

6 Ergebnisse

6.1 Genetische Struktur und genetische Varianten im Gen für α -Fibrinogen

Die DNA von 95 Hochrisikopatienten der ECTIM-Studie (vgl. Kapitel „Patientenkollektiv“) wurde mittels genomischer PCR unter Verwendung verschiedener Primerpaare und SSCP-Analyse das Gen α -Fibrinogen auf mögliche genetische Varianten untersucht. Ein unterschiedliches Laufverhalten einzelner PCR-Produkte in der SSCP-Analyse konnte mittels Sequenzanalyse ein Basenaustausch an der Stelle 3237 bestätigt werden.

Dies entspricht der 37. Base nach Ende des Exon 4. Es handelt sich dabei um einen Austausch einer Thyminbase durch eine Adeninbase (T→A), siehe Abb. 14.

Bei den 95 Hochrisikopatienten trat der Polymorphismus mit einer Allelfrequenz von weniger als 1% auf.

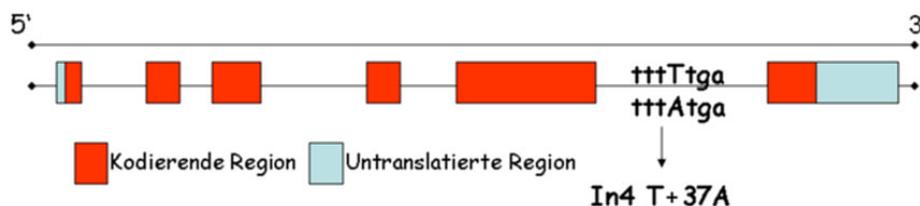


Abb. 14: schematischer Aufbau und identifizierte Varianten im α -Fibrinogen

Die orange markierten Elemente zeigen die Regionen der exonischen Sequenzen, die hellblauen Elemente zeigen 5'- und 3'-untranslatierte Regionen, die nicht markierten Regionen zeigen die intronischen Sequenzen auf.

Eine Vergleichsanalyse mit der NCBI SNP Datenbank brachte keine Übereinstimmung der gefundenen Variante mit denen der dort aufgeführten. Es ist daher keine abschließende Bewertung der Häufigkeit dieses Polymorphismus' in großen Studienpopulationen möglich.

6.2 Genetische Struktur und genetische Varianten im Gen für γ -Fibrinogen

Bei 95 Hochrisikopatienten wurde mittels genomischer PCR unter Verwendung verschiedener Primerpaare und SSCP-Analyse das Gen für γ -Fibrinogen auf potentielle Polymorphismen untersucht. Ein unterschiedliches Laufverhalten

einzelner PCR-Produkte in der SSCP-Analyse konnte bei dem Primerpaar 12 beobachtet werden, ein Basenaustausch an der Stelle 10070 mittels Sequenzanalyse konnte bestätigt werden.

Dies entspricht der 2. Base nach dem Stop-Codon (Stop A+2C). Dabei wird eine Adeninbase durch eine Cytosinbase ersetzt (A→C) (Abb. 15).

Bei den 95 Hochrisikopatienten trat der Polymorphismus mit einer Allelfrequenz von weniger als 1% auf.

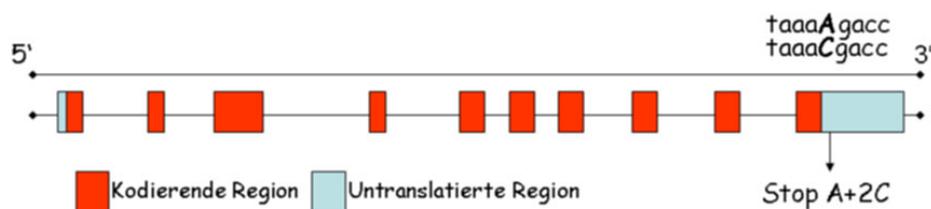


Abb. 15: schematischer Aufbau und identifizierte Varianten im γ -Fibrinogen

Die orange markierten Elemente zeigen die Regionen der exonischen Sequenzen, die hellblauen die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen, die nicht markierten Regionen zeigen die intronischen Sequenzen.

6.3 Genetische Struktur und genetische Varianten im Gen für ELA2

Nach PCR-Amplifikation der 95 Hochrisikopatienten mit jedem Primerpaar und anschließender SSCP-Analyse ergaben sich Auffälligkeiten in verschiedenen Primerpaaren.

Nach durchgeführter Sequenzierung wurde beobachtet, dass einige genetische Varianten in diesem Gen sehr selten sind, dass heißt, dass diese Varianten bei jeweils nur einem Patienten beobachtet wurden. Um zu verhindern, dass seltene und potenziell funktionelle Mutationen übersehen werden, wurde die Anzahl der zu untersuchenden Patienten per SSCP-Analyse erhöht. Die Anzahl der DNA-Proben ist daher von 95 auf 1152 Individuen der ECTIM-Studie (bestehend aus Patienten und Kontrollen) erhöht worden um die komplette kodierende Region zu analysieren.

1	ttgtcagagc	cccagctggt	gtccagggac	tgaccgtgag	cttgggtgaa	agtgagttcc	
61	cggttgagg	caccagacga	ggagaggatg	gaaggcctgg	cccccaagaa	tgagccctga	
121	ggttcaggag	cggttgagg	gagccgcccc	cagatctccg	tccagctgce	ggtcccagag	
181	gcctgggta	cactcggagc	tctctgggga	ggcccttgac	gtgctcagtt	cccaaacagg	
241	aacctggga	aggaccagag	aagtgcctat	tgccgagtg	gtgcccaca	cagctgcatg	Repeat-Region
301	tgcccggtat	cacagggccc	tggttaaact	gaggcaggcg	acacagctgc	atgtggccgg	
361	tatcacaggg	ccctgggtaa	actgaggcag	gcgacacagc	tgcatgtggc	cggtatcaca	
421	gggccctggg	taaaactgag	caggcgacac	agctgcatgt	ggccggatc	acagggccct	Del 53 bp
481	gggtaaaactg	aggcaggcga	cacagctgca	tgtggccgg	atcacggggc	cctggataaa	G→A
541	cagaggcagg	cgaggccacc	cccatacaagt	ccctcaggtc	taggtttggc	caggtttgga	
601	aaaacacagc	aacgctcggg	aaatctgaat	tccgggtaag	tatacctcgg	gcctcatttg	
661	gaagagactt	agattaaaaa	aaaaacgtcg	agaccagccc	ggccaacacg	tgaaacccc	
721	tctctactaa	aaatacaaaa	aattagccag	gcgcagtgct	cacgctctgt	atcccagcac	
781	tctgggaggt	gaggcaggcg	gatcacccga	ggtcagctgt	tcaagaccag	cctggccgag	
841	tgggcgaaac	actgtctcta	ctacaaatac	aaaaattagc	cgggagtgga	ggcagggtgc	
901	tgtaatctca	gctattcagg	aggctgaggc	aggagaatca	cttgaacctg	ggaggcggag	
961	gttgccgaga	gcggggatca	gcaccacgca	ctccagcctg	ggcgatagag	caagactctg	
1021	tctocaaaaa	aataaattaa	aaaaccacac	ttgattatct	gacatttgaa	tgcgattgtg	
1081	catcctgaat	tttgtctgga	ggccccaccc	gagccaatcc	agcgtcttgt	cccccttctc	
1141	ccccttttca	tcaacgcctg	tgccagggga	gaggaagtgg	agggcgctgg	ccggccgtgg	
1201	ggcaatgcaa	cggcctccca	gcacagggct	ataagaggag	cggggcgctg	acggaggggc	TATA-Box
1261	agagaccocg	gagccccagc	cccaccatga	ccctcggccg	ccgactcggc	tgtcttttcc	EXON 1
1321	tcgcctgtgt	cctgcccggc	ttgctgctgg	ggggtgagtt	tttgagtcca	acctcccgt	
1381	gctccctctg	tcccgggttc	tgttcccacc	tctccataga	gggcccacc	agtgtgggtc	
1441	cctcatcctc	acaggggagg	tgcccagctgg	gcaaaaggaga	ccagaagaga	ctgaggttct	
1501	gagcgggtaa	gccaccacca	ggagcccaga	gttggggttt	gaaaaccggg	gagggggggg	
1561	gtggcaggtc	gcccctctgg	ttcaagtcca	ggtctgtctg	tgccctggag	gggcaccctg	
1621	gggaggtccc	tttgctctc	ctgtgctcag	tttctcctc	tgaacaacag	gggtgcgaac	
1681	ggccccgata	cctgggttcc	ccgggtgggg	atccagaggc	cccgtggccg	ggaggggaca	
1741	ggctccttgg	caggcactca	gcacccgcac	ccgggtgtgc	cccaggcacc	gcgctggcct	EXON 2
1801	cgagatttgt	ggggggccgg	cgagcgcggc	cccacgcctg	gcccctcatg	gtgtccctgc	
1861	agctgcgcgg	aggccacttc	tgccggccca	ccctgattgc	gcccacttc	gtcatgtcgg	
1921	ccgcgcaactg	cgtggcgaat	gtgtgagtag	ccgggagtag	gcgcgcccgg	ctcggacccc	
1981	gcgtcccggg	ctgtgaggtg	gggtggggga	ggccggggcc	ggggctgctg	gcgggggggg	
2041	gtccgtccag	ggccccggg	gcccctcgag	caccttcgcc	ctcaggcccg	tcccgggatg	
2101	gggacgacaa	ggcgggctg	agccccgacc	cccggggccg	cccctgagcc	ccgcctctcc	
2161	ctcttttggc	agaaaacttc	cgcggtgctg	gggtgctcgt	ggagcccata	acctctcgg	EXON 3 G→A
2221	gcgggagccc	accggcagg	tgttcgccgt	gcagcgcctc	ttcgaaaacg	gctacgacc	
2281	cgtaaaacttg	ctcaacgaca	tcgtgattct	ccaggtgccc	ccgggcgggc	gggggcgagg	
2341	ggggaggccc	agaggcctgg	ggagggtgga	ggcctgggga	gggtggaggc	tgccagcggg	C→T
2401	gggcgcctc	ggccgcctc	tggggacctg	gggtggcctc	gtgggctggg	tggctcccctc	
2461	tcggcgctc	ggtctgcacc	tctgtgaaac	gggaaaatac	ggcccatggg	ccgttgaggg	C→T
2521	gttaaatgag	atcctgcagg	gaggccccga	tctgtgtca	atcaacaaac	ttactgagaa...	
...4381	agaaccacag	tggaacctga	gatggggaaa	ctgaggcccg	gagaggggag	ggtcatcatc	
4441	actgccccgt	gtgacgcgct	gacgatctgt	ccccaccgcc	acagctcaac	gggtcggcca	EXON 4 C→T
4501	ccatcaacgc	caacgtcgag	gtggcccagc	tgcccggctca	gggacgcgcc	ctgggcaacg	G→T
4561	gggtgcagtg	cctggccatg	ggctggggcc	ttctgggcag	gaaccgtggg	atcgcagcgc	
4621	tctgcagga	gctcaacgtg	acgggtggtga	cttccctctg	ccgtcgcagc	aacgtctgca	
4681	ctctcgtgag	ggcccgccag	gcccggctct	gtttcgtacg	tgccctgggt	gtccctctgc	
4741	tccccaccgg	ctcccagccc	ggtactgcag	caacagggc	cgtggctaga	ccctaggatg	
4801	ggacttccca	accctgacac	gtcggcgggg	agggtggcag	ggcctcgcag	tcagacttcc	C→T
4861	caacctgtc	tgccctcaca	gggggactc	ggcagcccct	tggtctgcaa	cgggctaatac	EXON 5 C→A
4921	caaggaaatg	cctcctctgt	ccggggaggc	tgccgctcag	ggctctacc	cgatgccttt	
4981	gccccgggtg	cacagtttgt	aaactggatc	gactctatca	tccaacgctc	cgaggacaac	G→T
5041	ccctgtcccc	accctcggga	cccggacccc	gccagcagga	cccactgaga	agggctgccc	C→T
5101	gggtcacctc	agctgcccac	accacactc	tccagcatct	ggcacaataa	acattctctg	
5161	ttttgtagaa	tgtgtttgat	gctccttggc	tgtgtgattg	gggttgtaaa	atggtcagta	
5221	ggtcggcgt	ggtggctcac	acctgtaac	ccagcacttt	gggaggttga	ggcagggcga	
5281	tcacttgagc	tc					

Abb. 16: Sequenz für humane Neutrophile Elastase

- Gelbe Boxen: Exons
- Grüne Boxen: Translationsstart und -ende
- Unterstrichene Sequenz: Signalpeptid
- Blau/violette Boxen: Repeat-Region im Promotor
- Rot: gefundene Polymorphismen und Mutationen

Die folgende Tabelle fasst nochmals alle gefundenen Varianten im ELA2 Gen und deren genaue Position in der Sequenz sowie deren Häufigkeit in den untersuchten

Patienten zusammen. Vergleiche dazu das Kapitel 5.6 „Nomenklatur der identifizierten Polymorphismen“.

Variante	Region	Position in der Sequenz	Häufigkeit (Anzahl der Patienten mit der gefundenen Variante)
G-761A	Promoter	G525A	häufig, ca. 21%
-852Del53bp	Promoter	434	1
Arg50His	Exon 3	G2181A	2
C+29/In3T	Intron 3	C2343T	1
C+149/In3T	Intron 3	C2463T	4
Asn81Asn	Exon 4	C4487T	6
Gly93Val	Exon 4	G4543T	1
C+137/In4T	Intron 4	C4852T	2
Ser173Ser	Exon 5	C4890A	häufig, ca. 22%
Asp222Tyr	Exon 5	G5035T	1
Pro228Pro	Exon 5	C5054T	1

Tabelle 4: Häufigkeit und Position gefundener Varianten im Gen für ELA2

Gezeigt werden die gefundenen Varianten, deren Auftreten im Gen und die Anzahl der Träger der Varianten, die in 1152 untersuchten Individuen identifiziert wurden.

Bei dem häufigen Polymorphismus Ser173Ser findet der Austausch C/A in der 3. Base des Triplets statt. Es kommt hier nicht zu einer Änderung der Aminosäure auf Proteinebene, d.h. die Aminosäure Serin an der Proteinstelle 173 bleibt erhalten.

Im Anschluss an die PCR-SSCP Analyse erfolgte die Genotypisierung der ECTIM-Studie für die beiden häufigen Varianten mittels ASO-Hybridisierung.

G526A (entspricht -761 im Promotor) und C4890A (entspricht S173S im Exon 5)

6.3.1 Genotypisierung

Nur die Varianten G-761A und Ser173Ser sind häufige Varianten. Die statistische Analyse ergab ein Kopplungs-Ungleichgewichtskoeffizienten von +0,82 ($p < 0,001$). Sämtliche anderen Varianten sind seltene Mutationen und traten mit einer Häufigkeit von weniger als 0,6% auf.

Die Haplotypenfrequenz für die beiden häufigen Varianten ist in der folgenden Tabelle dargestellt. 1 bedeutet dabei das häufige (Wildtyp) Allel und 2 das seltenere (Mutante) Allel.

		Haplotypenfrequenz				
Polymorphismen		Status		Kontrollen nach geografischer Herkunft		
-761	S173	Patienten	Kontrollen	Glasgow	Belfast	Straßburg
1	1	0,73	0,75	0,73	0,74	0,77
1	2	0,04	0,02	0,04	0,03	0,02
2	1	0,07	0,08	0,08	0,08	0,07
2	2	0,16	0,15	0,15	0,16	0,14

Tabelle 5: Haplotypenfrequenz zwischen den Varianten -761 und Ser173.

Dargestellt sind die häufigen Varianten im ELA2 Gen und deren Haplotypenfrequenz, unterteilt in Patienten und Kontrollen sowie deren geografische Herkunft

Folgende Beobachtungen wurden dabei gemacht:

- Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen $p=0,19$
- Unterschiede zwischen den Studienzentren $p=0,37$
- Unterschiede zwischen Großbritannien und Frankreich $p=0,69$

6.3.2 Häufigkeitsverteilung des Promotorpolymorphismus G-761A

In den folgenden Tabellen sind die Häufigkeiten des Polymorphismus G-761A innerhalb der einzelnen Studienzentren aufgeführt.

Glasgow	11	12	22	total	Allelfrequenz Seltenes Allel
Myokardinfarkt	230	126	14	370	0,208
Kontrolle	206	125	17	348	0,228
total	436	251	31	718	0,218

Tabelle 6: Häufigkeit G-761A in Glasgow

Dargestellt ist die Häufigkeit des Promotorpolymorphismus in Patienten und Kontrollen in Glasgow; 11 homozygot Wildtyp = GG, 12 heterozygot = GA, 22 homozygot Mutante = AA

Belfast	11	12	22	total	Allelfrequenz Seltene Allel
Myokardinfarkt	217	178	24	419	0,270
Kontrolle	220	150	16	386	0,236
total	437	328	40	805	0,253

Tabelle 7: Häufigkeit G-761A in Belfast

Dargestellt ist die Häufigkeit des Promotorpolymorphismus in Patienten und Kontrollen in Belfast; 11 homozygot Wildtyp = GG, 12 heterozygot = GA, 22 homozygot Mutante = AA

Straßburg	11	12	22	total	Allelfrequenz Seltene Allel
Myokardinfarkt	123	64	5	192	0,193
Kontrolle	101	56	6	163	0,209
total	224	120	11	355	

Tabelle 8: Häufigkeit G-761A in Straßburg

Dargestellt ist die Häufigkeit des Promotorpolymorphismus in Patienten und Kontrollen in Straßburg; 11 homozygot Wildtyp = GG, 12 heterozygot = GA, 22 homozygot Mutante = AA

Sämtliche Zentren	11	12	22	total	Allelfrequenz Seltene Allel
Myokardinfarkt	570	368	43	981	0,231
Kontrolle	527	331	39	897	0,228
total	1097	699	82	1878	

Tabelle 9: Häufigkeit G-761A in allen Zentren

Dargestellt ist die Häufigkeit des Promotorpolymorphismus in Patienten und Kontrollen jeder geografischer Herkunft; 11 homozygot Wildtyp = GG, 12 heterozygot = GA, 22 homozygot Mutante = AA

Die Allelfrequenzen sind mit $p=0,95$ zwischen Patienten und Kontrollen und getrennt nach Studienzentrum, nicht signifikant, es besteht daher kein Unterschied.

6.3.3 Auswertung des Polymorphismus Ser173Ser (C/A)

In den folgenden Tabellen sind die Häufigkeiten der Basen C und A des Polymorphismus Serin173 in den Patienten und Kontrollen der ECTIM-Studie unterteilt nach Zentren aufgeführt.

Sämtliche Zentren	11	12	22	total	Allelfrequenz Seltene Allel
Myokardinfarkt	629	330	31	990	0,198
Kontrolle	611	272	21	904	0,174
total	1240	602	52	1894	0,186

Tabelle 10: Häufigkeit Ser173Ser in allen Zentren

11 homozygot Wildtyp = CC, 12 heterozygot = CA, 22 homozygot Mutante = AA

Die Berechnung von Patienten und Kontrollen mit den Genotypen 11 gegenüber den Genotypen 12 und 22, getrennt nach Studienzentren ergab einen p -Wert von 0,056. Daher werden hier nochmals die einzelnen Zentren aufgeführt:

Glasgow	11	12	22	total	Allelfrequenz Seltene Allel
Myokardinfarkt	233	130	10	373	0,201
Kontrolle	231	110	9	350	0,183
total	464	240	19	723	0,192

Tabelle 11: Häufigkeit Ser173Ser in Glasgow

11 homozygot Wildtyp = CC, 12 heterozygot = CA, 22 homozygot Mutante = AA

11 versus 12+22: $p=0,33$

Belfast	11	12	22	total	Allelfrequenz Seltene Allel
Myokardinfarkt	252	151	21	424	0,228
Kontrolle	263	120	7	390	0,172
total	515	271	28	814	0,201

Tabelle 12: Häufigkeit Ser173Ser in Belfast

11 homozygot Wildtyp = CC, 12 heterozygot = CA, 22 homozygot Mutante = AA

11 versus 12+22: $p=0,018$

Straßburg	11	12	22	total	Allelfrequenz Seltene Allel
Myokardinfarkt	144	49	0	193	0,127
Kontrolle	117	42	5	164	0,116
total	261	91	5	357	0,141

Tabelle 13: Häufigkeit Ser173Ser in Straßburg

11 homozygot Wildtyp = CC, 12 heterozygot = CA, 22 homozygot Mutante = AA

11 versus 12+22: $p=0,49$

6.3.3.1 Myokardinfarkt

In den Studiengruppen aus Großbritannien ist das seltene A-Allel des S173S-Polymorphismus signifikant häufiger in Patienten zu finden, als in den Kontrollen (0,215 versus 0,177, $p=0,008$). In der Studiengruppe aus Straßburg konnte dieser Befund nicht beobachtet werden. Die Odds Ratio (OR) für Myokardinfarkt in Assoziation mit dem ELA2 173A-Allel beträgt für die Studienpopulation aus Großbritannien 1.28 (95% Konfidenzintervall, 1,04-1,58, $p=0,02$), getrennt nach Studienzentrum, Geschlecht und Alter.

6.3.3.2 Assoziation der Genotypen Ser173Ser mit anderen Phänotypen

Bei den Patienten konnten keine signifikanten Assoziationen zwischen Angina pectoris oder KHK mit dem Genotyp S173S gezeigt werden. In den Kontrollen gibt es keine signifikanten Assoziationen zwischen dem Genotyp für ELA2 173 und Hypertonie. Ebenfalls konnten keine Assoziationen zwischen den Genotypen und elterlichem Schlaganfall, Hypertonie oder Myokardinfarkt aufgezeigt werden.

Auch hinsichtlich Body Mass Index, Lipidstatus und hämostatischen Faktoren gibt es keine Unterschiede zwischen den Genotypen.

6.3.4 Weitere Varianten im ELA2 Gen

Sämtliche anderen gefunden Varianten im ELA2 Gen sind seltene Mutationen (Frequenz $\leq 1\%$). Die meisten Individuen tragen nur eine der identifizierten Mutationen. Ein Myokardinfarktpatient zeigt zwei Missense-Mutationen G93V und D222Y.

Sowohl die Mutation C+149/in3T als auch N81N sind bei einem Patienten als auch bei einer Kontrolle gefunden worden.

6.3.4.1 53 bp Deletion im Promotor

Besonderes Augenmerk verdient die 53 bp-Deletion an der Stelle -852 im Promotor des ELA 2 Gens dar. Sie betrifft eine funktionelle Transkriptionssequenz mit einem Repeat-Element (REP53) (Abb. 17), sodass hier ein funktioneller Effekt der Mutation auf die Transkription des ELA2 Gens vorliegen könnte.

Diese Mutation wurde in nur einem Patienten beobachtet, der dadurch auffiel, dass ein Myokardinfarkt bereits im Alter von 28 Jahren auftrat und eine positive Familienanamnese für das ACS bekannt ist: seine Mutter erlitt im Alter von 48 Jahren einen Herzinfarkt.

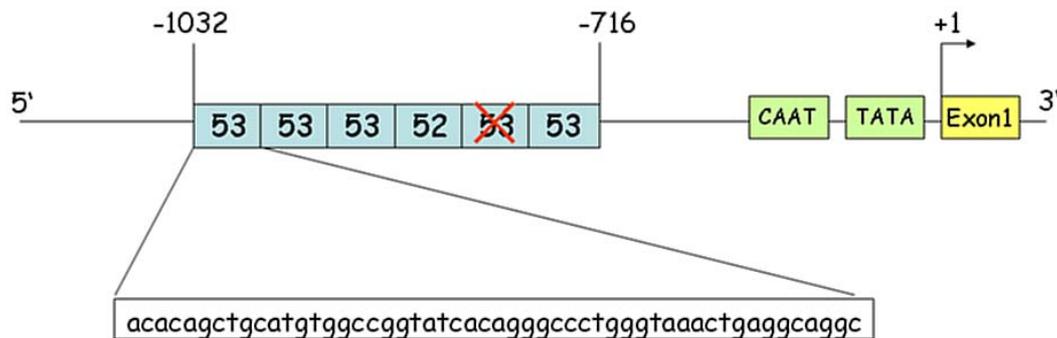


Abb. 17: Das REP53 Element im Promotor der ELA2 Sequenz.

Bei einem Patienten fehlt das 5. REP53 Element, dargestellt als durchgestrichene Box. Außerdem sind die typischen Promotorelemente im ELA2 Promotor gezeigt.

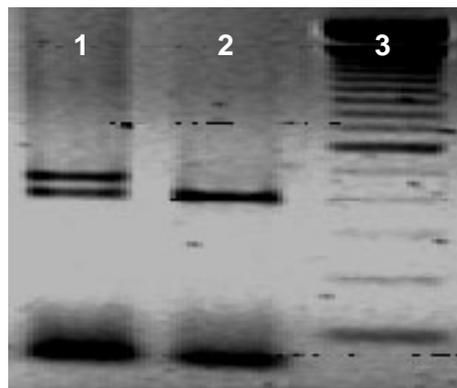


Abb. 18: Darstellung des fehlenden REP53-Element im Agarose-Gel

Anhand eines ca. 400bp großen Fragments aus dem Promotor von ELA2 kann die Deletion gezeigt werden.

In der ersten Tasche befindet sich DNA von dem heterozygoten Patienten, in der zweiten DNA von einer gesunden Kontrolle. Die dritte Tasche stellt einen 100 bp Größenstandard dar.

Um diese besondere Deletion genauer funktionell zu charakterisieren, wurden zwei unterschiedliche Promotor-Konstrukte mit und ohne jeweilige Repeat-Elemente kloniert, bei denen die Promotor-Aktivität der beiden Varianten untersucht werden sollte.

Wie unter Material und Methoden beschrieben, wurde die genomische DNA gewonnen und dann in ein Reporterplasmid überführt.

6.3.4.1.1 Transfektion der Promotorkonstrukte

Nach PCR der genomischen DNAs mit und ohne Deletion wurden die Fragmente wie beschrieben in den pGL3-Basic Vector subkloniert.

Eine Transfektion dieser Reporterplasmide fand in folgenden Zell-Linien statt:

- Murine Zell-Linie 32d
- Humane Zell-Linie HL60

Hierbei ist es sinnvoll, nur solche Zellen zu Promotorstudien heranzuziehen, die dem Stadium der Differenzierung entsprechen, in der ELA2 gebildet wird. Ein Beispiel für eine solche humane Zell-Linie ist die HL60 promyeloische Leukämie-Zell-Linie als ein Modell für frühe Knochenmarksvorläuferzellen.

6.3.5 Vorversuche zur Kultivierung der 32d Zell-Linie

6.3.5.1 Wachstumsverlauf der WEHI-3b Zell-Linie in Kultur

Die murine Zell-Linie WEHI-3b dient als Produzent von murinem IL3, welches für das Wachstum der 32d Zell-Linie benötigt wird. Die Wachstumskurve ergab folgendes:

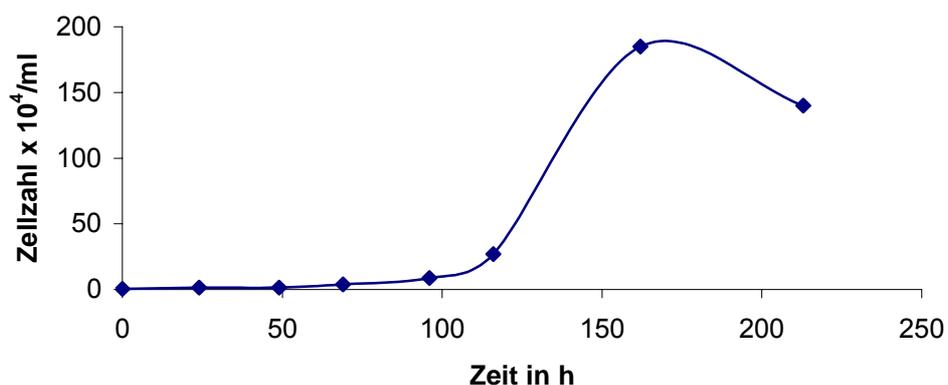


Abb. 19: Wachstumskurve WEHI-3b Zellen (n=1)

Ein exponentielles Wachstum findet bei ca. 1 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen pro ml Medium statt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen jeweils geerntet und nach der beschriebenen Prozedur zu einem konditionierten Medium verarbeitet.

6.3.5.2 Wachstumsverlauf der 32d Zell-Linie in Kultur

Eine Transfektion von Zellen erfolgt in der Phase des exponentiellen Wachstums. Daher war es notwendig zunächst eine Wachstumskurve für die gewählte Zell-Linie zu bestimmen. Dieses Wachstum wurde hierbei in Abhängigkeit von der Zeit und von der Menge an konditioniertem Medium (WEHI3b Zellen) gemessen (Abb. 20).

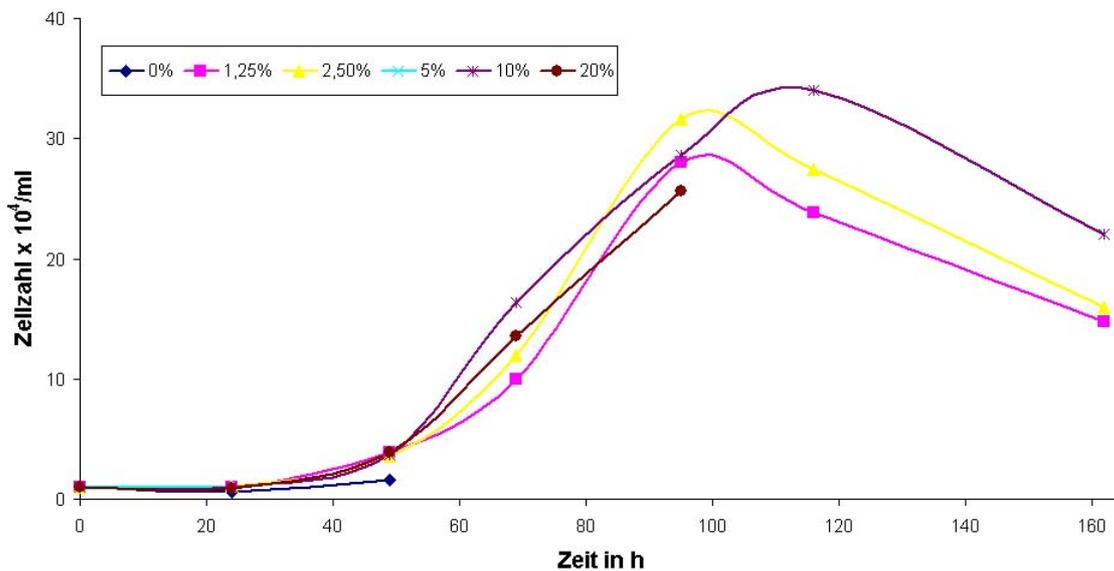


Abb. 20: Wachstumskurve 32d Zellen

Dargestellt ist das Wachstum der 32d Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an konditioniertem Medium in Prozent und der Zeit (n=1). Die verschiedenen farbigen Linien zeigen die Zellzahl über die Zeit in Abhängigkeit von dem prozentualen Zusatz an konditioniertem Medium.

Der Vorversuch ergab, dass ein exponentielles Wachstum bei ca. 2×10^5 Zellen pro ml Medium stattfindet, deshalb wurden zu diesem Zeitpunkt die Zellen jeweils geerntet und mit den Reportergenkonstrukten transfiziert. Die besten Wachstumsbedingungen zeigen sich bei Zusatz von 10 % an konditioniertem Medium, daher wurde bei den folgenden Versuchen diese Konzentration angewandt.

6.3.5.3 Optimierung der Transfektionsbedingungen für die 32d Zell-Linie

Unter Berücksichtigung der Literaturangaben wurden optimale Transfektionsbedingungen für die murine 32d Zell-Linie ermittelt.

Zur Optimierung der Transfektion können folgende Parameter variiert werden:

- Transfektionsmedium
- Umgebungstemperatur während der Transfektion
- DNA-Menge
- Zeitpunkt der Messung nach der Transfektion
- Elektroporationsbedingungen (Puls).

Laut Literaturangaben liegen die optimalen Pulsbedingungen bei 0,3 kV und 950 μ F. Da mit dieser Einstellung gute Ergebnisse erzielt wurden, ist dieser Parameter nicht geändert worden.

6.3.5.4 Optimierung des Transfektionsmediums und der Transfektionstemperatur für 32d Zellen

In verschiedenen Publikationen wurden unterschiedliche Ansätze bezüglich des Zellkulturmediums und der Transfektionstemperatur (Raumtemperatur und 4°C) beschrieben. Um die für diesen Ansatz vorliegenden Bedingungen zu optimieren, wurden jeweils PBS und RPMI 1640 Medium ohne weitere Zusätze eingesetzt und jeweils 5 Minuten bei den beschriebenen Temperaturen inkubiert (Abb. 21).

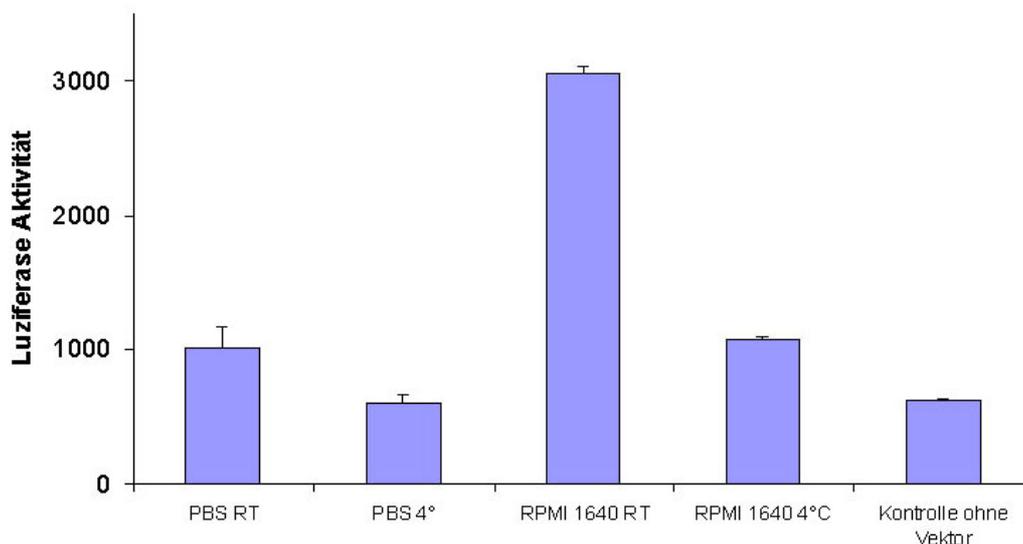


Abb. 21: Optimierung der Transfektion

Die Transfektion in 32d Zellen wurde bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen sowie mit verschiedenen Zellkulturmedien durchgeführt (n=3). Dargestellt sind die ermittelten Luciferaseaktivitäten der transfizierten Zellen in PBS Medium bei Raumtemperatur, in PBS Medium bei 4°C, in RPMI Medium bei Raumtemperatur, in RPMI bei 4°C sowie die Transfektion ohne Vektor zur Kontrolle mit den Standardabweichungen des Mittelwertes.

Die höchste Transfektionseffizienz wird bei Verwendung von RPMI 1640 Medium bei Raumtemperatur erreicht.

6.3.5.5 Optimierung der DNA-Menge:

Ferner wurden zur Optimierung der Transfektionsergebnisse verschiedene Kombinationen an eingesetzter Konstruktmenge untersucht. Die höchste Luziferaseaktivität wird bei 20 ng Konstrukt erreicht (Abb. 22).

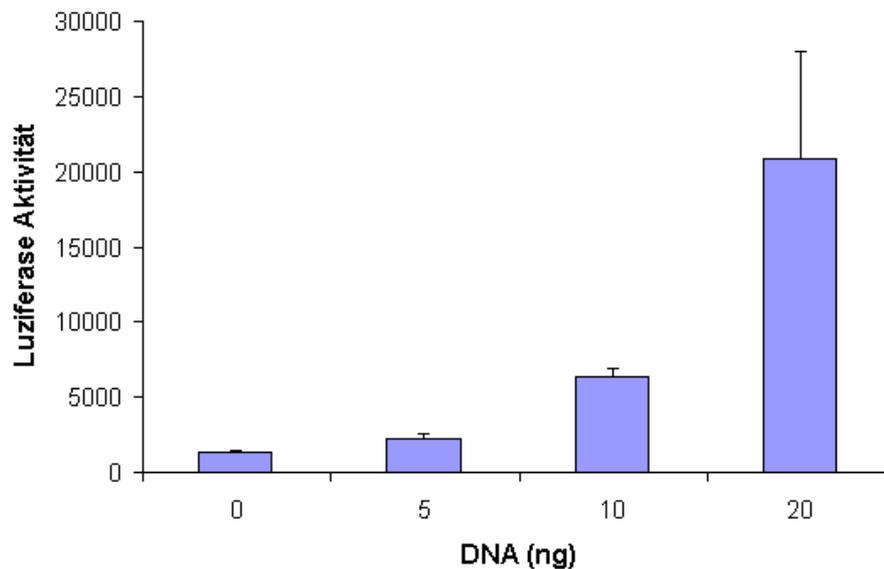


Abb. 22: DNA-Menge

Dargestellt sind die Ergebnisse zur Optimierung der DNA Menge (5, 10 und 20 ng) während der Transfektion von 32d Zellen mit den Standardabweichungen des Mittelwertes (n=9). Zur Kontrolle wurde eine Transfektion ohne Konstrukt (0 ng) durchgeführt.

6.3.5.6 Optimierung des Zeitpunktes der Zellernte von 32d Zellen

Zur Ermittlung des optimalen Zeitpunktes zur Messung der Luziferase-Aktivität nach der Transfektion wurden drei verschiedene Zeitpunkte für die Messung geprüft. Die besten Ergebnisse, das heißt die höchste Luziferase-Aktivität, werden ca. 23 Stunden nach der Transfektion erzielt.

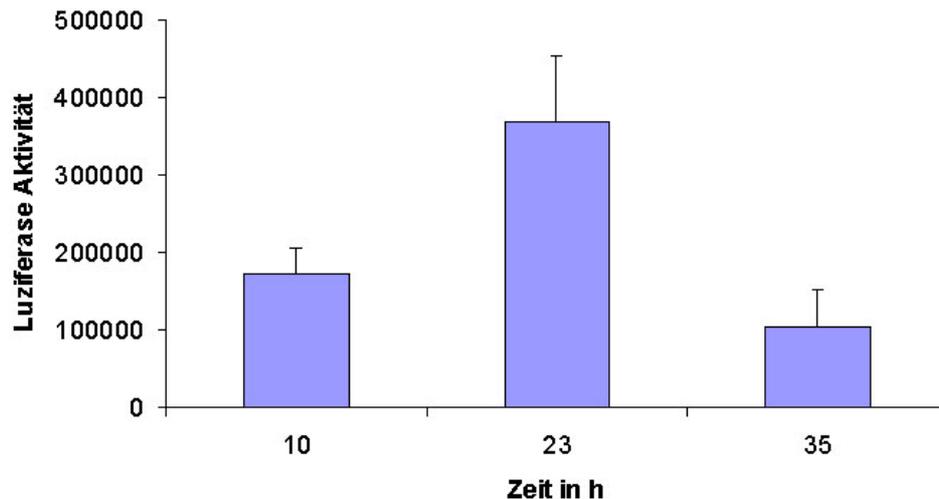


Abb. 23: Zellernte-Zeitpunktes

Ergebnisse zur Optimierung des Zeitpunktes der Zellernte nach der Transfektion von 32d Zellen (n=2) mit den Standardabweichungen des Mittelwertes

6.3.5.7 Zusammenfassung Optimierung:

Zusammenfassend konnten die validesten und besten Ergebnisse der Transfektion von murinen 32d Zellen werden erzielt bei:

- Transfektionsmedium RPMI 1640 ohne weitere Zusätze
- Raumtemperatur
- Zelldichte 2×10^7 Zellen pro ml
- Jeweils 20 ng DNA Reportergen pro Transfektionsansatz
- Ernte der Zellen ca. 23 Stunden nach der Transfektion
- Elektroporationsbedingungen 0,3 kV und 750 μ F

6.3.6 Elektroporation der 32d Zellen mit den unterschiedlichen Promotorkonstrukten

Die murine Zell-Linie wurde nach den optimierten Bedingungen mit den beiden Promotorkonstrukten (normal/Deletion) transfiziert. Es zeigte sich kein Unterschied in der Promotorantwort zwischen ELA2 Wildtyp und ELA2 Deletionsmutante (Abb. 24). ($p=0,9599$).

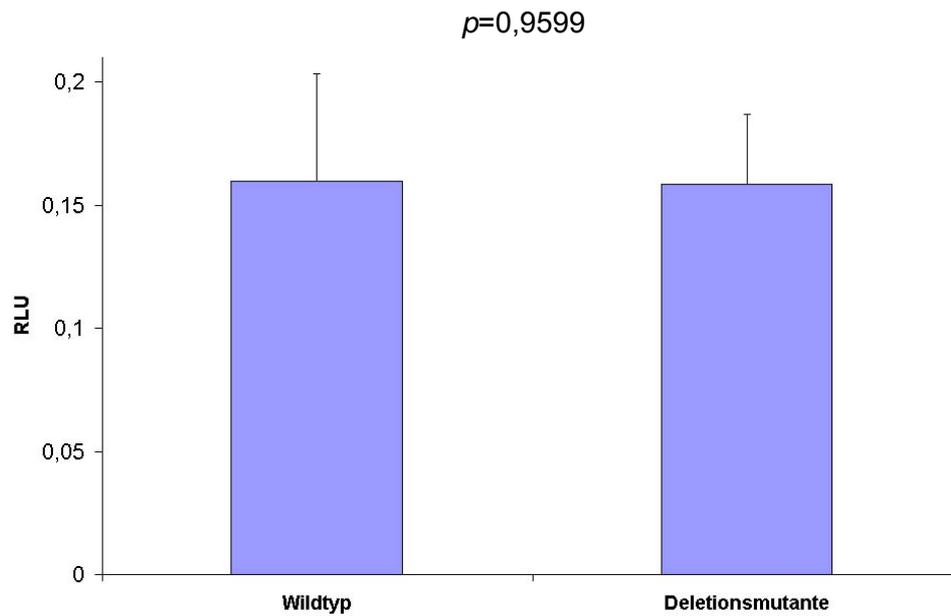


Abb. 24: Vergleich der Promotoraktivität der zwei Promotoren

Dargestellt ist die standarsierte relative Luziferaseaktivität (RLU) nach Elektroporation der 32d Zellen mit den unterschiedlichen Promotorkonstrukten (n=10), abgebildet mit den Standardabweichungen des Mittelwertes.

6.3.7 Optimierung der Transfektionsbedingungen für HL60 Zellen

Ähnlich wie bei der humanen Zell-Linie HL60 wurden die entsprechenden Elektroporationsbedingungen ausgetestet.

6.3.7.1 Optimierung des Zeitpunktes der Zellernte von HL60 Zellen

Die besten Ergebnisse wurden erzielt nach 24 Stunden Inkubation der Zellen (Abb. 25).

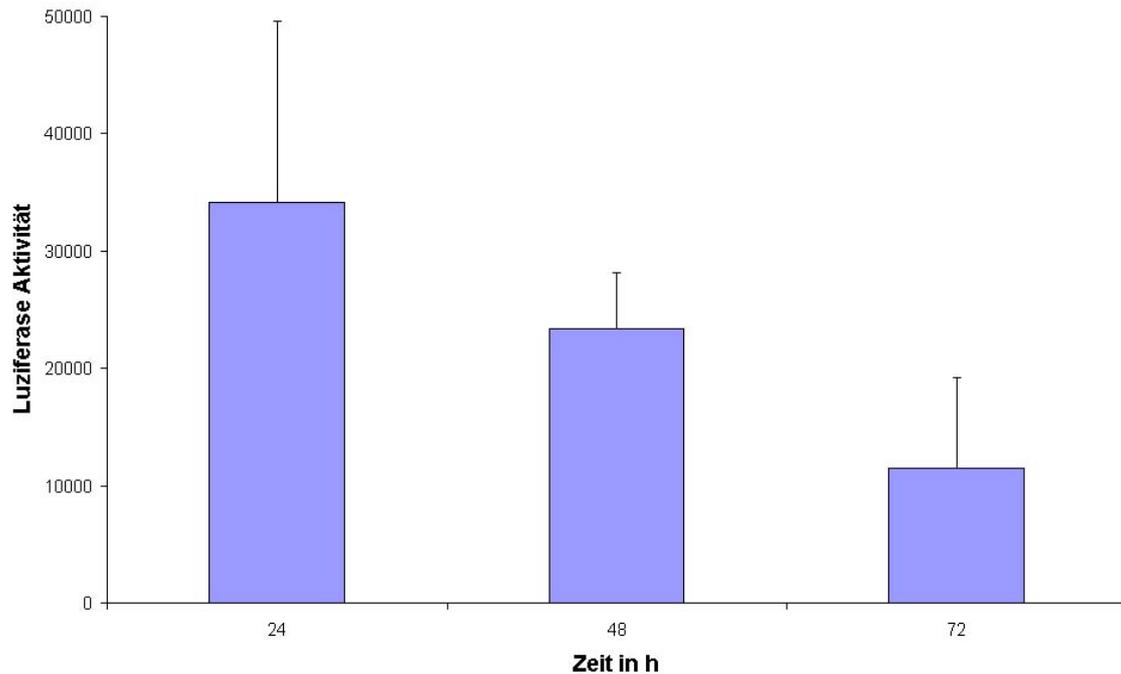


Abb. 25: Zellernte-Zeitpunktes

Ergebnisse zur Optimierung des Zeitpunktes der Zellernte nach der Transfektion von HL60 Zellen (n=2) mit den Standardabweichungen des Mittelwertes

Die besten Resultate der Transfektion von humanen HL60 Zellen werden erzielt bei:

- Transfektionsmedium RPMI 1640 ohne weitere Zusätze
- Raumtemperatur
- Zelldichte 2×10^7 Zellen pro ml
- 20 ng DNA
- Ernte der Zellen ca. 23 Stunden nach der Transfektion
- Elektroporationsbedingungen 0,3 kV und 750 μ F

6.3.8 Elektroporation von HL60 mit unterschiedlichen Promotorkonstrukten

Es wurde mit den unterschiedlich allelen Promotoren (Promotor Wildtyp und Deletion) eine Elektroporation der HL60 Zellen durchgeführt. Das ECE-1c-pGL3 Promotorkonstrukt wurde parallel als Positivkontrolle mitgeführt, da bekannt ist, dass die Promotorantwort von ELA2 in HL60 Zellen schwach ist und ECE-1c einen sehr starken Promotor darstellt.

Die gemessenen Luziferase-Aktivitäten für die ELA2 Konstrukte gehen nicht über die des Leervektors ohne Promotor hinaus (Abb. 26).

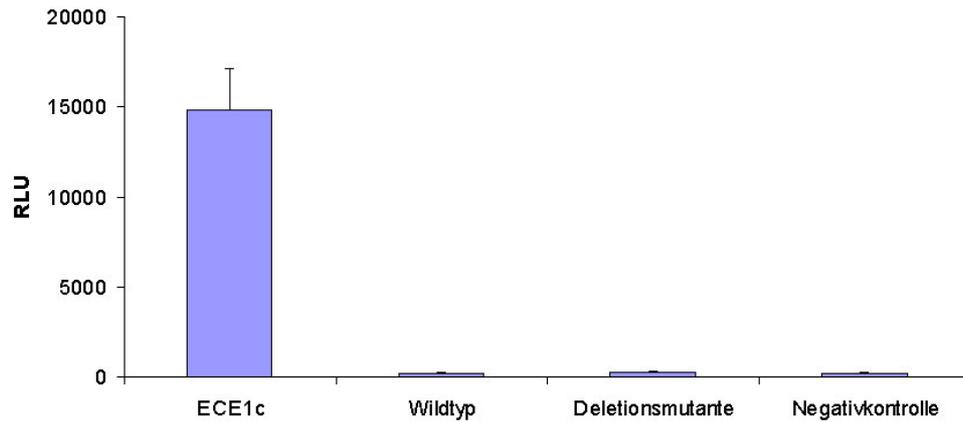


Abb. 26: Vergleich der Promotoraktivität verschiedener Promotoren
Dargestellt ist die standarsierte relative Luziferaseaktivität (RLU) nach Elektroporation der HL60 Zellen mit den unterschiedlichen Promotorkonstrukten sowie einer Positivkontrolle (ECE1c) (n=10), mit den Standardabweichungen des Mittelwertes

Der ELA2 Promotor zeigt in den HL60 Zellen keine Aktivität (Abb. 26). Die Transfektion der HL60 Zell-Linie ergab aber, dass starke Promotoren, wie ECE1c im pgL3 Control Vektor (gleiches Konstrukt wie der ELA2 Promotor) sich in die Zellen einbringen lassen und dort ausreichend Luziferase exprimieren (Abb. 27).

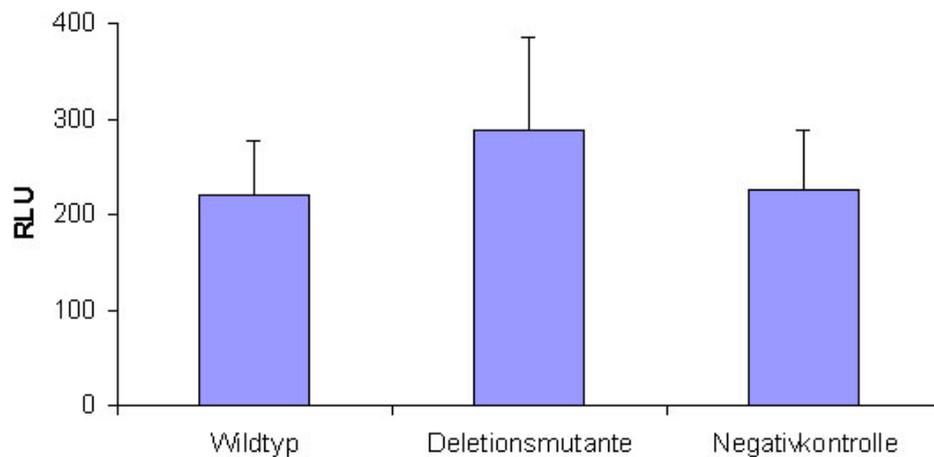


Abb. 27: Vergleich der Promotoraktivität der zwei Promotoren
Dargestellt ist die standarsierte relative Luziferaseaktivität (RLU) nach Elektroporation der HL60 Zellen mit den unterschiedlichen Promotorkonstrukten (n=10) ohne Positivkontrolle mit den Standardabweichungen des Mittelwertes. Die Aktivität der ELA2 Promotor geht nicht über die der Negativkontrolle hinaus.

6.3.9 RNA-Experimente

Da die vorangegangenen Ergebnisse offen lassen, ob die HL60 Zellen ELA2 exprimieren oder ob der vorliegende Promotor hier nicht aktiv ist, wurde die ELA2 Expression überprüft.

6.3.9.1 RNA-Isolation aus HL60 Zellen und Synthese von cDNA durch reverse Transkription

Die Reverse Transkriptase Reaktion mit anschließender PCR ergab, dass mittels RT-PCR die Expression von ELA2 in HL60 Zellen nachgewiesen werden kann. Da die eingesetzten Primer das Intron überspannen, kann ein falsch positiver Nachweis ausgeschlossen werden, weil das erwartete PCR-Produkt einer Größe von 250 bp entspricht und nicht 2402 bp für das genomische Amplifikat.

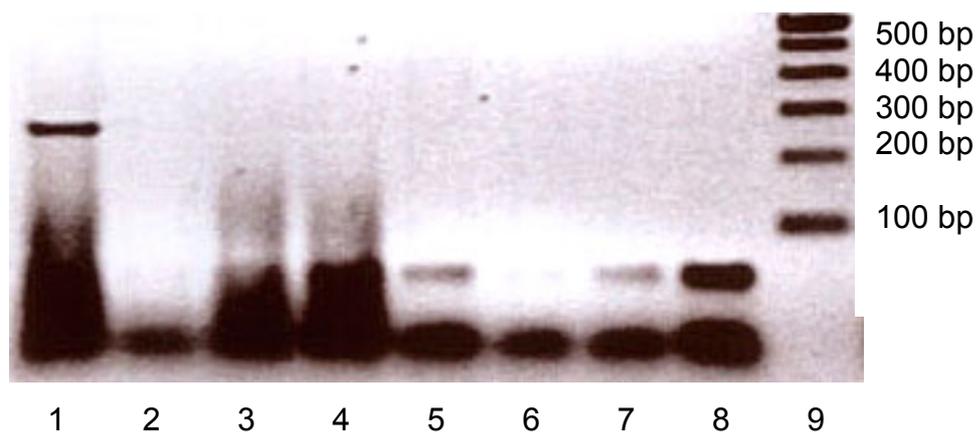


Abb. 28: RT-PCR.

- | | |
|----------|---|
| 1: RT+ | spezifisches Amplifikat (ca. 250 bp) |
| 2: RT- | kein Signal erkennbar |
| 3 und 4: | RT Ansatz zweiter HL60 Kultur ohne erkennbares Signal |
| 5 und 6: | genomische DNA mit der Amplifikation eines großen DNA Fragments größer als 2 kb |
| 7 und 8: | Wasserkontrolle |
| 9: | 100 bp Größenmarker |