

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Rolle der PAX2-Splicevarianten
in Lymphomen und soliden Tumoren

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Manuel Unz

aus Filderstadt

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. U. Keilholz
2.: Prof. Dr. med. P. Brossart
3.: Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

Datum der Promotion: 3. September 2010

Meiner Familie in tiefer Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 PAX-Genfamilie.....	1
1.2 PAX2.....	3
1.2.1 Physiologische Expression und Funktion von PAX2.....	4
1.2.1.1 Embryo und Fetus.....	4
1.2.1.2 Adulter Organismus.....	5
1.2.2 Pathologische Expression von PAX2.....	6
1.3 WT1.....	7
1.3.1 Physiologische Expression und Funktion von WT1.....	8
1.3.1.1 Embryo und Fetus.....	8
1.3.1.2 Adulter Organismus.....	9
1.3.2 Pathologische Expression von WT1.....	9
1.4 Wechselseitige Regulation von PAX2 und WT1.....	10
1.5 Grundlagen der RNA-Interferenz.....	11
1.6 Aufgabenstellung.....	12
2 Materialien und Methoden.....	14
2.1 Materialien.....	14
2.1.1 Zellkultur.....	14
2.1.2 Bakterienstämme.....	16
2.1.3 Bakterienkultur.....	16
2.1.4 Plasmide.....	17
2.1.5 Klonierung.....	20
2.1.6 Plasmidisolierung.....	20
2.1.7 Restriktion.....	20
2.1.8 Sequenzierung.....	21
2.1.9 Einfrieren von Zellen für RNA-Isolierung.....	21
2.1.10 RNA-Isolierung.....	21

2.1.11	cDNA-Synthese.....	22
2.1.12	Konventionelle PCR.....	22
2.1.13	Real-Time-PCR.....	22
2.1.14	DNA- und RNA-Elektrophorese.....	23
2.1.15	Fragmentisolierung aus PCR-Ansätzen, bzw aus Agarosegel.....	23
2.1.16	Polyacrylamidelektrophorese.....	23
2.1.17	Proteinmessung.....	23
2.1.18	Western-Blot.....	24
2.1.19	Transfektion.....	25
2.1.20	Verwendete Geräte.....	26
2.1.21	Hilfsmaterialien.....	27
2.1.22	Verwendete Software.....	27
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Zellkultur.....	29
2.2.1.1	Auftauen von Zellen.....	29
2.2.1.2	Kultivierung von Zellen.....	29
2.2.1.3	Auszählen von Zellen zur Bestimmung der Dichte und Vitalität.....	29
2.2.1.4	Einfrieren von Zellen in Kultur.....	30
2.2.1.5	Einfrieren von Zellen für RNA-Isolierung, bzw. Western-Blot-Ansätze.....	30
2.2.2	Klonierung.....	30
2.2.3	Transformation in One Shot™TOP10F' Competent E. coli.....	31
2.2.4	Herstellung von Selektionsnährböden für die Kultur von transformierten Bakterienklonen.....	31
2.2.5	Selektion transformierter Bakterienklone.....	31
2.2.5.1	TOPO®-Vektoren.....	31
2.2.5.2	pcDNA™6.2-GW/± EmGFP-miR-Vektoren.....	32
2.2.6	Herstellung von Nährmedien für Bakterienkulturen.....	32
2.2.6.1	Bakterienkulturen für Plasmid-Präparationen im kleinen Maßstab.....	32
2.2.6.2	Bakterienkulturen für Plasmid-Präparationen im mittleren Maßstab.....	33
2.2.7	Plasmidisolierung.....	33
2.2.7.1	Invisorb Spin-Plasmid-Mini-Two-Kit (Invitex).....	33
2.2.7.2	HighSpeed-Plasmid-Midi-Kit (Qiagen).....	34
2.2.8	Restriktion.....	35
2.2.9	Gesamt-RNA-Extraktion aus Zelllinien.....	35

2.2.10	cDNA-Synthese.....	36
2.2.11	Polymerase-Ketten-Reaktion	36
2.2.11.1	Primersequenzen und Amplifikatgrößen.....	37
2.2.12	Quantitative Real-Time-PCR (LightCycler®).....	38
2.2.12.1	Zusammensetzung der Real-Time-PCR-Ansätze.....	41
2.2.12.2	Detektionsbereich der PCR.....	41
2.2.12.3	PCR-Effizienz	42
2.2.12.4	Primer- und SONDENSEQUENZEN UND REAL-TIME-PCR-BEDINGUNGEN sowie Amplifikatgrößen.....	42
2.2.13	Amplifizierung von aufgereinigter DNA aus dem Reaktionsansatz, bzw. aus Agarosegel.....	46
2.2.14	Elektrophorese.....	47
2.2.14.1	DNA-Elektrophorese.....	47
2.2.14.2	RNA-Elektrophorese.....	48
2.2.15	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	48
2.2.15.1	Aufreinigung der PCR- Produkte aus dem PCR-Reaktionsmix.....	48
2.2.15.2	Fragmentisolierung aus Agarosegel.....	49
2.2.16	Spektrophotometrische Bestimmung der Konzentration von Proteinen sowie der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren.....	49
2.2.16.1	Messung von Nukleinsäureproben.....	49
2.2.16.2	Messung der Proteinkonzentration unter Verwendung der BCA-Methode..	50
2.2.17	Erstellung der Standard- und Probenverdünnung zur BCA-Proteinmessung für Western-Blot	50
2.2.18	Auftrennen von Proteinen im Polyacrylamidgel.....	51
2.2.19	Western-Blot	51
2.2.20	Detektion von Proteinen auf Membranen	52
2.2.21	Elektroporation.....	52
2.2.21.1	Nukleofektion.....	53
2.2.22	Lipofektion.....	54
2.2.22.1	RNAiFect	55
2.2.23	RNA-Interferenz.....	55
2.2.23.1	siRNA.....	55
2.2.23.1.1	Verwendete siRNA	56

2.2.23.2	miRNA	57
2.2.23.2.1	Herstellung der DNA-Vektoren	57
2.2.23.2.2	Verwendete miRNA	59
2.2.24	Durchflusszytometrie	60
3	Ergebnisse	62
3.1	Etablierung der PCR-Bedingungen für PAX2 +Exon 6 und PAX2 +Exon 10 für quantitative Real-Time-PCR nach dem LightCycler®-Prinzip	62
3.2	Expression von PAX2 und der drei PAX2-Splicevarianten in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen, sowie in Kolonkarzinomgewebe und Gesundblut auf mRNA-Ebene	63
3.2.1	PAX2	63
3.2.2	PAX2 +Exon 6	64
3.2.3	PAX2 +Exon 10	65
3.2.4	PAX2 +Intron 9	67
3.2.5	Vergleich der Expressionslevel der PAX2-Exon 5-8-PCR ³ und der splicevarianten-spezifischen PCRs für PAX2 +Exon 6, +Exon 10 sowie +Intron 9	69
3.3	Expression von WT1 und der Splicevarianten +Exon 5 und +KTS in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen auf mRNA-Ebene	70
3.3.1	WT1	70
3.3.2	WT +Exon 5	72
3.3.3	WT1 +KTS	72
3.3.4	Vergleich der Expressionslevel der WT1-Exon 1-3-PCR ⁴ und der splicevarianten-spezifischen PCRs für WT1 +Exon 5 und WT1 +KTS	73
3.3.5	Detektion einer funktionell relevanten Mutation in WT1-Exon 9 mit der WT1 +KTS-spezifischen PCR	75
3.4	Mögliche Wechselwirkung zwischen PAX2 und WT1	77
3.5	Western-Blot	81
3.6	Transfektionen	83
3.6.1	siRNA-Versuche	83
3.6.2	miRNA-Versuche	83

4	Diskussion	85
4.1	Untersuchung von Tumorzelllinien auf die Expression von PAX2, der beiden bekannten Splicevarianten PAX2 +Exon 6 und +Exon 10 sowie der neu entdeckten Splicevariante PAX2 +Intron 9 auf mRNA-Ebene	85
4.1.1	Vergleich der Expressionslevel der PAX2-Exon 5-8 ³ -PCR mit denjenigen der PCRs für PAX2 +Exon 6, +Exon 10 und +Intron 9.....	86
4.1.2	Untersuchung von Gesundblutproben auf die Expression von PAX2 und der drei in dieser Arbeit betrachteten Splicevarianten auf mRNA-Ebene	88
4.1.3	Untersuchung von Kolonkarzinomgewebe auf die Expression von PAX2 und der drei betrachteten Splicevarianten auf mRNA-Ebene	89
4.1.4	Untersuchung von Tumorzelllinien und Gesundblutproben auf die Expression von PAX2 und der drei Splicevarianten auf Proteinebene.....	91
4.2	Untersuchung von Tumorzelllinien auf die Expression von WT1 und der Splicevarianten WT1 +Exon 5 und WT1+KTS auf mRNA-Ebene	91
4.2.1	Vergleich der Expressionslevel der WT1-Exon 1-3-PCR ⁴ mit denen der splicevarianten-spezifischen PCRs für WT1 +Exon 5 und WT1 +KTS.....	93
4.2.2	Identifikation einer funktionell relevanten Mutation im Detektionsbereich der WT1 +KTS-PCR in WT1-Exon 9	94
4.3	Interaktion zwischen PAX2 und WT1 sowie den Splicevarianten in Tumorzellen	95
4.4	RNA-Interferenz	97
4.4.1	Ursachen für ineffiziente RNA-Interferenz.....	98
4.4.1.1	Transfektionseffizienz.....	98
4.4.1.2	Von der Transfektionseffizienz unabhängige Einflussfaktoren auf die RNA-Interferenz.....	100
5	Zusammenfassung	102
6	Literaturverzeichnis	104
7	Lebenslauf	115
8	Danksagung	116
9	Erklärung	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vektorkarte von pCR®2.1-TOPO®	17
Abbildung 2: Vektorkarte von pCR®2.1-Blunt II TOPO®	18
Abbildung 3: Vektorkarte von pcDNA™ 6.2-GW/miR	18
Abbildung 4: Vektorkarte von pcDNA™ 6.2-GW/miR- Negativkontrolle	19
Abbildung 5: Vektorkarte von pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR-Negativkontrolle.....	19
Abbildung 6: Vektorkarte von pmaxGFP	20
Abbildung 7: Exemplarische Darstellung einer LightCycler®-Amplifikationskurve für PBGD in Lymphom-Zelllinien.....	40
Abbildung 8: Histogramm-Plot nach Transfektion des pmaxGFP-Plasmids in U937-Zellen.....	61
Abbildung 9: PAX2-Expression in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen, Gesundblutproben und Kolonkarzinomgewebe.....	64
Abbildung 10: PAX2 +Exon 6-Expression in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen, Gesundblutproben und Kolonkarzinomgewebe.....	65
Abbildung 11: PAX2 +Exon 10-Expression in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen, Gesundblutproben und Kolonkarzinomgewebe.....	66
Abbildung 12: PAX2 +Intron 9-Expression in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen, Gesundblutproben und Kolonkarzinomgewebe.....	68
Abbildung 13: Expression von PAX2 und der drei Splicevarianten +Exon 6, +Exon 10 und +Intron 9 in Lymphom-Zelllinien.	69
Abbildung 14: Expression von PAX2 und der drei Splicevarianten +Exon 6, +Exon 10 und +Intron 9 in Zelllinien solider Tumore.....	70
Abbildung 15: WT1-Expression in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen sowie in Kolonkarzinomgewebe.	71
Abbildung 16: WT1 +Exon 5-Expression in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen	72
Abbildung 17: WT1 +KTS-Expression in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen. ...	73
Abbildung 18: Expression von WT1 und der beiden Splicevarianten +Exon 5 und +KTS in Lymphom-Zelllinien.	74
Abbildung 19: Expression von WT1 und der beiden Splicevarianten +Exon 5 und +KTS in Zelllinien solider Tumore.....	75
Abbildung 20 A-C: Schmelzkurvenanalyse der Zelllinien Karpas422, AMO und HCT116.....	77
Abbildung 21: Nukleotidsequenz der Punktmutation in Codon 462 in WT1-Exon 9	77

Abbildung 22: Betrachtung der Korrelation nach Spearman zwischen PAX2 und WT1 +Exon 5 in Lymphom-Zelllinien.	78
Abbildung 23: Hierarchische Cluster-Analyse der mRNA-Expressionslevel der Zelllinien mit dChip.....	79
Abbildung 24: Hierarchische Cluster-Analyse der mRNA-Expressionslevel der Kolonkarzinomgewebeprobe mit dChip.	80
Abbildung 25A und B: A) Detektion des PAX2-Proteins in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen B): Detektion des Aktin-Proteins als Kontrolle	81
Abbildung 26A und B: A) Detektion des PAX2-Proteins in einer Blutprobe B): Detektion des GAPDH-Proteins als Kontrolle.....	82
Abbildung 27: Position der Primer und Sonden der verwendeten PAX2-PCRs.....	88
Abbildung 28: Position der Primer und Sonden der verwendeten WT1-PCRs.	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untergruppen der PAX-Gene.....	1
Tabelle 2: Größe der Exons von PAX2 und Stellen von alternativem Splicing	3
Tabelle 3: PAX2-Splicevarianten.....	4
Tabelle 4: PAX2-Expression in Tumoren.....	6
Tabelle 5: Größe der Exons von WT1 und Stellen von alternativem Splicing	7
Tabelle 6: WT1-Splicevarianten	8
Tabelle 7: WT1-Expression in Tumoren.....	9
Tabelle 8: Zellkultur und Zellverarbeitung	14
Tabelle 9: Verwendete Zelllinien.....	14
Tabelle 10: Für die Bakterienkultivierung verwendete Materialien	16
Tabelle 11: Plasmide für die Vermehrung spezifischer PCR-Produkte und für die Transfektion	17
Tabelle 12: Zur Restriktion der PCR-Produkte aus den Plasmiden verwendete Restriktionsendonucleasen und zugehörige Puffer	20
Tabelle 13: Zum Einfrieren der Zellen für die nachfolgende RNA-Isolierung benötigte Materialien.....	21
Tabelle 14: Für die RNA-Isolierung verwendete Kits und Lösungen	21
Tabelle 15: Für die cDNA-Synthese verwendete Kits und Materialien.....	22
Tabelle 16: Für die konventionelle PCR eingesetzte Enzyme, Puffer, Oligonukleotide und weitere Materialien.....	22
Tabelle 17: Für die quantitative Real-Time-PCR benötigte Kits, Primer und Sonden	22
Tabelle 18: Für die Gelelektrophorese benötigte Substanzen und Lösungen	23
Tabelle 19: Für den Western-Blot eingesetzte Substanzen, Lösungen und Antikörper.....	24
Tabelle 20: Für die Transfektion verwendete Kits, Oligonukleotide und Lösungen	25
Tabelle 21: Für die Durchführung der Versuche verwendete Geräte	26
Tabelle 22: Eingesetzte Hilfsmaterialien	27
Tabelle 23: Für die Messungen und Auswertungen benutzte Software.....	27
Tabelle 24: Klonierung von PCR-Produkten in Vektoren	30
Tabelle 25: Restriktionsenzyme mit den entsprechenden Schnittstellen und den vom Hersteller empfohlenen Puffern	35
Tabelle 26: Temperatureinstellungen für die konventionelle PCR.....	37
Tabelle 27: Primerpaare für die konventionelle PCR	37
Tabelle 28: Real-Time-PCR-Ansätze.....	41

Tabelle 29: PCR-Detektionsbereiche	41
Tabelle 30: Verwendete PCRs und zugeordnete Effizienz	42
Tabelle 31: Für die Real-Time-PCR verwendete Primer- und Sondensequenzen, Arbeitsbedingungen und resultierende Amplifikatgröße	42
Tabelle 32: Zur DNA-Amplifizierung nach Isolierung aus dem Reaktionsansatz, bzw. Agarosegel, verwendete Enzyme, Oligonukleotide und Lösungen.....	47
Tabelle 33: Für die Nukleofektion benutzte Zelllinien, Plasmide und Geräteeinstellungen	54
Tabelle 34: Mit RNAiFect behandelte Zelllinien, transfizierte siRNA und Arbeitsbedingungen	55
Tabelle 35: Verwendete siRNA, Angabe von Zielgenen, -sequenzen und Lage in den Zielgenen	56
Tabelle 36: Ansatz für die Synthese der dsOligonukleotide aus den ssOligonukleotiden.....	57
Tabelle 37: Verdünnungsschritte der dsOligonukleotide.....	58
Tabelle 38: Ligationsansatz der dsOligonukleotide in pcDNA TM 6.2-GW/miR-Vektoren	58
Tabelle 39: Verwendete miRNA, Angabe von Zielgenen, -sequenzen und Lage in den Zielgenen	59

Abkürzungsverzeichnis

bp	base pair
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CMV	Cytomegalievirus
Cp	Crossing Point
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	double strand
ECL	Enhanced Luminol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epithelial Growth Factor
EGR-1	Early Growth Response Gene 1
E. coli	Escherichia coli
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-5-Isocyanat
FSC	Forward Scatter
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Proteine
GTC	Guanidinthiocyanat
h	Stunde
HMEC	Human Mammary Epithelial Cell
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IGF	Insulin-like-Growth Factor
kb	Kilobase
LB	Lysogeny Broth

MEM	Minimal Essential Medium
MESA	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA	micro RNA
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	millimolar
µM	mikromolar
MPER	Mammalian Protein Extraction Reagent
MRD	Minimal Residual Disease
mRNA	messenger RNA
nm	Nanometer
nM	nanomolar
nt	Nukleotid
PBGD	Phorphobilinogen-Deaminase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS/T	Phosphate Buffered Saline + Tween 20
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF-A	Platelet Derived Growth Factor A
pg	Picogramm
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	ribosomale RNA
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunde
SDS	Sodium Lauryl Sulfate
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA

SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite
sog	sogenannt
ss	single strand
SSC	Side Scatter
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Aktivitätseinheit von Enzymen)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 PAX-Genfamilie

PAX2 gehört zu einer Genfamilie, die für Transkriptionsfaktoren kodiert (1, 2). Beim Menschen wurden bislang neun PAX-Gene entdeckt, die alle auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (2-4). Die PAX-Genfamilie ist evolutionär hoch konserviert. Sie wurde zuerst bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* nachgewiesen (5) und findet sich bei einer Vielzahl verschiedenster Organismen, wie z.B. Maus, Mensch, Lanzettfisch, Kopffüßer oder Seescheide (6). Aufgrund der starken Homologie zwischen den murinen Pax-Genen und den humanen PAX-Genen konnten durch das Maus-Modell viele Erkenntnisse über die Funktion dieser Genfamilie gewonnen werden (7, 8). Die PAX-Gene sind nach der paired-box- Domäne benannt, die bei allen PAX-Genen zu finden ist (9). Es handelt sich um eine DNA-Sequenz, die eine 128 Aminosäure lange DNA-Bindungsdomäne kodiert und am N-terminalen Ende der PAX-Proteine liegt (10). Die paired-box-Domäne kann in zwei Untergruppen unterteilt werden. Am N-terminalen Ende der Domäne liegt die PAI-Domäne, die direkt mit der DNA interagiert. C-terminal liegt die RED-Domäne (PAI + RED = PAIRED), welche nicht direkt an die DNA bindet, aber an der Bindung der gesamten paired-box-Domäne an die DNA beteiligt ist (11). Nach dem fakultativen Vorkommen von zwei weiteren Domänen in den einzelnen PAX-Genen, lassen sich diese in vier Untergruppen einteilen (s. Tabelle 1). Dabei handelt es sich zum einen um eine Homeodomäne, eine weitere DNA-Bindungsdomäne (12) und zum anderen um ein Oktapeptid, welches eine transkriptionshemmende Funktion ausüben soll (13).

Tabelle 1: Untergruppen der PAX-Gene (14)

Untergruppe	Gen	Strukturdomänen		
		Paired-box-Domäne	Oktapeptid	Homeodomäne
1	PAX1	+	+	-
	PAX9	+	+	-
2	PAX2	+	+	+t
	PAX5	+	+	+t
	PAX8	+	+	+t

Fortsetzung Tabelle 1

Untergruppe	Gen	Strukturdomänen		
3	PAX3	+	+	+
	PAX7	+	+	+
4	PAX4	+	-	+
	PAX6	+	-	+

+: vorhanden und vollständig,

+t: vorhanden und trunkiert,

-: nicht vorhanden

PAX-Gene zeigen während der Organogenese eine dynamische Expression in einer Vielzahl unterschiedlicher Organe wie Auge, Niere, Extremitätenmuskulatur oder ZNS (15). Darüber hinaus zeigen Mutationen in einzelnen Vertretern der Genfamilie phänotypische Fehlbildungen wie das Waardenburg-Syndrom (PAX3) oder Aniridie (PAX6), die die Bedeutung der PAX-Gene für eine regelhafte Organentwicklung verdeutlichen (16, 17). In der Embryonalentwicklung spielen die PAX-Gene unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulation von epithelial-mesenchymalen Interaktionen, Zellproliferation und Zelldifferenzierung, Apoptoseresistenz, Migration von Vorläuferzellen und Selbsterneuerung von Zellen (1, 18-20). In den letzten Phasen der abschließenden Differenzierung der meisten fetalen Strukturen und in den meisten Zellen des Erwachsenen ist die Expression von PAX-Genen herunterreguliert (19, 21). Eine PAX-Expression wird aber auch bei Erwachsenen gefunden, wenn auch in geringerem Maße als während der Organogenese. So beispielsweise im Thymus, der Schilddrüse, der Augenlinse, im Gehirn oder in Lymphozyten (2, 8, 22).

In Tumoren konnte ebenfalls eine Expression von PAX-Genen nachgewiesen werden, unter anderem in Gewebe und Zelllinien von Lymphomen, Brust-, Lungen-, Darm-, oder Hautkrebs (21, 23). Im Hinblick auf die beschriebenen Prozesse, in die PAX-Gene während der Embryonalentwicklung eingebunden sind, ist anzunehmen, dass eine pathologische Expression von PAX-Genen die Entstehung und das Wachstum von Tumoren begünstigen kann.

1.2 PAX2

In dieser Arbeit wurde PAX2 als Vertreter der PAX-Genfamilie betrachtet.

PAX2 wurde beim Menschen auf Chromosom 10, Locus 24-25, lokalisiert (24). Es ist durch die Oktapeptidsequenz sowie eine trunkeierte Homeodomäne charakterisiert und setzt sich aus insgesamt 12 Exons zusammen, die ungefähr 86 kb umfassen (25).

Vier unterschiedliche Isoformen von PAX2 wurden bisher beschrieben (s. Tabelle 2 und 3). Sie entstehen durch alternatives Splicing von Exon 6, 10 oder Teilen von Exon 12. Isoform PAX2a kommt durch Insertion von Exon 6 zustande. Eine Deletion von Exon 6 findet man in Isoform PAX2b, die das häufigste Transkript ist. Isoform PAX2c entsteht durch Insertion von Exon 10 und Deletion von Exon 6. PAX2d ist Ergebnis einer Deletion der ersten 19 bp des Exon 12 und kommt mit (auch als Variante PAX2e bezeichnet) und ohne Exon 6 vor (PAX2d+ex6 und PAX2d Δ ex6) (26).

Zusätzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe eine neue Splicevariante von PAX2 beschrieben werden (Busse et al., Poster DGHO 2007). Diese Splicevariante enthält zusätzlich zu Exon 10 das Intron 9.

Tabelle 2: Größe der Exons von PAX2 und Stellen von alternativem Splicing

PAX2	
Exons	Nukleotide (nt) (25)
1	593 nt ¹
2	169 nt ¹
3	198 nt ¹
4	86 nt ¹
5	120 nt ¹
6	69 nt ¹ + (25)
7	176 nt ¹
8	127 nt ¹
9	102 nt ¹
Int 9	151 nt ⁵ + (Busse et al., DGHO 2007)
10	83 nt ² + (27)

Fortsetzung Tabelle 2

Exons	Nukleotide (nt)
11	87 nt ^{1/2}
12a	2395 nt ^{1/2}
12b	2376 nt ^{3/4} + (26)

(1: NM 003987.3; 2: NM 003988.3; 3: NM 003989.3; 4: NM 003990.3; 5: NG 008680)¹; + = alternativ gespaltene Exons und Introns

Tabelle 3: PAX2-Splicevarianten

Variante	a (25)	b (25)	c (27)	d (=dΔex6) (26)	e (=d+ex6) (26)
NM-Nummer ¹	NM 003987.3	NM 000278.3	NM 003988.3	NM 003989.3	NM 003990.3
Exon 6	+	-	-	-	+
Exon 10	-	-	+	-	-
Exon 12	-	-	-	(-19 bp)	(-19 bp)

Die Intron 9-positive Splicevariante gehört noch keiner offiziellen Nomenklatur an. Die Kombination mit anderen PAX2-Splicevarianten wurde in dieser Arbeit untersucht.

1.2.1 Physiologische Expression und Funktion von PAX2

1.2.1.1 Embryo und Fetus

PAX2 spielt in der Embryogenese eine bedeutende Rolle in der Entwicklung des Urogenitaltraktes, der Augen, der Ohren, der Milchdrüsen und des ZNS (8, 28).

Eine große Bedeutung hat es bei der Entwicklung der Niere. Schon im Pro- und Mesonephros der Maus lässt sich eine Expression von Pax2 nachweisen. Während der weiteren Entwicklung bildet sich ein spezifisches Expressionsprofil aus, das auf eine Bedeutung bei der Gewebedifferenzierung, hier der Wandlung von Mesenchym zu Epithel, hinweist (1).

¹ Referenznummern der Nukleotid-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Pax2 induziert den *glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF), der für das weitere Wachstum der Ureterknospe entscheidend ist, in der ebenfalls Pax2 exprimiert wird (1, 29). Mit fortschreitender Nierenentwicklung sinkt die Expression von Pax2 sehr stark ab (1).

Im cochleären Anteil des murinen Innenohrs spielt Pax2 eine Schlüsselrolle bei Wachstum und Differenzierung. Es reguliert hier ebenfalls die Weiterentwicklung von mesenchymalem Gewebe. Der Bereich der Pax2-Expression erstreckt sich von den Haarzellen bis zur Grenze der Stria vascularis und der Reissner Membran (30). Auch in einigen nicht-sensorischen Regionen findet eine Expression statt, wie zum Beispiel im Dach des Utriculus, im Ductus endolymphaticus und der lateralen Region des Crus commune (31). Bei menschlichen Embryonen konnte PAX2 in der Cochlea und der Macula utriculi nachgewiesen werden (32).

Für die Entwicklung der Augen ist neben PAX2 auch PAX6 bedeutend. In enger Kooperation sorgen sie für die korrekte Entwicklung unterschiedlicher Anteile des Auges. Aus Untersuchungen bei Mäusen ging hervor, dass Pax2 bei der Entwicklung des Augenbecherstiels zum Nervus opticus benötigt wird und darüber hinaus entscheidend an der Bildung des Chiasma opticum und des Tractus opticus beteiligt ist (33). Weitere differenzierungsregulierende Einflüsse von Pax2 im sich entwickelnden zentralen Nervensystem zeigen seine Expression während der Neurulation im späteren Neuroepithel des Gehirns. In der Gastrula der Maus lässt sich Pax2 zunächst in einer weiten Region im Bereich des Prosenzephalon bis zum Rhombenzephalon nachweisen. Nach Schluss des Neuralrohres reduziert sich die Expression auf einen schmalen Streifen im Grenzbereich von Mesenzephalon und Rhombenzephalon, die sog. Midbrain-Hindbrain Boundary (MHB) (33), welche die Entwicklung von Mesenzephalon und Cerebellum kontrolliert und für deren Formation Pax2 essentiell ist. Auch für den Schluss des Neuralrohres selbst in dieser Region scheint Pax2 eine Rolle zu spielen (34).

1.2.1.2 Adulter Organismus

PAX2 wird auch in einigen adulten Geweben exprimiert. In der Niere findet vor allem in den Papillen eine Expression statt (35). Auch in den Geweben der männlichen und weiblichen Gonaden, wie Ductus epididymis, Vas deferens und Ovidukt (nicht so Testis und Ovar), wurde eine Expression von Pax2 gefunden (36). Silberstein et al. konnten mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern die Expression von PAX2 in Myoepithelzellen und luminalen Zellen von Drüsenendstücken und Ausführungsgängen der menschlichen Brust nachweisen. Sie vermuteten, dass PAX2 beim Erhalt der Stammzellen eine Rolle spielt. Außerdem stellten sie fest, dass Pax2 in den Brustdrüsen der Maus für die Verzweigung der Drüsengänge verantwortlich ist (28).

1.2.2 Pathologische Expression von PAX2

Eine tumor-assoziierte Expression von PAX2 wurde in zahlreichen verschiedenen humanen Tumorentitäten festgestellt, die in Tabelle 4 aufgeführt sind.

Tabelle 4: PAX2-Expression in Tumoren

Tumorentität	Nachweis-Medium
Glioblastom	Tumorzelllinie SF-268 (21)
Mammakarzinom	Tumorzelllinie HS 578T (21) Mammakarzinomgewebe (28)
Kolonkarzinom	Tumorzelllinie KM12 (21)
Bronchialkarzinom	Tumorzelllinie NCI-H23, NCI-H522 (21)
Ovarialkarzinom	Tumorzelllinie IGROV1, OVCAR-8 (21)
Nierenzellkarzinom	Tumorzelllinie A498, RXF 393, SN12C (21), Wilms-Tumor-Gewebe (37), Nierenzellkarzinomgewebe (37)
Endometriumkarzinom	Endometriumkarzinomgewebe (38)
Prostatakarzinom	Tumorzelllinie LNCaP, DU145, PC3, Prostatakarzinomgewebe (39)
Kaposi-Sarkom	Tumorzelllinie KS-C1, KS-L3, KS-imm (40)
akute Leukämie	Knochenmarkgewebe, Blut (22)
Lymphome	B-und T-Zell-Lymphomgewebe (21)

Diese Ergebnisse lassen eine Beteiligung von PAX2 bei der Entstehung von Tumoren, bzw. dem Überleben von Tumorzellen vermuten. Gestützt wird diese Annahme durch Versuche, bei denen gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition der Expression in verschiedenen Krebszelllinien, zum Beispiel in Zelllinien von Nieren-, (37) Blasen- oder Ovarialkarzinomen (21) sowie von Kaposi-Sarkomen (40), zu vermindertem Wachstum, reduzierter Motilität und Invasivität sowie zum Zelltod führte. Es bestehen Hinweise für eine spezifische Expression des PAX2-Proteins bei Tumorpatienten, da man in mehreren Tumorentitäten ein HLA A2 restringiertes PAX2-Epitop gefunden hat, das bei Gesunden nicht nachgewiesen werden konnte².

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Expression von PAX2 in Tumorzellen zu Apoptoseresistenz, erhöhter Motilität und vermehrtem Zellwachstum in Abwesenheit exogener Wachstumsfaktoren führt.

² Asemisen AM et al. Daten noch nicht veröffentlicht.

1.3 WT1

Das WT1-Gen (Wilms-Tumor-Gen 1) ist auf Chromosom 11p13 lokalisiert und kodiert einen C₂H₂-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor (41). Es ist ca. 50 kb groß und besteht aus insgesamt 10 Exons. Das prolinreiche N-terminale Ende des Proteins wird von Exon 1 kodiert, die vier Zinkfinger am C-terminalen Ende des Proteins werden von den Exons 7-10 kodiert (42). Die Zinkfinger dienen der Bindung des Proteins an die DNA (41, 43). Die N-terminale Domäne ist in RNA- und Proteininteraktionen involviert (44) und beinhaltet zudem wichtige transkriptionsaktivierende und –hemmende Abschnitte (45, 46). Durch alternatives Splicing, das Vorkommen alternativer Translationsstartpunkte und RNA-Editierung, sind heute 24 verschiedene WT1-Proteine bekannt (47). Es gibt zwei vorherrschende Splicevarianten von WT1: Exon 5 (Splice I) und KTS (Splice II), durch deren Kombination die Grundlage für vier verschiedene Haupt-Isoformen des Proteins gegeben ist (s. Tabelle 5 und 6).

Exon 5 befindet sich zwischen dem prolinreichen N-Terminus und der ersten Zinkfingerdomäne, es kodiert 17 Aminosäuren. KTS kodiert drei zusätzliche Aminosäuren (Lysin (K), Threonin (T), Serin (S)) und befindet sich am 3'-Ende von Exon 9 zwischen dem 3. und 4. Zinkfinger (42).

Tabelle 5: Größe der Exons von WT1 und Stellen von alternativem Splicing

WT1	
Exons	Nukleotide
1	842 nt ¹
2	122 nt ¹
3	102 nt ¹
4	77 nt ¹
5	51 nt ¹ + (42)
6	96 nt ¹
7	150 nt ¹
8	89 nt ¹
9a	83 nt (-KTS) ¹
9b	92 nt (+KTS) ¹ + (42)
10	1400 nt ¹

(1: NM 024426.3)¹; + = alternativ gespligte Exons

Tabelle 6: WT1-Splicevarianten

Variante	A	B	C	D
NM-Nummer ¹	NM 000378.3	NM 024424.2	NM 024425.2	NM 024426.3
Splice I	-Exon 5 (42)	+Exon 5 (42)	-Exon 5 (42)	+Exon 5 (42)
Splice II	-KTS (42)	-KTS (42)	+KTS (42)	+KTS (42)

Namengebend war die Erstbeschreibung von WT1 als Tumor-Suppressor-Gen im Zusammenhang mit dem Wilms-Tumor (41, 48), dem häufigsten Nierenkrebs des Kindesalters (49). Eine Gruppe von kongenitalen Syndromen, die mit Wilms-Tumoren assoziiert sind, geht mit heterozygoten Mutationen im WT1-Gen einher, was zu der Vermutung führte, dass ein Funktionsverlust des Gens zur Tumorentstehung beiträgt. Es handelt sich dabei um das WAGR-Syndrom (engl.: Wilms tumour, aniridia, genitourinary anomalies, mental retardation), das Denys-Drash-Syndrom und das Frasier-Syndrom (50).

Es konnte jedoch festgestellt werden, dass bei isoliert auftretenden Wilms-Tumoren nur in ca. 15 % der Fälle eine Mutation des WT1-Gens vorlag (51) und die Mehrzahl der Wilms-Tumore das Wildtyp-Gen exprimierten (52), was die tumorsupprimierende Funktion des WT1-Gens in Frage stellte und auf eine mögliche onkogene Funktion hinwies (s. 1.3.2).

1.3.1 Physiologische Expression und Funktion von WT1

1.3.1.1 Embryo und Fetus

Die WT1-Expression erfolgt während der Embryo- und Fetogenese gewebespezifisch und daher räumlich eingeschränkt (53). Wie PAX2 ist auch WT1 wichtig bei der Differenzierung epithelialen Gewebes aus mesenchymalem Gewebe (54). Eine besonders wichtige und gut untersuchte Rolle spielt WT1 in der sich entwickelnden Niere. Zuerst ist WT1 im intermediären Mesoderm detektierbar, aus welchem die urogenitale Leiste entsteht (55-57). Die Expression setzt sich in dieser fort und nimmt in der sich entwickelnden Niere und den Gonaden zu. Es kann eine Expression im metanephrogenen Mesenchym beobachtet werden, aus welchem später die Nephrone entstehen. Eine verstärkte Expression ist in den sich entwickelnden Nephrone in den Vorläufern der glomerulären epithelialen Zellen zu finden (55). In den sich entwickelnden Hoden beschränkt sich die WT1-Expression auf die Sertoli-Zellen, die Tunica albuginea und das Rete testis. Auch im sich entwickelnden Ovar ist eine WT1-Expression festzustellen, besonders

deutlich in epithelialen Zellen, welche die Ovarien umgeben (58). Außerdem ist eine Expression während der Embryogenese in der sich entwickelnden Milz, in Zellen des Neuralrohres, in mesenchymalen Anteilen der Zölonhöhle und in haematopoetischen Vorläuferzellen nachzuweisen (53, 55, 58, 59).

1.3.1.2 Adulter Organismus

Eine Expression im erwachsenen Organismus findet sich in den Podozyten, den Mesangium-Zellen der Niere, den Sertoli-Zellen, den Granulosazellen, sowie myometrialen und endometrialen Stromazellen des Uterus. Außerdem ist eine Expression im ZNS und CD 34-positiven hämatopoetischen Stammzellen zu erkennen (47, 60).

1.3.2 Pathologische Expression von WT1

In soliden Tumoren konnte, im Vergleich zu gesundem Gewebe (61-63), eine Überexpression des WT1-Wildtyp-Gens nachgewiesen werden (s. Tabelle 7). In Experimenten konnte durch Reduktion der Expression des WT1-Wildtyp-Gens eine Wachstumsinhibition der Tumorzellen erreicht werden (63), was auf eine onkogene Funktion des WT1-Gens schließen ließ.

Tabelle 7: WT1-Expression in Tumoren

Tumorentität	Nachweis-Medium
Brustkrebs	HMEC HBL-100, MCT 1A Humane Zelllinien HS 578, T47D, MDA-MB468, 21MT, 21PT Humanes Tumorgewebe (61)
Gehirntumore	Humanes Tumorgewebe aus Astrozytomen, Glioblastomen, Ependymomen (64)
Kolorektales Adenokarzinom	Humanes Tumorgewebe (65)
Schilddrüsenkarzinom	Humanes Tumorgewebe (66)
Nierenzellkarzinom	Humane Zelllinien K562, E14, TM3, CCF-RC1, CCF-RC2 (67)
Duktales Pankreas-Adenokarzinom	Humanes Tumorgewebe (68)

Fortsetzung Tabelle 7

Tumorentität	Nachweis-Medium
Malignes Melanom	Humane Primäre Zelllinien WM1158, WM239A, WM1617, WM9, WM852, WM164, WM983A, WM983B, WM373, WM373, WM39, WM902B, WM793 (69)
Lungenkrebs	Humanes Tumorgewebe (70)
Knochen-und Weichgewebssarkome	Humanes Tumorgewebe (71)
Akute lymphatische Leukämie	Blut (72)
Akute myeloische Leukämie	Blut (72)
Chronische myeloische Leukämie	Blut (72)
Myelodysplastisches Syndrom	Blut (62, 72, 73)
Non-Hodgkin-Lymphome	Humanes Tumorgewebe von B- und T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen, humane Zelllinien Karpas 299, SU-DHL-4 (74)

Außer bei soliden Tumoren spielt das WT1-Gen eine sehr bedeutende Rolle bei hämatologischen Erkrankungen (s. Tabelle 7). Bei den meisten Leukämien liegt, im Vergleich zu Gesundblut, eine Überexpression des WT1-Wildtyp-Gens vor (62). Der WT1-Expressionslevel konnte daher als Indikator für submikroskopische Tumoraktivität (MRD-Marker) in der Diagnostik dieser Erkrankungen etabliert werden (75). Lediglich in ca. 10-15 % der AML finden sich Mutationen im WT1-Gen, die mit einer schlechten Prognose einhergehen (76, 77). Bei der ALL ist die Mutationsrate noch geringer (78).

In Transfektionsversuchen konnte durch Expressionsreduktion von WT1, wie auch bei soliden Tumoren, das Zellwachstum vermindert und Apoptose induziert werden (79). Es besteht bei Leukämien ein antiproportionaler Zusammenhang zwischen der Expression von WT1 und der Prognose der Patienten, so dass WT1 als Prognosefaktor genutzt werden kann. Die WT1-Expression in Lymphomen ist im Vergleich zu Leukämien niedriger (75).

1.4 Wechselseitige Regulation von PAX2 und WT1

Eine räumlich und zeitlich übereinstimmende Expression von PAX2 und WT1 konnte in der fetalen Niere, in Wilms-Tumoren, in Tumoren der Mamma und Prostata, sowie in akuten Leukämien gezeigt werden. (22, 28, 39, 80). Eine besonders hohe PAX2-Expression konnte in

Wilms-Tumoren festgestellt werden, bei denen keine WT1-Expression detektierbar war (80). Hinweise auf eine mögliche Repression von PAX2 durch WT1 ergab die Feststellung, dass WT1 an Promotoren bindet, die die EGR-1-Erkennungssequenz tragen und auf diese transkriptionshemmend wirkt (43, 81). Eine solche Sequenz ist auch bei PAX2 nachweisbar (1). Somit könnte eine hohe PAX2-Expression bei fehlender WT1-Expression erklärt werden. Ryan et al. konnten in Versuchen zeigen, dass WT1 während der normalen Nierenentwicklung ab einem bestimmten WT1-Expressionslevel hemmend auf den PAX2-Promotor wirkt (82). Umgekehrt ist PAX2 in der Lage, die Transkription von WT1 zu aktivieren. Es konnte gezeigt werden, dass die PAX2-Isoformen b und c den WT1-Promotor aktivieren können (83).

In PAX2-exprimierenden Mammakarzinomzellen konnte eine stark erhöhte Expression von WT1 gefunden werden. In murinen Brustdrüsen mit einer Pax2-Null-Mutation war auch die WT1-mRNA signifikant vermindert, was die Vermutung einer positiv korrelierenden Regulation von WT1 durch PAX2 unterstützte (28), die auf Grund der Expressionsmuster auch für das Prostatakarzinom und die akute myeloische Leukämie angenommen wird (22, 39).

1.5 Grundlagen der RNA-Interferenz

Eine Möglichkeit zur funktionellen Untersuchung von regulatorischen Zusammenhängen zwischen zwei Genen bietet die RNA-Interferenz (RNAi), mit der die Expression eines Interaktionspartners reduziert und ein Effekt auf das andere Gen geprüft werden kann.

RNAi beschreibt ein evolutionär konserviertes Phänomen. Es wird angenommen, dass es den Organismus vor exogenen (z.B. Viren) oder endogenen (Transposons) genetischen Parasiten schützen kann und eine differenzierte Regulierung eukaryotischer Genexpression ermöglicht (84). RNAi wurde zuerst in *Caenorhabditis elegans* als Mechanismus beschrieben, bei dem durch Einführung von einigen hundert Kilobasen langer dsRNA die komplementäre mRNA posttranskriptionell abgebaut wurde (85). In verschiedenen Tier- und Pflanzenarten konnte gezeigt werden, dass in die Zellen eingeschleuste lange dsRNA in kürzere, 21 Nukleotide große dsRNA gespalten wurde. Diese führte auch zum Abbau komplementärer mRNA und wurde als siRNA (short interfering RNA) bezeichnet (86, 87). Ein Strang des siRNA-Duplexes wird in den RNA-induced silencing complex (RISC), ein Ribonukleoprotein-Komplex, eingebunden und führt zu einer spezifischen Erkennung der komplementären mRNA durch RISC (87, 88). Die mRNA wird im Anschluss gespalten und abgebaut (87). Mit synthetischer, sequenzspezifischer siRNA konnte auch in Vertebraten die Inaktivierung von spezifischen Zielgenen erzielt werden (89). Möglich war dies durch die geringe Größe der siRNA von weniger als 30 Nukleotiden, da

durch längere Nukleotide in Wirbeltierzellen die Interferonantwort ausgelöst werden kann (90). Dabei handelt es sich um ein komplexes antivirales Abwehrsystem, das zu einer globalen posttranskriptionellen Inhibition der Genexpression führt (91).

Neben der siRNA konnte auch die miRNA identifiziert werden, bei der es sich um eine physiologischerweise endogen exprimierte kleine einzelsträngige RNA mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden handelt, die einen Einfluss auf die Genexpression mit Komponenten nimmt, die auch im siRNA-Signalweg vorkommen (92). Die miRNA weist eine sog. Haarnadelschleifenstruktur durch intramolekulare Anlagerung komplementärer Sequenzen auf. Nach Transkription und Prozessierung eines primären Transkriptes wird die miRNA vom Zellkern in das Zytoplasma transportiert (93-95), wo die funktionelle miRNA in einen miRISC inkorporiert wird, durch den, wie bei der siRNA, die Prozessierung der komplementären mRNA erfolgt (96).

1.6 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit soll die Splicevarianten-Expression von PAX2 und WT1 näher beschrieben und eine Interaktion beider Gene, bzw. deren Varianten, in verschiedenen Tumorentitäten untersucht werden. Es soll so ein Beitrag zum besseren Verständnis der Funktion dieser Gene und ihrer Splicevarianten in Tumoren und darüber hinaus zum besseren allgemeinen Verständnis der Tumorzellregulation geleistet werden.

In einem ersten Schritt der Arbeit soll gezeigt werden, ob sich das Expressionsmuster von PAX2 und dreier seiner Splicevarianten (PAX2 +Exon 6, +Exon 10 und die in unserer Arbeitsgruppe neu beschriebene Variante PAX2 +Intron 9) zwischen Zelllinien solider Tumore und Lymphome auf mRNA- und Proteinebene unterscheidet und eventuell charakteristisch für eine der beiden Tumorgruppen ist. Durch Vergleich von Gesundblut und Tumorgewebeproben soll gezeigt werden, ob die Expression der untersuchten Größen auf mRNA-Ebene tumorspezifisch ist, um sie gegebenenfalls als MRD-Marker verwenden zu können. Weiter soll die Expression von PAX2 und der betrachteten Splicevarianten in Gesundblut und Tumorzellen auch auf Proteinebene untersucht werden.

Hierfür ist erforderlich:

1. Die Etablierung neuer LightCycler® Real-Time-PCR-Bedingungen für die PAX2-Varianten +Exon 6 und +Exon 10.
2. Die Kultur der Tumorzelllinien.
3. Die Isolierung von RNA und Proteinen, sowie cDNA-Synthese.
4. Die Anwendung von quantitativer Real-Time-PCR und Western-Blot zur Detektion der

Expression auf mRNA-, bzw. Proteinebene.

Im zweiten Abschnitt soll die Expression von WT1, sowie die der Exon 5- und KTS-positiven Splicevarianten, in den gleichen Zelllinien und Kolonkarzinomgewebeproben untersucht werden. Die Expression soll mit der Expression von PAX2 und derjenigen der untersuchten PAX2-Splicevarianten verglichen werden, um zu prüfen, ob die unter 1.4 angeführte mögliche Interaktion zwischen PAX2 und WT1 sich in den beiden hier untersuchten Tumorgruppen widerspiegelt, bzw. sich ein splicevarianten-spezifisches Interaktionsmuster nachweisen lässt. Die Expression soll auf zwei mögliche Interaktionsformen geprüft werden:

1. Auf die lineare Korrelation, die einen stetigen Zusammenhang der beteiligten Größen über den gesamten Detektionsbereich zeigen soll.
2. Auf ein Schwellenphänomen, bei dem der Einfluss auf den Interaktionspartner im Sinne eines „on-off-Mechanismus“ erst nach Überschreiten eines bestimmten Expressionslevels des Aktivators bzw. Repressors zustande kommt.

Im dritten Abschnitt der Arbeit soll der vermutete Zusammenhang zwischen PAX2 und WT1 funktionell durch RNA-Interferenz-(RNAi) Versuche gezeigt werden, da dieser bisher nicht eindeutig bewiesen werden konnte. Es werden hierfür zwei Systeme verwendet, um deren Effizienz vergleichen zu können. Zum einen vektorungebundene doppelsträngige siRNA und zum anderen DNA-Plasmide, die für spezifische miRNA-Sequenzen kodieren. Hierfür ist erforderlich:

1. Die Auswahl von Zelllinien, die beide Gene und die untersuchten Splicevarianten exprimieren und eine gute Transfektionseffizienz zeigen.
2. Die Auswahl der effizientesten Transfektionsmethode für die verwendeten Zelllinien, um einen maximalen RNAi-Effekt zu erzielen.
3. Herstellung der miRNA-DNA-Vektoren und Auswahl geeigneter siRNA-Moleküle.
4. Kontrolle der Transfektionseffizienz mit Hilfe der Durchflusszytometrie.
5. Ernten und aufarbeiten der Zellen nach Versuchsende (Proteingewinnung, RNA-Isolierung, cDNA-Synthese)
6. Messung der Expressionslevel auf mRNA-Ebene (LightCycler® Real-Time-PCR).
7. Messung der Expression auf Proteinebene mit Western-Blot.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Puffer und Lösungen, die in den verwendeten Kits enthalten sind, sind nicht extra aufgeführt.

2.1.1 Zellkultur

Tabelle 8: Zellkultur und Zellverarbeitung

Medien	Hersteller
RPMI 1640-Medium	Biochrom, Berlin
Leibovitz-Medium	Biochrom, Berlin
DMEM	Biochrom, Berlin
L-15-Medium	Biochrom, Berlin
Eagle-MEM	Biochrom, Berlin
FCS	Biochrom, Berlin
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	Biochrom, Berlin
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Trypanblaulösung (0,4 %)	Gibco BRL, Karlsruhe

Zu 500 ml Kulturmedium wurden hinzugefügt: 50 ml FCS (10 %), bzw. 100 ml FCS (20 %), 10 ml L-Glutamin (200 mM), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml).

Tabelle 9: Verwendete Zelllinien (Alle Zelllinien leiten sich von humanen Primärzellen ab)

Lymphom-Zelllinien			
Zelllinien-bezeichnung	Art des Malignoms	Kulturmedium	Bezugsfirma
AMO	Multiples Myelom	RPMI, 20 % FCS	DMSZ, Braunschweig
DG75	Burkitt-Lymphom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig
Karpas422	B-Zell-Lymphom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig

Fortsetzung Tabelle 9

Zelllinien- bezeichnung	Art des Malignoms	Kulturmedium	Bezugsfirma
KM-H2	Hodgkin-Lymphom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig
HDLM2	Hodgkin-Lymphom	RPMI, 20 % FCS	DMSZ, Braunschweig
L540	Hodgkin-Lymphom	RPMI, 20 % FCS	DMSZ, Braunschweig
Raji	Burkitt-Lymphom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig
SU-DHL-4	B-Zell-Lymphom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig
SUP-M2	Anaplastisches großzelliges Lymphom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig
U698	B-Zell-Lymphom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig
U937	Histiozytisches Lymphom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig
U266	Multipl. Myelom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig
Granta519	B-Zell-Lymphom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig
Zelllinien solider Tumore			
Zelllinien- bezeichnung	Art des Malignoms	Kulturmedium	Bezugsfirma
SW620	Kolonadenokarzinom	Leibovitz 10 %	ATCC, Manassas, USA
HCT116	Kolonadenokarzinom	DMEM	ATCC, Manassas, USA
Cx94	Kolonadenokarzinom	RPMI, 10 % FCS	Cell Lines Service, Heidelberg
CaCo2	Kolonadenokarzinom	RPMI, 10 % FCS	Cell Lines Service, Heidelberg
Colo320	Kolonadenokarzinom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig
SW480	Kolonadenokarzinom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig
Cx2	Kolonadenokarzinom	RPMI, 10 % FCS	Cell Lines Service, Heidelberg
SW948	Kolonadenokarzinom	Leibovitz 10 %	DMSZ, Braunschweig
DMS79	Kleinzelliges Bronchialkarzinom		ATCC, Manassas, USA
SK-Mel 5	Malignes Melanom	DMEM, 10 % FCS	ATCC, Manassas, USA
SK-Mel 10	Malignes Melanom	MEM-Eagle	ATCC, Manassas, USA

Fortsetzung Tabelle 9

Zelllinien- bezeichnung	Art des Malignoms	Kulturmedium	Bezugsfirma
SKMel 16	Malignes Melanom	MEM-Eagle	Cell Lines Service, Heidelberg
SKMel 23	Malignes Melanom	RPMI, 10 % FCS	Cell Lines Service, Heidelberg
SKMel 24	Malignes Melanom	MEM-Eagle	ATCC, Manassas, USA
SKMel 28	Malignes Melanom	MEM-Eagle	ATCC, Manassas, USA
BCPAP	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig
TT260	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	RPMI, 20 % FCS	DMSZ, Braunschweig
8505C	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig
CGTH-W-1	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	RPMI, 10 % FCS	DMSZ, Braunschweig

2.1.2 Bakterienstämme

Für die Transformation von Plasmiden wurden One Shot™TOP10F' Competent E. coli von Invitrogen, Carlsbad, USA verwendet. Es handelt sich um chemisch kompetente Zellen, rekombinationsdefizient (recA1) und endonukleasedefizient (endA).

2.1.3 Bakterienkultur

Tabelle 10: Für die Bakterienkultivierung verwendete Materialien

Materialien	Hersteller
Spectinomycin	Sigma, Deisenhofen
LB-Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
Agar Select	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Sigma, Deisenhofen

Fortsetzung Tabelle 10

Materialien	Hersteller
ImMedia™ Kan Blue	Invitrogen, Carlsbad, USA
ImMedia™ Kan Liquid	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.4 Plasmide

Tabelle 11: Plasmide für die Vermehrung spezifischer PCR-Produkte und für die Transfektion

Plasmide	Plasmidgröße	Hersteller
pCR®-BluntII-TOPO®	3519 bp	Invitrogen, Carlsbad, USA
pCR®2.1-TOPO®	3931 bp	Invitrogen, Carlsbad, USA
pcDNA™6.2-GW/miR	4944 bp	Invitrogen, Carlsbad, USA
pcDNA™6.2-GW/± EmGFP-miR Negativkontrolle	5759 bp/5004 bp	Invitrogen, Carlsbad, USA
pmaxGFP	3486 bp	Amaya, Gaithersburg, USA

Vektorkarte von pCR®2.1-TOPO® (aus dem Manual „TOPO TA Cloning®“, Invitrogen).

Dieser Vektor besitzt in seiner Klonierungsregion 3'-Thymidin-Überhänge für die von der Taq-Polymerase an die PCR-Produkte angefügten 3'-Adenin-Überhänge

Abbildung 1: Vektorkarte von pCR®2.1-TOPO®.

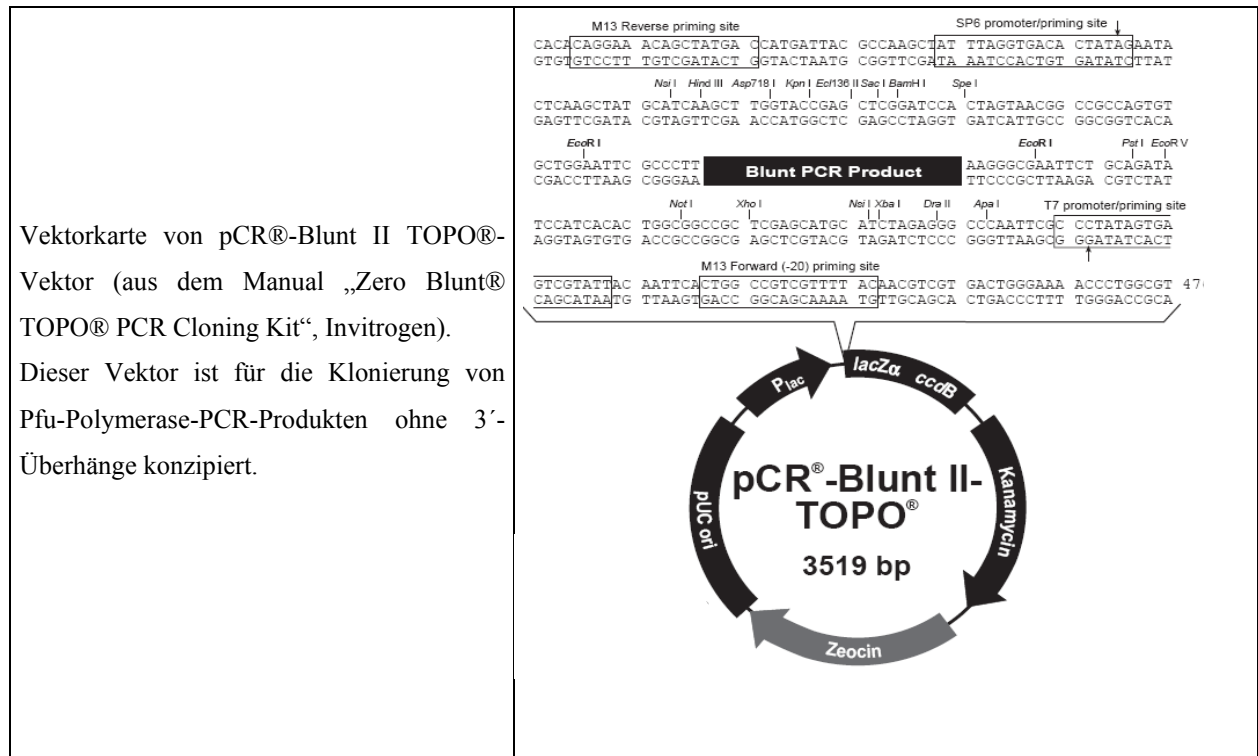


Abbildung 2: Vektorkarte von pCR®-Blunt II TOPO®.

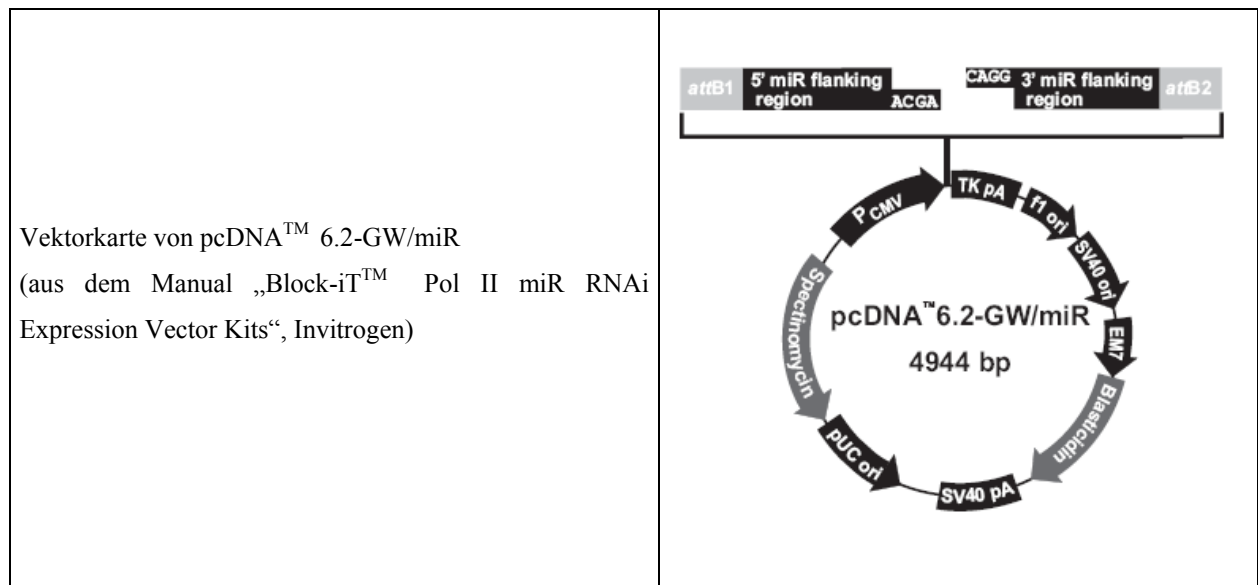


Abbildung 3: Vektorkarte von pcDNA™ 6.2-GW/miR.

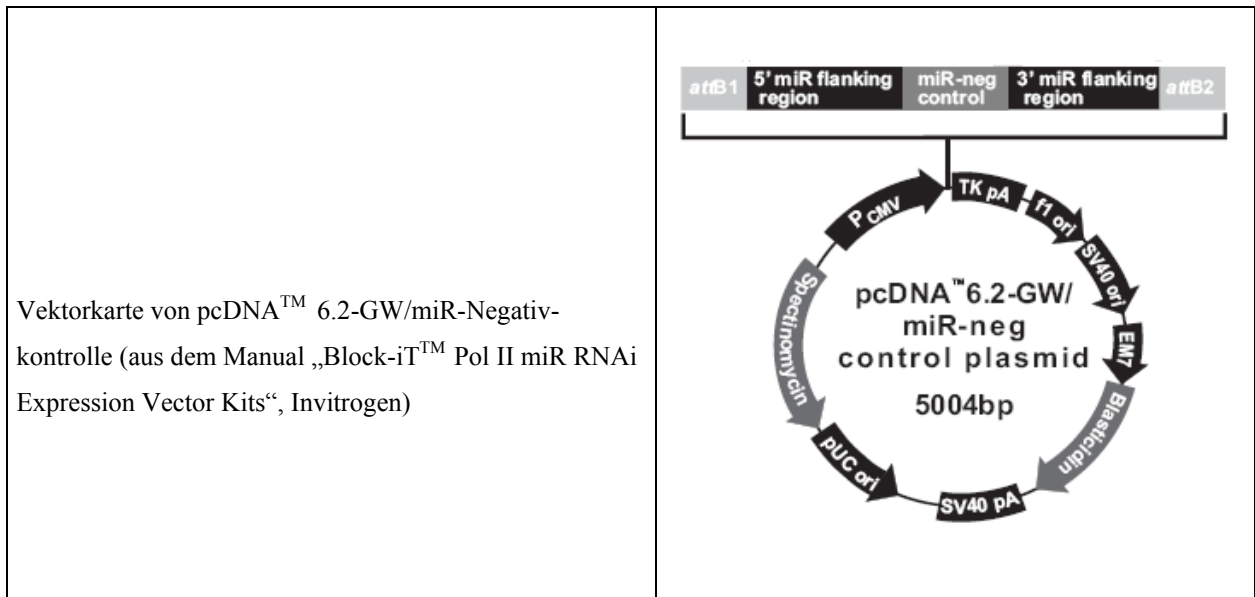


Abbildung 4: Vektorkarte von pcDNA™ 6.2-GW/miR-Negativkontrolle.

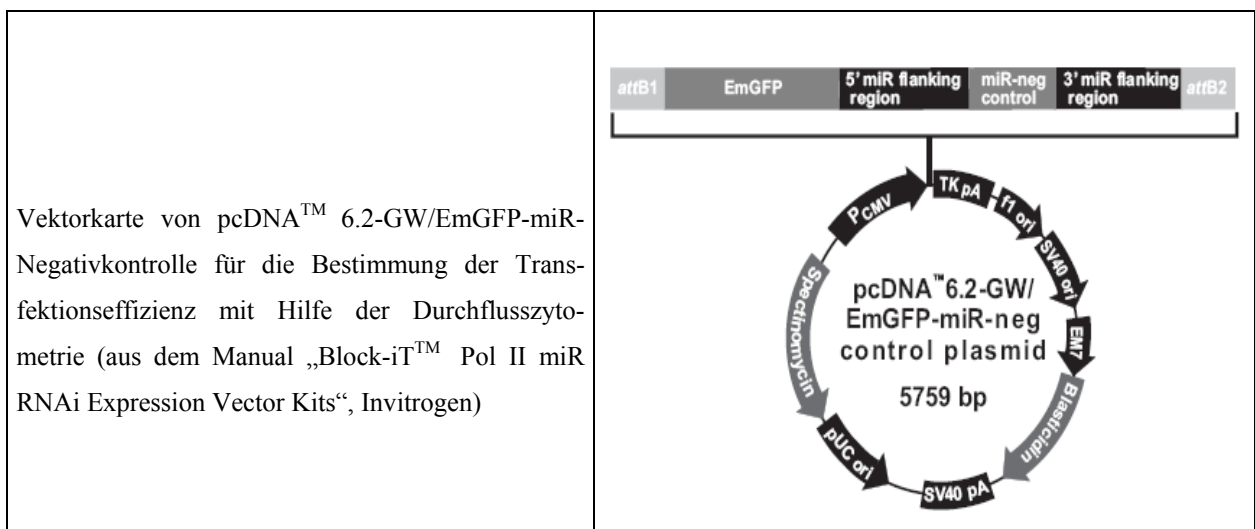


Abbildung 5: Vektorkarte von pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR-Negativkontrolle.

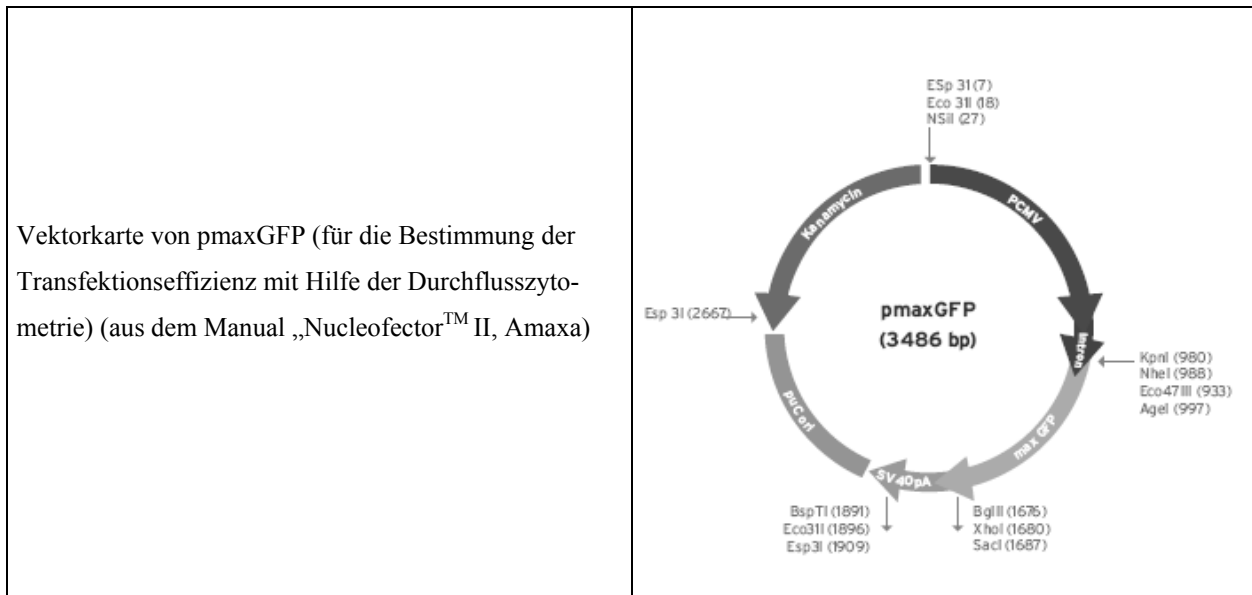


Abbildung 6: Vektorkarte von pmaxGFP.

2.1.5 Klonierung

Für die Klonierung von PCR-Produkten in Plasmide wurde das TOPO TA Cloning®-Kit und das Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning-Kit verwendet. Beide Kits wurden von Invitrogen, Carlsbad, USA, bezogen.

2.1.6 Plasmidisolierung

Zur Isolierung der Plasmide aus Bakterien wurde das Invisorb Plasmid-Spin-Mini-Two-Kit von Invitex, Berlin und das HighSpeed-Plasmid-Midi-Kit von Qiagen, Hilden verwendet.

2.1.7 Restriktion

Tabelle 12: Zur Restriktion der PCR-Produkte aus den Plasmiden verwendete Restriktionsendonucleasen und zugehörige Puffer

Enzyme und Lösungen	Hersteller
EcoRI	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
EcoRV	Roche Diagnostics, Mannheim
Buffer EcoRI	MBI Fermentas, St.Leon-Rot

Fortsetzung Tabelle 12

Enzyme und Lösungen	Hersteller
Buffer EcoRV "Sure Cut"	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR grade water	Sigma, Deisenhofen

2.1.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von Gene Analysis Service, Dr. A.C. Looman, Berlin durchgeführt.

2.1.9 Einfrieren von Zellen für RNA-Isolierung

Tabelle 13: Zum Einfrieren der Zellen für die nachfolgende RNA-Isolierung benötigte Materialien

Materialien	Hersteller
GTC-Puffer: 4 M Guanidiniumthiocyanat: 141,8 g 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0: 18,75 ml 0,5 % Laurylsarkosin: 4,35 ml	Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen
Bis auf 300 ml mit DEPC behandeltem Wasser (Nuklease-frei) auffüllen, über Nacht bei 37°C autoklavieren, kühl lagern	

2.1.10 RNA-Isolierung

Tabelle 14: Für die RNA-Isolierung verwendete Kits und Lösungen

Materialien	Hersteller
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Ethanol, absolut	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
DEPC behandeltes Wasser, Nuklease-frei	Ambion, Austin, USA
RNase free DNase Set	Qiagen, Hilden

cDNA-Synthese

Tabelle 15: Für die cDNA-Synthese verwendete Kits und Materialien

Materialien	Hersteller
Omniscript Kit	Qiagen, Hilden
Oligo-dT-Primer	Roche Diagnostics, Mannheim
Random-Hexamer-Primer	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase Inhibitor (40 U/ μ L)	Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.11 Konventionelle PCR

Tabelle 16: Für die konventionelle PCR eingesetzte Enzyme, Puffer, Oligonukleotide und weitere Materialien

Materialien	Hersteller
Cloned Pfu DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l)	Stratagene, Amsterdam, NL
10x Cloned Pfu DNA-Polymerase Puffer	Stratagene, Amsterdam, NL
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	Roche Diagnostics, Mannheim
10x Taq- Polymerase Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTP (10 mM)	Roche Diagnostics, Mannheim
Primer forward/reverse	Metabion, Martinsried
PCR grade water	Sigma, Deisenhofen

2.1.12 Real-Time-PCR

Tabelle 17: Für die quantitative Real-Time-PCR benötigte Kits, Primer und Sonden

Materialien	Hersteller
LightCycler®Fast-Start DNA Master HybProbe-Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Primer forward/reverse	Metabion, Martinsried
Sonde FL/LC FL= Fluorescein LC= LCRed640	Metabion, Martinsried

2.1.13 DNA- und RNA-Elektrophorese

Tabelle 18: Für die Gelelektrophorese benötigte Substanzen und Lösungen

Materialien	Hersteller
TBE (10x)	Gibco BRL, Karlsruhe
MESA (10x)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid (10 mg/ml H ₂ O)	Sigma, Deisenhofen
DNA-Größenmarker 100 bp	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
SeaKem LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf

2.1.14 Fragmentisolierung aus PCR-Ansätzen, bzw. aus Agarosegel

Zur Isolierung spezifischer PCR-Produkte aus dem Reaktionsansatz wurde das QIAquick-Purification-Kit von Qiagen, Hilden benutzt. Für die Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegel wurde das QIAEX II Agarose-Gel-Extraction-Kit von Qiagen, Hilden eingesetzt.

2.1.15 Polyacrylamidelektrophorese

Bei der Proteinauftrennung für Western-Blot wurde das 10 % Precise Protein Fertiggel, von Pierce, Rockford, USA benutzt.

2.1.16 Proteinmessung

Zur Proteinkonzentrationsmessung wurde das BSA Standard-Kit von Pierce, Rockford, USA eingesetzt.

2.1.17 Western-Blot

Tabelle 19: Für den Western-Blot eingesetzte Substanzen, Lösungen und Antikörper

Materialien	Hersteller
MPER (Mammalian Protein Extraction Reagent)	Pierce, Rockford, USA
Ladepuffer: Non-reducing lane marker sample buffer 2-Mercaptoethanol	Pierce, Rockford, USA Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Page Ruler Prestained Protein Marker	MBI Fermentas, St.Leon- Rot
Laufpuffer x10: 238 g HEPES 121 g Tris 10 g SDS	Gibco BRL, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe
Wet-Blotpuffer x10: 1,9 M Glycin 1 M Tris 10 % SDS 20 % Methanol	Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe J.T. Baker, Deventer, NL
Blockierungspuffer PBST: 1x PBS Tween 0,1 1 % BSA	Biochrom, Berlin Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe
Antikörper: 1. Antikörper: Anti-PAX2: Rabbit anti-phospho-PAX2 (Ser 393) Anti-WT1: Rabbit anti-WT1	Invitrogen, Carlsbad, USA Sigma, Deisenhofen

Fortsetzung Tabelle 19

Materialien	Hersteller
Anti-Aktin: Anti-Aktin from rabbit (A 2066) Anti-GAPDH: Mouse anti-GAPDH	Sigma, Deisenhofen Bioscience Resource Project, USA
2. Antikörper: ECL, Anti-rabbit IgG, PE-linked from donkey NA 934 Anti-mouse IgG-HRP	Amersham Pharmacia, Hannover R&D Systems, Minneapolis, USA
ECL-Reagens	Amersham Pharmacia, Hannover

2.1.18 Transfektion

Tabelle 20: Für die Transfektion verwendete Kits, Oligonukleotide und Lösungen

Materialien	Hersteller
BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector-Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
ssOligonukleotide für pre-miRNA-Synthese	MWG Biotech AG, Ebersberg
Hp GenomeWide siRNA 1027400	Qiagen, Hilden
Suspensios-Puffer	Qiagen, Hilden
RNAiFect-Kit	Qiagen, Hilden
Nucleofector-Solution	Amaxa, Gaithersburg, USA

2.1.19 Verwendete Geräte

Tabelle 21: Für die Durchführung der Versuche verwendete Geräte

Materialien	Hersteller
Biological Safety Cabinet ClassII Typ A/B3	Nuaire, Plymouth, USA
Blotkammer	BioRad, München
Brutschrank Automatic CO2 Inkubator	Friedrich S. Bartolomey, Alfter
Brutschrank CO ₂ -Auto-Zero	Kendro Laboratory Products, Berlin
Durchflusszytometer FACScan	Bioscience, Becton Dickinson, Heidelberg
Entwickler Western-Blot	BioRad, München
Gelkammer für Agarosegele Horizon 58	Gibco BRL, Karlsruhe
Gelkammer Mini PROTEAN 3 Cell	BioRad, München
Inkubator Orbital Incubator SI50	Dunn Labortechnik, Asbach
Kühlgeräte -4°C, -20°C	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlgeräte -80°C	Forma Scientific, Marietta, USA
Laborwaage KB 800-2	Kern&Sohn, Balingen
Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikrowellenherd	Moulinex, Paris
ND 1000 Spectrophotometer	Nano Drop Technologies, Wilmington, USA
Nucleofector-Elektroporationsgerät	Amaxa, Gaithersburg, USA
Olympus Digitalkamera	Olympus, Hamburg
PCR-Gerät Light Cycler® Real-Time	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR-Gerät Gradienten Cycler	Biorad, München
PCR-Gerät Multi Cycler PTC-200	MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf
Sterile Werkbank PCR Captair®bio	Erlab, Köln
Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
Thermomixer Eppendorf 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
UV-Schirm Reprostar II	LAMAG, Berlin
Vortexer VF2	IKA- Labortechnik, Staufen
Zentrifuge Eppendorf 5804R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Varifuge 3.2RS	Heraeus Sepatech, Osterode

2.1.20 Hilfsmaterialien

Tabelle 22: Eingesetzte Hilfsmaterialien

Materialien	Hersteller
Einfrierboxen	Nunc, Roskilde, DK
Einfrierröhrchen	Nunc, Roskilde, DK
Elektroporationsküvetten	Amaya, Gaithersburg, USA
Falcontubes (15 ml und 50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Filterpapier 3MM	Schleicher und Schüll, Dassel
Glasgefäße diverse	Schott Duran, Mainz
Neubauer Zählkammer	Sigma, Deisenhofen
Nitrocellulosemembran Hybond N	Amersham Pharmacia, Hannover
Petrischalen	Roth, Karlsruhe
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Brand, Wertheim
Pipetten, serologische	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Biozym, Hess. Oldendorf
Sterilfilter	NeoLab, Heidelberg
12-well Mikrotiter-Platte	Nunc, Roskilde, DK
24-well Mikrotiter-Platte	Nunc, Roskilde, DK
96-well Mikrotiter-Platte	Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen NUNCLON™ 160 ml	Nunc, Roskilde, DK
Zellschaber	VWR, Darmstadt

2.1.21 Verwendete Software

Tabelle 23: Für die Messungen und Auswertungen benutzte Software

Software	Hersteller
dChip 2006 (Cluster-Analyse)	Cheng Li Group, Harvard School of Public Health, Boston, USA
EndNote (Literaturverwaltung)	Thomson-Reuters, Carlsbad, USA
FACScan, Cell-Quest Software	Bioscience, Becton Dickinson, Heidelberg
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, USA

Fortsetzung Tabelle 23

Software	Hersteller
Microsoft Power Point	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft, Redmond, USA
Nano Drop Software ND-1000 V3.1.0	Nano Drop Technologies, Wilmington, USA
Light Cycler® Probe Design Software Version 1.0	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR RT-Light Cycler® Software Version 3.39	Roche Diagnostics, Mannheim
RNAi Designer	Invitrogen, Carlsbad, USA
SPSS 15.0 (Statistik)	SPSS, Chicago, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

2.2.1.1 Auftauen von Zellen

Die tief gefrorenen Zellen wurden in vorgewärmtes Medium aufgenommen und einmal im Medium gewaschen, um das dem Einfriermedium zugesetzte DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden dann in der empfohlenen Zelldichte ausgesät.

2.2.1.2 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in den entsprechenden Medien kultiviert. Mindestens alle zwei Tage wurde die Zelldichte bestimmt und die Zellen entsprechend ihrer Dichte umgesetzt.

Suspensionszellen wurden nach gründlichem Durchmischen der Suspension verdünnt und in frischem Medium weiterkultiviert. Um adhärente Zellen zu lösen, wurden sie entweder mit einem Zellschaber abgelöst und verdünnt in neue Kulturflaschen mit frischem Medium aufgenommen, oder sie wurden mit 1x PBS (+ 2 mM EDTA und 0,5 % FCS) 10 min. inkubiert und durch Zugabe frischen Mediums weiter vereinzelt und vollständig abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden umgehend für Versuche verwendet und danach nicht wieder in Kultur genommen.

2.2.1.3 Auszählen von Zellen zur Bestimmung der Dichte und Vitalität

50 µl Zellsuspension wurden entnommen und mit 0,4 % gepufferter Trypanblaulösung im Verhältnis 1:2 verdünnt. Der Farbstoff dringt in alle Zellen ein. Lebende Zellen können ihn aktiv wieder ausscheiden, während tote Zellen blau angefärbt bleiben. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer unter Ausschluss der toten Zellen unter einem Mikroskop ausgezählt. Es wurden mindestens 2 x 16 Felder betrachtet. Für die Berechnung der Zelldichte gilt:

Anzahl der Zellen in 16 Feldern x Verdünnung x 10⁴ (Umrechnungsfaktor Zählkammer) = Anzahl Zellen/ml.

2.2.1.4 Einfrieren von Zellen in Kultur

Die Zellen wurden entsprechend 2.2.1.3 ausgezählt und ca. $5 \cdot 10^4$ Zellen in ein Einfrierröhrchen mit Einfriermedium gegeben. Das Einfriermedium bestand aus 42 % Kulturmedium ohne Zusätze, 8 % DMSO und 50 % FCS. Die Einfrierröhrchen wurden nach Zugabe der Zellen umgehend in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox gegeben und zunächst bei -80°C , dann bei -160°C eingefroren.

2.2.1.5 Einfrieren von Zellen für RNA-Isolierung, bzw. Western-Blot-Ansätze

Die einzufrierenden Zellen wurden aus den Mikrotiter-Platten in Eppendorfgefäße überführt und bei 2000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde zu den Ansätzen für die RNA-Isolierung 600 μl GTC-Puffer gegeben. Die Zellen wurden bei -80°C eingefroren. Die Zellen für die Western-Blot-Ansätze wurden nach Abnahme des Überstandes erneut zentrifugiert und das Zellpellett trocken bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Klonierung

Die Klonierung von PCR-Produkten in Vektoren diente deren Vervielfältigung in Bakterien. Der zu transformierende Klonierungsansatz ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Klonierung von PCR-Produkten in Vektoren

Bestandteile	Volumen
PCR-Produkt aufgereinigt aus: a) dem PCR-Reaktionsmix (2.2.15.1), b) aus Agarosegel (2.2.15.2).	4 μl
TOPO Vektor (2.1.4) (bei voriger Verwendung der Pfu-Polymerase: pCR-Blunt II-TOPO®-Vektor, bei Verwendung der Taq-Polymerase: pCR 2.1-TOPO®)	1 μl
Salt Solution	0,5 μl

Der Ansatz wurde 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und danach auf Eis gestellt.

Das an die Vektoren kovalent gebundene Enzym DNA-Topoisomerase I besitzt zwei Funktionen: Eine Restriktionsfunktion (Erkennungssequenz: $(5'-\text{CCCTT}\downarrow-3')$) zum Öffnen der Vektoren und eine Ligationsfunktion zum Einfügen des zu klonierenden PCR-Produktes.

2.2.3 Transformation in One Shot™TOP10F' Competent E. coli

Die bei -80°C gelagerten kompetenten Zellen ($50\ \mu\text{l}$) wurden auf Eis aufgetaut, mit dem gesamten Klonierungsansatz (2.2.2) versetzt und 30 min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock über 30 sec. bei 42°C , der die Aufnahme der DNA in die Bakterien erleichtert, wurde der Ansatz für 2 min. auf Eis gestellt, dann $250\ \mu\text{l}$, auf Raumtemperatur vorgewärmtes, SOC-Medium hinzugefügt und 30 min. bei 37°C unter Schütteln bei 250 rpm inkubiert.

2.2.4 Herstellung von Selektionsnährböden für die Kultur von transformierten Bakterienklonen

Bei der Zubereitung der Medien wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

Die Auswahl der Selektionsmedien hing von dem Antibiotikaresistenzgen des verwendeten Vektors ab.

Als Selektionsmedium diente zum einen LB-Medium, versetzt mit Spectinomycin (Endkonzentration $50\ \mu\text{g/ml}$). Das Antibiotikum wurde steril filtriert und aliquotiert. Für die Selektionsnährböden wurden 4 g Agar zu 250 ml LB-Medium gegeben und 20 min. bei 120°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde Spectinomycin hinzugefügt und die Masse in Petrischalen gegossen.

Zum anderen wurde ImMedia™ Kan Blue verwendet, ein bereits mit Kanamycin versetztes Nährmedium (Endkonzentration $50\ \mu\text{g/ml}$). Der Packungsinhalt wurde in 200 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle zweimal kurz aufgeköcht und die Masse nach dem Abkühlen in Petrischalen gegossen.

2.2.5 Selektion transformierter Bakterienklone

$80\ \mu\text{l}$ transformierter One Shot™TOP10F' Competent E. coli wurden auf vorgewärmte Selektionsnährböden (2.2.4) ausplattiert und bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.2.5.1 TOPO®-Vektoren

Das Nährmedium enthielt Kanamycin, entsprechend des Kanamycin-Resistenzgens des verwendeten Vektors (2.1.4). So konnten nur Bakterienklone auf dem Medium wachsen, die den Vektor aufgenommen hatten. Zusätzlich beinhaltet der TOPO®-Vektor ein Gen für das Enzym

β -Galaktosidase, welches den synthetischen Indigofarbstoff 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-Gal) spalten kann. Dies führte dazu, dass Bakterienkolonien, die die β -Galaktosidase enthielten, blau erschienen. Der Vektor war so konzipiert, dass das Gen für β -Galaktosidase durch den Einbau des zu klonierenden DNA-Fragmentes gespalten wurde und dadurch das Enzym nicht mehr exprimiert werden konnte. Es entstand kein blauer Farbstoff. Diejenigen Bakterienkolonien, die den Vektor aufgenommen hatten, wuchsen aufgrund ihrer Kanamycin-Resistenz auf dem Nährboden. Die Kolonien, die zusätzlich das DNA-Fragment im Vektor trugen, blieben weiß. Dies ermöglichte die Selektion von erfolgreich mit dem DNA-Fragment transformierten Bakterien.

2.2.5.2 pcDNATM6.2-GW/ \pm EmGFP-miR-Vektoren

Das Nährmedium beinhaltete Spectinomycin. Der Vektor trug ein Spektinomycin-Resistenzgen. So wuchsen nur Bakterienkolonien, die den Vektor aufgenommen hatten und dadurch resistent gegen Spectinomycin waren.

2.2.6 Herstellung von Nährmedien für Bakterienkulturen

Die Herstellung der Nährmedien entsprach der Herstellung der Selektionsnährböden (2.2.4) mit dem Unterschied, dass dem LB-Medium keine Agarose zugefügt wurde und anstatt ImMediaTM Kan Blue ImMediaTM Kan Liquid verwendet wurde. Die Antibiotikakonzentration betrug für beide Ansätze 50 μ g/ml.

2.2.6.1 Bakterienkulturen für Plasmid-Präparationen im kleinen Maßstab (für Mini-Plasmidisolierung)

Für die Herstellung von Standards für die Real-Time-PCR.

Es wurden 2 ml des antibiotikahaltigen ImMediaTM Kan Liquid-Mediums (Kanamycinkonzentration: 50 μ g/ml) in einem leicht geöffneten 14 ml-Zentrifugenröhrchen mit einem einzelnen positiven E. coli-Klon (2.2.5.1) beimpft und 12-16h bei 37°C unter Schütteln bei ca. 300 rpm inkubiert. Zunächst wurden Stocklösungen hergestellt, indem von jeder Bakteriensuspension 500 μ l in ein steriles Einfrierröhrchen überführt, mit einem Tropfen sterilem Glycerin (Frostschutz) versehen und bei -80°C eingefroren wurden. Die verbleibende

Bakteriensuspension wurde in ein 2 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 1 min. bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde unverzüglich aufgearbeitet (2.2.7.1).

2.2.6.2 Bakterienkulturen für Plasmid-Präparationen im mittleren Maßstab (für Midi-Plasmidisolierung)

Für die Herstellung von Plasmiden für die Transfektion.

Es wurden 2 ml des antibiotikahaltigen LB-Mediums (Spectinomycinkonzentration: 50 µg/ml) in einem 14 ml-Zentrifugenröhrchen unter losem Verschluss mit einem einzelnen positiven E. coli-Klon (2.2.5.2) beimpft und 6-8h bei 37°C unter Schütteln bei ca. 300 rpm inkubiert. Im folgenden Schritt wurden aus dieser Vorkultur Stocklösungen hergestellt (s. auch 2.2.6.1). Aus der Vorkultur wurden 100 µl in 100 ml LB-Medium + Spectinomycin (Verdünnung 1:1000) in einem autoklavierten 500 ml-Erlenmeyerkolben gegeben. Diese Bakterienkultur wurde über Nacht bei 37°C zur weiteren Vermehrung unter Schütteln inkubiert. Der 100 ml-Ansatz wurde anschließend auf zwei 50 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und 30 min. bei 4500 rpm und 4°C zentrifugiert.

2.2.7 Plasmidisolierung

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden zwei verschiedene Kits benutzt.

2.2.7.1 Invisorb Spin-Plasmid-Mini-Two-Kit (Invitex)

Das Prinzip beruht auf der Lyse von Bakterien durch EDTA und SDS unter alkalischen Bedingungen und der selektiven Adsorption von DNA an eine Silikamembran in einem stark salzhaltigen Milieu.

Das gewonnene Pellet (2.2.6.1) wurde nach Abnahme des Überstandes in 250 µl Solution A aufgenommen und durch Vortexen resuspendiert. In diese Suspension wurden 250 µl Solution B gegeben und der Ansatz vorsichtig durch Schwenken vermischt. Das vorsichtige Mischen ist notwendig, um ein Abscheren von DNA hohen Molekulargewichtes zu vermeiden, die die Plasmid-DNA kontaminieren kann, da diese DNA-Fragmente nicht durch NaOH/SDS gefällt werden können. Es wurden 250 µl Solution C hinzugegeben und die Suspension gründlich geschwenkt. Anschließend wurde 5 min. bei 14000 rpm zentrifugiert. Im weiteren Verlauf wurde der Überstand auf einen Spin Filter (Säule mit DNA-bindender Matrix) gegeben, 1 min. bei

Raumtemperatur inkubiert, anschließend bei 10000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. 750 µl Wash Solution (+ 96 %-100 % Ethanol) wurden auf den Spin Filter gegeben und 1 min. bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurde für 3 min. bei 14000 rpm zentrifugiert, um jegliche Ethanolrückstände zu entfernen. Der Spin Filter wurde daraufhin in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Receiver Tube) gestellt und 50 µl RNase-freies H₂O direkt auf die DNA-bindende Matrix gegeben. Es folgten eine einminütige Inkubation bei Raumtemperatur und eine abschließende Zentrifugation bei 10000 rpm. Dadurch wurde die Plasmid-DNA von der Matrix gelöst und in dem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die Plasmid-DNA bei -20°C gelagert.

2.2.7.2 HighSpeed-Plasmid-Midi-Kit (Qiagen)

Auch hier ist das Prinzip die alkalische Zellyse, gefolgt von einer Bindung der Plasmid-DNA an Anionen-Austauscher-Kunstharze bei niedrigen Salzkonzentrationen und pH-Werten.

RNA, Proteine und Farbstoffe werden durch Waschschrte mit mittleren Salzkonzentrationen entfernt. Die DNA wird bei den Plasmid-Isolierungs-Kits von Qiagen in einem stark salzhaltigen Puffer eluiert, dann durch Isopropanol-Ausfällung aufkonzentriert und entsalzt. Hier wurde ein HighSpeed-Kit verwendet. Bei diesem Kit wird die DNA nicht mit Isopropanol und Zentrifugation gewonnen, sondern auf einen Filter (QIA-Prezipitator®) gebunden. Die Plasmid-DNA kann dann mit H₂O aus dem QIA-Prezipitator® eluiert werden. Durch dieses Verfahren wird das Risiko vermieden, das DNA-Pellet nach Zentrifugation beim Abkippen des Überstandes zu verlieren.

Die gewonnenen Bakterienpellets (2.2.6.2) wurden insgesamt erst in 6 ml gekühlten Puffer P1 (+RNase A (100 µg/ml)), dann zusätzlich in 6 ml Puffer P2 aufgenommen. Nach gründlichem Mischen des Ansatzes erfolgte eine Inkubation von 5 min. bei Raumtemperatur. Danach wurden dem Lysat 6 ml Puffer P3 (4°C) zugefügt. Nach kräftigem Schwenken wurde das Lysat in den QIAfilter-Einsatz gegeben und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurde ein HighSpeed Midi Tip in einen Erlenmeyer-Kolben eingesetzt und mit 4 ml Puffer QBT equilibriert. Der QIAfilter-Einsatz wurde mit einem Spritzenkolben versehen in den HighSpeed Midi Tip eingesetzt und das Lysat dort hinein gegeben. Durch die Schwerkraft lief das Lysat in den Erlenmeyer-Kolben. Im Anschluss wurde der HighSpeed Midi Tip mit Puffer QC gewaschen. Um die DNA aus dem Filter des HighSpeed Midi Tip auszuwaschen, wurde dieser in ein neues Gefäß eingesetzt und mit 5 ml Puffer QF gespült. Zu den 5 ml Puffer QF wurden 3,5 ml Isopropanol gegeben und die Mischung 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Plasmide

wurden nun in mehreren Arbeitsgängen im QIA-Prezipitator® gebunden, mit 70 % Ethanol gewaschen, mehrmals luftgetrocknet und schließlich mit 200 µl H₂O in ein Eppendorfgesäß eluiert.

2.2.8 Restriktion

Die DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen an spezifischen Sequenzen des Vektors (2.1.4) geschnitten.

Für EcoRI setzte sich der 20 µl-Ansatz zusammen aus: 15 µl Plasmid-DNA, 1 µl des Enzyms EcoRI, sowie 2 µl EcoRI-Puffer (vgl. Tabelle 25) und 2 µl H₂O. Die DNA wurde für mindestens 1-2h bei 37°C inkubiert. Um die Restriktionsenzyme zu inaktivieren, wurden die Ansätze danach 20 min. bei 65°C inkubiert und anschließend 2 min. auf Eis gestellt. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Lagerung bei -20°C. Die EcoRI-Restriktion wurde zur Überprüfung der Produktgröße mittels Gelelektrophorese durchgeführt.

Für den EcoRV-Verdau wurden 17 µl Plasmid-DNA mit 1 µl Enzym und 2 µl Puffer (Sure Cut) (s. Tabelle 25) für 1h bei 37°C inkubiert. Eine Inaktivierung war hier nicht erforderlich. Die EcoRV-Restriktion wurde zur Isolierung der DNA-Fragmente für die Standard-Herstellung für die Real-Time-PCR (2.2.12) durchgeführt.

Tabelle 25: Restriktionsenzyme mit den entsprechenden Schnittstellen und den vom Hersteller empfohlenen Puffern (Pfeile kennzeichnen die Schnittstellen der Enzyme)

Enzym	Erkennungssequenz	Verwendeter Puffer
EcoRI	5'-G↓AATTC-3'	EcoRI-Puffer
EcoRV	5'-GAT↓ATC-3'	Puffer-EcoRV „Sure Cut“

2.2.9 Gesamt-RNA-Extraktion aus Zelllinien

Für die RNA-Isolierung aus den Zellen wurde das RNeasy-Mini-Kit von Qiagen verwendet. Es beruht auf der Bindung von RNA an eine Silikamembran.

Zu 6·10⁶ bis 7·10⁶ Zellen, resuspendiert und homogenisiert in 1 ml GTC-Puffer (2.1.9 und 2.2.1.5, dieser denaturiert die Proteine und dient zum Aufschließen der Zellen für die nachfolgende RNA-Isolierung), wurde 1 ml 70 % Ethanol zugegeben. Das Lysat wurde gründlich durchmischt und nacheinander Aliquots von 700 µl auf die RNeasy-Mini-Spin-Säulen

geladen. Diese wurden für 15 sec. bei 14000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säulen wurden mit 350 µl Puffer RW1 gewaschen und mit einer Mischung aus 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde noch einmal mit 350 µl Puffer RW1 und zweimal mit 500 µl Puffer RPE (+Ethanol, absolut) gewaschen. Die Säulen wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die RNA in 50 µl RNase-freiem H₂O eluiert. Die Konzentration und Reinheit wurden sowohl spektrophotometrisch (2.2.16.1) als auch durch die Gelelektrophorese (2.2.14.2) überprüft.

2.2.10 cDNA-Synthese

Es wurde das Omniscript-RT-Kit von Qiagen verwendet. Für die Umschreibung der isolierten RNA (2.2.9) in cDNA sind zwei Enzymaktivitäten der Reversen Transkriptase wichtig: Die RNA-abhängige DNA-Polymerase, die nach Annealing der verwendeten Random-Hexamere und Oligo-dT-Nukleotide die cDNA generiert, und die RNaseH, eine Hybrid-abhängige Exoribonuklease, die nur RNA in DNA-RNA-Hybriden degradiert.

Es folgte die Konzentrationsberechnung der auf Eis aufgetauten RNA am NanoDrop®-Gerät (2.2.16.1). Bei dem verwendeten Kit können maximal 2 µg RNA in einem Volumen von maximal 15 µl verarbeitet werden. Der Ansatz wurde 5 min. bei 65°C inkubiert, um die RNA-Sekundärstrukturen zu lösen, danach 5 min. auf Eis gestellt. Ein Mix aus 2 µl Reverse Transkriptase-Puffer (10 x), 2 µl dNTPs (5 mM), 2 µl Random Hexamere (im Verhältnis 1:8,25) und Oligo-dT-Nukleotide (im Verhältnis 1:10), 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) und 1 µl Omniscript Reverse Transkriptase (4 U/µl) wurde der RNA zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde die Reverse Transkriptase durch Erhitzen auf 95°C inaktiviert und die Proben auf Eis gestellt. Folgende Kontrollen wurden mitgeführt: ein Ansatz ohne RNA, stattdessen mit RNase freiem Wasser und jeweils, pro umzuschreibender RNA-Probe, ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (-RT-Kontrolle). Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur selektiven Anreicherung von DNA-Bereichen definitiver Länge und Sequenz wurde die PCR eingesetzt. Die konventionelle PCR und die sich daran anschließenden Arbeitsschritte dienen der Gewinnung spezifischer Sequenzen zur Erstellung von Standardkurven für die quantitative LightCycler©-Real-Time-PCR (2.2.12).

Die einzelnen PCR-Schritte verlaufen nach einem voreingestellten Temperaturschema (s. Tabelle 26). Durch Erhitzen auf 95°C denaturieren die DNA-Doppelstränge. Sinkt die Temperatur, kommt es zur Hybridisierung (Annealing) von zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primern) an die komplementären DNA-Stränge. Die Primer werden als Vorwärts (forward)-Primer und Rückwärts (reverse)-Primer bezeichnet. Sie sind so gewählt, dass sie sich antiparallel zueinander jeweils an die Enden der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz anlagern. Eine hitzebeständige Polymerase verlängert durch Einbau von Nukleotiden (Elongation) die Primersequenzen. Durch die Wiederholung von DNA-Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation wird mit jedem Zyklus die DNA verdoppelt, so dass der gewünschte DNA-Abschnitt exponentiell angereichert wird.

Die Primer-Sequenzen wurden mit Hilfe der LightCycler®-Probe Design-Software ausgesucht.

Tabelle 26: Temperatureinstellungen für die konventionelle PCR

PCR-Phasen	Denaturierung	Annealing	Elongation
Temperatur	95°C	50°C	72°C
Zyklus 1	3 min.	30 sec.	60 sec.
Zyklus 2 bis 15	30 sec.	30 sec.	60 sec.

Beim letzten Zyklus wurde die Elongation auf 7 min. ausgedehnt (final extension) und der Ansatz auf 4°C abgekühlt.

2.2.11.1 Primersequenzen und Amplifikatgrößen

Folgende in Tabelle 27 aufgeführten Primerpaare wurden für die konventionelle PCR eingesetzt.

Tabelle 27: Primerpaare für die konventionelle PCR

Primer	Sequenz	Amplifikatgröße
PAX2 +Exon 6 fw	5'GCCACACCATTGTTCC 3'	194 bp
PAX2 +Exon 6 rev	5'AGTCCAGACCAGATGC 3'	194 bp
PAX2 +Exon 10 fw	5'GATGAAGTCAAGTCGAGTCTA 3'	198 bp
PAX2 +Exon 10 rev	5'TGCAGCCTCAGGCACCATT 3'	198 bp

Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel aufgetragen (2.2.14.1) und analysiert, die Banden der entsprechenden Größe ausgeschnitten und die DNA extrahiert (2.2.15.2).

2.2.12 Quantitative Real-Time-PCR (LightCycler®)

Um eine quantitative Aussage über die Aktivität bestimmter Gene treffen zu können, wurde die aus Zellen isolierte RNA (2.2.9) in cDNA (2.2.10) umgeschrieben und mit der LightCycler®-PCR vervielfältigt. Diese indirekt quantitative Messung der mRNA des entsprechenden Gens ermöglicht eine Aussage über dessen Aktivität.

Das Real-Time-PCR-Prinzip beinhaltet zwei Komponenten: Zum einen rapid-cycle-PCR, die eine sehr schnelle Amplifizierung der zugegebenen cDNA ermöglicht, zum anderen eine zeitgleich erfolgende Quantifizierung der amplifizierten DNA mit Hilfe der Fluoreszenzmessung. Die Erzeugung der Fluoreszenz erfolgt durch das FRET-Prinzip (Fluorescence Resonance Energy Transfer) mittels Hybridisierungs-Sonden (an Oligonukleotide gekoppelte Fluorochrome). Dazu müssen die LightCycler®-Sonden in enger räumlicher Nähe mit einem Abstand von 1-5 Basen binden. Die Sonde FL (Donor, mit Fluorescein) wird durch eine externe LED-Lichtquelle angeregt und überträgt einen Teil ihrer Anregungsenergie auf die benachbarte Sonde LC (Akzeptor, mit LC-Red 640). Diese gibt dadurch messbares Licht ab. Die Sonden sind so konzipiert, dass sie sich zwischen den Primerbindungsstellen während des Annealing-Schrittes anlagern. Fluorescein befindet sich am 3'-Ende der FL-Sonde und verhindert damit, dass die Sonde als Primer fungieren kann. Aus demselben Grund ist die LC-Sonde am 3'-Ende phosphoryliert. Durch das Sonden-Prinzip ist eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung bereits während der PCR möglich. Je mehr DNA amplifiziert wird, desto mehr LightCycler®-Sonden können an ihre spezifische Sequenz binden und die Fluoreszenz steigt proportional zu der DNA-Amplifizierung an. Überschreitet die Fluoreszenz das unspezifische Hintergrundrauschen, ist der sog. Crossing Point C_p erreicht. Hier liegt definitionsgemäß in allen Reaktionen die gleiche DNA-Konzentration vor, unabhängig von der Ausgangskonzentration des Zielgens. Reaktionen, bei denen viel Ausgangsmaterial vorgegeben ist, erreichen den C_p bei einer niedrigeren Zyklusstufe. Auf Grund dieses Zusammenhanges ist der C_p ein Maß für die Ausgangsmenge der mRNA in den einzelnen Reaktionen und kann mit Hilfe der LightCycler®-Software in eine Konzentration umgerechnet werden. Überschreitet die DNA-Konzentration - und damit einhergehend die Fluoreszenz - den C_p , folgt eine exponentielle Zunahme der DNA-Konzentration (log-Phase), an welche sich die sog. Plateau-Phase anschließt. Es kommt, durch

einsetzende Enzyminaktivierung und Behinderung des Primer-Annealings durch PCR-Produkte, zur Stagnation der DNA-Amplifizierung.

Zur Quantifizierung werden drei Verdünnungsstufen der entsprechenden DNA-Amplifikate in Duplikaten als Standards bei jedem Lauf mitgeführt (absolute Quantifizierung). Die Standardkurve entsteht durch Auftragen des dekadischen Logarithmus der eingesetzten Menge gegen den C_p , es besteht eine linear antiproportionale Beziehung zwischen den beiden Größen (s. Abbildung 7).

Des weiteren wird die Expression des Zielgens mit der Expression eines konstitutiv exprimierten, nicht regulierten sog. Haushaltgens, hier PBGD, normalisiert. Durch diese relative Quantifizierung wird die Varianz der Expressionsergebnisse gemindert. Unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der cDNA-Synthese innerhalb einer experimentellen Probe betreffen Ziel- und Haushaltgen gleichermaßen, wodurch diese Ungenauigkeiten relativiert werden. Ziel- und PBGD-Gen müssen mit der gleichen Effizienz amplifiziert werden, da sich ansonsten erhebliche Abweichungen bei der Berechnung der Expressionswerte ergeben. Die Effizienz kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Bei der benötigten Steigung handelt es sich um die Steigung der Standardkurve. Sie kann dem LightCycler®-PCR-Protokoll entnommen werden (s. Abbildung 7).

Um die Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz zu überprüfen, kann mit dem LightCycler® eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird die Temperatur kontinuierlich erhöht, so dass sich die amplifizierten DNA-Doppelstränge in Abhängigkeit der jeweiligen Schmelzpunkte in ihre Einzelstränge auftrennen. Die resultierende Abnahme der Fluoreszenz wird gemessen und in Form einer DNA-Schmelzkurve dargestellt. Zur besseren Veranschaulichung wird von der Software die erste negative Ableitung des Fluoreszenzsignales gegen die Temperatur dargestellt (s. Abbildung 20 A-C) Da Mutationen die Schmelzpunkte der DNA-Doppelstränge verändern, erlaubt die Schmelzkurvenanalyse genetische Variationen wie SNPs oder Deletionen in einem PCR-Produkt zu identifizieren. Zudem lassen sich unspezifische Produkte, wie Primerdimere, aufgrund der geringeren Schmelztemperatur nachweisen.

Die Primer- und Sonden-Sequenzen wurden mit Hilfe der LightCycler®-Probe Design-Software ausgesucht.

Der Reaktionsansatz von 20 µl setzte sich jeweils zusammen aus:

2 µl cDNA, jeweils 1 µl spezifische Primer (10 µM) und Sonden (4 µM), 2 µl Master Mix LightCycler® Fast-Start DNA Master HybProbe (Taq DNA-Polymerase, Reaktionspuffer,

dNTP-Mix), je nach PCR entsprechend der zugehörigen $[MgCl_2]$ jeweils $x \mu l$ $MgCl_2$ und $12 - x \mu l$ PCR grade water (2.2.12.1).

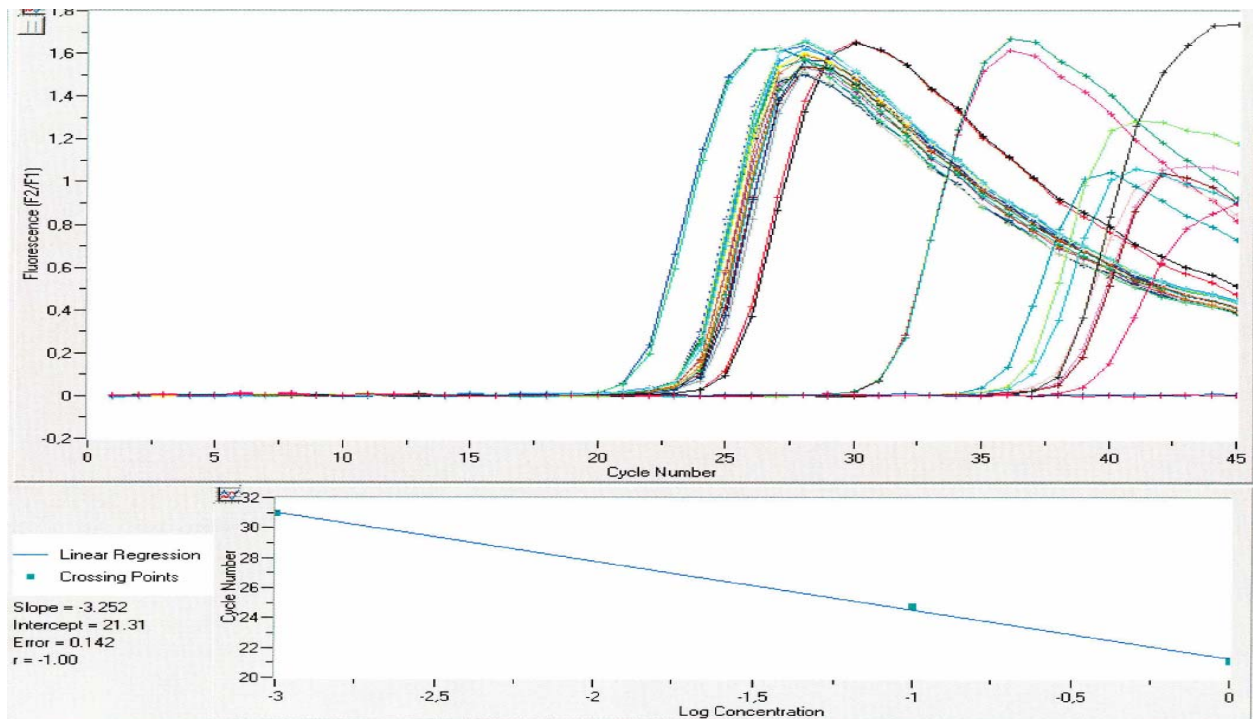


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung einer LightCycler®-Amplifikationskurve für PBGD in Lymphom-Zelllinien, inklusive -RT-Kontrollen. Die Standardkurve entsteht durch Auftragen des dekadischen Logarithmus der definierten Standardkonzentration gegen den C_p . Es besteht eine linear antiproportionale Beziehung zwischen den beiden Größen. Mit der angegebenen Steigung der Standardkurve kann die Effizienz des PCR-Laufes berechnet werden. (F1=Fluoreszenz der Sonde FL, F2=Fluoreszenz der Sonde LC).

2.2.12.1 Zusammensetzung der Real-Time-PCR-Ansätze

Tabelle 28: Real-Time-PCR-Ansätze

Gen/Splicevariante	[MgCl ₂] [mM]	MgCl ₂ [25 mM] (μl)	H ₂ O (μl)	Primer fw/rev [10 μM] (μl)	Sonde FL/LC [4 μM] (μl)
PAX2-Exon 5-8 ³	3,5	2,0	10,0	1,0	1,0
PAX2 +Exon 6	2,0	0,8	11,2	1,0	1,0
PAX2 +Exon 10	1,5	0,4	11,6	1,0	1,0
PAX2 +Intron 9	2,0	0,8	11,2	1,0	1,0
WT1-Exon 1-3 ⁴	2,0	0,8	11,2	1,0	1,0
WT1 +Exon 5	3,0	1,6	10,4	1,0	1,0
WT 1 +KTS	5,0	3,2	8,8	1,0	1,0

2.2.12.2 Detektionsbereich der PCR

Tabelle 29: PCR-Detektionsbereiche

PCR	genaue Detektion in pg/μl bis:
PBGD	1·10 ⁻⁵
PAX2-Exon 5-8	1·10 ⁻⁵
PAX2 +Exon 6	1·10 ⁻⁴
PAX2 +Exon 10	1·10 ⁻⁴
PAX2 +Intron 9	1·10 ⁻⁴
WT1-Exon 1-3	1·10 ⁻⁵
WT1 +Exon 5	1·10 ⁻⁵
WT1 +KTS	1·10 ⁻⁴

³ PAX2-Exon 5-8-PCR bezeichnet die PCR, die das PAX2-Transkript splicevarianten-unabhängig detektiert

⁴ WT1-Exon 1-3-PCR bezeichnet die PCR, die das WT1-Transkript splicevarianten-unabhängig detektiert

Der genaue Detektionsbereich umfasst den Bereich, in dem die Standard-Duplikate definierter Konzentrationen reproduzierbar auf einer Geraden liegen.

2.2.12.3 PCR-Effizienz

Tabelle 30: Verwendete PCRs und zugeordnete Effizienz

PCR	Effizienz
PBGD	1,99
PAX2-Exon 5-8	1,94
PAX2 +Exon 6	1,98
PAX2 +Exon 10	1,97
PAX2 +Intron 9	1,95
WT1-Exon 1-3	1,88
WT1 +Exon 5	1,98
WT1 +KTS	1,96

Eine Effizienz von 2,0 entspricht nach der unter 2.2.12 aufgeführten Formel einer idealen PCR-Effizienz von 100 % (Verdopplung der Amplifikate/Zyklus). Die angegebenen Werte ergeben sich aus dem arithmetischen Mittelwert der Effizienzen aus jeweils 10 PCR-Läufen.

2.2.12.4 Primer- und Sondensequenzen und Real-Time-PCR-Bedingungen sowie Amplifikatgrößen

Tabelle 31: Für die Real-Time-PCR verwendete Primer- und Sondensequenzen, Arbeitsbedingungen und resultierende Amplifikatgröße

<u>PBGD</u>			
Primer forward	Primer reverse	Sonde FL	Sonde LC
5' TGCAGGCTACC ATCCATGTCCT GC 3'	5' AGCTGCCGTG CAACATCCAGG ATGT 3'	5' CGTGG AATGTT ACGAGCAGTGAT GCCTACC-fluo 3'	5' LCRed-640- TGTGGGTCATCCTC AGGCCATCTTC-pho 3'

Fortsetzung Tabelle 31

<u>PBGD</u>			
Denaturierungs- temperatur	Denaturierungs- zeit	Annealing- temperatur	Annealingzeit
95°C	0 sec.	65°C	12 sec.
Elongations- temperatur	Elongationszeit⁵	Zyklenzahl	Amplifikatgröße
72°C	10 sec.	45	187 bp
<u>PAX2-Exon 5-8</u>			
Primer forward	Primer reverse	Sonde FL	Sonde LC
5'GGTGAGAAGA GGAAACG 3'	5'GCAGATAGAC TCGACTTG 3'	5'CTCAGTCCCCAA TGGAGATTCC-fluo 3'	5'LCRed-640- GAGTGGTGTGGAC AGTTTGCG-pho 3'
Denaturierungs- temperatur	Denaturierungs- zeit	Annealing- temperatur	Annealingzeit
95°C	0 sec.	57°C	12 sec.
Elongations- temperatur	Elongationszeit	Zyklenzahl	Amplifikatgröße
72°C	10 sec.	55	266 bp/ 345 bp (+Exon 6)
<u>PAX2 +Exon 6</u>			
Primer forward	Primer reverse	Sonde FL	Sonde LC
5'GCCACACCATT GTTC 3'	5'AGTCCAGACC AGATG 3'	5'AGGAAACGTGA TGAAGTTGAGG- fluo 3'	5'LCRed-640- TACACTGATCCTGC CCACATTAGAG-pho 3'

⁵ Als Richtwert für die Elongationszeit gilt: $t = (\text{bp}/25) \text{ sec.}$

Fortsetzung Tabelle 31

<u>PAX2 +Exon 6</u>			
Denaturierungs- temperatur	Denaturierungs- zeit	Annealing- temperatur	Annealingzeit
95°C	0 sec.	57°C	9 sec.
Elongations- temperatur	Elongationszeit	Zyklenzahl	Amplifikatgröße
72°C	8 sec.	55	194 bp
<u>PAX2 +Exon 10</u>			
Primer forward	Primer reverse	Sonde FL	Sonde LC
5'GATGAAGTCAA GTCGAGTCTA 3'	5'TGCAGCCTCA GGCACCATT 3'	5'ACACAGACATA CCCAGTTGTGAC- fluo 3'	5'LCRed-640- GTCGTGACATGGCG AGCAC-pho 3'
Denaturierungs- temperatur	Denaturierungs- zeit	Annealing- temperatur	Annealingzeit
95°C	0 sec.	59°C	10 sec.
Elongations- temperatur	Elongationszeit	Zyklenzahl	Amplifikatgröße
72°C	8 sec.	55	198 bp
<u>PAX2 +Intron 9</u>			
Primer forward	Primer reverse	Sonde FL	Sonde LC
5'GGTTACCCCC TCACG 3'	5'GGGACAGAAT AGCAGTGG 3'	5'CCTCCACCCTGG CAGGA-fluo 3'	5'LCRed-640 GGTGCCTGGTAGGT GACAA-pho 3'
Denaturierungs- temperatur	Denaturierungs- zeit	Annealing- temperatur	Annealingzeit
95°C	0 sec.	57°C	12 sec.

Fortsetzung Tabelle 31

<u>PAX2 +Intron 9</u>			
Elongations-temperatur	Elongationszeit	Zyklenzahl	Amplifikatgröße
72°C	10 sec.	55	212 bp
<u>WT1-Exon 1-3</u>			
Primer forward	Primer reverse	Sonde FL	Sonde LC
5'GGGTTACAGCA CGGTCACCT 3'	5'GCGTCCTCAG CAGCAAAG 3'	5'CAGCAGTACTC GGTGCCGCCCCC- fluo 3'	5'LCRed-640 TCTATGGCTGCCAC ACCCCCACCG-pho3'
Denaturierungs-temperatur	Denaturierungs-zeit	Annealing-temperatur	Annealingzeit
95°C	0 sec.	57°C	12 sec.
Elongations-temperatur	Elongationszeit	Zyklenzahl	Amplifikatgröße
72°C	10 sec.	55	218 bp
<u>WT1 +Exon 5</u>			
Primer forward	Primer reverse	Sonde FL	Sonde LC
5'GTGAAATGGAC AGAAGGG 3'	5'TTGCAGCCTG GGTAAG 3'	5'ACGTGTGCCTG GAGTAGC-fluo 3'	5'LCRed-640- CGACTCTTGTACGG TCGGC-pho 3'
Denaturierungs-temperatur	Denaturierungs-zeit	Annealing-temperatur	Annealingzeit
95°C	0 sec.	60°C	12 sec.
Elongations-temperatur	Elongationszeit	Zyklenzahl	Amplifikatgröße
72°C	10 sec.	45	221 bp

Fortsetzung Tabelle 31

<u>WT1 +KTS</u>			
Primer forward	Primer reverse	Sonde FL	Sonde LC
5'GCTCAAAAGAC ACCAAAGG 3'	5'ACTAATTCATC TGACCGGG 3'	5'AGACCCACACC AGGACTC-fluo 3'	5'LCDRed-640 ACAGGTAAAACAA GTGAAAAGCCC-pho 3'
Denaturierungs- temperatur	Denaturierungs- zeit	Annealing- temperatur	Annealingzeit
95°C	0 sec.	60°C	12 sec.
Elongations- temperatur	Elongationszeit	Zyklenzahl	Amplifikatgröße
72°C	10 sec.	45	251 bp

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch getrennt (2.2.14.1) und analysiert.

2.2.13 Amplifizierung von aufgereinigter DNA aus dem Reaktionsansatz (2.2.15.1), bzw. aus Agarosegel (2.2.15.2)

Zur Herstellung von Standards für die quantitative LightCycler©-Real-Time-PCR (2.2.12) müssen die über die Real-Time-PCR gewonnenen spezifischen PCR-Produkte isoliert werden (2.2.15.1, bzw. 2.2.15.2). Nach diesem Schritt ist eine weitere Amplifizierung dieser Real-Time-PCR-Produkte mittels konventioneller PCR notwendig, um die PCR-Produkte in Vektoren klonieren (2.2.2) zu können. Die Zusammensetzung des Reaktionsmixes ist in Tabelle 32 dargestellt.

Tabelle 32: Zur DNA-Amplifizierung nach Isolierung aus dem Reaktionsansatz, bzw. Agarosegel, verwendete Enzyme, Oligonukleotide und Lösungen

Materialien	Volumen
Taq-Polymerase 10 x Reaktionspuffer/ Pfu-Polymerase 10 x Reaktionspuffer	5 µl
Primer fw (10 µM)	1 µl
Primer rev (10 µM)	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Taq- Polymerase (5 U/µl)/ Pfu- Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl
H ₂ O	40 µl
DNA	1 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Es wurde grundsätzlich auf Eis pipettiert.

2.2.14 Elektrophorese

Die Gelelektrophorese beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Sie dient der Identifizierung und Trennung von DNA-Fragmenten bzw. von Gesamt-RNA. Sie kann außerdem zur Abschätzung der Konzentration von Nukleinsäuren herangezogen werden.

2.2.14.1 DNA-Elektrophorese

Es wurden 1,5 prozentige Agarosegele hergestellt. 1,5 g Agarose wurden in 100 ml 0,5x TBE-Puffer aufgekocht, 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) (Phenanthridinfarbstoff der bei Anregung durch UV-Licht fluoresziert) hinzu gegeben und in eine Gelkammer gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde die Gelkammer mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt. Je 10 µl (konventionelle PCR), bzw. 20 µl (Real-Time-PCR) der Amplifikate wurden mit 5 µl Bromphenolblau (Ladepuffer) gemischt und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur unter einer konstanten Spannung von 7 V/cm. Als Referenz für das

Molekulargewicht diente ein DNA-Längenstandard (100 bp-Marker), der zusammen mit den Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde.

2.2.14.2 RNA-Elektrophorese

Es wurden 1 prozentige Agarosegele hergestellt, indem 0,3 g Agarose in 30 ml 1x MESA-Puffer aufgekocht, nach dem Abkühlen 5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gemisch in eine Gelkammer überführt wurde. Nachdem das Gel polymerisierte, wurde die Gelkammer mit 1x MESA-Puffer aufgefüllt. 5 µl der extrahierten RNA (2.2.9) wurde mit 5 µl Bromphenolblau gemischt und aufgetragen. 80 % der Gesamt-RNA stellt die rRNA dar. Ihre 18S-Untereinheit (1,9 kb) und 28S-Untereinheit (5 kb) sind als scharfe Bande zu erkennen.

Die DNA- und RNA-Gele wurden unter UV-Licht (302 nm) analysiert und zur Dokumentation mit einer Digitalkamera fotografiert.

2.2.15 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden zur Herstellung von Standards für die Real-Time-PCR benötigt.

2.2.15.1 Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem PCR-Reaktionsmix

Es wurde der QIAquick Purification-Kit (Qiagen) verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an Silicagel gebunden wird, im Gegensatz zu Unreinheiten wie Enzymen und nicht eingebauten Nukleotiden. Es können DNA-Fragmente mit einer Größe von 100 bp bis 10 kb aufgereinigt werden. Zum PCR-Reaktionsansatz (2.2.12) wurde ein fünfmal größeres Volumen an Puffer PB hinzugefügt, die Mischung auf die QIAquick-Säule mit Auffanggefäß gegeben, 30–60 sec. bei 14000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach der Zugabe von 750 µl Waschpuffer PE auf die Säule folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte. Danach wurde die Säule in ein steriles 1,5 ml-Eppendorfgefäß umgesetzt und 30 µl H₂O auf die Silicamembran gegeben, 1 min. bei Raumtemperatur inkubiert, darauf 1 min. bei 14000 rpm zentrifugiert und die Säule verworfen.

Die Reinheit und Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch überprüft (2.2.16.1). Die DNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei –20°C gelagert.

2.2.15.2 Fragmentisolierung aus Agarosegel

Die Isolierung der DNA aus Agarosegel erfolgte mit dem QIAEX II Extraction-Kit (Qiagen). Hiermit können DNA-Fragmente von 0,2 kb bis 3 kb aus einem 1,5 % prozentigen Agarosegel durch Schmelzen der Agarose und selektiver quantitativer Adsorption von Nukleinsäuren an Silicapartikel (QIAEX II-Partikel) herausgelöst werden. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente (2.2.14.1), wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Zu je 100 mg Gel wurden 300 µl QX 1-Puffer hinzugefügt. Nach Zugabe von 10 µl der QIAEX II-Suspension folgte eine Inkubation bei 50°C unter Schütteln für 10 min. Nach einer Zentrifugation von 30 sec. bei 14000 rpm wurde der Überstand aus Agarose, Proteinen, Ethidiumbromid und Salzen vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde in 500 µl QX 1-Puffer durch Vortexen resuspendiert, für 30 sec. bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand wiederum abpipettiert. Es folgten in gleicher Weise drei Waschschrte mit jeweils 500 µl Puffer PE. Anschließend wurde das Pellet für 15 min. bei Raumtemperatur unter der sterilen Werkbank getrocknet, um mögliche Ethanolreste zu entfernen. Das getrocknete Pellet wurde in 25 µl H₂O resuspendiert, 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min. bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit der reinen DNA wurde in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Die Reinheit und Konzentration der isolierten DNA wurde spektrophotometrisch überprüft (2.2.16.1). Die DNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.16 Spektrophotometrische Bestimmung der Konzentration von Proteinen sowie der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Hierfür wurde das NanoDrop ND 1000®-Gerät verwendet. Es handelt sich um einen Spektrophotometer, der Probenvolumina von 2 µl für Proteine und 1 µl für Nukleinsäuren messen kann. Sein Wellenlängenbereich liegt zwischen 220-750 nm. NanoDrop® benötigt keine Messküvetten, da die Technologie die Proben unter Ausnutzung der Proben-Oberflächen-spannung am Messort hält.

2.2.16.1 Messung von Nukleinsäureproben

Nukleinsäureproben müssen bei diesem Verfahren bis zu einer Konzentration von 3700 ng/µl (DNA), bzw. 3000 ng/µl (RNA) nicht verdünnt werden.

Es wird eine 1 µl-Probe auf das Ende eines Glasfaseroptikkabels pipettiert, welches als Empfängerfaser dient. Ein zweites Glasfaseroptikkabel (Senderfaser) wird in Kontakt mit der Probe gebracht, wodurch diese einen Abstand von genau 1 mm zwischen den beiden Glasfaseroptikkabeln überbrückt. Dieser Abstand zwischen den Kabeln stellt den konstanten Messweg für das Licht dar. Als Lichtquelle für die spektrophotometrische Messung dient ein Xenon-Blitzlicht. Nach Durchstrahlung der flüssigen Probe wird das Licht durch einen Spektrometer analysiert und die Probenkonzentration mit Hilfe der NanoDrop®-Software errechnet. Die gewonnenen Daten werden auf einem PC gespeichert.

Ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren ist das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}). Der Berechnungsfaktor für die DNA liegt bei 50 ng/µl, für die RNA bei 40 ng/µl. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} sollte $>1,8$ für die DNA, $>2,1$ für die RNA betragen. Geringere Werte deuten auf eine Protein- oder Phenolkontamination hin.

2.2.16.2 Messung der Proteinkonzentration unter Verwendung der BCA-Methode

Bei der BCA-(Bicinhoninic Acid) Proteinnachweismethode bildet sich in Anwesenheit von Proteinen ein Cu-BCA-Chelatkomplex, der bei seinem Absorptionsmaximum von 562 nm gemessen wird. Für die Quantifizierung wird eine Standardkurve erstellt. Mit Hilfe der Software wird dann eine Proteinkonzentration in mg/ml berechnet. Am NanoDrop ND 1000® können Proteinkonzentrationen von 0,2 mg/ml bis zu 8,0 mg/ml bestimmt werden. Es können maximal fünf Standards im Doppelansatz gemessen werden. Entsprechend der zu erwartenden Proteinkonzentration müssen daher fünf in diesem Bereich liegende Standards verwendet werden. Die BCA-Methode erfordert für jeden Messdurchgang die Herstellung einer neuen Standardkurve.

2.2.17 Erstellung der Standard- und Probenverdünnung zur BCA-Proteinmessung für Western-Blot

Nach Auftauen auf Eis wurden die Proben in MPER aufgenommen, um die Proteine aus den Zellen zu extrahieren. Durch Zentrifugation über 5 min. bei 5000 rpm gelangten die Proteine in den Überstand und konnten in ein separates Gefäß überführt werden. Um die Proteine quantifizieren zu können, wurde eine BSA-Lösung (2000 µg/ml) über 5 Stufen jeweils 1:2

verdünnt (1000 µg/ml bis 31,25 µg/ml). 5 µl der Proteinproben wurden im Verhältnis 1:10-1:80 in der Mikrotiter-Platte verdünnt. Auf jeden Ansatz wurden 200 µl BCA-Working-Reagent gegeben (im Verhältnis 50:1 Reagens A:B). Die Mikrotiter-Platte wurde für 30 min. bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit dem NanoDrop ND 1000® gemessen (2.2.16.2).

2.2.18 Auftrennen von Proteinen im Polyacrylamidgel

Bei der Elektrophorese trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix Proteine nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auf. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10 % prozentigen Polyacrylamid-Fertiggel (2.1.16), welches Trenn- und Sammelgel in sich vereint. Das Gel wurde in eine Elektrophoreseapparatur eingesetzt, die Gelkammern mit 10 x Laufpuffer (2.1.18) gefüllt und die Geltaschen mit 20 µl Proteinprobe (17 µl Proteine + 3 µl Ladepuffer) bzw. 7 µl Molekulargewichtsmarker (2.1.18) beladen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei folgenden Bedingungen: 70 V für ca. 10 min. bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten und eine gemeinsame Lauffront bildeten, dann wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Sobald der Ladepuffer das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese abgebrochen.

Bei Verwendung von Aktin als Positivkontrolle mussten zwei identische Gele beladen werden. Die Primärantikörper gegen PAX2, WT1 und Aktin stammen aus Kaninchenserum, daher ist der zweite Antikörper gegen Kaninchenprotein gerichtet und markiert auf der Nitrocellulosemembran beide Proteine gleichzeitig. Wurde GAPDH als Positivkontrolle verwendet, genügte ein einziges Gel, da der Primärantikörper gegen GAPDH aus Mausserum stammt. Der zweite Antikörper ist gegen das Mausprotein gerichtet, und sowohl das zu untersuchende Protein als auch das Kontrollprotein konnten nacheinander auf der gleichen Membran detektiert werden.

2.2.19 Western-Blot

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden mittels einer Blotkammer auf eine Nitrocellulosemembran, welche die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen bindet, elektrophoretisch übertragen und immobilisiert. Dazu wurde ein „Sandwich“ in folgender Reihenfolge ohne Lufteinschlüsse zusammengestellt: Auf in Wet-Blotpuffer (2.1.18) getränktes Filterpapier wurde die in Wet-Blotpuffer getränkte Nitrocellulosemembran gelegt, darauf das Gel gebettet, das mit einem wiederum in Wet-Blotpuffer getränktem Filterpapier bedeckt wurde.

Das „Sandwich“ wurde in der Blotkammer so platziert, dass die Membran der Anode und das Gel der Kathode zugewandt war, damit die negativ geladenen Proteine auf die Membran übertragen wurden. Der Transfer erfolgte innerhalb von 1h bei 300 mA. Nach dem Transfer wurde das „Sandwich“ zerlegt und zur Orientierung die Membran an der rechten oberen Ecke eingeschnitten.

2.2.20 Detektion von Proteinen auf Membranen

Die Western-Blot-Membran mit den immobilisierten Proteinen wurde in 10 ml Blockierungspuffer (2.1.18) über Nacht bei 4°C inkubiert, um die restlichen Proteinbindungsstellen der Blotmembran abzusättigen. Anschließend wurde die jeweilige Membran mit den in Blockierungspuffer verdünnten Primärantikörpern (2.1.18) inkubiert. Der anti-phospho Pax2-Antikörper wurde im Verhältnis 1:1000, der anti-WT1-Antikörper im Verhältnis 1:2500, der Anti-Aktin Antikörper im Verhältnis 1:2000 verdünnt und die Membranen für 2h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBST für jeweils 5 min. folgte eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (2.1.18). Der Peroxidase-gekoppelte anti-rabbit IgG Antikörper wurde 1:5000 in Blockierungspuffer verdünnt. Die Membran wurde erneut fünfmal in PBST gewaschen und anschließend für 2 min. mit der ECL-Lösung (2.1.18) im Verhältnis 1:10 bedeckt. Die Detektion beruht auf der Oxidation von Luminol, die von Chemilumineszenz begleitet ist und in Gegenwart von Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird. Die Lumineszenz wurde durch Belichten eines Filmes dokumentiert.

Der Antikörper gegen GAPDH (1:10000 verdünnt) wurde nach der Filmbelichtung und zweimaligem Waschen der PAX2- und WT1-Membranen für 30 min. inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBST erfolgte die Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper für 45 min. Die Proteindetektion erfolgte wie bei der Detektion der PAX2-, WT1- und Aktin-Proteine.

2.2.21 Elektroporation

Zur Elektroporation wurde der Nucleofector® von Amaxa verwendet.

Bei der Elektroporation werden Zellen mit kurzen elektrischen Impulsen mit hoher Spannung behandelt, wodurch sich ein transmembranes Potential aufbaut. Dadurch wird in der Zellmembran die Ausbildung von temporär vorhandenen Poren induziert, durch welche

Nukleinsäuren in das Innere der Zellen gelangen können. Im Unterschied zu anderen Transfektionsmethoden und anderen Elektroporatoren, können mit der Nucleofector®-Technologie Nukleinsäuren direkt in den Zellkern transportiert werden. Dies stellt gerade für die Transfektion von DNA-Plasmiden einen Vorteil dar. Durch den direkten nukleären Transport der Nukleinsäuren ist diese Transfektionsmethode vom Zellzyklus unabhängig.

Die Transfektionsrate ist abhängig von der Amplitude und der Dauer des elektrischen Impulses, sowie von der Konzentration und der Menge der verwendeten Nukleinsäuren. Unter in-vitro-Bedingungen ist eine Spannung im Kilovolt-Bereich und eine Pulsdauer von einigen Mikrosekunden für eine effiziente Elektroporation notwendig.

Für die Transfektion mit dem Nucleofector® stehen mehrere voreingestellte Programme zur Verfügung, in denen verschiedene elektrische Einstellungen für bestimmte Zelltypen festgelegt sind. Die Programme werden mit speziellen Nucleofector®-Puffern kombiniert, die für jeden primären Zelltyp entwickelt wurden. Werden Zelllinien verwendet, deren Transfektionsbedingungen nicht vom Hersteller optimiert wurden, müssen die Bedingungen durch Kombination verschiedener Programme und Puffer etabliert werden.

2.2.21.1 Nukleofektion

Nach Auszählen und Waschen der Zellen in PBS wurde das Zellpellet in entsprechendem auf Raumtemperatur vorgewärmten Nucleofector®-Puffer (100 µl pro Ansatz) aufgenommen, und die entsprechende Menge Plasmid (s. Tabelle 33) zugegeben. Nach Durchmischen und Überführen der Transfektionsansätze in eine Nucleofector®-Küvette, wurde die Nukleofektion mit dem jeweils für die Zelllinien spezifischen Programm (s. Tabelle 33) durchgeführt. Im Anschluss wurden sofort 500 µl auf Raumtemperatur vorgewärmtes Medium in die Küvette gegeben. Danach wurde die Zellsuspension in eine mit entsprechendem Kulturmedium vorgefüllte Mikrotiter-Platte überführt und im Brutschrank inkubiert. Die Überprüfung der Transfektionseffizienz erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (2.2.24) nach 24h.

Die entsprechend angelegten Ansätze für Real-Time-PCR, Western-Blot und Durchflusszytometrie wurden nach den jeweiligen Zeitpunkten abgenommen und bei -80°C eingefroren (2.2.1.5), bzw. weiter verarbeitet.

Tabelle 33: Für die Nukleofektion benutzte Zelllinien, Plasmide und Geräteeinstellungen

Zelllinie	Zellzahl/Ansatz	Transfizierte Plasmide	Programm	Puffer
U937	1·10 ⁶	pmaxGFP (1 µg), miRNA PAX2 1078, 1278, 1839 (5 und 7 µg)	V-01	V
U266	2·10 ⁶	pmaxGFP, pcDNA TM 6.2-GW/miR WT1 1373, 1463, 1686, pcDNA TM 6.2- GW/miR± EmGFP-Kontroll-Vektoren (2, 4 und 6 µg)	T-01	R
KM-H2	1·10 ⁶	pmaxGFP (5 µg)	T-01	T
Raji	1·10 ⁶	pmaxGFP (2 µg)	M13	V
SU- DHL4	2·10 ⁶	pmaxGFP (2 µg)	T17	T
L 540	1·10 ⁶	pmaxGFP (2 µg)	T-01	V

2.2.22 Lipofektion

Die Lipofektion wurde mit RNAiFect von Qiagen durchgeführt. Das Prinzip besteht in der Ausbildung von Liposomen. Kationische Lipide bilden hierbei einen natürlichen Komplex mit negativ geladener DNA. Liposomen sind Vesikel, die aus einem wässrigen Kompartiment bestehen, das durch eine Phospholipid-Bilayer-Schicht eingeschlossen wird. Die Komplexe aus Nukleinsäuren und Lipiden werden als Lipoplexe bezeichnet. Ihre positive Ladung erlaubt eine Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran, wodurch das Eindringen der Lipoplexe in die Zelle erleichtert wird. Der Mechanismus der Transfektion mit Lipoplexen beruht auf der Endozytose. Das Endosom, das bei der Endozytose gebildet wird, wird in der Zelle abgebaut, wodurch die Nukleinsäuren in das Zytoplasma entlassen werden. Die Neutralisation erfolgt wahrscheinlich durch die Interaktion der kationischen Lipoplexe mit den anionischen Zelllipiden, wodurch die Nukleinsäuren aus dem Komplex freigesetzt werden und wieder biologisch aktiv sind.

2.2.22.1 RNAiFect

$8 \cdot 10^4$ Zellen/well (s. Tabelle 34) wurden 48h vor Transfektion ausplattiert, um am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 80 % zu erreichen. Es wurde pro Ansatz 1 μg siRNA (s. Tabelle 34) mit dem entsprechendem Kulturmedium (s.2.1.1) zu einem Gesamtvolumen von 100 μl gemischt. Hierzu wurden 9 μl RNAiFect gegeben und 15 min. inkubiert. Von den adhärennten Zellen wurde das Medium abgenommen und 300 μl neues Medium pro Ansatz zugegeben. Nach der Inkubationszeit von 15 min. wurden die 109 μl Mix pro Ansatz zugegeben, die Zellen im Brutschrank inkubiert und nach 4h die Transfektionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmt (2.2.24). Nach den zuvor festgelegten Zeitintervallen wurden die entsprechenden Ansätze für Real-Time-PCR und Western-Blot bei -20°C eingefroren (2.2.1.5).

Tabelle 34: Mit RNAiFect behandelte Zelllinien, transfizierte siRNA und Arbeitsbedingungen

Zelllinie	Zellzahl/well	Mikrotiter -Platte	Transfizierte siRNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
8505C	$8 \cdot 10^4$	24well	Hs PAX2 1 HP siRNA, Hs PAX2 2 HP siRNA, Hs PAX2 4 HP siRNA, Hs PAX2 5 HP siRNA, AllStars Negative Control siRNA, AllStars Negative Control siRNA Alexa Fluor® 488
CGTH-W-1	$8 \cdot 10^4$	24well	Hs PAX2 1 HP siRNA, Hs PAX2 2 HP siRNA, Hs PAX2 4 HP siRNA, Hs PAX2 5 HP siRNA, AllStars Negative Control siRNA AllStars Negative Control siRNA Alexa Fluor® 488

2.2.23 RNA-Interferenz

2.2.23.1 siRNA

Die siRNA wurden von Qiagen mit Hilfe des HiPerformance Design Algorithm synthetisiert. Als Kontrolle für die Durchflusszytometrie wurde die fluoreszenzmarkierte AllStars Negative Control Alexa Fluor® 488-siRNA von Qiagen verwendet. Für die Sequenz dieser siRNA gibt es

nach Herstellerangabe keine komplementäre Sequenz im Genom von Säugetieren. Als Negativkontrolle für die Durchflusszytometrie und die Transfektionsversuche wurde die AllStars Negative Control-siRNA von Qiagen ohne Fluoreszenzmarkierung benutzt.

2.2.23.1.1 Verwendete siRNA

Tabelle 35: Verwendete siRNA, Angabe von Zielgenen, -sequenzen und Lage in den Zielgenen

siRNA	Zielgen	Lage im Zielgen	Zielsequenz
Hs PAX2 1 HP siRNA	PAX2	Exon 12 (Nt 3146- 3166) NM 000278.3 (Variante b) ¹	5' CACAGCTACACGCCCATTTAAA 3'
Hs PAX2 2 HP siRNA	PAX2	Exon 12 (Nt 3576- 3596) NM 000278.3	5' CCCGTAGTTGCTCTTTTCGGTA 3'
Hs PAX2 4 HP siRNA	PAX2	Exon 12 (Nt 2873- 2893) NM 000278.3	5' CAGGAACTGAACAGAACCACA 3'
Hs PAX2 5 HP siRNA	PAX2	Exon 3 (Nt 868-888) NM 000278.3	5' CCCGACTATGTTCGCCTGGGA 3'
AllStars Negative Control	Angaben nicht erhältlich		
AllStars Negative Control siRNA Alexa Fluor® 488	Angaben nicht erhältlich		

Die siRNA wurde in lyophilisierter Form geliefert und nach Vorgaben des Herstellers verdünnt. Durch Zugabe von 250 µl Suspensions-Puffer bei 5 nmol/siRNA-Gefäß, bzw. 1 ml Suspensions-Puffer bei 20 nmol/siRNA-Gefäß ergab sich eine Konzentration von 20 µM.

Der Ansatz wurde im Anschluss für 1 min. bei 90°C, dann 1h bei 37°C erhitzt. Danach konnte die siRNA verarbeitet oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.23.2 miRNA

Zur Herstellung der spezifischen miRNA wurde das BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector-Kit von Invitrogen verwendet, das die pcDNA™6.2-GW/± EmGFP-miR Vektoren enthält. Es handelt sich dabei um DNA-Vektoren, in denen die spezifischen pre-miRNA-Sequenzen in Form von doppelsträngigen Oligonukleotiden vorliegen. In dem Vektor befindet sich zudem der humane CMV-Promotor. Er wird von der RNA-Polymerase II erkannt, welche die pre-miRNA transkribiert. Diese wird weiter durch das Enzym DICER prozessiert. Als Endprodukt entsteht die reife, ca. 22 nt lange, einzelsträngige miRNA.

2.2.23.2.1 Herstellung der DNA-Vektoren

Zur Herstellung der DNA-Vektoren wurde nach dem Protokoll von Invitrogen vorgegangen. Zunächst wurden mit Hilfe des von Invitrogen erhältlichen Computerprogramms „RNAi Designer“ zwei einzelsträngige Oligonukleotide konzipiert. Es folgte die Synthese der doppelsträngigen (ds) Oligonukleotide. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist Tabelle 36 zu entnehmen.

Tabelle 36: Ansatz für die Synthese der dsOligonukleotide aus den ssOligonukleotiden

Reagens	Volumen
top-Strang (200 µM)	5 µl
bottom-Strang (200 µM)	5 µl
10x Oligo Annealing Puffer	2 µl
DNase/RNase freies Wasser	8 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur in ein steriles 0,5 ml-Eppendorf-Gefäß gegeben, für 4 min. bei 95°C inkubiert und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Ansatz hatte eine Konzentration von 50 µM. Für die Klonierung der dsOligonukleotide in die Vektoren

war eine Konzentration von 10 nM erforderlich. Es erfolgten zwei Verdünnungsschritte, die Tabelle 37 zu entnehmen sind.

Tabelle 37: Verdünnungsschritte der dsOligonukleotide

<u>1. Verdünnungsschritt:</u>	
Reagens	Volumen
50 µM dsOligonukleotide	1 µl
DNase/RNase freies Wasser	99 µl
Gesamtvolumen	100 µl
Konzentration	500 nM
<u>2. Verdünnungsschritt:</u>	
500 nM dsOligonukleotide	1 µl
10x Oligo Annealing Puffer	5 µl
DNase/RNase freies Wasser	44 µl
Gesamtvolumen	50 µl
Konzentration	10 nM

Die verbleibenden Ansätze der 50 µM und 500 nM Lösung wurden als Stock-Lösungen für weitere Klonierungen bei -20°C eingefroren.

Zur Kontrolle über die erfolgte Hybridisierung der ssOligonukleotide zu dsOligonukleotiden wurde eine Gelelektrophorese mit einem 4 prozentigen Agarosegel und einem 10 bp DNA-Marker durchgeführt. Die dsOligonukleotide stellten sich als Bande in Höhe von 60-70 bp dar, während nicht-hybridisierte ssOligonukleotide in einer Höhe von 30-35 bp erschienen.

Die Ligationsreaktion der dsOligonukleotide in die Plasmide wurde bei Raumtemperatur angesetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie in Tabelle 38 aufgeführt zusammen.

Tabelle 38: Ligationsansatz der dsOligonukleotide in pcDNATM6.2-GW/miR-Vektoren

Reagens	Volumen
5x Ligationspuffer	4 µl
pcDNA TM 6.2-GW/miR-Vektoren (5 ng/µl)	2 µl
dsOligonukleotide (10 nM)	4 µl

Fortsetzung Tabelle 38

Reagens	Volumen
DNase/RNase freies Wasser	9 µl
T4 DNA-Ligase (1 U/µl)	1 µl
Gesamtmenge	20 µl

Der Ansatz wurde sorgfältig gemischt und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Wird die Transformation in kompetente Zellen (2.2.3) im Anschluss durchgeführt, kann der Ansatz auf Eis gelagert werden. Ansonsten ist eine Lagerung der Vektoren bei -20°C über Nacht möglich. Im Anschluss erfolgte das Kultivieren (2.2.6.2) der erfolgreich transformierten Bakterienkulturen und die Aufreinigung der Plasmide (2.2.7.2).

2.2.23.2.2 Verwendete miRNA

Die so gewonnenen miRNA-Vektoren konnten nun für Transfektionsversuche eingesetzt werden. Sie sind in Tabelle 39 aufgeführt. Um die Effizienz der Transfektion überprüfen zu können, wurde ein Vektor verwendet, der das Gen für das Green Fluorescent Protein (GFP) trägt und als Positivkontrolle in der Durchflusszytometrie genutzt wurde. Dieser Vektor unterscheidet sich lediglich durch das Einfügen der für GFP kodierenden Sequenz. Er trägt zusätzlich eine unspezifische Sequenz, die zu einer reifen miRNA prozessiert wird, für die angenommen wird, dass sie zu keiner bekannten Sequenz von Wirbeltieren komplementär ist. Als Negativkontrolle für die Durchflusszytometrie und die Transfektionen wurde ein Vektor ohne das GFP mit der gleichen unspezifischen pre-miRNA-Sequenz wie der GFP-tragende Vektor benutzt.

Tabelle 39: Verwendete miRNA, Angabe von Zielgenen, -sequenzen und Lage in den Zielgenen

miRNA	Zielgen	Lage im Zielgen	Zielsequenz
miRNA 1078	PAX2	Exon 4/5 Nt 942 - 962 NM 00278 (Variante b) ¹	5'GCGTCTCTCCATCAACAGAA 3'
miRNA 1278	PAX2	Exon 5 Nt 1142 - 1162 NM 00278 (Variante b)	5'GGTGAGAAGAGGAAACGTGAT 3'
miRNA 1839	PAX2	Exon 11 Nt 1620 - 1640 NM 00278 (Variante b)	5'ACAACGAGGCTTGGAGATTCA 3'

Fortsetzung Tabelle 39

miRNA	Zielgen	Lage im Zielgen	Zielsequenz
miRNA 1373	WT1	Exon 7 Nt 1322 - 1342 NM 000378 (Variante a) ¹	5'TGTGCTTACCCAGGCTGCAAT 3'
miRNA 1463	WT1	Exon 8 Nt 1412 - 1432 NM 000378 (Variante a)	5'TGTGACTTCAAGGACTGTGAA 3'
miRNA 1686	WT1	Exon 10 Nt 1626 - 1646 NM 000378 (Variante a)	5'ATGAATTAGTCCGCCATCACA 3'
Kontroll- Vektor ± EmGFP	Vektor bindet an keine mRNA von Wirbeltieren		

2.2.24 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die simultane Messung von Streulichteigenschaften und Fluoreszenzsignalen einer großen Anzahl einzelner Zellen. Die Messungen erfolgten an einem FACScan Durchflusszytometer, die graphische Darstellung und Analyse der Daten wurde mit der Cell-Quest-Software (2.1.22) durchgeführt. Die Zellen lagen in einer Einzelzellsuspension vor und wurden mittels Überdruck in eine Messküvette gesogen. Durch hydrodynamische Fokussierung wurden die Zellaggregate getrennt, so dass eine Zelle nach der anderen auf einen Laserstrahl traf. Dies führt zu zwei physikalischen Phänomenen: Lichtstreuung und Fluoreszenz, die über ein optisches und elektronisches System in elektrische Signale umgewandelt, anschließend digitalisiert und von einer Software analysiert und ausgewertet werden können. Zwei Richtungen der Lichtstreuung werden detektiert: Streuung in Vorwärtsrichtung (FSC) entlang des Laserstrahls, die Information über die Größe der Zellen liefert, und Streuung im 90° Winkel (SSC) zum Laserstrahl, als Indikator für die Granularität und Oberflächeneigenschaften der Zellen.

Durch Einbringen von Fluoreszenzfarbstoffen in die Zellen (hier über fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, bzw. GFP-kodierende Plasmide) kann Fluoreszenz entsprechend der Transfektionseffizienz detektiert werden. Es wurden die Farbstoffe GFP (Green Fluorescent Protein) und FITC (Fluorescein-5-Isocyanat) verwendet. Die Farbstoffe emittieren Fluoreszenz nach Anregung. Diese erfolgte mit Hilfe des 488 nm Argon-Lasers. Für Transfektions-Versuche wurden verwendet:

1. Das Kontrollplasmid pmaxGFP von Amara (Absorptionsmaximum 482 nm, Emissionsmaximum 502 nm),
2. die pcDNA™6.2-GW/+ EmGFP-miR Vektoren von Invitrogen (Absorptionsmaximum 487 nm, Emissionsmaximum 509 nm),
3. sowie die FITC-markierte All Stars Negativ Control-siRNA Alexa 488 von Qiagen (Absorptionsmaximum 495 nm, Emissionsmaximum 519 nm).

Die Farbstoffe GFP und FITC wurden im Fluoreszenzkanal 1 gemessen. Die Anzahl der zu messenden Ereignisse wurde vor der Messung festgelegt. Für die Darstellung der Zellen wird zunächst ein FSC/SSC Diagramm verwendet (Dot-Plot). Die erste Messung erfolgte mit einer Negativkontrolle, sie diente als Referenzpunkt. SSC und FSC wurden so ausgerichtet, dass die Zellen auf dem Diagramm erschienen. Dann wurde eine Region gesetzt, die die Zellen von Interesse umfasste. Die Sensitivität der Fluoreszenzkanäle wurde so eingestellt, dass die Negativkontrolle nahe dem Nullpunkt, aber noch auf der Skala erschien. Die zu untersuchenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt, bei 1400 rpm für 10 min. zentrifugiert und mehrfach in PBS gewaschen. Danach wurde das Zellpellett je nach Pellett-Stärke in 150-300 µl PBS aufgenommen und nach Vortexen am FACScan gemessen. Die Auswertung der Transfektionseffizienz erfolgte über die Histogramm-Darstellung, wie es in Abbildung 8 dargestellt ist.

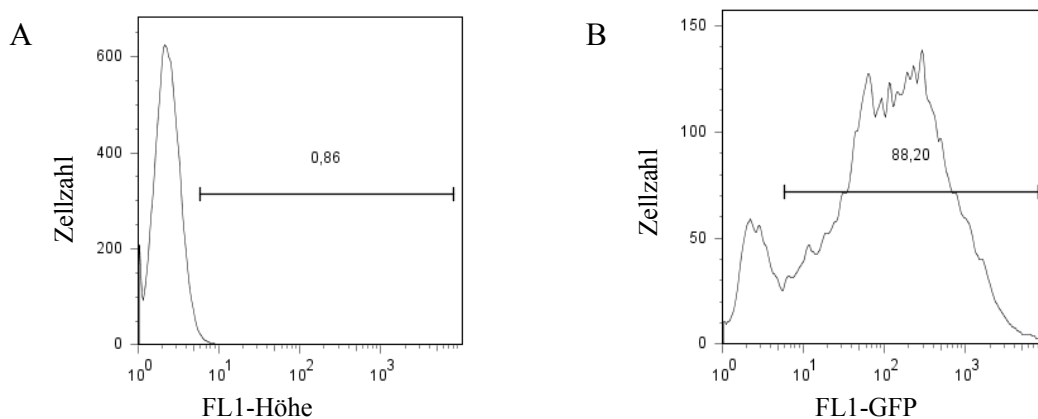


Abbildung 8: Histogramm-Plot nach Transfektion des pmaxGFP-Plasmids in U937-Zellen. A) Negativkontrolle ohne pmaxGFP-Plasmid, < 1 % der Zellen zeigten ein Fluoreszenzsignal. B) mit pmaxGFP-transfizierte Zellen. Der Gipfel links entspricht den negativen Zellen aus A), 88 % der Zellen wurden mit dem Plasmid transfiziert.

3 Ergebnisse

Für PAX2 +Exon 6 und PAX2 +Exon 10 wurden die Real-Time-PCR-Bedingungen im Rahmen dieser Arbeit neu etabliert. Die Bedingungen für die anderen in dieser Arbeit verwendeten PCRs (2.2.12.1 und 2.2.12.4) waren in der Arbeitsgruppe bereits etabliert.

3.1 Etablierung der PCR-Bedingungen für PAX2 +Exon 6 und PAX2 +Exon 10 für quantitative Real-Time-PCR nach dem LightCycler®-Prinzip

Primer- und Sondensequenzen (2.2.12.4) wurden mit der LightCycler®-Probe-Design-Software (Version 1.0; 2.1.22) ausgewählt. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurden wie unter 2.2.9 und 2.2.10 beschrieben durchgeführt. Für die optimale Amplifizierung der spezifischen DNA-Sequenzen wurden verschiedene Temperaturen für die einzelnen PCR-Schritte getestet. Die Temperatureinstellung richtete sich nach den Schmelztemperaturen der verwendeten Primer und Sonden. Zusätzlich wurden mehrere MgCl₂-Konzentrationen getestet. Die MgCl₂-Konzentration ist wichtig für die Produktivität der DNA-Polymerase und die Affinität der Primer zu ihrer Zielsequenz.

Die verwendeten Temperatureinstellungen für die einzelnen PCR-Abschnitte, sowie MgCl₂-Konzentrationen und Amplifikatgrößen, sind Abschnitt 2.2.12.1 und 2.2.12.4 zu entnehmen.

Für die Quantifizierung wurden die spezifischen PCR-Produkte aus dem Reaktionsansatz bzw. aus dem Agarosegel extrahiert (2.2.15.1, 2.2.15.2) und in pCR-TOPO®-Vektoren (2.1.4) kloniert (2.2.2). Im Anschluss erfolgte die Transformation in kompetente E.coli-Stämme (2.2.3), die Plasmidreinigung (2.2.7.1) und die Restriktion (2.2.8). Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch Schmelzkurvenanalyse (2.2.12), Gelelektrophorese (2.2.14.1) sowie Sequenzierung (2.1.8) überprüft. Eine Standardkurve mit drei Verdünnungsstufen in Duplikaten der spezifischen Amplifikate (2.2.12.4) wurde bei jedem PCR-Lauf mitgeführt. Die Berechnung der Real-Time-PCR-Expressionslevel wurde mit der LightCycler®-Software (Version 3.39; 2.1.22) durchgeführt. Alle Proben wurden in Duplikaten untersucht und der arithmetische Mittelwert beider Duplikate als Expressionswert verwendet. Dieser wurde durch Division des Expressionslevel des Haushaltsgens PBGD normalisiert. So konnten Ungenauigkeiten, wie unterschiedliche cDNA-Mengen pro Probe, ausgeglichen werden, da Ziel- und Haushaltsgen gleichermaßen davon betroffen sind (2.2.12).

3.2 Expression von PAX2 und der drei PAX2-Splicevarianten in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen, sowie in Kolonkarzinomgewebe und Gesundblut auf mRNA-Ebene

Für statistische Berechnungen wurde das Statistikprogramm SPSS (Version 15.0; 2.1.22) verwendet. Die Prüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte nach Kolmogorov-Smirnov. Die hier erhobenen Daten sind nicht normal verteilt, daher wurden nicht-parametrische Tests verwendet. Für die Prüfung statistisch signifikanter Expressionsunterschiede wurde der Mann-Whitney-Test angewandt. Korrelationen wurden nach Spearman auf statistische Signifikanz überprüft. Ergebnisse wurden als signifikant erachtet für p-Werte $< 0,05$.

3.2.1 PAX2

In 12 von 13 Lymphom-Zelllinien (92 %) und in 16 von 19 Zelllinien solider Tumore (84 %) konnte PAX2 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

In den Lymphom-Zelllinien (mediane Expression: $2,41 \cdot 10^{-05}$, Maximum: $4,12 \cdot 10^{-02}$, Minimum: 0) war der mediane mRNA-Expressionslevel niedriger als in den Zelllinien solider Tumore (mediane Expression: $5,98 \cdot 10^{-05}$, Maximum: $8,23 \cdot 10^{-03}$; Minimum: 0). Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0,51$).

In 10 von 11 auf PAX2 untersuchten Gesundblutproben (90 %) konnte PAX2 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (mediane Expression: $1,38 \cdot 10^{-04}$, Maximum: $7,07 \cdot 10^{-04}$, Minimum: 0). Der Expressionslevel im Gesundblut lag im Median über dem in den Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen, der Unterschied war in beiden Fällen nicht signifikant ($p=0,26$, bzw. $p=0,08$).

In 4 von 12 Kolonkarzinomgewebeproben (33 %) konnte PAX2 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. (mediane Expression: 0, Maximum: $1,11 \cdot 10^{-02}$, Minimum: 0). Der mediane Expressionslevel der Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen lag über dem Expressionslevel im Tumorgewebe, der Unterschied war in beiden Fällen nicht signifikant ($p=0,11$). Auch im Gesundblut lag der mediane PAX2-Expressionslevel über dem des Tumorgewebes, der Unterschied war auch hier nicht signifikant ($p=0,10$). In Abbildung 9 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt.

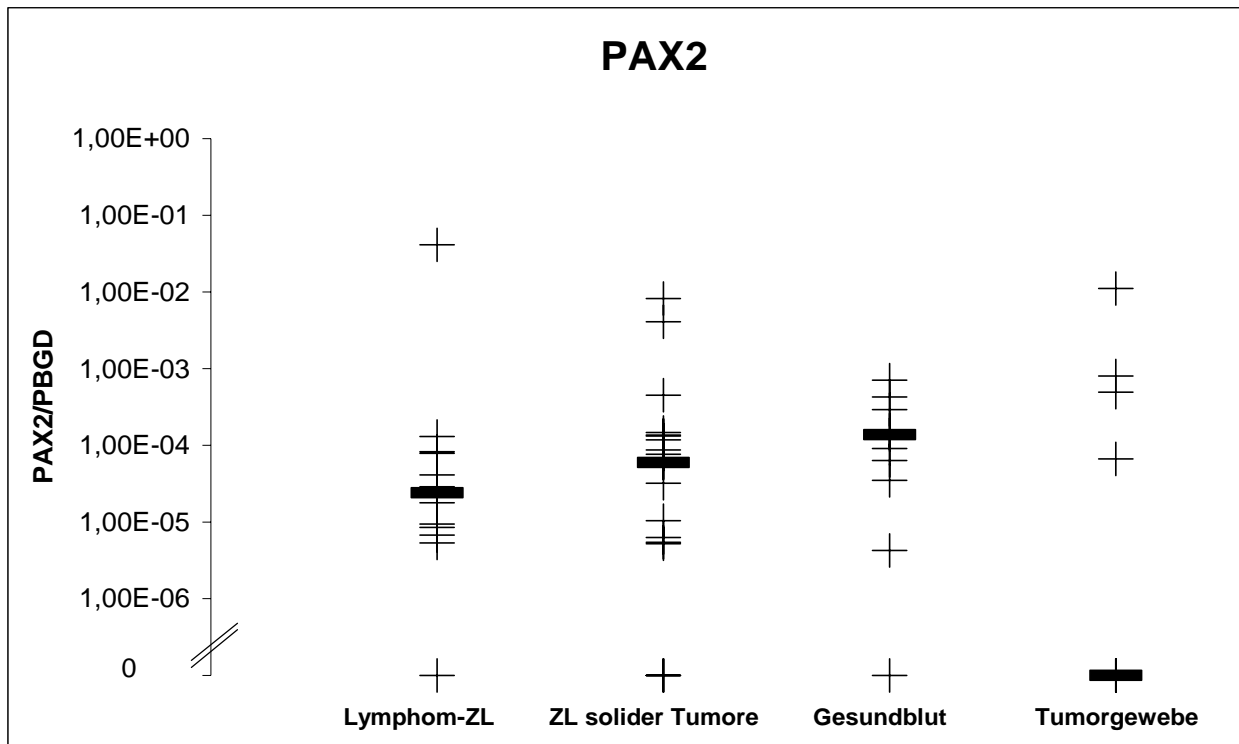


Abbildung 9: PAX2-Expression normalisiert durch PBGD in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen, Gesundblutproben und Kolonkarzinomgewebe. Die PAX2-Expression wurde mit der PAX2-Exon 5-8-PCR gemessen, die das PAX2-Transkript splicevarianten-unabhängig detektiert. (schwarzer Balken=Median, ZL=Zelllinie, die Y-Achse ist logarithmisch skaliert).

3.2.2 PAX2 +Exon 6

In 12 von 13 Lymphom-Zelllinien (92 %) und in 15 von 19 Zelllinien solider Tumore (79 %) konnte die Splicevariante PAX2 +Exon 6 nachgewiesen werden.

Der mRNA-Expressionslevel in den Lymphom-Zelllinien (mediane Expression: $1,34 \cdot 10^{-4}$, Maximum: $4,26 \cdot 10^{-3}$, Minimum: 0) lag im Median eine log-Stufe höher als in den Zelllinien solider Tumore (mediane Expression: $4,11 \cdot 10^{-5}$, Maximum: $1,29 \cdot 10^{-3}$, Minimum: 0). Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0,29$).

In 11 von 12 Gesundblutproben (92 %) konnte PAX2 +Exon 6 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (mediane Expression: $3,51 \cdot 10^{-4}$, Maximum: $2,96 \cdot 10^{-2}$, Minimum: 0).

Der Expressionslevel für die +Exon 6-spezifische Splicevariante lag im Median bei den Lymphom-Zelllinien unter dem im Gesundblut, der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,10$). Der Expressionslevel der Zelllinien solider Tumore lag ebenfalls im Median unter dem in den Gesundblutproben. Der Unterschied war hier signifikant ($p=0,01$).

In 6 von 13 Kolonkarzinomgewebeprobe (46 %) konnte PAX2 +Exon 6 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (mediane Expression: 0, Maximum: $5,73 \cdot 10^{-3}$, Minimum: 0).

Der Expressionslevel der Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen lag im Median auch hier über dem Expressionslevel im Tumorgewebe. Der Unterschied war in beiden Fällen nicht signifikant ($p=0,98$, bzw. $p=0,64$). Auch im Gesundblut war der mediane Expressionslevel für PAX2 +Exon 6 höher als im Tumorgewebe, der Unterschied war nicht signifikant ($p=0,10$). In Abbildung 10 sind die Ergebnisse dargestellt.

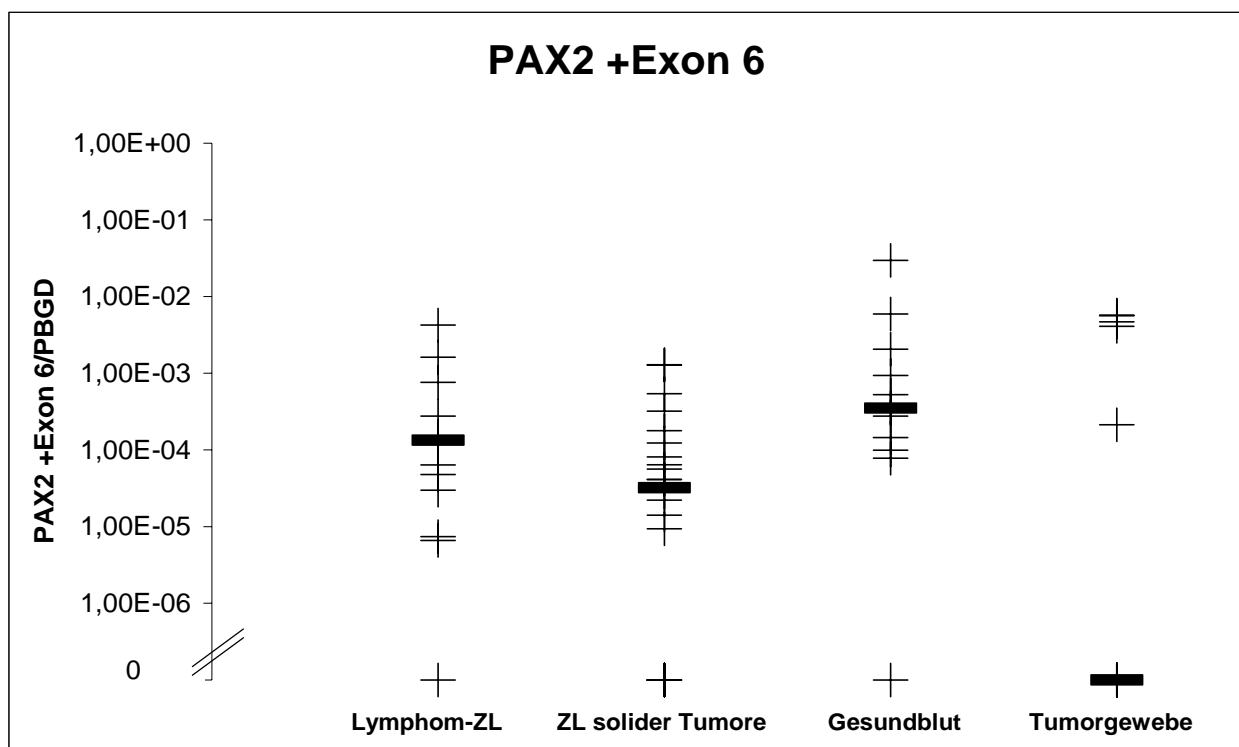


Abbildung 10: PAX2 +Exon 6-Expression normalisiert durch PBGD in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen, Gesundblutproben und Kolonkarzinomgewebe. Der Unterschied des Expressionslevels war für die Zelllinien solider Tumore und die Gesundblutproben signifikant ($p=0,01$). (Mann-Whitney-Test; schwarzer Balken=Median, ZL=Zelllinie, die Y-Achse ist logarithmisch skaliert).

3.2.3 PAX2 +Exon 10

In 11 von 13 Lymphom-Zelllinien (85 %) und in 17 von 19 Zelllinien solider Tumore (89 %) konnte PAX2 +Exon 10 nachgewiesen werden.

Der Expressionslevel in den Lymphom-Zelllinien (mediane Expression: $2,38 \cdot 10^{-6}$, Maximum: $8,81 \cdot 10^{-6}$, Minimum: 0) lag im Median um eine log-Stufe unter dem der Zelllinien solider

Tumore (mediane Expression: $1,05 \cdot 10^{-05}$, Maximum: $2,08 \cdot 10^{-03}$, Minimum: 0). Der Unterschied war auch hier nicht signifikant ($p=0,13$).

In allen 8 auf PAX2 +Exon 10 untersuchten Gesundblutproben konnte PAX2 +Exon 10 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (mediane Expression: $4,21 \cdot 10^{-05}$, Maximum: $7,78 \cdot 10^{-04}$, Minimum: $2,63 \cdot 10^{-06}$). Der Expressionslevel der Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen lag im Median unter dem in den Gesundblutproben. Für die Lymphom-Zelllinien war der Unterschied signifikant ($p=0,01$), für die Zelllinien solider Tumore war der Unterschied nicht signifikant ($p=0,14$).

In 5 von 12 Kolonkarzinomgewebeproben (42 %) konnte PAX2 +Exon 10 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. (mediane Expression: 0, Maximum: $2,57 \cdot 10^{-04}$, Minimum: 0).

Der Expressionslevel der Lymphom-Zelllinien und Zelllinien solider Tumore lag im Median über dem Expressionslevel im Tumorgewebe, der Unterschied war nicht signifikant ($p=0,16$, bzw. $p=0,12$). Der Expressionsunterschied zwischen Gesundblut und Tumorgewebe war ebenfalls nicht signifikant ($p=0,07$). Die Abbildung 11 zeigt die zugehörigen Ergebnisse.

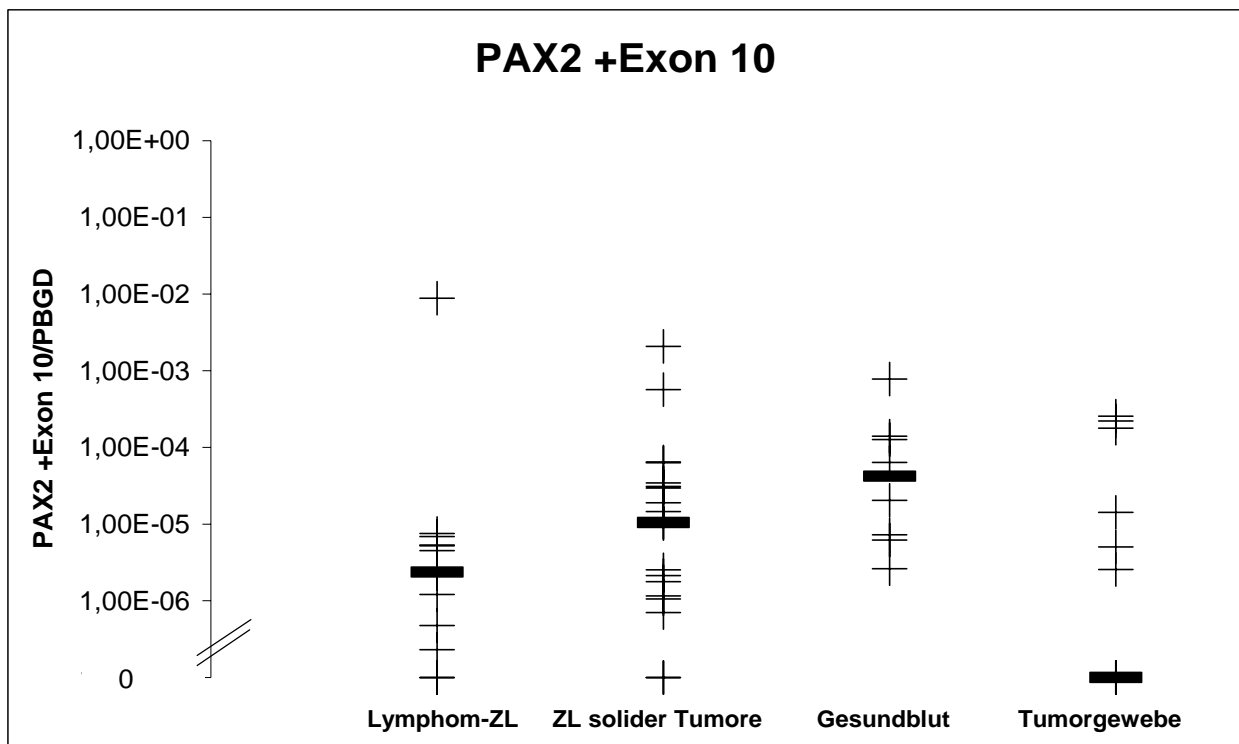


Abbildung 11: PAX2 +Exon 10-Expression normalisiert durch PBGD in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen, Gesundblutproben und Kolonkarzinomgewebe. Der Unterschied des Expressionslevels war für die Lymphom-Zelllinien und die Gesundblutproben signifikant ($p=0,01$). (Mann-Whitney-Test; schwarzer Balken=Median, ZL=Zelllinie, die Y-Achse ist logarithmisch skaliert).

3.2.4 PAX2 +Intron 9

In allen 13 Lymphom-Zelllinien und in allen 19 Zelllinien solider Tumore konnte PAX2 +Intron 9 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

In den Lymphom-Zelllinien (mediane Expression: $2,01 \cdot 10^{-03}$, Maximum: $7,61 \cdot 10^{-02}$, Minimum: $1,42 \cdot 10^{-04}$) lag der Expressionslevel für die PAX2 +Intron 9-spezifische Splicevariante im Median über dem der Zelllinien solider Tumore (mediane Expression: $7,98 \cdot 10^{-04}$, Maximum: $5,11 \cdot 10^{-03}$, Minimum: $2,95 \cdot 10^{-06}$). Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0,33$).

In allen 11 auf PAX2 +Intron 9 untersuchten Gesundblutproben konnte PAX2 +Intron 9 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (mediane Expression: $5,33 \cdot 10^{-03}$, Maximum: $4,10 \cdot 10^{-02}$, Minimum: $1,36 \cdot 10^{-04}$). Der mediane Expressionslevel der Gesundblutproben lag über dem in den Lymphom-Zelllinien, der Unterschied war nicht signifikant ($p=0,43$). Der Unterschied des Expressionslevels der Gesundblutproben zu dem der Zelllinien solider Tumore war jedoch signifikant ($p=0,04$).

In 11 von 12 Kolonkarzinomgewebeproben (92 %) konnte PAX2 +Intron 9 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (mediane Expression: $9,69 \cdot 10^{-02}$, Maximum: 5,44, Minimum: 0).

Der Expressionslevel im Tumorgewebe lag über dem der Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen. Der Unterschied war in beiden Fällen signifikant ($p<0,001$, bzw. $p=0,001$). Auch im Vergleich zum Gesundblut lag der Expressionslevel im Tumorgewebe höher, der Unterschied war ebenfalls signifikant ($p=0,002$). In Abbildung 12 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt.

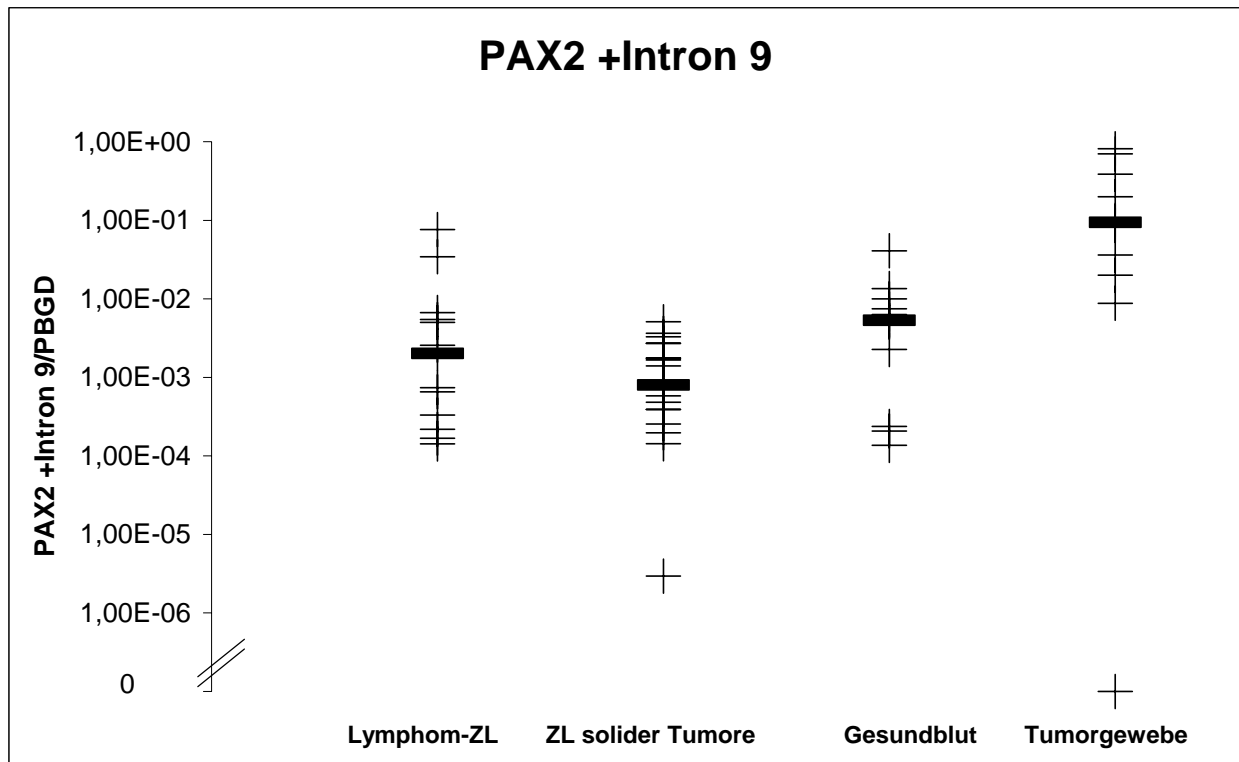


Abbildung 12: PAX2 +Intron 9-Expression normalisiert durch PBGD in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen, Gesundblutproben und Kolonkarzinomgewebe. Der Unterschied des Expressionslevels war für die Zelllinien solider Tumore und Gesundblut ($p=0,04$), Gesundblut und Tumorgewebe ($p=0,002$), sowie für die Zelllinien von soliden Tumoren bzw. Lymphomen und Tumorgewebe ($p<0,001$, bzw. $p=0,001$) signifikant. (Mann-Whitney-Test; schwarzer Balken=Median, ZL=Zelllinie, die Y-Achse ist logarithmisch skaliert).

Die untersuchten Splicevarianten von PAX2 wurden in Gesundblut, in Kolonkarzinomgewebe und in humanen Tumorzelllinien nachgewiesen. Dabei lagen die Expressionslevel im Gesundblut stets über denen der Zelllinien, z.T. war der Unterschied signifikant. Zudem konnte kein spezifisches Expressionsmuster der einzelnen PAX2-Splicevarianten in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen, Gesundblut oder Tumorgewebe nachgewiesen werden.

Bis auf PAX2 +Intron 9 bestand für die Expression der PAX2-Splicevarianten im Kolonkarzinomgewebe und in den Zelllinien kein signifikanter Unterschied, wobei die mediane Expression in den Zelllinien bis auf PAX2 +Intron 9 immer höher lag als im Tumorgewebe.

Im Gesundblut lag die mediane Expression der PAX2-Splicevarianten, bis auf PAX2 +Intron 9, ebenfalls über der im Tumorgewebe.

3.2.5 Vergleich der Expressionslevel der PAX2-Exon 5-8-PCR³ und der splicevarianten-spezifischen PCRs für PAX2 +Exon 6, +Exon 10 sowie +Intron 9

Bei einigen Zelllinien konnte eine Expression für die Splicevarianten festgestellt werden, während der Expressionslevel der PAX2-Exon 5-8-PCR unter der Nachweisgrenze lag. Dies war bei einer Lymphom-Zelllinie (Granta519) und bei drei Zelllinien solider Tumore (Colo320, SW948 und BCPAP) der Fall. Des weiteren lag die mediane Expression der PAX2-Exon 5-8-PCR bei den Lymphom-Zelllinien unter der medianen Expression von PAX2 +Exon 6 und PAX2 +Intron 9. Bei den Zelllinien solider Tumore traf dies nur für die +Intron 9-spezifische PCR zu. Abbildung 13 stellt die Expressionswerte der PAX2-PCRs für die Lymphom-Zelllinien dar.

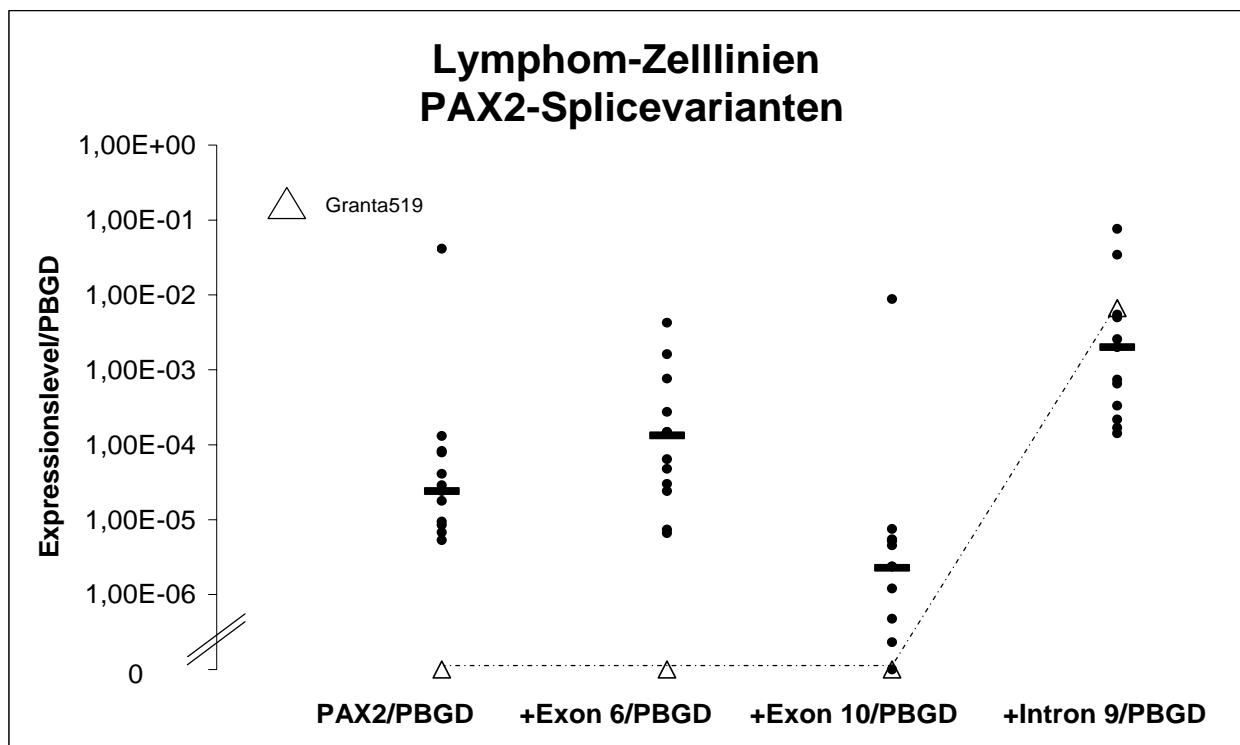


Abbildung 13: Expression von PAX2 und der drei Splicevarianten +Exon 6, +Exon 10 und +Intron 9 normalisiert durch PBGD in Lymphom-Zelllinien. Herausgehoben ist die Zelllinie Granta519, bei der die Expression für die PAX2-Exon 5-8-PCR unter der Nachweisgrenze lag, während die Splicevariante PAX2 +Intron 9 eine Expression von $7 \cdot 10^{-3}$ aufwies. Für Granta519 lag die Expression der beiden Splicevarianten PAX2 +Exon 6 und +Exon 10 ebenfalls unter der Nachweisgrenze. Bei den Lymphom-Zelllinien lag der mediane Expressionslevel der PAX2-Exon 5-8-PCR ($2,41 \cdot 10^{-5}$) unter dem der splicevarianten-spezifischen PCRs für PAX2 +Exon 6 ($1,34 \cdot 10^{-4}$) und +Intron 9 ($2,01 \cdot 10^{-3}$). Der Unterschied war für PAX2 +Exon 6 nicht signifikant ($p=0,11$), für PAX2 +Intron 9 signifikant ($p<0,001$). (Mann-Whitney-Test; schwarzer Balken=Median, die Y-Achse ist logarithmisch skaliert).

Abbildung 14 zeigt die Expressionswerte der Zelllinien solider Tumore der einzelnen PAX2-PCRs

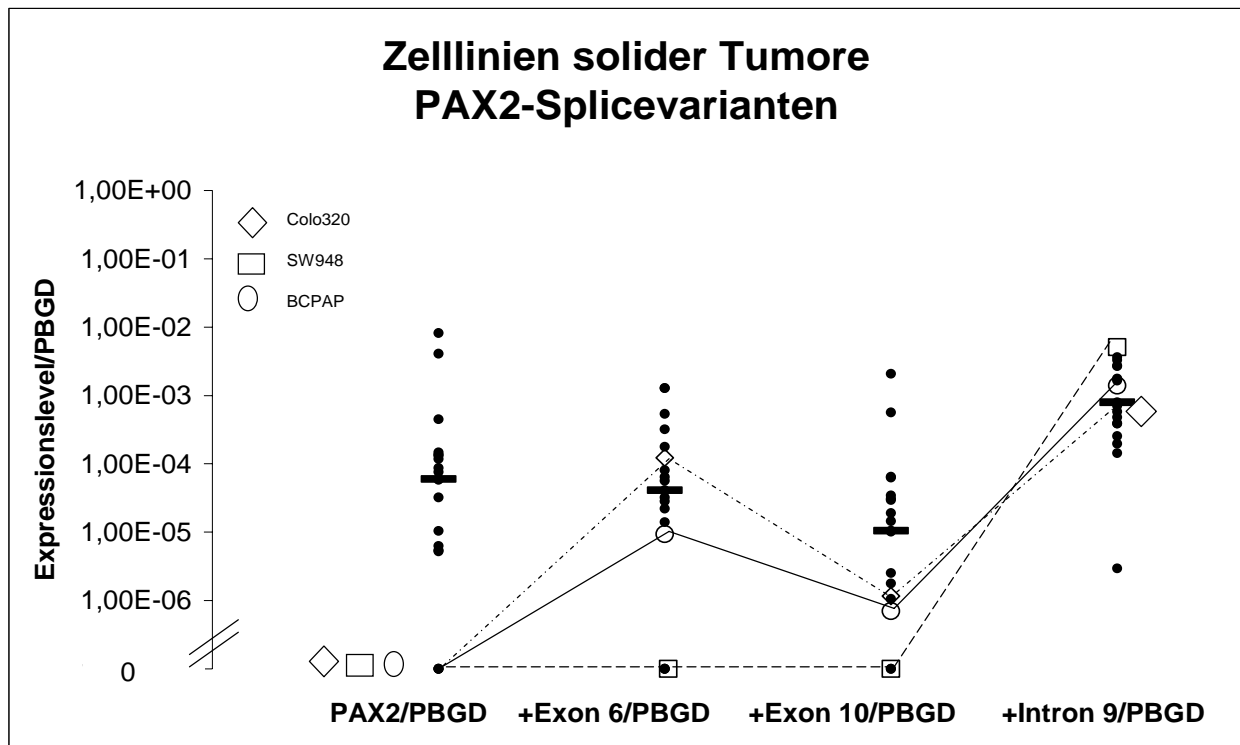


Abbildung 14: Expression von PAX2 und der drei Splicevarianten +Exon 6, +Exon 10 und +Intron 9 normalisiert durch PBGD in Zelllinien solider Tumore. Hier wurden drei Zelllinien identifiziert, bei denen eine splicevarianten-spezifische Expression detektiert werden konnte, während das splicevarianten-unabhängige PAX2-Transkript mit der PAX2-Exon 5-8-PCR nicht detektiert werden konnte. Der mediane Expressionslevel dieser PCR ($5,98 \cdot 10^{-5}$) lag hier unter dem von PAX2 +Intron 9 ($7,98 \cdot 10^{-4}$). Der Unterschied war signifikant ($p < 0,001$). (Mann-Whitney-Test; schwarzer Balken=Median, die Y-Achse ist logarithmisch skaliert).

3.3 Expression von WT1 und der Splicevarianten +Exon 5 und +KTS in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen auf mRNA-Ebene

3.3.1 WT1

In 7 von 13 Lymphom-Zelllinien (54 %) und in 17 von 19 Zelllinien solider Tumore (89 %) konnte WT1 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

In den Lymphom-Zelllinien (mediane Expression: $3,28 \cdot 10^{-06}$, Maximum: $1,70 \cdot 10^{-04}$, Minimum: 0) lag der mediane mRNA-Expressionslevel unter dem in den Zelllinien solider Tumore

(mediane Expression: $1,09 \cdot 10^{-02}$, Maximum: $1,13 \cdot 10^{-01}$; Minimum: 0), der Unterschied war signifikant ($p < 0,001$).

In 10 von 12 Kolonkarzinomgewebeproben (83 %) konnte WT1 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (mediane Expression: $3,42 \cdot 10^{-03}$, Maximum: $6,23 \cdot 10^{-02}$, Minimum: 0). Der mediane Expressionslevel der Lymphom-Zelllinien lag unter dem Expressionslevel im Tumorgewebe, der Unterschied war signifikant ($p = 0,001$). Der Expressionslevel der Zelllinien solider Tumore lag über dem im Tumorgewebe, hier war der Unterschied aber nicht signifikant ($p = 0,57$). In Abbildung 15 sind die Ergebnisse dargestellt.

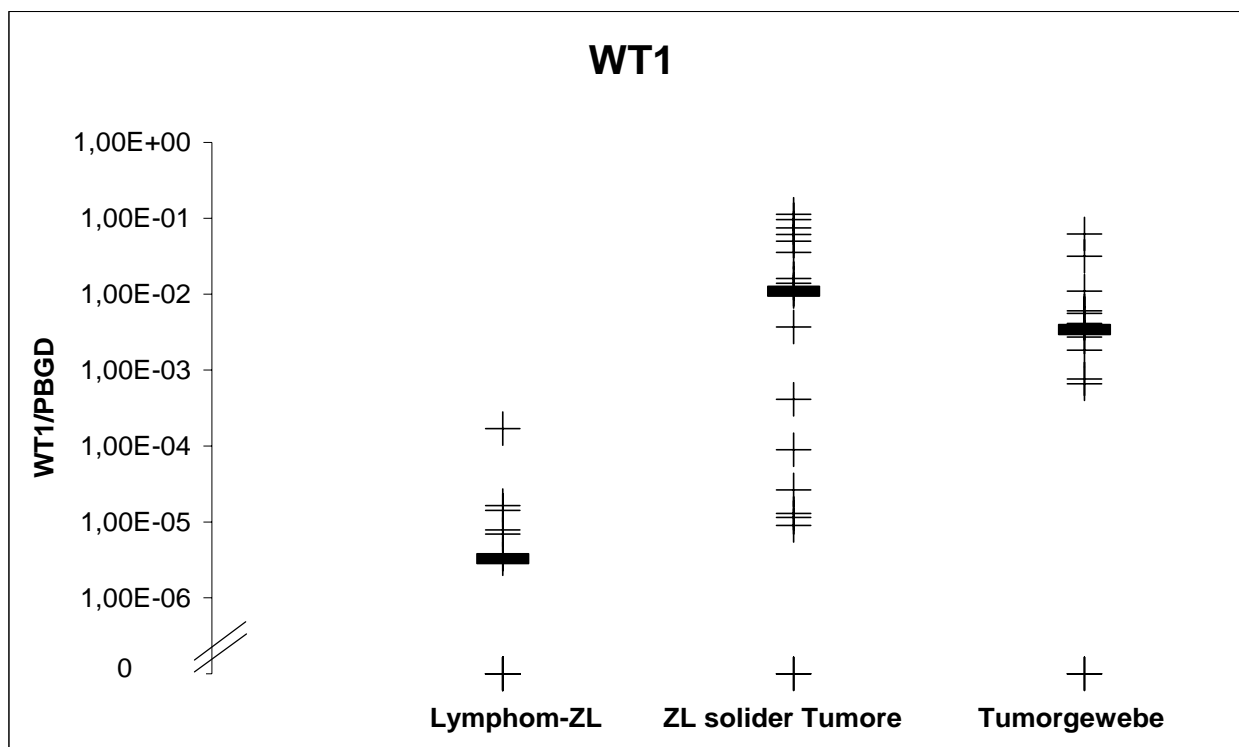


Abbildung 15: WT1-Expression normalisiert durch PBGD in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen sowie in Kolonkarzinomgewebe. Der Unterschied des Expressionslevel war für die Lymphom-Zelllinien und die Zelllinien solider Tumore signifikant ($p < 0,001$), sowie für die Lymphom-Zelllinien und das Kolonkarzinomgewebe ($p = 0,001$). Die WT1-Expression wurde mit der WT1-Exon 1-3-PCR gemessen, die das WT1-Transkript splicevarianten-unabhängig detektiert. (Mann-Whitney-Test; schwarzer Balken=Median, ZL=Zelllinie, die Y-Achse ist logarithmisch skaliert).

Für die Splicevarianten WT1 +Exon 5 und WT1 +KTS konnte mangels Probenmaterial keine Expression in Kolonkarzinomgewebeproben gemessen werden.

3.3.2 WT +Exon 5

In 8 von 13 Lymphom-Zelllinien (62 %) und in 15 von 19 Zelllinien solider Tumore (79 %) konnte WT1 +Exon 5 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

Der mediane Expressionslevel der Lymphom-Zelllinien (mediane Expression: $1,20 \cdot 10^{-06}$, Maximum: $3,61 \cdot 10^{-03}$, Minimum: 0) lag unter dem der Zelllinien solider Tumore (mediane Expression: $9,42 \cdot 10^{-05}$, Maximum: $1,41 \cdot 10^{-02}$, Minimum: 0). Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0,07$). Abbildung 16 zeigt die Expressionslevel für WT1 +Exon 5 in den Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen.

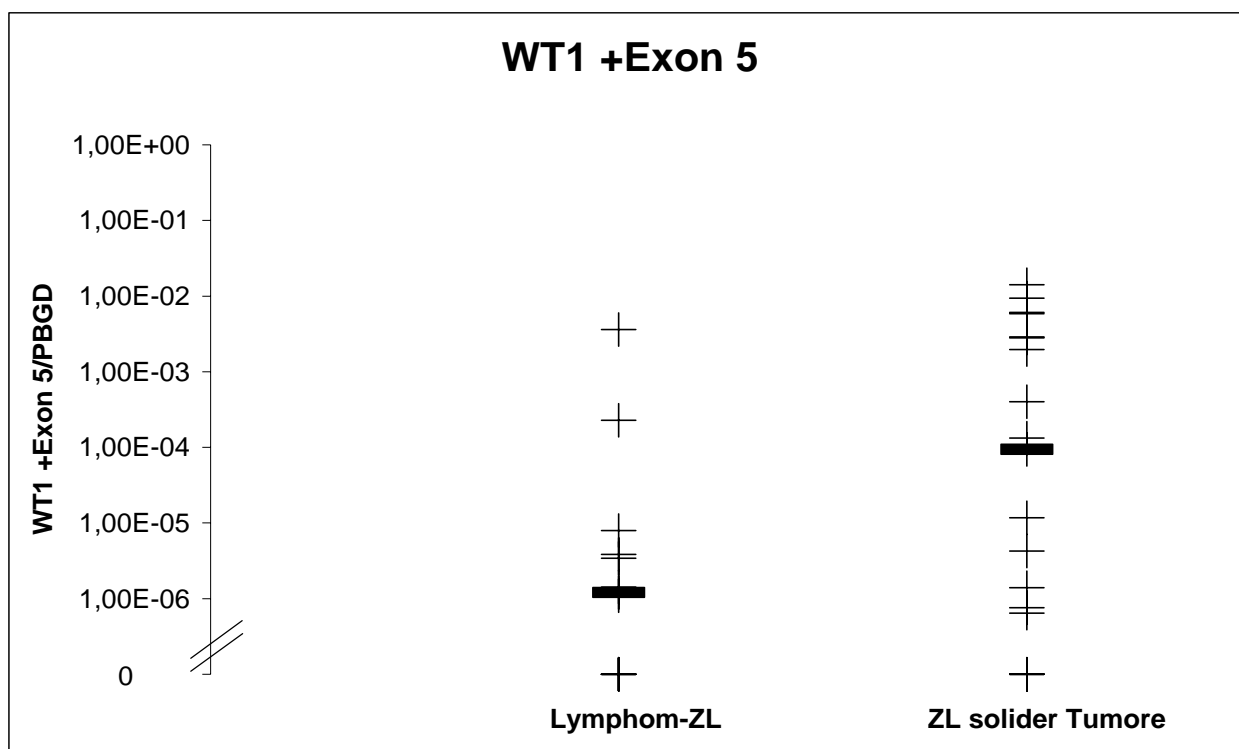


Abbildung 16: WT1 +Exon 5-Expression normalisiert durch PBGD in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen. Der Unterschied des Expressionslevel zwischen beiden Tumorgruppen war nicht signifikant ($p=0,07$). (Mann-Whitney-Test; schwarzer Balken=Median, ZL=Zelllinie, die Y-Achse ist logarithmisch skaliert).

3.3.3 WT1 +KTS

In 11 von 13 Lymphom-Zelllinien (85 %) und in allen 19 Zelllinien solider Tumore konnte WT1 +KTS auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

Der Expressionslevel der Lymphom-Zelllinien (mediane Expression: $1,20 \cdot 10^{-04}$, Maximum: $2,87 \cdot 10^{-02}$, Minimum: 0) lag im Median unter dem Expressionslevel der Zelllinien solider

Tumore (mediane Expression: $5,05 \cdot 10^{-4}$, Maximum: $4,83 \cdot 10^{-2}$, Minimum: $2,80 \cdot 10^{-6}$). Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0,39$). In Abbildung 17 sind die Expressionslevel für WT1 +KTS in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen zu sehen.

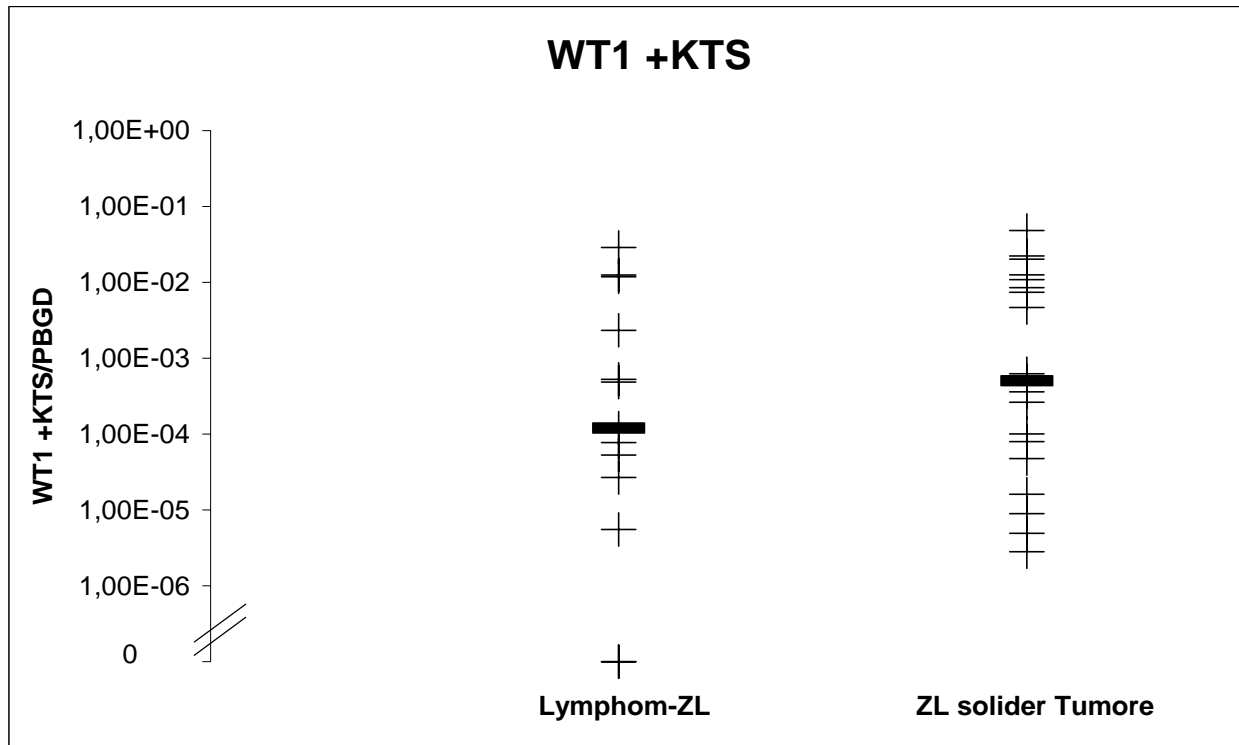


Abbildung 17: WT1 +KTS-Expression normalisiert durch PBGD in Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen. Der Unterschied des Expressionslevel war für die Lymphom-Zelllinien und die Zelllinien solider Tumore nicht signifikant ($p=0,39$). (Mann-Whitney-Test; schwarzer Balken=Median, ZL=Zelllinie, die Y-Achse ist logarithmisch skaliert).

3.3.4 Vergleich der Expressionslevel der WT1-Exon 1-3-PCR⁴ und der splicevarianten-spezifischen PCRs für WT1 +Exon 5 und WT1 +KTS

Es fiel auf, dass der Expressionslevel für die WT1-Exon 1-3-PCR bei 4 von 14 untersuchten Lymphom-Zelllinien unter der Nachweisgrenze lag, während für diese 4 Zelllinien eine Expression der beiden Splicevarianten detektiert werden konnte. Bei den Zelllinien solider Tumore war dies bei 2 von 19 Zelllinien der Fall. Die Abbildung 18 stellt die Expressionslevel der einzelnen WT1-PCRs in Lymphom-Zelllinien dar.

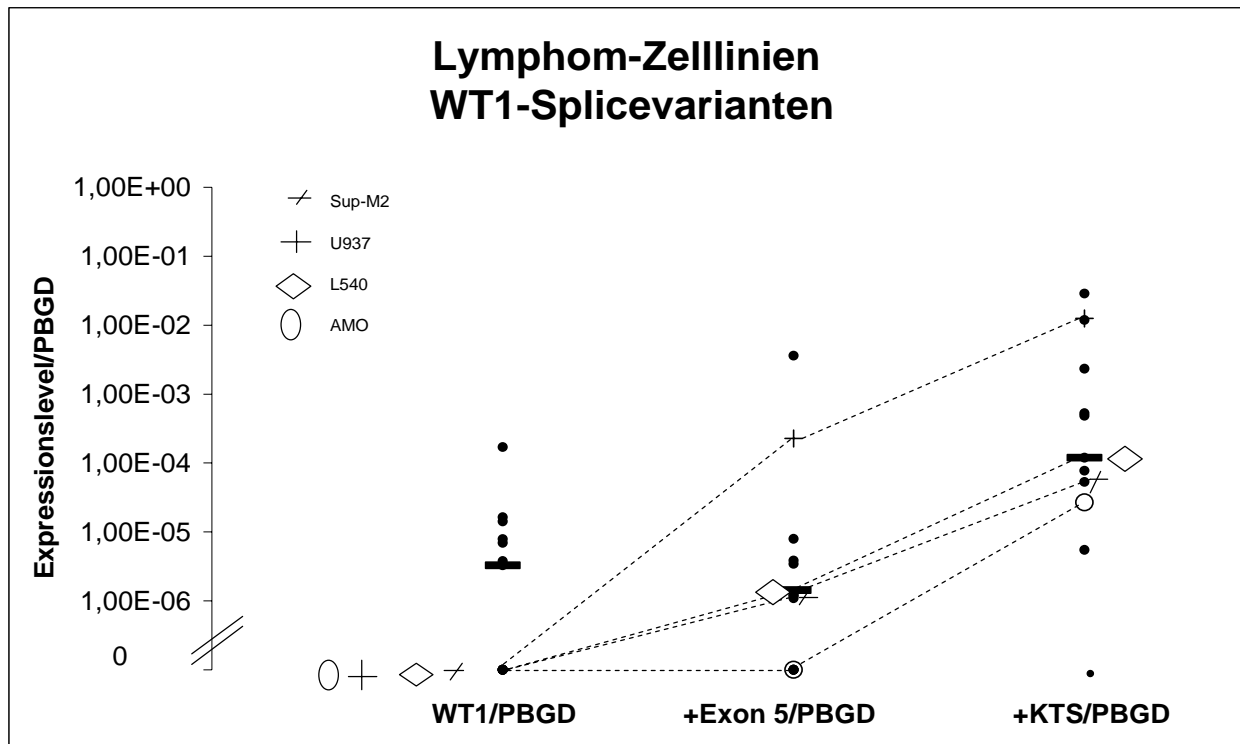


Abbildung 18: Expression von WT1 und der beiden Splicevarianten +Exon 5 und +KTS in Lymphom-Zelllinien. Bei den Zelllinien SUP-M2, U937 und L540 konnte mit den splicevarianten-spezifischen PCRs für WT1 +Exon 5 und WT1 +KTS eine Expression detektiert werden, nicht hingegen für die WT1-Exon 1-3-PCR. Bei der Zelllinie AMO konnte nur eine Expression mit der für WT1 +KTS spezifischen PCR detektiert werden. Der mediane Expressionslevel der WT1-Exon 1-3-PCR ($3,28 \cdot 10^{-6}$) lag unter dem der WT1 +KTS-spezifischen PCR ($1,2 \cdot 10^{-4}$). Der Unterschied war signifikant ($p=0,004$) (Mann-Whitney-Test; schwarzer Balken=Median, die Y-Achse ist logarithmisch skaliert).

Die Abbildung 19 stellt die Expressionslevel der einzelnen WT1-PCRs in Zelllinien solider Tumore dar.

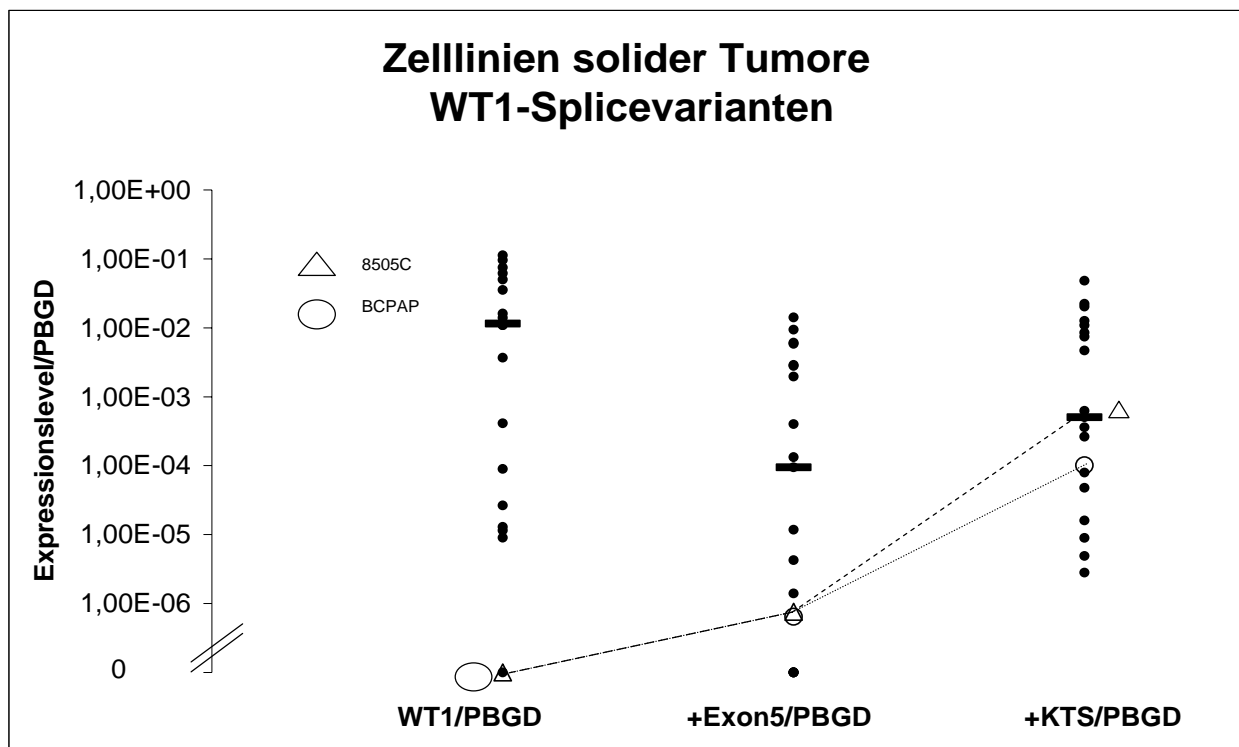
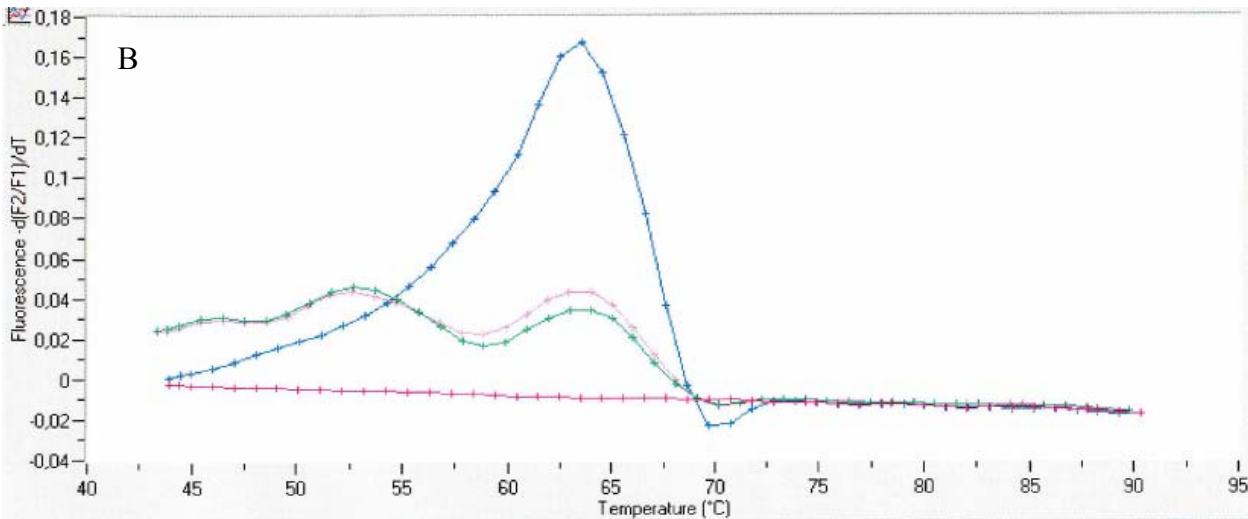
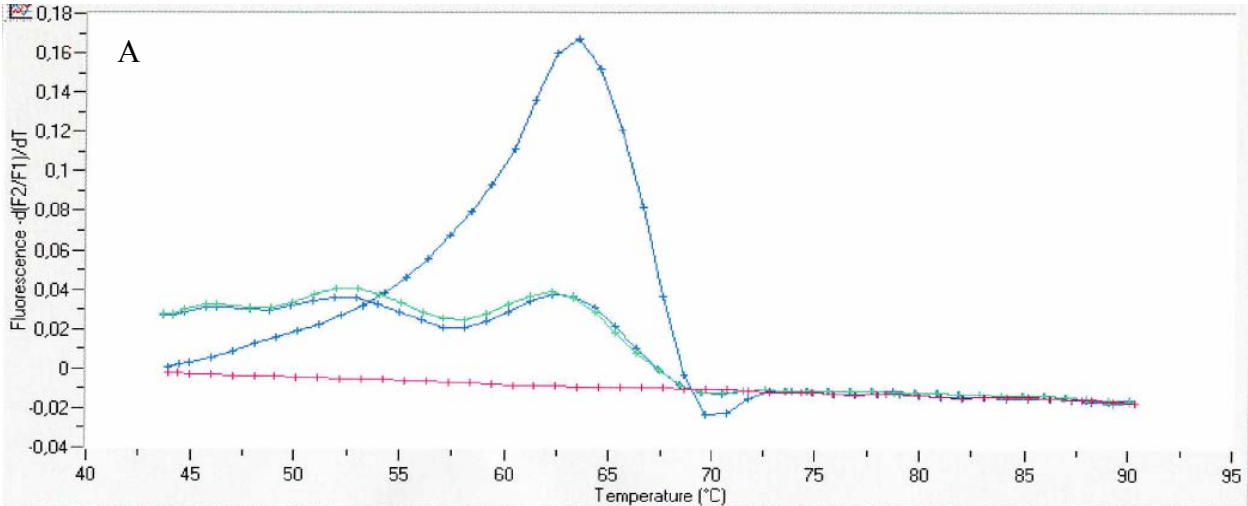


Abbildung 19: Expression von WT1 und der beiden Splicevarianten +Exon 5 und +KTS in Zelllinien solider Tumore. Bei den Zelllinien 8505C und BCPAP konnte mit den splicevarianten-spezifischen PCRs für WT1 +Exon 5 und WT1 +KTS eine Expression detektiert werden, nicht aber für die WT1-Exon 1-3-PCR. Die mediane Expression dieser PCR ($1,09 \cdot 10^{-02}$) lag bei den Zelllinien solider Tumore über der medianen Expression von WT1 +Exon 5 ($9,42 \cdot 10^{-05}$) und WT1 +KTS ($5,05 \cdot 10^{-04}$). Der Expressionsunterschied war für WT1 und WT1 +Exon 5 signifikant ($p=0,02$), für WT1 und WT1 +KTS jedoch nicht ($p=0,34$). (Mann-Whitney-Test; schwarzer Balken=Median, die Y-Achse ist logarithmisch skaliert).

3.3.5 Detektion einer funktionell relevanten Mutation in WT1-Exon 9 mit der WT1 +KTS-spezifischen PCR

In zwei Lymphom-Zelllinien (Karpas422, AMO) und einer Kolonadenokarzinom-Zelllinie (HCT116) konnte eine, für das Denys-Drash-Syndrom beschriebene, funktionell bedeutende missense-Mutation im Exon 9 von WT1 durch Schmelzkurvenanalyse (s. Abbildung 20 A-B) und anschließende Sequenzierung (2.1.8) identifiziert werden. Die sequenzierten Fragmente der WT1 +KTS-PCR (2.2.12.4) wiesen an Position 1580 (NM 024426.3) eine Punktmutation C>T auf, die zum Aminosäureaustausch von Arginin gegen Tryptophan (R>W) in Codon 462 führt. Sie ist in Abbildung 21 schematisch an Hand der Nukleotidsequenz dargestellt.



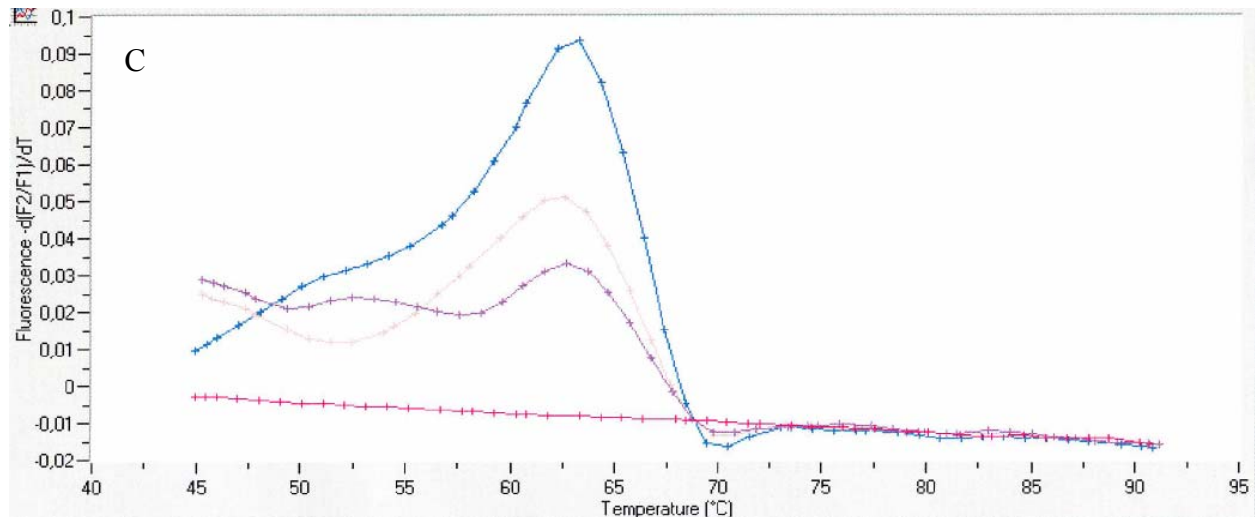


Abbildung 20 A-C: Schmelzkurvenanalyse (2.2.12) der Zelllinien Karpas422 (A), AMO (B) und HCT116 (C). Bei Karpas422 und AMO lagen in beiden Duplikaten zwei Gipfel in der Schmelzkurve vor, bei HCT116 nur in einem Duplikat. Der zusätzliche Gipfel weist auf das Vorkommen von 2 unterschiedlichen Produkten hin, die Mutation ist heterozygot. (Blaue Kurve=Standard 1,0 µg/µl, rote Kurve=Wasserprobe).

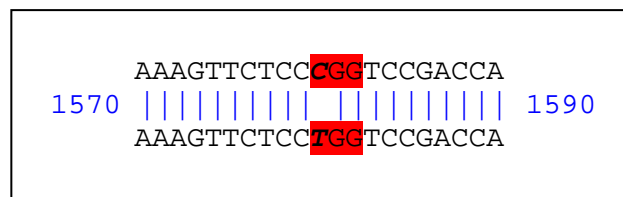


Abbildung 21: Nukleotidsequenz der Punktmutation in Codon 462 (rot eingerahmt) in WT1-Exon 9 (NM 024426.3).

3.4 Mögliche Wechselwirkung zwischen PAX2 und WT1

Die erhobenen Expressionsdaten von PAX2 und WT1, sowie deren Splicevarianten, wurden mit dem Statistikprogramm SPSS nach Spearman auf Korrelation geprüft.

Nur bei den Lymphom-Zelllinien war für PAX2 eine signifikante Korrelation ($p=0,03$) mit WT1 +Exon 5 nachzuweisen, die in Abbildung 22 dargestellt ist.

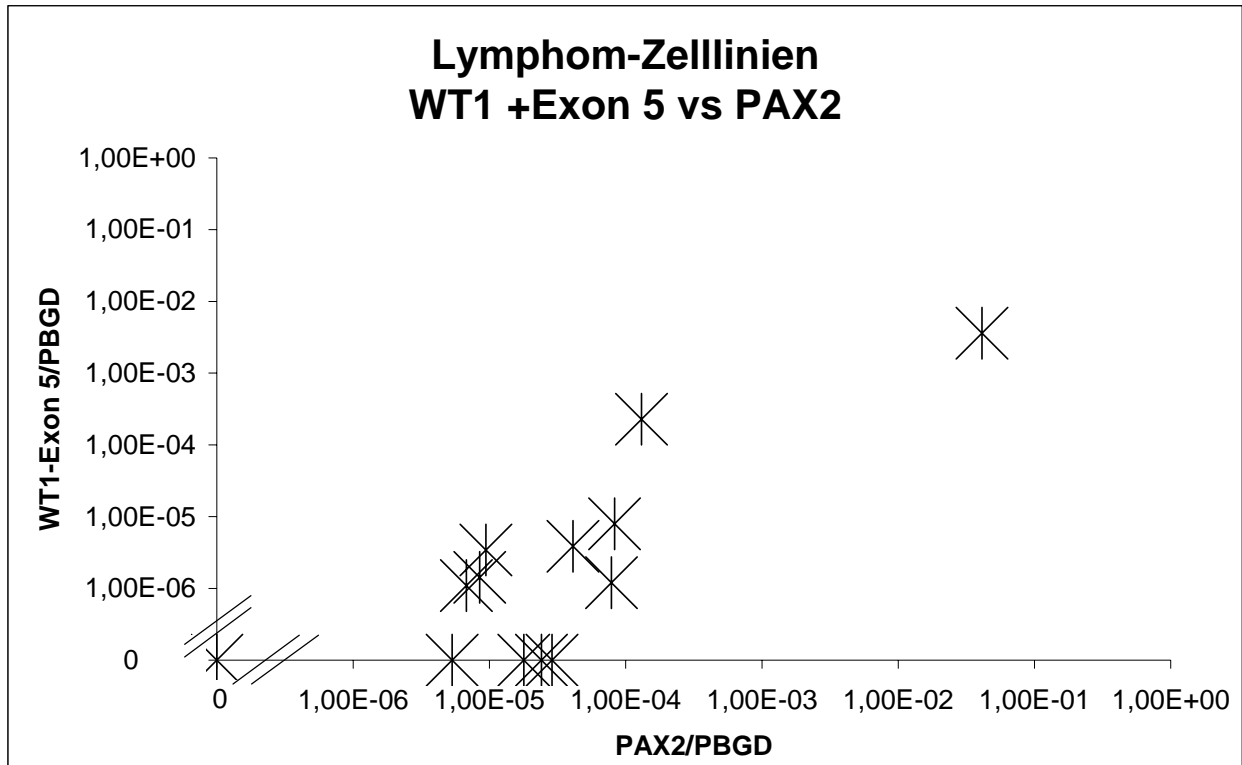


Abbildung 22: Betrachtung der Korrelation nach Spearman ($r=0,62$, $p=0,03$) zwischen PAX2 und WT1 +Exon 5 in Lymphom-Zelllinien. (Die Zelllinie rechts außen (KM-H2) wurde in die Korrelationsberechnung nicht einbezogen. Die Achsen sind logarithmisch eingeteilt).

Für alle anderen betrachteten Splicevarianten von PAX2 und WT1 konnte keine signifikante lineare Korrelation aus den mRNA-Expressionsdaten errechnet werden.

Im Kolonkarzinomgewebe konnte ebenfalls keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Expressionsleveln von PAX2, den drei Splicevarianten und WT1 festgestellt werden.

Eine Korrelationsbetrachtung mit den WT1-Splicevarianten WT1 +Exon 5 und WT1 +KTS war mangels Probenmaterial im Kolonkarzinomgewebe nicht möglich.

Ein Schwellenphänomen im Sinne eines „on-off-Mechanismus“, bei dem ab einem bestimmten Expressionslevel (Schwelle) des einen potentiellen Interaktionspartners der Expressionslevel des anderen Gens über, bzw. unter einem bestimmten Expressionslevel läge, konnte ebenfalls nicht gezeigt werden.

Zur übersichtlichen Visualisierung der Expression aller untersuchten Zelllinien und Gene, bzw. Splicevarianten, wurde die hierarchische Cluster-Analyse (dChip 2006-Programm) angewandt. Die normalisierten PCR-Expressionsdaten werden dabei nach einem Mustererkennungsalgorithmus angeordnet. Eine klare Gruppierung der Zelllinien nach ähnlichem Expressionsmuster konnte nicht gezeigt werden. Der relative Expressionslevel für

eine Zelllinie innerhalb eines betrachteten Gens oder einer Splicevariante, ergibt sich durch Varianz vom Mittelwert der betrachteten Größe. Bei einigen Zelllinien gingen erhöhte Expressionswerte von PAX2 und der betrachteten PAX2-Splicevarianten mit einer erhöhten Expression von WT1 und seinen beiden Splicevarianten WT1 +Exon 5 und WT1 +KTS einher. Einzelne Zelllinien wiesen überexprimierte WT1-(Splicevarianten) Expressionslevel bei Unterexpression von PAX2 und seinen Splicevarianten auf. Auch eine erhöhte PAX2-Expression bei unterdurchschnittlicher WT1-(Splicevarianten) Expression konnte bei einigen Zelllinien gezeigt werden. Der Großteil der untersuchten Zelllinien wies eine gleichzeitige Unterexpression für PAX2 und WT1 auf (s. Abbildung 23).

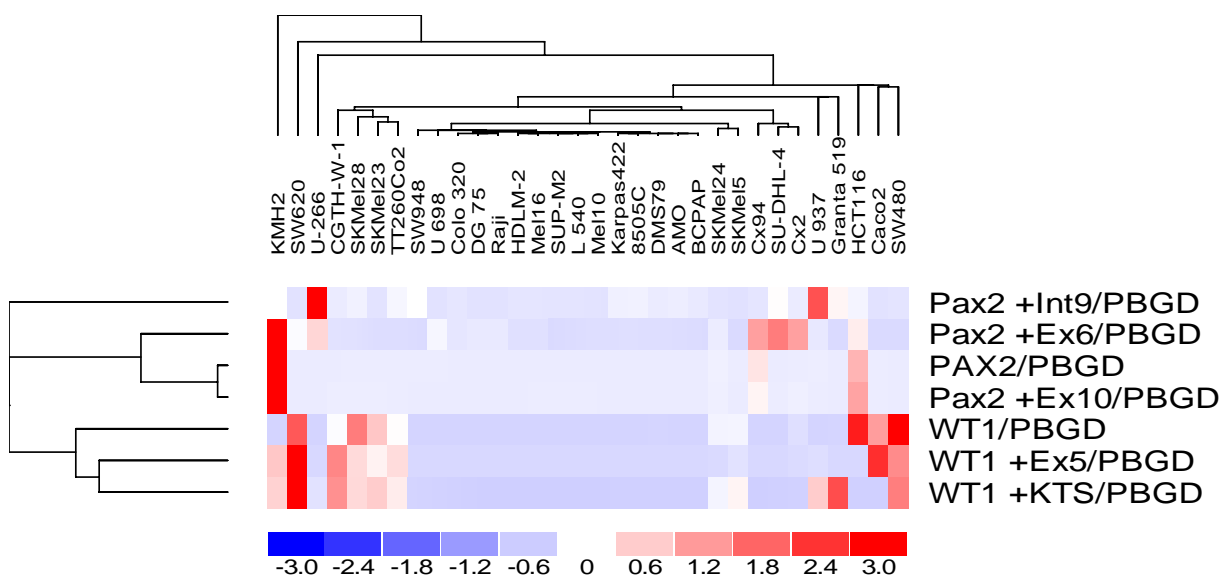


Abbildung 23: Hierarchische Cluster-Analyse der normalisierten mRNA-Expressionslevel der Zelllinien mit dChip. Bei den Zelllinien HCT116, Granta519, U937 und KM-H2 gehen erhöhte PAX2-(Splicevarianten) Expressionslevel mit erhöhten WT1-(Splicevarianten) Expressionslevel einher. Die Zelllinien SW480, CaCo2, SkMel5, TT260, SkMel23 und 28, CGTH-W-1 sowie SW620 zeigten die umgekehrte Konstellation. Die 4 Zelllinien Cx2, SU-DHL4, Cx94 und U266 wiesen eine erhöhte PAX2-(Splicevarianten) Expression auf. Die WT1-(Splicevarianten) Expression war in diesen Fällen unter dem Durchschnitt. Alle anderen Zelllinien zeigten niedrige PAX2-(Splicevarianten) Expressionslevel und gleichzeitig niedrige WT1-(Splicevarianten) Expressionslevel. (Die Farbkodierung visualisiert die Varianz eines Expressionslevels vom Mittelwert (weiß) für ein untersuchtes Gen, bzw. eine Splicevariante. Rot (+) =überexprimiert, blau (-) =unterexprimiert).

Bei Betrachtung des Expressionsmusters der Kolonkarzinomgewebeprobe, das in Abbildung 24 dargestellt ist, konnte keine erhöhte Expression von WT1 bei gleichzeitiger Unterexpression von PAX2 und der drei hier betrachteten Splicevarianten beobachtet werden. Ansonsten glichen die Ergebnisse denen in den Zelllinien (s. Abbildung 23).

Eine splicevarianten-spezifische Interaktion konnte bei den Zelllinien und den Tumorgewebe-
proben nicht erkannt werden.

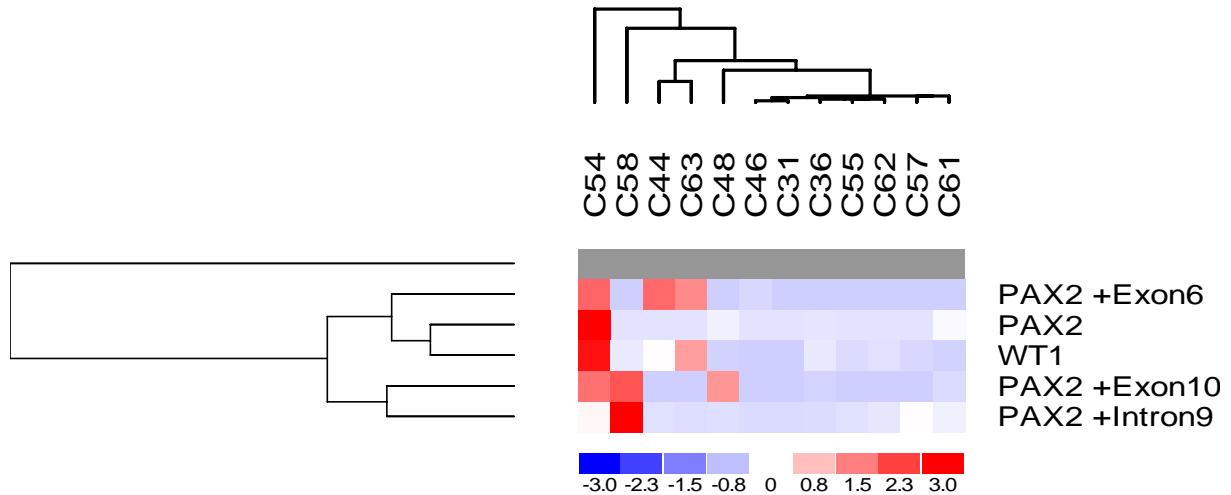


Abbildung 24: Hierarchische Cluster-Analyse der normalisierten mRNA-Expressionslevel der Kolonkarzinomgewebeprobe mit dChip. Die Proben C63 und C54 wiesen eine PAX2-(Splicevarianten) Überexpression und eine WT1-Überexpression auf. Die Proben C48, C44 und C58 zeigten erhöhte Expressionslevel von PAX2-(Splicevarianten) bei mittlerer bis unterdurchschnittlicher WT1-Expression. Die Expressionslevel der anderen Kolonkarzinomgewebeprobe zeigten unterdurchschnittliche PAX2-(Splicevarianten) Expressionslevel und unterdurchschnittliche WT1-Expressionslevel. (Die Farbkodierung visualisiert die Varianz eines Expressionslevels vom Mittelwert (weiß) für ein untersuchtes Gen, bzw. eine Splicevariante. Rot (+) =überexprimiert, blau (-) =unterexprimiert).

3.5 Western-Blot

Es wurden die Proteine von zwei Zelllinien (KM-H2 und HCT116 (2.1.1)) und einer Gesundblutprobe untersucht. Die Proteine wurden aus den Zellen extrahiert (2.2.17), im Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.2.18) und nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (2.2.19) mit dem monoklonalen Primärantikörper anti-PAX2 aus Kaninchenserum und dem Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper aus Eselserum als Sekundärantikörper detektiert (s. Abbildungen 25A und 26A). Als Kontrolle diente die Detektion der Proteine Aktin und GAPDH (2.2.20), wie in den Abbildungen 25B und 26B zu sehen ist.

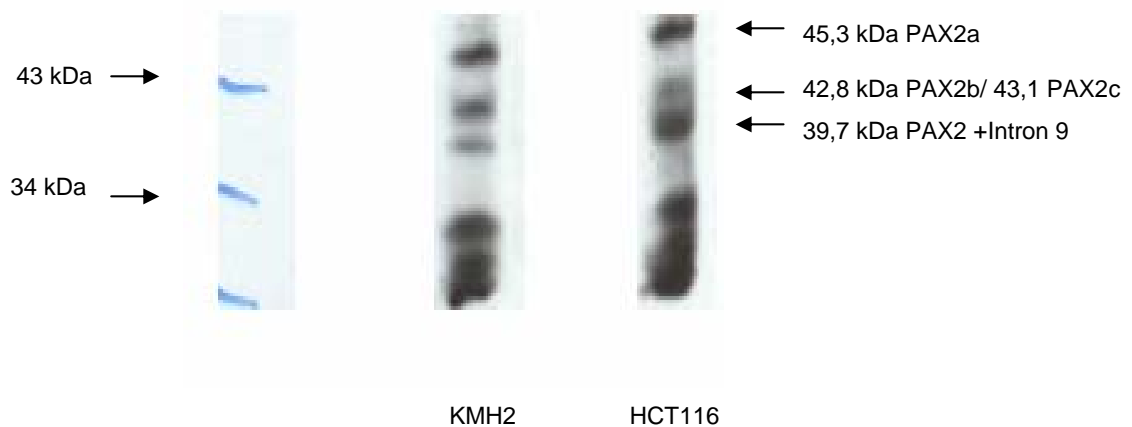


Abbildung 25A: Detektion des PAX2-Proteins in einer Lymphom-Zelllinie (KM-H2) und einer Kolonadenokarzinom-Zelllinie (HCT116). Der Film wurde nach Zugabe des ECL-Reagens (2.2.20) 5 min. belichtet.

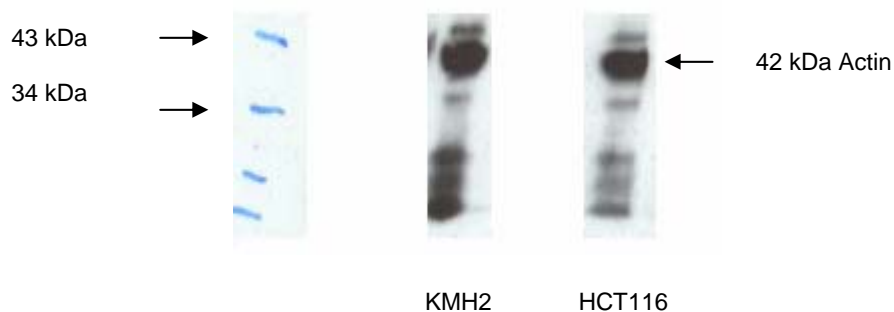


Abbildung 25B: Detektion des Aktin-Proteins als Kontrolle. Der Film wurde nach Zugabe des ECL-Reagens 1 min. belichtet.

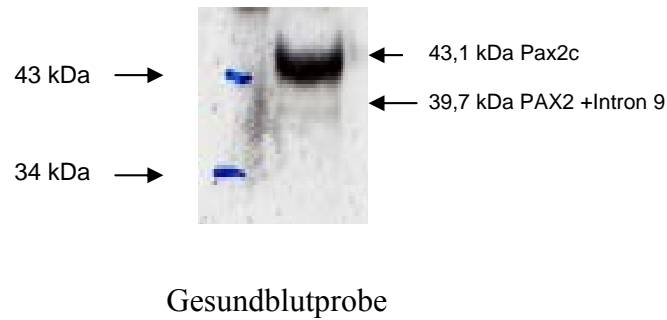


Abbildung 26A: Detektion des PAX2-Proteins in einer Gesundblutprobe. Der Film wurde nach Zugabe des ECL-Reagens 4 min. belichtet.

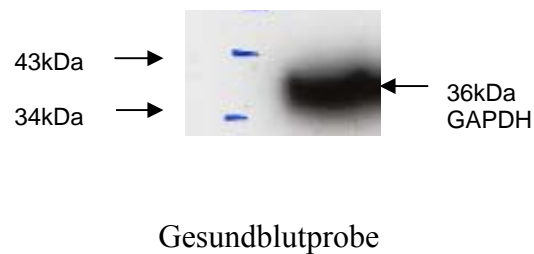


Abbildung 26B: Detektion des GAPDH-Proteins als Kontrolle. Der Film wurde nach Zugabe des ECL-Reagens 5 sec. belichtet.

In den beiden repräsentativ für die Lymphome und soliden Tumore untersuchten Zelllinien konnten die PAX2-Splicevarianten a, b und c sowie die in unserer Arbeitsgruppe neu beschriebene Intron 9-positive Variante auf Proteinebene nachgewiesen werden. In den Zelllinien findet demnach eine Translation der mRNA der einzelnen Splicevarianten statt.

In der Gesundblutprobe konnte ebenfalls PAX2-Protein nachgewiesen werden. Der Western-Blot zeigte eine Expression der PAX2-Variante c und eine schwache Expression der neu entdeckten PAX2-Splicevariante +Intron 9.

3.6 Transfektionen

Um eine mögliche Interaktion zwischen PAX2 und WT1 anhand funktioneller Versuche nachweisen zu können, sollten entweder PAX2 oder WT1 mittels RNA-Interferenz herunterreguliert werden. Es wurden zwei verschiedene Formen der RNA-Interferenz zur Unterdrückung der Genexpression verwendet: siRNA (2.2.23.1) gegen PAX2 und miRNA (2.2.23.2) jeweils gegen PAX2 und WT1.

3.6.1 siRNA-Versuche

Für die beiden Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien, CGTH-W-1 und 8505C, gab es in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Transfektionsprotokolle für siRNA (2.2.22.1). Es wurde jeweils 1 µg von 4 verschiedenen siRNAs gegen PAX2 verwendet, sowie eine Kontroll-siRNA als Negativkontrolle und eine fluoreszenzmarkierte Kontroll-siRNA (2.2.23.1.1) für die Messung der Transfektionseffizienz mit Hilfe der Durchflusszytometrie (2.2.24). Die Zellen wurden jeweils nach 24h und 48h für die RNA-Isolierung (2.2.9) und anschließende Real-Time-PCR (2.2.12), bzw. nach 48h und 72h für Western-Blot (2.2.17-2.2.20), geerntet. Es konnte in keinem der Versuchsansätze auf mRNA-Ebene und Proteinebene eine Verminderung des Expressionslevels von PAX2 detektiert werden. Die Transfektionseffizienz lag bei den Versuchen zwischen 50 % und 95 %.

Unspezifische Effekte auf die Genexpression durch die RNA-Interferenz konnten nicht festgestellt werden. Das Haushaltsgen PBGD (2.2.12) zeigte bei allen Versuchen eine gleichbleibend hohe Expression im Bereich von $1 \cdot 10^{-1}$.

3.6.2 miRNA-Versuche

Für die Transfektion von miRNA-Vektoren wurde für mehrere Lymphom-Zelllinien versucht, eine effiziente Transfektion mit dem Nucleofector® zu etablieren (2.2.21.1). Für die Prüfung der Transfektionseffizienz wurde, neben pmaxGFP, ein GFP-markierter miRNA-Vektor als Positivkontrolle in der Durchflusszytometrie verwendet. Als Negativkontrolle für die Durchflusszytometrie und die Transfektionen wurde ein Vektor ohne das GFP benutzt, der die gleiche unspezifische pre-miRNA-Sequenz aufweist, wie der GFP-tragende Vektor (2.1.4, 2.2.23.2.2).

Bei 2 Zelllinien, U937 und U266, konnte eine gute Transfektionseffizienz von 90 % für U937 und 75 % für U266 mit pmaxGFP (2.1.4, 2.2.24) bei den Optimierungsversuchen erzielt werden.

Bei den anderen Zelllinien lag die Transfektionseffizienz unter 20 %. Die Zellen wurden jeweils nach 24h und 48h für die RNA-Isolierung (2.2.9) und anschließende Real-Time-PCR (2.2.12), bzw. nach 48h und 72h für Western-Blot (2.2.17-2.2.20), geerntet. U937 wurde mit Vektoren, die für PAX2-spezifische miRNA kodieren, transfiziert, U266 mit Vektoren, die für WT1-spezifische miRNA kodieren (2.2.23.2.2). Es wurden verschiedene Konzentrationen der DNA-Vektoren von 2-7 µg eingesetzt.

In keinem der Versuchsansätze konnte auf mRNA-Ebene und Proteinebene eine Verminderung des Expressionslevels von PAX2 oder WT1 detektiert werden. Die pmaxGFP-Transfektionseffizienzen für U937 befanden sich bei den funktionellen Versuchen zwischen 65 % und 88 % und zwischen 55 % und 77 % für U266. Im Vergleich zur Transfektionseffizienz mit pmaxGFP lag die Transfektionseffizienz bei den miRNA-Vektoren um 10-20 % niedriger. Unspezifische Effekte auf die Genexpression durch die Transfektion konnten auch hier nicht festgestellt werden. Das Haushaltsgen PBGD (2.2.12) zeigte bei allen Versuchen eine gleich bleibend hohe Expression im Bereich von $1 \cdot 10^{-1}$.

4 Diskussion

4.1 Untersuchung von Tumorzelllinien auf die Expression von PAX2, der beiden bekannten Splicevarianten PAX2 +Exon 6 und +Exon 10 sowie der neu entdeckten Splicevariante PAX2 +Intron 9 auf mRNA-Ebene

In dieser Arbeit wurden Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen untersucht, um festzustellen, wie PAX2 und die beiden bekannten PAX2-Splicevarianten +Exon 6 und +Exon 10, sowie die in unserer Arbeitsgruppe neu beschriebene Variante PAX2 +Intron 9, in den beiden Tumorgruppen exprimiert werden, und ob sich die Expression zwischen beiden Gruppen bedeutend unterscheidet. Eine splicevarianten-spezifische Expressionsbetrachtung in verschiedenen Tumorentitäten ist bisher nicht durchgeführt worden. Über die Expression von PAX2 in Lymphomen ist zudem wenig bekannt. Muratovska et al. (21) konnten eine Expression in Lymphom-Zelllinien auf Protein- und mRNA-Ebene nachweisen.

Ein signifikanter Unterschied für PAX2 und die Splicevarianten +Exon 6, +Exon 10 und +Intron 9 zwischen Zelllinien solider Tumore und Lymphome konnte nicht festgestellt werden. Die Expression von PAX2 und der in dieser Arbeit untersuchten Splicevarianten konnte somit nicht eindeutig hämatologischen, bzw. soliden Tumorzelllinien zugeordnet werden.

Die Funktion der PAX2-Splicevarianten konnte bislang nur in Ansätzen geklärt werden. Für die Isoform PAX2c, die das Exon 10 enthält, konnte gezeigt werden, dass sie den WT1-Promotor stärker transaktivieren kann, als die Isoform PAX2b ohne Exon 6 und Exon 10 (83). Durch alternatives Splicing von Exon 10 entsteht ein anderer C-Terminus (27), der im Gegensatz zum inhibitorisch wirkenden C-Terminus der Variante b (97) durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren transkriptionsfördernd wirken könnte (83). Die hier erhobenen PCR-Daten der betrachteten Splicevarianten zeigten keinen solchen Zusammenhang. Möglicherweise ist dies durch die Konzeption der PAX2 +Exon 10-PCR bedingt (s. 4.1.1).

Die Funktion der Exon 6- und Intron 9-positiven Varianten in Tumorzellen und Gesundblut blieb weiterhin unklar.

4.1.1 Vergleich der Expressionslevel der PAX2-Exon 5-8³-PCR mit denjenigen der PCRs für PAX2 +Exon 6, +Exon 10 und +Intron 9

Bei der Betrachtung der Expressionslevel von PAX2 +Exon 10 und PAX2 +Intron 9 fiel auf, dass der mediane Expressionslevel für PAX2 +Exon 10 unter dem von PAX2 +Intron 9 lag, wobei der Unterschied signifikant war. In unserer Arbeitsgruppe konnte mit anderen als den hier zur Detektion von PAX2 +Exon 10 verwendeten Primer-Paaren⁶ festgestellt werden, dass eine gemeinsame Expression von Exon 10 und Intron 9 in 8 von 9 untersuchten verschiedenen Tumorentitäten jeweils in über 75 % der Proben vorlag (Busse et al., Poster DGHO 2007). Eine in dieser Arbeit etablierte PCR für PAX2 +Exon 10 detektiert spezifisch die Expression von Exon 10, ohne das Intron 9 mit zu detektieren. Eine isolierte Detektion von PAX2 +Exon 10 ist hier nur dann möglich, wenn das Intron 9 sich nicht in der mRNA-Sequenz befindet, da der Reverse-Primer für PAX2 +Exon 10 auf dem Übergang von Exon 9/Exon 10 bindet (s. Abbildung 27). Der geringe Expressionslevel des Produktes der PAX2 +Exon 10-PCR im Vergleich zu dem Produkt der PAX2 +Intron 9-PCR, lässt in Verbindung mit den zuvor in der Arbeitsgruppe beschriebenen Daten annehmen, dass ein gemeinsames Transkript mit Exon 10 und Intron 9 auf mRNA-Ebene häufiger exprimiert wird, als das Transkript nur mit Exon 10.

Um die Exon 10-Expression unabhängig von Intron 9 zu bestimmen, müsste eine weitere PCR etabliert werden, deren Forward-Primer in Exon 10 und der Reverse-Primer in Exon 11 liegen könnte.

Weiter fiel bei der Betrachtung der PCR-Ergebnisse auf, dass bei den Lymphom-Zelllinien und den Zelllinien solider Tumore die mediane Expression der PAX2-Exon 5-8-PCR unter der medianen Expression der Splicevariante PAX2 +Intron 9 lag, der Unterschied war signifikant. Bei den Lymphom-Zelllinien lag sie zusätzlich unter der medianen Expression der Splicevariante PAX2 +Exon 6. Der Unterschied war hier nicht signifikant. Zudem konnte bei drei Zelllinien solider Tumore sowie einer Lymphom-Zelllinie mit den splicevarianten-spezifischen PCRs eine Expression detektiert werden, mit der PAX2-Exon 5-8-PCR jedoch nicht. Ein Grund für die Expressionsunterschiede könnte eine unterschiedliche Effizienz der PCRs sein. Geringste Schwankungen in der PCR-Effizienz führen zu starken Unterschieden bei der Berechnung des Expressionslevels (98, 99). Die Effizienz der PAX2-Exon 5-8-PCR entspricht derjenigen der PAX2 +Intron 9-PCR (s. 2.2.12.3).

Ein anderer Grund für die Expressionsunterschiede könnte die Konzeption der PAX2-Exon 5-8-PCR sein. Der Forward- und der Reverse-Primer umschließen das alternativ gespligte Exon 6. Es

⁶ Nicht dargestellt

ist anzunehmen, dass bei der Expression von Exon 6 die verwendete Elongationszeit von 10 sec. nicht ausreicht, um den erforderlichen Abschnitt vollständig zu amplifizieren. Möglicherweise detektiert die PAX2-Exon 5-8-PCR bei der Expression von Exon 6 den PAX2-Expressionslevel zu gering. Er erscheint im Median deshalb niedriger als die Expressionslevel von PAX2 +Exon 6 und PAX2 +Intron 9. Dies würde jedoch die fehlende Detektion mit der PAX2-Exon 5-8-PCR bei stattfindender hoher splicevarianten-spezifischer Detektion im Falle der vier Zelllinien nicht erklären können. In diesen Fällen sind Mutationen an den Primer-, bzw. Sonden-Bindungsstellen denkbar, die das Anbinden an den Matrizen-Strang verhindern. Mutationen könnten mit einer Sequenzierung des entsprechenden Bereiches festgestellt werden. Die bisher im Detektionsbereich der PAX2-Exon 5-8-PCR beschriebenen Mutationen (100-103) liegen nicht in deren Primer- und Sonden-Bindungssequenzen. Neben den Mutationen besteht eine weitere Möglichkeit darin, dass im Detektionsbereich der PAX2-Exon 5-8-PCR noch andere unbekannte Splicevarianten vorliegen. So könnten sich, entsprechend dem von uns identifizierten Intron 9, an weiteren Exon-Grenzen Introns in der mRNA-Sequenz befinden. Wenn sich beispielsweise das Intron 7 zwischen Exon 7 und Exon 8 befände, würde dies das Binden des Reverse-Primers der PAX2-Exon 5-8-PCR verhindern, da der Reverse-Primer auf dem Übergang Exon 7/8 bindet (s. Abbildung 27). Um weitere unbekannte PAX2-Splicevarianten zu identifizieren, sollte eine stückweise Amplifizierung des PAX2-Gens erfolgen. Bei der Festlegung der Primer-Positionen sollte besonders auf die Übergänge zwischen den Exons geachtet werden. So könnten dazwischen liegende Introns ausfindig gemacht werden, da im Falle einer Intron-Expression auf mRNA-Ebene die Primer nicht binden könnten. Eine Amplifizierung wäre dann nicht, oder je nach Ausmaß der Intron-Expression nur vermindert möglich, wie es für die PAX2 +Exon 10-spezifische PCR hier beschrieben wurde. Durch anschließende Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese sollte geprüft werden, ob evtl. weitere Splicevarianten oder Mutationen vorliegen und bei entsprechenden Anhaltspunkten sollten die DNA-Abschnitte sequenziert werden.

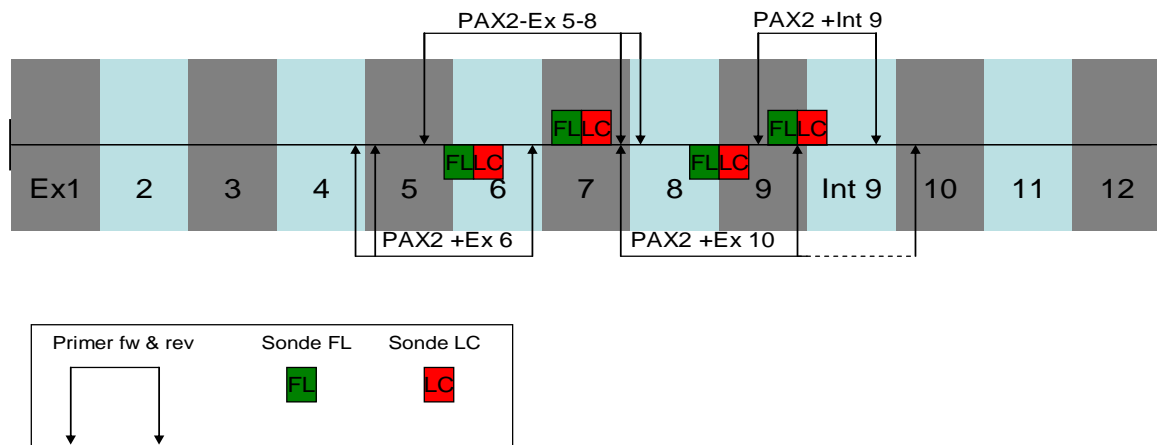


Abbildung 27: Position der Primer und Sonden der verwendeten PAX2-PCRs. Die Doppelpfeile bezeichnen die Anlagerung eines Primers auf einer Exon-Grenze mit einer Bindung in den beiden beteiligten Exons. Die gestrichelte Linie bei dem Reverse-Primer der PAX2 +Exon 10-PCR bezeichnet seinen Bindungsbereich bei nicht exprimiertem Intron 9.

4.1.2 Untersuchung von Gesundblutproben auf die Expression von PAX2 und der drei in dieser Arbeit betrachteten Splicevarianten auf mRNA-Ebene

Die Expression in Gesundblutproben wurde untersucht, um zu prüfen, ob der Nachweis von PAX2, bzw. der drei Splicevarianten, tumorspezifisch ist. In den Gesundblutproben wurden sowohl PAX2, als auch die hier untersuchten Splicevarianten auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Die Expressionslevel lagen im Gesundblut über denen in den Zelllinien, zum Teil war der Unterschied signifikant. Diese Ergebnisse stimmen mit Resultaten von Siehl et al. (22) überein, die zeigten, dass die PAX2-Expressionslevel in AML-Proben denen in Gesundblutproben entsprachen.

Folglich ist der Nachweis von PAX2 und der Splicevarianten +Exon 6, +Exon 10 sowie +Intron 9 im Blut auf mRNA-Ebene nicht tumorspezifisch und kann somit nicht als MRD-Marker herangezogen werden.

Fraglich bleibt die Funktion von PAX2 und seinen Splicevarianten im Gesundblut. Die Expression von PAX2 und anderen Mitgliedern der PAX-Genfamilie in gesundem adultem Gewebe (21, 104, 105) deutet auf eine Schutzfunktion gegen stressinduzierten Zelltod (106) und die Aufrechterhaltung von Vorläuferzellen hin (105). Für die maligne Entartung von Zellen

scheinen zusätzliche antiapoptotische und proliferationsfördernde Faktoren notwendig zu sein. Möglicherweise liegt die onkogene Wirkung von PAX2 in der Regulierung tumorzell-spezifischer Faktoren, die stark von der PAX2-Aktivierung abhängen und für das Überleben der Tumorzellen essentiell sind. Bei Inhibition der PAX2-Expression würde die Regulation der onkogenen lebenswichtigen Faktoren abnehmen oder entfallen, und die Tumorzellen würden in Apoptose gehen. Einer dieser Faktoren könnte WT1 sein, dessen Expression in Neoplasien, im Vergleich zu Gesundblut bzw. gesundem Gewebe, überexprimiert ist (61-63).

So ließe sich eine PAX2-Expression erklären, die per se nicht onkogen ist, sondern nur in Verbindung mit anderen Faktoren, die spezifisch in malignen Zellen vorliegen. Über die Funktion und das Expressionsmuster der in dieser Arbeit nicht untersuchten Variante PAX2d, bei der eine Deletion von 19 bp in Exon 12 vorliegt, ist bisher wenig bekannt. Ihre Expression konnte in Wilms-Tumoren und in gesunden Zellen der Nierenrinde von Erwachsenen beschrieben werden (26). Eine mögliche Überexpression in Tumoren muss in folgenden Studien geprüft werden. Weiter sind bisher nicht identifizierte PAX2-Splicevarianten denkbar, die charakteristischer Weise in malignen Zellen exprimiert werden würden. Ein kennzeichnender Expressionsunterschied von Splicevarianten zwischen entarteten und gesunden Zellen könnte die PAX2-Expression in vielen Tumorentitäten erklären, bei denen PAX2 eine wichtige Rolle für das Überleben der Tumorzellen zu spielen scheint (21, 37, 40), bei gleichzeitiger PAX2-Expression im Gesunden.

4.1.3 Untersuchung von Kolonkarzinomgewebe auf die Expression von PAX2 und der drei betrachteten Splicevarianten auf mRNA-Ebene

Die Expression von PAX2 und der drei Splicevarianten wurde auf mRNA-Ebene auch in Kolonkarzinomgewebe untersucht und konnte für alle Splicevarianten nachgewiesen werden. Die Expression von PAX2 +Intron 9 lag im Kolonkarzinomgewebe im Median über der Expression in den Tumorzelllinien und im Gesundblut, der Unterschied war signifikant. Alle anderen verwendeten PAX2-PCRs zeigten im Tumorgewebe eine niedrigere Expression als in den Zelllinien und im Gesundblut.

Die Tumorzelllinien sind ein in-vitro-Modell für die Situation in-vivo. Ein unterschiedlicher Selektionsdruck sowie andere Wachstumsbedingungen für Tumorgewebe und kultivierte Zelllinien könnte die Genexpression in Zelllinien verändern (107) und dazu führen, dass die Gene, die in gesundem Gewebe und Tumoren hoch exprimiert werden, in den Zelllinien im Vergleich dazu mit zunehmender Kulturzeit niedriger exprimiert werden (108, 109). So könnte

eine höhere Expression von PAX2 und seinen Splicevarianten im Gesundblut, im Vergleich zu den Tumorzelllinien, zustande kommen. Auch für das Tumorgewebe ist eine höhere PAX2-Expression im Vergleich zu den Zelllinien anzunehmen, da die PAX2 +Intron 9-Expression im Kolonkarzinomgewebe über der Expression in den Zelllinien lag, der Unterschied war hier signifikant. Mit der PAX2-Exon 5-8-PCR konnte dies nicht bestätigt werden. Gründe hierfür könnten die unter 4.1.1 besprochenen möglichen Mutationen, bzw. neuen Splicevarianten im Detektionsbereich der PAX2-Exon 5-8-PCR sein, welche die korrekte Detektion mit dieser PCR beeinflussen könnten. Möglicherweise handelt es sich um vermehrt in Tumorgewebe vorliegende Sequenzveränderungen, da das Phänomen der splicevarianten-spezifischen Detektion bei ausbleibender Detektion des splicevarianten-unabhängigen Transkriptes in den untersuchten Gesundblutproben nur bei einer von 11 Proben auftrat, im Tumorgewebe bei 8 von 12 Proben.

Die vergleichsweise niedrige Detektion der Splicevariante +Exon 10 im Kolonkarzinomgewebe könnte durch die hohe Expression von Intron 9 in Verbindung mit der Konzeption der +Exon 10-spezifischen PCR zustande kommen. Der +Exon 10-Reverse-Primer kann bei Expression von Intron 9 nicht binden (4.1.1; Abbildung 27). Nach unseren Erkenntnissen werden das Intron 9 und das Exon 10 allermeist gemeinsam exprimiert. Eine hohe Intron 9-Expression ist demnach mit einer hohen Exon 10-Expression assoziiert (4.1.1).

Die geringe Expression der Splicevariante +Exon 6 im Kolonkarzinomgewebe könnte mit der Inhomogenität des Tumorgewebes zusammenhängen. Dieses setzt sich aus organspezifischen malignen und gesunden Zellen sowie Matrixzellen zusammen (108). Enthielten die untersuchten Tumorproben neben malignen Zellen mehr gesunde Zellen, die möglicherweise eine geringe Expression dieser Splicevariante aufweisen, könnte der Expressionslevel der +Exon 6-Splicevariante in diesen Tumorproben, auch im Vergleich zu den Zelllinien und Gesundblutproben, geringer ausfallen als eventuell bei selektiver Messung maligner Gewebezellen. Denkbar ist auch, dass die Splicevariante +Exon 6 eine untergeordnete Bedeutung für das Wachstum und Überleben von Tumorgewebezellen hat und aus diesem Grund im Kolonkarzinomgewebe vergleichsweise niedrig exprimiert wird. Dem gegenüber kann für die PAX2-Variante c (+Exon 10/-Exon 6) auf Grund der anzunehmenden hohen Expression (s.o.) eine biologisch wichtige Funktion im Tumorgewebe vermutet werden. Für diese Variante werden zudem transkriptionsfördernde Eigenschaften angenommen (83).

4.1.4 Untersuchung von Tumorzelllinien und Gesundblutproben auf die Expression von PAX2 und der drei Splicevarianten auf Proteinebene

In den Tumorzelllinien konnten alle in dieser Arbeit untersuchten PAX2-Splicevarianten auf Proteinebene nachgewiesen werden. Im Gesundblut konnte ebenfalls das PAX2-Protein nachgewiesen werden. Die mRNA wird demnach auch in gesunden Zellen translatiert. Der Western-Blot zeigte eine Expression der PAX2-Variante c, die als transkriptionsfördernd beschrieben ist (83), und eine geringe Expression der neu entdeckten PAX2-Splicevariante Intron 9, die auf mRNA-Ebene hoch exprimiert wird. Möglicherweise findet im Gesundblut, im Vergleich zu den Tumorzellen, eine geringere Expression dieser Splicevariante auf Proteinebene statt.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um sicher zeigen zu können, ob es einen Unterschied in der Expression der PAX2-Splicevarianten auf Proteinebene zwischen Tumorzellen und Gesundblut gibt, der auf unterschiedliche Funktionen in malignen und gesunden Zellen hinweisen könnte. Auf eine unterschiedliche Proteinexpression in malignen und gesunden Zellen deuten Untersuchungen hin, die bei Tumorpatienten eine T-Zell-Antwort gegen das PAX2-Epitop beschreiben konnten. Diese war bei einer gesunden Kontroll-Gruppe nicht nachzuweisen, weshalb PAX2 als mögliches Tumortarget diskutiert wird². Die T-Zell-Antwort gegen das PAX2-Epitop könnte im Gesundblut wegen nicht stattfindender Prozessierung und Präsentation des PAX2-Epitopes ausbleiben. Die fehlende Prozessierung könnte wiederum an einer unterschiedlichen Expression der PAX2-Proteine zwischen malignen und gesunden Zellen liegen. Würden in Tumorzellen die PAX2-Proteine in Zellkern und Zytoplasma exprimiert werden, in gesunden Zellen aber vorwiegend im Zellkern, wäre anzunehmen, dass die Prozessierung und Präsentation des PAX2-Epitopes an der Zelloberfläche in gesunden Zellen ausbleibt, bzw. geringer ausfällt, als in Tumorzellen. Eine unterschiedliche T-Zell-Antwort zwischen Tumorpatienten und Gesunden könnte so erklärt werden. Die Proteinverteilung könnte durch die Auftrennung der Proteine in eine nukleäre und zytoplasmatische Fraktion gezeigt werden.

4.2 Untersuchung von Tumorzelllinien auf die Expression von WT1 und der Splicevarianten WT1 +Exon 5 und WT1 +KTS auf mRNA-Ebene

Die WT1-Expression unterschied sich signifikant zwischen Zelllinien solider Tumore und Lymphome. Dieses Ergebnis entspricht dem Ergebnis einer anderen Arbeit, die zeigte, dass die

WT1-Expression in Lymphomen auf mRNA-Ebene sehr gering bis nicht nachweisbar ausfiel (75).

Die Expression der PAX2-Exon 5-8-PCR und auch die der splicevarianten-spezifischen PAX2-PCRs korrelierten nicht mit den Expressionsunterschieden von WT1 zwischen den beiden Tumorgruppen. Die unterschiedliche WT1-Expression zwischen den Zelllinien von soliden Tumoren und Lymphomen scheint daher nicht durch einen regulatorischen Einfluss von PAX2 und seinen betrachteten Splicevarianten bedingt zu sein.

Der Expressionslevel für die beiden WT1-Splicevarianten +Exon 5 und +KTS unterschied sich nicht bedeutend zwischen den Lymphom-Zelllinien und den Zelllinien solider Tumore. Über die genaue Funktion dieser WT1-Splicevarianten liegen unterschiedliche Erkenntnisse vor. Ein Teil der Arbeiten zeigte in Tumoren eine Überexpression der Exon 5-positiven Splicevarianten (110, 111). Andere Ergebnisse wiesen auf eine proliferationshemmende und apoptoseinduzierende Funktion hin (112-114). Die WT1 +KTS-Splicevarianten scheinen mit der Prozessierung von RNA assoziiert zu sein (115) und zeigen ebenfalls sowohl transkriptionsaktivierende als auch transkriptionshemmende Eigenschaften (114). Menke et al. (116) vermuteten eine Apoptoseinduktion durch die WT1 -KTS-Varianten im Zusammenhang mit transkriptioneller Repression der EGF- und IGF1-Rezeptorgene, die sie für die +KTS-Splicevarianten nicht zeigen konnten. Dies stimmt mit Ergebnissen überein, die zeigten, dass die +KTS-Varianten eine geringere Affinität zu DNA-Zielsequenzen aufwiesen als die -KTS-Varianten (115, 117). Andere Untersuchungen konnten aber auch für die +KTS-Varianten die Apoptoseinduktion nachweisen (112). Weitere Studien sind erforderlich, um die Rolle der WT1-Splicevarianten in Tumorzellen besser charakterisieren zu können. Wahrscheinlich ist, dass die WT1-Splicevarianten in verschiedenste zelltyp-spezifische Funktionen involviert sind (116). Der resultierende funktionelle Effekt der Splicevarianten könnte durch die relativen Expressionslevel der Splicevarianten zueinander und durch Interaktionen der Varianten miteinander sowie mit anderen Proteinen bedingt sein. Die Expressionslevel in Tumorzellen sind zudem möglicherweise weniger tumorspezifisch bedingt als vielmehr ein Spiegelbild des Entwicklungsstadiums der Zellen, aus denen die Tumore entstanden sind (110). Die hier gewonnenen Ergebnisse sind am ehesten in einen solchen Zusammenhang zu stellen.

Die WT1-Expression wurde auch im Kolonkarzinomgewebe bestimmt. Sie lag über der Expression in den Lymphom-Zelllinien und entsprach dem Unterschied der Zelllinien solider Tumore zu den Lymphom-Zelllinien. In beiden Fällen war der Unterschied hoch signifikant. Die Expression im Tumorgewebe lag unter der Expression der Zelllinien solider Tumore, wobei hier der Unterschied nicht signifikant war. Mögliche Gründe der niedrigeren WT1-Expression im

Kolonkarzinomgewebe gegenüber den Zelllinien solider Tumore könnten die gleichen sein, wie für PAX2 +Exon 6 unter 4.1.3 besprochen.

4.2.1 Vergleich der Expressionslevel der WT1-Exon 1-3-PCR⁴ mit denen der splicevarianten-spezifischen PCRs für WT1 +Exon 5 und WT1 +KTS

Die mediane Expression der WT1-Exon 1-3-PCR lag bei den Lymphom-Zelllinien unter der medianen Expression der WT1 +KTS-spezifischen PCR. Der Unterschied war signifikant. Daneben gab es Zelllinien, bei denen eine Expression der Splicevarianten im oberen Detektionsbereich gemessen werden konnte, während eine Expression mit der WT1-Exon 1-3-PCR bei diesen Zelllinien nicht detektiert werden konnte. Ein Grund für die niedrigere mediane Expression der WT1-Exon 1-3-PCR, gegenüber der WT1 +KTS-spezifischen PCR, könnte die höhere Effizienz der splicevarianten-spezifischen PCR sein (s. 2.2.12.3). Dies erklärt jedoch nicht die Höhe des Expressionsunterschiedes von 2 log-Stufen und auch nicht, dass für die WT1-Splicevarianten eine hohe Expression nachgewiesen werden konnte, für das splicevarianten-unabhängige WT1-Transkript jedoch keine Expression detektiert werden konnte. So sind auch in diesem Fall, wie bei der PAX2-Exon 5-8-PCR, Mutationen an den Primer- und Sonden-Bindungsstellen der WT1-Exon 1-3-PCR denkbar, was das Phänomen für die 4 betroffenen Lymphom-Zelllinien und die beiden Zelllinien solider Tumore erklären könnte. In der Literatur sind bisher keine Mutationen im Bereich der Primer- und Sonden-Bindungssequenzen der WT1-Exon 1-3-PCR (s. Abbildung 28) beschrieben (118-120). Durch die Etablierung einer neuen WT1-PCR, die die WT1-Expression splicevarianten-unabhängig detektiert, sollte geprüft werden, ob die splicevarianten-unabhängige Expression dann nicht gleich hoch oder sogar höher liegt, als die Expression der Splicevariante +KTS. Weiter sollte geprüft werden, ob sich der WT1-Expressionslevel mit den neuen Primerpositionen dann noch signifikant zwischen Lymphom-Zelllinien und Zelllinien solider Tumore unterscheidet.

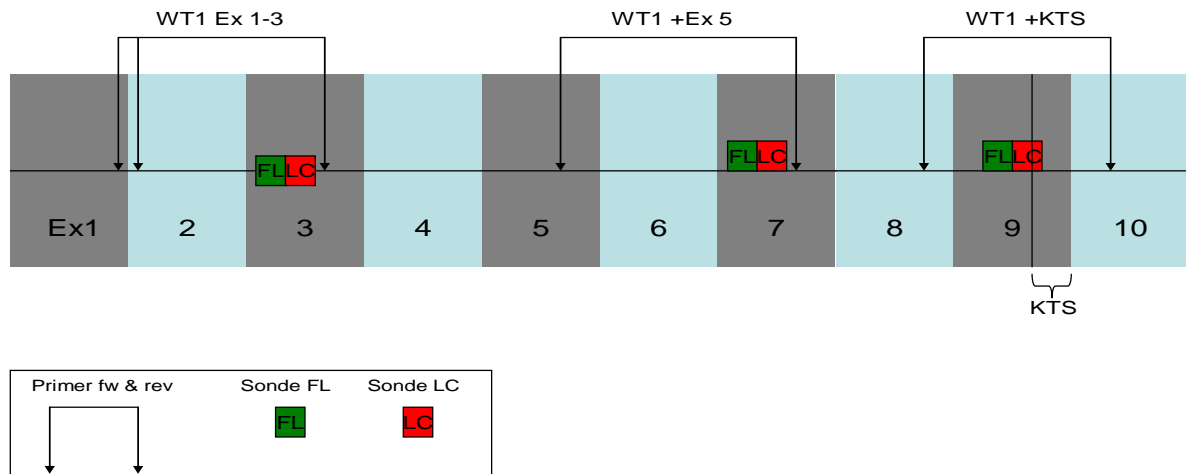


Abbildung 28: Position der Primer und Sonden der verwendeten WT1-PCRs. Die Doppelpfeile bezeichnen die Anlagerung eines Primers auf einer Exon-Grenze mit Bindung in beiden beteiligten Exons.

4.2.2 Identifikation einer funktionell relevanten Mutation im Detektionsbereich der WT1 +KTS-PCR in WT1-Exon 9

Mit der WT1 +KTS-spezifischen PCR konnte bei zwei Lymphom-Zelllinien und einer Zelllinie solider Tumore durch Schmelzkurvenanalyse und Sequenzierung eine, bei Patienten mit Denys-Drash-Syndrom beschriebene, heterogene Mutation in WT1-Exon 9 (121) identifiziert werden. Bei dieser „missense“-Mutation kommt es zum Austausch der Aminosäure Arginin gegen Tryptophan in Codon 462⁷. Es konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass durch diesen Aminosäure-Austausch die Interaktion des WT1-Proteins mit dessen DNA-Zielsequenzen, wie EGR-1-Konsensussequenzen oder Sequenzen im PDGF-A-Gen, verhindert wurde (117). Über die Anbindung an die EGR-1-Konsensussequenzen im PAX2-Promotor soll die PAX2 Repression durch WT1 erfolgen (80). In Tumorzellen, die diese heterozygote Mutation tragen, würde sie die Repression von PAX2 beeinträchtigen können und damit einen möglicherweise existierenden Regelkreis zwischen beiden Genen stören. Zumindest für die Zelllinie HCT116 könnte aus dem Expressionsmuster ein solcher Zusammenhang vermutet werden. Untersuchungen einer großen Gruppe sind hier nötig, um ein aussagekräftiges Ergebnis erhalten zu können.

Für akute myeloische Leukämien konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen WT1-Mutationen und schlechter Prognose der Patienten hergestellt werden (76, 77). Möglicherweise

⁷ NM 24426.3, Nukleotide 1580-1582

haben Mutationen in soliden Tumoren und Lymphomen ähnlichen Einfluss auf die Prognose der Patienten.

4.3 Interaktion zwischen PAX2 und WT1 sowie den Splicevarianten in Tumorzellen

In Untersuchungen zur Nierenentwicklung wurde festgestellt, dass PAX2 einerseits den WT1-Promotor aktivieren kann, und auf der anderen Seite bei hoher WT1-Expression die PAX2-Expression vermindert war (82, 83). Daneben zeigten andere Arbeiten eine positive Korrelation der Expression von PAX2 und WT1 in Brustkrebszelllinien und -gewebe, Prostatakarzinomzelllinien und -gewebe sowie in einem Teil von akuten Leukämien (22, 28, 39). Dies ließ vermuten, dass die für die embryonale Niere beschriebene Interaktion zwischen PAX2 und WT1 auch in Tumorzellen vorliegen könnte.

In dieser Arbeit wurde der mRNA-Expressionslevel der beiden Gene und der untersuchten Splicevarianten auf lineare Korrelation berechnet. Es sollte geprüft werden, ob es Hinweise für ein generelles Regulationsprinzip in Tumorzellen sowie für eine splicevarianten-spezifische Interaktion geben könnte. Dies konnte nur für das splicevarianten-unabhängige PAX2-Transkript und das Exon 5-positive WT1-Transkript gezeigt werden. Eine funktionelle Relevanz müsste durch expressionsmodulierende Versuche, wie RNA-Interferenz-Versuche, gezeigt werden.

Eine zur übersichtlichen Visualisierung des Expressionsmusters der untersuchten Zelllinien durchgeführte Cluster-Analyse konnte keine deutliche Gruppenbildung anhand des Expressionsmusters identifizieren, und lässt dadurch keinen Schluss auf in Tumorzellen generell vorhandene Regulationsmechanismen zwischen PAX2 und WT1 zu. Nur für einzelne Zelllinien ließ sich eine Interaktion zwischen den beiden Genen vermuten. Einige Zelllinien zeigten sowohl für PAX2 als auch für WT1, bzw. deren Splicevarianten, eine Überexpression. Dies könnte als ein transaktivierender Effekt von PAX2 auf WT1 angesehen werden. In anderen Zelllinien war WT1 überexprimiert und PAX2 unterdurchschnittlich exprimiert. Ein repressorischer Einfluss von WT1 auf PAX2 wäre hier einerseits denkbar, andererseits fraglich, da die PAX2-Expression in diesen Fällen nicht niedriger war als in Zelllinien mit unterdurchschnittlicher WT1-Expression. Eine mögliche regulatorische Funktion der Splicevarianten ließ sich nicht erkennen.

Viele Zelllinien zeigten gleichzeitig eine unterdurchschnittliche PAX2- und WT1-Expression. Die niedrigere WT1-Expression könnte durch die fehlende PAX2-Transaktivierung entstehen. Diese Konstellation könnte aber auch darauf hinweisen, dass zwischen den beiden Genen,

zumindest in diesen Zelllinien, keine Interaktion stattfindet. Eine erhöhte PAX2-Expression bei unterdurchschnittlicher WT1-Expression in manchen Zelllinien bekräftigte diesen Eindruck.

In den betrachteten Kolonkarzinomgewebeprobe konnte in keinem der 12 Fälle eine WT1-Überexpression und eine unterdurchschnittliche PAX2-Expression gesehen werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass im Tumorgewebe keine WT1-vermittelte PAX2-Inhibition vorliegen könnte. Die anderen beobachteten Konstellationen entsprachen denen in den Zelllinien.

Die von Silberstein et al. und Khoubehi et al. in der Mehrzahl der untersuchten Fälle gezeigte Korrelation der PAX2- und WT1-Expression bei Brust- bzw. Prostatakrebs (28, 39) konnte in dieser Arbeit nicht als allgemeines Regulationsprinzip in verschiedenen Tumorentitäten nachvollzogen werden.

Siehl et al. (22) konnten in akuten Leukämien für ungefähr 25 % der untersuchten Fälle eine Korrelation zwischen PAX2 und WT1 nachweisen. Dies weist zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit darauf hin, dass für die Regulation der beiden Gene innerhalb, aber auch zwischen verschiedenen Tumorentitäten, weitere Faktoren von Bedeutung sind. Möglicherweise sind die in der embryonalen Niere bekannten wechselseitigen Regulationen in Tumoren nicht vorhanden und die in früheren Arbeiten vermuteten Interaktionen von WT1 und PAX2 bestehen nur zufällig.

Andererseits könnten die fehlenden Anhaltspunkte für eine Interaktion bei den meisten in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien durch die eingeschränkte Aussagekraft der splicevarianten-unabhängigen PAX2- und WT1-PCR (4.1.1 und 4.2.1) mit bedingt sein. Des Weiteren könnte eine an sich vorhandene Interaktion moduliert und deshalb erschwert an Hand der Expressionslevel in Tumorzellen nachzuweisen sein. Modulatoren könnten funktionell beeinträchtigende Mutationen (4.2.2), bzw. epigenetische Veränderungen oder ein unterschiedliches Expressionsmuster der Splicevarianten in den Zelllinien sein. Für die WT1 +KTS-Splicevarianten konnte im Vergleich zu den -KTS-Varianten eine deutlich geringere Affinität zu den Zielsequenzen festgestellt werden, unter anderem EGR-1-Konsensussequenzen (117), die als WT1-Zielsequenz für eine PAX2-Repression in Frage kommen könnten (80). Bei einigen der hier untersuchten Zelllinien konnte, relativ zum Transkript der splicevarianten-unabhängigen WT1-PCR, eine hohe mediane WT1 +KTS-Expression gezeigt werden, die eine mögliche PAX2-Repression beeinträchtigen könnte. Die in dieser Arbeit bei verschiedenen Zelllinien festgestellte und als funktionell beeinträchtigend beschriebene Mutation in WT1-Exon 9 (117) führt zum Affinitätsverlust an die WT1-Zielsequenzen, was bei den betroffenen Zellen auch einen regulatorischen Einfluss der -KTS-Varianten stören könnte.

Könnte prinzipiell gezeigt werden, dass PAX2 WT1 in Tumorzellen positiv reguliert, wäre dies ein Umstand, der die hohe Expression von WT1 in Tumorzellen, im Vergleich zu Gesundblut

(62) und gesundem Gewebe (61, 63), mit erklären könnte. Ein Grund für die PAX2-Expression in Tumorzellen könnte eine nicht vorhandene oder defekte Rückkopplung durch WT1 sein (82). Im Gesundblut scheint dieser Regulationsmechanismus nicht zu bestehen und könnte einen Unterschied in der Zellregulation zwischen gesunden und malignen Zellen darstellen. Sowohl in dieser Arbeit als auch in vorhergehenden Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe (22), konnte festgestellt werden, dass die PAX2-Expression in Gesundblutproben dem Expressionslevel in Tumorzelllinien, bzw. dem in Tumorproben entsprach. Eine geringe WT1-Expression im gesunden Blut (22) bietet bei hoher PAX2-Expression keinen Hinweis für einen aktivierenden Einfluss von PAX2 auf WT1. Die niedrige WT1-Expression im Gesundblut könnte außerdem durch die fehlende Rückkopplung für die hohe PAX2-Expression mitverantwortlich sein.

Gehörten beide Gene gemeinsamen Signalwegen der Tumorzellregulation an, würde sich die Möglichkeit bieten, die Expression von zwei am Überleben von Tumorzellen beteiligten Genen durch Inhibition eines der Interaktionspartner zu unterbinden. Durch die Identifikation von Regulatoren der Expression von PAX2 und WT1 könnte die Kaskade der Tumorzellregulation weiter aufgeschlüsselt und das Verständnis der Ursache der malignen Entartung vertieft werden. In der Folge könnten diese Erkenntnisse zur therapeutischen Intervention an frühen Stellen der Signalkaskade genutzt werden. Je zentraler die Intervention in einem Signalweg erfolgen würde, umso weniger alternative Signalwege könnten nach der Blockade eines Signals aktiviert und ein Überleben der Tumorzellen könnte so eventuell verhindert werden.

4.4 RNA-Interferenz

Da eine Interaktion zwischen PAX2 und WT1 in Tumorzellen bisher nicht eindeutig funktionell nachgewiesen wurde, sollte in einem letzten Abschnitt dieser Arbeit die Expression eines der beiden Gene spezifisch inhibiert werden, um den möglichen Effekt auf die Expression des anderen Gens beurteilen zu können. Es sollte dabei die Effizienz der beiden verbreiteten Formen der RNA-Interferenz, siRNA- und miRNA-vermittelte Inhibition, verglichen werden. Für die siRNA-Versuche gegen PAX2 wurde vektorunabhängige doppelsträngige siRNA verwendet. Nachteilig dabei ist die relativ kurze Persistenz der siRNA im Zytoplasma von wenigen Tagen (122). Deshalb wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen vektorgebundene siRNA-Systeme, wie shRNA, entwickelt. Diese Vektorsysteme enthalten in der Regel in allen Zelltypen exprimierte Polymerase III-abhängige Promotoren (123-125), die zu sehr effizienter Expressionsreduktion führten. Eine sehr starke shRNA-Expression wird aber wiederum als nachteilig betrachtet, da diese die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Reduktion der

Genexpression in den Zellen und unerwünschter Effekte, wie Induktion des Interferonsystems und Zytotoxizität, erhöhen soll (126, 127).

Für die miRNA-Versuche gegen PAX2 und WT1 wurden DNA-Vektoren verwendet, die für spezifische einzelsträngige miRNA-Sequenzen kodieren. Die hier verwendeten miRNA-Vektoren tragen einen RNA-Polymerase II-abhängigen humanen CMV-Promotor. Die Transkription durch Polymerase II entspricht der Transkription endogener miRNA (94). Mit diesem System sollten die kurze Wirkungsdauer der vektorunabhängigen siRNA einerseits und die angeführten Nachteile eines Polymerase III-abhängigen Promotors andererseits ausgeglichen werden.

Da eine erfolgreiche Reduzierung der Genexpression weder mit siRNA noch mit miRNA erzielt wurde, konnte die Effizienz beider Systeme in dieser Arbeit nicht verglichen und der Nachweis einer Interaktion von PAX2 und WT1 in Tumorzellen nicht erbracht werden.

4.4.1 Ursachen für ineffiziente RNA-Interferenz

Im Folgenden werden wesentliche Faktoren besprochen, die für das Gelingen der RNA-Interferenz von Bedeutung sind. Damit sollen Ursachen für die nicht nachweisbare Expressionsreduktion von PAX2 und WT1 herausgearbeitet werden.

4.4.1.1 Transfektionseffizienz

Ein wesentliches Kriterium für das Gelingen von Transfektionsversuchen ist die Effizienz, mit der die Zellen transfiziert werden (128). Die Transfektionseffizienz ist von mehreren Faktoren abhängig:

1. Von der verwendeten Zelllinie, deren Passage und Wachstumsdichte.

Verschiedene Zelllinien sind unterschiedlich schwer zu transfizieren (129). Es wurden Zelllinien verwendet, bei denen die Transfektionseffizienz in den Versuchsoptimierungen mindestens 60 % betrug, und die einen Expressionslevel von WT1 und PAX2 im mittleren Detektionsbereich (2.2.12.2) aufwiesen, da ein niedriger Expressionslevel des Zielgens die Effizienz der RNA-Interferenz mindert (130, 131). Mit zunehmender Passage können sich die Eigenschaften von Zellen, einschließlich ihres Expressionsprofiles, verändern (132). Es wurden deshalb Zellkulturen niedriger Passage oder frisch kultivierte Zellen, verwendet. Für die mit dem Nucleofector® von Amaxa transfizierten Suspensionszellen (2.2.21.1) wurde eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^6$ /Ansatz gewählt. Dies liegt in dem vom Hersteller empfohlenen Bereich von $2 \cdot 10^5$ - $2 \cdot 10^6$ Zellen/Ansatz. Die Zellzahl der mit RNAiFect® von Qiagen transfizierten adhären Zellen (2.2.22.1) wurde so

bemessen, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion eine vom Hersteller empfohlene Konfluenz von 70-80 % aufwiesen. Eine zu geringe Zellzahl mindert die Transfektionseffizienz und erhöht die transfektionsbedingte Toxizität.(129).

2. Von der Reinheit der verwendeten siRNA und miRNA.

Durch unsaubere Aufarbeitung der miRNA-Vektoren aus den Bakterien, oder durch DNA-Kontamination der miRNA, bzw. siRNA, kann die Transfektionseffizienz stark beeinflusst werden (133). Eine Verunreinigung ist bei der in dieser Arbeit verwendeten miRNA und siRNA unwahrscheinlich. Die Lösungen wiesen eine hohe spektrophotometrisch bestimmte Reinheit auf.

3. Von der Transfektionsmethode (129, 134).

Für die jeweilige Zelllinie wurde die nach unseren Erfahrungen effizienteste Transfektionsmethode verwendet, um in den Zellen einen maximalen Effekt der RNA-Interferenz zu ermöglichen. Wir verwendeten zwei verschiedene Prinzipien der Transfektion: Die Nukleofektion (2.2.21.1) und die Lipofektion (2.2.22).

Der Nucleofector® von Amaxa arbeitet nach einer speziellen Form der Elektroporation. Er bietet gerade für DNA-Vektoren, wie es bei den miRNA-Vektoren der Fall ist, den Vorteil, diese direkt in den Zellkern zu schleusen. Durch den unmittelbaren nukleären Transport der Nukleinsäuren ist diese Transfektionsmethode vom Zellzyklus unabhängig. Ein Effekt von transfizierter DNA auf die Genexpression kann somit schneller als mit anderen Methoden erwartet werden.

Das zweite angewandte Verfahren war die Lipofektion mit RNAiFect® von Qiagen (2.2.22). Die Lipofektion ermöglicht keinen direkten Transport in den Zellkern, wodurch der nukleäre Transport zellzyklus-abhängig ist. Ein Effekt nach der Transfektion mit DNA-Vektoren ist im Vergleich zur Nukleofektion später zu erwarten. Dieser Faktor wirkte sich bei den siRNA-Versuchen nicht aus, da siRNA-Moleküle transfiziert wurden, die nicht von Vektoren im Zellkern exprimiert werden und deren Wirkungsbereich im Zytoplasma ist (135).

Mit der Lipofektion lag die Transfektionseffizienz der fluoreszenzmarkierten siRNA zwischen 50 % und 95 %. Mit der Nukleofektion wurde mit den GFP-markierten miRNA-Vektoren eine Effizienz zwischen 35 % und 65 % erreicht. Für das pmaxGFP-Kontroll-Plasmid lag die Effizienz zwischen 75 % und 80 %. Eine geringere GFP-Expression mit den miRNA-Vektoren wird vom Hersteller durch Abbau von GFP angegeben. Die tatsächliche Effizienz soll demnach über der detektierten Effizienz liegen.

Die geringe Transfektionseffizienz bei einem Teil der Versuche wird in diesen Fällen als Hauptgrund für die ineffiziente RNA-Interferenz angesehen.

Überprüft werden kann die Effizienz mit Hilfe von vektorgebundenen Reportergenen, wie z.B. dem GFP-Gen, dessen Produkt nach erfolgreicher Transfektion in den Zellen nachgewiesen

werden kann. Daneben gibt es für die vektorungebundenen siRNA die Möglichkeit, sie direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren. Die Messung der Fluoreszenz mit Hilfe der Durchflusszytometrie, wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde, ermöglicht jedoch nur eine näherungsweise Aussage über die Transfektionseffizienz in den einzelnen Ansätzen. Das Ergebnis der Messung kann nur eine exakte Aussage über die Transfektionseffizienz im untersuchten Kontrollansatz treffen. Für die anderen Ansätze wird eine ähnliche Effizienz angenommen, da sie unter gleichen Bedingungen wie der Kontrollansatz hergestellt wurden. Eine Messung aller Ansätze mit der Durchflusszytometrie ist nicht möglich, da die Zellen durch die Messung geschädigt und danach in einem Sammeltank aufgefangen werden.

Eine Aussage über den Erfolg der RNA-Interferenz lässt sich mit dem Nachweis der Transfektionseffizienz nicht machen. Sie gibt lediglich an, wie gut die Moleküle in die Zellen eingedrungen sind.

4.4.1.2 Von der Transfektionseffizienz unabhängige Einflussfaktoren auf die RNA-Interferenz

1. Die Sequenzen der siRNA- und miRNA-Moleküle.

Verschiedene siRNA-, bzw. miRNA-Sequenzen zeigen eine unterschiedliche Effizienz die Ziel-mRNA abzubauen (122). Sequenzen anderer Gene mit einer partiellen Homologie zur Zielsequenz können außerdem durch die siRNA-, bzw. die miRNA erkannt werden, was zu unspezifischer Expressionsminderung anderer Gene (off-target-Effekt) und zur ineffektiven Expressionsminderung des Zielgens führen kann (135). Deshalb wurden zur Optimierung mehrere Sequenzen für ein Zielgen ausgetestet. Diejenige Sequenz mit der besten spezifischen Expressionsreduktion des Zielgens, in Verbindung mit den geringsten unspezifischen Effekten, sollte ausgewählt werden. Unspezifische Effekte auf die Genexpression sollten durch Expressionsänderungen des Haushaltgens PBGD festgestellt werden. Der PBGD-Expressionslevel zeigte bei allen Versuchen eine gleichbleibend hohe Expression im Bereich von $1 \cdot 10^{-1}$. Unspezifische Effekte auf die Genexpression der Zellen sind somit hier unwahrscheinlich. Eine Punktmutation in der Ziel-mRNA im Hybridisierungsbereich von siRNA, bzw. miRNA, kann einen Abbau der mRNA durch RISC verhindern (89). Die Sequenzierung der siRNA- und miRNA-Zielsequenzen in den verwendeten Zelllinien könnte zeigen, ob Mutationen mit ein Grund für die ineffiziente RNA-Interferenz sein könnten.

2. Die mRNA-Sekundärstruktur

Die Sekundärstruktur der Ziel-mRNA beeinflusst die mRNA-Prozessierung und wirkt sich dadurch auf die Effizienz der RNA-Interferenz aus (136). Bei entsprechender Faltung der mRNA könnte ein Angreifen der in RISC eingebundenen siRNA- bzw. miRNA an die spezifischen Sequenzen gestört und so eine Degradierung der PAX2-, bzw. WT1-mRNA erschwert worden sein.

3. Der im Plasmid eingebundene Promotor

Bei Vektorsystemen, wie den miRNA-Vektoren, ist es möglich, dass der Promotor in der verwendeten Zelllinie auf Grund epigenetischer Modifizierungen wie Methylierung inaktiv ist (137), und die miRNA-Sequenz nicht transkribiert werden kann.

4. Expressionsreduktion essentieller Gene.

Bei RNAi gegen diese beiden für das Überleben von Tumorzellen essentiellen Gene (21, 37, 40, 63) ist denkbar, dass diejenigen Zellen absterben, die erfolgreich transfiziert wurden, wenn die Expression des Zielgens unter einen für das Überleben der Zelle notwendigen Level reduziert wurde. Ein Effekt auf mRNA-Ebene wäre dann nicht nachzuweisen, da die RNA der abgestorbenen Zellen zwischenzeitlich abgebaut worden wäre. So könnte man annehmen, dass nur die Zellen überleben, die nicht bzw. nicht effizient genug transfiziert wurden und nur deren mRNA gemessen werden konnte. Damit könnte eine stattgefunden reduzierte Expression des essentiellen Gens nicht nachgewiesen werden.

Es ist zu vermuten, dass ein Zusammenspiel mehrerer der hier besprochenen Faktoren für die ineffektiven RNA-Interferenz-Versuche verantwortlich ist.

5 Zusammenfassung

Das PAX2-Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor, der eine bedeutende Funktion bei der Entwicklung vieler Organe während der Embryogenese einnimmt. Die Expression nimmt nach Abschluss der Zelldifferenzierung ab. Demgegenüber konnte in zahlreichen humanen Neoplasien eine Überexpression von PAX2 beobachtet werden, die wichtig für das Überleben und Wachstum von Tumorzellen zu sein scheint.

In dieser Arbeit wurde die Expression von PAX2 und zwei der vier bekannten Splicevarianten (+Exon 6 und +Exon 10) sowie die Expression der in unserer Arbeitsgruppe neu entdeckten Intron 9-positiven Splicevariante in Zelllinien solider Tumore und Lymphome auf mRNA-Ebene (quantitative Real-Time-PCR, LightCycler®-Prinzip) und Proteinebene (Western-Blot) untersucht. Zwischen den Zelllinien solider Tumore und Lymphome konnte kein Unterschied des Expressionsmusters und des Expressionslevels von PAX2 sowie der untersuchten Splicevarianten auf mRNA- und Proteinebene festgestellt werden. Ihre Expression konnte somit nicht spezifisch hämatologischen bzw. soliden Tumorzelllinien zugeordnet werden. PAX2 und die drei Splicevarianten konnten auch in Gesundblutproben nachgewiesen werden. Die medianen Expressionslevel lagen hier auf mRNA-Ebene stets über denen der Zelllinien. Der Nachweis von PAX2-(Splicevarianten) mRNA im Blut ist folglich nicht tumorspezifisch und kann somit nicht als MRD-Marker herangezogen werden. Auf Proteinebene konnte PAX2 ebenfalls im Gesundblut nachgewiesen werden. Ob es einen Unterschied zwischen gesunden und malignen Zellen hinsichtlich der Lokalisation und der Funktion des PAX2 Proteins (Zytoplasma/ Nukleus) gibt, muss in weiteren Untersuchungen gezeigt werden. Zusätzlich konnten alle Splicevarianten im Kolonkarzinomgewebe detektiert werden. Insbesondere hier, aber auch in einigen Zelllinien, fiel auf, dass für die Splicevarianten, vor allem für die Variante +Intron 9, eine hohe Expression detektiert werden konnte, während mit der das PAX2-Transkript splicevarianten-unabhängig detektierenden PCR in diesen Proben keine Expression gemessen werden konnte. Dies lässt annehmen, dass im Detektionsbereich dieser PCR Veränderungen wie Mutationen oder unbekannte Splicevarianten im Sinne des Intron 9 vorliegen. Die Veränderungen scheinen häufiger in malignen Zellen aufzutreten, da das Phänomen im Gesundblut nur in einem von 11 Fällen beobachtet werden konnte.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die Expression des Transkriptionsfaktors WT1 sowie die der Exon 5- und KTS-positiven WT1-Splicevarianten in den gleichen Zelllinien auf mRNA-Ebene untersucht. WT1 spielt eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung der Niere und des Urogenitaltraktes. Darüber hinaus konnte eine Überexpression in vielen Tumorerkrankungen

gefunden werden, die analog zu PAX2 für das Überleben und Wachstum der Tumorzellen bedeutend zu sein scheint. Eine in der embryonalen Niere gezeigte, wechselseitige Interaktion der beiden Gene, bei der PAX2 den WT1-Promotor aktiviert und WT1 zur PAX2-Expressionsreduktion führt, wird auf Grund korrelierender Expressionsmuster auch in mehreren Tumorentitäten vermutet.

Die Lymphom-Zelllinien zeigten hier, im Vergleich zu den Zelllinien solider Tumore, eine bedeutend niedrigere Expression, was mit Ergebnissen anderer Arbeiten übereinstimmt. Für die untersuchten WT1-Splicevarianten konnte hier kein Unterschied zwischen beiden Tumorgruppen gezeigt werden. So wie auch für PAX2 beobachtet, konnte für WT1 in einigen Zelllinien, vor allem von Lymphomen, eine Splicevarianten-Expression auf mRNA-Ebene detektiert werden, nicht aber das Transkript der splicevarianten-unabhängigen WT1-PCR. Dies lässt auch hier das Vorliegen von Veränderungen im Detektionsbereich dieser PCR annehmen und könnte mit am Expressionsunterschied zwischen den Zelllinien solider Tumore und Lymphome beteiligt sein.

Zur Prüfung der vermuteten Interaktion wurden die Expressionslevel von PAX2 und WT1 sowie der betrachteten Splicevarianten korreliert. Nur für das splicevarianten-unabhängige PAX2-Transkript und WT1 +Exon 5 ergab sich bei den Lymphom-Zelllinien eine signifikante lineare Korrelation. Für die anderen Größen konnte nur bei einem Teil der Zelllinien eine Interaktion vermutet werden. Ein allgemeines, bzw. splicevarianten-spezifisches Regulationsprinzip für PAX2 und WT1 in verschiedenen Tumorentitäten konnte daher nicht gezeigt werden. Möglicherweise sind die in der embryonalen Niere bekannten wechselseitigen Regulationen in Tumoren nicht vorhanden, und die in früheren Arbeiten angenommenen Interaktionen von WT1 und PAX2 bestehen nur zufällig. Andererseits könnten die fehlenden Anhaltspunkte für eine Interaktion durch die eingeschränkte Aussagekraft der splicevarianten-unabhängigen PAX2- und WT1-PCR mit bedingt, oder sie könnten Hinweise auf Modulatoren sein, die eine potentiell vorhandene Interaktion beeinträchtigen. Dabei mag es sich um unterschiedliche Splicevarianten-Expressionsmuster in den Zelllinien, epigenetische Veränderungen oder Mutationen handeln, wie die hier in einigen Zelllinien festgestellte Mutation in WT1-Exon 9, die zum Affinitätsverlust zu WT1-Zielsequenzen führt.

Funktionell konnte die Interaktion der beiden Gene hier nicht gezeigt werden und muss in weiteren Studien geprüft werden. Wären PAX2 und WT1 in gemeinsame Signalwege integriert, könnte die Fortleitung von Aktivierungssignalen in mehrere untergeordnete Signalwege an dieser Schnittstelle unterbunden werden. Der Nachweis einer Interaktion könnte somit neue therapeutische Interventionsmöglichkeiten eröffnen und das Verständnis der Tumorzellregulation vertiefen.

6 Literaturverzeichnis:

1. Dressler GR, Douglass EC. Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1179-83.
2. Stuart ET, Kioussi C, Gruss P. Mammalian Pax genes. *Annu Rev Genet* 1994;28:219-36.
3. Pilz AJ, Povey S, Gruss P, Abbott CM. Mapping of the human homologs of the murine paired-box-containing genes. *Mamm Genome* 1993;4:78-82.
4. Stapleton P, Weith A, Urbanek P, Kozmik Z, Busslinger M. Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9. *Nat Genet* 1993;3:292-8.
5. Bopp D, Burri M, Baumgartner S, Frigerio G, Noll M. Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* 1986;47:1033-40.
6. Glardon S, Callaerts P, Halder G, Gehring WJ. Conservation of Pax-6 in a lower chordate, the ascidian *Phallusia mammillata*. *Development* 1997;124:817-25.
7. Burri M, Tromvoukis Y, Bopp D, Frigerio G, Noll M. Conservation of the paired domain in metazoans and its structure in three isolated human genes. *Embo J* 1989;8:1183-90.
8. Eccles MR, He S, Legge M, Kumar R, Fox J, Zhou C, et al. PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int J Dev Biol* 2002;46:535-44.
9. Robson EJ, He SJ, Eccles MR. A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat Rev Cancer* 2006;6:52-62.
10. Treisman J, Harris E, Desplan C. The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein. *Genes Dev* 1991;5:594-604.
11. Jun S, Desplan C. Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development* 1996;122:2639-50.
12. Underhill DA, Gros P. The paired-domain regulates DNA binding by the homeodomain within the intact Pax-3 protein. *J Biol Chem* 1997;272:14175-82.
13. Eberhard D, Jimenez G, Heavey B, Busslinger M. Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho family. *Embo J* 2000;19:2292-303.
14. Dahl E, Koseki H, Balling R. Pax genes and organogenesis. *Bioessays* 1997;19:755-65.

15. Mansouri A, Hallonet M, Gruss P. Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:851-7.
16. Jordan T, Hanson I, Zaletayev D, Hodgson S, Prosser J, Seawright A, et al. The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nat Genet* 1992;1:328-32.
17. Tassabehji M, Read AP, Newton VE, Harris R, Balling R, Gruss P, et al. Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature* 1992;355:635-6.
18. Bernasconi M, Remppis A, Fredericks WJ, Rauscher FJ, Schafer BW. Induction of apoptosis in rhabdomyosarcoma cells through down-regulation of PAX proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:13164-9.
19. Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA. PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol* 2007;73:1-14.
20. Wallin J, Wilting J, Koseki H, Fritsch R, Christ B, Balling R. The role of Pax-1 in axial skeleton development. *Development* 1994;120:1109-21.
21. Muratovska A, Zhou C, He S, Goodyer P, Eccles MR. Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene* 2003;22:7989-97.
22. Siehl JM, Thiel E, Heufelder K, Snarski E, Schwartz S, Mailander V, et al. Possible regulation of Wilms' tumour gene 1 (WT1) expression by the paired box genes PAX2 and PAX8 and by the haematopoietic transcription factor GATA-1 in human acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 2003;123:235-42.
23. Scholl FA, Kamarashev J, Murmann OV, Geertsen R, Dummer R, Schäfer B. PAX3 is expressed in human melanoms and contributes to tumor cell survival. *Cancer Research* 2001;61:823-6.
24. Narahara K, Baker E, Ito S, Yokoyama Y, Yu S, Hewitt D, et al. Localisation of a 10q breakpoint within the PAX2 gene in a patient with a de novo t(10;13) translocation and optic nerve coloboma-renal disease. *J Med Genet* 1997;34:213-6.
25. Sanyanusin P, Norrish JH, Ward TA, Nebel A, McNoe LA, Eccles MR. Genomic structure of the human PAX2 gene. *Genomics* 1996;35:258-61.
26. Tavassoli K, Ruger W, Horst J. Alternative splicing in PAX2 generates a new reading frame and an extended conserved coding region at the carboxy terminus. *Hum Genet* 1997;101:371-5.

27. Ward TA, Nebel A, Reeve AE, Eccles MR. Alternative messenger RNA forms and open reading frames within an additional conserved region of the human PAX-2 gene. *Cell Growth Differ* 1994;5:1015-21.
28. Silberstein GB, Dressler GR, Van Horn K. Expression of the PAX2 oncogene in human breast cancer and its role in progesterone-dependent mammary growth. *Oncogene* 2002;21:1009-16.
29. Brophy PD, Ostrom L, Lang KM, Dressler GR. Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene. *Development* 2001;128:4747-56.
30. Burton Q, Cole LK, Mulheisen M, Chang W, Wu DK. The role of Pax2 in mouse inner ear development. *Dev Biol* 2004;272:161-75.
31. Lawoko-Kerali G, Rivolta MN, Holley M. Expression of the transcription factors GATA3 and Pax2 during development of the mammalian inner ear. *J Comp Neurol* 2002;442:378-91.
32. Terzic J, Muller C, Gajovic S, Saraga-Babic M. Expression of PAX2 gene during human development. *Int J Dev Biol* 1998;42:701-7.
33. Torres M, Gomez-Pardo E, Gruss P. Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development* 1996;122:3381-91.
34. Pfeffer PL, Payer B, Reim G, di Magliano MP, Busslinger M. The activation and maintenance of Pax2 expression at the mid-hindbrain boundary is controlled by separate enhancers. *Development* 2002;129:307-18.
35. Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest* 2004;114:795-804.
36. Fickenscher HR, Chalepakis G, Gruss P. Murine Pax-2 protein is a sequence-specific trans-activator with expression in the genital system. *DNA Cell Biol* 1993;12:381-91.
37. Gnarra JR, Dressler GR. Expression of Pax-2 in human renal cell carcinoma and growth inhibition by antisense oligonucleotides. *Cancer Res* 1995;55:4092-8.
38. Wu H, Chen Y, Liang J, Shi B, Wu G, Zhang Y, et al. Hypomethylation-linked activation of PAX2 mediates tamoxifen-stimulated endometrial carcinogenesis. *Nature* 2005;438:981-7.
39. Khoubehi B, Kessler AM, Adshead JM, Smith GL, Smith RD, Ogden CW. Expression of the developmental and oncogenic PAX2 gene in human prostate cancer. *J Urol* 2001;165:2115-20.

40. Buttiglieri S, Deregibus MC, Bravo S, Cassoni P, Chiarle R, Bussolati B, et al. Role of Pax2 in apoptosis resistance and proinvasive phenotype of Kaposi's sarcoma cells. *J Biol Chem* 2004;279:4136-43.
41. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990;60:509-20.
42. Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9618-22.
43. Rauscher FJ, Morris JF, Tournay OE, Cook DM, Curran T. Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science* 1990;250:1259-62.
44. Menke A, van der Eb AJ, Jochemsen AG. The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? *Int Rev Cytol* 1998;181:151-212.
45. Dallosso AR, Hancock AL, Brown KW, Williams AC, Jackson S, Malik K. Genomic imprinting at the WT1 gene involves a novel coding transcript (AWT1) that shows deregulation in Wilms' tumours. *Hum Mol Genet* 2004;13:405-15.
46. Wang ZY, Qiu QQ, Enger KT, Deuel TF. A second transcriptionally active DNA-binding site for the Wilms tumor gene product, WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8896-900.
47. Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene* 2001;273:141-61.
48. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 1990;343:774-8.
49. Matsunaga E. Genetics of Wilms' tumor. *Hum Genet* 1981;57:231-46.
50. Little M, Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat* 1997;9:209-25.
51. Reddy JC, Licht JD. The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: how much do we really know? *Biochim Biophys Acta* 1996;1287:1-28.
52. Rivera MN, Haber DA. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer* 2005;5:699-712.
53. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, et al. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1990;346:194-7.

54. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993;74:679-91.
55. Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard JB. The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev* 1993;40:85-97.
56. Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Glaser T, Housman DE. Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. *Mol Cell Biol* 1991;11:1707-12.
57. Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman D. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev* 1991;5:1345-56.
58. Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 1993;119:1329-41.
59. Menses HD, Renkl HJ, Entezami M, Thiel E. Wilms' tumor gene expression in human CD34+ hematopoietic progenitors during fetal development and early clonogenic growth. *Blood* 1997;89:3486-7.
60. Menke A, McInnes L, Hastie ND, Schedl A. The Wilms' tumor suppressor WT1: approaches to gene function. *Kidney Int* 1998;53:1512-8.
61. Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjan B, Buluwela L, et al. Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res* 2001;61:921-5.
62. Menses HD, Renkl HJ, Rodeck U, Maurer J, Notter M, Schwartz S, et al. Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 1995;9:1060-7.
63. Oji Y, Ogawa H, Tamaki H, Oka Y, Tsuboi A, Kim EH, et al. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:194-204.
64. Nakatsuka S, Oji Y, Horiuchi T, Kanda T, Kitagawa M, Takeuchi T, et al. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Mod Pathol* 2006;19:804-14.
65. Oji Y, Yamamoto H, Nomura M, Nakano Y, Ikeba A, Nakatsuka S, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2003;94:712-7.

66. Oji Y, Miyoshi Y, Koga S, Nakano Y, Ando A, Nakatsuka S, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary thyroid cancer. *Cancer Sci* 2003;94:606-11.
67. Campbell CE, Kuriyan NP, Rackley RR, Caulfield MJ, Tubbs R, Finke J, et al. Constitutive expression of the Wilms tumor suppressor gene (WT1) in renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998;78:182-8.
68. Oji Y, Nakamori S, Fujikawa M, Nakatsuka S, Yokota A, Tatsumi N, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2004;95:583-7.
69. Rodeck U, Bossler A, Kari C, Humphreys CW, Gyorfı T, Maurer J, et al. Expression of the wt1 Wilms' tumor gene by normal and malignant human melanocytes. *Int J Cancer* 1994;59:78-82.
70. Oji Y, Miyoshi S, Maeda H, Hayashi S, Tamaki H, Nakatsuka S, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int J Cancer* 2002;100:297-303.
71. Ueda T, Oji Y, Naka N, Nakano Y, Takahashi E, Koga S, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in human bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer Sci* 2003;94:271-6.
72. Miwa H, Beran M, Saunders GF. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia* 1992;6:405-9.
73. Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, Kimura T, Sakabe H, Oka Y, et al. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 1997;89:1405-12.
74. Drakos E, Rassidakis GZ, Tsioli P, Lai R, Jones D, Medeiros LJ. Differential expression of WT1 gene product in non-Hodgkin lymphomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005;13:132-7.
75. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994;84:3071-9.
76. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrozek K, Maharry K, et al. Wilms tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol* 2008;26:4595-602.

77. Virappane P, Gale R, Hills R, Kakkas I, Summers K, Stevens J, et al. Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol* 2008;26:5429-35.
78. King-Underwood L, Pritchard-Jones K. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood* 1998;91:2961-8.
79. Algar EM, Khromykh T, Smith SI, Blackburn DM, Bryson GJ, Smith PJ. A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene* 1996;12:1005-14.
80. Eccles MR, Yun K, Reeve AE, Fidler AE. Comparative in situ hybridization analysis of PAX2, PAX8, and WT1 gene transcription in human fetal kidney and Wilms' tumors. *Am J Pathol* 1995;146:40-5.
81. Madden SL, Cook DM, Morris JF, Gashler A, Sukhatme VP, Rauscher FJ. Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product. *Science* 1991;253:1550-3.
82. Ryan G, Steele-Perkins V, Morris JF, Rauscher FJ, Dressler GR. Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development* 1995;121:867-75.
83. McConnell MJ, Cunliffe HE, Chua LJ, Ward TA, Eccles MR. Differential regulation of the human Wilms tumour suppressor gene (WT1) promoter by two isoforms of PAX2. *Oncogene* 1997;14:2689-700.
84. Bernstein E, Denli AM, Hannon GJ. The rest is silence. *Rna* 2001;7:1509-21.
85. Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.
86. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999;286:950-2.
87. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000;404:293-6.
88. Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001;107:309-21.
89. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 2001;20:6877-88.

90. Manche L, Green SR, Schmedt C, Mathews MB. Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol* 1992;12:5238-48.
91. Sen GC. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:255-81.
92. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
93. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* 2004;10:185-91.
94. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 2004;23:4051-60.
95. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *Embo J* 2005;24:138-48.
96. Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 2004;16:861-5.
97. Dorfler P, Busslinger M. C-terminal activating and inhibitory domains determine the transactivation potential of BSAP (Pax-5), Pax-2 and Pax-8. *Embo J* 1996;15:1971-82.
98. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Bio Spektrum* 2004;10:92-6.
99. Platts AE, Johnson GD, Linnemann AK, Krawetz SA. Real-time PCR quantification using a variable reaction efficiency model. *Anal Biochem* 2008;380:315-22.
100. Nishimoto K, Iijima K, Shirakawa T, Kitagawa K, Satomura K, Nakamura H, et al. PAX2 gene mutation in a family with isolated renal hypoplasia. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1769-72.
101. Porteous S, Torban E, Cho NP, Cunliffe H, Chua L, McNoe L, et al. Primary renal hypoplasia in humans and mice with PAX2 mutations: evidence of increased apoptosis in fetal kidneys of Pax2(1Neu) +/- mutant mice. *Hum Mol Genet* 2000;9:1-11.
102. Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe LA, Ward TA, Pierpont ME, Sullivan MJ, et al. Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet* 1995;9:358-64.
103. Shim HH, Nakamura BN, Cantor RM, Schimmenti LA. Identification of two single nucleotide polymorphisms in exon 8 of PAX2. *Mol Genet Metab* 1999;68:507-10.
104. Eccles MR. The role of PAX2 in normal and abnormal development of the urinary tract. *Pediatr Nephrol* 1998;12:712-20.
105. Stoykova A, Gruss P. Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 1994;14:1395-412.

106. Cai Q, Dmitrieva NI, Ferraris JD, Brooks HL, van Balkom BW, Burg M. Pax2 expression occurs in renal medullary epithelial cells in vivo and in cell culture, is osmoregulated, and promotes osmotic tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:503-8.
107. Ertel A, Verghese A, Byers SW, Ochs M, Tozeren A. Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Mol Cancer* 2006;5:55.
108. Baguley BC, Marshall ES. In vitro modelling of human tumour behaviour in drug discovery programmes. *Eur J Cancer* 2004;40:794-801.
109. Sandberg E, Ernberg, I. Assessment of tumour characteristic gene expression in cell lines using a tissue similarity index (TSI). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:252-7.
110. Renshaw J, King-Underwood L, Pritchard-Jones K. Differential splicing of exon 5 of the Wilms tumour (WT1) gene. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;19:256-66.
111. Siehl JM, Reinwald M, Heufelder K, Menssen HD, Keilholz U, Thiel E. Expression of Wilms' tumor gene 1 at different stages of acute myeloid leukemia and analysis of its major splice variants. *Ann Hematol* 2004;83:745-50.
112. Englert C, Hou X, Maheswaran S, Bennett P, Ngwu C, Re GG, et al. WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *Embo J* 1995;14:4662-75.
113. Kudoh T, Ishidate T, Moriyama M, Toyoshima K, Akiyama T. G1 phase arrest induced by Wilms tumor protein WT1 is abrogated by cyclin/CDK complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4517-21.
114. Wang ZY, Qiu QQ, Huang J, Gurrieri M, Deuel TF. Products of alternatively spliced transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene, wt1, have altered DNA binding specificity and regulate transcription in different ways. *Oncogene* 1995;10:415-22.
115. Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, et al. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 1995;81:391-401.
116. Menke A, Shvarts A, Riteco N, van Ham RC, van der Eb AJ, Jochemsen AG. Wilms' tumor 1-KTS isoforms induce p53-independent apoptosis that can be partially rescued by expression of the epidermal growth factor receptor or the insulin receptor. *Cancer Res* 1997;57:1353-63.
117. Little M, Holmes G, Bickmore W, van Heyningen V, Hastie N, Wainwright B. DNA binding capacity of the WT1 protein is abolished by Denys-Drash syndrome WT1 point mutations. *Hum Mol Genet* 1995;4:351-8.

118. King-Underwood L, Renshaw J, Pritchard-Jones K. Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. *Blood* 1996;87:2171-9.
119. Little SE, Hanks SP, King-Underwood L, Jones C, Rapley EA, Rahman N, et al. Frequency and heritability of WT1 mutations in nonsyndromic Wilms' tumor patients: a UK Children's Cancer Study Group Study. *J Clin Oncol* 2004;22:4140-6.
120. Regev M, Kirk R, Mashevich M, Bistrizter Z, Reish O. Vertical transmission of a mutation in exon 1 of the WT1 gene: lessons for genetic counseling. *Am J Med Genet A* 2008;146A:2332-6.
121. Jeanpierre C, Denamur E, Henry I, Cabanis MO, Luce S, Cecille A, et al. Identification of constitutional WT1 mutations, in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database. *Am J Hum Genet* 1998;62:824-33.
122. Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1757-66.
123. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550-3.
124. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002;16:948-58.
125. Stegmeier F, Hu G, Rickles RJ, Hannon GJ, Elledge SJ. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13212-7.
126. Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 2003;34:263-4.
127. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003;21:635-7.
128. Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet* 2004;5:355-65.
129. Gopalakrishnan B, Wolff J. siRNA and DNA transfer to cultured cells. *Methods Mol Biol* 2009;480:31-52.
130. Miki D, Itoh R, Shimamoto K. RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiol* 2005;138:1903-13.
131. Chu CY, Rana TM. Potent RNAi by short RNA triggers. *Rna* 2008;14:1714-9.

132. Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, et al. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim* 2005;33:261-87.
133. Kiss-Toth E, Dower SK, Sayers JR. A method for enhancing the transfection efficiency of minipreps obtained from plasmid cDNA libraries. *Anal Biochem* 2001;288:230-2.
134. Walters DK, Jelinek DF. The effectiveness of double-stranded short inhibitory RNAs (siRNAs) may depend on the method of transfection. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002;12:411-8.
135. Scherr M, Steinmann D, Eder M. RNA interference (RNAi) in hematology. *Ann Hematol* 2004;83:1-8.
136. Pancoska P, Moravek Z, Moll UM. Efficient RNA interference depends on global context of the target sequence: quantitative analysis of silencing efficiency using Eulerian graph representation of siRNA. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1469-79.
137. Curradi M, Izzo A, Badaracco G, Landsberger N. Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol Cell Biol* 2002;22:3157-73.

7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8 Danksagung

Folgenden Personen möchte ich für ihre Unterstützung danken:

Herrn Professor Dr. med. Ulrich Keilholz

Frau Dr. med. Antonia Busse

Frau Dipl.-Ing. Anika Rietz

Herrn Dr. med. Alberto Fusi

Herrn Dr. med. Sebastian Ochsenreither

9 Erklärung

Ich, Manuel Unz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Rolle der PAX2-Splicevarianten in Lymphomen und soliden Tumoren“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 17. Februar 2009

Manuel Unz