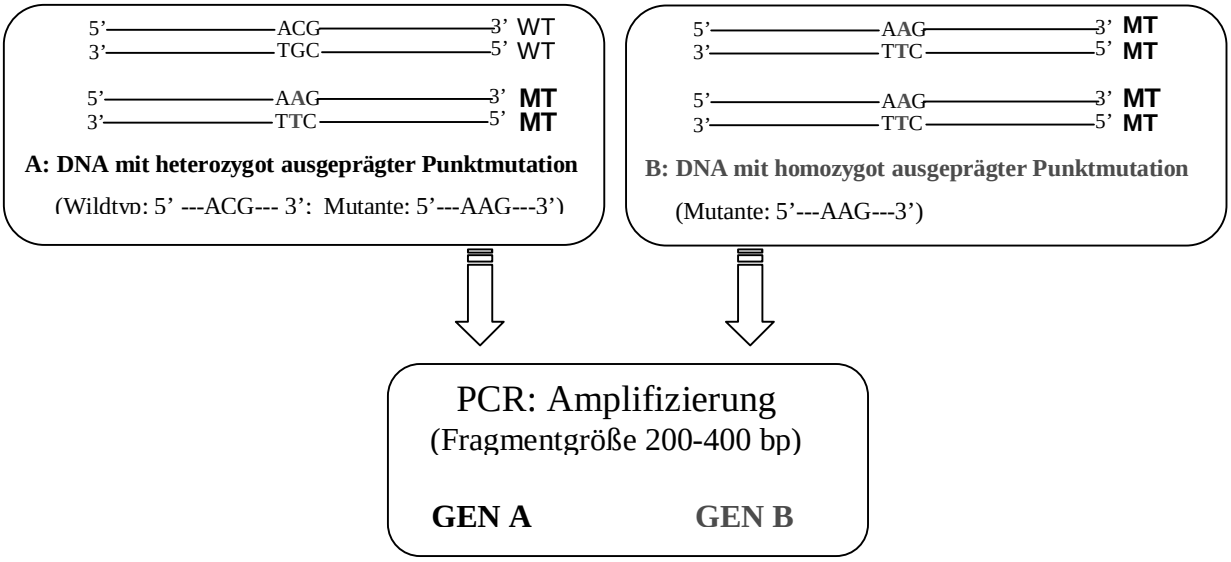


Abb. 9: Das zu untersuchende mutierte Gen (Gen A heterozygot; Gen B homozygot) wurde mittels PCR amplifiziert, wobei die Fragmentgrößen des PCR-Produktes zwischen 200 und 450 bp betrugen (Williams et al., 1998)

Bei der Analyse von homozygot-mutierten Genen (hier: Gen B) erfolgte als Zwischenschritt die Heteroduplexbildung. Hierbei wurden gleiche Mengen einer DNA mit der Wildtypausprägung dieses Gens (hier: Gen A) zusammen mit der zu untersuchenden DNA (hier Gen B) gemixt und für 5 Minuten bei 98°C denaturiert. Dadurch kam es zu einer Auftrennung der DNA in Einzelstränge. Die darauf folgende Abkühlung auf 65°C bewirkte im Mix eine statistisch stark signifikante Zusammenlagerung dieser Einzelstrangfragmente zu heterozygot-mutierten DNA-Doppelstrangfragmenten.

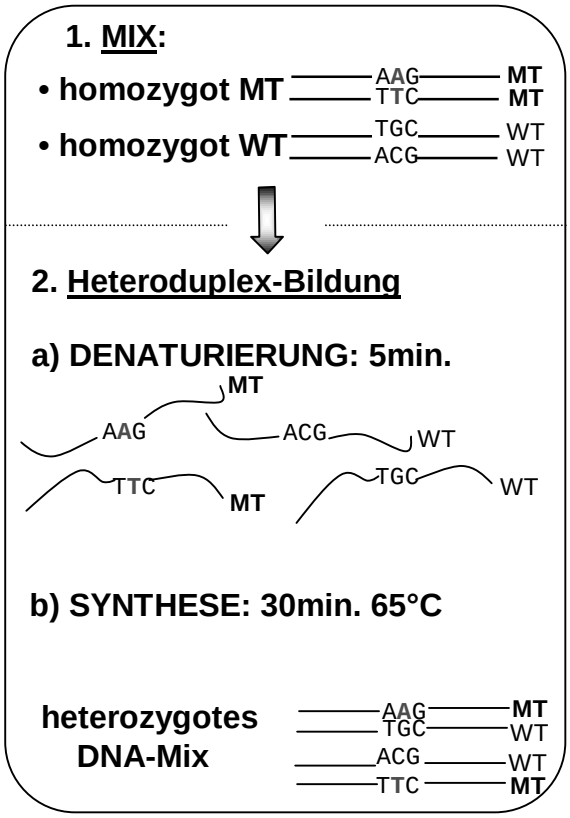


Abb. 10: Heteroduplexbildung

Heteroduplexe, die auf diese Art gebildet wurden, verhalten sich bei der Mutationsanalyse wie ursprünglich heterozygot-mutierte Gene. Die Auftrennung erfolgte zwischen Glasplatten mit den Maße 20 cm x 40 cm und unter Verwendung eines Kammes mit 17 Zähnen (je 0.5 cm Länge und 1 mm Breite). Für einen Ansatz von 175 ml Gel (2 Plattenpaare) wurden folgende Chemikalien benötigt: 43.75 ml Acrylamid, 17.5 ml Bisacrylpiperazin (aus der Stammlösung von 5g BAP-Pulver in 500 ml H_2O), 17.5 ml Ethylenglycol, 51 ml H_2O, 26.25 ml Formamid, 875 µl APS 20% und 100 µl TEMED. Es hat sich als günstig erwiesen, die Platten während des Einfüllens des flüssigen Gelgemisches horizontal aufzulegen, um die Bildung von Luftblasen im Gel zu vermeiden. Bis zur endgültigen Polymerisation des Gels sollte mindestens eine Stunde abgewartet werden (Williams et al., 1998). Als Laufpuffer diente 0.5x TTE. Nach einem Vorlauf von 750 Volt für 15 Minuten zur Ladungsausrichtung mussten die Geltaschen mit dem Laufpuffer gründlich (bis zu achtmal) ausgespült werden, da sonst nur verschwommene Banden detektiert werden konnten (siehe Anhang). Nach diesem Vorgang wurden je 4 µl der DNA-Probe (1µg/µl) mit 2 µl CSGE-Auftragungspuffer gemischt und auf das Gel geladen. Der Lauf fand bei 400 V statt. Da die optimale Auftrennung zur Mutationsanalyse bei PCR-Fragmenten mit Größen zwischen 200 und 450 bp erzielt wird und diese im Gel dabei eine möglichst weite Laufstrecke zurückgelegt haben sollten, betrug die Zeit bis zum Abnehmen der Spannung etwa 17 Stunden.

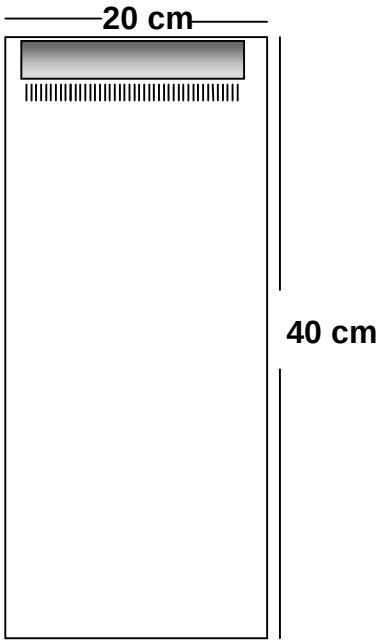


Abb. 11: CSGE- Gelplatten

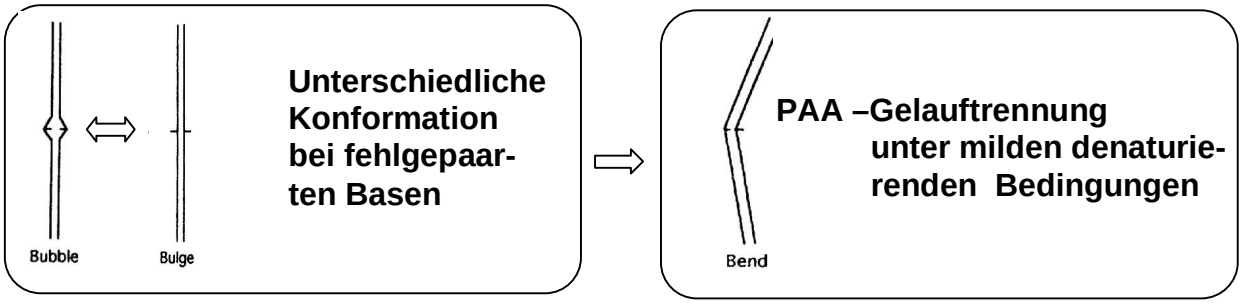


Abb. 12: Während der Auftrennung im mild denaturierenden Gel änderte sich die Konformation nur bei DNA-Fragmenten mit vorhandenem Heteroduplex

Das Gel wurde 5 Minuten in Ethidiumbromid gefärbt, sowie 15 Minuten in H_2O entfärbt. Heteroduplexe konnten nach ausreichend langer Laufzeit durch das Vorhandensein einer Doppelbande identifiziert werden, Homoduplexe hingegen stellten sich als einfache Bande dar. Die DNA wurde anschließend auf einem Transilluminator (UVP) durch Ethidiumbromid-fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar gemacht und gegebenenfalls durch einen Orangefilter fotografiert (Polaroid 667).

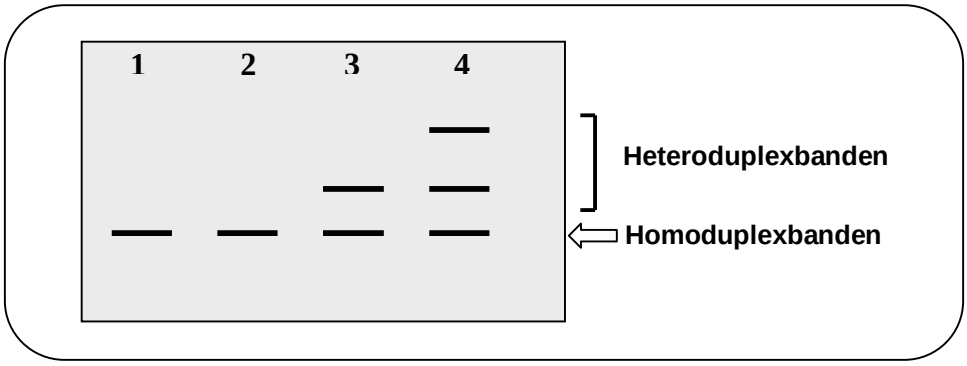


Abb. 13: Ergebnis der Mutationsanalyse eines Genfragmentes bei vier unterschiedlichen Patienten-DNA-Proben

Probe 1 und 2: eine DNA-Bande (Homoduplex) => keine Mutation
Probe 3: Doppelbande (ein Heteroduplex) => eine Mutation
Probe 4: 3-fach-Bande (zwei Heteroduplexe) => zwei Mutationen

2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.3.1 Arbeiten mit RNA und Synthese von cDNA

2.3.1.1 Isolierung von RNA

Kultivierte Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen und in 20 µl 4 M Guanidinium-Isothiocyanat-Lösung (GIT) pro cm^2 Platte aufgenommen. Das Lysat wurde zur Homogenisierung in eine Spritze mit 0.8 mm Kanüle aspiriert. Jeweils 8 ml Lysat wurden vorsichtig auf ein CsCl-Kissen (4 ml 5.7 M CsCl, 20 mM Na-Acetat) in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Während der Zentrifugation (3200 rpm) bildet sich ein CsCl-Gradient aus, in den chromosomale DNA etwa zur Hälfte einwandert, RNA dagegen ganz nach unten gelangt. Nach der Zentrifugation wurde die GIT-Lösung abgehoben, je nach Bedarf die DNA-Bande isoliert und das RNA-Pellet in TE-Puffer mit 0.3 M Na-Acetat aufgenommen. Daraufhin erfolgte eine Phenol/Chloroform Extraktion. Die Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte bestimmt (1 OD_{260} = 40 mg/ml).

2.3.1.2 Selektion von poly(A)$^+$ RNA

Zur Detektion von wenig exprimierten Transkripten wurde poly(A)$^+$ RNA aus totaler RNA angereichert. Hierzu wurde Oligo-(dT) Zellulose (BRL, Eggenstein) mit HS-Puffer (0.5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA) versetzt, in eine 15 ml Einwegsäule gefüllt und mit Puffer äquilibriert. 1-2 mg RNA wurden bei 70°C für 5 Minuten denaturiert und danach auf die Säule gegeben. Die Oligo-(dT)-Matrix wurde mit 10 Vol. LS-Puffer (0.1 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA) gewaschen. Poly (A)$^+$ angereicherte RNA konnte anschließend mit 5 x 400 µl TE-Puffer eluiert und mit je 40 µl 3 M Na-Acetat (pH 7.5) und 1 ml Ethanol präzipitiert werden. Aus 1 mg totaler RNA erhielt man 30-50 µg Poly (A)$^+$ RNA als Ausbeute.

2.3.1.3 Reverse Transkription

Für die Synthese von cDNA wurden 3 µg poly(A)$^+$ RNA (1 µg/µl) eingesetzt. Nach Zugabe von 10 pmol eines Oligo-dT-Primers wurde das Gesamtvolumen des Ansatzes mit dH_2O auf 6.5 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung wurde 5 min bei 70°C inkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Damit die Primer hybridisieren können, wurde der Reaktionsansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe folgender Substanzen weitergeführt: 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 1µl RNAse Inhibitor (40 E/µl), 4.0 µl Reverse-Transkriptase Puffer (4x), 2 µl DTT (Dithiothreitol), 2 µl AMV Reverse-Transcriptase (10 U) und 2.5 µl dH_2O. Die Synthese der komplementären DNA erfolgte während der Inkubation für 2 Stunden bei 42°C. Dies ist das Arbeitsoptimum der AMV-RT, einem Enzym aus dem *avian myoblastosis virus*. Durch Inkubation für 7 Minuten bei 72°C wurde die Synthese abgeschlossen und die cDNA mittels PCR Purification Kit aufgereinigt.

2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

2.3.2.1 Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können DNA-Sequenzen, die in nur geringer Kopienzahl vorkommen, zu detektierbaren und klonierbaren Mengen amplifiziert werden (Saiki et al., 1985). Hierbei verwendet man zwei spezifische Oligonukleotide, welche die zu vervielfachende Sequenz einschließen. In der vorliegenden Arbeit wurde durch PCR die Expression von hVH-5 - Genen in genomischer DNA sowie cDNA von Brustkrebszelllinien und Geweben untersucht. Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Grundschema in einem Reaktionsvolumen von 50 µl (ad H_2O) angesetzt:

1 µl	DNA (1µg/µl)
0.5 µl	"sense" Oligonukleotid, 10 pmol
0.5 µl	"antisense" Oligonukleotid, 10 pmol
5 µl	10x Taq Polymerase Puffer (20 mM Tris/Cl, pH 8.0, 0.1 mM KCl, 20 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0,5% Nonidet P40 (v/v), 0,5% Tween 20 (v/v))
1 µl	dNTP-Mix, 10 mM (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)
1 µl	Taq-Polymerase (0,1-0,5 E)

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde cDNA bzw. genomische DNA durch ein entsprechendes Volumen an H_2O ersetzt. Die Synthesereaktion lief im Thermocycler „Progene“ der Fa. Techne ab. Es wurde das folgende Syntheseprotokoll verwendet:

erste Denaturierung:	3 min	94°C	
Amplifikation 25-30 Zyklen:	1 min	94°C	(Denaturierung)
	1 min	x°C	(Hybridisierung)
	1 min	72°C	(Synthese)
letzte Synthese:	5 min	72°C	

Hierbei wurde aus der Schmelztemperatur der Oligonukleotide die Annealing-Temperatur berechnet. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem Agarose- bzw. Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Anfärben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

2.3.2.2 Real-time quantitative PCR

Moderne Quantifizierungsverfahren wie die real-time quantitative PCR (Echt-Zeit-PCR) beruhen darauf, dass die Menge an detektierbarem PCR-Produkt nach jedem Zyklus während der Amplifikation im Reaktionsgefäß gemessen wird. Mit einem optischen Verfahren kann hierbei ein Fluoreszenzsignal gemessen werden, dessen Stärke direkt proportional der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt ist (Higuchi et al., 1992). Das in dieser Arbeit verwendete Gerät (Light Cycler, Roche) arbeitet mit Glaskapillaren und dem Fluoreszensfarbstoff SYBR Green. Zur Amplifikation und Quantifizierung von cDNA wurde mit folgendem Protokoll gearbeitet:

H_2O (sterile, PCR grade)	11.6 µl
MgCl, stock solution (4 mM)	2.4 µl
Primer, stock solution (10 pmol/µl)	1 µl
Light Cycler-Fast Start SYBR Green I	2 µl
DNA (1µg/µl)	2 µl

Die Amplifikation erfolgte nach jenen Parametern:

	Temperatur (°C)	Inkubationszeit (Sek.)	
Vorinkubation:	95	8	
Amplifikation:	95	15	} Zyklen
	52	8	
	72	15	
Schmelzen:	60	30	
	95	6	
Kühlung:	40	30	

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 250 bp bis 12 kb wurden in 0,6-2 %igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Die Bestimmung der Größe linearisierter Fragmente erfolgte im Vergleich zu einem Längenstandard (1 kb Leiter, Gibco, Eggenstein). Die Agaroselösungen wurden in TAE (1x) angesetzt, in der Mikrowelle aufgekocht und pro 100 ml Gellösung 1 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugegeben. Der Auftrag der DNA erfolgte in Auftragspuffer (1x). Zur Elektrophorese wurde als Puffer TAE (1x) mit 1µg/100 ml Ethidiumbromid verwendet, dabei lagen die Laufzeiten – je nach zu untersuchendem Trennbereich, Agarosekonzentration der Gellösung und Größe der Gelkammer – zwischen einer und vier Stunden bei 40 bis 100 Volt.
Die DNA wurde anschließend auf einem Transilluminator (UVP) durch Ethidiumbromidfloureszenz unter UV-Licht sichtbar gemacht und gegebenenfalls durch einen Orangefilter fotografiert (Polaroid 667).

2.3.4 Enzymatische Behandlung von DNA

2.3.4.1 Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Die Berechnung der eingesetzten Enzymmenge erfolgte unter Verwendung der Einheitenangaben der Hersteller, Einbeziehung des Größenverhältnisses und der Zahl der Schnittstellen von verdauter DNA zur Standard-DNA (Lambda-DNA). Die Berechnung der einzusetzenden

Enzymmenge (U) zum Verdau von 1 µg DNA erfolgte nach folgender Formel: (Anzahl der Basenpaare von λ x Schnittstellen in zu verdauender DNA) / (Anzahl der Basenpaare in zu verdauender DNA x Schnittstellen in λ). Die Inkubationszeiten betrugen 2-3 Stunden bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur und erfolgten in dem vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffer.

2.3.4.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden verhindert. 1-4 µg gespaltene Vektor-DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl in 1x Phosphatasepuffer (50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 0,1 mM EDTA (pH 8,5)) nach Zugabe von 1 µl alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 E) für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA über ein Agarosegel (0,6-1% Agarose) aufgereinigt.

2.3.4.3 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden mit Klenow-Polymerase

5'-überhängende Enden von Restriktionsenzymen lassen sich in Anwesenheit der entsprechenden Desoxynukleotidtriphosphate mit Klenow-DNA-Polymerase zu glatten Enden auffüllen. Die DNA wurde in nach Herstellerangaben entsprechenden Pufferbedingungen sowie mit 250 µM dNTP und Klenow-DNA-Polymerase 30 min. bei RT inkubiert.

2.3.4.3 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Ligationspuffer (10x):	500	mM	TRIS/HCl (pH 7.4)
	100	mM	MgCl
	100	mM	DTT
	10	mM	ATP
	10	mM	Spermidin
	1	mg/ml	BSA

Die Klonierung von DNA-Fragmenten in linearisierte Plasmide erfolgte unter Verwendung des Enzymes T4-DNA-Ligase, das die kovalente Verknüpfung von kompatiblen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden unter Hydrolyse von ATP katalysiert. 25-100 ng Vektor-DNA wurden in Ligationspuffer (1x) mit dem 2-3 fachen molaren Überschuss des DNA-Fragmentes in Gegenwart von 1E T4-DNA-Ligase für 2-4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

2.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurden mittels QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach der Methode von Vogelstein et al., 1979 isoliert.

2.3.6 Restriktion-Fragment-Längen-Polymorphismus Analyse (PCR-RFLP)

Aufgrund der hohen Anzahl der durchgeführten PCR-Reaktionen und um mögliche Überkreuzkontamination zu vermeiden, wurden Ready☮To☮Go™ PCR-Beads (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Diese enthalten bereits alle nötigen Reagentien, außer Primer und DNA, für eine 25µl PCR-Reaktion.
Bei einem Endvolumen von 25µl enthält jeder Reaktionsansatz:

1,5	U	Taq-Polymerase
10	mM	Tris-HCl pH 9,0
50	mM	KCl
1,5	mM	$MgCl_2$
200	µM	je dNTPs (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)

Dazu wurden zugegeben:

2	µl	DNA (1µg/µl)
0,5	µl	„sense“ Oligomer (10 pmol/µl)
0,5	µl	„antisense“ Oligomer (10 pmol/µl)
22	µl	$H_2O_{bidest.}$

Es wurde zusätzlich eine Reaktion mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die DNA durch ein entsprechendes Volumen an $H_2O_{bidest.}$ ersetzt.
Die Synthesereaktion wurde in einem Thermocycler, „Progene“ der Fa. Techne (Cambridge), durchgeführt. Bei Benützung dieses Gerätes ist die Verwendung von Mineralöl zum Schutz vor Verdampfen des Reaktionsansatzes nicht notwendig, da eine Deckelheizung integriert ist.

Für die PCR-Reaktion wurde der folgende Reaktionszyklus verwendet:

erste Denaturierung:	5 min	94°C
Amplifikation 35 Zyklen:	30 sek	94°C
	30 sek	61°C
	1 min	72°C
letzte Synthese:	5 min	72°C

Nach Beendigung der PCR-Amplifikation wurde der gesamte Ansatz mit 0.2 µl des Restriktionsenzyms Taq I (10U/µl) versetzt und 2h bei 65°C inkubiert. Die dabei entstandenen Produkte des Restriktionsverdaus wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Acrylamid ist ein Monomer, das zu langen Ketten polymerisiert. Bei Zugabe von Methylenbisacrylamid werden die Ketten quervernetzt. Nach Zugabe von 1/250 10% APS und 1/1000 TEMED wurde die Polymer-Lösung (16,5 ml 2%iges Methylenbisacrylamid; 33,3 ml 30%iges Polyacrylamid; 5,5 ml 10x TBE) zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch Abstandshalter (Spacer) getrennt waren. Die Größe der linearisierten DNA-Fragmente wurde im Vergleich zu einem Längenstandard (1kb DNA Leiter, Gibco) ermittelt.
Als Laufpuffer diente 1x TBE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Volumen eines 6x Laufpuffers versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 190-270 Volt innerhalb von 3-4 Stunden. Nach 10- minütigem Färben in einer Ethidiumbromidlösung (etwa 12 µl/l einer Stammlösung von 10 mg/ml in dest. Wasser) konnten die DNA-Banden auf einem Transilluminator (UVP) mittels der Ethidiumbromid-Fluoreszenz unter UV-Licht (λ = 302nm) sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Orangefilters fotografiert (Polaroid 667) werden.

2.3.7 Sequenzierung

Zur DNA-Sequenzanalyse wurde die Didesoxynukleotidmethode nach Sanger et al., 1977 verwendet. Das in der Arbeit benutzte PE-Applied-Biosystem arbeitet mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen zur Identifizierung von A, C, G und T. Jeder Farbstoff emittiert nach Anregung durch einen Ionisationslaser eine unterschiedliche Wellenlänge. Jedoch können alle Farben durch Injektion in eine einzige Kapillare erkannt und ausgewertet werden.

2.3.8 DNA-Präparation in kleinem Maßstab („Miniprep“) und für präparative Zwecke

Die Präparation von DNA erfolgte mittels QIAGEN Plasmid Mini/Maxi Kit nach der Methode von Birnbooim, 1983.

2.3.9 DNA-Transfer in *E.coli* Bakterien

2.3.9.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

Es wurde die Methode von Chung und Miller (1988) verwendet. Zur Herstellung kompetenter *E.coli* DH 5α wurden 100 ml LB-Medium + Kanamycin (Selektion auf das F-Plasmid) mit 1 ml einer Über-Nacht-Kultur von *E.coli* angeimpft und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600}=0.3-0.6) bei 37°C geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (5000 rpm., 10 min., 4°C) wurde der Ansatz auf Eis in 7,5 ml TSB resuspendiert. Eine Stunde später wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei – 80°C gelagert.

2.3.9.2 Transformation von kompetenten E.coli Bakterien

Die zu transformierende DNA wurde in KCM (1x) auf 100 µl Volumen verdünnt und mit dem gleichen Volumen an kompetenten *E.coli* erst 20 min. auf Eis, anschließend 10 min. bei RT inkubiert. Zur Regeneration der Zellen und zum Aufbau der Plasmid-gekoppelten Antibiotikaresistenz wurden die Zellen nach Zugabe von 1 ml vorgewärmtem LB-Medium 50 min. bei 37°C geschüttelt.
Für die Transformation von Ligationsansätzen (25-100 ng Vektor-DNA) wurden 50, 150 und 1000 µl des Transformationsansatzes, bei der Transformation von Plasmid-DNA (10 ng DNA) 10 µl einer 1:10- und einer 1:100-Verdünnung auf LB-Agar Platten + Ampicillin (10 cm Durchmesser) ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte ü.N. bei 37°C.

2.4 METHODEN ZUR ARBEIT MIT EUKARYONTISCHEN ZELLEN

2.4.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO_2) bei 5-7% CO_2, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Kultivierte Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Das Einfrieren von Zellen erfolgte im Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer.

2.4.2 Transfektion von 293 Zellen mit Plasmid-DNA

Zur Transfektion von 293 Zellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalzium-Phosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen und Okayama, 1987). Dazu wird aus einer Mischung der DNA mit $CaCl_2$ und einer BES gepufferten Phosphatlösung (BBS) ein Kalziumphosphatpräzipitat der DNA gebildet, das nach einem noch unbekannten Mechanismus von den Zellen aufgenommen wird (Graham und van der Eb, 1973).

Die DNA liegt als Transgenom in den Zellen vor und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens im Laufe der Zellteilungen verloren (Scagos und Ruddle, 1981). Daraus resultiert in der sogenannten transienten Expression ein Expressionsmaximum bei etwa 48-72 h nach der Transfektion. Die hier verwendeten 293 Zellen sind humane embryonale Nierenfibroblasten, die mit Adenovirus Typ V-DNA transformiert wurden (Graham et al., 1977). Am Abend vor der Transfektion wurden pro 3,5 cm Schale $2x10^5$ 293-Zellen in 2 ml Medium ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Pro Transfektion wurden 4 µl Plasmid-DNA (1µg/µl) mit 86 µl Wasser und 10 µl einer 2,5 M $CaCl_2$-Lösung gemischt und unter gleichzeitigem Vortexen 100 µl BBS (2x) zugetropft. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und diese ü.N. bei 37°C und 3% CO_2 inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit DMEM/0.25% FCS gewaschen und bis zur Verwendung für 24 Stunden bei 8% CO_2 inkubiert.

2.5 PROTEINANALYTISCHE METHODEN

2.5.1 Tritonlyse von Zellen

Zur spezifischen Aufreinigung von Proteinen wurden die Zellen mit Hilfe des Detergens Triton X-100 lysiert. Dabei werden die Zellmembranen aufgelöst, während der Zellkern und die übrigen Zellkompartimente intakt bleiben und durch Zentrifugation abgetrennt werden können.

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit einem entsprechenden Volumen Lysepuffer (50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glyzerin, 5 mM EDTA pH 8,0, 1% Triton X-100), das sich nach der Größe der Zellkulturschale richtete, lysiert. Zusätzlich wurden frisch zugegeben: 10,0 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF, 100 mM Natriumfluorid, 10 mM p-Nitrophenylphosphat, 20 mM Natriumpyrophosphat, 2 mM NaOrthovanadat (pH 10). Nach 5-10 min auf Eis wurde das Zelllysat gesammelt und in ein 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett mittels Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C), wurde der Überstand, der alle zytosolischen und membranständigen Proteine enthält, in ein frisches Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde entweder zur Immunpräzipitation verwendet oder als Gesamtzelllysat weiterverarbeitet.

2.5.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Tritonlysaten erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung des BioRad Proteinassay Reagenzes. Die Proteinkonzentration ergibt sich dabei aus der Absorption bei 595 nm im Vergleich zu BSA als Standard.

2.5.3 Immunpräzipitation von Proteinen

Zur Anreicherung eines bestimmten Proteins aus Zelllysat dienen spezifische, an Protein A-Sepharose gekoppelte Antikörper, mit denen eine sog. Immunpräzipitation durchgeführt werden kann.

Protein A ist ein Membranprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus* mit der Eigenschaft, spezifisch an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen zu binden (Lindmark et al., 1983). Durch Kopplung von Protein A an Sepharose (Hjelm et al., 1972) und Bindung eines spezifischen Antikörpers kann das jeweilige erkannte Protein aus einem komplexen Gemisch zellulärer Proteine immunpräzipitiert werden.

Monoklonale Antikörper, die eine geringe Affinität zu Protein A besitzen, können unter Verwendung eines Protein A-bindenden Brückenantikörpers mit Spezifität zu Immunoglobulinen der jeweiligen Species an Protein A gekoppelt werden.

Pro Immunpräzipitation wurden 15 µl sedimentierte Protein A-Sepharose (Bindungskapazität 10 mg IgG/ml Gel) und 1-10 µg der monoklonalen Antikörper oder 1-4 µl der Kaninchen-Antiseren eingesetzt. Die obigen Mengenangaben wurden auf die Zahl der Präzipitate hochgerechnet und die insgesamt benötigte Protein A-Sepharose mit dem Antikörper in PBS für mindestens 3 Stunden auf einem Mischrotor bei 4 °C inkubiert. Der Protein A-Sepharose-Antikörper-Komplex wurde anschließend zweimal mit HNTG gewaschen und in soviel HNTG aufgenommen, dass pro Präzipitation die Hälfte des jeweiligen Tritonlysatvolumens an dieser Suspension zugegeben werden konnte. Die Inkubation erfolgte für 3 bis 18 Stunden auf einem Mischrotor bei 4 °C.

Die Präzipitate wurden abzentrifugiert (13000 rpm, 10 Sekunden, Tischzentrifuge), in der Regel dreimal mit je 1 ml HNTG gewaschen und in je 25 µl Lämmlipuffer aufgenommen.

2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, sodass ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennen-

den Proteine wurden 7-15%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen, ferner Gradientengele mit einem kontinuierlichen Polyacrylamidgradienten von 15% nach 7,5% bzw. 11% nach 6%. Auf die Trenngele wurde in Anschluss ein 4%iges Sammelgel gegossen. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G 250 gefärbt, oder die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Als Molekulargewichtsstandard bei der Gelelektrophorese wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

Protein:	**MG (in kD):**	**Protein:**	**MG (in kD):**
Myosin	205,0	Ovalbumin	42,7
ß-Galaktosidase	116,25	Carboanhydrase	29,0
Phosphorylase b	97,4	Trypsin-Inhibitor	21,5
BSA	66,2	Lysozym	14,4

2.5.5 Tricin-Sodiumdodecylsulfat-Gelelektrophorese

Das Tricin-Gelelektrophorese-System erlaubt die Auftrennung von Proteinen einer Größe von 1 bis 100 kDa bei einer Acrylamidkonzentration von nur 10%, weshalb dieses bevorzugt zur Auftrennung sehr kleiner Proteine bzw. Proteinfragmente verwendet wird.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Acrylamidlösung (48/1.5%)	48.0 g	Acrylamid
	1.3 g	Bisacrylamid
Gelpuffer	3.0 M	Tris/HCl, pH 8.45
	0.3 %	(w/v) SDS
Anodenpuffer	0.2 M	Tris/HCl, pH 8.9
Kathodenpuffer	0.1 M	Tris/HCl, pH 8.25
	0.1 M	Tricin
	0.1 %	(w/v) SDS

Sammelgellösung (3%)	1.0 ml	Polyacrylamidlösung (48/1.5%)
	3.1 ml	Gelpuffer
	8.4 ml	H_2O_{bidest}
Trennlösung (10%)	6.1 ml	Polyacrylamidlösung (48/1.5%)
	10.0 ml	Gelpuffer
	4.0 g	Glyzerin
	10.2 ml	H_2O_{bidest}
Probenpuffer	4.0 %	(w/v) SDS
	12.0 %	(w/v) Glyzerin
	50.0 mM	Tris/HCl, pH 6.8
	2.0 %	(w/v) S-Mercaptoethanol
	0.01%	(w/v) Serva Blue G

Es wurden die gleichen Glasplatten wie in 2.5.4 verwendet, zusammengesetzt und abgedichtet. Die Trenngellösung (mit 150 µl 10% (w/v) APS und 15 µl TEMED) wurde eingefüllt, mit Isopropanol überschichtet und nach Auspolymerisieren und Entfernung des Isopropanols mit dem Sammelgel (150 µl 10% (w/v) APS und 15 µl TEMED) überschichtet und der Kamm eingesteckt.

2.5.6 Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung (1% Coomassie G250, 10% Essigsäure, 40% Methanol) 5 Minuten gefärbt und dann mit 40% Methanol, 10% Essigsäure entfärbt. Anschließend wurden die Gele auf 3 MM Whatmann-Papier bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

2.5.7 Transfer von Proteinen durch das *Semidry*-Verfahren

Der Transfer erfolgte unter Verwendung einer Semidry-Blotapparatur nach der Methode von Bjerrum et al., 1986. Das auf die Nitrozellulose aufgelegte Gel wurde dabei in angefeuchtete

Filterpapiere eingebettet und auf beiden Seiten mit zwei Graphitelektroden in Verbindung gebracht. Der Transfer erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes.
Dazu wurde das Gel für 5 Minuten in Transblotpuffer inkubiert. Acht Lagen Filterpapier (Whatman 3MM) sowie eine Nitrozellulosemembran (Fa. Schleicher und Schüll, BA 85, 0,45µm) in der Größe des Trenngels wurden in dem gleichen Puffer angefeuchtet. Zum Transfer wurden 4 Lagen Filterpapier, die Nitrozellulose, das Gel und abschließend wieder 4 Lagen Filterpapier luftblasenfrei zwischen den Graphitelektroden aufgebaut. Der Transfer erfolgte für 2-3 Stunden bei 0,8 mA pro cm^2 des Gels.
Anschließend wurde zur Markierung des Längenstandards die Nitrozellulosemembran für 2 min. in Ponceau S-Lösung (siehe oben) geschwenkt und mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Entfärben der Membran erfolgte durch Waschen mit TBST.

2.5.8 Immundetektion (Immunoblot-Analyse)

Bei der Immundetektion wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Detektionsverfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass in einem ersten Schritt die spezifischen Antikörper die immobilisierten Antigene auf der Nitrozellulose erkennen, während im zweiten Schritt diese ihrerseits durch Antikörper erkannt und detektiert werden können.
Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese für 1 h mit 0,25% Gelatine in 1x NET inkubiert. Zur Detektion der Proteine in der Immundetektion wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet. Soweit die Konzentration bekannt war, wurden die Antikörperlösungen auf 1 µg/ml in NET, 0,25% Gelatine eingestellt, ansonsten wurden die Antikörper 1:500 bzw. 1:1000 in NET, 0,25% Gelatine verdünnt. Der Filter wurde 3 h oder über Nacht bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert, danach zweimal 5 Minuten mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Anschließend wurde die Membran 60 min bei RT mit dem zweiten Antikörper in 0,25% Gelatine in 1x NET inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte spezies-spezifische Antikörper verwendet. Vor der Detektion mit dem ECL-Kit (NEN) wurde der Blot schließlich mindestens dreimal 15 Minuten mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Zur Detektion wurde der Filter 1 min in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und auf einem Röntgenfilm exponiert.

Für ein weiteres Benutzen der Membran konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in einer spezifischen Lösung (62,5 mM Tris/HCl (pH 6.8), 100 mM ß-Mercaptoethanol, 2% SDS) bei 50°C für 1 h entfernt werden.

2.5.9 Herstellen eines Kaninchen-polyklonalen-Antiserums α ψhVH-5

Die Immunisierung des Kaninchens zur Herstellung des Antiserums erfolgte mit einem synthetischen Peptid. Als antigene Determinante dienten die ersten 15 Aminosäuren, ausgehend vom N-Terminus dieses Proteins (MAGDRLPRKVMDAKK). Das Peptid besaß am C-Terminus einen zusätzlichen Cysteinrest, der die Kopplung an ein Trägerprotein, hier Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KLH), ermöglichte. Synthese des Peptids, sowie Kopplung an KLH und Immunisierung erfolgte in der Firma EUROGENTECH (Belgien). Nach dem Syntheseverfahren (Reinheitsgrad 75%) wurden 5 mg des Peptids an KLH gekoppelt. Die Immunisierung wurde an einem Kaninchen durchgeführt, welchem vorher Preimmunserum abgenommen wurde. Im Abstand von 14-, 28- und 56 Tagen wurde erneut mit dem Antigen immunisiert. Eine weitere Blutentnahme erfolgte schließlich nach 38 und 66 Tagen. Die Endblutung war am 80. Tag nach der ersten Antigeninjektion und ergab 60 ml Serum.

3. ERGEBNISSE

3.1 EXPRESSIONSANALYSE DER PHOSPHATASE HVH-5

3.1.1 Amplifikation von hVH-5 aus cDNA mittels PCR

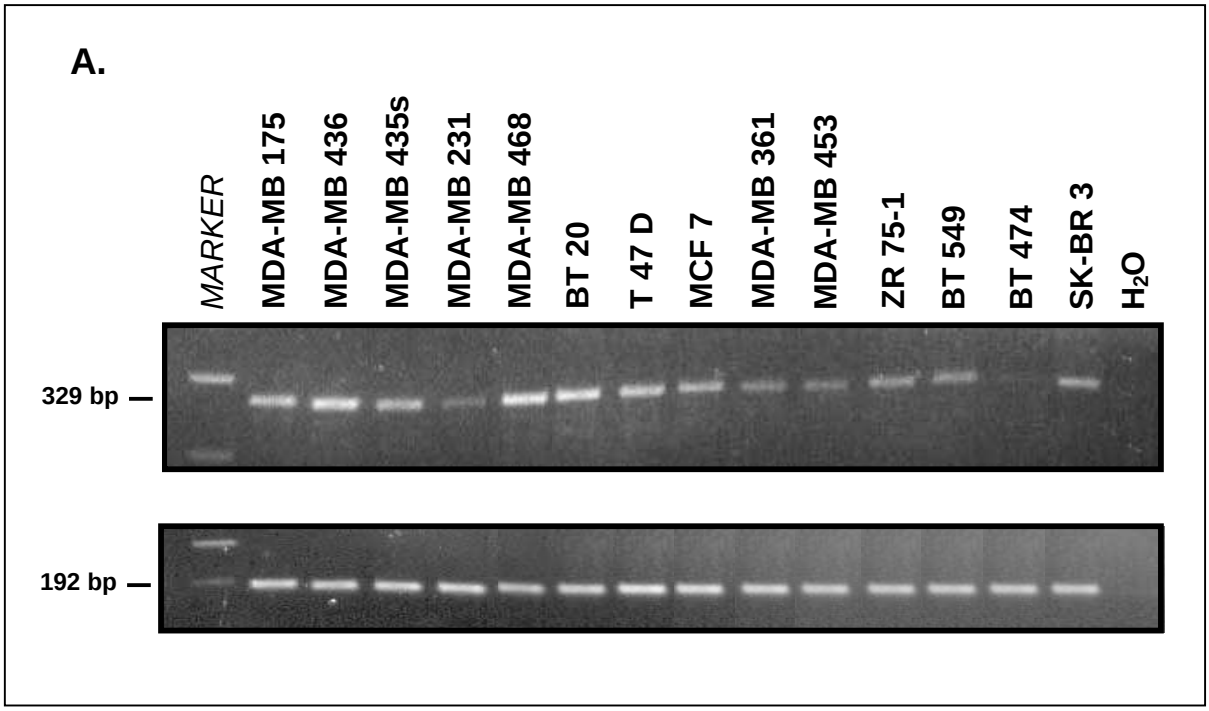
Zur Bestimmung des Expressionsmusters der Phosphatase hVH-5 in humanem Normalgewebe und Brustkrebszelllinien wurde die Polymerase-Kettenreaktion angewendet.

Aus Gewebe und Zelllinien wurde poly (A^+)RNA isoliert und mit Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die als Matrize für die PCR-Reaktion verwendet wurde. Zur Amplifikation wurden die Oligonukleotide DUSP EX 1 FW und DUSP EX 1 RV (siehe 2.1.9) eingesetzt. Sie wurden so gewählt, dass das entstehende 329 bp große PCR-Produkt das gesamte Exon 1 sowie einen Teil des Exon 2 einschließt. Damit sollte ermöglicht werden, mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA, welche bei der Präparation der total-RNA entstanden sein könnten, durch die PCR sichtbar machen zu können. Das zu amplifizierende Genfragment wurde so gewählt, dass es am 5'-Ende der kodierenden Sequenz von hVH-5 beginnt, da in der anschließenden Mutationsanalyse (3.2.1) die gesamte Phosphatase in flankierenden PCR-Produkten systematisch vom 5'- zum 3'-Ende untersucht werden sollte.

Als Positivkontrolle wurde an allen zu untersuchenden Proben eine zweite PCR-Reaktion durchgeführt: Das hierbei amplifizierte Gen, Elongation-Faktor 1a (EF1a), wird ubiquitär in eukaryontischen Zellen exprimiert (Matyas et al., 1999) und sollte idealerweise eine ungefähr gleiche Expression in allen Proben zeigen. Die dabei verwendeten Oligonukleotide EF1a FW und EF1a RV (siehe 2.1.9) amplifizieren ein Fragment von 192 bp.

Abb. 14 A zeigt, dass hVH-5 in cDNA von allen untersuchten Brustkrebszelllinien exprimiert wird, wobei der Expressionslevel der Phosphatase allerdings im Gegensatz zur relativ einheitlichen Expression von EF1a stark schwankt.

In Abb. 14 B ist die Expression der Phosphatase hVH-5 in Normalgeweben dargestellt: Das Gen wird in allen untersuchten Geweben nahezu gleich stark exprimiert. Etwas niedriger liegt die Expression in den Geweben Leber und Milz.



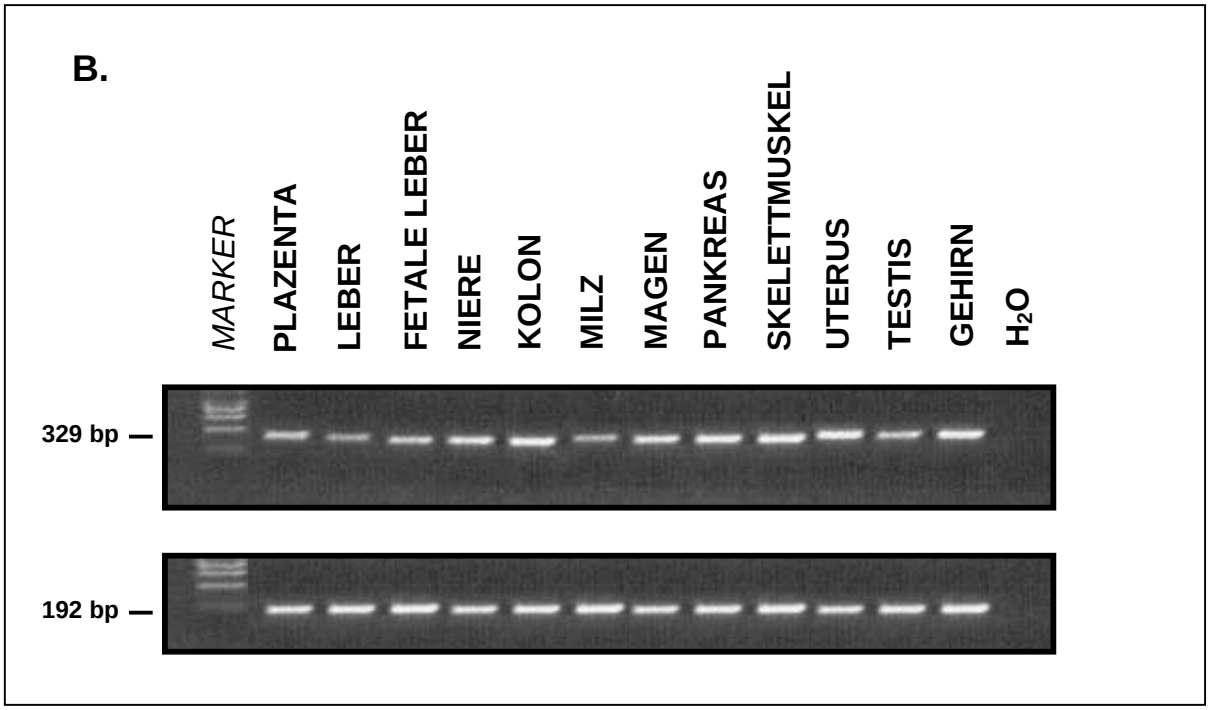


Abb. 14: PCR-Expressionsanalyse von hVH-5

A. Amplifikation von hVH-5 in verschiedenen Brustkrebszelllinien (Fragment 329 bp; oben). Expression des "Housekeeping" - Gens EF 1a (192 bp; unten).

B. hVH-5 – Expression in Normalgeweben (Fragment 329 bp; oben) Expression des "Housekeeping" - Gens EF 1a (192 bp; unten).

3.1.2 Real-time PCR: Quantitative Expressionsanalyse von hVH-5

Als nächstes sollte ein genauerer Expressionsvergleich der Phosphatase hVH-5 in krebs-assoziierten (DAL, MDA-MB 231 und MDA-MB 468) und nicht krebs-assoziierten Zelllinien (HBL-100 und MCF 10a) durch real-time PCR durchgeführt werden.

Total-RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.3.1.3), die PCR-Reaktion wurde nach dem Protokoll 2.3.2.2 im *Light Cycler System* der Firma Roche durchgeführt. Das Expressionsverhältnis zwischen den Zelllinien wurde durch eine Doppelbestimmung gemessen und unter Verwendung der *Light Cycler Relative Quantification* Software Version 1.0 der Firma Roche ausgewertet.

Die Expressionsrate in den untersuchten cDNA-Proben unterschied sich zum Teil mehr als 100-fach, es konnte jedoch keine Korrelation zwischen krebs- und nicht krebsassoziierten Zelllinien und der Expression von hVH-5 festgestellt werden.

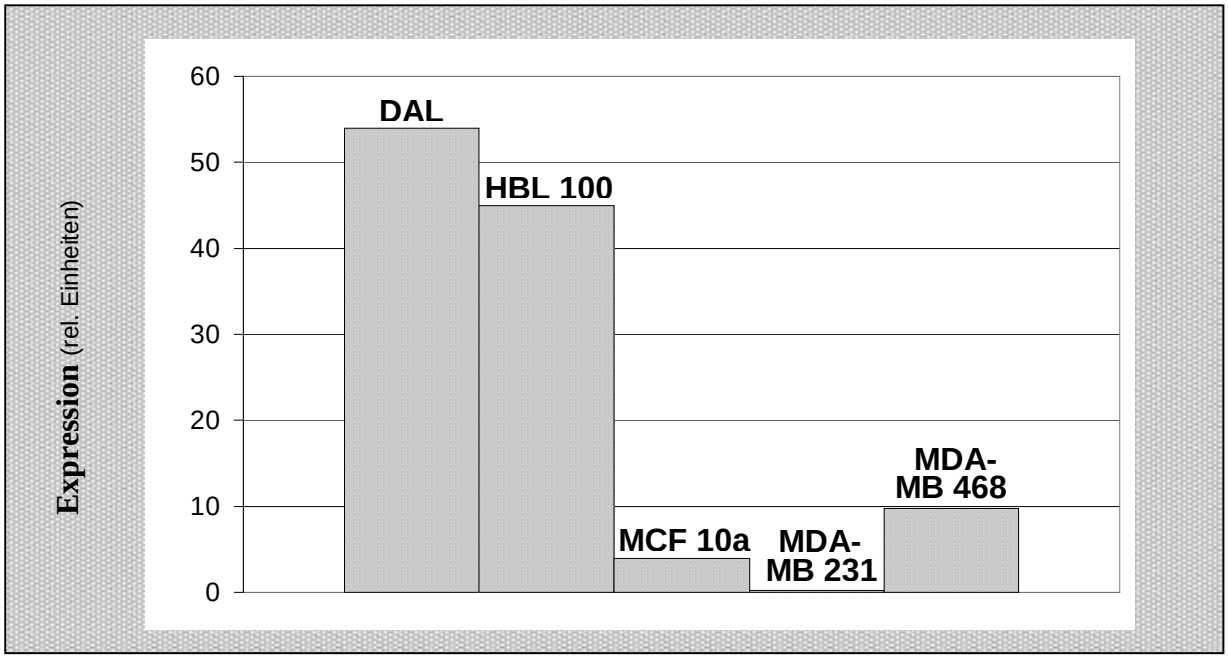


Abb. 15: Quantitative PCR von hVH-5 in Zelllinien

Total-RNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Hieraus konnten mittels quantitativer PCR die Expressionsraten von hVH-5 in verschiedenen Zelllinien detektiert werden.

3.2 MUTATIONSANALYSE VON HVH-5 IN ZELLLINIEN

3.2.1 Identifizierung von Heteroduplexbanden mittels CSGE-Analyse

Da hVH-5 eine Komponente der zellulären Signaltransduktion darstellt, könnte ein mögliches Vorliegen von Mutationen in diesem Protein mit dem Auftreten von Krebserkrankungen in Zusammenhang stehen.

Es war deshalb geplant, die gesamte Phosphatase systematisch auf Genveränderungen zu untersuchen. Die Analyse wurde an cDNA, die durch reverse Transkription aus poly (A^+)RNA gewonnen wurde, durchgeführt.

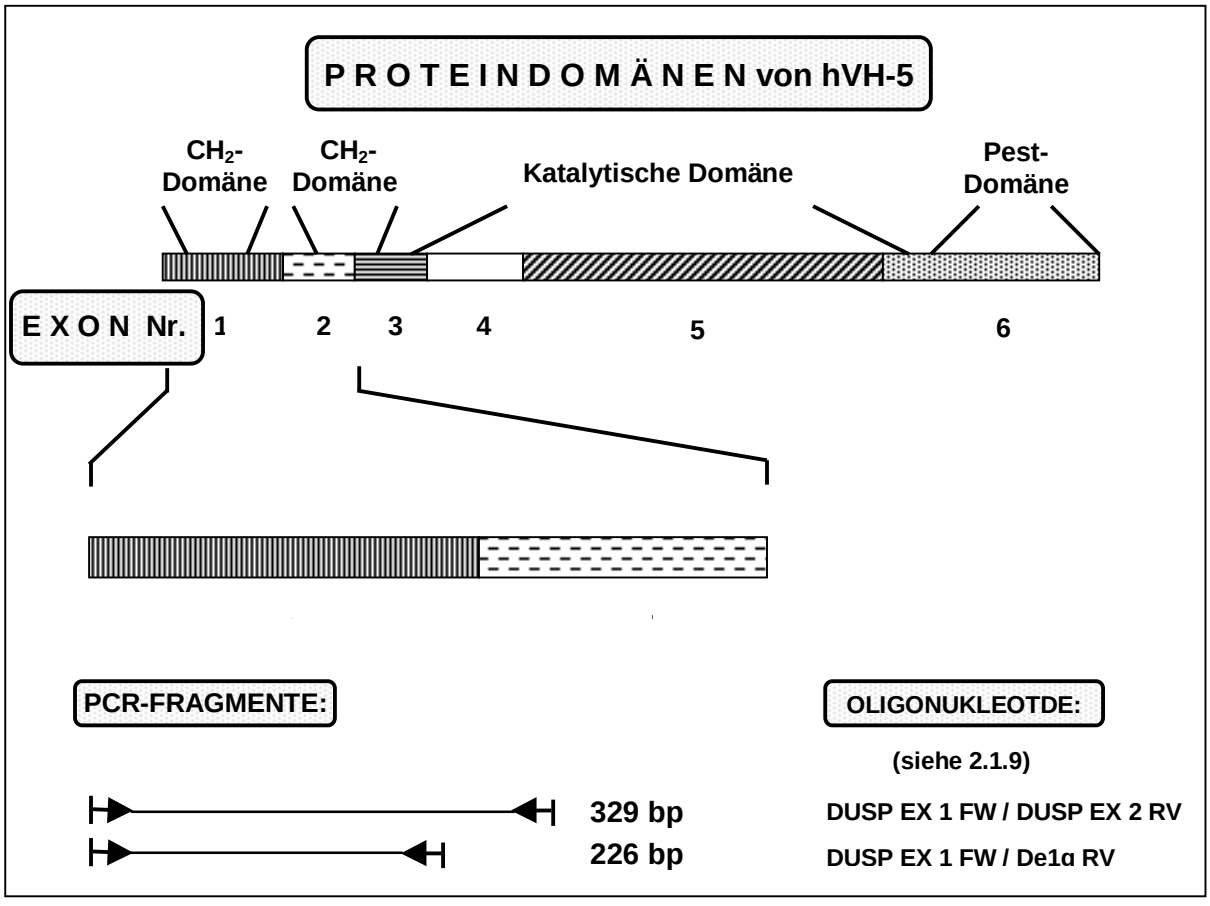


Abb. 16: Schematische Darstellung der für die PCR und anschließende Mutationsanalyse verwendeten Oligonukleotidpaare

Für die Amplifikation von Phosphatasefragmenten und deren Mutationsanalyse wurden zwei Oligonukleotidpaare eingesetzt. Die CSGE-Analyse wurde mit einem 329 bp großen PCR-Fragment durchgeführt. Dieses schließt Exon 1 und einen Teil von Exon 2 ein.

Die Oligonukleotide zur Amplifikation der PCR-Produkte wurden so gewählt, dass ein Fragment zwischen 250 bp und 450 bp entsteht. In diesem Größenbereich wird eine optimale Auftrennung der DNA im "Mutationsgel" erzielt. Die Analyse der Phosphatase sollte am 5'-Ende der kodierenden Sequenz begonnen und in überlappenden Fragmenten bis zum 3'-Ende fortgesetzt werden. Die Primärstruktur von hVH-5 ist schematisch in Abb. 16 dargestellt.

An allen zu untersuchenden cDNA-Proben wurde ein Fragment von 329 bp amplifiziert (siehe Abb. 16), welches das gesamte Exon 1 und einen kleinen Teil von Exon 2 der Phosphatase hVH-5 umfasst. Zur Kontrolle der richtigen Fragmentgröße wurden die PCR-Produkte auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die Aufreinigung der PCR-Reaktionsansätze zur Entfernung der Primer wurde anschließend mittels QIAquick PCR Purification Kit durchgeführt.

Ein Fünftel der erhaltenen PCR-Fragmente wurde für die CSGE-Mutationsanalyse entnommen. Die Denaturierung und Renaturierung zur Ausbildung von möglichen Heteroduplexen und damit die Visualisierung von Mutationen wurde ebenso wie die Auftrennung im "Mutationsgel" wie in 2.2.3 beschrieben ausgeführt.

Wie in Abb. 17 dargestellt, zeigte die Mutationsanalyse im CSGE-Gel bei elf Zelllinien das Vorhandensein einer DNA-Doppelbande. Dies deutet auf das Vorkommen von Heteroduplexen hin, d.h. in den amplifizierten DNA-Fragmenten konnte nach Reassoziation eine Basenfehlpaarung identifiziert werden. Die Fehlpaarung konnte nur dadurch sichtbar gemacht werden, dass vor der Auftrennung im mild-denaturierenden Gel die DNA-Doppelstränge bei 98°C getrennt und anschließend wieder renaturiert wurden, was die Zusammenlagerung von Wildtyp- mit mutierten Strängen ermöglichte (Heteroduplexbildung). Dies hat den Vorteil, beim Screening eine schnelle Aussage über das Vorliegen einer Mutation im untersuchten PCR-Fragment machen zu können, es gibt aber keinerlei Information über die exakte Art und Lage der Genveränderung. Eine Heteroduplexbildung wurde bei folgenden Zelllinien beobachtet: MDA-MB 436, MDA-MB 435s, MDA-MB 231, BT 20, T 47 D, MCF 7, MDA-MB 361, MBA-MB 453, BT 549, BT 474 und SK-BR 3.

Homoduplexe, d.h. Einfachbanden zeigte die CSGE-Auftrennung der Zelllinien MDA-MB 175, MDA-MB 468 und ZR 75-1 (siehe Abb. 17). Dies ist ein Hinweis, dass in diesen DNA-Proben keine Mutationen vorliegen. Ebenso könnte es sich hierbei allerdings auch um einen Genotyp mit identischen Genveränderungen in beiden Allelen handeln.

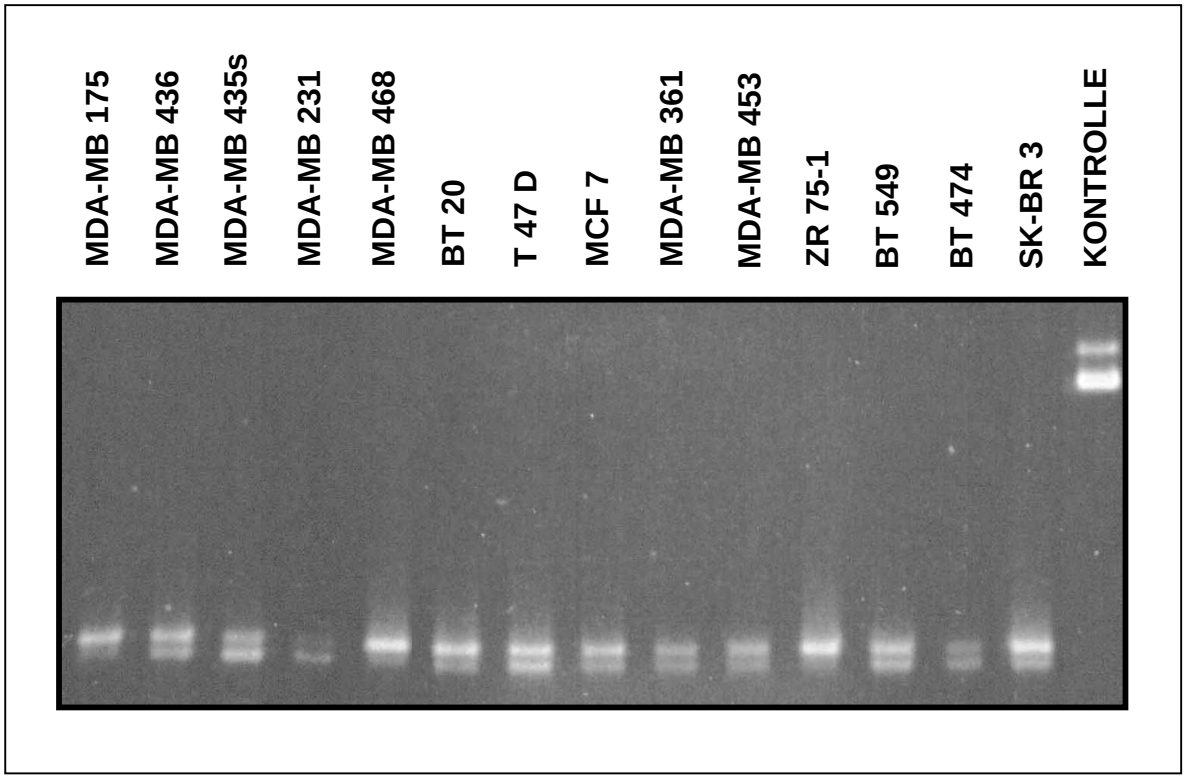


Abb. 17: CSGE-Mutationsanalyse eines PCR-Fragmentes von hVH-5 Exon 1 und 2 in Brustkrebszelllinien

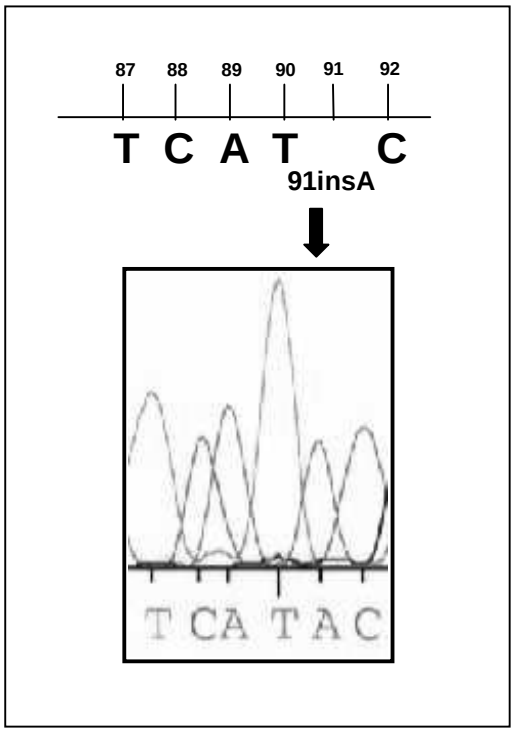
Beginnend vom 5'-Ende des hVH-5 - Gens wurde an cDNA von 14 Brustkrebszelllinien ein 329 bp–Fragment mittels PCR amplifiziert. Die DNA-Doppelbande, welche in 11 unterschiedlichen Proben detektiert werden konnte, kommt durch eine Heteroduplexbildung zustande (siehe Kapitel 2.2). Dies ist ein Hinweis für das Vorhandensein von Genmutationen im untersuchten DNA-Abschnitt dieser Zelllinien.

ANALYSEERGEBNIS:	**ZELLLINIE:**
DNA-HETERODUPLEX	MDA-MB 436 MDA-MB 435s MDA-MB 231 BT 20 T47 D MCF 7 MDA-MB 361 MDA-MB 453 BT 549 BT 474 SK-BR 3
DNA-HOMODUPLEX	MDA-MB 175 MDA-MB 468 ZR 75-1

3.2.2 Sequenzanalyse von hVH-5 Exon 1

Bei der Mutationsanalyse des 329 bp-Fragmentes von hVH-5 konnte an 11 von 14 untersuchten Brustkrebszelllinien eine Heteroduplexbildung beobachtet werden. Die CSGE-Analyse diente hierbei nur zum unspezifischen Nachweis, ob im untersuchten PCR-Fragment eine Mutation vorliegt oder nicht. Um die Art von Genveränderung in diesem Bereich der Phosphatase hVH-5 festzustellen, erfolgte eine Sequenzierung dieses Genabschnittes. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Anzahl der im Gel gebildeten Heteroduplexbanden mit der Summe der vorliegenden Genveränderungen im untersuchten PCR-Fragment korreliert (Körkkö et al., 1998). Demnach müsste die Untersuchung der Heteroduplexbanden beim hVH-5 – Gen das Vorliegen einer einzigen Mutation anzeigen. Die Sequenzierreaktionen erfolgten wie in Kapitel 2.3.8 beschrieben und wurden mit dem PE-Applied-Biosystem durchgeführt.

3.2.2.1 PCR-Produkte mit Heteroduplexbildung bei der CSGE



Es wurden diejenigen PCR-DNA-Proben sequenziert, die bei der CSGE-Analyse eine Doppelbande zeigten, d.h. eine Heteroduplexbildung mit Verdacht auf eine Genveränderung vorlag. Die Auswertung der Sequenzanalyse erwies sich schwieriger als erwartet, denn die Ausschläge der Kurven zur Detektion der Basen waren nicht immer eindeutig. Eine Ursache hierfür war zu diesem Zeitpunkt unklar, da technische Fehler durch Kontrollproben nahezu ausgeschlossen werden konnten. Ausserdem fiel auf, dass die Sequenzier-ergebnisse von DNA-Proben, die

Abb. 18a: Sequenzanalyse hVH-5 Mutation

Sequenzierung des PCR-Produktes von cDNA-Proben, die bei der Mutationsanalyse Heteroduplexe ergaben. Die Sequenzen waren nicht eindeutig beurteilbar, jedoch wurde eine scheinbare Insertion 91insA beobachtet. Die Wildtypsequenz ist oberhalb dargestellt.

keine Mutation tragen sollten, immer gut lesbar und eindeutig waren. So wurde zunächst festgestellt, dass bei allen „heteroduplex-positiven“ Proben eine offensichtliche Adenin-Insertion nach dem Basenpaar 91 vorlag (siehe Abb. 18a). Dass als Ursache für die Detektion der zusätzlichen Adenin-Base an genau dieser Stelle eigentlich ein ganz anderer Grund vorlag, konnte jedoch erst im späteren Verlauf der Arbeit aufgeklärt werden.
Das Vorhandensein dieser zusätzlich eingefügten Base würde zu einer Verschiebung des Leserahmens und somit zu einer kompletten Veränderung der Aminosäuresequenz führen. Dies wiederum würde bedeuten, dass es in den betroffenen Zelllinien zu einem veränderten Translationsprodukt des hVH-5 – Gens kommt.

3.2.2.2 PCR-Produkte mit Homoduplexbildung bei der CSGE

Die Sequenzierung von DNA-Proben, die bei der CSGE-Analyse eine Einfachbande aufwiesen, sollte aufklären, ob im untersuchten Genfragment ein Wildtyp oder eine homozygote Mutation vorhanden ist. Das Ergebnis war für alle drei Zelllinien identisch und eindeutig zu beurteilen (siehe Abb. 18b): bei den cDNA-Proben von MDA-MB 175, MDA-MB 468 und ZR 75-1 war keine Genveränderung zu erkennen.

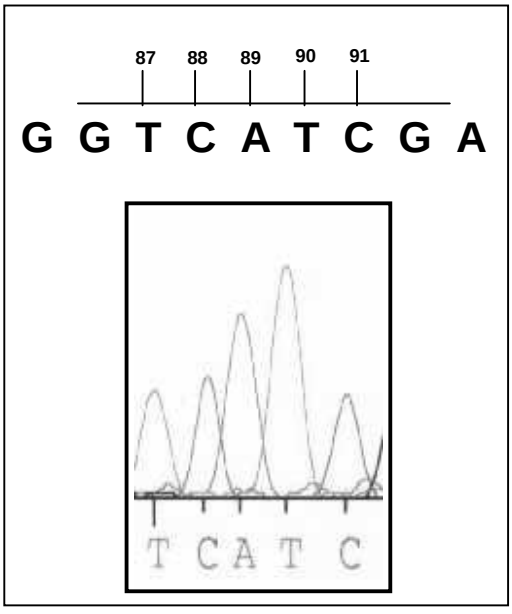


Abb. 18b: Sequenzanalyse hVH-5 Wildtyp

Sequenzierung des PCR-Produktes von cDNA-Proben, die bei der Mutationsanalyse Homoduplex ergaben. Es zeigte sich eindeutig eine unveränderte Wildtypsequenz.

3.2.3 Bestimmung des hVH-5 Genotyps durch RFLP

3.2.3.1 RFLP-Analyse an cDNA-Proben

Um das Vorliegen einer veränderten Gensequenz der hVH-5 – Phosphatase in cDNA bei verschiedenen Brustkrebszelllinien zu bestätigen, wurde eine Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP) durchgeführt. Dazu wurde mRNA aus den Zelllinien isoliert und zur Synthese der entsprechenden cDNA verwendet. Die Analyse erfolgte wie in Protokoll 2.3.6 beschrieben. Es wurde angenommen, dass eine RFLP-Analyse an dieser Nukleotidsequenzstelle durchführbar sei, da durch die möglicherweise vorliegende Insertion eines Adenosins an Position 91 das einzig in diesem hVH-5–PCR–Fragment erscheinende Erkennungsmotiv für das Restriktionsenzym Taq 1 verloren gehen würde (Abb. 19).

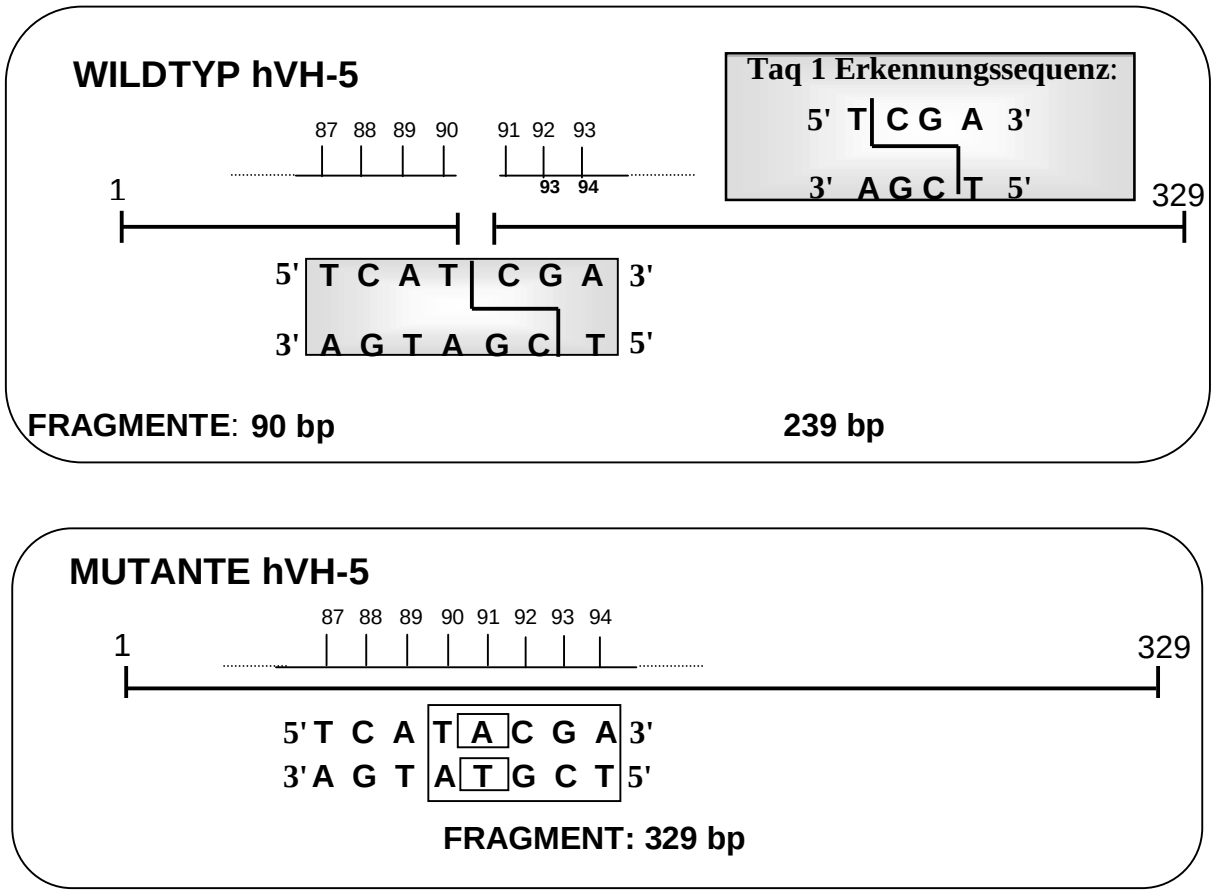


Abb. 19: Schematische Darstellung der RFLP Analyse zur Untersuchung des hVH-5 Genotyps

Das Restriktionsenzym Taq 1 erkennt die Sequenz „TCGA“ als Schnittstelle (oben; Kasten)

oben: im Wildtypgen hVH-5 ist die Erkennungssequenz für Taq 1 unverändert; das Restriktionsenzym schneidet ein 329 bp Fragment in 2 Teile mit den Größen 90 bp und 239 bp.

unten: die mutierte Sequenz führt zu einem Verlust der Erkennungssequenz. Taq 1 kann das 329 bp Fragment nicht schneiden

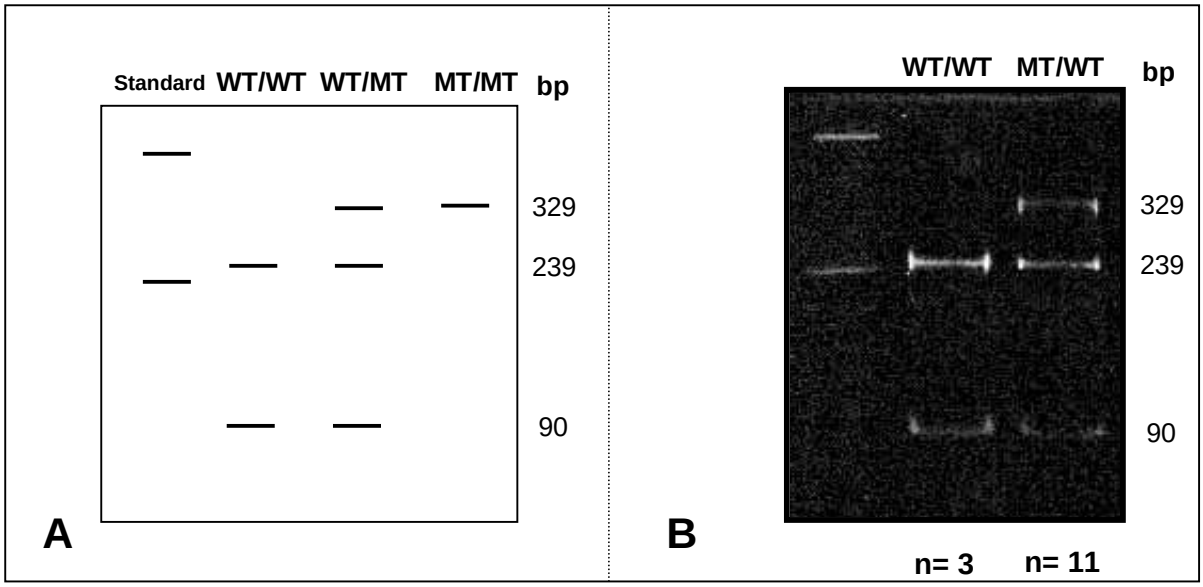


Abb. 20: Analyse von Genotypen der PTP hVH-5

An cDNA der jeweiligen Zelllinien wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, um ein 329 bp großes Fragment zu bilden. Die aus der RFLP-Analyse entstandenen Fragmente wurden in einem 12%igen nicht-denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

links: Schema der möglichen Kombinationen von Genotypen

rechts: Ergebnis der RFLP-Analyse von 14 (n=14) verschiedenen Brustkrebszelllinien

Mit Hilfe spezifischer Primer wurde das 329 bp große hVH-5 – Fragment, welches Exon 1 und einen Teil von Exon 2 enthält, durch PCR amplifiziert (Abb. 16) und anschließend mit dem Restriktionsenzym Taq 1 verdaut.

Falls ein Erkennungsmotiv vorhanden ist, kann das Enzym Taq 1 an einer bestimmten Position innerhalb des PCR-Produktes schneiden und erzeugt dadurch zwei Fragmente mit einer Größe von 90 bp und 239 bp. Aufgrund der spezifischen Bandenmuster nach Auftrennung der DNA in einem 12%iges Polyacrylamidgel konnten die Genotypen identifiziert werden (siehe Abb. 20).

Drei Zelllinien, MDA-MB 175, MDA-MB 468 und ZR 75-1 zeigten das Bandenmuster der homozygot nicht mutierten hVH-5.

Alle anderen untersuchten Zelllinien dagegen bildeten ein Muster von drei Banden: Das ungeschnittene 329 bp Fragment (mutiertes Allel), sowie zwei Banden, die durch den Verdau des Wildtyp-Fragmentes entstehen. Dieser Genotyp konnte in allen Zelllinien festgestellt werden, die bei der CSGE-Analyse eine Doppelbande zeigten und bei der Sequenzanalyse keine Wildtypsequenz ergaben.

Das Vorkommen eines homozygot-mutierten Genotyps konnte bei dieser Untersuchung wie erwartet nicht beobachtet werden.

3.2.3.2 Vergleich von Ergebnissen des RFLP an genomischer DNA und cDNA

Aus den vorangegangenen Experimenten gab es Hinweise auf eine mögliche veränderte Gensequenz der Phosphatase hVH-5.
Für weitere Untersuchungen wurde bereits vorhandene genomische DNA, die aus der Brustkrebszelllinie MDA-MB 436 gewonnen worden war, verwendet. Die RFLP-Analyse erfolgte wie in Protokoll 2.3.7 beschrieben, jedoch musste für die PCR ein anderer Reverse-Primer gewählt werden (siehe Abb. 16): Die Oligonukleotide zur Amplifikation des bereits untersuchten Abschnitts in cDNA von hVH-5 umschließen Exon 1 und einen Teil von Exon 2. Das in genomischer DNA dazwischen liegende Intron hat eine Länge von 1.6 kb.
Für die Untersuchungen an genomischer DNA sollte dieses Intron nun ausgespart werden, um eine eindeutige RFLP-Analyse zu ermöglichen. Unter Verwendung des „ursprünglichen“ forward - Primers (DUSP EX 1 FW) und eines neuen Reverse – Primers (De1g RV), der an das Ende von Exon 1 gelegt wurde, sollte auch an genomischer DNA ein relativ kleines PCR-Fragment entstehen, um dieses auf Vorhandensein einer möglichen Insertion untersuchen zu können.
Durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym Taq 1 wird das 226 bp-Fragment beim Vorliegen eines homozygoten hVH-5 - Wildtypgens in Fragmente von 90 bp und 136 bp zerschnitten, da auch in diesem Fragment die Schnittstelle für diese Restriktionsendonuklease 90 bp nach dem 5' – Ende der kodierenden Region liegt. Außerdem können noch folgende Fragmentgrößen den unterschiedlichen Genotypen zugeordnet werden: Ein Muster von DNA-Banden in Höhe von 90 bp, 136 bp und 226 bp im Agarosegel zeigt eine heterozygote Mutation von hVH-5 an und das alleinige Vorhandensein eines 226 bp – Fragments spricht für eine homozygote Mutation dieses Gens.
Es wurde die genomische DNA von 14 Brustkrebszelllinien untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass alle Zelllinien, die bei der ersten Analyse als WT/MT-Genotyp identifiziert worden waren, die vermeintliche Mutation nicht mehr enthielten: Während eine RFLP-Analyse dieser Zelllinien an cDNA das typische 3-Banden-Muster (WT/MT-Genotyp) aufwies (siehe 3.2.3.2), zeigte sich sowohl unter Verwendung von genomischer DNA als auch von cDNA in Kombination mit dem neuen Reverse-Primer „De1g RV“ bei den gleichen Zelllinien ein Muster mit nur zwei Banden auf dem Agarosegel als Hinweis auf das Vorliegen eines homozygoten Wildtyps (siehe Abb. 21A).

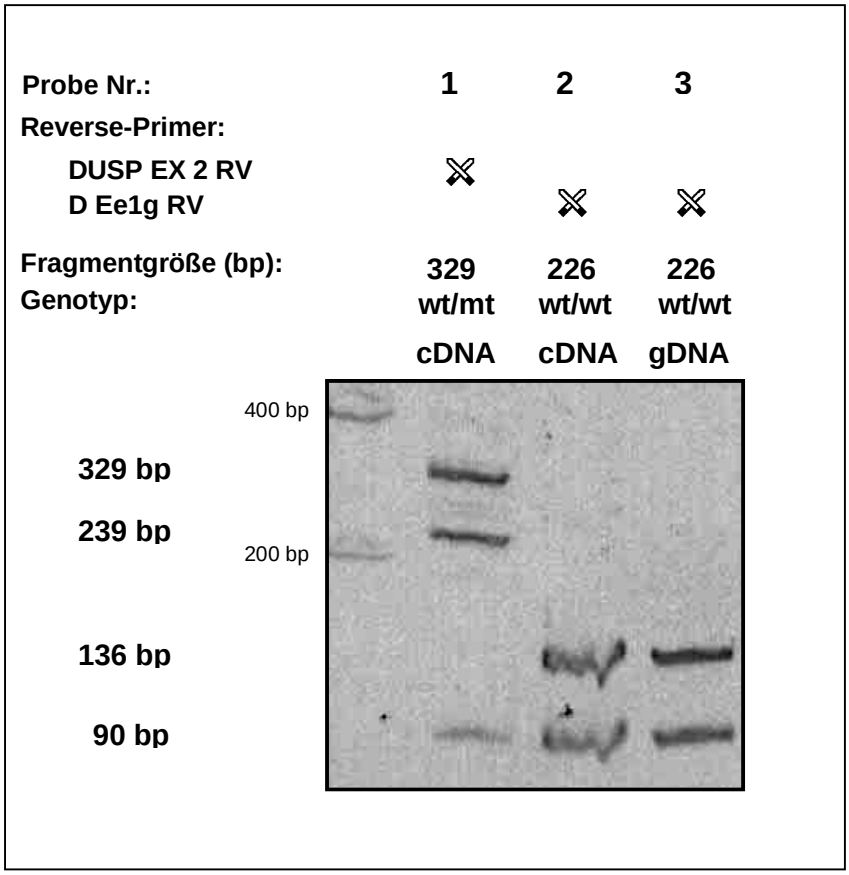


Abb. 21 A: RFLP zur Untersuchung des hVH-5 - Genotyps an Proben aus genomischer DNA und cDNA der Zelllinie MDA-MB 436 mit zwei verschiedenen reverse-Primern für die PCR

Bei der Phosphatase hVH-5 wurde eine PCR-Reaktion mit zwei unterschiedlichen Reverse-Primern durchgeführt. Während unter Verwendung des Oligonukleotids DUSP EX 2 RV ein 329 bp-Fragment entsteht, amplifiziert De1g RV ein kleineres Fragment mit 226 bp. Die zu untersuchende Schnittstelle für das Restriktionsenzym Taq 1 liegt für beide PCR-Fragmente 90 bp vom 5' – Ende der kodierenden Sequenz entfernt. Eine RFLP-Analyse von drei DNA-Proben von MDA-MB 436 führte zu folgenden Ergebnissen (Amplifikation von Proben mit dem Forward-Primer DUSP EX 1 FW, sowie den jeweils angegebenen RV-Oligonukleotiden und anschließender Restriktionsverdau):

Probe 1: cDNA amplifiziert mit Reverse-Primer DUSP EX 2 RV (329 bp-Fragment)
→ Genotyp „WT/MT“

Probe 2: cDNA amplifiziert mit Reverse-Primer De1g RV (226 bp-Fragment)
→ Genotyp „WT/WT“

Probe 3: genomische DNA amplifiziert mit Reverse-Primer De1g RV (226 bp-Fragment)
→ Genotyp „WT/WT“

Diese Resultate der RFLP-Analyse könnten dadurch erklärt werden, dass der neue Reverse-Primer De1g RV möglicherweise das mutierte Allel nicht mehr erkennt.

Als Ursache käme hierfür in Frage, dass in jenem Bereich, in welchem sich der neue RV-Primer am Ende von Exon 1 im hVH-5 - Gen anlagern sollte, weitere Sequenzveränderungen vorhanden sind. Dadurch erkennt jener neue RV-Primer diese Sequenz nicht und kann folglich in der PCR-Reaktion dieses veränderte Gen auch nicht amplifizieren. Aus diesem Grund wird in jenen Proben spezifisch das Wildtypgen amplifiziert, was sich dann in der RFLP-Analyse als Genotyp „WT/WT“ zeigt.

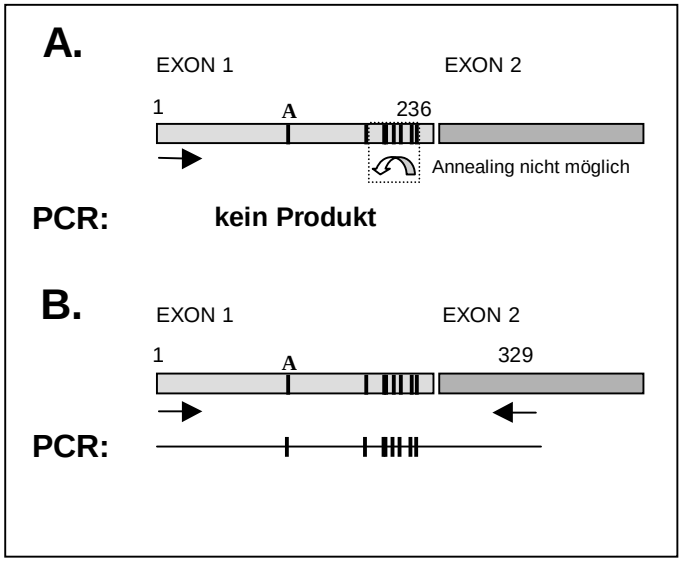


Abb. 21 B: Schematische Darstellung der veränderten Sequenz von hVH-5

Aufgrund der Ergebnisse einer RFLP-Analyse wurde angenommen, dass eine Gensequenz von hVH-5 mit den dargestellten Veränderungen (schematische Vereinfachung: ▌ ▌▐▐▌) existiert.

A.: Die Sequenzveränderungen von hVH-5 am Ende des Exon 1 verhindern ein Anlagern des neuen reverse-Primers De1g RV. Bei einer PCR-Reaktion mit diesem Primer kann das mutierte Gen nicht amplifiziert werden, da dieser RV-Primer die stark veränderte Sequenz im Exon 1 nicht erkennt.

B.: Das Gen mit der veränderten Sequenz kann amplifiziert werden, wenn für die PCR-Reaktion der RV-Primer DUSP EX 2 RV eingesetzt wird (PCR-Fragment 329 bp), da an dessen Anlagerungsstelle in Exon 2 eine Wildtypsequenz vorliegt, die vom Primer erkannt wird.

3.2.4 Sequenzanalyse von klonierten hVH-5 – PCR-Fragmenten

MDA-MB 436 gehört zu den Zelllinien, die im vorhergehenden Teil der Arbeit eine Heteroduplexbildung in der CSGE-Analyse aufwiesen und bei weiteren Untersuchungen ebenfalls Hinweise auf das Vorhandensein von Genveränderungen lieferten. Experimente mit der Zelllinie ZR 75-1 dagegen bestätigten in allen durchgeführten Analysen das Vorhandensein eines unveränderten Wildtyps.

Um eindeutige Sequenzdaten der vorliegenden hVH-5 – Genotypen in diesen Zelllinien zu erhalten, wurde cDNA synthetisiert und die daraus amplifizierten PCR-Produkte (329 bp, siehe 3.1.1) in den Vektor Bluescript II KS ligiert. Nachdem eine Transformation sowie Selektionierung durch Resistenzgene durchgeführt worden war, wurden zehn zufällig ausgewählte Klone sequenziert.

Alle untersuchten Sequenzen von klonierten PCR-Fragmenten der Zelllinie ZR-751 stimmten zu 100% mit der hVH-5 Wildtypsequenz aus der NCBI-Datenbank (Nr. U 27193) überein.

Eine Analyse von PCR-Fragmenten aus MDA-MB 436 zeigte drei mit der Wildtypsequenz identische Klone. Sieben Fragmente jedoch enthielten eine Sequenz, die sich deutlich vom Wildtyp unterschied.

Ein Vergleich dieser Sequenzierergebnisse mit der bereits veröffentlichten Wildtypsequenz von hVH-5 läßt das Vorhandensein von 28 Mutationen im 329 bp langen Fragment erkennen, bei denen es sich um 7 Transversionen, 19 Transitionen und 2 Deletionen in diesem Genabschnitt handelt. Wie bereits vermutet, bestätigte sich auch, dass der in 3.2.3.2 verwendete Reverse-Primer De1g RV (in Abb. 22 mit gelber Farbe gekennzeichnet) nicht genug Komplementarität mit dieser Sequenz aufweist, um dort „primen“ zu können, da in diesem Genbereich allein sechs Mutationen liegen.

Dadurch, dass bei dieser PCR-Reaktion (329 bp – Fragment) sowohl der Wildtyp als auch die veränderte Gensequenz amplifiziert wurden, führte dies bei der Auswertung durch die Sequenziermaschine dazu, dass beide Nukleotidsequenzen übereinander geschrieben wurden. Darüber hinaus kommt eine Rasterverschiebung innerhalb dieser Sequenzüberlagerung durch Deletionen der Nukleotide 81 und 82 in der veränderten Sequenz im Vergleich zum hVH-5 Wildtyp zustande.

Die in Abb. 18a dargestellte vermeintliche Adenin-Insertion an der Basenpaarstelle 91 war somit auf einen Überlagerungsartefakt zurückzuführen und nicht vorhanden.

Das CSGE-Gel hatte durch den Heteroduplex nicht diese Insertion, sondern eine zweite, hVH-5 – ähnliche Sequenz angezeigt, deren Primärsturktur in Abb. 22 dargestellt ist.

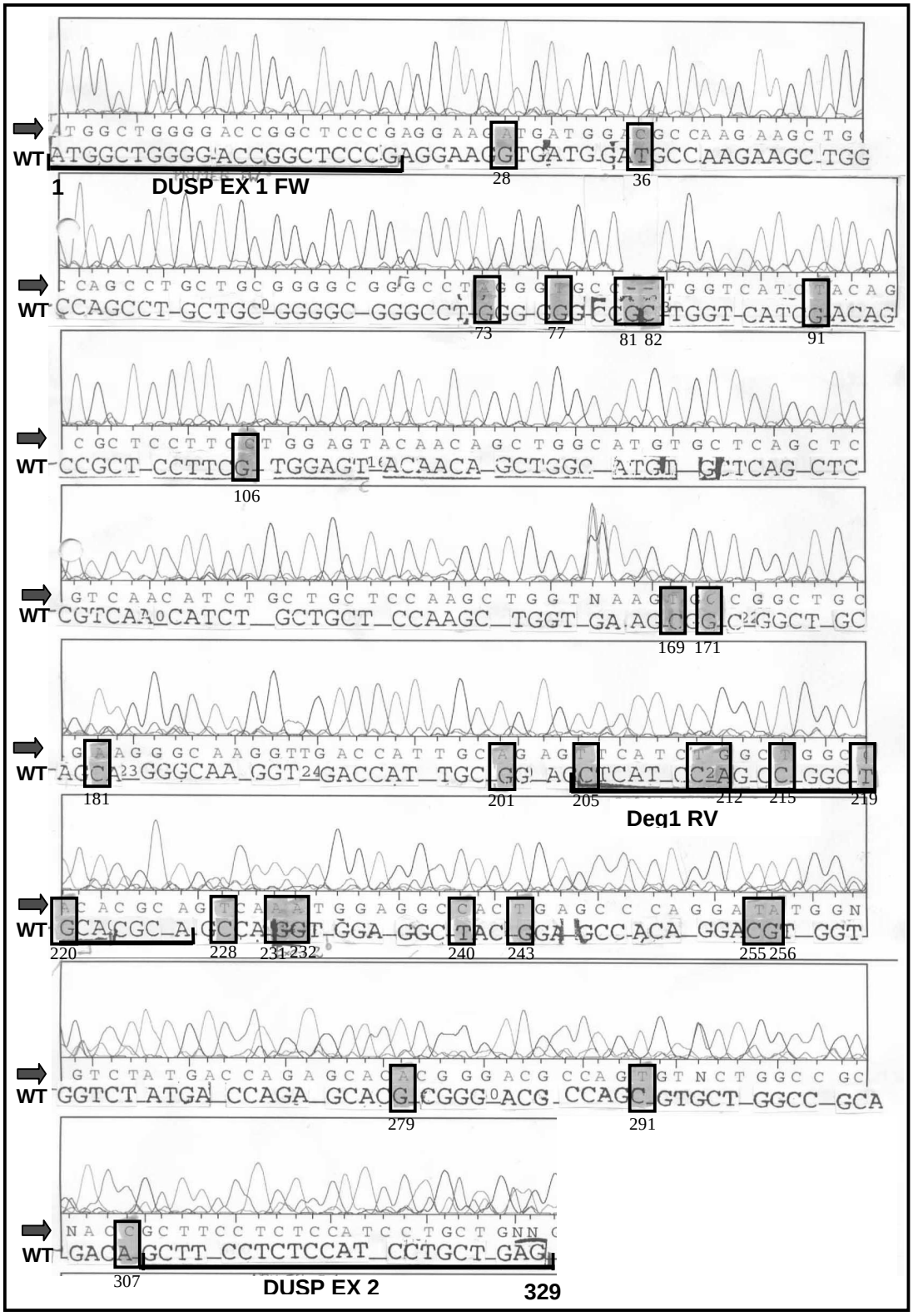


Abb. 22: Allel-spezifische Sequenzanalyse von hVH-5

Aus cDNA der Brustkrebszelllinie MDA-MB 436 wurde ein 329 bp großes Fragment von hVH-5 mittels PCR amplifiziert, in den Vektor BS II KS kloniert und anschließend sequenziert. Ein Vergleich mit der Wildtypsequenz dieses Gens (NCBI-Datenbank Nr. U27193) zeigte 7 Transversionen, 19 Transitionen und 2 Deletionen. Die analysierte Sequenz des PCR-Fragments ist durch einen Pfeil am linken Rand gekennzeichnet. Darunter ist zum Vergleich die Wildtypsequenz (WT) der hVH-5 Phosphatase dargestellt.

3.2.5 Datenbankrecherche zur Sequenzlokalisation im Genom

Die in Kapitel 3.2.4 beschriebene Sequenz, welche nach einer PCR-Amplifikation (329 bp – Fragment) subkloniert und sequenziert wurde, unterscheidet sich durch 28 Mutationen vom hVH-5 – Wildtypgen. Hierbei ist es von Interesse, ob es sich bei dieser Gensequenz um eine Veränderung des hVH-5 – Wildtyps (Chromosom 11p15.5) handelt oder die Sequenz als eigenständiges bisher noch nicht beschriebenes Gen unabhängig von der hVH-5 – Wildtypsequenz im humanen Genom existiert. Um nähere Informationen dazu zu erhalten, wurde eine Datenbankrecherche im Internet durchgeführt (ENSEMBL Datenbank: www.ensembl.org/Homo-sapiens/blastview und NCBI Datenbank: www.ncbi.nlm.nih.gov /cgi-bin/Entrez/hum_srch).

Ziel dieser Recherche war es festzustellen, ob im humanen Genom eine Homologie mit der in dieser Arbeit identifizierten Gensequenz besteht. Dazu wurde die 327 bp lange Nukleotidsequenz in die Blast-Datenbank des „Ensembl Human Genome Server“ eingegeben und bekannten Ergebnissen aus der Sequenzierung des humanen Genoms verglichen.

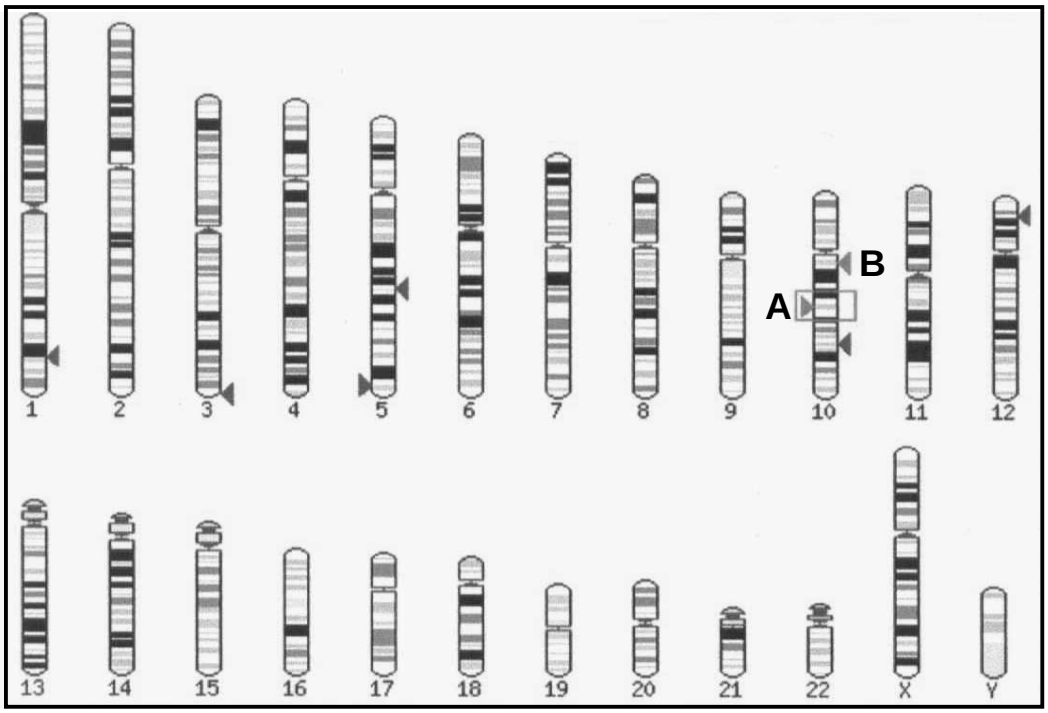


Abb. 23: Homologien der in Kap. 3.2.4 identifizierten Sequenz mit Nukleotidsequenzen im humanen Genom (Datenbankrecherche; Ensembl Human Genome Server)

Gekennzeichnete Chromosomenabschnitte zeigen Ähnlichkeiten mit der untersuchten Gensequenz. Die 327 bp lange Sequenz wurde mit einer Übereinstimmung von 100% auf dem Chromosomenabschnitt 10q22.2 lokalisiert und durch einen Kasten und Pfeil A markiert. Ein zweiter Homologiebereich (Homologie von 92% auf Chromosom 10q11.22, Pfeil B) konnte ebenfalls festgestellt werden.

Es zeigte sich eine Homologie von 100% auf einem Genbereich des humanen Chromosoms Nr.10: Der Abschnitt 10q22.2 stimmt mit der gesuchten Sequenz überein. Chromosom 10q11.22 hingegen enthält eine Nukleotidsequenz, die zu 92% mit der hVH-5 ähnlichen Sequenz identisch ist.

Weiterhin konnten die „contigs“ (d.h. in „contiguous overlapping arrangements“ enthaltenen Sequenzinformationen des humanen Genoms) in diesen chromosomalen Bereichen mittels NCBI-Datenbank bestimmt werden:

Chromosom 10q22.2:	Contig NT_008583
Chromosom 10q11.2	Contig NT_031847.5

Unter der Kenntnis dieser Contig-Nummern wurde ein Zugriff auf (durch das HUGO-Projekt) bekannte Nukleotidsequenzabschnitte des menschlichen Genoms ermöglicht. Somit konnte auch auf Nukleotidebene ein Vergleich bestimmter Chromosomenabschnitte mit der zu untersuchenden 327 bp – Sequenz durchgeführt werden.

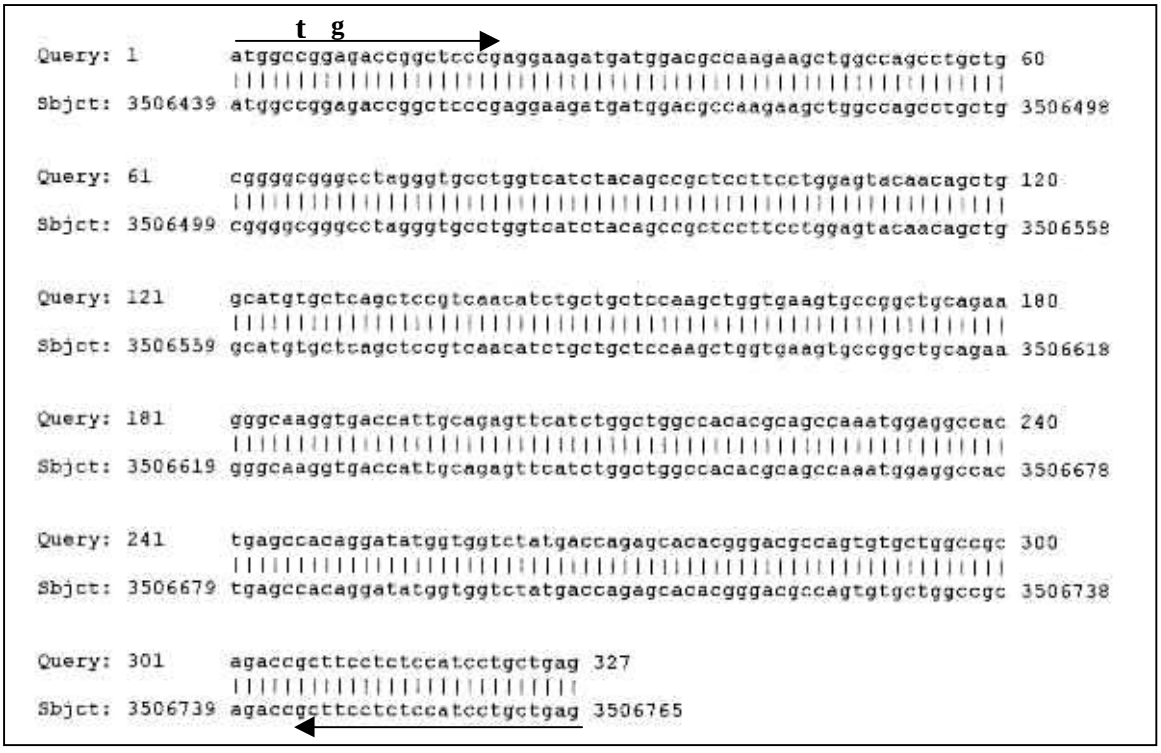


Abb. 24: Alignment der veränderten hVH-5 Sequenz mit dem Contig NT_024037.12 auf Chromosom 10 (Ensembl Human Genome Server)

Der aufgeführte Contig trägt die gesuchte Sequenz mit einer Übereinstimmung der Nukleotide zu 100%. Dies bestätigte die Lokalisation der Nukleotidsequenz auf Chromosom 10q22.2. Die Länge der zur Amplifikation verwendeten Primer ist durch einen schwarzen Pfeil am 5’ – und 3’ Ende der Sequenz markiert. Durch den forward-Primer hervorgerufene Fehlpaarungen an den Nukleotidstellen sechs und neun (c→t; a→g) sind oberhalb des Alignments angegeben und müssen bei der Beurteilung der Sequenzübereinstimmung mit dem Genom außer Acht gelassen werden (siehe Text).

Die beiden nicht mit diesem chromosomalen Lokus übereinstimmenden Basen an zwei Nukleotidpositionen innerhalb der Lage des Primers am 5’ Ende sind durch die PCR-Reaktion erklärbar. Mit dem 21 bp langen Oligonukleotid DUSP EX 1 FW ist die Nukleotidfolge der ersten 21 Basen festgelegt. Fehler in diesem Bereich kommen wohl dadurch zustande, dass bei einer Übereinstimmung von 19 Basenpaaren trotzdem eine Anlagerung an zu amplifizierende Sequenzbereiche erfolgen kann und in anschließenden Syntheseschritten die vorgegebene Nukleotidsequenz des Primers amplifiziert wird. Folglich müssten korrekterweise bei einem Alignment die Anfangs- und Endbereiche eines durch Amplifikation entstandenen PCR-Fragmentes, in denen sich die Oligonukleotide anlagern, außer Acht gelassen werden (siehe Abb. 24).

3.3 DAS PSEUDOGEN VON HVH-5

Gene, deren Sequenzen eine große Homologie zu funktionellen Genen aufweisen und welche selbst keine oder bisher unbekannte Funktionen besitzen, werden Pseudogene (PGs) genannt. Pseudogene sind häufig durch das Symbol ψ gekennzeichnet. Sie entstehen u.a. bei der Entwicklung von Genfamilien und entsprechen über weite Bereiche vollwertigen Genen. Im Gegensatz zu diesen werden sie aber in der Regel weder transkribiert noch translatiert – sind daher inaktiv. Dennoch können solche Gene im Sinne einer Weiterentwicklung modifiziert werden, um wieder transkribiert und zu einem veränderten Protein translatiert zu werden (Mighell et al., 2000).

3.3.1 Klassifizierung des Pseudogens der Phosphatase hVH-5

Allgemein kann zwischen zwei verschiedenen Arten von Pseudogenen unterschieden werden. Während konventionelle Pseudogene wie ihnen verwandte, funktionell aktive Gene eine Exon – Intron Struktur aufweisen und sich von jenen lediglich durch eine große Anzahl von Mutationen unterscheiden, bestehen prozessierte Pseudogene aus aneinandergereihten Exonsequenzen.

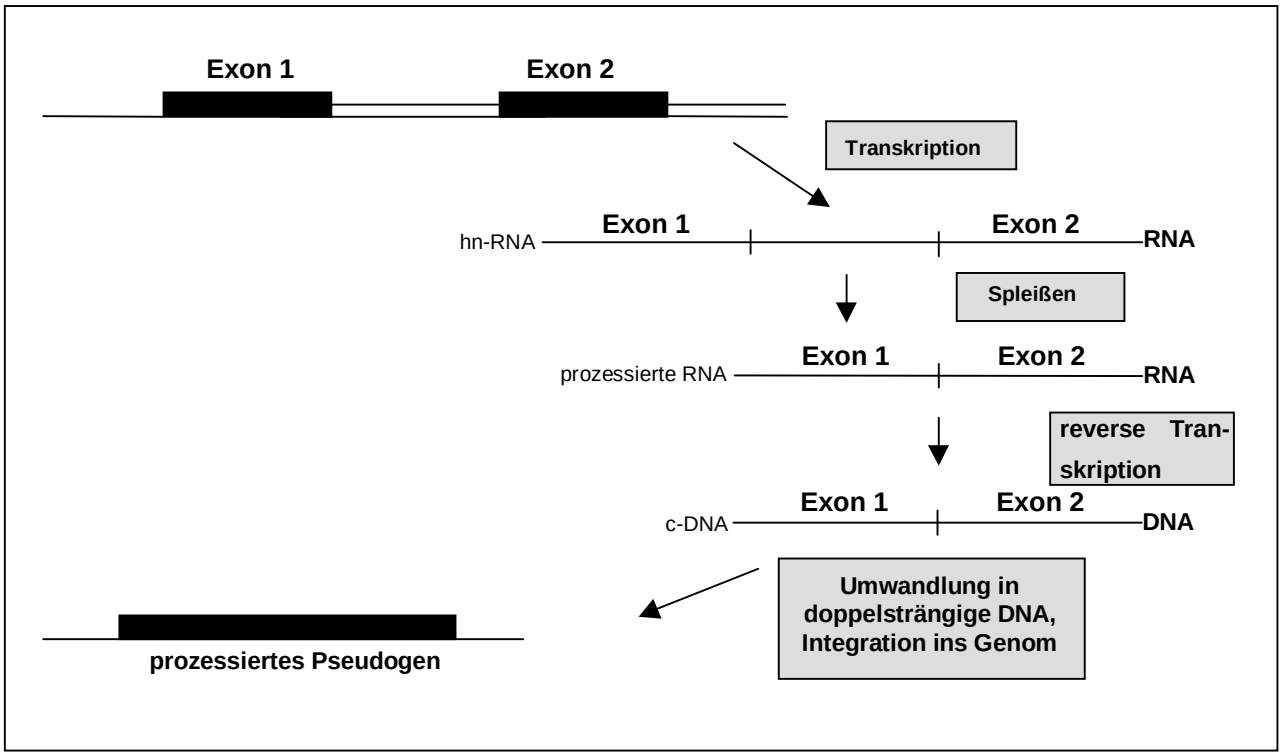


Abb. 25: Entstehungsmechanismus von prozessierten Pseudogenen
Nach Umschrift der genomischen DNA in hn-RNA und deren posttranskriptionaler Modifikation wird die RNA durch reverse Transkription in DNA umgeschrieben und ins Genom integriert.

Vergleicht man die Sequenz (Kap. 2.4.3) mit dem Wildtyp von hVH-5 im Genom, so fällt auf, dass neben dem Vorhandensein zahlreicher Mutationen das zwischen Exon 1 und 2 gelegene Intron fehlt (Abb.26). Das hier vorliegende Gen ist somit nicht einfach eine mutierte Version des ursprünglichen hVH-5 Gens, sondern eine DNA-Kopie der mRNA, die vom Wildtyp stammt. Gene, die auf diese Art entstanden sind und anschließend wieder in das Genom integriert wurden, werden prozessierte Pseudogene genannt. Diese entsprechen der posttranskriptionellen RNA nach deren Umschrift in cDNA und enthalten nicht funktionsfähige Exon-Sequenzen eines aktiven Gens, die oft deshalb nicht funktionsfähig sind, weil sie keine aktiven Promotoren besitzen.

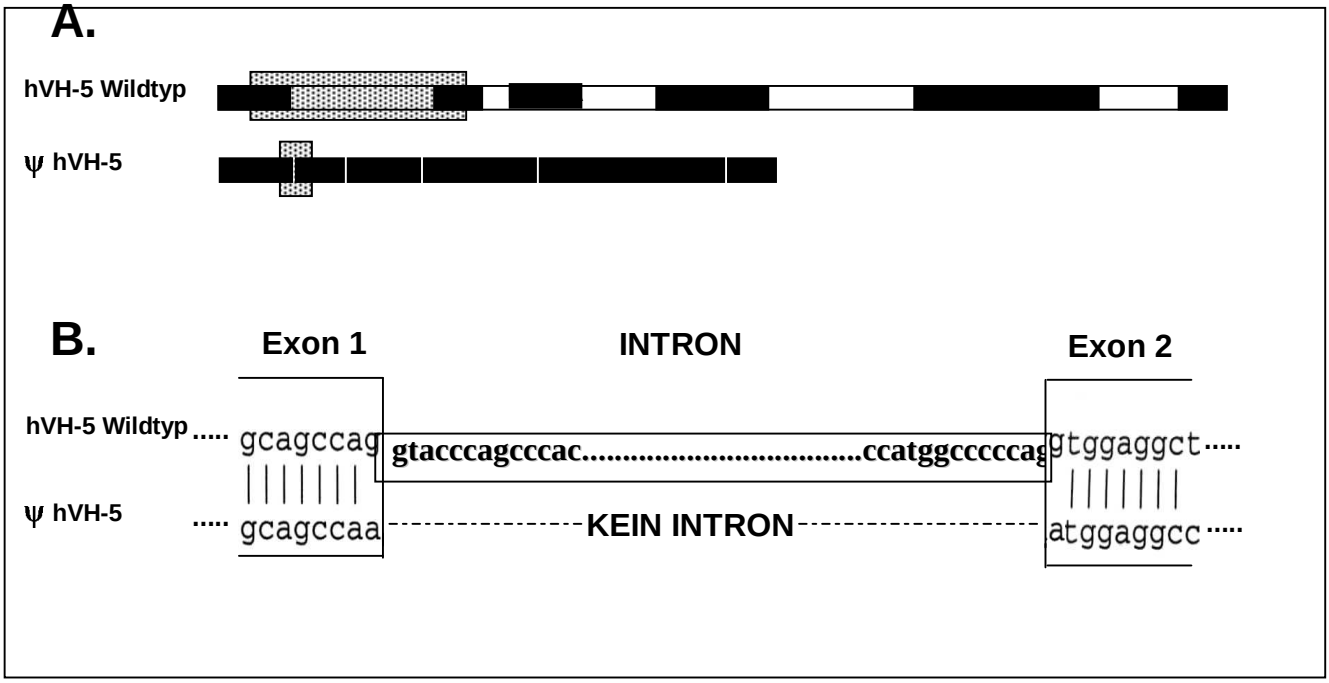


Abb. 26: Vergleich der Sequenzen des hVH-5 Wildtyps und des prozessierten Pseudogens von hVH-5 im Genom

A. schematische Darstellung der Exon-Intron – Struktur
Bei gleicher Exonlänge ist ψhVH-5 durch das Fehlen von Introns gekennzeichnet.
Zeichenerklärung: schwarzes Kästchen: Exon; weißes Kästchen: Intron;
▒ : in B. vergrößert)

B. Alignment auf Nukleotidebene
Ausschnittsvergrößerung der in A. mit ▒ markierten Bereiche. Durch Klonierung und Sequenzierung (Kap. 3.2.4) konnte gezeigt werden, dass das Pseudogen keine Intronsequenz trägt. Vergleichende Darstellung des Aufbaus dieser Gene im Grenzbereich zwischen den ersten beiden Exons.

3.3.2 ψhVH-5 wird in vivo transkribiert

Obwohl prozessierte Pseudogene durch das Fehlen von Promotoren sehr oft inaktiv sind, konnte eine in vivo - Transkription für das hVH-5 Pseudogen durch Amplifikation in cDNA nachgewiesen werden. Um dies zu zeigen, wurde mit demselben Primerpaar eine PCR unter gleichen Bedingungen an genomischer DNA und cDNA durchgeführt und die dabei erhaltenen Produktgrößen verglichen.

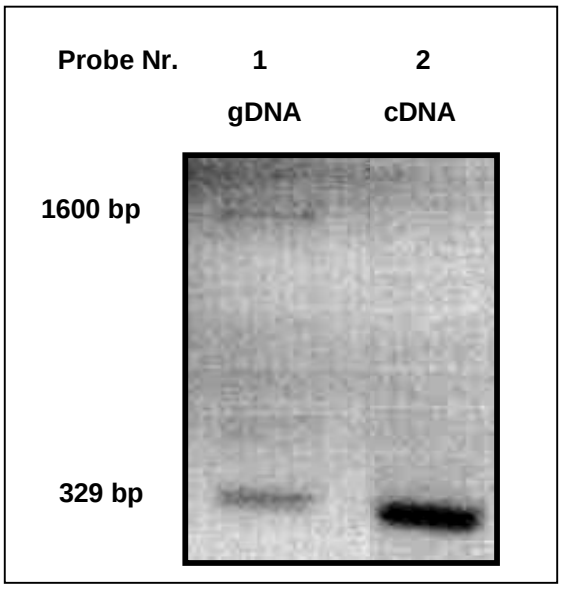


Abb. 27: Amplifikation von hVH-5 und ψhVH-5 an gDNA und cDNA (Bedingungen Kap. 3.2.4)
Die beiden Produkte in Probe Nr. 1 lassen sich ψhVH-5 und dem hVH-5 Wildtyp im Genom zuordnen. Dass die PCR-Bande von Probe Nr. 2 kontaminationsfrei dessen Transkripten entspricht, wird erst durch Abb. 28 bestätigt.

Mit den in 3.2.1 beschriebenen Oligonukleotiden DUSP EX 1 FW und DUSP EX 2 RV kann sowohl der hVH-5 Wildtyp als auch das PG dieser Phosphatase amplifiziert werden. Durch das Anlagern der Primer an zwei aneinander grenzenden Exonsequenzen (siehe Abb. 16) ist es möglich, anhand der Größe des PCR-Produkts festzustellen, ob das amplifizierte Fragment ein Intron (1,3 kb) trägt. In diesem Fall ergibt sich eine Produktgröße von ca. 1,6 kb, während ein 329 bp Produkt auf das Fehlen des Introns zwischen Exon eins und zwei hinweist.

Unter Verwendung des Protokolles 2.1.9 wurde an den beiden DNA-Proben (Abb. 27; Probe 1 und 2) der Brustkrebszelllinie BT 474 eine PCR –Reaktion mit den oben beschriebenen Oligonukleotiden ausgeführt.

Eine an zellulärer DNA durchgeführte Amplifikation führte zu zwei Produkten: Die Nukleinsäurebande von 1,6 kb stimmt mit der Größe des hVH-5 Wildtyps in genomischer DNA überein und verdeutlicht dessen Exon-Intron-Struktur. Weiterhin konnte die darunter liegende Bande (Höhe 329 bp) dem prozessierten und deshalb „intronfreien“ PG von hVH-5 zugeordnet werden.

Die gleiche Amplifikationsreaktion wurde an cDNA durchgeführt. Im 2%igen Agarosegel ließ sich ein Fragment mit der Länge von ca. 330 bp in nahezu doppelter Intensität der Probe Nr.1 (siehe Abb. 27) nachweisen. Dieses entspricht, wie sich bereits durch Klonierungs- und

Sequenzierungsexperimente herausgestellt hatte (Kap. 3.2.4), sowohl dem 327 bp großen hVH-5 Pseudogen als auch einer 329 bp langen Nukleinsäureumschrift des Wildtyps von hVH-5 ohne Intron. Daher liegt nahe, dass diese beiden Fragmente Transkripte genomischer DNA darstellen. Jedoch konnte dadurch nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass die hierfür verwendete cDNA frei von genomische DNA ist, was fälschlicherweise zur Annahme führen würde, dass ψhVH-5 transkribiert wird.

Aus diesem Grund wurde die cDNA der Brustkrebszelllinie BT 474 repräsentativ für alle cDNA–Proben, mit denen in dieser Arbeit Experimente ausgeführt wurden, getestet. Hierbei erwies es sich als sinnvoll, nur eine Probe zu untersuchen, da bei der Extraktion von mRNA und deren reversen Transkription in cDNA alle Proben gleich behandelt wurden.

Für nachfolgenden Test wurden wiederum mit den oben beschriebenen DNA-Proben der Zelllinie BT 474 eine PCR-Reaktion durchgeführt. Als Kontaminationskontrolle wurde eine Amplifikation des HER 2 - Gens mit den Oligonukleotiden HER 2 FW/RV aus folgendem Grund gewählt: Es war bekannt, dass durch diese PCR im Genom genau eine Sequenz von 329 bp mit einem 138 bp langen Intron des HER 2 Gens amplifiziert wird. Wie bei vorangegangenen PCR-Reaktionen an hVH-5 Genen liegen auch hier die Primer an aneinander grenzenden Exonsequenzen. Bei einer kontaminationsfreien Extraktion von RNA und deren Umschrift muss diese PCR ein eindeutiges Produkt von 192 bp aufweisen.

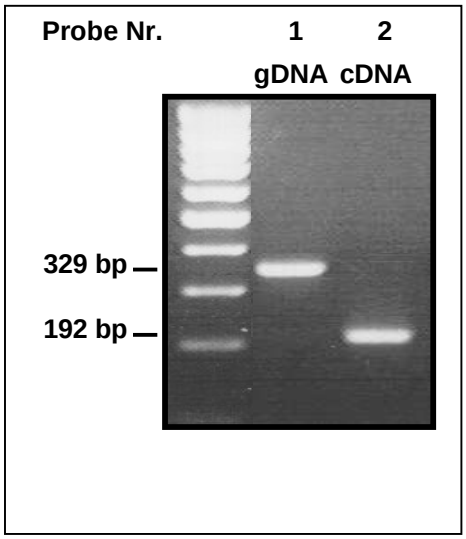


Abb. 28: Amplifikation des HER-2 Gens zur Kontaminationskontrolle von cDNA
Das Produkt von Probe Nr. 1(gDNA) umfasst ein Fragment von 329 bp Länge.
Die Bande in Höhe von 192 bp stellt das intronlose PCR-Produkt aus nicht mit genomischer DNA kontaminierter cDNA dar.

Die durchgeführten PCR-Reaktionen ließen sowohl bei genomischer DNA als auch an cDNA jeweils das Vorhandensein genau eines Produktes in der oben angegebenen Größe erkennen (Abb. 28) und ermöglichten somit die Aussage, dass die in der Arbeit verwendete cDNA nicht kontaminiert war.

3.3.3 Die Nukleinsäuresequenz des hVH-5 Pseudogens

3.3.3.1 Vergleich von hVH-5 – Gensequenzen im Genom

Aus vorangegangenen Ergebnissen und der in Kap. 3.2.5 beschriebenen Recherche in Gendatenbanken war die exakte Lokalisation des Pseudogens auf Chromosom 10q22.2 und die dazugehörige Sequenz bekannt. Die Sequenzen für genomische DNA und mRNA wurden in die NCBI Datenbank aufgenommen und erhielten folgende Accession Numbers: AY661564, bzw. AY661565.

Da die Sequenzdaten des humanen Genoms durch das HUGO-Projekt nahezu vollständig vorliegen, konnte die Sequenz unter Zuhilfenahme dieser Daten in 5' – und 3' – Richtung beliebig erweitert werden. Nachfolgende Untersuchungen in Internetdatenbanken zeigten, dass es sich bei dem zweiten Contig NT_031847.5 (Chromosom 10q11.2) um ein weiteres prozessiertes Pseudogen handelt, dessen Existenz bereits in der Arbeit von Nesbit et al., 1997 erwähnt wurde.

Um aus den Daten weitere Informationen über die „hVH-5 – Genfamilie" zu gewinnen, wurde der hVH-5 – Wildtyp mit der Sequenz des analogen Mausgens (M3/6; NCBI Accession Number NM_008748) dieser Phosphatase sowie dem Pseudogen verglichen.

	BASEN - SUBSTITUTIONEN								
	KODON								
Gen	**1**	**2**	**3**	**Silent**	**Missense**	**Gesamt**	**Deletion**	**Insertion**	**Gesamt**
ψhVH-5	59	27	72	68	**90**	**158**	63	5	226
M 3/6	38	28	194	192	**68**	**260**	9	123	392

Abb. 29: **Unterschiede von Mitgliedern der hVH-5 Genfamilie zum humanen hVH-5 Wildtypgen (kodierende Region der NCBI-Sequenz Nr. U 27193)**

Im hellgrauen Bereich sind die Basensubstitutionen an der jeweils angegebenen Position im Kodon aufgelistet. Von besonderer Relevanz für spätere Berechnungen zur Evolutionsentwicklung sind Substitutionen, welche zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz führen: Missense-Substitutionen der jeweiligen Sequenzen sind mit einem dunkelgrauen Kasten markiert.

Ein Vergleich der Gene zeigt, dass sich im Mausgen die meisten Basenabweichungen befinden. Entgegen der Erwartung können bei diesem Gen aber am wenigsten „missense“-Substitutionen detektiert werden, was sich dadurch erklären lässt, dass die größte Anzahl von Genveränderungen jeweils an der dritten Position eines Kodons lokalisiert ist.

Nach Lin (1995) kann aus der Anzahl der ermittelten Missense-Substitutionen und der Länge der kodierenden Sequenz eines Gens im Vergleich zu Wildtyp dessen evolutionsgeschichtliche Entstehungszeit ermittelt werden. Durch diese Methode lässt sich für ψhVH-5 eine Entstehungszeit vor ca. 6,84 Mio. Jahren, für das Mausgen vor 5,17 Mio. Jahren errechnen.

3.3.3.2 Transkription von ψhVH-5 in Normalgeweben

Aus Kapitel 3.2.1 war bereits bekannt, dass ψhVH-5 in 11 von 14 Brustkrebszelllinien transkribiert wird. Um das Expressionsmuster des ψhVH-5 Pseudogens in Normalgeweben zu bestimmen, wurde die Polymerase-Kettenreaktion angewendet. Dazu wurde dieselbe cDNA benutzt, welche bereits in Kapitel 3.1.1 hergestellt worden war.

Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide Pseudo FW und Pseudo RV (siehe 2.1.9) wurden so gelegt, dass sie im ersten Exon spezifisch nur an die Nukleotidsequenz des ψhVH-5 annealen können und ein Fragment von 202 bp ergeben.

Das Pseudogen ψhVH-5 wird in allen untersuchten Normalgeweben transkribiert. Während die Expression in Leber und Milz geringer ausgeprägt ist, zeigt sich in allen anderen untersuchten Proben ein etwa gleicher Spiegel.

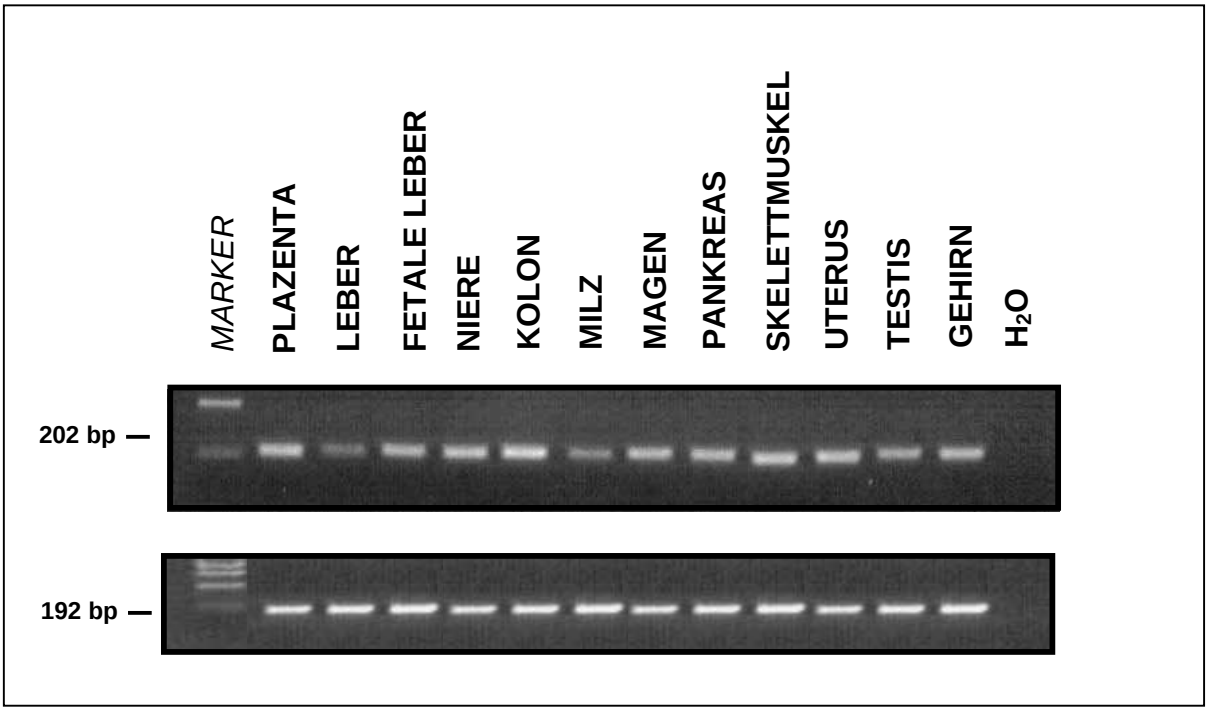


Abb. 30: PCR-Expressionsanalyse von ψ hVH-5

oben: Expression des hVH-5 – Pseudogens in Normalgeweben (Fragment 202 bp; oben)

unten: Expression des "Housekeeping" - Gens EF 1a (192 bp).

3.3.4 Die Proteinsequenz von ψhVH-5

Bei bekannter DNA-Sequenz eines Gens kann durch den bestehenden genetischen Code eine Übersetzung in Aminosäuren erfolgen und somit der Aufbau und die Länge des kodierenden Proteins bestimmt werden. Entscheidend hierfür ist jedoch, welcher Leserahmen bei der Translation in der Zelle gewählt wird.

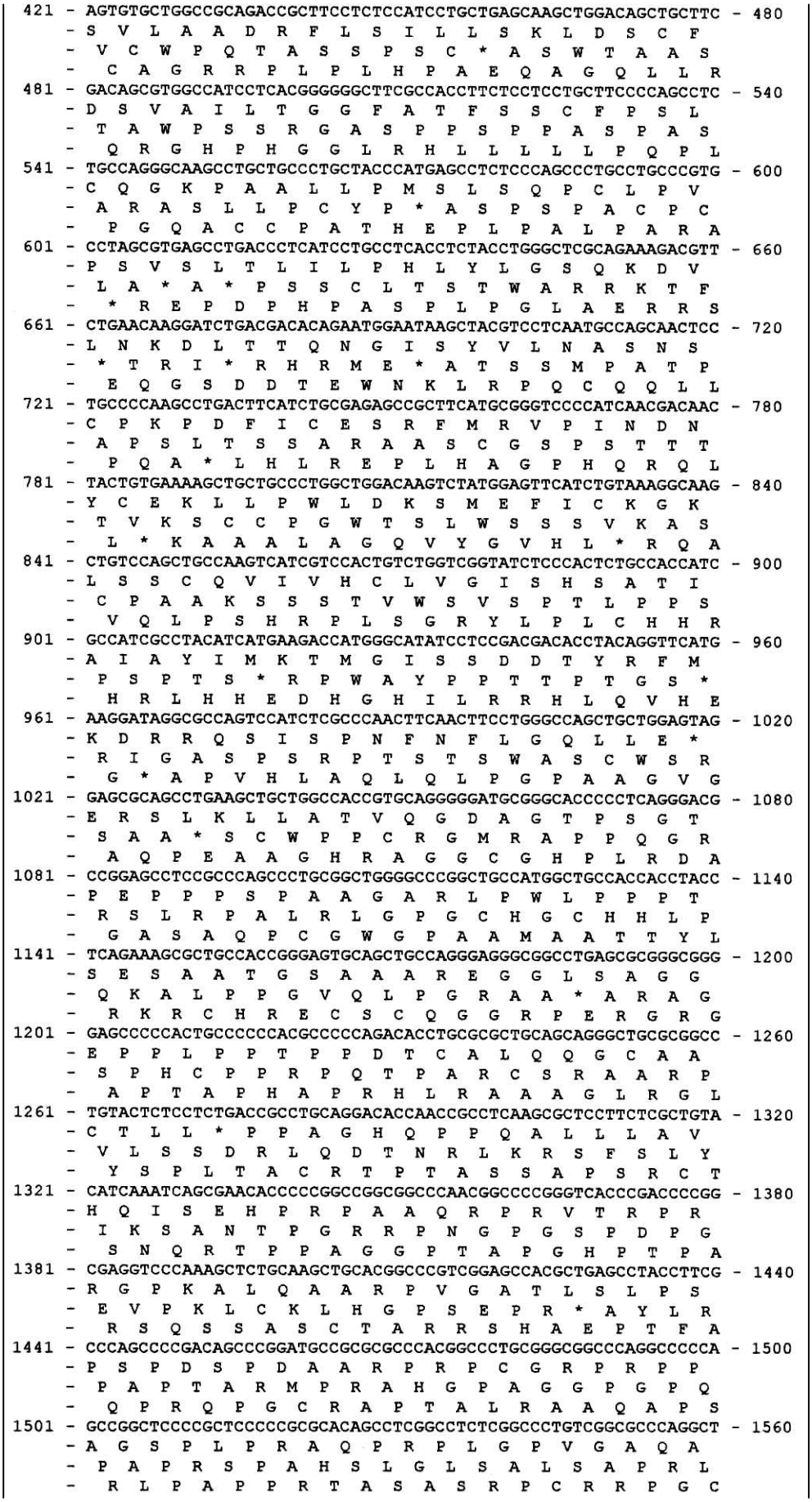
3.3.4.1 Bestimmung des Leserahmens

Für die Wahl des richtigen Leserahmens, der bei einer eventuellen Translation dieses Pseudogens für ein Peptid kodiert, mussten folgende Kriterien und Hinweise beachtet werden:

i. Keiner der drei Leserahmen kodiert für ein vollständiges Protein, da ein oder mehrere Stoppkodons in der Nukleinsäuresequenz jedes Leserahmens zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führen und durch vorherige PCR-Analysen Splicevarianten ausgeschlossen werden können.
ii. Das hVH-5 Wildtypprotein würde sich bei einer nicht mutierten Sequenz aus dem dritten Leserahmen ergeben.
iii. Das "ATG" im dritten Leserahmen, mit welchem das Wildtypprotein ebenfalls beginnt, erfüllt auch beim Pseudogen die Kriterien eines Startkodons (Kozak, 1984).

Die oben genannte Gründe sprechen für die Wahl des 3. Leserahmens bei der Übersetzung der Nukleinsäuresequenz in das entsprechende Protein, was im folgenden dargestellt ist.

```
  1 - CGCCCCCCGAGGCGAGCGCTAACGAGGTCCGGCACCATGTGCTAGGTCACTCCCAGTGCA - 60
    - R  P  P  P  R  R  A  L  T  R  S  G  T  M  C  *  V  T  P  S  A
    -  A  P  R  G  E  R  *  R  G  P  A  P  C  A  R  S  L  P  V  Q
    -   P  P  E  A  S  A  N  E  V  R  H  H  V  L  G  H  S  Q  C  K
 61 - AGGCCACACTTGGGCCATCCGAGCAACCCCTCCTCACGTCAGGGGTCACCCTCCCCACCA - 120
    - R  P  H  L  G  H  P  S  N  P  S  S  R  Q  G  S  P  S  P  P
    -  G  H  T  W  A  I  R  A  T  P  P  H  V  R  G  H  P  P  H  H
    -   A  T  L  G  P  S  E  Q  P  L  L  T  S  G  V  T  L  P  T  T
121 - CCCATTGCCCCACCATGGCCGGAGACCGGCTCCCGAGGAAGATGATGGACGCCAAGAAGC - 180
    - P  I  A  P  P  W  P  E  T  G  S  R  G  R  *  W  T  P  R  S
    -  P  L  P  H  H  G  R  R  R  P  A  P  E  E  D  D  G  R  Q  E  A
    -   H  C  P  T  M  A  G  D  R  L  P  R  K  M  M  D  A  K  K  L
181 - TGGCCAGCCTGCTGCGGGGCGGGCCTAGGGTGCCTGGTCATCTACAGCCGCTCCTTCCTG - 240
    - W  P  A  C  C  G  A  G  L  G  C  L  V  I  Y  S  R  S  F  L
    -  G  Q  P  A  A  G  R  A  *  G  A  W  S  S  T  A  A  P  S  W
    -  A  S  L  L  R  G  G  P  R  V  P  G  H  L  Q  P  L  L  P  G
241 - GAGTACAACAGCTGGCATGTGCTCAGCTCCGTCAACATCTGCTGCTCCAAGCTGGTGAAG - 300
    - E  Y  N  S  W  H  V  L  S  S  V  N  I  C  C  S  K  L  V  K
    -  S  T  T  A  G  M  C  S  A  P  S  T  S  A  A  P  S  W  *  S
    -  V  Q  Q  L  A  C  A  Q  L  R  Q  H  L  L  L  Q  A  G  E  V
301 - TGCCGGCTGCAGAAGGGCAAGGTGACCATTGCAGAGTTCATCTGGCTGGCCACACGCAGC - 360
    - C  R  L  Q  K  G  K  V  T  I  A  E  F  I  W  L  A  T  R  S
    -  A  G  C  R  R  A  R  *  P  L  Q  S  S  S  G  W  P  H  A  A
    -  P  A  A  E  G  Q  G  D  H  C  R  V  H  L  A  G  H  T  Q  P
361 - CAAATGGAGGCCACTGAGCCACAGGATATGGTGGTCTATGACCAGAGCACACGGGACGCC - 420
    - Q  M  E  A  T  E  P  Q  D  M  V  V  Y  D  Q  S  T  R  D  A
    -  K  W  R  P  L  S  H  R  I  W  W  S  M  T  R  A  H  G  T  P
    -  N  G  G  H  *  A  T  G  Y  G  G  L  *  P  E  H  T  G  R  Q
```


421 - AGTGTGCTGGCCGCAGACCGCTTCCTCTCCATCCTGCTGAGCAAGCTGGACAGCTGCTTC - 480
- S V L A A D R F L S I L L S K L D S C F
- V C W P Q T A S S P S C * A S W T A A S
- C A G R R P L P L H P A E Q A G Q L L R
481 - GACAGCGTGGCCATCCTCACGGGGGGCTTCGCCACCTTCTCCTCCTGCTTCCCCAGCCTC - 540
- D S V A I L T G G F A T F S S C F P S L
- T A W P S S R G A S P P S P P A S P A S
- Q R G H P H G G L R H L L L L L P Q P L
541 - TGCCAGGGCAAGCCTGCTGCCCTGCTACCCATGAGCCTCTCCCAGCCCTGCCTGCCCGTG - 600
- C Q G K P A A L L P M S L S Q P C L P V
- A R A S L L P C Y P * A S P S P A C P C
- P G Q A C C P A T H E P L P A L P A R A
601 - CCTAGCGTGAGCCTGACCCTCATCCTGCCTCACCTCTACCTGGGCTCGCAGAAAGACGTT - 660
- P S V S L T L I L P H L Y L G S Q K D V
- L A * A * P S S C L T S T W A R R K T F
- * R E P D P H P A S P L P G L A E R R S
661 - CTGAACAAGGATCTGACGACACAGAATGGAATAAGCTACGTCCTCAATGCCAGCAACTCC - 720
- L N K D L T T Q N G I S Y V L N A S N S
- * T R I * R H R M E * A T S S M P A T P
- E Q G S D D T E W N K L R P Q C Q Q L L
721 - TGCCCCAAGCCTGACTTCATCTGCGAGAGCCGCTTCATGCGGGTCCCCATCAACGACAAC - 780
- C P K P D F I C E S R F M R V P I N D N
- A P S L T S S A R A A S C G S P S T T T
- P Q A * L H L R E P L H A G P H Q R Q L
781 - TACTGTGAAAAGCTGCTGCCCTGGCTGGACAAGTCTATGGAGTTCATCTGTAAAGGCAAG - 840
- Y C E K L L P W L D K S M E F I C K G K
- T V K S C C P G W T S L W S S S V K A S
- L * K A A A L A G Q V Y G V H L * R Q A
841 - CTGTCCAGCTGCCAAGTCATCGTCCACTGTCTGGTCGGTATCTCCCACTCTGCCACCATC - 900
- L S S C Q V I V H C L V G I S H S A T I
- C P A A K S S S T V W S V S P T L P P S
- V Q L P S H R P L S G R Y L P L C H H R
901 - GCCATCGCCTACATCATGAAGACCATGGGCATATCCTCCGACGACACCTACAGGTTCATG - 960
- A I A Y I M K T M G I S S D D T Y R F M
- P S P T S * R P W A Y P P T T P T G S *
- H R L H H E D H G H I L R R H L Q V H E
961 - AAGGATAGGCGCCAGTCCATCTCGCCCAACTTCAACTTCCTGGGCCAGCTGCTGGAGTAG - 1020
- K D R R Q S I S P N F N F L G Q L L E *
- R I G A S P S R P T S T S W A S C W S R
- G * A P V H L A Q L Q L P G P A A G V G
1021 - GAGCGCAGCCTGAAGCTGCTGGCCACCGTGCAGGGGGATGCGGGCACCCCCTCAGGGACG - 1080
- E R S L K L L A T V Q G D A G T P S G T
- S A A * S C W P P C R G M R A P P Q G R
- A Q P E A A G H R A G G C G H P L R D A
1081 - CCGGAGCCTCCGCCCAGCCCTGCGGCTGGGGCCCGGCTGCCATGGCTGCCACCACCTACC - 1140
- P E P P P S P A A G A R L P W L P P P T
- R S L R P A L R L G P G C H G C H H L P
- G A S A Q P C G W G P A A M A A T T Y L
1141 - TCAGAAAGCGCTGCCACCGGGAGTGCAGCTGCCAGGGAGGGCGGCCTGAGCGCGGGCGGG - 1200
- S E S A A T G S A A A R E G G L S A G G
- Q K A L P P G V Q L P G R A A * A R A G
- R K R C H R E C S C Q G G R P E R G R G
1201 - GAGCCCCCACTGCCCCCCACGCCCCCAGACACCTGCGCGCTGCAGCAGGGCTGCGCGGCC - 1260
- E P P L P P T P P D T C A L Q Q G C A A
- S P H C P P R P Q T P A R C S R A A R P
- A P T A P H A P R H L R A A A G L R G L
1261 - TGTACTCTCCTCTGACCGCCTGCAGGACACCAACCGCCTCAAGCGCTCCTTCTCGCTGTA - 1320
- C T L L * P P A G H Q P P Q A L L L A V
- V L S S D R L Q D T N R L K R S F S L Y
- Y S P L T A C R T P T A S S A P S R C T
1321 - CATCAAATCAGCGAACACCCCCGGCCGGCGGCCCAACGGCCCCGGGTCACCCGACCCCGG - 1380
- H Q I S E H P R P A A Q R P R V T R P R
- I K S A N T P G R R P N G P G S P D P G
- S N Q R T P P A G G P T A P G H P T P A
1381 - CGAGGTCCCAAAGCTCTGCAAGCTGCACGGCCCGTCGGAGCCACGCTGAGCCTACCTTCG - 1440
- R G P K A L Q A A R P V G A T L S L P S
- E V P K L C K L H G P S E P R * A Y L R
- R S Q S S A S C T A R R S H A E P T F A
1441 - CCCAGCCCCGACAGCCCGGATGCCGCGCGCCCACGGCCCTGCGGGCGGCCCAGGCCCCCA - 1500
- P S P D S P D A A R P R P C G R P R P P
- P A P T A R M P R A H G P A G G P G P Q
- Q P R Q P G C R A P T A L R A A Q A P S
1501 - GCCGGCTCCCCGCTCCCCCGCGCACAGCCTCGGCCTCTCGGCCCTGTCGGCGCCCAGGCT - 1560
- A G S P L P R A Q P R P L G P V G A Q A
- P A P R S P A H S L G L S A L S A P R L
- R L P A P P R T A S A S R P C R R P G C

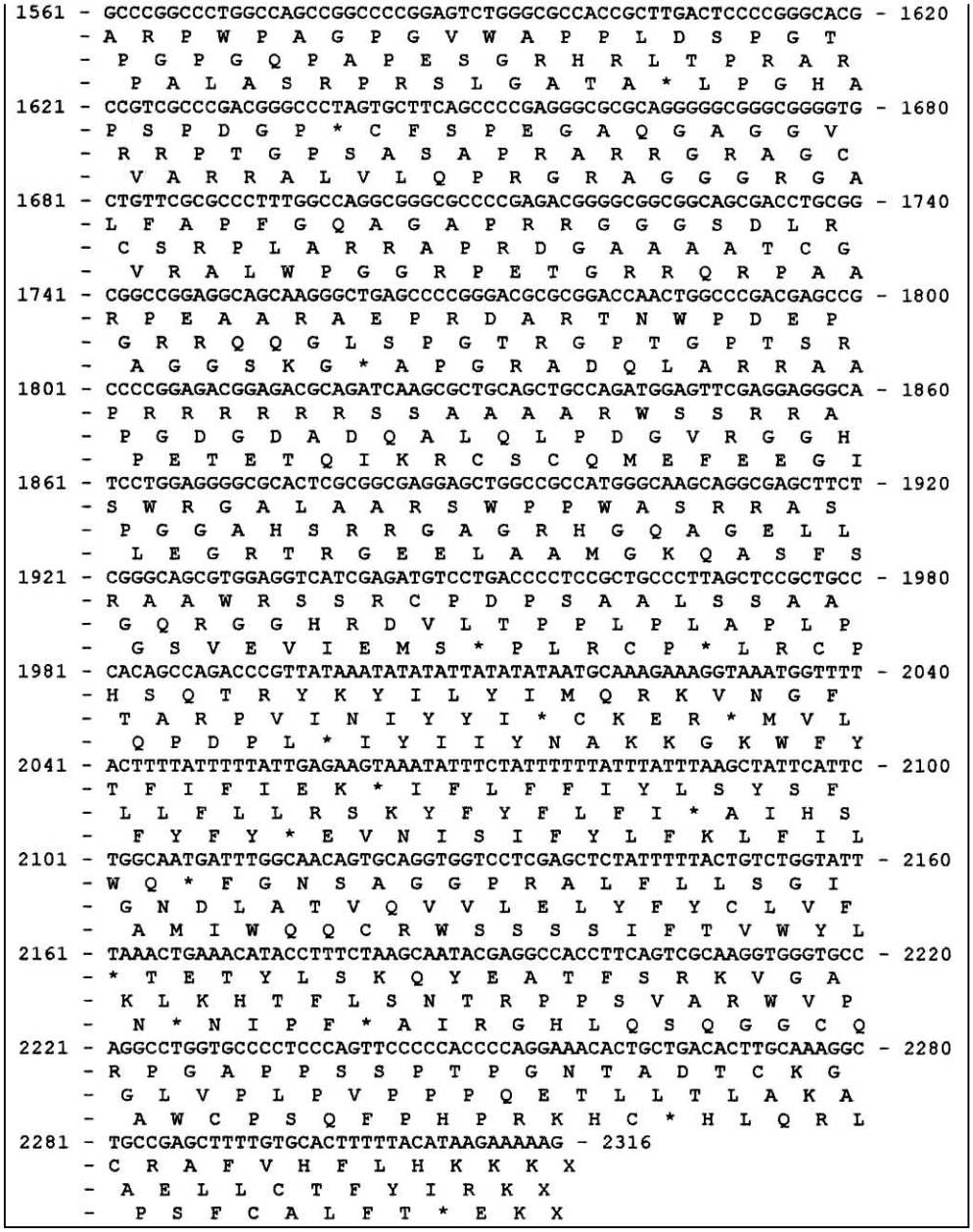


Abb. 31: Darstellung der drei möglichen Leserahmen von ψ hVH-5

Übersicht über multiple Sequenzabbrüche in jedem der drei Leserahmen. Stoppkodons sind durch einen Stern gekennzeichnet. Der dritte Leserahmen kodiert für die Proteinsequenz des Pseudogens. Start- sowie Stoppkodon hierfür sind umkreist. Die Sequenz von 80 Aminosäuren, welche sich aus der in vitro Translation ergibt, ist durch einen Kasten gekennzeichnet.

3.3.4.2 Vergleich von verschiedenen hVH-5 Proteinsequenzen

Die in Kap. 3.3.3.1 beschriebenen Nukleinsäuresequenzen des hVH-5 Wildtypgens, des Pseudogens, sowie des Mausgens wurden in die entsprechende (beim Wildtyp- und Mausgen bereits bekannte) Proteinsequenz übersetzt und miteinander verglichen. Im Gegensatz zum 625 AS langen Wildtyp hat das Pseudogen ψhVH-5 eine Länge von 80 AS, wobei ein Vergleich der beiden Proteine zeigt, dass die ersten 24 Aminosäuren nahezu übereinstimmen. Aus "missense" – Mutationen resultieren im Anschluss daran zwei veränderte Aminosäuren (aa 25 und 26), wobei eine darauffolgende Rasterverschiebung durch die beiden Deletionen sowie multiple Mutationen der Pseudogen- DNA - Sequenz zu einem komplett veränderten Protein mit kaum erkennbaren Homologien zum Wildtypen führen.
Ein Vergleich funktioneller Domänen des humanen Wildtyps mit ψhVH-5 lässt ein Fehlen wesentlicher Erkennungsmotive und Domänen erkennen.

3.3.4.3 Versuch eines Proteinnachweises mittels Antikörper

Erster Schritt für den Nachweis einer Translation von ψhVH-5 in vitro ist das Herstellen eines Immunserums gegen bestimmte Aminosäureabfolgen des nachzuweisenden Proteins. Um sowohl den Wildtyp als auch Pseudogene der hVH-5 Phosphatase detektieren zu können, wurde ein polyklonales Immunserum gegen die ersten 15 Aminosäuren des Wildtyps hergestellt, da diese AS-Abfolge beim Wildtyp und den Pseudogenen nahezu identisch ist (siehe Kap. 3.3.4.2). Dadurch besteht die Möglichkeit, dass der Antikörper alle human hVH-5 – Formen, falls diese translatiert werden, erkennt.
Das Antiserum wurde zunächst im überexprimierten System getestet: Es erfolgte eine transiente Expression der Konstrukte hVH-5 wt und ψhVH-5 in HEK 293 – Zellen. Gleiche Mengen Protein aus den Zelllysaten wurden mit Hilfe der Immundetektion von immobilisierten Proteinen analysiert.

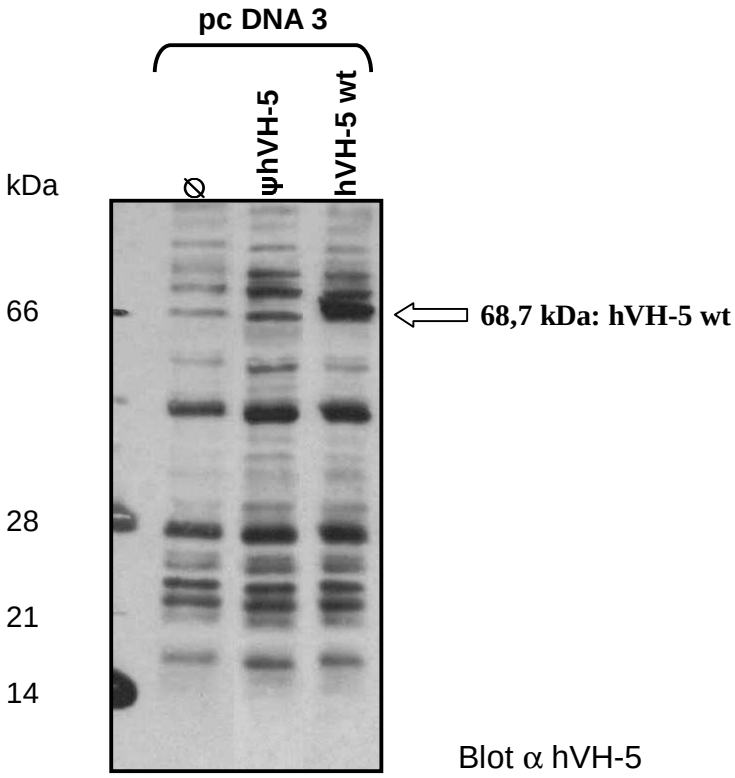


Abb. 33: Test eines Antikörpers zum Nachweis von hVH-5 wt und ψhVH-5

HEK 293 Zellen wurden, wie am oberen Bildrand angegeben, transfiziert. Aus Triton-Lysaten wurden die Proteine mittels Tricin-Sodiumdodecylsulfat-Gelelektrophorese(nach Schägger & Jargow) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem Antikörperserum α ψhVH-5 inkubiert.

Wie aus Abb. 33 zu erkennen ist, läßt sich durch das Anitserum die Wildtypform von hVH-5 nachweisen. In voller Länge kodiert dieses Gen für ein Protein von 625 AS, was sich auf dem Gel durch eine Bande mit der Größe von 68.7 kDa detektieren lässt.

Das Pseudogen hVH-5 müsste korrekterweise als Bande mit der Größe von 8.8 kDa auf dem Gel sichtbar werden, denn die Länge des Proteins ergibt bei einer Translation 80 AS. Eine gewöhliche 8-9% SDS- PAGE trennt jedoch Polypeptide von so geringer Größe nicht auf, so dass für die Antikörper-Analyse eine Tricin-Sodiumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (nach Schägger & Jargow) gewählt wurde. Die Immunoblotanalyse zeigt, da das Immunserum noch nicht aufgereinigt wurde, in allen drei Laufspuren zahlreiche unspezifische Bindungen. Ein Nachweis des transient überexprimierten Pseudogens konnte nicht erbracht werden. Aus diesem Grund wurden weiterführende Experimente zum Nachweis einer endogenen Expression des ψhVH-5 – Proteins unterlassen.

4. DISKUSSION

Viele physiologische Prozesse, Wachstum und Entwicklung von Zellen, aber auch zahlreiche Erkrankungen des Menschen können sowohl durch Aktivierung als auch durch Inaktivierung von Genen verursacht werden. Die maligne Transformation einer Zelle geht mit einer Veränderung von Protoonkogenen einher, die häufig durch Mutation, Amplifikation oder Proteininstabilität zu Onkogenen werden (Kinzler und Vogelstein, 1996). Veränderte Genprodukte, die an der Regulation von Teilungsverhalten und Proliferation beteiligt sind, können damit zur Unkontrollierbarkeit dieser Vorgänge und zur malignen Entartung der betroffenen Zellen führen. Mehr als 200 Erkrankungen, die nach den Mendelschen Regeln vererbt werden, gehen mit Tumorerkrankungen, oft in Kombination mit anderen Symptomen, einher. Beispiele für relativ häufige erbliche Tumoren sind das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom sowie das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (Eng et al., 1993). Um die Entstehung spezifischer Veränderungen nachzuvollziehen, werden in einem ersten Schritt Genveränderungen aufgesucht, deren anschließende Charakterisierung entscheidend zum Verständnis der Pathogenese beitragen soll.

4.1 VOM MUTATIONSNACHWEIS BEI HVH-5 ZUM PSEUDOGEN HVH-5

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mutationsanalyse der Phosphatase hVH-5 gestartet, mit dem Ziel der Identifizierung von krebsverursachenden Genmutationen. Da zum Mutationsnachweis meist aufwändigere molekulargenetische Untersuchungsmethoden zur Anwendung kommen, wurde in dieser Arbeit mit einer anderen Methode, CSGE, ein Vorabscreening durchgeführt. Diese Methode, die auf dem Nachweis von Heteroduplexen beruht, wurde in der vorliegenden Arbeit etabliert und durchgeführt. Mittels CSGE konnten bereits im ersten Exon von hVH-5 Hinweise auf das Vorliegen einer veränderten Gensequenz erbracht werden.
DNA ist *in vivo* durch eine außerordentliche Konstanz der Basenzusammensetzung gekennzeichnet. Betrachtet man spontane Veränderungen der DNA, so liegt die Fehlerrate je nach Polymerase zwischen 1:2000 und 1:10.000. Für den Austausch eines einzelnen Basenpaares liegt die Fehlerrate bei nur einem Austausch pro 10^9 Basenpaare pro Zellgeneration. Diese

außergewöhnliche Konstanz der DNA-Struktur beruht darauf, dass die Komplementarität der Einzelstränge eine äußerst effektive Reparatur von Defekten ermöglicht (Alberts et al., 1989).
Die Anzahl der vorhandenen Heteroduplexbanden im CSGE-Gel kann einen Hinweis auf die Summe der insgesamt vorliegenden Mutationen im untersuchten PCR-Fragment geben (Körkkö et al., 1998). Beim Screening des ersten PCR-Fragmentes (329 bp) wurde in 11 von 14 Brustkrebszelllinien das Vorhandensein einer Heteroduplexbande festgestellt, so dass initial irrtümlicherweise davon ausgegangen wurde, dass im untersuchten Fragment nur eine einzelne Genveränderung detektiert wurde. Erst durch Subklonierung und Sequenzierung konnte die exakte Sequenz des veränderten Gens ermittelt werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die untersuchte Sequenz sich durch multiple Mutationen vom Wildtypgen hVH-5 unterscheidet.
Mutationen sind spontane oder künstlich ausgelöste Änderungen des Erbguts. Dies kann beispielsweise bedingt sein durch Fehler bei der Replikation einer Nukleotidsequenz. Zwar weisen eukaryontische Zellen Reparaturmechanismen auf, um solche Schäden zu beheben, aber nicht immer kommt es dabei zur kompletten Beseitigung des Schadens. Betreffen DNA-Schädigungen beide Einzelstränge des Doppelstrangs oder entgehen sie den Reparaturmechanismen der Zelle, so kommt es zu stabilen Mutationen (Löffler et al., 1999). Bei Punktmutationen sind einzelne Basen verändert. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes kann der Basenaustausch ohne Veränderung der Aminosäuresequenz des kodierten Proteins geschehen ("silent mutation"), es kann ein Aminosäureaustausch resultieren ("missense") oder ein Stop-Codon generiert werden ("nonsense") (Wagener et al., 1999). Bei Insertionen oder Deletionen einzelner Basen kommt es immer zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des zugehörigen Proteins, da das Leseraster geändert wird (Rasterschubmutation).
Für hVH-5 konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zum Wildtypgen noch ein weiteres verändertes Gen dieser Phosphatase existiert, welches bei einer Anzahl von 1878 Nukleotiden 226 Mutationen aufweist. Ein Vergleich dieses Gens mit dem Wildtyp lieferte folgende Unterschiede: Bei einer Gesamtzahl von 158 Basen-Substitutionen wurden 68 Silent- und 90 Missensemutationen gezählt, außerdem waren 63 Deletionen und 5 Insertionen vorhanden.
Mutationen können an verschiedensten Stellen im Genom lokalisiert sein, sie können in kodierenden und nicht-kodierenden Sequenzabschnitten der DNA liegen. Punktmutationen außerhalb kodierender Sequenzen können die Transkription, Struktur und Stabilität der mRNA sowie die Translation beeinflussen (Wagener et al., 1999). Neben den regulatorischen Sequenzen befindet sich in den nichttranskribierten Regionen auch eine Zahl von sogenannten

Pseudogenen. Die Anzahl der Pseudogene im humanen Genom wird auf ca. 13.400 geschätzt (Zhang et al., 2003).

4.2 Ψ (PSI) HVH-5 – EIN PSEUDOGEN

Pseudogene (PGs) sind Gene, die mit funktionstüchtigen Genen verwandt sind, selbst aber auf Grund von Mutationen nicht mehr exprimiert werden können (Mighell et al., 2000). Ein Pseudogen wird meist nach dem Gen benannt, welchem es ähnlich ist, jedoch wird es durch Voranstellen des griechischen Buchstaben ψ (psi) als solches gekennzeichnet, z.B. ψPTEN. Definitionsgemäß sind Pseudogene inaktiv, was bedeutet, dass diese weder transkribiert noch translatiert werden. Aus diesem Grund enthält ihre Gensequenz meist mehrere "schädigende" Mutationen, was dadurch erklärt wird, dass nach der ursprünglichen Inaktivierung des Gens durch den fehlenden Selektionsdruck die Akkumulation weiterer Mutationen nicht verhindert wurde. Bei der in dieser Arbeit beschriebenen, dem hVH-5 Gen ähnlichen, Gensequenz konnte eine Ansammlung multipler Mutationen festgestellt werden. Wegen einer fehlenden Exon-Intron-Struktur (siehe 3.3.1) kann die Sequenz folglich einem prozessierten Pseudogen von hVH-5 (ψhVH-5) zugeordnet werden.

Aufgrund der Divergenz zwischen Pseudogen und funktionsfähigem Gen lässt sich abschätzen, wann das Pseudogen entstand und sich daraufhin die multiplen Mutationen ansammelten (Lin 1995). Da erst nach der Mutation eines Gens zu einem Pseudogen die Mutationen in den stillen und den nichtsynonymen Basen gleich sind, lässt sich auch berechnen, wie viel Zeit die beiden Gene funktionstüchtig waren und seit wann eines der Gene ein Pseudogen ist. Vergleicht man hVH-5 mit seinem Pseudogen, so lässt sich nach Lin (1995) für ψhVH-5 eine Entstehungszeit vor ca. 6,84 Millionen Jahren errechnen.

Die Existenz von Pseudogenen, welche inaktive Versionen derzeit aktiver Gene darstellen, wurde in zahlreichen Organismen beobachtet: Der Begriff „Pseudogen“ wurde zum ersten Mal in Zusammenhang mit Forschungsergebnissen am Genom des Frosches *Xenopus laevis* erwähnt (Jacq et al., 1977). Daraufhin konnte dessen Vorkommen auch bei Bakterien, Pflanzen, Insekten und Wirbeltieren beabachtet werden (Fsihi et al., 1996; Loguericio et al., 1998; Ramos-Onsins et al., 1998).

Die Anzahl der existierenden Pseudogene kann stark schwanken – von der einzelnen Kopie bis zu vielfachen nicht funktionellen Gensequenzen: Bei hVH-5 wurde die Existenz eines anderen Pseudogens auf Chromosom 10q11.2 bereits von Nesbit und Kollegen (1997) er-

wähnt, so dass nun davon ausgegangen werden kann, dass für die Phosphatase hVH-5 mindestens zwei Pseudogene im Genom existieren. Im Fall von ribosomaler RNA konnten bereits bis zu hunderte von Pseudogenen nachgewiesen werden (Fredericksen et al., 1997). Verwandt mit Pseudogenen und auch nicht scharf davon zu trennen sind verkürzte Gene und Genfragmente, die einem Genstück homolog sind, – dem 5'-Fragment, einem Mittelstück oder dem 3' Fragment – aber nicht exprimiert werden.

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass Pseudogene auf zwei unterschiedliche Arten entstehen: Zum einen durch Duplikation von genomischer DNA, aber auch durch Retrotransposition von Erbmaterial in das Genom (Mighell et al., 2000).

Zur ersten Gruppe zählen die nicht prozessierten, oder auch konventionellen Pseudogene. Diese stellen nicht funktionelle Kopien einer Sequenz aus der genomischen DNA dar und haben dieselbe Stuktur wie funktionsfähige Gene, einschließlich Exons und Introns an den zu erwartenden Positionen. Anpassung an veränderte Umweltbedingungen und Selektionsdruck (Theorie nach Darwin) erfordern eine ständige Weiterentwicklung des Genoms. Deshalb bietet eine Duplikation von DNA-Segmenten essentielle Grundlage für die Entwicklung eines komplexen Genoms und kann der Wissenschaft als Erklärungsansatz für die Entstehung von Genfamilien (Samuelson et al., 1990) dienen. Während sich einige Duplikate zu selbständigen funktionstüchtigen Genen entwickelten, waren manche anscheinend nur eine Zeit lang aktiv, bevor sie zu Pseudogenen wurden (Cooke et al., 1997). Andere Pseudogene wiederum sind offensichtlich seit dem Zeitpunkt ihres Entstehens inaktiv (Tachida et al., 1998). Ein solcher Funktionsverlust betrifft meist Defekte im Promotorbereich oder Regulationselemente des Gens, so dass keine Transkription mehr stattfinden kann.

Abb. 34 liefert einen Überblick über die Entstehungsmechanismen und Entwicklungsmöglichkeiten von Pseudogenen. Die Grenze zwischen Genen und Pseudogenen ist jedoch nur sehr unscharf. Ein Gen kann durch Mutationen inaktiviert werden, im anderen Fall kann aber auch ein Pseudogen durch Mutationen aktiviert werden (Harris et al., 1984).

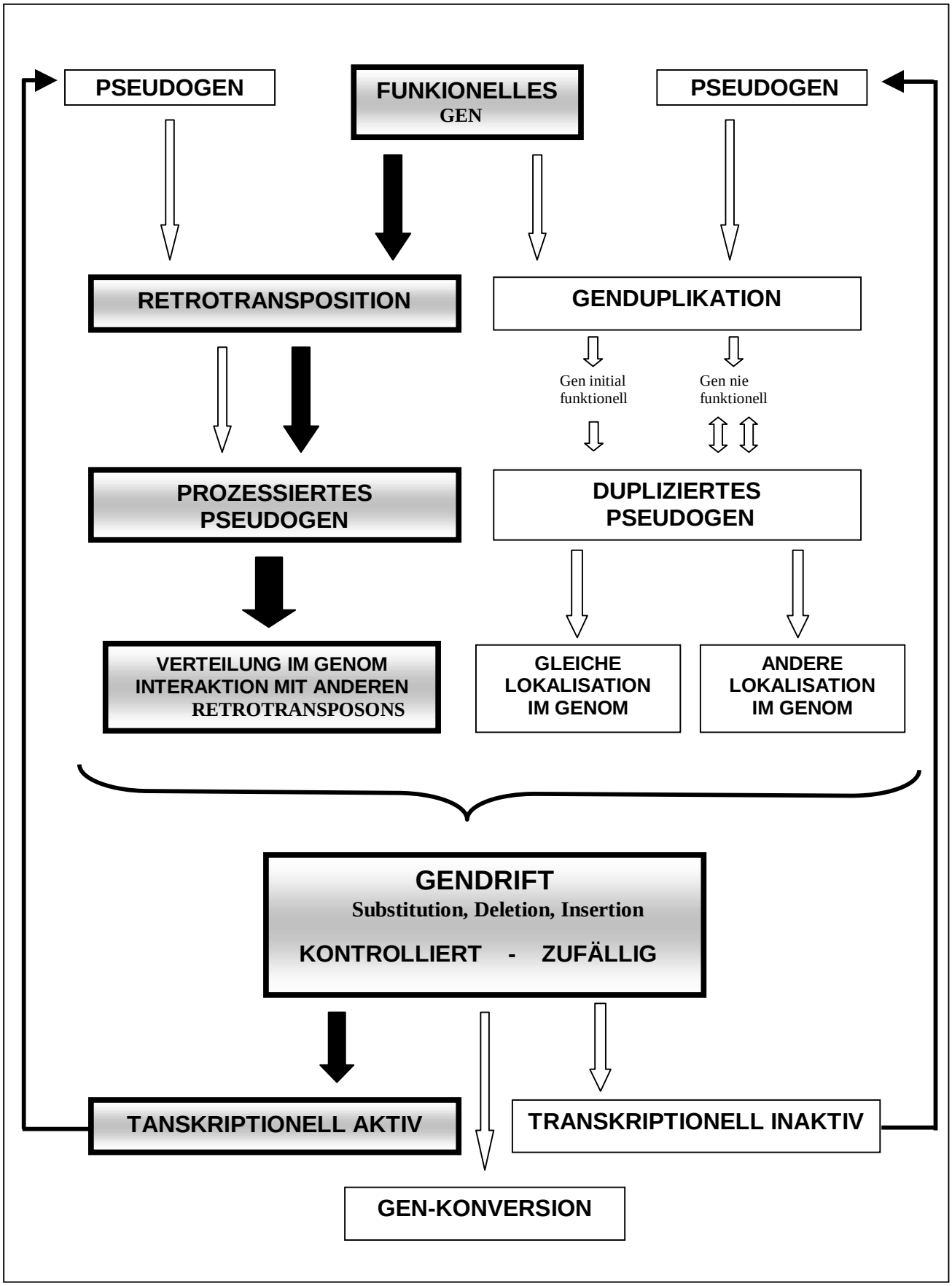


Abb. 34: Schematische Darstellung von Entstehungs- und Entwicklungsmöglichkeiten der Pseudogene (Modifikation nach Mighell)
Ursprung und Entwicklungsmechanismen bzw. -wege, die zur Entstehung von ψhVH-5 führten, sind mit schwarzen Pfeilen markiert und mit schwarz umrandeten Kästen gekennzeichnet.

4.3 DIE EXPRESSION DES HVH-5 PSEUDOGENS

Die zweite Gruppe von Pseudogenen entsteht durch reverse Transkription „reifer“ Exon-Sequenzen und deren Retrotransposition ins Genom (Vanin, 1985). Das bedeutet, dass jene weiterverarbeiteten Pseudogene nicht einfach eine mutierte Version des ursprünglichen Gens darstellen, sondern ein DNA-Kopie der mRNA, die von diesem Gen stammt. Es hat deshalb weder Introns noch einen Promotor, da diese durch "processing" aus der mRNA entfernt werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ψhVH-5 nicht nur in genomischer DNA, sondern auch in cDNA detektiert werden kann, was einen Beweis für die Transkription des Pseudogens liefert. Normalerweise verhindert das Fehlen des Promotors die Transkription eines prozessierten Pseudogens. Jedoch sind auch Fälle bekannt, bei denen weiterverarbeitete PGs dennoch exprimiert werden. Dies geschieht, wenn prozessierte Kopien dieses Gens durch die RNA Polymerase III transkribiert werden können, da ungewöhlicherweise der Promotor während des "RNA-Reifungsprozesses" nicht entfernt wurde. ψhVH-5 wird in allen untersuchten menschlichen Normalgeweben transkribiert. Unklar ist, warum ψhVH-5 lediglich in 11 von 14 Brustkrebszelllinien transkribiert wird.

Entsteht ein Pseudogen durch eine Duplikation oder Retrotransposition, so hat der betreffende Organismus zunächst zwei identische Gene. Diese können beide aktiv sein und so z.B. eine wichtige Funktion absichern (Redundanz). Mit der Zeit werden sich die Sequenzen der beiden Gene durch Mutationen zunehmend voneinander unterscheiden. Es kann zu neuen Funktionen kommen (Evolution) oder eines der Gene verliert die Funktion.

Mit der Integration in das Genom entwickeln sich Pseudogene im Laufe der Evolution in verschiedene Richtungen. Der Mechanismus, wodurch dies gesteuert wird, sowie die Bedeutung und Funktion von Pseudogenen sind jedoch noch lange nicht aufgeklärt. Aus diesem Grund sollte gerade im Bereich der Molekularbiologie der möglichen Existenz von Pseudogenen bei der Untersuchung und Chrarakterisierung von Genen eine besondere Beachtung geschenkt werden und diese Gene auf eventuelle bisher unbekannte Funktionen untersucht werden.

4.4 MÖGLICHE INTERATIONEN UND FUNKTIONEN DES HVH-5 PSEUDOGENS

Nach Vanin (1985) umfasst die Definition eines Pseudogens zwei wesentliche charakteristische Merkmale. Pseudogene weisen starke Ähnlichkeit zu einem bestimmten Gen auf, von welchem sie abstammen. Zweites Kennzeichen von Pseudogenen ist, dass diese keine Funktion mehr erfüllen. Der Funktionsverlust beruht auf der Tatsache, dass Pseudogene theoretisch weder die Fähigkeit zur Transkription und Translation besitzen, noch können sie für ein funktionsfähiges Protein kodieren. Auf der anderen Seite sind einige Beispiele für funktionelle Pseudogene bekannt.

Das Preproinsulin I – Gen der Ratte war das erste Pseudogen, dessen Transkriptionsfähigkeit beschrieben wurde (Soares et al., 1985). Daraufhin folgten das humane CYP21A1 Pseudogen sowie das humane 5-HT7 Pseudogen (Bristow et al., 1993; Olsen et al., 1999). Aufgrund der Identifikation von Pseudogen-Transkripten stellt sich die Frage, ob diese alternativen mRNAs Funktionen erfüllen können oder deren Aminosäureprodukte eine funktionelle Bedeutung haben.

4.4.1 Proteinebene

Als Pseudogene erstmals entdeckt wurden, spekulierte man darüber, ob sie möglicherweise für ein funktionelles, wenn auch verkürztes oder andersartiges Protein kodieren können (Karin et al.,1982; Scarpulla 1984). Es besteht die Möglichkeit, dass Veränderungen auf der Nukleotidebene, die den kodierenden, aber auch den nicht kodierenden Bereich eines Gens betreffen können, sich sowohl auf die Regulation der Translation eines Proteins als auch auf dessen Aufbau auswirken und somit dessen Funktion beeinflussen.

Da eine Transkription in humanem Gewebe für das in dieser Arbeit beschriebene Pseudogen ψhVH-5 gezeigt werden konnte, stellt sich die Frage nach einer eventuellen Translation dieses Gens. Hierbei müssen verschiedene Gesichtspunkte betrachtet werden, wie ein Pseudogen oder dessen Produkt allgemein in Funktionsabläufe der Zelle integriert sein könnte oder dieses mit seinem ursprünglichen Gen in Interaktion treten kann.

Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die mRNA des Pseudogens in ein Protein translatiert wird, welches die Funktion des Wildtyp-Proteins negativ reguliert. So wird beispielsweise von einem Cx43 Pseudogen berichtet, dessen Transkript in Krebszelllinien nachgewiesen werden konnte. Durch in vitro Translation konnte ein Protein von 43 kDa erzeugt werden,

dessen funktionelle Bedeutung untersucht wurde. Es wurde gezeigt, dass das Produkt des Pseudogens in der Lage war, in vitro ein Zellwachstum zu inhibieren (Kandouz et al., 2004).
Ein anderes Beispiel dafür, dass translatierte Pseudogene möglicherweise eine Funktion haben könnten, wurde an Untersuchungen des PTEN/MMAC1 Pseudogens festgestellt. Das Wildtypgen PTEN kodiert, ebenso wie hVH-5, für eine Phosphatase und ist als Tumorsuppressorgen bekannt. Weiterhin hat dieses Gen mit hVH-5 gemeinsam, dass es auch auf einer LOH-Region lokalisiert ist, die für einige Krebsarten bekannt ist. Es konnte gezeigt werden, dass das PTEN/MMAC1 Pseudogen in Zellen transkribiert wird. Dieses Pseudogen kodiert für ein Protein, welches in vitro translatiert wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass dieses Pseudogen-Protein zwar eine schwache, aber immerhin detektierbare dual-spezifische Phosphatase-Aktivität besitzt (Myers et al., 1997).
Das Wildtypgen hVH-5 kodiert ebenfalls für eine dual-spezifische Phosphatase. Somit kann eine dem Pseudogen von PTEN ähnliche Funktion für das Pseudogen von hVH-5 letztendlich nicht ausgeschlossen werden. Wählt man jedoch für die Translation der Nukleinsäuresequenz von ψhVH-5 den in dieser Arbeit beschriebenen Leserahmen, so ergibt sich ein Protein mit einer Länge von 80 Aminosäuren. Das Protein, welches hieraus entsteht, ist stark verkürzt und besitzt keine funktionelle Phosphatase-Domäne. Aus diesem Grund wäre eine Funktion als dual-spezifische Phosphatase für dieses Pseudogen unwahrscheinlich. Um andere potentielle Funktionsmöglichkeiten für dessen translatiertes Produkt aufzudecken, wurde dessen Proteinsequenz mit dem Programm "Scansite algorithm" (Yaffe et al., 2001) abgeglichen. Hierbei konnten keine aktuell bekannten Domänen oder funktionellen Motive erkannt werden. Ein in vitro Translationsnachweis konnte in dieser Arbeit für das Pseudogen von hVH-5 nicht erbracht werden, so dass die Existenz eines translatierten Proteins von ψhVH-5 sowie dessen mögliche Funktion weiterhin unklar bleibt.

4.4.2 RNA-Ebene

Eine weitere funktionelle Bedeutung für das Pseudogen ψhVH-5 könnte auch auf RNA-Ebene stattfinden. Im Jahr 2003 konnte Hirotsune zusammen mit seinen Kollegen die allgemeine These widerlegen, dass Pseudogene nur "molekulare Fossilien" sind.
Es wurde gezeigt, dass Transkripte des Pseudogens Makorin1-p1 in der Lage sind, die Stabilität der mRNA des Originalgens Makorin1 zu regulieren und somit dessen Funktion zu beeinflussen. Untersucht wurden die Auswirkungen der genetischen Inaktivierung eines Pseudogens bei Mäusen. Durch den Einbau von Fremd-DNA in die Sequenz eines Pseudogens wurde dieses inaktiviert. Dabei wurde festgestellt, dass dies zu ungewöhnlichen und schweren Krankheitssymptomen bei den Tieren führt: während die meisten Tiere starben, hatten überlebende Mäuse fehlgebildete Nieren und Knochen. Derartige Missbildungen traten auch bei den Nachkommen dieser Tiere auf. Es konnte belegt werden, dass das Pseudogen nötig ist, um die mRNA des Wildtypgens zu stabilisieren. Genauso wie bei hVH-5 befindet sich auch bei Makorin1 das Wildtypgen auf einem anderen Chromosom als das Pseudogen. Bekannt ist, dass Makorin1 in den Nierenzellen gesunder Mäuse sehr aktiv ist. Mäuse, die ein verändertes Pseudogen besitzen, zeigen dagegen nur eine schwache und unregelmäßige Aktivität von Makorin1. Ein weiteres gemeinsames Merkmal von ψhVH-5 und Makorin1-p1 ist, dass beide Pseudogene im Laufe der Evolution in ihrer DNA-Sequenz derartige Mutationen anhäuften,

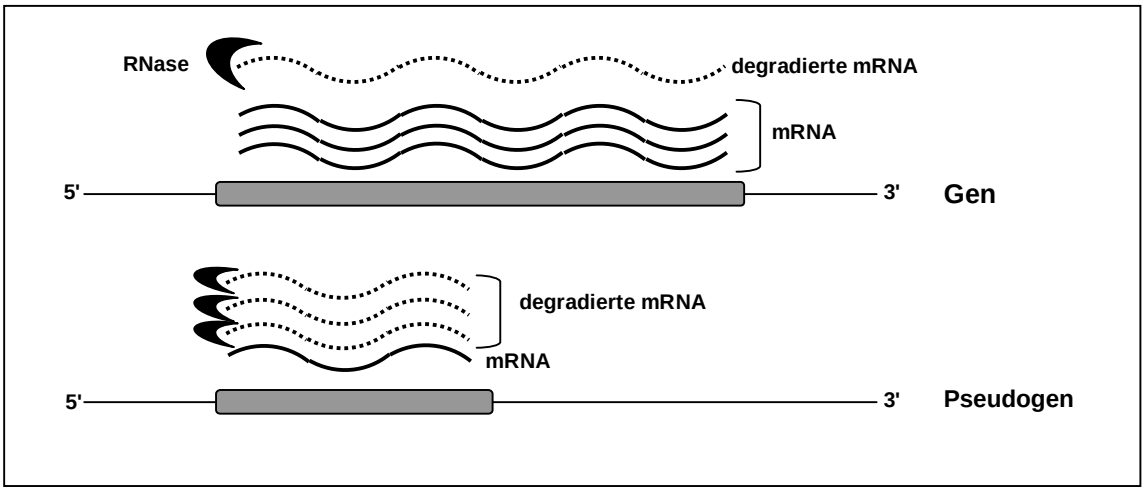


Abb. 35 A: Genregulation durch Pseudogene, RNA-vermittelter Mechanismus (nach Lee, 2003)
Kopien der Messenger-RNA eines Pseudogens und eines Gens kompetetieren miteinander im Abbau durch ein destabilisierendes Enzym, z.B. eine RNase.

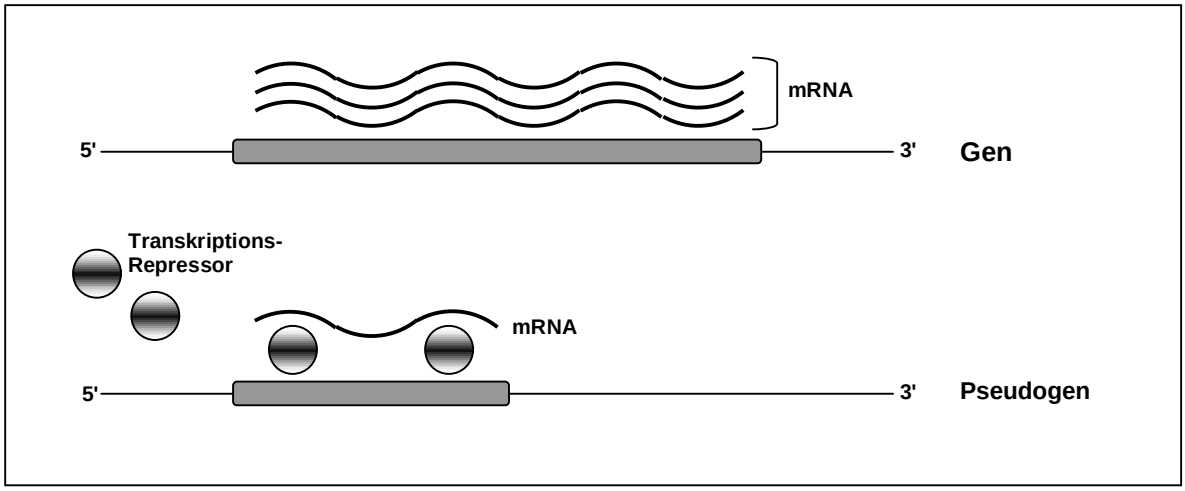


Abb. 35 B: Genregulation durch Pseudogene, DNA-vermittelter Mechanismus (nach Lee, 2003)
Auf DNA-Ebene kompetieren Gen und Pseudogen um Transkriptionsrepressoren

die bei einer Übersetzung der mRNA in eine Aminosäuresequenz zu einem verkürzten und funktionslosen Protein führen. Somit ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass die Fähigkeit des Pseudogens Makorin1-p1 zur Stabilisierung seines Wildtyps weniger von einer Funktion des Aminosäureproduktes abhängt als vielmehr mit der Ähnlichkeit der DNA-Sequenzen von Wildtypgen und Pseudogen zusammenhängt. Lee (2003) beschrieb mehrere Möglichkeiten, wie ein Pseudogen Gene regulieren kann. In Abbildung 35 sind zwei dieser Regulationsmechanismen schematisch dargestellt.

Da die Sequenzen von hVH-5 und ψhVH-5 zu ca. 89% übereinstimmen, besteht die Möglichkeit, dass das in dieser Arbeit beschriebene Pseudogen ψhVH-5 über die in Abb. 35 gezeigten Mechanismen oder auf ähnliche Art mit seinem funktionellen Wildtypgen interagieren könnte.

Wenn Mäuse sterben müssen oder krank werden, weil ein Pseudogen zerstört ist, so liegt der Schluss nahe, dass ein nicht-funktionierendes Pseudogen auch beim Menschen Krankheiten verursachen kann. Möglicherweise spielen Pseudogene wie ψhVH-5 eine wesentliche, bisher noch unbekannte Rolle bei der Regulation von zellulären Prozessen. Derartige Überlegungen bieten interessante Forschungsansätze für weiterführende Arbeiten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Tyrosinphosphatase hVH-5 nach Genveränderungen untersucht. Als Mitglied der Familie der dual-spezifischen Phosphatasen ist hVH-5 (homologue of vaccinia virus H1 phosphatase gene clone 5) an der Signaltransduktion der Zelle durch Dephosphorylierung von stress-aktivierter Proteinkinase (SAPK) und p38 beteiligt. Aufgrund seiner Rolle als potentielles Tumorsuppressorgen können Genveränderungen oder Fehlregulationen von hVH-5 zur Entstehung von Tumoren beitragen. Wie bereits bekannt ist, zählt die Lokalisation dieses Gens auf Chromosom 11p15.5 zu häufig beobachteten Loss Of Heterozygosity (LOH)-Regionen bei Krebserkrankungen, u.a auch bei Brustkrebs.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Expressionsanalyse der hVH-5 Phosphatase in Normalgewebe und Brustkrebszelllinien durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass hVH-5 nicht nur, wie schon bekannt, in humanem Gehirn, Herz und Skelettmuskel transkribiert wird, sondern eine Trankription darüber hinaus auch noch in 10 weiteren humanen Geweben sowie in allen untersuchten Brustkrebszelllinien nachgewiesen werden konnte.

Um ein zeitsparendes und effektives Mutationsscreening zu ermöglichen, wurde eine neue Methode, Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE), etabliert. Dadurch konnte bereits im ersten Exon dieser Phosphatase eine Heteroduplexbildung als Hinweis auf eine Genveränderung sichtbar gemacht werden. Mittels Sequenzierungs- sowie Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse konnte die exakte Nukleotidsequenz bestimmt werden.

Es wurde festgestellt, dass es sich hierbei um eine bisher unbekannte Gensequenz eines prozessierten Pseudogens der hVH-5 Phosphatase handelt. Prozessierte Pseudogene sind dadurch definiert, dass sie typischerweise durch einen Verlust des Promotors transkriptionell inaktiv sind. Eine Datenbankrecherche (Sanger Center) ermöglichte die Lokalisation des Pseudogens auf Chromosom 10q22.2. Phylogenetische Analysen führten zu dem Ergebnis, dass das Gen vor ca. 6,8 Mio. Jahren entstanden sein müsste.

Es konnte gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit beschriebene Pseudogen von hVH-5 (ψhVH-5) entgegen der Definition eines Pseudogens in gesunden menschlichen Geweben transkribiert wird. Diese Tatsache deutet auf eine evtl. funktionelle Bedeutung dieses Gens hin. Weiterhin konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Transkription des Pseudogens und der Entstehung von Brustkrebs nicht ausgeschlossen werden, da dieses in drei von 14 untersuchten Brustkrebszelllinien nicht transkribiert wird.

Aus der Übersetzung der Nukleinsäuresequenz von ψhVH-5 in Aminosäuren resultierte ein Peptid von 8.8 kDa, welches sich stark vom hVH-5 Wildtyp unterscheidet und keinerlei funktionelle Domänen aufweist. Es konnte weder ein Nachweis des transient überexprimierten Proteins noch eines in vivo exprimierten Proteins erbracht werden.

Die Akkumulation der zahlreichen Mutationen im Pseudogen verglichen mit dem Wildtyp deutet stark darauf hin, dass dieses Gen in der Evolutionsgeschichte aufgrund fehlender funktioneller Bedeutung zumindest zeitweise keinem Selektionsdruck unterlag oder aber sich zu einem selbständigen Gen mit noch unbekannter Funktion weiterentwickelte. In der vorliegenden Arbeit konnten Hinweise dafür gebracht werden, dass ψhVH-5 sich möglicherweise derart entwickelt hat, um durch andere Regulationsmechanismen, beispielsweise solche, die für nicht-kodierende RNAs bekannt sind, mit dem Wildtypgen der hVH-5 Phosphatase zu interagieren.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aaronson, S.A. Growth factors and cancer. (1991) *Science* **254**, 1146-1153
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York, London (1989)
- Alitalo, K., Schwab, M. Oncogene amplification in tumor cells (1986) *Adv. Cancer Res.* **47**, 235-282
- Bange, J., Prechtl, D., Cheburkin, Y., Specht, K., Harbeck, N., Schmitt, M., Knyazeva, T., Müller, S., Gärtner, S., Sures, I., Hongyang, W., Imyanitov, E., Häring, H.U., Knyazev, P., Iacobelli, S., Höfler, H., Ullrich, A. Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg^{388} Allele. (2002) *Cancer Research* **62**, 840-847
- Baserga, R. Oncogenes and the strategy of growth factors. (1994) *Cell* **79**, 927-930
- Bhattacharyya, A., Lilley, M.J. The contrasting structures of mismatched DNA sequences containing looped-out bases (bulges) and multiple mismatches (bubbles). (1989) *Nucleic Acids Research* **17**, 6821-6840
- Biffen, M., McMichael-Phillips, D., Larson, T., Venkitaraman, A., Alexander, D. The CD45 tyrosine phosphatase regulates specific pools of antigen receptor-associated p59fyn and CD45-associated p56lck tyrosine kinases in human T-cells. (1994) *EMBO J.* **13**, 1920-1929
- Birnboim, H.C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA (1983) *Methods Enzymol.* **100**, 243-255
- Bishop, J.M. Molecular themes in oncogenesis. (1991) *Cell* **64**, 235-248
- Bjerrum, O.J. und Schafer-Nielsen, C. Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblotting with a horizontal apparatus. (1986) *Electrophoresis* **86**, 315-327
- Blesa, J.R., Hernández-Yago, J. Adaption of conformation-sensitive gel electrophoresis to an ALFexpress DNA sequencer to screen BRCA1 mutations. (2000) *BioTechniques* **28**, 1019-1025
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 284-254

- Bristow, J., Gitelman, S.E., Tee, M.K., Staels, B., Miller, W.L. Abundant adrenal-specific transcription of the human P450c21A "pseudogene". (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 12929-12924
- Brown-Shimer, S., Johnson, K.A., Hill, D.E., Bruskin, A.M. Effect of tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene. (1992) *Cancer Res.* **52**, 478-482
- Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., Soltoff, S. Oncogenes and signal transduction. (1991) *Cell* **64** (2) 281-302
- Cavenee, W.K., Dryja, T.P., Phillips, R.A., Benedict, W.F., Godbout, R., Gallie, B.L., Murphree, A.L., Strong, L.C., White, R.L. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. (1983) *Nature* **305**, 779-784
- Charbonneau, H., Tonks, N.K., Kumar, S., Diltz, C.D., Harrylock, M., Cool, D.E., Krebs, E.G., Fischer, E.H., Walsh, K.A. Human placenta protein-tyrosine phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5252-5256
- Charles, C.H., Sun, H., Lau, L.F., and Tonks, N.K. The growth factor-inducible immediate-early gene 3CH134 encodes a protein-tyrosine-phosphatase. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5292-5296
- Chen, C. und Okayama, H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745-2752
- Chen, L.C., Kurisu, W., Ljung, B.M., Goldman, E.S., Moore, D., Smith, H.S. Heterogenety for allelic loss in human breast cancer. (1992) *J. Natl. Cancer Inst.* **84**, 506-510
- Chernoff, J., Schievella, A.R., Jost, C.A., Erikson, R.L., Neel, B.G. Cloning of a cDNA for a major human protein-tyrosine-phosphatase. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2735-2739
- Chung, C.T. und Miller, R.H. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 3580
- Cooke, J., Nowak, M.A., Boerlijst, M., Maynard-Smith, J. (1997) Evolutionary origins and maintenance of redundant gene expression during metazoan development. *Trends Genet.* **13**, 360-364
- Cool, D.E., Tonks, N.K., Charbonneau, H., Walsh, K.A., Fischer, E.H., Krebs, E.G. cDNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86,** 5257-5261

- Cool, D.E., Tonks, N.K., Charbonneau, H., Fischer, E.H., Krebs, E.G. Expression of a human T-cell protein-tyrosine-phosphatase in baby hamster kidney cells. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7280-7284
- Den Hertog, J., Pals, C.E.G.M., Jonk, L.J.C, and Kruijer, W. Differential expression of a novel murine non-receptor protein tyrosine phosphatase during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. (1992) *EMBO J.* **12**, 3789-3798
- Dixon, J.E. Structure and catalytic properties of protein tyrosine phosphatases. (1995) *Ann NY Acad Sci* **766**, 18-22
- Eddy, S.R. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. (2001) *Nature reviews* **2**, 919-929
- Eng, C., Ponder B.A. The role of gene mutations in the genesis of familial cancers. (1993) *FasebJ.* **7**, 910-919
- Fantl, W.D., Johnson, D.E., Williams, L.T. Signalling by receptor tyrosine kinases. (1993) *Ann. Rev. Biochem.* **62**, 453-481
- Feng, G. and Pawson, T., Phosphotyrosine phosphatases with SH2 domains: regulators of signal transduction. (1994) *Trends Gen.* **10**, 54-58
- Fischer, E.H., Charbonneau, H. and Tonks, N.K. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. (1991) *Science* **253**, 401-406
- Frangioni, J.V., Beam, P.H., Shifrin, V., Jost, C.A., Neel, B.G. The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. (1992) *Cell* **68**, 545-560
- Fredericksen, S., Cao, H., Lomholt, B.., Levan, G., Hallenberg, C. The rat 5S rRNA bona fide gene repeat maps to chromosome 19q12-->qter and the pseudogene repeat maps to 12q12.(1997) *Cytogenet. Cell Genet.* **76**, 101-106
- Friis, R.R., Jokusch, B.M., Boschek, C.B., Ziecki, A., Rusamen, H., Bauer, H. Transformation-defective, temperaturesensitive mutants of Rous sarcoma virus have a reversigly defective src-gene product. (1979) *Cold Sringarbor Symp. Quant. Biol.* **7**, 1007-1012
- Fsihi, H., De Rossi, E., Salazar, L., Cantoni, R., Labo, M., Riccardi, G., Takiff, H.E., Eiglmeier, K., Bergh, S., cole, S.T. Gene arrangement and organization in a approximately 76 kb fragment encompassing the ori C region of the chromosome of Mycobacterium leprae. (1996) *Microbiology* **142**, 3147-3161

- Ganguli, A., Matthew, J.R., Prockop, D. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**,10325-10329
- Graham, F.L. und van der Eb, A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA (1973) *Virology* **52**, 456-467
- Graham, F.L., Smiley, J., Russel, W.C., Naim, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. (1977) J. Gen. Virol. **36**, 59-72
- Greenfield, C., Hiles, I., Waterfield, M.D., Federwisch, M., Wollmer, A., Blundell, T.L., McDonald, N. Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor. (1989) *EMBO J.* **8,** 4115-4123
- Guan, K., Haun, R.S., Watson, S.J., Geahlen, R.L., Dixon, J.E. Cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase. (1990) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1501-1505
- Guan, K., Broyles, S.S., and Dixon, J.E. A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. (1991) *Nature*. **350**, 359-362
- Guan, K.-L. and Butch, E. Isolation and characterization of a novel dual specific phosphatase, hVH2, which, selectively dephosphorylates the mitogen-activated protein kinase. (1995) *J Biol. Chem.* **270**, 14587-14596
- Hammacher, A., Mellstrom, K., Heldin, C.H., Westermark, B. Isoform-specific induction of actin reorganization by platelet-derived growth factor suggests that the functionally active receptor is a dimer. (1989) EMBO J. **9**, 2489-2495
- Harris, S., Barrie, P.A., Weiss, M.L., Jeffreys, A.J. The primate psi beta 1 gene. An ancient beta-globin pseudogene. (1984) *J Mol Biol.* **180,** 785-801
- Heldin, C.H., Westermark B., Platelet-derived growth factor: three isoforms and two receptor types. (1989) *Trends Genet* **4**, 108-111
- Henry, I., Grandjouan, S., Couillin, P., Barchark, F., Huerre-Jeanpierre, C., Glase, T., Philip, T., Lenoir, G., Chaussain, J.L., Junien, C. Tumor-specific loss of 11p15.5 alleles in del 1p13 Wilms' tumor and in familial adrenocortical carcinoma. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3247-3251
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. (1992) *Biotechnology* **10**, 413-417
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. (1993) *Biotechnology* **11**, 1026-1030

- Hirotsune, S., Yoshida, N., Chen, A., Garrett, L., Sugiyama, F., Takhashi, S., Yagami, K., Wynshaw-Boris, A., Yoshiki, A. An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. (2003) *Nature* **423**, 91-96
- Hjelm, H., Hjelm, K. und Sjörquist, J. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. (1972) *FEBS Letters* **28**, 73-76
- Hologado-Madruga, M., Emlet, D.R., Moscatello, D.K., Godwin, A.K., Wong A.J. A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. (1996) *Nature* **379**, 560-564
- Hooft van Huijsduijnen R. Protein tyrosine phosphatases: counting the trees in the forest. (1998) Gene. **225**, 1-8
- Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling. (1995) *Cell* **80**, 225-236
- Hunter, T., Sefton, B.M. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1311-1315
- Huynh, H., Alpert, L., Pollak, M. Silencing of the mammary-derived growth inhibitor (MDGI) gene in breast neoplasms is associated with epigenetic changes. (1996) *Cancer Res.* **56**, 4865-4870
- Ishibashi, T., Bottaro, D.P., Michieli, P., Kelly, C.A., Aaronson S.A. A novel dual specificity phosphatase induced by serum stimulation and heat shock. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 29897-29902
- Jacq, C., Miller, J.R., Brownlee, G.G. A pseudogene structure in 5S DNA of Xenopus laevis. (1977) *Cell* **12**, 109-120
- Johnson, T.R., Biggs, J.R., Winbourn, S.E., Kreft, A.S. Regulation of dual-specifity Phosphatases M3/6 and hVH5 by Phorbol Esters. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 31755-31762
- Joshua-Tor, L., Frolow, F., Appella, E., Hope, H., Rabinovich, D., Sussman, J.L. Three-dimensional structures of bulge-containing DNA fragments. (1992) *J. Mol. Biol.* **225**, 397-431
- Kandouz, M., Carystinos, G.D., Alaoui-Jamli, M.A., Batist, G. Connexin43 pseudogene is expressed in tumor cells and inhibits growth. (2004) *Oncogene* **23**, 2763-4770
- Karin, M., Richards, R.I. Human metallothionein genes - primary structure of the metallothionein- II gene and a related processed gene. (1982) *Nature* **299**, 797-802

- Kavanaugh, W.M., Turck, C.W. & Williams, L.T. PTB domain binding to signalling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine. (1995) *Science* **268**, 1177-1179
- Keyse, S.M. and Emslie, E.A. Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. (1992) *Nature* **15**, 644-647
- Keyse, S.M. and Ginsburg, M. Amino acid sequence similarity between CL100, a dual-specificity MAP kinase phosphatase, and cdc25. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 377-378
- Kinzler K.W., Vogelstein, B. Life (and death) in a malignant tumour.(1996) *Nature* **379**,19-20
- Knudson, A.G. Mutation and cancer: Statistical Study of Retinobolastoma (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **68**, 820-823
- Körkkö, J., Annunen, S., Pihlajamaa, T., Prockop, D.J., Ala-Kokko, L. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: Comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1681-1685
- Kozak, M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. (1984) *Nucleic Acids Res* **12(2)**, 857-72
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970) *Nature* **227**, 680-685
- Lee, T.L Complicity of gene and pseudogene. (2003) *Nature* **423**, 26-28
- Lee, C.-H., Mizusawa, H., Kakefuda, T. Base insertion and deletion mutations induced in an E. coli plasmid by benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2838-2842
- Lewis, T.S., Shapiro, P.S., Ahn, N.G. Signal transduction through MAP kinase cascades (1998) *Adv. Cancer Res.* **74**, 49-139
- Li, L., Dixon, J.E. Form, funktion, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement human diseases (2000) *Seminars in Immunology* **12**, 75-84
- Lin, Y., Soh-Ha, C. Cloning and characterization of two p53 pseudogenes from the rat genome. (1995) *Gene* **156**, 183-189
- Lindmark, R., Thoren-Tolling, K. und Sjöquist, J. Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. (1983) *J. Immunol. Methods* **62**, 1-15
- Löffler,G. Basiswissen Biochemie. (1999) Springer, Berlin, Heidelberg, New York

- Loguercio, L.L., Wilkins, T.A. Structural analysis of a hmg-coA-reductase pseudogene: insights into evolutionary processes affecting the hmgr gene family in allotetraploid cotton (Gossypium hirsutum L.). (1998) *Curr. Genet.* **34**, 241-249
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. (1992) *Cell* **70**, 431-442
- Marshall, C.J. Tumor suppressor genes. (1991) *Cell* **64**, 313-326
- Martell, K.J., Seasholtz, A.F., Kwak, S.P., Clemens, K.K., Dixon, J.E. hVH-5: A protein tyrosine phosphatase abundant in brain that inactivates mitogen-activated protein kinase. (1995) *J. Neurochem.* **65**, 1823-1833
- Matsuguchi, T., Musikacharoen, T., Johnson, T., Kraft, A., Yoshikai, Y. A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase is an important negative regulator of lipopolysaccharide-mediated c-Jun N-terminal kinase activation in mouse macrophage cell lines. (2001) *Molecular and cellular biology* **20**, 6999-7009
- Matyas, R.J., Huang, D., Adams, M.E. A comparison of various “housekeeping” probes for northern analysis of normal and osteoarthritic articular cartilage RNA. (1999) *Connect Tissue* **40**, 163-172
- Mauro, L.J. and Dixon, J.E. 'Zip codes' direct intracellular protein tyrosine phosphatases to the correct cellular 'address'. (1994) *Trends Biochem Sci.* **4**, 151-155
- Mayer, B.J. & Baltimore, D. Signalling through SH2 and SH3 domains. (1993) *Trends Cell Biol.* **3**, 8-13
- Mighell, A.J., Smith, N.R., Robinson, P.A., Markham, A.F. Vertebrate pseudogenes. (2000) *FEBS Letters* **468**, 109-114
- Mosinger, B., Tillman, U., Westphal, H., Tremblay, M.L. Cloning and characterization of a mouse cDNA encoding a cytoplasmic protein-tyrosine-phosphatase. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 499-503
- Mourey, R. J., Vega, Q.C., Campbell, J.S., Wenderoth, M.P., Hauschka, S.D., Krebs, E.G., and Dixon, J.E. A novel cytoplasmic dual specificity protein tyrosine phosphatase implicated in muscle and neuronal differentiation. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 3379-3802
- Muda, M., Boschert, U., Dickinson, R., Martinou, J.-C., Martinou, I., Camps, M., Schlegel, W., and Arkinstall, S. MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 4319-4326

- Muda, M., Boschert, U., Smith, A., Antonsson, B., Gillieron, C., Chabert, C., Camps, M., Martinou, I., Ashworth, A., and Arkinstall, S. Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 5141-5151
- Mustelin, T. and Altman, A. Dephosphorylation and activation of the T cell tyrosine kinase pp56lck by the leukocyte common antigen (CD45). (1990) *Oncogene* **5**, 809-813
- Mustelin, T., Pessa-Morikawa, T., Autero, M., Gassmann, M., Anderson, L.C., Gahmberg, C.G., Burn, P. Regulation of the p56fyn protein tyrosine kinase by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. (1992) *Eur. J. Immunol.* **22**, 1173-1178
- Mustelin, T. and Burn, P. Regulation of src family tyrosine kinases in lymphocytes. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 215-220
- Myers, M.P., Stolarov, J.P., Eng, C., Li, J., Wang, S.I., Wigler, M.H., Parsons, R., Tonks, N.K. PTEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual specificity phosphatase. (1997) *Proc. Natl. Sci. USA* **94**, 9052-9027
- Nesbit, M.A., Hodges, M.D., Campbell, L., Little P.F., Davies, K.E. Genomic Organization and Chromosomal Localization of a Member of the MAP Kinase Phosphatase Gene Family to Human Chromosome 11p15.5 and a Pseudogene to 10q11.2. (1997) *Genomics* **42**, 284-294
- Olsen, M.A., Schechter, L.E. Cloning, mRNA localization and evolutionary conservation of a human 5-HT7 receptor pseudogene. (1999) *Gene* **227**, 63-69
- Osborne, R.J., Hamshere, M.G. A genome-wide map showing common regions of loss of heterozygosity/allelic imbalance in breast-cancer. (2000) *Cancer Res.* **60**, 3706-3712
- Palmieri, S. Oncogene requirements for tumorigenicity: cooperative effects between retroviral oncogenes. (1989) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **148**, 43-91
- Pawson, T. Protein modules and signalling networks. (1995) *Nature* **373**, 573-580
- Pingel, J.T. and Thomas, M.L. Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. (1989) *Cell* **58**, 1055-1065
- Plowman, G.D., Ullrich, A., Shawver, L.K. Receptor tyrosine kinases as targets for drug intervention. (1994) *DN&P* **7**, 334-339
- Pot, D.A. and Dixon, J.E. A thousand and two protein tyrosine phosphatases (1992) *Biochem. Biophys. Acta* **1136**, 35-43

- Ramos-Onsins, S., Aguade, M. Molecular evolution of the Cecropin multigene family in Drosophila. functional genes vs. pseudogenes. (1998) *Genetics* **150**, 157-171
- Rohan, P.J., Davis, P., Moskaluk, C.A., Kearns, M., Krutzsch, H., Siebenlist, U., Kelly, K. PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. (1993) *Science* **259**, 1763-1766
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Ehrlich, H.A., Arnheim, N. (1985) *Science* **230**, 1350-1354
- Samuelson, L.C., Wiebauer, K., Snow, C.M., Meisler, M.H. Retroviral and pseudogene insertion sites reveal the lineage of human salivary and pancreatic amylase genes from a single gene during primate evolution. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2513-2520
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **74**, 5463-5467
- Saxena, M., Mustelin, T. Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase. (2000) *Semin. Immunol.* **12**, 387-396
- Scagos, G. und Ruddle, F.H. Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells – a review. (1981) *Gene* **14**, 1-10
- Scarpulla, R.C. Processed pseudogene for rat cytochrome c are preferentially derived from one of three alternate mRNAs (1984) *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2279-2288
- Schlessinger, J. Cellular signalling by receptor tyrosine kinases. (1995) *The harvey lectures* **89**, 105-123
- Schmid C.W. Does SINE evolution preclude Alu function? (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 4541-4550
- Seifert R.A., Hart, C.E., Phillips, P.E., Forstrom, J.W., Ross, R., Murray, M.J., Bowen-Pope D.F. Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. (1989) *J Biol Chem.* **264**, 8771-8778
- Shin, D.-Y., Ishibashi, T., Choi, T.S., Chung, E., Chung, I.Y., Aaronson, S.A., Bottaro, D.P. A novel human ERK phosphatase regulates H-ras and v-ras signal transduction. (1997) *Oncogene* **14**, 2633-2639
- Soares, M.B., Schon, E., Henderson, A., Karathanasis, S.K., Kate, R., Zeitlin, S., Chirgwin, J., Efstratiadis, A. RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. (1985) *Mol. Cell Biol.* **5**, 2090-2103.
- Streuli, M. Protein tyrosine phosphatases in signaling. (1996) *Current Opinion in Cell Biology* **8**, 182-188

- Sun, H., Charles, C. H., Lau, L., Tonks, N.K. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. (1993) *Cell* **75**, 487-495
- Sun, T. and Tonks, N.K. The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 480-485
- Swarup, G., Kamatkar, S., Radha, V., Rema, V. Molecular cloning and expression of a protein-tyrosine phosphatase showing homology with transcription factors fos and jun. (1991) *FEBS Letters* **280**, 65-69
- Tachida, H., Kuboyama, T. (1998) Evolution of multigene families by gene duplication. A haploid model. *Genetics* **149**, 2147-2158
- Tanoue, T., Moriguchi, T., Nishida, E., Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 19949-19956
- Theodosiou, A. M., Roudrigues, N.R., Nesbit, M.A., Ambrose, H.J., Davies, K.E. A member of the Map kinase phosphatase gene family in mouse containing a complex trinucleotide repeat in the coding region. (1996) *Hum. Mol. Genet.* **4**, 1499-1507
- Thomas, M.L., Barclay, A.N., Gagnon, J. and Williams, A.F. Evidence from cDNA clones that the rat leukocyte-common antigen (T200) spans the lipid bilayer and contains a cytoplasmic domain of 80,000 Mr. (1985) *Cell* **41**, 83-93
- Tonks, N.K., Charbonneau, H., Diltz, C.D., Fischer, E.H., Walsh, K.A. Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. (1988) *Biochemistry* **27**, 8695-8701
- Ullrich, A., Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. (1990) *Cell* **61**, 203-212
- van der Geer, P., Hunter, T. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. (1994) *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 251-337
- Vanin, E.F., (1985) Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annu. Rev. Genet.* **19**, 253-272
- Vogelstein, B. und Gillespie, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76,** 615-619
- Wagener, C. Molekulare Onkologie. (1999), Thieme, Stuttgart, New York
- Ward, Y., Gupta, S., Jenson, P., Wartmann, M., Davis, R.J., Kelly, K. Control of map kinase activation by the mitogen-induced threonine/tyrosine phosphatase PAC-1. (1994) *Nature* **367**, 651-654

- Wasylyk, B., Hagman, A., Gutierrez-Hartmann, A., Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. (1998) *Trends Biochem. Sci.* **23**, 213-216
- Weiss, A. and Littman, D.R. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. (1994) *Cell* **76**, 263-274
- Williams, I.J., Abuzenadah, A., Winship, P.R., Preston, F.E., Dolan, G., Wright, J., Peake, I.R., Goodeve A.C. Precise carrier diagnosis in families with haemophilia a: use of conformation sensitive gel electrophoresis for mutation screening and polymorphism analysis. (1998) *Thormb. Haemost.* **79**, 723-726
- Woodford-Thomas, T.A., Rhosdes, J.D., Dixon, J.E. Suppression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src transformed mouse 3T3 fibroblasts. (1992) *J. Cell Biol.* **117**, 401-414
- Woodson, S.A. und Crothers, D.M. Binding of 9-aminoacridine to bulged-base DNA oligomers from a frame-shift hot spot. (1988) *Biochemistry* **27**, 8904-8914
- Yaffe, M.B., Leparc, G.G., Lai, J., Obata, T., Volinia, S., Cantley, L.C. A motif-based profile scanning approach for genome wide prediction of signaling pathways. (2001) *Nature Biotech.* **19**, 348-353
- Yarden, Y., Ullrich, A. Growth factor receptor tyrosine kinases. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 443-478
- Zander, N.F., Cool, D.E., Diltz, C.D., Rohrschneider, L.R., Krebs, E.G., Fischer, E.H. Suppression of v-fms-induced transformation by overexpression of a truncated T-cell protein tyrosine phosphatase. (1993) *Oncogene* **8**, 1175-1182
- Zhang, Z., Harrison, P.M., Liu, Y., Gerstein, M. Millions of Years of Evolution Perserved: A Chomprehensive Catalogue of the Processed Pseudogenes in the Human Genome. (2003) *Genome Res.* **13**, 2541-2558
- Zhang, Z.Y. and Dixon, J.E. Protein tyrosine phosphatases: mechanism of catalysis and substrate specifity. (1994) Adv. Enzymol. Relat. *Areas Mol. Biol. USA* **68**, 1-36
- Zheng, C.F., and Guan, K.L. Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-_activated protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 16116-16119
- Zheng, X.M., Wang, Y., Pallen, C.J. Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase. (1992) *Nature* **359**, 336-339
- Zwick, E., Bange, J., Ullrich, A. Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. (2002) *Trends in molecular medicine* **8,** 17-23

ABKÜRZUNGEN

’	Minute
’’	Sekunde
A	Adenin
Ak.	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BRCA1; 2	Brustkrebsgen Nr.1; 2
BSA	Rinder-Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CH2-Domäne	homologe Domäne zu cdc 25
CSF	Colony stimulating factor
CSGE	Conformaition Sensitive Gel Electrophoresis
c-src	Protoonkogen des Rous sarcoma virus
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
DMEM	Dubecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds DNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
DUSP(s)	dual-spezifische Phosphatase(n)
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fötales Kälberserum
FW	forward
G	Guanin
fyn	Protoonkogen der Tyrosinkinase fyn
GDP	Guanosindiphosphat
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H_2O_{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyl)-piperazin-N’-2-ethansulfonsäure
HER	humaner EGFR
HUGO	humanes Genomprojekt
hVH-x	homolog of vaccinia virus H1 phosphatase gene clone x
IP	Immunpräzipitation
JNK	c-jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen

KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
lck	Lymphozyten-spezifische Tyrosinkinase
LOH	Loss of heterozygosity
M	molar
MAP-Kinase	Mitogen activated protein kinase
MEK	MAP/ERK Kinase
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PCR-RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenlymethlysulfonylfluorid
PTB-Motive	Phosphotyrosine-Bindungsmotive
PTP(s)	Proteintyrosinphosphatase(n)
v-ras	Onkogen des rat sarkoma virus
RB	Retinoblastomgen
real-time PCR	Echt-Zeit-PCR (quantitativ)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsen	Ribonukleasen
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK(s)	Rezeptortyrosinkinase(n)
RV	reverse
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
SH 2, 3-Domäne	Src Homologie 2, 3 Domäne
Sos	son of sevenless
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ss DNA	einzelsträngige DNA
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris/HCl/EDTA
TEMED	N, N, N’, N’-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSG(s)	Tumorsuppressorgen(e)
TTE	Tris/Taurin/EDTA
TTP	Thymintriphosphat
U	Enzymaktivitätseinheit (Unit)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v-fms	Onkogen des McDonough feline sarcoma virus
VH1	vaccinia virus homologue phosphatase 1
Vol.	Volumen

ANHANG: ETABLIERUNG CSGE

Conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) ist eine zeitsparende Methode zur Suche nach neuen Mutationen und eignet sich besonders zum Screening einer großen Anzahl von Proben innerhalb kurzer Zeit. In dieser Arbeit wurde das System nach den Vorgaben von Ganguli (1993) etabliert.

Optimierung der Versuchsbedingungen

Um eine möglichst hohe Sensitivität bei der Detektion von neuen Mutationen zu erreichen, wurden die Versuchsbedingungen zur Durchführung der CSGE-Methode an bereits bekannten Polymorphismen ausgetestet und optimiert. Hierfür wurde das FGFR4-Gen herangezogen, welches in einigen Brustkrebszelllinien an der Nukleotidposition 1217 eine G ⟶ A Substitution trägt (Bange et al., 2002). Eine PCR-Reaktion mit den Primern FGFR4 FW/RV (siehe 2.1.9) liefert ein Produkt von 167 bp, wobei der FGFR4-Polymorphismus hier bei Basenpaar Nr. 80 liegt, d.h. die wichtige Voraussetzung für das Gelingen eines Mutationsnachweises mittels CSGE, dass die Genveränderung mindestens 50 bp von beiden Enden des Fragmentes entfernt ist (Williams et al., 1998), ist erfüllt.

Beladen des Gels, Laufbedingungen und DNA-Menge

Bei der Durchführung der Testläufe zur Etablierung von CSGE wurden die Bedingungen zur Heteroduplexbildung und Herstellung des Gels nach Protokoll 2.2.3 ausgeführt.
Zunächst wurden für das PCR-Fragment diejenigen Laufbedingungen (Laufzeit; Spannung; DNA-Menge) ermittelt, welche zu einer optimalen Auftrennung der Heteroduplexbanden auf dem Gel führen (keine Abbildung; Daten siehe Protokoll 2.2.3).
Weiterhin stellte sich als entscheidender Faktor für das Gelingen der Mutationsanalyse heraus, dass die Taschen im Gel, in welche die DNA eingefüllt wird, vor der Beladung von Gelresten befreit und anschließend mit TTE-Puffer mehrmals gründlich (fünfmal und öfter) gespült werden. Darüber hinaus erwies es sich als vorteilhaft, jede Geltasche einzeln kurz vor dem Beladen mit DNA ein weiteres Mal zu reinigen. (Im Gegensatz hierzu genügt es meist bei Elektrophoresegelen, die Taschen durch einmaliges Spülen von Gelresten zu reinigen.)

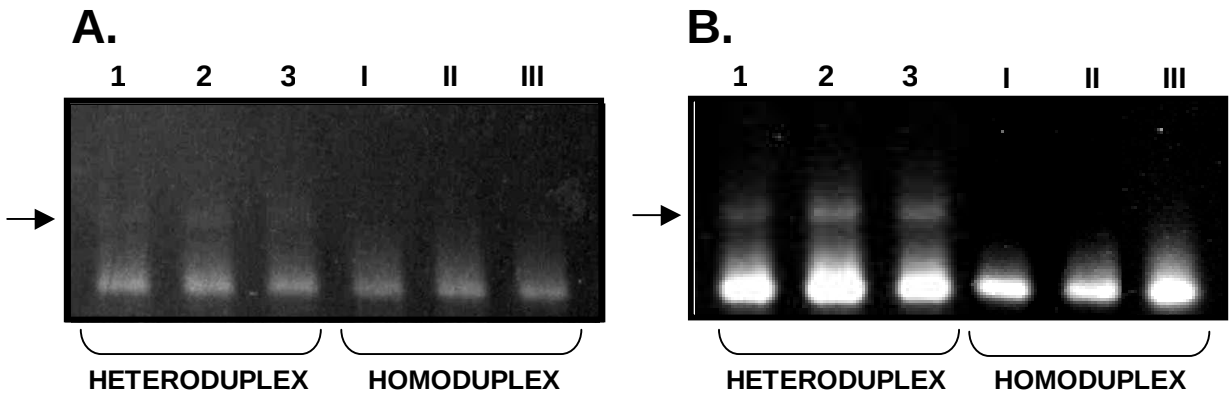


Abb. 36: CSGE Mutationsanalyse des FGFR4-Gens (167 bp PCR-Fragment)

Bei beiden CSGE-Gelen wurden jeweils PCR-Fragmente von drei DNA-Proben (1, 2 und 3) mit heterozygotem Polymorphismus und 3 DNA-Wildtypproben des FGFR4-Gens (I, II und III) unter verschiedenen Versuchsbedingungen (A und B) aufgetragen.

(*Zeichenerklärung*: ⟶ Heteroduplexbande)

A.: Geltaschen einmal gespült

B.: doppelte DNA – Menge von A.; Geltaschen achtmal gespült

Durch Variieren der DNA-Menge und gründliches Säubern der Geltaschen konnte die Qualität der Analyse optimiert werden (siehe Abb. 36). Jedoch fiel auf, dass sich die obere Heteroduplexbande im Vergleich zur unteren Bande in sehr viel geringerer Intensität detektieren ließ. Dies könnte unter Umständen die Auswertung späterer CSGE-Analysen bei der Suche nach Mutationen im hVH-5 – Gen erschweren.

Intensität der Heteroduplexbanden

Es sollte getestet werden, ob die Auftrennung einer anderen PCR-Produktgröße zur stärkeren Darstellung der oberen Heteroduplexbande im CSGE-Gel führt. Hierfür wurden in Kooperation mit dem Royal Hallamshire Hospital (Sheffield, UK) 2 DNA-Polymorphismen (an den Nukleotiden 1241: C→G und 1269: A→C) im Exon 14 des Faktor VIII-Gens untersucht. Zur Verfügung standen DNA-Proben von drei (einer weiblichen und zwei männlichen) Patienten, woraus mit Hilfe der Oligonukleotide 14F1 und 14F (siehe 2.1.9) ein 381 bp großes PCR-Fragment dieses Genabschnittes amplifiziert und mit der CSGE-Methode untersucht werden sollte. Die Lage des SNP im PCR-Fragment erfüllt die von Williams (1998) geforderten Bedingungen zum Detektionsnachweis bei CSGE (siehe oben). Da der Blutgerinnungsfaktor VIII x-chromosomal kodiert ist, können auf diesem Lokus nur Frauen eine heterozygote Gen-

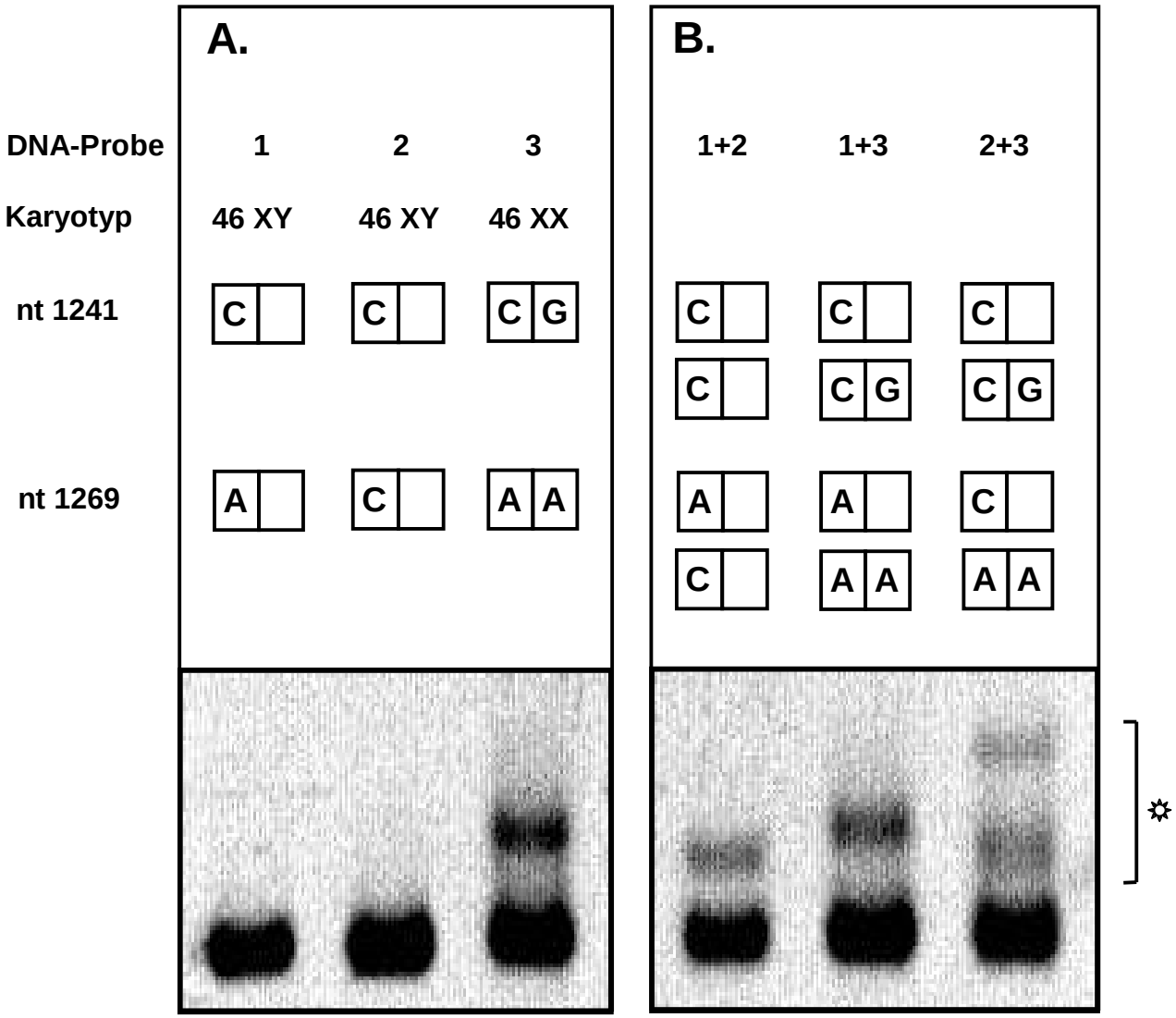


Abb. 37: CSGE-Mutationsanalyse des Gerinnungsfaktor VIII-Gens (381 bp PCR-Fragment)

A.: Analyse von PCR-Fragmenten aus DNA von drei englischen Patienten (Nr.1 männl., 2 männl. und 3 weiblich). Der heterozygote Polymorphismus C/G des Nukleotidpaares 1241 in Probe 3 läßt sich durch die markante Heteroduplexbande detektieren, deren Intensität wesentlich stärker ist als im 167 bp Fragment.

B.: Beim Vermischen der Proben können je nach Kombination unterschiedliche Heteroduplexe gebildet werden.

Proben:		neu gebildete heterozygote Genkombination:	Anzahl Heteroduplexbanden:
a)	1+2	nt 1269 A/C	eine
b)	1+3	nt 1241 C/G	eine
c)	2+3	nt 1241 C/G und nt 1269 A/C	zwei

Zeichenerklärung: Im Kasten ☐☐ sind jeweils die Allele der Nukleotidstellen 1241 und 1269 dargestellt. Männer: 1 Allel; Frauen: 2 Allele. Heteroduplexbanden befinden sich im mit ✡ markierten Bereich abgebildet. nt: Nukleotid

ausprägung aufweisen. Eine Mutationsanalyse der amplifizierten PCR-Fragmente dieser drei Patientenproben im CSGE-Gel ließ bei der weiblichen Patientin den schon bekannten Polymorphismus 1241: C/G erkennen. In Abb. XX A dargestellt, zeichnet sich die obere Heteroduplexbande bei der CSGE-Analyse im 381 bp Fragment stärker von der unteren Bande ab als die in Abb. XY dargestellte Bande des 167 bp Fragmentes.

Heteroduplexbildung durch Mischen zweier homozygoter DNA-Proben

Wie in Veröffentlichungen zur CSGE-Methode bereits beschrieben, kann die Heteroduplexbildung auch durch ein Gemisch zweier für ein Gen unterschiedlich ausgeprägter homozygoter DNA-Proben bewirkt werden. Abb. 37 zeigt, wie sich neue Heteroduplexbandenmuster durch jeweils verschiedene Zweierkombinationsmischungen der im vorigen Versuch verwendeten Patientenproben ergeben, indem diese wie in Protokoll 2.2.3 beschrieben miteinander gemischt werden.

Es wurde beobachtet, dass das Wanderungsverhalten der oberen DNA-Bande im Gel einen Hinweis darauf geben kann, ob die untersuchten Proben identische Mutationen tragen: Ein Mix aus Patientenprobe 1+2 führt zur Heterozygotie A/C an der Nukleotidstelle 1269. Hier trennt sich die Heteroduplexbande jedoch weniger weit von der unteren Bande auf als beim Vorliegen des C/G Genotyps an Nukloetid 1241, der sich auch beim Mischen von 1+3 erkennen lässt.

Anscheinend kann CSGE auch über die Anzahl der im untersuchten PCR-Produkt vorliegenden Mutationen eine Prognose liefern: Das Bild dreier übereinander liegender Banden (entspricht zwei Heteroduplexbanden) ergibt sich aus der Kombination der Proben 2+3: Die mittlere Bande stellt eine sich aus dieser Mischung ergebende Heterozygotie A/C an der Nukleotidstelle 1269 dar und liegt in etwa gleichem Abstand zur untersten Bande wie beim identischen Genotyp aus dem Mix von 1+2. Ebenso steht die oberste der drei Banden zur mittleren im selben Verhältnis wie die zwei Banden aus der Mischung 1+3 und deuten damit auf eine C/G Heterozygotie hin.

Somit konnten mittels CSGE alle vorliegenden Genveränderungen gezeigt, bzw. sogar deren Anzahl festgestellt werden.

LEBENSLAUF

Ingemarie Regina Edith Berger

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Geburtstag:	26.01.1979
Geburtsort:	Augsburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch

SCHULE

1985-1989	Hans-Adlhoch-Grundschule in Augsburg
1989-1996	Gymnasium Maria Stern in Augsburg
1996-1998	Gymnasium bei St. Stephan in Augsburg
06/1998	Abitur

STUDIUM

ab WS 1998	Humanmedizin an der LMU München
08/2000	ärztliche Vorprüfung
08/2002	erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03/2004	zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2005	dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

SS 2000	Aufnahmeprüfung Max-Planck-Institut f. Biochemie
2001-2004	Gastwissenschaftlerin im MPI für Biochemie; Abteilung Molekularbiologie
SS 01/WS 02	Freistellung von den Lehrveranstaltungen der LMU

AUSLANDSAUFENTHALTE

2003	AKH Wien, Anästhesie (professional exchange, DFA)
2004	Universitätsspital Basel, Chirurgie

VERÖFFENTLICHUNGEN

Berger, IR, Buschbeck, M, Bange, J, Ullrich, A. Identification of a transcriptionally active hVH-5 pseudogene on human chromosome 10q22.2 (2005) *Cancer genetics and cytogenetics.*159, 155-159

Berger, IR, Buschbeck, M, Bange, J, Ullrich, A. Homo sapiens protein tyrosine phosphatase VH-5 pseudogene, partial sequence. (2005) NCBI GenBank: AY661564; AY661565

DANKE

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders herzlich bei Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für die Vergabe des Promotionsthemas, seine Unterstützung, Ideen und sein Interesse am Fortschritt der Arbeit sowie für die Bereitstellung bester Arbeitsmöglichkeiten und für die Freiräume beim Bearbeiten des Projektes bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Manfred Thiel bedanke ich mich herzlich für ihre Bereitschaft, meine Doktorarbeit an der Fakultät für Medizin zu vertreten.

Mein ganz herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Marcus Buschbeck, ohne dessen herausragende Sachkenntnis, Rat und Hilfe diese Arbeit so nicht hätte abgeschlossen werden können.

Herrn Dr. Johannes Bange danke ich für die freundschaftliche Unterstützung bei der Bearbeitung des Projektes und seine Hilfsbereitschaft bei allen Fragen.

Herzlichen Dank an Dr. Anne Goodeve und ihre Mitarbeiter im Royal Hallamshire Hospital (Sheffield, UK) für die freundliche Kooperation. Mit ihrer Hilfe und den zur Verfügung gestellten Materialien konnte die Etablierung der CSGE-Methode sehr erleichtert werden.

Vielen Dank an Dr. Anja Ruschel für die vielen praktischen sowie persönlichen Ratschläge und die schöne Zeit im gemeinsamen Labor G 132.

Danken möchte ich Dr. Tina Bauer für ihre unabkömmliche persönliche Unterstützung und vor allem für die schönen gemeinsamen Kammermusikstunden während der Labor-Pausen. Danke für die professionelle Klavierbegleitung am MPI-Flügel.

Meinen früheren und jetzigen Kollegen im Institut danke ich für deren Diskussionsbereitschaft und die Zusammenarbeit unter freundschaftlicher Atmosphäre in einer guten Laborgemeinschaft.

Danken möchte ich auch den Damen und Herrn in der „Medien- und Spülküche“ für ihre zuverlässige Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Traumstudium und die "Beurlaubung" für meine Arbeit im MPI und die Promotion ermöglicht haben.