

7. Zusammenfassung

Transfinanzierte Zellarrays (TCA) stellen eine stabile Plattform für die funktionelle Hochdurchsatz-Analyse von Genen und Proteinen mit lebenden Zellen dar. Auf Zellarrays werden große Sets von Nukleinsäuren temporär auf Glasträgern immobilisiert, gefolgt von der simultanen Transfektion in die darüber wachsenden, adhärenen Zellen. Es resultieren lokale Transfektionspunkte inmitten eines "Rasens" nichttransfizierter Zellen. Die Weiterentwicklung der TCA-Technik erfordert zugleich die Etablierung effektiver biologischer Auslese-Verfahren für Zellarrays. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Ansätze für die Zellarray-basierte subzelluläre Kolokalisation und zur Apoptose-Detektion zur hochdurchsatzartigen Genfunktions-Annotation zu etablieren.

In dieser Arbeit wurde die TCA-Technologie erstmalig zur subzellulären Lokalisation von Proteinen des menschlichen Chromosoms 21 (Chr21) angewandt. Offene Leseraster (ORFs) von 89 Chr21-Proteinen wurden in einen Säuger-Expressionisvektor kloniert, der einen 6-Histidin-Tag am Aminoterminus der Inserts einfügt. All diese Konstrukte wurden punktweise auf Glas-Objektträgern aufgebracht und zur Proteinexpression revers in HEK293T-Zellen transfiziert. Zur gleichzeitigen Markierung aller Testproteine wurden Anti-Histidin-Antikörper verwendet. Für eine präzise subzelluläre Lokalisationsbestimmung wurden organellspezifische Marker eingeführt, um bis zu 9 zelluläre Kompartimente zu identifizieren: ER, Golgi-Apparat, Mitochondrium, Lysosom, Peroxisom und Strukturen des Zytoskeletts. Insgesamt konnte die Lokalisation von 52 Chr21-Proteinen bestimmt werden, für 34 von ihnen durch die vorliegende Arbeit erstmalig.

Weiterhin wurden das intrazelluläre "Trafficking" mehrerer Chr21-Proteine sowie morphologische Veränderungen durch Überexpression der zugrundeliegenden ORFs dokumentiert. Die experimentell erhaltenen Lokalisationsdaten wurden verglichen mit computergestützten Vorhersagen, unter Zuhilfenahme von vier verschiedenen Programmen. Die Leistungsfähigkeit der theoretischen Vorhersagen variierte stark auf der Grundlage der Verwendung unterschiedlicher biologischer Information und mathematischer Modelle.

Außerdem wurde die TCA-basierte Apoptose-Detektion etabliert, um den durch Überexpression mehrerer Chr21-ORFs ausgelösten Zelltod zu charakterisieren. Es wurden verschiedene Apoptose-Assays parallel verwendet mit der Zielsetzung, den

Mechanismus der Apoptose-Induktion aufzudecken. Die einzelnen morphologischen Veränderungen durch Überexpression von Claudin-14 und Claudin-8 waren positiv für Annexin-V-Bindung und TUNEL-Reaktion, was auf einen Verlust der Plasmamembran-Asymmetrie und auf unvollständige nukleäre Fragmentierung der absterbenden Zellen hindeutete. Der negative Ausfall von Caspase-Spaltungsassays sowie das Ausbleiben typischer Apoptose-Phänotypen suggerierte einen nichtprogrammierten Zelltod infolge der Claudin-Überexpression in beiden Fällen.

Schließlich wurde die TCA-basierte Apoptose-Detektion im Zusammenhang mit siRNA-induziertem (small interfering RNA) Zelltod angewandt, um Gene mit Apoptose-Suppressorfunktion zu identifizieren. Durch Kombination der verschiedenen Assays wurde die Detektionssensitivität erhöht, denn so konnten Apoptose-Signale aus verschiedenen Prozessierungsschritten aufgenommen werden. In einem "Proof-of-Principle"-Test wurde eine kleine Bibliothek von siRNA-Molekülen auf HeLa-Zellarrays durchmustert, wobei die siRNAs gegen die humanen Gene SGTA und Cyclin-B1 klassische Apoptose verursachten.

Zusammengenommen werden die Ergebnisse mit den Chr21-Proteinen beitragen zur Konstruktion eines integrierten funktionellen Netzwerks für Chromosom 21 und könnten hilfreich sein für das molekulare Verständnis der Pathologie von Krankheiten wie dem Down-Syndrom, die mit diesem Chromosom in Zusammenhang stehen. Weiterhin belegt die erfolgreiche Anwendung der TCA-Technik in dieser Arbeit den Ansatz, auf diese Weise eine große Anzahl von Genen auf Einzelzellbasis und kosteneffizient funktionell zu evaluieren.