

INHALTSVERZEICHNIS	SEITE
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1 TGF- β 1 UND SEIN BINDUNGSPROTEIN LTBP-4	3
2.1.1 Kurzer Überblick	3
2.1.2 Proteinstrukturen	4
2.1.3 Gewebelokalisation.....	8
2.1.4 Biologische Funktionen.....	8
2.1.5 Funktionen von TGF- β 1 im Rahmen der Karzinogenese epithelialer Neoplasien.....	10
2.1.5.1 Autokrine und parakrine Effekte des TGF- β 1 in Neoplasien	10
2.1.5.2 Mutationen der TGF- β 1-Rezeptoren in Neoplasien.....	11
2.1.5.3 Mutationen der Smads in Neoplasien	12
2.2 TGF- β 1-SIGNALTRANSDUKTIONSKASKADE UND IHRE EFFEKTE AUF DIE EXPRESSION VON p21 UND c-myc IN EPITHELIALEN ZELLEN	12
2.2.1 TGF- β 1-Aktivierung	12
2.2.2 TGF- β 1-Rezeptorbindung.....	13
2.2.3 TGF- β 1-Signaltransduktion.....	13
2.2.4 TGF- β 1-vermittelte Wachstumshemmung in epithelialen Zellen	14
2.2.4.1 Einleitung	14
2.2.4.2 Funktion der G1-Phase Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren (G1 CDKI`s) im Verlauf des Zellzyklus	14
2.2.4.3 TGF- β 1-Effekte auf das G1 CDKI p21	16
2.2.4.4 TGF- β 1-Effekte auf andere G1-Regulatoren wie das Protoonkogen c-myc.....	16
3 MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 MATERIAL.....	18
3.1.1 Zelllinie HEK293T	18
3.1.2 Basisplasmide und cDNA-Plasmid-Konstrukte (»Plasmide«)	18

3.1.2.1	Basisplasmide	18
3.1.2.2	cDNA-Plasmid-Konstrukte.....	19
3.1.3	Synthetische Oligonukleotide.....	21
3.1.4	Kompetente Bakterien	21
3.1.5	Enzyme und Reaktionskits	22
3.1.5.1	Enzyme	22
3.1.5.2	Reaktionskits.....	22
3.1.6	Antikörper	23
3.1.7	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	23
3.1.8	Angesetzte Lösungen und Puffer.....	26
3.1.9	Geräte und sonstiges Zubehör	28
3.2	METHODEN	29
3.2.1	Vermehrung von Plasmiden	
	durch Expression in kompetenten <i>Escherichia coli</i> -Bakterien	29
3.2.1.1	Plasmid-Expression in kompetenten Bakterien allgemein.....	29
3.2.1.2	Transformation	29
3.2.1.3	Plasmid-Amplifikation (Maxi-Prep-Verfahren)	30
3.2.1.4	Spezifischer Restriktionsverdau	31
3.2.1.5	Gelelektrophoretische Auftrennung	
	der DNA-Restriktionsfragmente	32
3.2.2	Zellkultur und Transfektion der Zelllinie HEK293T	33
3.2.2.1	Auftauen und Kultivierung der Zellen	33
3.2.2.2	Zellbeurteilung, Mediumwechsel und Passagieren	33
3.2.2.3	Einfrieren der Zellen (Kryokonservierung).....	34
3.2.2.4	Passagieren für die Calciumphosphat-Transfektion.....	34
3.2.2.5	Prinzip der Calciumphosphat-Transfektion.....	34
3.2.2.6	Protokoll der Calciumphosphat-Transfektion.....	34
3.2.2.7	Fluoreszenzanalyse und Mikroskopie	35
3.2.3	Molekularbiologische Untersuchungen	36
3.2.3.1	Übersicht	36
3.2.3.2	RNA-Isolierung und RNA-Qualitätskontrolle.....	36
3.2.3.2.1	RNA-Isolierung aus Zellen	36
3.2.3.2.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	37
3.2.3.2.3	Bestimmung der RNA-Integrität	38

3.2.3.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	38
3.2.3.4	Quantitative PCR	39
3.2.3.4.1	Überblick.....	39
3.2.3.4.2	qPCR Primer.....	40
3.2.3.4.3	qPCR Assay Etablierung	41
3.2.3.4.4	Referenzgene (housekeeping genes).....	44
3.2.3.4.5	Bestimmung geeigneter Referenzgene.....	44
3.2.3.4.6	qPCR Kontrollen	45
3.2.3.4.7	Protokoll der qPCR	46
3.2.3.4.8	Bestimmung der C _T -Werte (cycle threshold values)	47
3.2.3.4.9	Auswertung der Schmelzkurvenanalyse	47
3.2.3.4.10	Bestimmung der relativen Expression.....	48
3.2.3.4.11	Gruppenauswertung	49
3.2.3.4.12	Darstellung der Ergebnisse.....	49
3.2.4	Proteinbiochemische Untersuchungen	50
3.2.4.1	Überblick	50
3.2.4.2	Proteinisolierung aus HEK293T Zellen	51
3.2.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	51
3.2.4.4	Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52
3.2.4.5	Coomassie-Färbung (Gelfärbung).....	53
3.2.4.6	Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran (Western Blot).....	53
3.2.4.7	Ponceau S-Färbung (Membranfärbung)	54
3.2.4.8	Antigen-Antikörper-Nachweis (Immunoblotting)	54
4	ERGEBNISSE.....	55
4.1	ERGEBNISSE DER GELELEKTROPHORETISCHEN AUFTRENNUNG DER PLASMID-RESTRIKTIONSFRAGMENTE	55
4.2	ERGEBNISSE AUS ZELLKULTUR UND TRANSFEKTION DER ZELLINIE HEK293T	59
4.2.1	Wachstumsverhalten der Zelllinie HEK293T	59
4.2.2	Ergebnisse der mikroskopischen Fluoreszenzanalyse	60
4.3	ERGEBNISSE DER MOLEKULARBIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN	61
4.3.1	Ergebnisse der RNA-Isolierung und RNA-Qualitätskontrolle	61

4.3.1.1	RNA-Konzentrationen	61
4.3.1.2	RNA-Integrität	61
4.3.2	Ergebnisse der relativen Quantifizierung der Zielgene LTBP-4, TGF- β 1, p21 und c-myc sowie der Referenzgene	62
4.3.2.1	qPCR Kontrollen auf Kontamination mit genomischer DNA	62
4.3.2.2	qPCR Assay Etablierung	62
4.3.2.2.1	qPCR Assay Etablierung für TGF- β 1	63
4.3.2.2.2	qPCR Assay Etablierung für p21	63
4.3.2.2.3	qPCR Assay Etablierung für c-myc	64
4.3.2.3	Geeignete Referenzgene	65
4.3.2.4	Bestimmung der C _T -Werte	66
4.3.2.5	Relative Quantifizierung der Referenz- und Zielgene in HEK293T Zellen	66
4.3.2.5.1	sLTBP-4 knock-down durch RNA-Interferenz (gene silencing) ...	66
4.3.2.5.2	sLTBP-4 Überexpression	67
4.3.2.5.3	Testgruppen	67
4.3.2.5.4	Kontrollgruppen	67
4.3.2.5.5	Relative Expressionsraten der Referenzgene	68
4.3.2.5.6	Relative Expressionsraten der GOI in HEK293T Zellen mit sLTBP-4-knock-down	69
4.3.2.5.6.1	sLTBP-4	69
4.3.2.5.6.2	TGF- β 1	70
4.3.2.5.6.3	p21	71
4.3.2.5.6.4	c-myc	72
4.3.2.5.7	Relative Expressionsraten der GOI in HEK293T Zellen mit sLTBP-4-Überexpression	73
4.3.2.5.7.1	sLTBP-4	73
4.3.2.5.7.2	TGF- β 1	74
4.3.2.5.7.3	p21	75
4.3.2.5.7.4	c-myc	76
4.4	ERGEBNISSE DER PROTEINBIOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNGEN	77
4.4.1	Detektion des sL4-V5-Fusionsproteins	77
4.4.2	Proteinkonzentration	78

Inhaltsverzeichnis

4.4.3	Coomassie-Färbung	78
4.4.4	Ponceau S-Färbung.....	79
4.4.5	sL4-V5-Westernblot-Nachweis in HEK293T-Zellen	79
5	DISKUSSION.....	80
6	ZUSAMMENFASSUNG	88
7	SUMMARY.....	89
8	LITERATURVERZEICHNIS	90
9	ANHANG	97
9.1	TABELLEN	97
9.2	EIGENE PUBLIZIERTE ERGEBNISSE.....	104
	DANKSAGUNG	105
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	106