

Aus dem Institut für Humangenetik, Fachbereich Humanmedizin,
dem Graduiertenkolleg „Biochemie von Nukleoproteinkomplexen“
und dem Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Identifizierung von Genen, die durch
fibroblast growth factor receptor 2
(FGFR2) reguliert werden**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der naturwissenschaftlichen Fachbereiche
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt im März 2001
von Diplom-Biologe Andreas Wagner

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 1997 bis März 2001 am Institut für Humangenetik im Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Ulrich Müller angefertigt. Die Betreuung der Arbeit im Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften wurde von Herrn Prof. Dr. Rainer Renkawitz aus dem Institut für Genetik übernommen.

Die Dissertation erfolgte im Rahmen des Graduiertenkollegs „Biochemie von Nukleoproteinkomplexen“.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Rainer Renkawitz
Institut für Genetik
Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Müller
Institut für Humangenetik
Fachbereich Humanmedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	FGF-Rezeptoren	1
1.1.1	Struktur der FGF-Rezeptoren	2
1.1.2	Verschiedene Spleissformen von FGF-Rezeptoren	3
1.2	Signaltransduktion durch FGF-Rezeptoren	5
1.2.1	Mechanismus der Rezeptoraktivierung	5
1.2.2	Interaktionspartner von aktivierten FGF-Rezeptoren.....	6
1.3	Funktionen der FGF-Rezeptoren bei physiologischen Prozessen	8
1.3.1	FGF-Rezeptoren und dysproportionierter Minderwuchs	9
1.3.2	FGF-Rezeptoren und autosomal-dominante Craniosynostose-Syndrome	9
1.3.2.1	Craniosynostosen.....	9
1.3.2.2	FGFR-Mutationen bei autosomal-dominanten Craniosynostose- Syndromen.....	11
1.3.2.3	FGFR2-Expression in Schädelnähten	14
1.4	Zielsetzung der Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Material	16
2.1.1	Lösungen.....	16
2.1.2	Puffer	17
2.1.3	Kits	18
2.1.4	Enzyme.....	18
2.1.5	Medien und Nährböden	18
2.1.6	Nukleotide	18
2.1.7	Nährmedien und Lösungen für die Gewebekultur	18
2.1.8	Chemikalien	19
2.1.9	Desoxyribonukleinsäuren.....	20

2.1.10	Größenmarker für die Gelelektrophorese	20
2.1.11	Zelllinien.....	20
2.1.12	Antikörper.....	21
2.1.13	Sonstige Materialien.....	21
2.1.14	Oligonukleotide.....	21
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Arbeiten mit Zellkulturen.....	24
2.2.1.1	Kultivierung und Passagieren von L6 Rattenmyoblasten.....	24
2.2.1.2	Auftauen und Einfrieren von L6-Zellen.....	25
2.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	25
2.2.1.4	Einführen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen (Transfektion).....	26
2.2.1.5	Subklonierung transfizierter L6-Zellen.....	27
2.2.1.6	Behandlung der L6-Zellen mit FGF2 und Heparin.....	28
2.2.1.7	Doppelfärbung von Zellen mit Hämalaun-Eosin für Übersichtspräparate	28
2.2.2	Differential Display von mRNA durch PCR.....	28
2.2.2.1	Einführung in Differential Display-RT-PCR	28
2.2.2.2	Experimenteller Ablauf	31
2.2.2.2.1	DNaseI-Behandlung von Gesamt-RNA.....	32
2.2.2.2.2	Reverse Transkription.....	33
2.2.2.2.3	PCR.....	34
2.2.2.2.4	Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie.....	35
2.2.2.2.5	Elution differentieller Banden aus dem Polyacrylamidgel	35
2.2.2.2.6	Reamplifizierung der Eluate	36
2.2.3	Hybridisierungsanalysen an cDNA-Arrays.....	36
2.2.3.1	Übersicht über den Versuchsablauf und Prinzip des Verfahrens	37
2.2.4	Arbeiten mit DNA	38
2.2.4.1	DNA-Sequenzierung	38
2.2.4.1.1	Plasmidsequenzierung	39
2.2.4.1.2	Direkte Sequenzierung von PCR-Produkten.....	41
2.2.4.2	Auftrennung von DNA-Molekülen durch Agarose-Gel-Elektrophorese	42
2.2.4.2.1	Herstellung von Agarosegelen.....	42
2.2.4.2.2	Probenvorbereitung und Durchführung der Elektrophorese	43
2.2.4.3	Reinigung von DNA-Fragmenten über Extraktion aus Agarosegelen..	43

2.2.4.4	DNA-Präzipitation.....	43
2.2.4.5	Restriktionsenzymspaltung	44
2.2.4.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.2.4.7	Phenol/Chloroformextraktion von DNA	45
2.2.4.8	Photometrische DNA- und RNA-Mengenbestimmung	46
2.2.4.9	Isolierung von Plasmid-DNA.....	46
2.2.4.9.1	Minipräparation.....	47
2.2.4.9.2	Midipräparation.....	47
2.2.5	Arbeiten mit RNA	48
2.2.5.1	Isolation der Gesamt-RNA aus Säugerzellen.....	49
2.2.5.2	Präparation von Poly(A)+-RNA aus Gesamt-RNA.....	50
2.2.5.3	Northern Blot-Analyse	50
2.2.5.3.1	Auftrennung von RNA in formaldehydhaltigen Agarosegelen.....	50
2.2.5.3.2	Northern Blot.....	51
2.2.5.3.3	Radioaktive Markierung von DNA-Proben.....	51
2.2.5.3.4	Reinigung radioaktiv markierter DNA-Proben.....	52
2.2.5.3.5	Hybridisierung von RNA auf Northern Transfermembranen mit radioaktiv markierten DNA-Proben.....	52
2.2.6	Klonierungen in Bakterienzellen.....	53
2.2.6.1	Vorbereitung der DNA und Ligation	54
2.2.6.2	Vorbereitung der Agarplatten	54
2.2.6.3	Transformation kompetenter E.coli-Zellen und Ausplattierung	55
2.2.6.4	Untersuchung der erhaltenen Klone	55
2.2.7	Arbeiten mit Proteinen.....	56
2.2.7.1	Proteinisolation mit RIPA-Puffer	56
2.2.7.2	Präparation von Plasmamembranen durch diskontinuierliche Gradientenzentrifugation.....	56
2.2.7.3	Bestimmung der Proteinmenge	57
2.2.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	57
2.2.7.4.1	Anfertigung eines Gels	58
2.2.7.4.2	Färben von SDS-Polyacrylamidgelen nach der Elektrophorese.....	58
2.2.7.5	Western-Blot	59

3	ERGEBNISSE	60
3.1	Vorbemerkungen zu den experimentellen Ansätzen	60
3.2	Herstellung von FGFR2-exprimierenden L6-Zellen	61
3.3	Differential Display RT-PCR Analysen an BEK26-Zellen zur Identifizierung FGFR2-regulierter Gene.....	66
3.3.1	Übersicht.....	66
3.3.2	Im Differential Display war trotz Durchführung unabhängiger Doppelansätze die Anzahl falsch positiver Ergebnisse hoch.....	67
3.3.3	Die mitochondriale 16S-rRNA war nach FGF2-Behandlung von BEK26- Zellen stärker fragmentiert	69
3.3.4	Nach FGF2-Behandlung der BEK26-Zellen war die verstärkte Expression eines unbekanntes Gens detektierbar	71
3.4	Hybridisierungsanalysen an cDNA-Arrays zur Identifizierung von durch FGFR2 regulierten Genen	74
3.4.1	Übersicht.....	74
3.4.2	Anordnung von Sequenzgruppen auf den ATLAS RAT 1.2 cDNA Expressionsarrays	75
3.4.3	Hybridisierungen der cDNA-Expressionsarrays	78
3.4.4	Northern Blot-Analysen zur Untersuchung der differentiellen Expression von Kandidatengenen aus den Array-Hybridisierungen.....	85
3.4.5	Die über das Array-System detektierte differentielle Expression von TA1 und Fyn ist nicht auf die FGFR2-Aktivierung zurückzuführen	91
3.4.5.1	Untersuchung des Expressionsmusters von TA1 und Fyn nach unterschiedlichen FGF2-Inkubationszeiten in WT26-Zellen	91
3.4.5.2	Expressionsunterschiede des TA1-und Fyn-Gens innerhalb einer FGF2-Inkubationsdauer sind auch in L6-Zellen detektierbar, die keinen FGFR2 exprimieren	94
3.5	Untersuchung von weiteren Genen auf eine FGFR2-abhängige Regulation.....	97
3.5.1	Nach FGF2-Behandlung von WT26-Zellen war die Expression des Transkriptionsfaktors MyoD vermindert	98

3.5.1.1	Die MyoD-Repression in WT26-Zellen lässt sich nicht auf FGFR2 zurückführen	99
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	100
4	DISKUSSION	103
4.1	Differential Display-Analysen: Die Fragmentierung der mt16S-rRNA und eine Einschätzung der Technik	104
4.2	Befunde aus den cDNA-Array-Analysen	107
4.3	Einschätzung des cDNA-Array-Systems und der Eignung der L6-Rattenmyoblasten zur Identifizierung FGFR2-regulierter Gene	109
4.4	Einschätzung des in dieser Arbeit gewählten experimentellen Ansatzes zur Identifizierung FGFR2-regulierter Gene und mögliche Alternativen	111
4.5	Schlussfolgerungen	112
5	ZUSAMMENFASSUNG	114
6	LITERATURVERZEICHNIS	116
7	ANHANG	126
	Abkürzungsverzeichnis	126
	Allgemeine Abkürzungen	126
	Aminosäuren	128
	Basen und Nukleotide	128
	Komponenten und Akronyme der Signaltransduktion	129
	Danksagung	130

1 Einleitung

Zellen modulieren ihre Aktivitäten in Antwort auf Signale in ihrer Umgebung. In vielzelligen Organismen besteht die Notwendigkeit, diese Aktivitäten mit denen von Nachbarzellen zu koordinieren, was zur Evolution komplexer Signalwege geführt hat. Die Signale werden vermittelt über kleine Moleküle. Häufig sind dies Peptide, die durch spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche erkannt werden. Die Rezeptoren übertragen (transduzieren) das Signal in das Zellinnere und setzen dort eine Reaktionskaskade in Gang, die oft eine veränderte Regulation verschiedener Gene bewirkt und schließlich zu einer zellulären Antwort führt. Einige dieser Rezeptoren besitzen in ihrem intrazellulären Anteil intrinsische Protein-Tyrosinkinaseaktivität. Sie übertragen Phosphatreste von ATP auf die Tyrosinreste von Zielproteinen im Zellinnern und regulieren damit deren Aktivität. Zu dieser Klasse der Rezeptor-Protein-Tyrosinkinasen (RPTKs) gehören auch die Rezeptoren für *fibroblast growth factors* (FGF-Rezeptoren, FGFRs). Mutationen in RPTKs können die von ihnen kontrollierten Reaktionskaskaden im Zellinnern dramatisch beeinflussen. Dies kann schwerwiegende Konsequenzen für die Zelle und den gesamten Organismus haben.

1.1 FGF-Rezeptoren

Der erste im Detail charakterisierte FGF-Rezeptor (FGFR1) wurde 1989 aus Hühnerembryonen isoliert (Lee et al. 1989). Kurz darauf folgte die Identifizierung der Gene für 3 weitere FGFRs, die, in der Reihenfolge ihrer Entdeckung, als FGFR2 (Dionne et al. 1990), FGFR3 (Keegan et al. 1991) und FGFR4 (Partanen et al. 1991) bezeichnet werden. Die von diesen vier Genen codierten Proteine sind strukturell einander sehr ähnlich und in ihrer Aminosäuresequenz hoch konserviert. FGFRs sind hochaffine Rezeptoren für *fibroblast growth factors* (FGFs). FGFs bilden eine Familie von Polypeptid-Mitogenen, deren Bezeichnung sich dadurch erklärt, dass die ersten charakterisierten FGFs (FGF1 und FGF2) aufgrund ihrer mitogenen Wirkung auf Fibroblasten gereinigt worden waren (z.B. Armelin 1973). Inzwischen sind 22 verschiedene FGFs bekannt (Kato & Sekine 1999). Die einzelnen FGFs binden an die

vier bekannten FGF-Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität. Außerdem exprimieren Zellen meist eine große Zahl niedrigaffiner unspezifischer Bindungsstellen für FGFs. Es handelt sich dabei um Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) (Bashkin et al. 1989). HSPGs sind Proteine, die mit der Zellmembran assoziiert sind oder in der extrazellulären Matrix liegen. Ihre Kohlenhydratseitenketten sind sulfatiert und carboxyliert und daher stark negativ geladen. HSPGs spielen eine wesentliche Rolle bei der FGF-FGFR-Interaktion (Yayon et al. 1991): Sie vermitteln und potenzieren die Bindung von FGFs an FGFRs (Yayon et al. 1991, Kan et al. 1993).

1.1.1 Struktur der FGF-Rezeptoren

In Abbildung 1.1 ist ein Schema der FGFR-Struktur dargestellt.

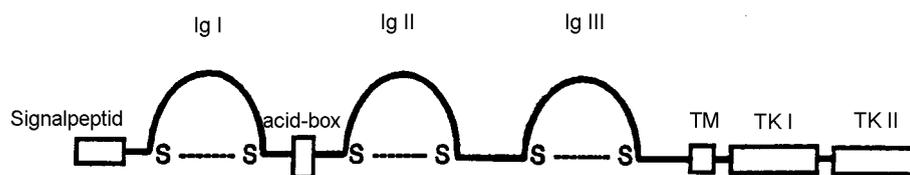


Abbildung 1.1: Schema der Struktur von FGF-Rezeptoren. Ig I, -II und -III: Immunglobulinähnliche Domänen I, -II und -III. TM: Transmembrandomäne; TK1 und TK2: Tyrosinkinasedomänen 1 und 2.

Das N-terminal gelegene Signalpeptid leitet das Molekül zur Zellmembran. Die Immunglobulin-ähnlichen Domänen Ig I, Ig II und Ig III werden durch Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten stabilisiert. Die Ig II- und Ig III-Domänen sind für die Ligandenbindung verantwortlich. Zwischen der Ig I- und Ig II-Domäne befindet sich eine Folge von sauren Aminosäuren (AS), die die nur bei FGFRs vorkommende „acid box“ bilden. Bei FGFR1 sind dies 8 aufeinanderfolgende AS, bei FGFR2 6 von 7 AS, bei FGFR3 7 von 8 AS und bei FGFR4 5 von 7 AS (Johnson & Williams 1993). Die Transmembrandomäne besteht aus einer Folge von etwa 20 hydrophoben Aminosäuren und verankert das Protein in der Zellmembran. Die Kinase-Domäne im intrazellulären Anteil des Rezeptors wird durch die Insertion von 14 Aminosäuren in zwei Bereiche

geteilt. Die humanen FGFR-Proteine bestehen aus 822 (FGFR1), 821 (FGFR2), 806 (FGFR3) und 802 (FGFR4) Aminosäuren. Die molekulare Masse der FGFRs beträgt vor der Glykosylierung 90-92 kDa (Johnson & Williams 1993).

Die Kinasedomänen 1 und 2 sind die am stärksten konservierten Bereiche eines Rezeptortyps zwischen verschiedenen Spezies als auch zwischen den 4 FGFRs einer Spezies (z.B. 92% und 95% zwischen Mensch und *Xenopus* bei FGFR1 bzw. 75% und 84% zwischen den humanen Proteinen FGFR1 und FGFR4). Am schwächsten konserviert sind das Signalpeptid, die IgI-Domäne, die Transmembrandomäne und die Kinaseinsert-Domäne (Johnson & Williams 1993).

1.1.2 Verschiedene Spleissformen von FGF-Rezeptoren

Von FGFR1 und FGFR2 (Abbildung 1.2) sowie FGFR3 wurden verschiedene cDNAs isoliert, die eigene Rezeptorvarianten codieren. Studien zur Organisation der FGFR-Gene legten nahe, dass die Rezeptorvarianten durch alternatives Spleissen generiert werden (Johnson & Williams 1993). Bei FGFR1 und FGFR2 treten Formen ohne die IgI-Domäne auf, was aber bei beiden Rezeptoren die Affinität zu FGF1 und FGF2 nicht verändert (Johnson et al. 1990, Dionne et al. 1990). Von FGFR1 sind zwei lösliche, nicht membrangebundene Formen bekannt (Johnson et al. 1990, Eisemann et al. 1991).

Funktionell von besonderer Bedeutung ist das alternative Spleissen von Exons, die die C-terminale Hälfte der IgIII-Domäne codieren. Im FGFR1-Gen befinden sich für diesen Proteinbereich 3 Exons (Johnson et al. 1991), im FGFR2-Gen 2 Exons (Johnson et al. 1991) und im FGFR3-Gen ebenfalls 2 Exons (Murgue et al. 1994, Chellaiah et al. 1994). Die von ihnen codierten IgIII-Domänen werden als IgIIIa (nur bei einer löslichen FGFR1-Variante), IgIIIb und IgIIIc bezeichnet. Die Spezifität der Ligandenbindung wird vornehmlich durch die IgIII-Domäne determiniert. So bindet beispielsweise die FGFR2IIIb-Variante (KGFR, *keratinocyte growth factor receptor*) mit hoher Affinität FGF1 und FGF7 (KGF) und nur schwach FGF2 (Miki et al. 1991), während die FGFR2IIIc-Variante (BEK, *bacterially expressed kinase*) zu FGF1 und FGF2 eine höhere Affinität hat als zu FGF7 (Dionne et al. 1990).

Von FGFR4 sind keine Spleissvarianten bekannt. Die Analyse der genomischen Struktur des humanen FGFR4-Gens zeigte, dass für den C-terminalen Bereich der

IgIII-Domäne nur 1 Exon vorhanden ist (Kostrzewa und Müller 1998). Der Homologievergleich dieses Exons mit den Exons der FGFR-Gene 1-3, die für die IgIII-Domäne codieren, legt nahe, dass FGFR4 ausschließlich als IgIIIc-Form exprimiert wird.

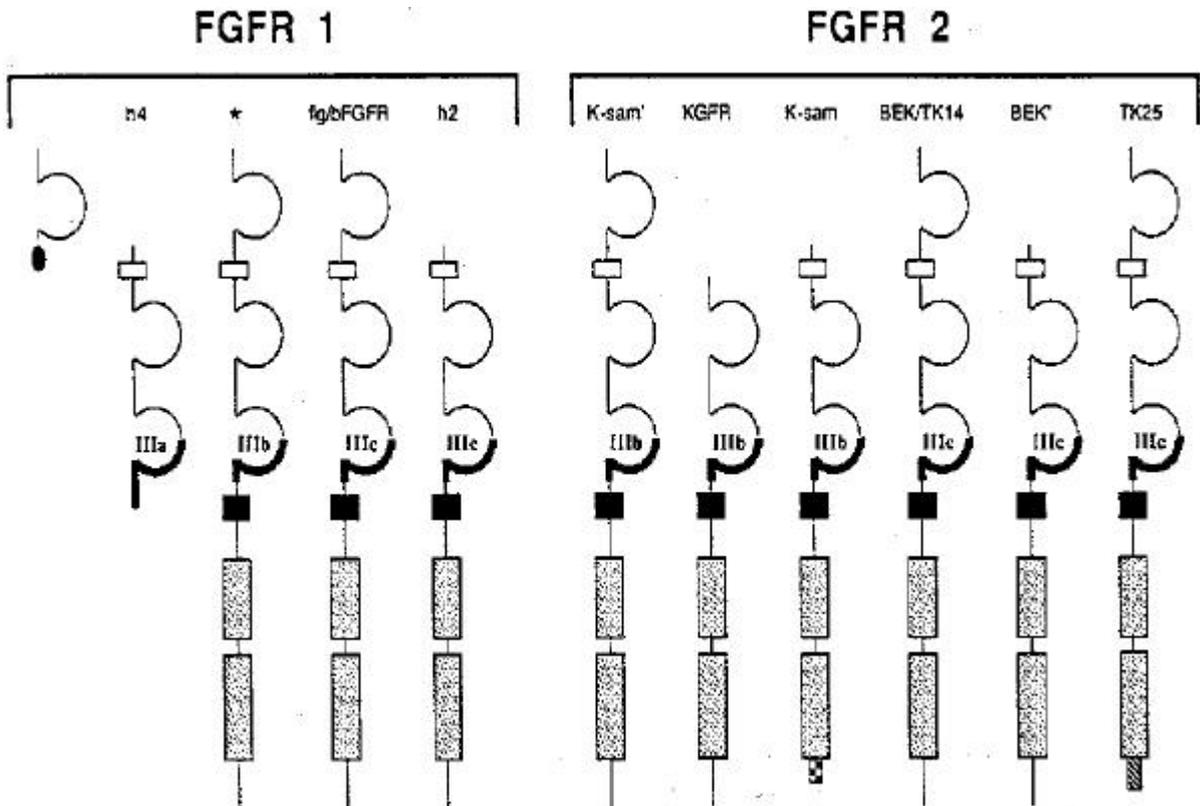


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung von FGFR1- und FGFR2-Spleissvarianten. Zur Primärstruktur siehe auch Abb. 1.1. Oberhalb der Strukturen sind die Namen einiger Rezeptorvarianten angegeben, wie sie in der Literatur auftauchen. Nach: Johnson and Williams (1993).

Sowohl die Spleissvarianten der FGFRs als auch die FGFRs 1-4 selbst zeigen ein zell- und gewebsspezifisches Expressionsmuster. Studien an Mausgeweben von Werner et al. (1992) demonstrierten eine Expression der IgIIIc-Variante von FGFR1 in nahezu allen Geweben mit Ausnahme der Leber und eine eher lokale Expression der IgIIIa- (Gehirn, Skelettmuskel und Haut) und IgIIIb-Varianten (vor allem in der Haut, daneben auch im Gehirn, der Niere und der Placenta). Orr-Urtreger et al. beschrieben 1993 die differentielle Expression der IgIIIb- und IgIIIc-Varianten von FGFR2 (KGFR und BEK) in embryonalen Mausgeweben. Demnach wird KGFR in der Haut und seinen Derivaten exprimiert, hingegen BEK in mesenchymalen Geweben. Letzteres weist auf die besondere Funktion der BEK-Variante in der Osteogenese hin (Orr-Urtreger et al. 1993). Kommt es zur simultanen Expression der

3 IgIII-Varianten in Zelllinien oder Geweben, dann wird die IgIIIc-Variante am stärksten exprimiert (Johnson et al. 1991, Werner et al. 1992).

Hinsichtlich der gewebsspezifischen Ausprägung der verschiedenen FGFR-Gene zeigen FGFR1 und FGFR2 ein breites, aber leicht voneinander abweichendes Expressionsmuster. Im Embryo finden sich FGFR1-Transkripte im Gehirn und in mesenchymalen Geweben, FGFR2-Transkripte im Gehirn und epithelialen Geweben (Peters et al. 1992). FGFR3 und FGFR4 zeigen ein begrenzteres Expressionsmuster. FGFR3 wird in Gehirn, Rückenmark und in Knorpelresten von sich entwickelnden Knochen (Peters et al. 1993) und FGFR4 im sich entwickelnden Endoderm und den Myotomen von Somiten exprimiert (Stark et al. 1991).

Aus dem bisher Gesagten geht hervor, dass mehrere Faktoren zur Komplexität des FGF-FGFR-Systems beitragen und es Zellen und Geweben dadurch möglich ist, sehr vielseitig und äußerst fein differenziert auf FGF-Signale zu reagieren. Dabei handelt es sich um die Existenz und unterschiedliche Expression von FGFR-Varianten, jede mit eigenen distinkten Ligandenbindungsspezifitäten für nur bestimmte FGFs, um die Verfügbarkeit dieser FGFs im Extrazellulärraum und um das Expressionsmuster der als Corezeptoren wirkenden Heparansulfatproteoglykane (HSPGs).

1.2 Signaltransduktion durch FGF-Rezeptoren

1.2.1 Mechanismus der Rezeptoraktivierung

Die Signaltransduktion wird bei Rezeptor-Tyrosinkinase durch Bindung des Ligandenmoleküls an den Rezeptor initiiert. Dies hat eine Dimerisierung von zwei Rezeptormonomeren zur Folge und bewirkt so eine Aktivierung des Rezeptors (Heldin 1995). Bei FGFRs wird die FGF-Bindung und Dimerisierung über HSPGs (Kan et al. 1993) vermittelt. Die Dimerisierung kann bei FGFRs zwischen Rezeptoren des gleichen oder zwischen Rezeptoren verschiedenen Subtyps erfolgen (Bellot et al. 1991). Sie induziert Konformationsänderungen in den cytoplasmatischen Bereichen der Rezeptormonomere, wodurch die Kinase-Domänen aktiviert werden (Keating et al. 1988). Die beiden Monomere phosphorylieren sich daraufhin gegenseitig an

spezifischen Tyrosin-Resten (Heldin et al. 1995) und interagieren über diese schließlich mit zahlreichen cytoplasmatischen Proteinen.

1.2.2 Interaktionspartner von aktivierten FGF-Rezeptoren

Phosphorylierte Tyrosine sind Bindestellen für Proteine mit SH2-Domänen (*src homology domain 2*). SH2-Domänen bestehen aus 100 Aminosäuren und sind in verschiedenen Enzymen wie Phospholipase C γ (PLC γ), cytoplasmatischen Tyrosinkinasen wie *sarcoma* (SRC), Lipidkinasen wie der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und Protein-Tyrosinphosphatasen wie der *src homology phosphatase-2* (SHP-2), in Adaptermolekülen ohne enzymatische Aktivität wie dem *growth factor receptor bound protein 2* (GRB2) oder in Transkriptionsfaktoren wie dem *signal transducer and activator of transcription 1* vorhanden (STAT1) (Klint & Claesson-Welsh 1999). Die Spezifität der Interaktion einer SH2-Domäne mit einem phosphorylierten Tyrosin (P-Tyr) wird durch 3-6 Aminosäuren C-terminal des P-Tyr determiniert (Zhou & Cantley 1995).

Die Bindung eines SH2-Proteins an das Phosphotyrosin eines Rezeptors hat mehrere, sich gegenseitig nicht notwendigerweise ausschließende Konsequenzen: Das SH2-Protein wird durch den Rezeptor an Tyrosinresten phosphoryliert und damit aktiviert (z.B. PLC γ , siehe unten), die Bindung bewirkt eine Konformationsänderung und damit eine Aktivierung (z.B. PI3-Kinase) oder die Bindung von Adapterproteinen bringt die Komponenten einer Reaktionskaskade in unmittelbare räumliche Nachbarschaft zueinander (GRB2-SOS-RAS-Signalweg, siehe unten) (van der Geer et al. 1993). Zu den gut gesicherten FGFR-regulierten Signalwegen in der Zelle gehören die über Phospholipase C γ (PLC γ) und *rat sarcoma* (RAS). Sie werden daher kurz beispielhaft für die weiteren Ereignisse bei der Signaltransduktion dargestellt (Abbildung 1.3).

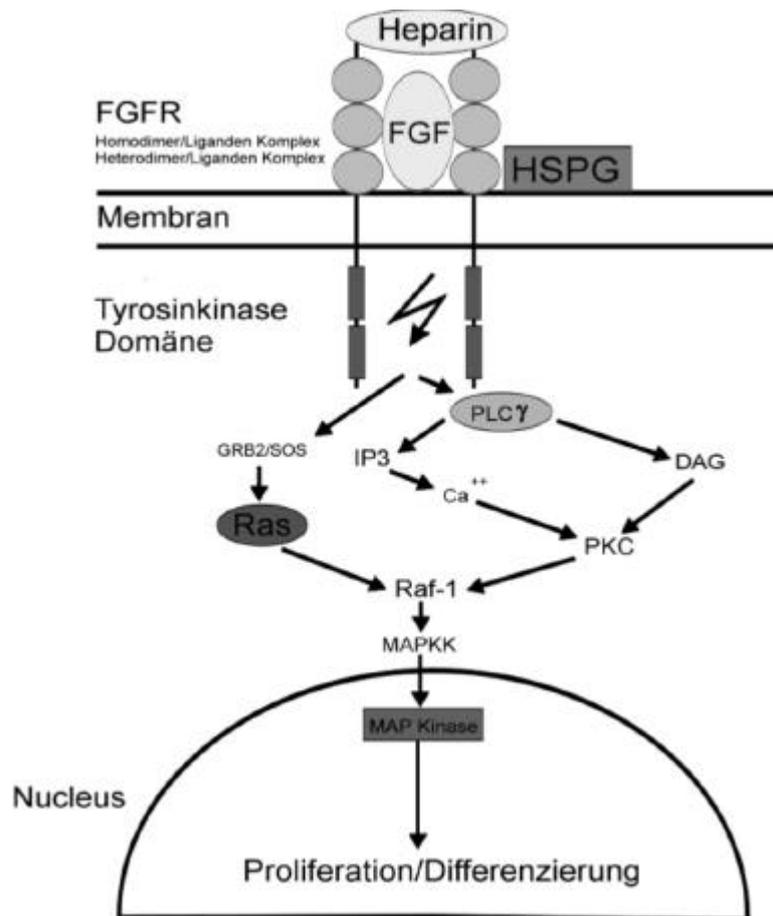


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der von FGF-Rezeptoren aktivierten Signalwege in der Zelle. Zur Erklärung siehe Text. Die Abkürzungen bedeuten: DAG-Diacylglycerin; FGF-fibroblast growth factor; FGFR-fibroblast growth factor receptor; GRB2-growth factor receptor bound protein 2; HSPG-Heparansulfatproteoglykan; IP3-Inositoltrisphosphat; MAPKK-mitogen activated protein kinase kinase; PKC-Proteinkinase C; PLCγ-Phospholipase Cγ; Raf-rat fibroma; RAS-rat sarcoma; SOS-son of sevenless.

PLC γ bindet an P-Tyr von FGFRs und wird daraufhin selbst an Tyrosinen phosphoryliert (Klint & Claesson-Welsh 1999). Die dadurch erfolgte Aktivierung von PLC γ führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat zu Inositoltrisphosphat (InsP3) und Diacylglycerin. Während InsP3 Ca²⁺ aus cytoplasmatischen Speicherkomponenten freisetzt (Berridge 1993), aktivieren Diacylglycerin und Ca²⁺ Proteinkinasen C (PKCs). PKCs aktivieren durch Phosphorylierung *mitogen activated protein-kinases* (MAP-Kinasen). Aktivierte MAP-Kinasen werden in den Zellkern transloziert und regulieren durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren (van der Geer 1993).

FGFRs aktivieren den Signalweg über das GTP-bindende Protein RAS (*rat sarcoma*) über das Adapterprotein *FGF-receptor substrate 2* (FRS2) (Kouhara et al. 1997).

FRS2 hat statt einer SH2- eine sogenannte Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB) mit vergleichbarer Funktion (Kouhara et al. 1997). An FRS2 bindet der weitere Adapter GRB2, der konstitutiv mit dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor *son of sevenless* (SOS) verbunden ist. SOS katalysiert den Austausch von GDP gegen GTP an RAS. RAS ist aktiv in seiner GTP-bindenden Form und wirkt aktivierend auf die Serin-Threonin-Kinase *rat fibroma* (RAF), die über Aktivierung von MAP-Kinase-Kinasen (z.B. der *mitogenic and extracellular regulated kinase*, MEK) aktivierend auf MAP-Kinasen einwirkt (van der Geer et al. 1993).

1.3 Funktionen der FGF-Rezeptoren bei physiologischen Prozessen

FGFRs sind potente Regulatoren der Proliferation (Burgess & Maciag 1989), Differenzierung (Lin et al. 1998, Klint et al. 1999) und Migration (Osterhout et al. 1997) von Zellen. Eine zentrale Rolle der FGFRs bei der frühen Embryogenese zeigen Studien an Mäusen mit gezielter Inaktivierung des FGFR1- oder FGFR2-Gens: Der homozygote *Knock-Out* führt zu einer Reihe schwerster Entwicklungsstörungen und zum Teil zum Absterben des Embryos noch vor der Gastrulation (Deng et al. 1994, Arman et al. 1998).

Die Bedeutung von FGF-Rezeptoren bei der Skelettentwicklung ist besonders gut dokumentiert. FGFRs sind sowohl an der Induktion der Extremitätenanlage (FGFR2), an der Regulation des Längenwachstums der Röhrenknochen in den Extremitäten (FGFR3) als auch an der Regulation des Schädelknochenwachstums in den Schädelnähten (FGFR2) beteiligt (Naski & Ornitz 1998). Die zentrale Rolle der FGFRs bei der Skelettentwicklung ist auch daran zu erkennen, dass wenigstens 8 beim Menschen vorkommende autosomal-dominant vererbte Formen von Skelettfehlbildungen bekannt sind, die in Zusammenhang mit Mutationen in FGFR-Genen stehen (4 Formen dysproportionierten Minderwuchses und 4 Craniosynostose-Syndrome).

1.3.1 FGF-Rezeptoren und dysproportionierter Minderwuchs

Das Längenwachstum von Röhrenknochen erfolgt durch Neubildung von Knorpel und anschließender sekundärer Verknöcherung der Epiphysenfuge an den Enden des Röhrenknochens. Die Knorpelbildung erfolgt durch Proliferation von Chondrocyten. Proliferierende Chondrocyten exprimieren FGFR3 (Deng et al. 1996). FGFR3 wirkt dabei wahrscheinlich als Inhibitor der Proliferation (Deng et al. 1996, Colvin et al. 1996), eine Annahme, die durch Befunde der FGFR3-induzierten Expression von Zellzyklusinhibitoren (Su et al. 1997) unterstützt wird.

FGFR3-Mutationen sind assoziiert mit den humanen Minderwuchsformen Achondroplasie (ACH), thanatophorer Dysplasie (TD) I und II und Hypochondroplasie (HCH). Hier liegen Punktmutationen vor, die zu einem Aminosäureaustausch in der Extrazellulärregion (R248C bei TD), in der Transmembrandomäne (G380R bei ACH) oder in der Kinasedomäne (K650E bei TD) des Rezeptors führen. Die Mutationen führen durch Ermöglichung ligandenunabhängiger Dimerisierung (R248C und G380R) oder durch Aktivierung der Kinasedomäne (K650E) zu einer Verstärkung der Tyrosinkinaseaktivität von FGFR3 (Naski et al. 1996, Webster & Donoghue 1996, Webster et al. 1996).

1.3.2 FGF-Rezeptoren und autosomal-dominante Craniosynostose-Syndrome

1.3.2.1 Craniosynostosen

Die Schädelkalotte besteht aus mehreren Knochenplatten, die durch bindegewebige Nähte (Suturen) miteinander verbunden sind. Die Nähte bestehen aus undifferenzierten, proliferierenden osteogenen Stammzellen. Während der embryonalen und postnatalen Entwicklung wachsen die Schädelplatten durch Differenzierung von Anteilen der Stammzellen zu Osteoblasten. Die vorzeitige Differenzierung des gesamten Gewebes einer Naht in Knochengewebe (Craniosynostose) führt dazu, dass weiteres Wachstum der Schädelplatten von der betroffenen Sutur ausgehend

nicht mehr stattfindet. Die Synostose kann eine, mehrere oder alle Suturen betreffen, was zu äußerst variablen Schädeldeformationen führt (Abbildung 1.4).

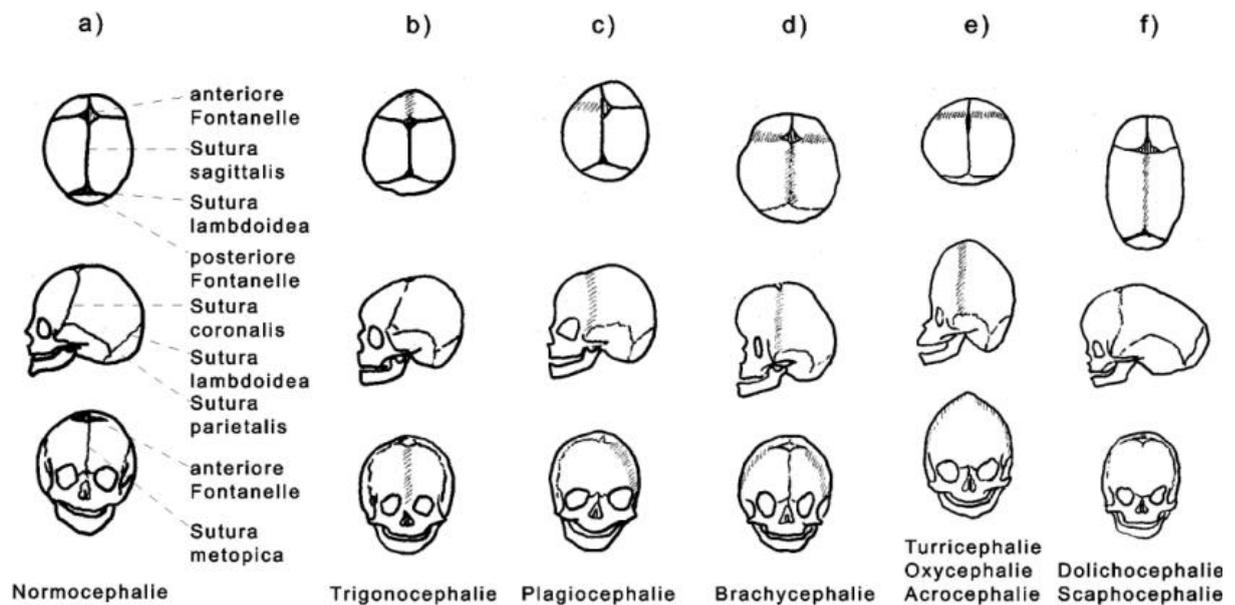


Abbildung 1.4: Cranialsuturen (a) und mögliche resultierende Schädeldeformationen (b-f) bei vorzeitigem Suturenverschluss. In b-f sind die jeweils von der Synostose betroffenen Suturen schraffiert gezeichnet.

Mehr als 100 Syndrome mit Craniosynostose als gemeinsamem Symptom sind bisher beschrieben worden (Cohen 1986, Winter & Baraitser 1996). Die Prävalenz von Craniosynostosen wird mit etwa 1:2500 angegeben (Hunter und Rudd 1976, Lajeunie et al. 1995). Das abnorme Schädelwachstum kann erhöhten Schädelinnendruck, Einschränkungen in der optischen und akustischen Wahrnehmung, schwere Kopfschmerzen und epileptische Anfälle zur Folge haben (Müller et al. 1997). Die Beeinträchtigung geistiger Fähigkeiten wird ebenfalls beschrieben (Cohen 1990). In vielen Fällen treten Craniosynostosen in Verbindung mit Abnormitäten der Gliedmaßenentwicklung auf (Cohen 1990). Familiär auftretende Craniosynostosen folgen meist einem autosomal-dominanten Erbgang. Zu ihnen gehören die klinisch definierten Syndrome Crouzon, Pfeiffer, Jackson-Weiss, Apert, Saethre-Chotzen und Boston-Typ-Craniosynostose. Die Syndrome Saethre-Chotzen und Boston-Typ-Craniosynostose sind mit Mutationen in Genen für die Transkriptionsfaktoren TWIST (El Ghouzzi et al. 1997, Howard et al. 1997) und MSX2 (Müller et al. 1993, Jabs et al. 1993) assoziiert, die Syndrome Apert, Crouzon, Jackson-Weiss und Pfeiffer mit Mutationen in FGFR-Genen (Müller et al. 1997). Die

klinische Einteilung beruht auf dem craniofacialen Phänotyp und dem Auftreten von Fehlbildungen der Gliedmaßen (Tabelle 1.1, nach Gorlin et al. 1990).

Tabelle 1.1: Hauptkriterien zur klinischen Klassifizierung FGFR-assoziiierter Craniosynostose-Syndrome.

Syndrom	Craniosynostose assoziiert mit
Crouzon	Exorbitismus, orbitaler Hypertelorismus, Mittelgesichtshypoplasie
Pfeiffer	Verbreiterte Daumen und große Zehen
Jackson-Weiss	Fußanomalien
Apert	Hypertelorismus, Strabismus, Maxillarhypoplasie, Syndactylien

In Hinblick auf das klinische Erscheinungsbild können die Übergänge zwischen den Syndromen jedoch fließend sein. Die Zuordnung zu einem bestimmten Syndrom ist dann nicht immer möglich. Es wird daher diskutiert, ob eine Benennung der Syndrome nach der zugrundeliegenden Genmutation angemessener wäre. Danach würde man beispielsweise die Syndrome Crouzon, Pfeiffer, Jackson-Weiss und Apert als „FGFR-assoziierte Craniosynostosen“ zusammenfassen, da ihnen Mutationen in FGFR-Genen zugrunde liegen (Steinberger et al. 1996b).

1.3.2.2 FGFR-Mutationen bei autosomal-dominanten Craniosynostose-Syndromen

Mutationen sind bisher in den Genen für FGFR1, FGFR2 und FGFR3 gefunden worden (Tabelle 1.2), wobei FGFR2-Mutationen den größten Anteil ausmachen (Abbildung 1.5). In den meisten Fällen codieren die betroffenen Genbereiche für extrazelluläre Anteile des Rezeptors. Seltener betreffen die Mutationen den Transmembrananteil des Rezeptors. Dazu gehören die Ala391Glu-Mutation in FGFR3 und möglicherweise auch die Tyr375Cys-Mutation in FGFR2, die ursächlich ist für das Beare-Stevenson-Syndrom (Przylepa et al. 1996). Die Zugehörigkeit von Tyr375 zur Transmembrandomäne (TM-Domäne) von FGFR2 ist allerdings nicht gesichert. Während Przylepa et al. (1996) die Tyr375Cys-Mutation der TM-Domäne von FGFR2 zuordnen, bilden nach der Swissprot-Datenbank (letztes *Update* vom 31.5.2000)

jedoch die Aminosäuren 378-398 die TM-Domäne von FGFR2 (Acc.-Nr. P21802). Demnach läge Tyr375 am C-terminalen Ende der Verbindungsregion zwischen der IgIII- und der TM-Domäne.

Tabelle 1.2: Überblick über einige der im Text genannten FGFR-Mutationen, dem dazugehörigen klinischen Erscheinungsbild und, soweit untersucht, den wahrscheinlichen molekularen Mechanismen.

Rezeptor	Mutation, Protein-domäne	Mechanismus	Syndrom
FGFR1	Pro252Arg, IgII-IgIII linker	verminderte FGF-Dissoziation (?)	Pfeiffer
FGFR2	Pro253Arg, IgII-IgIII linker Cys342Arg, IgIII C-terminal	verminderte FGF-Dissoziation ligandenunabhängige Dimerisierung	Apert Pfeiffer, Crouzon, Jackson-Weiss
FGFR3	Pro250Arg, IgII-IgIII linker Ala391Glu, Transmembrandomäne	Verminerte FGF-Dissoziation (?) ligandenunabhängige Dimerisierung	Muenke Crouzon/Acanthosis nigricans

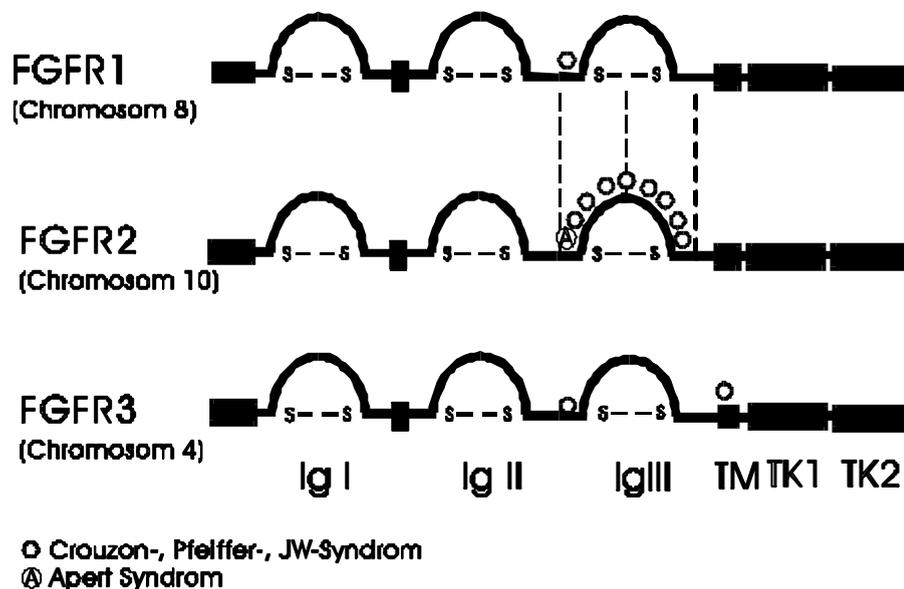


Abbildung 1.5: Mutationen in FGFR1, FGFR2 und FGFR3, die in Zusammenhang mit den Craniosynostosesyndromen Crouzon, Pfeiffer, Jackson-Weiss (JW) und Apert stehen. Zur Primärstruktur der FGFRs siehe Abb. 1.1.

Meistens handelt es sich um Punktmutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen. Zusätzlich wurden im Fall von FGFR2 Spleiss-Stellen-Mutationen (Del Gatto

& Breathnach 1995, Li et al. 1995) sowie *in frame*-Mikrodeletionen (Oldridge et al. 1995, Steinberger et al. 1996a) und -Duplikationen (Steinberger et al. 1996b) beschrieben. Weiterhin wurden bei zwei Patienten mit Apert-Syndrom Insertionen eines Alu-Elements in bzw. unmittelbar stromaufwärts von Exon 9 des *FGFR2*-Gens gefunden (Oldridge et al. 1999). Exon 9 codiert für eine von zwei alternativen C-terminalen Hälften der IgIII-Domäne innerhalb des *FGFR2*, IgIIIb und IgIIIc. Die Aluinsertion führt dazu, dass Exon 9, das für IgIIIc codiert, herausgespleisst wird und ausgehend von dem betroffenen Gen nur noch die IgIIIb-Variante (codiert durch das alternativ exprimierte Exon 8) des *FGFR2* exprimiert wird. Die verstärkte Expression der IgIIIb-Variante des *FGFR2* (KGFR) und die verminderte Expression der IgIIIc-Variante des *FGFR2* (BEK) könnten die Symptomatik der beiden Patienten mit Alu-Insertionen erklären (Oldridge et al. 1999).

Besonders häufig findet man Mutationen im *FGFR2*-Gen, die das Cystein-Codon an Position 342 betreffen (Steinberger et al. 1995). Cystein 342 bildet mit dem korrespondierenden Cystein 278 eine intramolekulare Disulfidbrücke aus, die die IgIII-Domäne stabilisiert. Der Ersatz einer der beiden Cysteinreste durch eine andere Aminosäure läßt das korrespondierende Cystein ungepaart. Dies ermöglicht die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken zwischen zwei Rezeptormonomeren. Es kommt zur ligandenunabhängigen Dimerisierung und konstitutiven Aktivierung des Rezeptors (Neilson & Friesel 1995, Galvin et al. 1996, Robertson et al. 1998).

Weitere Befunde erhärten das Modell, dass *FGFR*-Mutationen in Craniosynostosen wie in den bereits erwähnten Minderwuchsformen eine Veränderung der Genfunktion (*gain of function*) in Hinblick auf die Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktionskomponenten zur Folge haben. *FGFR2*-Mutationen, die die Verbindungsregion der IgII- und IgIII-Domäne betreffen und in Zusammenhang mit dem Apert-Syndrom stehen (Ser252Trp und Pro253Arg), bewirken eine verminderte Dissoziation vom Rezeptor und seinem Liganden FGF2. Dadurch befinden sich diese *FGFR2*-Mutanten länger im dimerisierten und damit aktiven Zustand (Anderson et al. 1998). Pro>Arg-Mutationen im IgII-IgIII *linker* wurden auch im Codon 252 von *FGFR1* (Muenke et al. 1994) und Codon 250 von *FGFR3* identifiziert (Bellus et al. 1996).

1.3.2.3 FGFR2-Expression in Schädelnähten

Experimente an fötalen Schädelnähten der Maus zeigten, daß FGFR2 im Suturenmesenchym stark exprimiert wird. Diese erhöhte Expression korreliert mit einer geringen Verfügbarkeit des Liganden FGF2. In der osteogenen Front (OF) hingegen ist die FGF2-Konzentration stark erhöht. Die OF ist der Randbereich, an dem das Suturenmesenchym an die Schädelplattenränder angrenzt und von wo aus das Knochenwachstum erfolgt. Dies führt in der OF zu einer Abnahme der FGFR2-Expression. Gleichzeitig wird die Expression von Osteonectin und alkalischer Phosphatase verstärkt. Dies führt zu einer Induktion des Differenzierungsprozesses der Osteoblasten, was molekular an der erhöhten Expression des Knochendifferenzierungsmarkers Osteopontin erkennbar ist (Iseki et al. 1997). Die FGFR2-Expression ist demnach hoch in proliferierenden osteogenen Stammzellen bei gleichzeitiger limitierter Verfügbarkeit des Liganden und wird bei FGF2-Überschuss erniedrigt, was den Differenzierungsprozess der Osteoblasten einleitet (Iseki et al. 1997). In diesem Zusammenhang lassen sich die Wirkungen von FGFR2-Mutationen in Craniosynostose-Syndromen auf das Suturgewebe folgendermaßen verstehen: Aktivierende FGFR2-Mutationen simulieren das Vorliegen eines FGF2-Überschusses, was zur Induktion von Differenzierungsprozessen führt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

FGF-Rezeptoren regulieren zahlreiche physiologische Vorgänge und FGFR-Mutationen können Fehlbildungen wie Craniosynostosen verursachen. Bei Craniosynostosen findet man am häufigsten Mutationen im FGFR2-Gen. Die Identifizierung von spezifisch durch FGFR2 regulierten Genen verbessert das molekulare Verständnis von FGFR-regulierten Prozessen wie der Cranialsuturenentwicklung. Um FGFR2-regulierte Gene zu identifizieren, wurde ein *in vitro*-Untersuchungssystem an L6-Rattenmyoblasten etabliert. Durch Transfektion von FGFR2-cDNA wurden L6-Zellen zur FGFR2-Expression gebracht. Die FGFR2-exprimierenden L6-Zellen wurden dann mit Differential Display- und cDNA-Array-Analysen auf FGFR2-regulierte Gene hin untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Lösungen

40%ige Acrylamid-Lösung: 38 % (w/v) Acrylamid und 2 % (w/v) Bisacrylamid (19 + 1 Teile).

30%ige Acrylamid-Lösung: 30 % Acrylamid, 0.8 % Bis

APS: 10 % (w/v), Firma Bio-Rad.

Coomassieblau-Färbelösung für Acrylamidgele: 450 ml Methanol, 450 ml aqua bidest, 100 ml Essigsäure, 2.5 g Coomassieblau.

Coomassieblau-Entfärbelösung für Acrylamidgele: Zusammensetzung wie die Färbelösung aber ohne Coomassieblau.

Denhardt'sche Lösung (100 x): 2 % Polyvinylpyrrolidon, 2 % Ficoll, 2 % BSA (jeweils w/v).

DEPC-behandeltes Wasser: Zur Inaktivierung von RNasen wurde H₂O mit 0.2 % (v/v) DEPC versetzt und zum Lösen kräftig geschüttelt. Zur Einwirkung des DEPC wurde das Gemisch über Nacht stehengelassen und anschließend zur Zerstörung des DEPC autoklaviert.

Dextransulfat (50 %): 50 g/100 ml H₂O.

EDTA: 0,5 M, pH 8,0 eingestellt mit 10 M NaOH.

Ethidiumbromid: 10 mg/ml in H₂O.

Formaldehyd/Agarose-Gellösung (RNA): Für 100 ml wurden 1,2 g Agarose mit 10 ml 10 x MOPS-Puffer, 1,8 ml 37%igem Formaldehyd (Endkonzentration 0,22 M) und 88 ml DEPC-H₂O versetzt.

Hybridisierungslösung: 5 x SSC, 5 x Denhardt'sche Lösung, 0,5 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Formamid, 5 % (v/v) Dextransulfat, 100 µg/ml Heringssperma-DNA.

Sammelgellösung für Proteingele (5%): 1,67 ml Acrylamid-Lösung (30%), 1,25 ml 1M Tris-HCl pH 6,8, 7,3 ml aqua bidest, 50 µl 20% SDS 15 µl TEMED 50 µl 10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung.

Natriumacetat: 3 M, pH 5,2, eingestellt mit konzentrierter Essigsäure.

Sequenzier-Gellösung: 30 g Harnstoff (Endkonzentration 8,3 M) wurden mit 10 ml 40%igem Acrylamid (Endkonzentration 6,6 %), 6 ml 10 x TBE, 22,5 ml H₂O, 180 µl 10 % (w/v) APS und 24 µl TEMED versetzt.

SSC (20 x): 3 M NaCl, 0,3 M Na₃Citrat, pH 7 mit HCl eingestellt.

Trenngellösung für Proteingele (7.5%): 7,5 ml Acrylamid-Lösung (30%), 11,2 ml 1M Tris-HCl pH 8,8, 11,2 ml aqua bidest, 150 µl 20% SDS, 30 µl TEMED, 150 µl 10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung.

TRIzol: Zur Gesamt-RNA-Präparation, Firma Gibco-BRL.

2.1.2 Puffer

Blockierungspuffer für Western-Blot: 3% fettfreies Milchpulver, gelöst in TBST.

10^x Laufpuffer für Proteingele: 30,3 g Tris, 142,2 g Glycin, 10 g SDS, auf 1 Liter mit aqua bidest auffüllen.

MOPS-Puffer (10 x): 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7,0, eingestellt mit konzentrierter Essigsäure.

P1: 100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, pH 8,0, Lagerung bei 4 °C.

P2: 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS, Lagerung bei RT.

P3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5, eingestellt mit konzentrierter Essigsäure, Lagerung bei 4 °C.

PBS: 10 g/l NaCl, 0,25 g/l KCl, 1,41 g/l Na₂HPO₄ (· 2 H₂O), 0,3 g/l KH₂PO₄, pH 7,4.

PCR-Puffer (10 x): 400 mM NaCl, 500 mM Tris, 25mM MgCl₂, 0,1 % Gelatine.

Probenpuffer für RNA-Gele (5 x): Zu einem Endvolumen von 10 ml wurden 16 µl gesättigtes Bromphenolblau, 80 µl 500 mM EDTA, 100 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml), 720 µl 37 % (12,3 M) Formaldehyd, 2 ml 100 % Glycerol, 3084 µl Formamid, 4 ml 10 x MOPS-Puffer und DEPC-H₂O vermischt.

Probenpuffer für Proteingele (4 x): 12,5 ml 1 M Tris-Cl pH 6,8, 4 g SDS, 10 g Glycerin und 5 mg Bromphenolblau auf 50 ml mit aqua bidest auffüllen. Vor der Verwendung zu einem Aliquot 5% Beta-Mercaptoethanol zugeben.

Probenpuffer für Sequenziergele: Deionisiertes Formamid wurde mit 25 mM EDTA, pH 8,0 (enthaltend 50 mg/ml Blue Dextran) im Verhältnis 5:1 vermischt.

Probenpuffer für TAE-DNA-Gele (6 x) : 6 x TAE, 15 % Ficoll 400, 0,6 % SDS sowie jeweils 0,6 mg/ml Bromphenolblau und Xylencyanol.

Probenpuffer für TBE-DNA-Gele (6 x): 6 x TBE, 15 % Ficoll 400, 0,6 % SDS sowie jeweils 0,6 mg/ml Bromphenolblau und Xylencyanol.

QBT: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % (v/v) Ethanol, 0,15 % TRITON-X-100, pH 7,0, eingestellt mit HCl, Lagerung bei RT.

QC: 1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % (v/v) Ethanol, pH 7,0, eingestellt mit HCl, Lagerung bei RT.

QF: 1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, 15 % (v/v) Ethanol, pH 8,5, eingestellt mit HCl, Lagerung bei RT.

RIPA-Lysepuffer: 1 x PBS, 1 % NP-40, 0,1% SDS. Unmittelbar vor Gebrauch pro ml 1 µl Aprotinin (10 mg/ml) und 20 µl Na-Orthovanadat (50 mM) zugeben.

TAE: 40 mM Tris, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,8, eingestellt mit konzentrierter Essigsäure.

TBE: 100 mM Tris, 100 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3, eingestellt mit NaOH.

TBS: 10 mM Tris, 75 mM NaCl, pH 7,4.

TBST: 1 x TBS, 0,1% Tween 20.

TE: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA.

Transferpuffer für Western-Blot: 5,8 g Tris, 2,9 g Glycin, 3,7 ml 10% SDS, 200 ml Methanol, aufgefüllt auf 1 l mit aqua bidest.

Verdaupuffer für Proteinase K: 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 25 mM EDTA, pH 8,0, 0,5 % SDS und jeweils frisch dazu 100 µg Proteinase K/ml Puffer.

2.1.3 Kits

pMOSBlue blunt end cloning kit	Amersham, Braunschweig
Oligotex-mRNA-Mini-Kit	Qiagen, Hilden
Thermosequenase cycle sequencing kit	Amersham, Braunschweig
Random primers labelling kit	Gibco BRL, Eggenstein
Superfect-Transfectionsreagenz	Qiagen, Hilden
Effectene-Transfectionsreagenz	Qiagen, Hilden
ECL-Detektions-Kit	Amersham, Braunschweig
Plasmid-DNA Minipröp-Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid-DNA Midipröp-Kit	Qiagen, Hilden
Gelextraktions -Kit	Qiagen, Hilden
	Macherey-Nagel, Düren

2.1.4 Enzyme

T4-Polynukleotidkinase	Amersham, Braunschweig
RNase A	Böhringer, Mannheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Diverse Anbieter
Superscript-Reverse Transkriptase	Gibco BRL, Eggenstein
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein,
DNAseI, Rnase-frei	Böhringer, Mannheim

2.1.5 Medien und Nährböden

Agar: 1,5 % (w/v) Bactoagar (Firma Difco) in LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin, 15 µg/ml Tetracyclin.

LB-Medium: 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glucose (Jeweils w/v), pH 7,4, eingestellt mit NaOH.

2YT-Medium (1 L): 16 g Trypton, 10 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl.

2 x Einfriermedium für L6-Zellen: 10 % DMSO, 50 % FKS, 40 % Vollmedium.

2.1.6 Nukleotide

dATP, dCTP, dGTP, dTTP: Firma Gibco. Die einzelnen Nukleotide lagen 100 mM in wäßriger Lösung, pH 7,5, vor.

$\alpha^{32}\text{P-dCTP}$, $\gamma^{32}\text{P-ATP}$, $\alpha^{32}\text{P-dATP}$ $\alpha^{35}\text{S-dATP}$ Firma Amersham. Spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol.

2.1.7 Nährmedien und Lösungen für die Gewebekultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein

Fötale Kälberserum (FKS)
Geneticin (G418)

Gibco BRL, Eggenstein
Gibco BRL, Eggenstein

2.1.8 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose standard low-m _r	Bio-Rad, Richmond, USA
Agarose ultra pure DNA Grade	Bio-Rad, Richmond, USA
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Merck, Darmstadt
APS (Ammoniumpersulfat)	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Difco Lab., Detroit, USA
Bradford's Reagenz	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Bovines Serum Albumin)	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliantblue	Sigma, München
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, München
Dextransulfat	Sigma, München
Dimethyldichlorsilan	Serva, Heidelberg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Boehringer, Mannheim
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
FKS (Fötale Kälberserum)	Gibco BRL, Eggenstein
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
Hefe-Extrakt	Merck, Darmstadt
Imidazol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma, Heidelberg
Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver, fettfrei	Carnation, Kalifornien, USA
Mineralöl	Sigma, München
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt

Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumvanadat (Na_3VO_4)	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethylsulfonyl-Fluorid)	Sigma, München
Saccharose	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Silikonfett	Bayer, Leverkusen
Silikonlösung	Sigma, München
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethyl-ethylen-diamin)	Serva, Heidelberg
Tetracyclin	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100 (Octophenolpolyethylen-glykolether)	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma, München
Trypton	Merck, Darmstadt
Tween20	Roth, Karlsruhe
X-gal	
(5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-galaktopyranosid)	Merck, Darmstadt
Xylenzanol	Serva, Heidelberg

2.1.9 Desoxyribonukleinsäuren

Salmon sperm DNA (Lachshoden DNA)	Sigma, München
pcDNA3-Expressionsvektor	Invitrogen, de Schelp (NL)
kompletter ORF (Nu 180-2645) der humanen	Brian Hampton, Holland
cDNA von FGFR2, über HindIII-Schnittstellen in	Laboratory, Rockville, Mary-
den pcDNA3-Expressionsvektor inseriert	land, USA

2.1.10 Größenmarker für die Gelelektrophorese

Längenmarker für RNA-Gele	Gibco-BRL, Eggenstein
Längenmarker für DNA-Gele	Gibco-BRL, Eggenstein
Rainbow TM -Marker für Proteingele	Amersham, Braunschweig

2.1.11 Zelllinien

L6-Rattenmyoblasten	American Type Culture Collection (ATCC)
---------------------	--

2.1.12 Antikörper

Polyklonaler Rabbit-Anti-FGFR2 Antikörper C-17	Santa Cruz Biotechnologies
<i>Horseradish peroxidase</i> –gekoppelter Anti- <i>rabbit</i> -Antikörper (Bestandteil des ECL-Kits)	Amersham, Braunschweig

2.1.13 Sonstige Materialien

Chromatographie-Papier, Whatman 3MM	Pierce, Rockford, IL, USA
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Gewekulturschalen	Greiner, Nürtingen
Kunststoffreaktionsgefäße 50ml	Falcon, Heidelberg
Kunststoffreaktionsgefäße 20ml	Greiner, Nürtingen
Kryoröhrchen, Nalgene	Falcon, Heidelberg
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Röntgenfilm Bio MAX™	Kodak, Rochester, USA
PVDF-Transfermembran	Böhringer, Mannheim
Nylon-Transfermembran Hybond N+	Amersham, Braunschweig
cDNA Expressions-Arrays	Clontech, Heidelberg

2.1.14 Oligonukleotide

Primer für RT-PCRs und Northern-Hybridisierungen von Genen aus den cDNA-Array-Analysen und dem Kandidatengenansatz (zur Bedeutung der Gennummern siehe Tabelle 3.2)

MyoD-Oligo:	5' AGC AGC GAC CCG CCT GGT GGT GCC CGC TGG GCG CGC GCA CAT GCT CAT CC 3'
TA1(Gen6)Hin:	5' TGTCCTGCTTCGGCTCTGTCAAT 3'
TA1(Gen6)Rück:	5' GAGGAAGAGGCAGGCCAGGATAAA 3'
Fyn(Gen22)Hin:	5' CCACGAGGGCCCAGTTTGAG 3'
Fyn(Gen22)Rück:	5' CCGCCATGTCCACGAGGTTT 3'
Gen1Hin:	5' GGAGCGGCGGGATTGAAACCA 3'
Gen1Rück:	5' GCGGCGGGAAGGGCACTG 3'
Gen2Hin:	5' CCATGGGGACTTCGCTTTTGACG 3'
Gen2Rück:	5' TCGGCGATGGCATAGACACTCC 3'
Gen3Hin:	5' ATCCGTCCTCGTACCTATGTGG 3'
Gen3Rück:	5' TTCCCCGGCGTACCCTCCTGT 3'
Gen4Hin:	5' TCAGCCGCAGAAGTTAAAAGCAGA 3'
Gen4Rück:	5' CGGACATTCGGGCAGTAGTGGTAA 3'
Gen5Hin:	5' TCAGCGGGACCAAGAAGGAAAAC 3'
Gen5Rück:	5' GGGAGGAAGTGAGCGGAGGTGT 3'
Gen7Hin:	5' CCCGCTGGAGGTGGAGAC 3'
Gen7Rück:	5' GGCCCCCTACTGTGAATAAGAAG 3'
Gen8Hin:	5' TATGATCCCGAGAACAGCACAAAC 3'
Gen8Rück:	5' AATAAGGCCCAAAGCAAAGATGTC 3'

Gen9Hin: 5' GCATGGGGCTGTCGCTGGTGGAG 3'
 Gen9Rück: 5' CGTGGGTGTGCTGGGCTGCTTCA 3'
 Gen10Hin: 5' GCACCCCTTACACGCTGGACTCT 3'
 Gen10Rück: 5' ATGGGGCCCTGGGTAGCAATGTAG 3'
 Gen11Hin: 5' TGCAGCCCGGAAGGAGGTCATCAGG 3'
 Gen11Rück: 5' CTGCCGTTGCTGTCTGTGCCGTTAGTCTCT 3'
 Gen12Hin: 5' TCTATGGCCTGCCTCCGTTCTACA 3'
 Gen12Rück: 5' GCTTCCGCGGCTTCTTTTCACTG 3'
 Gen13Hin: 5' GGGCGCACTGGCACCTTTGT 3'
 Gen13Rück: 5' CTCTTCGCCCGTTTGACTGGA 3'
 Gen14Hin: 5' GGCCCCTTGTTCATCTT 3'
 Gen14Rück: 5' TGTTTCGCCCGTCCCTCAGT 3'
 Gen15Hin: 5' CCTGGGTTGATATGGAGGGAATAA 3'
 Gen15Rück: 5' GAGGGGAGATACAGCAGGAAGTCA 3'
 Gen16Hin: 5' CAGTGGGGAAGTCGATGTTGGTG 3'
 Gen16Rück: 5' CGTGGGCGGGGTCTTTGGGTGGTA 3'
 Gen17Hin: 5' AGTGGGCCTGGTCAGCATTTCGTGGTGT 3'
 Gen17Rück: 5' GGTGCCGTTTAGTCCTGGTCCCTTCTCT 3'
 Gen18Hin: 5' CTTGGCTGCCGCTGAGAT 3'
 Gen18Rück: 5' TGAGAACCACTGGCTTTAGACTGT 3'
 Gen19Hin: 5' TAGCCTGCCGGAACACTG 3'
 Gen19Rück: 5' TCCGTCCCCCATCTCTTC 3'
 Gen20Hin: 5' GCCCAGCTGCCCTTCCT 3'
 Gen20Rück: 5' ACCCGCAGCCACAGTCC 3'
 Gen21Hin: 5' TGAACGCCGGACCACAGAT 3'
 Gen21Rück: 5' GGGCAGAAGGATATTAAGGATGTT 3'

Primer zur Generierung des pcDNA3-WT-Konstruktes

FR2Kpn: 5' GGGGTACCGTAACCATGGTCAGCTGGGG 3'
 FR2Bam: 5' GCGGATCCTCATGTTTTAACACTGCC 3'

Differential Display-Primer

00: 5' CGGGAAGCTTATCGACTCCAAG 3'
 01: 5' CGGGAAGCTTTAGCTAGCATGG 3'
 02: 5' CGGGAAGCTTGCTAAGACTAGC 3'
 03: 5' CGGGAAGCTTTGCAGTGTGTGA 3'
 04: 5' CGGGAAGCTTGTGACCATTGCA 3'
 05: 5' CGGGAAGCTTGTCTGCTAGGTA 3'
 06: 5' CGGGAAGCTTGCATGGTAGTCT 3'
 07: 5' CGGGAAGCTTGTGTTGCACCAT 3'
 08: 5' CGGGAAGCTTAGACGCTAGTGT 3'
 09: 5' CGGGAAGCTTTAGCTAGCAGAC 3'
 10: 5' CGGGAAGCTTCATGATGCTACC 3'
 11: 5' CGGGAAGCTTACTCCATGACTC 3'
 12: 5' CGGGAAGCTTATTACAACGAGG 3'
 13: 5' CGGGAAGCTTATTGGATTGGTC 3'
 14: 5' CGGGAAGCTTATCTTTCTACCC 3'

15: 5' CGGGAAGCTTATTTTTGGCTCC 3'
16: 5' CGGGAAGCTTTATCGATACAGG 3'
17: 5' CGGGAAGCTTTATGGTAAAGGG 3'
18: 5' CGGGAAGCTTTATCGGTCATAG 3'
19: 5' CGGGAAGCTTTAGGTAAGG 3'
DDRT-A: 5' GCGGTACCTTTTTTTTTTTTVA 3'
DDRT-C: 5' GCGGTACCTTTTTTTTTTTTVC 3'
DDRT-G: 5' GCGGTACCTTTTTTTTTTTTVG 3'
DDRT-T: 5' GCGGTACCTTTTTTTTTTTT VT 3'

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Zellkulturen

Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie L6 ist eine Myoblasten-Zelllinie der Ratte. Als adhärenente Zellen wachsen sie auf speziell beschichteten Kulturschalen ("tissue culture") als Monolayer in gewebeartigem Verband. Die Zellen sind spindelförmig, können aber bei niedriger Zelldichte auch voluminöser und gedrungener sein. Bei 80-90%iger Konfluenz müssen die Zellen verdünnt werden. Dies hält den Fibroblastenanteil vernachlässigbar gering und verhindert die Induktion eines Ausdifferenzierungsprozesses der Myoblasten. Letzteres ist wichtig, da L6-Zellen vor der Ausdifferenzierung ihre FGFR-Gene nicht exprimieren.

2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren von L6 Rattenmyoblasten

L6-Zellen wurden in Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit 10% FKS, 200 IU Penicillin/ml Medium und 200 µg Streptomycin/ml Medium ("Vollmedium") im Brutschrank bei 37°C und 10% CO₂ gehalten. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Bei 50-90%iger Konfluenz wurden die Zellen 1:2 bis 1:20 verdünnt bzw. auf weitere Kulturschalen verteilt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit vorgewärmtem (37°C) DMEM ohne Zusätze gewaschen. Anschließend wurde vorgewärmtes 1 x Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben und maximal 10 min bei 37°C inkubiert. Trypsin ist ein proteolytisches Enzym, das die an der Zell-Zell-Bindung beteiligten Proteine spaltet, so dass sich die Zellen von der Petrischale ablösen. Der Trypsinierungsvorgang wurde mit Vollmedium gestoppt und die Zellen entsprechend der gewünschten Verdünnung verteilt. Je nach Größe der Kulturgefäße wurden folgende Volumina an Medium für die Kultivierung bzw. an 1 x Trypsin/EDTA für die Passagierung eingesetzt:

	<u>ml Vollmedium</u>	<u>ml 1 x Trypsin/EDTA</u>
1 Napf einer 96-Loch-Platte	0,2	0,1
1 Napf einer 24-Loch-Platte	1	0,3
1 Napf einer 6-Loch-Platte	3	0,5
50 ml Flasche	7	2
94 mm Schale	10	2
145 mmSchale	25	5

2.2.1.2 Auftauen und Einfrieren von L6-Zellen

Die Zellen wurden in der Hand oder bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort in ein vorbereitetes Kulturgefäß mit warmem Kulturmedium gegeben. Nach 6-8 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, um das noch verbliebene DMSO-haltige Einfriermedium zu entfernen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit frischem Nährmedium versorgt, um abgestorbene Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Zum Einfrieren wurden zu 50-90% dicht gewachsene Zellen durch Trypsinierung vom Kulturgefäß abgelöst, für 5-10 min bei 1000 UpM sedimentiert und in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ - 5×10^6 Zellen pro ml in Einfriermedium resuspendiert. Die in 1,5 ml Kryoröhrchen verbrachten Zellen wurden bei -70° eingefroren und nach 2-14 Tagen in Flüssigstickstoff gesetzt.

Einfriermedium:

- 5% DMSO
- 25% FKS
- 70% Vollmedium

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden vom Kulturgefäß abgelöst und gut vereinzelt. Die Trypsinierung wurde mit einer definierten Menge Vollmedium gestoppt. Ein Tropfen der Zellsuspension wurde auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Anzahl der Zellen durch Auszählen unter dem Mikroskop bestimmt. Bei dieser Zählkammer

ergibt die Anzahl der Zellen in 16 Kleinstquadraten multipliziert mit 10^4 die Anzahl der Zellen in einem ml Suspensionslösung.

2.2.1.4 Einführen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen (Transfektion)

Für die Transfektion der L6-Zellen wurden zwei Reagenzien der Firma Qiagen verwendet: „Superfect“ und „Effectene“. In beiden Verfahren wird die zu transfizierende DNA mit einer kationischen Lipidschicht umgeben. Der gebildete Komplex wird über einen endosomal Weg in die Zelle aufgenommen.

Die transfizierten DNAs kodierten den Wildtyp bzw. verschiedene mutierte Formen der FGFR2-Rezeptorvariante BEK. Sie waren inseriert in den Säugerexpressionsvektor pcDNA3, der zur Selektion transfizierter Zellen ein Geneticin (G418)-Resistenzgen trägt. Für die Transfektionen wurde linearisierte DNA verwendet, da diese leichter in die chromosomale DNA integriert wird und somit die Anzahl stabil transfizierter Zellen steigt. Hierzu wurde eine geeignete DNA-Menge (s.u.) mit *BsmI* linearisiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des “PCR purification kit” (Qiagen) gereinigt.

Vorbereitung der Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wurden 3×10^5 L6-Zellen in den Napf einer 6-Loch-Platte ausgesät. Beim Aussäen war darauf zu achten, dass sich die Zellen möglichst vereinzelt am Napfboden absetzen.

Transfektion mit dem Effectene-Reagenz

0,4 µg linearisierte DNA wurden mit Effectene-Puffer auf 100 µl aufgefüllt, mit 3,2 µl Effectene-Enhancer vermischt (1 sek vortexen) und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl Effectene-Reagenz inkubierte die Lösung weitere 10 min bei RT. Inzwischen wurden die Zellen einmal mit DMEM ohne Zusätze gewaschen und mit 1,5 ml Vollmedium versorgt. Die DNA-Lösung wurde mit 600 µl Vollmedium vermischt und tropfenweise über dem Zellrasen verteilt. Nach 8 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen dreimal mit Vollmedium gewaschen und mit Vollmedium versorgt. Nach drei Tagen wurden die Zellen eines Napfes auf 2-4

Kulturschalen (94 mm) verteilt und in G418-haltigem Medium (400 µg/ml) selektioniert. 2-3 Wochen später geschah die Subklonierung stabil transfizierter Zellen (s.u.).

Transfektion mit dem Superfect-Reagenz

2 µg DNA wurden mit DMEM ohne Zusätze auf 100 µl aufgefüllt, mit 10 µl Superfect-Reagenz vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit DMEM ohne Zusätze gewaschen und mit 1,5 ml Vollmedium versorgt. Die DNA-Lösung wurde mit 600 µl Vollmedium vermischt und tropfenweise über dem Zellrasen verteilt. Nach 5 Stunden Inkubation im Brutschrank geschah die weitere Behandlung der Zellen wie für das Effectene-Reagenz beschrieben.

2.2.1.5 Subklonierung transfizierter L6-Zellen

Zur Klonisolierung wurden die Klone auf der Außenseite der Kulturschale mit einem Filzstift markiert und mit jeweils einem runden, sterilen, in 1 x Trypsinlösung getränktem Whatman-3-MM-Papier (Ø 0,5 cm) bedeckt. Nach einer Einwirkzeit von 1-2 min bei RT wurden die Whatman-3-MM-Papiere in einen mit Vollmedium beschickten Napf einer 24-Loch-Platte überführt.

Bei der weiteren Kultivierung im Brutschrank bei 37°C konnten die am Filter haftenden Zellen am Boden des Kulturgefäßes anwachsen und sich vermehren.

Ein alternatives Verfahren zur Gewinnung von Einzelklonen bestand im Aussäen einzelner Zellen in Nöpfen von 96-Loch-Platten. Dies war dann vorzuziehen, wenn der Abstand der Klone zueinander auf den Kulturschalen zu gering war. Hierzu wurden die Zellen abtrypsiniert, gut vereinzelt, gezählt und schließlich über eine Verdünnungsreihe die Zellzahl so eingestellt, dass sich in 200 µl Medium 5 Zellen befanden. Pro Napf einer 96-Loch-Platte wurden statistisch 5 Zellen ausgesät (200 µl). Nach einer Woche konnten die Nöpfe auf das Auftreten von Einzelkolonien hin untersucht werden. Erfahrungsgemäß war in 1 von 5-10 Nöpfen dann auch nur eine Zelle ausgesät worden.

2.2.1.6 Behandlung der L6-Zellen mit FGF2 und Heparin

Zur Identifizierung FGFR2-regulierter Gene wurden L6-Zellen verwendet, die nach der Transfektion FGFR2 exprimierten und L6-Zellen, die nur mit dem Expressionsvektor pcDNA3 transfiziert worden waren. Die Zellen wurden in 94 mm- und 145 mm-Kulturschalen auf eine Dichte von 80%-90% angezogen. Zur Synchronisation wurden die Zellen zweimal mit DMEM ohne Zusätze gewaschen und über Nacht (16 h) in DMEM gehalten, das nur einen Zusatz von 0,1% FKS oder 0,5% FKS enthielt. Anschließend wurden die Zellen für verschiedene Zeiten mit Medien (DMEM ohne Zusätze oder DMEM/0,1% FKS) versorgt, die als Zusätze FGF2 (200 ng/ml) und Heparin (10 µg/µl) enthielten. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurde unmittelbar die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert.

2.2.1.7 Doppelfärbung von Zellen mit Hämalaun-Eosin für Übersichtspräparate

Hierzu wurden L6-Zellen auf Teflon-beschichteten Objektträgern angezogen, die Zellen mit PBS gewaschen und für 30 min in Aceton fixiert. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mit den Zellen 10 min in Mayers Hämalaun (0,1% Hämatoxylin, 20% Natriumjodat, 5% Kalialaun, 5% Chloralhydrat und 0,1% Zitronensäure in Aqua bidest.) eingelegt, 5 min in Aqua bidest gespült, 30 min in 0,1% Eosin eingelegt, 5 min mit Aqua bidest gespült und getrocknet.

2.2.2 Differential Display von mRNA durch PCR

2.2.2.1 Einführung in Differential Display-RT-PCR

Differential Display von mRNA durch PCR wurde 1992 von Liang und Pardee beschrieben (Liang und Pardee 1992). Die Methode ermöglicht die Identifizierung differentiell exprimierter Gene. Sie beruht auf dem Vergleich des mRNA-Expressionsmusters zweier oder mehrerer verschiedener Zelltypen oder Gewebe.

Zunächst werden durch reverse Transkription und anschließende PCR die 3'-Enden von mRNA-Molekülen in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Die Analyse der PCR-Produkte aus verschiedenen mRNA-Quellen führt zur Detektion jener cDNAs, die mögliche differentiell exprimierte mRNAs repräsentieren. Diese Produkte werden charakterisiert und die Echtheit ihrer differentiellen Expression überprüft. Das Flussdiagramm in Abbildung 2.1 gibt einen Überblick über die einzelnen Arbeitsschritte.

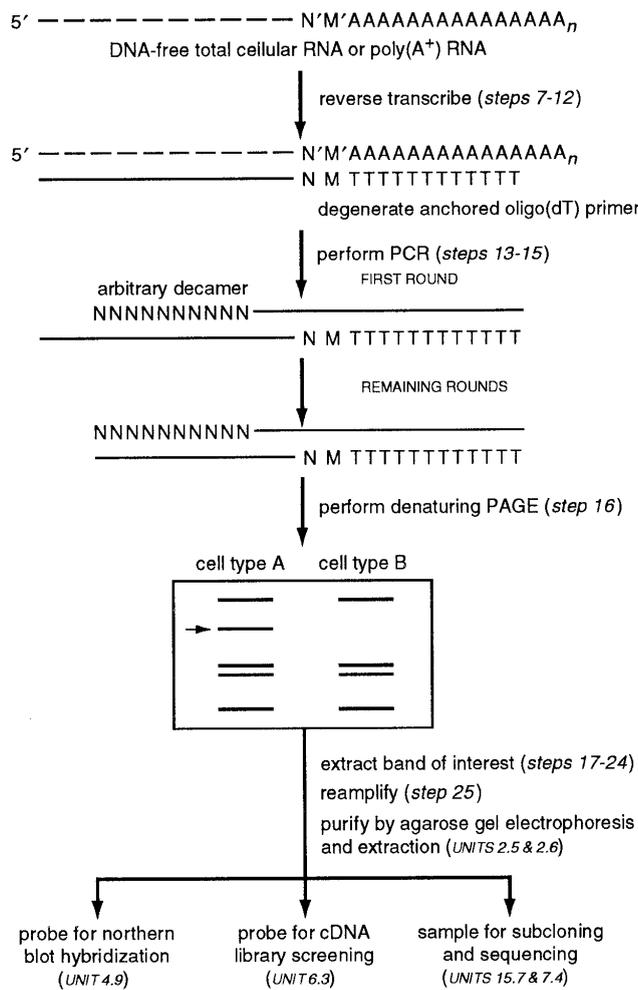


Abbildung 2.1: Darstellung der Differential Display-Technik als Flussdiagramm. Aus DNA-freier RNA werden mit geankerten Oligo-d(T)-Primern und Primern zufälliger Sequenz die 3'-Enden der RNAs in Gegenwart eines radioaktiven Nukleotids amplifiziert. Die Reaktionsprodukte aus den zu vergleichenden RNA-Quellen werden Seite an Seite in Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Reaktionsprodukte nur aus einer Quelle repräsentieren ein mögliches differentiell exprimiertes Gen. Dieses Produkt wird aus dem Gel isoliert, reamplifiziert und als Sonde in Northern Blots verwendet. Aus: „*Current Protocols in Molecular Biology*“.

Wahl der Primer und RT-PCR

Schätzungen zufolge exprimiert jeder Zelltyp zu einem gegebenen Zeitpunkt 10000-20000 verschiedene Gene (Alberts et al.1989). In der Zelle liegen also 10000-20000 unterschiedliche mRNA-Moleküle in stark variierender Anzahl vor. Durch geeignetes Primerdesign und RT-PCR können jene mRNA-Moleküle gefunden werden, die in Zelltyp A aber nicht in Zelltyp B gebildet werden. Da nicht bekannt ist, um welche mRNAs es sich dabei handelt, können genspezifische Primer nicht eingesetzt werden. Durch Verwendung von Primern mit zufälliger Sequenz können die meisten mRNAs (im Idealfall alle) amplifiziert werden. Als Primer für die reverse Transkription werden geankerte Oligo-d(T)-Primer der Form (T)₁₁MN verwendet. M steht für A, C oder G und N steht für A, C, G, oder T. Die beiden Nukleotide M und N ermöglichen ein Anhybridisieren des Oligo-d(T)-Primers am Übergang vom Poly(A)-Schwanz zum 3'-untranslatierten Bereich einer mRNA. Dadurch werden unerwünschte Variationen der Produktlänge durch Bindung des Oligo-d(T)-Primers an zufälligen Stellen innerhalb des Poly(A)-Schwanzes vermieden.

Je nach Wahl der Nukleotide in den Positionen M und N entstehen 12 cDNA-Subfraktionen. So wird der Primer (dT)₁₁**AG** an alle mRNAs hybridisieren, deren Sequenz im Bereich der Poly(A)-Stelle 5'-NNNCT(poly-A)-3' ist. In der Praxis hat sich gezeigt, dass die Spezifität der Reaktion weitgehend durch die Position N bestimmt wird (Liang et al.1993) und die Base an Position M degeneriert sein kann (A, C, G). Damit ist eine Reduktion auf 4 cDNA-Subfraktionen möglich. Bei statistischer Verteilung der vier Basen an Position N sind in jeder cDNA-Subfraktion circa 2500-5000 verschiedene cDNAs zu erwarten. Ein gegebener Primer von 10-25 Nukleotiden Länge mit zufälliger Sequenz wird - unter geeigneten PCR-Bedingungen - an etwa 100-200 dieser cDNAs in einem Abstand von 100-700 Nukleotiden vom Oligo-d(T)-Primer entfernt anhybridisieren (Liang & Pardee 1992, Liang et al.1993). Mit einem Primerpaar (einer der vier Oligo-d(T)-Primer und ein 5'-Primer zufälliger Sequenz) entstehen demnach 100-200 verschiedene und verschieden große PCR-Produkte (letzteres mit der Einschränkung, dass der 5'-Primer bei unterschiedlichen cDNAs in der gleichen Entfernung vom Oligo-d(T)-Primer binden kann. Dadurch entstehen gleich große Produkte unterschiedlicher Identität). Durch Verwendung von 15-30 verschiedenen 5'-Primern zufälliger Sequenz (in Kombination mit den 4 Oligo-d(T)-Primern sind das 60-120 Primerpaare) können von den meisten mRNAs (50%-90%) die 3'-Enden amplifiziert werden.

Analyse der Produkte

Die Detektion differentiell exprimierter mRNAs in zwei RNA-Quellen geschieht mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese. Die radioaktiv markierten PCR-Produkte eines definierten Primerpaares (100-200 verschiedene Fragmente von 100–700 Nukleotiden Länge) aus RNA-Quelle A werden Seite an Seite mit den PCR-Produkten desselben definierten Primerpaares aus RNA-Quelle B aufgetragen und der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Die anschließende Autoradiographie zeigt, dass das Längenmuster (und das Intensitätsmuster) der generierten PCR-Produkte zwischen RNA-Quelle A und B weitgehend identisch ist. Mit dem verwendeten Primerpaar sind demnach aus beiden RNA-Quellen unabhängig voneinander die gleichen mRNAs amplifiziert worden. Hingegen weisen autoradiographische Banden, die nur in einer Spur auftreten, auf eine differentiell exprimierte mRNA zwischen RNA-Quelle A und B hin. Durch exaktes Orientieren von Gel und Autoradiogramm zueinander kann das PCR-Produkt, das nur in einer Spur zu einer Bande führt, im Gel genau lokalisiert werden. Dieses Fragment wird dann aus dem Polyacrylamidgel isoliert und zur Herstellung handhabbarer Mengen mit dem gleichen Primerpaar, mit dem es ursprünglich generiert wurde, reamplifiziert. Nach radioaktiver Markierung wird das Produkt direkt als Sonde in Northern Blot-Analysen verwendet, um die Echtheit seiner differentiellen Expression zu testen.

2.2.2.2 Experimenteller Ablauf

Das in dieser Arbeit durchgeführte Differential Display war eng angelehnt an das von Linskens et al. vorgeschlagene "enhanced differential display" (Linskens et al. 1995). Es beruht auf der Verwendung relativ langer 5'-Primer (22-mer) und stringenteren PCR-Bedingungen als denen von Liang und Pardee beschriebenen. Für die reverse Transkription wurden die 4 Oligo-d(T)-Primer DDRT-A, -C, -G und -T verwendet. Als 5'-Primer dienten die Oligonukleotide "00"-19". Die mRNAs wurden also mit 80 verschiedenen Primerpaaren amplifiziert.

Um falsch positive Fragmente zu erkennen wurde jedes Experiment in unabhängigen Doppelansätzen durchgeführt, beginnend bei der Behandlung der L6-Zellen mit FGF2 (2.2.1.6).

Der experimentelle Ablauf gliederte sich in folgende Teile:

1. DNaseI-Behandlung von Gesamt-RNA.
2. Reverse Transkription
3. PCR
4. Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie
5. Elution differentieller Banden aus dem Polyacrylamidgel
6. Reamplifizierung der Eluate

2.2.2.2.1 DNaseI-Behandlung von Gesamt-RNA

Vor der reversen Transkription wurde die RNA zur Entfernung kontaminierender chromosomaler DNA mit DNaseI inkubiert.

Reaktionsansatz:	20-100	µg	RNA
	0,5	µl	RNasin (40u/µl)
	1	µl	RNase-freie DNaseI (10u/µl)
	5	µl	Tris-HCl, pH 8,3 (0,1M)
	5	µl	KCl (0,5M)
	5	µl	MgCl ₂ (15mM)
	ad. 50	µl	DEPC-H ₂ O

Inkubation: 30 min, 37°C

Danach wurde das Volumen mit DEPC-H₂O auf 200 µl erhöht und mit 400 µl Phenol/Chloroform (3:1) extrahiert. Der Überstand wurde mit 20 µl 3M NaOAc (pH 5,2) und 1 ml absolutem Ethanol vermischt und über Nacht bei -80°C präzipitiert. Anschließend wurde für 20 min bei 4°C und 13000 UpM die RNA zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 75%igem Ethanol gewaschen, für 10-15 min an der Luft getrocknet, in 30 µl DEPC-H₂O aufgenommen und für 15 min bei 65°C gelöst. Um die Intaktheit der RNA zu überprüfen wurden 2 µl der gelösten RNA mit 5 x RNA-Ladepuffer versetzt, 5 Minuten bei 65° inkubiert und in einem formaldehydhaltigen Agarosegel aufgetrennt. Weiterhin wurden 2 µl der gelösten RNA für eine photometrische Mengenbestimmung verwendet.

2.2.2.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden die Oligo-d(T)-Primer DDRT-A, -C, -G und -T eingesetzt sowie die Superscript-II-Reverse Transkriptase von Gibco-BRL verwendet.

Reaktionsansatz:

	1	µg	Gesamt-RNA, DNase-behandelt
	2,5	µl	Oligo-d(T)-Primer, 15 µM
ad.	14	µl	H ₂ O

- 10 min 70°C (Auflösung von Sekundärstrukturen)
- kurz zentrifugieren
- auf Eis dazu geben:

	5	µl	5 x Erststrangpuffer
	2	µl	DTT, 0,1 M
	2	µl	dNTP-Mix, je 250 µM

- 2 min bei 42°C inkubieren (Anhybridisieren des Primers)
- dann dazu geben:

	1	µl	Superscript-II-Reverse Transkriptase (200u/µl)
--	---	----	---

- 50 min 42°C (cDNA-Synthese)
- 15 min 70°C (Enzym-Inaktivierung)

Danach wurde die cDNA in 5 µl-Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2.2.3 PCR

Die PCR wurde in 96-Loch-Platten von Corning-Costar durchgeführt. Der unten aufgeführte Reaktionsansatz wurde als 7-fach Mastermix angesetzt, da mit jedem 5'-Primer 6 RNA-Quellen untersucht wurden (2 mal RNA aus FGFR2-exprimierenden L6-Zellen mit FGF2-Behandlung, 2 mal RNA aus FGFR2-exprimierenden L6-Zellen ohne FGF2-Behandlung und 2 mal RNA aus FGF2-behandelten L6-Zellen, die nur mit dem Expressionsvektor transfiziert worden waren).

Reaktionsansatz:	<u>1 x</u>	<u>7 x</u>
10 x Taq-Puffer	1 µl	7 µl
MgCl ₂ , 50 mM	0,3 µl	2,1 µl
Taq-DNA-Polymerase, Gibco-BRL, 5u/µl	0,2 µl	1,4 µl
dNTP-Mix, je 100 µM	0,75 µl	5,25 µl
5'-Primer "00"-19", 20 µM	0,625 µl	4,4 µl
α- ³⁵ S-dATP, 10µCi/µl	0,1 µl	0,7 µl
cDNA aus Schritt 2 (mit 3'-Primer)	1 µl	-----
H ₂ O	<u>6,025 µl</u>	42,2 µl
	10 µl	

Je 9 µl des 7-fach Master-Mix wurden mit 1 µl cDNA aus Schritt 2 versetzt und einem Tropfen Mineralöl (20-30 µl) überschichtet.

PCR-Profil:	94°C	3 min
	4 x	(94°C 1min, 41°C 90 sek, 72°C 1 min)
	26 x	(94°C 1 min, 60°C 45 sek, 72°C 1 min)
	72°C	5 min

Nach der PCR wurden 3 µl Formamid-Ladepuffer für Polyacrylamidgele zu jeder Probe gegeben.

2.2.2.2.4 Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie

Jeweils 5 µl der PCR-Produkte wurden in denaturierenden (7 M Harnstoff) 6%igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 2 min bei 94°C denaturiert. Durch den Auftrag der PCR-Produkte aus verschiedenen RNA-Quellen Seite an Seite waren differentielle Banden im Autoradiogramm gut zu identifizieren.

Der Gellauf erfolgte für 3-4 h bei 60 W und maximal 1500 V bis die Xylencyanolfrent des Formamid-Ladepuffers die untere Gelgrenze erreicht hatte. Damit waren Produkte im Bereich von 100-700 Nukleotiden Länge optimal aufgetrennt.

Nach dem Gellauf wurde das Gel auf Whatman-Papier plaziert und unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurden mit einer Nadel möglichst dünne Punkte radioaktiver Tinte an mehreren gelfreien Stellen auf das Whatman-Papier aufgetragen. Dadurch war später eine exakte Positionierung des Autoradiogramms auf dem Gel möglich. Die Exposition erfolgte auf Röntgenfilmen für 12-96 h bei -80°C mit Hilfe eines Verstärkerscreens für niedrigenergetische β-Strahler ("Transscreen-LE", Amersham).

2.2.2.2.5 Elution differentieller Banden aus dem Polyacrylamidgel

Hierzu wurde das sich auf Whatman-Papier befindende Gel auf einer waagerechten glatten Unterlage fixiert. Mit Hilfe der Markierungspunkte wurde dann das Autoradiogramm exakt auf dem Gel positioniert und ebenfalls fixiert. Die Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, mit 100 µl H₂O versetzt und 15 min bei RT stehen gelassen. Dann wurde für 15 min bei 100°C gekocht und für 2 min bei 13000 UpM in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 µl 3 M NaOAc (pH 5,2), 2,5 µl Glykogen (20 µg/µl) und 400 µl absolutem Ethanol vermischt. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 13000 UpM wurde das Sediment mit 85%igem Ethanol gewaschen, für 10 min an der Luft getrocknet und schließlich in 10 µl H₂O 1h bei 50°C gelöst.

2.2.2.2.6 Reamplifizierung der Eluate

Reaktionssansatz:	Eluat aus Schritt 5	4	µl
	10 x Taq-Puffer	4	µl
	Taq-DNA-Polymerase, Gibco-BRL		
	5u/µl	0,2	µl
	MgCl ₂ , 50 mM	1,2	µl
	3'-Primer (DDRT-A, -C, -G,-T), 15 µM	2,5	µl
	5'-Primer "00"-19", 15 µM	2,5	µl
	dNTP-Mix, je 1 mM	2	µl
	H ₂ O	<u>23,6</u>	<u>µl</u>
		40	µl

PCR-Profil:	3 min 94°C
	40 x (1 min 94°C, 1min 60°C, 1 min 72°C)
	5 min 72°C

Die Produkte der Reamplifikation wurden auf Agarosegelen analysiert. PCR-Produkte der passenden Größe wurden mit Hilfe von Gelextraktionskits aus dem Gel isoliert und gereinigt.

2.2.3 Hybridisierungsanalysen an cDNA-Arrays

Eine Alternative zum Differential Display besteht in der Hybridisierung von cDNA-Arrays. In dieser Arbeit wurden ATLAS RAT 1.2 ARRAYS von CLONTECH verwendet. Dieser Array ist eine Nylonmembran, auf die 1176 cDNAs als Dots aufgetragen sind. Jeder Dot enthält ca. 10 ng einer einzigen, definierten und bekannten cDNA. Die Analyse der Arrays geschah eng angelehnt an das Protokoll von CLONTECH.

2.2.3.1 Übersicht über den Versuchsablauf und Prinzip des Verfahrens

In Abbildung 2.2 ist der experimentelle Ablauf der Hybridisierungsanalysen an cDNA-Arrays schematisch dargestellt.

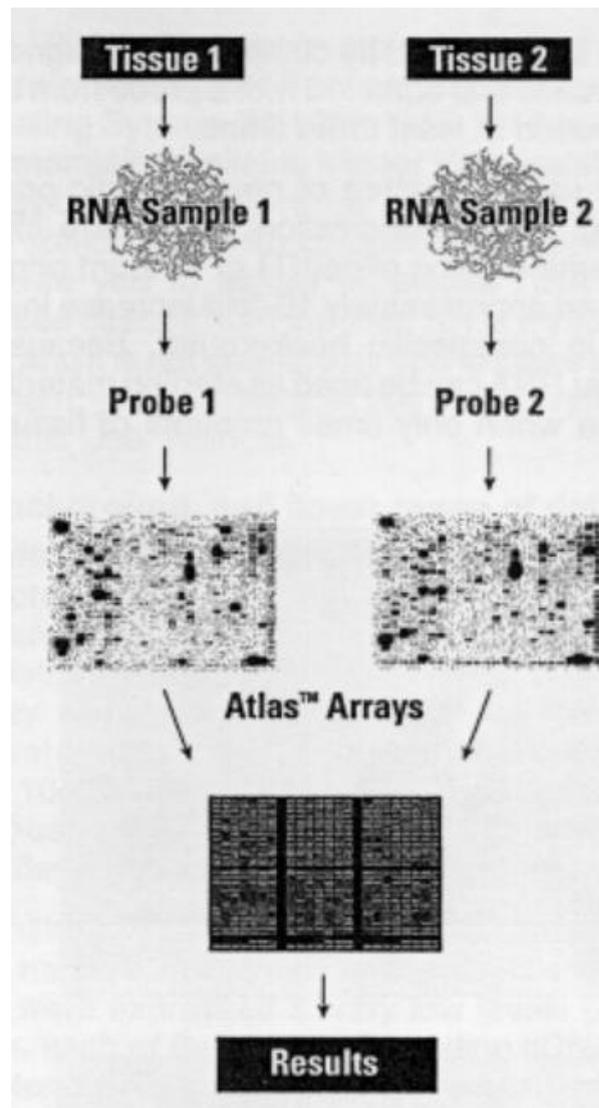


Abbildung 2.2: Hybridisierungsanalysen an cDNA-Arrays. Die mRNAs, die auf dem Array als cDNAs aufgetragen sind, werden aus den zu vergleichenden Quellen in Gegenwart eines radioaktiven Nukleotids revers transkribiert. Die gebildeten Einzelstrang-cDNAs dienen als Sonden zur Hybridisierung der Arrays. Treten Unterschiede im Ausmaß der Hybridisierung an einzelnen cDNA-Dots auf den Vergleichs-Arrays auf, weist dies auf eine differentielle Expression dieses Gens hin. Aus dem Handbuch von CLONTECH zur Hybridisierungsanalyse an ATLAS RAT 1.2 ARRAYS.

Aus L6-Zellen mit und ohne FGF2-Behandlung (2.2.1.6) wurde RNA präpariert. Die RNA wurde mit DNase behandelt und aus ihr die Poly(A)⁺-RNA isoliert. Die reverse Transkription erfolgte in Gegenwart von $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP. Die Primer für die cDNA-Synthese befanden sich in einer als CDS-Mix bezeichneten Lösung (Bestandteil des Kits). Der CDS-Mix enthält 1176 verschiedene Primer, die jeweils komplementär zu den 1176 cDNAs auf dem Array waren. Nach der reversen Transkription wurde die cDNA gereinigt und als komplexe Sonde für die Array-Hybridisierung eingesetzt. Nach der Hybridisierung wurden die Arrays unter Schwenken gewaschen und auf Imaging-Platten für Phosphorimager exponiert. Unterschiedlich starke Hybridisierungssignale an einem Dot auf den Vergleichsarrays wiesen darauf hin, daß die entsprechende mRNA in den Vergleichsquellen verschieden stark exprimiert worden war. Nur Signalunterschiede, die in zwei Array-Hybridisierungen auftauchten, wurden weiter untersucht. Mit Hilfe eines Rasters wurde der entsprechende Dot einer mRNA zugeordnet und mit Hilfe des Programms PRIMER SELECT (DNASar) Oligonukleotide für die RT-PCR entworfen. Die Primer oder RT-PCR-Produkte wurden als Sonden in Northern Blots verwendet, um die differentielle Expression dieser mRNA zu überprüfen. Hierzu wurde die RNA einer zweiten unabhängigen FGF2-Behandlung der L6-Zellen benutzt.

2.2.4 Arbeiten mit DNA

2.2.4.1 DNA-Sequenzierung

Den in dieser Arbeit angewandten Sequenzierungsmethoden liegen die Arbeiten von Sanger zugrunde (Sanger et al.1977, Sanger 1981). Sie sind eine Kombination von enzymatischer Reaktion und elektrophoretischer Auftrennung. Die durch gezielten Kettenabbruch entstehenden Produkte werden radioaktiv markiert und auf langen Gelen aufgetrennt. Nach Autoradiographie kann die Sequenz vom Film abgelesen werden. Bei der Didesoxy-Methode von Sanger dient einzelsträngige DNA als Matrize. Ein Primer mit freier 3'-OH-Gruppe ist komplementär zu einer kurzen Sequenz. Davon ausgehend synthetisiert eine DNA-Polymerase DNA-Stränge. Der Reaktionsansatz wird in vier Aliquots aufgeteilt. Zu jedem Aliquot wird ein Gemisch zugegeben, das Desoxynukleosidtriphosphate aller vier Basen (dNTPs)

und, in einer geringen Konzentration, Didesoxytriphosphate (ddNTPs) von jeweils nur einer der vier Basen enthält. Den Didesoxytriphosphaten fehlt die 3'-OH-Gruppe. Sie werden von der DNA-Polymerase wie die Desoxynucleosidtriphosphate eingebaut, führen dann jedoch zum Kettenabbruch. In jedem Ansatz wird ein anderes ddNTP eingesetzt, so daß alle synthetisierten DNA-Fragmente im jeweiligen Ansatz mit der gleichen Base enden. Durch den statistisch verteilten Kettenabbruch entsteht ein Gemisch aus Fragmenten verschiedener Länge. Alle Fragmente haben das gleiche 5'-Ende, aber verschiedene 3'-Enden.

2.2.4.1.1 Plasmidsequenzierung

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde der "T7 Sequenase"-Kit von Amersham verwendet.

A) Denaturierung

9 µl Plasmid-DNA (entsprechend 0,5-1 µg DNA) wurden mit 1 µl 2N NaOH/2mM EDTA versetzt, gemischt, kurz zentrifugiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 2 µl 3M NaAc, pH 5,2, und 50 µl 100% Ethanol. Nach Mischen und kurzem Zentrifugieren wurde für 15 min bei -70°C gefällt. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 UpM für 15 min. Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, 10 min an der Luft getrocknet und in 7 µl sterilem H₂O bidest aufgenommen.

B) Annealing des T7-Primers

Dem Ansatz aus der Denaturierungsreaktion wurden 2 µl T7 Sequenase Reaktionspuffer und 1 µl Primer T7 (5 µM) zugegeben. Anschließend wurde für 2 min bei 65°C inkubiert und dann langsam (innerhalb von 15-30 min) auf 35°C abgekühlt.

C) Markierung

Die T7-Sequenase wurde mit Verdünnungspuffer 1:8 und der "labelling mix dGTP" mit H₂O 1:5 verdünnt. Je 2,5 µl "dGTP termination mix" mit ddGTP, ddATP, ddTTP und ddCTP wurden auf 4 Reaktionsgefäße verteilt und bei 37°C vorgewärmt.

Anschließend wurde die Markierung durchgeführt:

10	µl denaturierte DNA mit annealtem T7-Primer
1	µl 0,1 M DTT
2	µl verdünnter "Labelling mix dGTP"
0,5	µl α - ³⁵ S-dATP (5 µCi)
2	µl verdünnte T7-Sequenase

Inkubation: 2-5 min bei RT.

D) Termination

Je 3,5 µl aus der Markierungsreaktion wurden in die vorbereiteten Reaktionsgefäße mit den vier ddNTP's pipettiert und 5 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 µl Stopp-Puffer beendet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben für 2 min bei 70°C inkubiert. Je 3µl wurden pro Lauf auf das Gel aufgetragen.

E) Erstellen eines Polyacrylamidgels für die Sequenzierung

Die Glasplatten wurden mit Spülmittel gereinigt, mit destilliertem Wasser nachgespült und die Innenseiten mit absolutem Ethanol geputzt. Die Innenseite der kleinen Platte wurde mit Acrylease (Stratagene), die Innenseite der großen Platte mit Sigmacote (Sigma) beschichtet. Die beiden Platten wurden durch Spacer von 0,4 mm Dicke getrennt und mit Klammern zusammengehalten.

Sequenzgel-Lösung (500 ml):

10 M Harnstoff	350	ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	75	ml (6%ige Gele)
	100	ml (8%ige Gele)
10 x TBE	50	ml
H ₂ O	25	ml (6%)
	0	ml (8%)

60 ml dieser Lösung wurden mit 400 µl APS (10 %) und 30 µl TEMED vermischt und unmittelbar zwischen die Glasplatten gegeben.

Nach 1-2 h war das Gel ausreichend polymerisiert. Vor dem Auftragen der Proben erfolgte ein Vorlauf von 30 bis 60 min bei 1500V.

F) Polyacrylamidgelelektrophorese

Nach Entfernen und umgekehrtem Einsetzen des Kammes wurden die Proben aufgetragen. Das Gel lief bei 60 W und einer Spannung von 1500V. Die vier Proben wurden in der Reihenfolge A-C-G-T auf das Sequenzgel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte je nach Bereich der zu lesenden Sequenz. Nach dem Lauf wurde eine Glasplatte vom Gel abgenommen, das Gel auf Whatman-Papier übertragen und für 1-2 h bei 70°C unter Vakuum getrocknet.

Anschließend wurde das Gel für 1-14 Tage auf Röntgenfilmen exponiert.

2.2.4.1.2 Direkte Sequenzierung von PCR-Produkten

War der Reinheitsgrad und die Homogenität eines PCR-Produktes ausreichend hoch, konnte eine direkte Sequenzierung erfolgen. Hierzu wurde einer der PCR-Primer am 5'-Ende radioaktiv markiert und in einer Sequenzier-PCR eingesetzt. Für die 5'-Endmarkierung wurde die T4-Polynukleotidkinase von Amersham, für die Sequenzierreaktion der "Thermosequenzase cycle sequencing"-Kit, ebenfalls von Amersham, verwendet.

A.) 5'-Endmarkierung des Primers

Reaktionsansatz:

10 µM PCR-Primer	1 µl
γ - ³² P-ATP, 10 µCi/µl	2 µl
10 x Puffer für T4-Polynukleotidkinase	1 µl
H ₂ O	4 µl
Verdünnte T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK)	<u>2 µl</u>

Inkubation: 30 min 37°C, 10 min 65°C

Verdünnung der T4-PNK: 0,5 µl T4-PNK in 4,5 µl Verdünnungspuffer

B.) Sequenzierreaktion

Reaktionsansatz:

DNA	6-12,5	µl
H ₂ O	xx	µl (zusammen mit DNA 12,5 µl)
5'-endmarkierter Primer	1	µl
Reaktionspuffer für		
Thermosequenzase	2	µl
Thermosequenzase	<u>2</u>	<u>µl</u>
	17,5	µl

In 4 Reaktionsgefäße für PCR wurden jeweils 4 µl der Terminationsmische ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP vorgelegt, anschließend mit 4 µl des obigen Reaktionsansatzes vermischt, das Ganze mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und mit folgendem PCR-Programm sequenziert: 2 min 95°C, 35 x (1 min 95°C, 1 min Annealing des Primers, 30 sek 72°C). Anschließend wurden 4 µl Stopp-Lösung zugegeben, 5 min bei 70°C inkubiert und 3 µl auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese der Fragmente geschah wie oben beschrieben.

2.2.4.2 Auftrennung von DNA-Molekülen durch Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Elektrophorese durch Agarosegele dient der Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten. Die aufgetrennten DNA-Banden können durch das fluoreszierende, interkalierende Agens Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.2.4.2.1 Herstellung von Agarosegelen

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Moleküle wurden Agarosekonzentrationen von 0.8%-2% gewählt. Die Agarose wurde durch Erhitzen in TBE-Puffer gelöst und zum Erhärten in einen Gelschlitten gegossen. Ein Plastikkamm mit rechteckigen

Zähnen reichte bis in das Gel. Nachdem das Gel erstarrt war, konnte der Kamm entfernt und in die entstandenen Aussparungen (Slots) die Probe aufgetragen werden.

2.2.4.2 Probenvorbereitung und Durchführung der Elektrophorese

DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumenteil 10 × Proben-Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in 1 × TBE-Puffer bei einer Spannung von 50-100 V und 80 mA. Anschließend wurde das Gel in Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml) für 15-30 min äquiliert und unter UV-Beleuchtung bei 254 nm photographiert.

2.2.4.3 Reinigung von DNA-Fragmenten über Extraktion aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden Gelextraktionskits von Qiagen sowie Macherey & Nagel verwendet. Mit 10 x Proben-Auftragspuffer versetzte DNA-Fragmente wurden in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid (2 µg/ml) gefärbt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell so schmal wie möglich ausgeschnitten und anschließend gemäß den Herstellerangaben aus dem Gel isoliert.

2.2.4.4 DNA-Präzipitation

Für die längerfristige Aufbewahrung oder im Sinne eines Reinigungsschrittes wurde die in der wässrigen Phase enthaltene DNA mit 0.1 Volumenteilen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2-3 Volumenteilen absolutem Ethanol bei -20°C für mindestens 2-3 Stunden gefällt. Die präzipitierte DNA wurde anschließend bei 13000 UpM für 15 min bei RT (Eppendorf-Tischzentrifuge) sedimentiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in einem für die weitere Verwendung geeigneten Volumen aqua bidest oder TE-Puffer aufgenommen.

2.2.4.5 Restriktionsenzymspaltung

Restriktionsendonukleasen sind aus Bakterien isolierte Enzyme, die spezifische Sequenzen doppelsträngiger DNA erkennen und in oder nahe dieser Erkennungssequenzen schneiden, d.h. Doppelstrangbrüche in die DNA einführen. Dabei entstehen entweder stumpfe ("blunt") oder 5'- bzw. 3'-überhängende ("kohäsive") Enden. Die Restriktionsenzymspaltungen dieser Arbeit wurden unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Dabei wurden 1-5 Einheiten (Units) Enzym/ μg DNA eingesetzt und der Verdau für 1,5-2 Stunden bei der vorgeschriebenen Temperatur durchgeführt. Bei Doppelspaltungen wurde zunächst das Enzym verwendet, das die niedrigere Ionenkonzentration benötigte. Nach Einstellen auf die erforderliche höhere Ionenkonzentration wurde die Spaltung mit dem zweiten Enzym angeschlossen.

Das Volumen der zugegebenen Restriktionsendonuklease sollte nicht mehr als 1/10 des gesamten Restriktionsansatzes betragen, da der Aufbewahrungspuffer des Enzyms Glycerin enthält und dies in zu hoher Konzentration die Reaktion stört.

2.2.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR-Technik können Gene, die nur in einer Kopie, bzw. DNA-Fragmente, die nur in geringer Menge vorhanden sind, spezifisch amplifiziert werden. Ein typischer Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 50 μl setzte sich wie folgt zusammen:

<u>Komponenten</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
10 \times PCR Puffer	10 μl	1 \times
10 mM dNTP Gemisch	2 μl	0,2 mM je dNTP
50 mM MgCl_2	3 μl	1,5 mM
10 μM Primer 1	2,5 μl	0,25 μM Primer 1
10 μM Primer 2	2,5 μl	0,25 μM Primer 2
DNA	xx μl	1-50 ng
5 U/ μl Taq DNA Polymerase	0,5 μl	2,5 Units

mit sterilem PCR aqua bidest auf 50 μl auffüllen.

Der Reaktionsansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und die DNA in folgenden Zyklen vermehrt.

PCR-Zyklen:

Denaturierung	94°C
Annealing	40-72°C
Verlängerung	72°C

Die Anzahl der Zyklen, die Zeiten sowie die Annealingtemperaturen wurden auf die jeweils erstellten Fragmente optimiert.

2.2.4.7 Phenol/Chloroformextraktion von DNA

Die Phenol/Chloroformextraktion dient der Entfernung von Verunreinigungen aus DNA-Präparationen, die in wässriger Lösung vorliegen. Das Phenol denaturiert die in der Lösung vorhandenen Proteine und bewirkt deren Ablösung von der DNA. Chloroform trägt zur Denaturierung der Proteine bei, löst außerdem Fette aus der wässrigen Phase heraus und verbessert durch sein hohes spezifisches Gewicht die Trennung der schwereren organischen von der leichteren wässrigen Phase. Bei längerer Lagerung kommt es zur Bildung von Oxidationsprodukten des Phenols, die eine Spaltung der Phosphodiesterbindungen der DNA oder eine Vernetzung der DNA-Moleküle untereinander bewirken können. Die Entstehung der Oxidationsprodukte wird durch Zugabe des Antioxidans 8-Hydroxychinolin zur Phenol/Chloroform-Lösung verhindert.

Zur Extraktion wurde äquilibriertes Phenol pH 8,0 mit dem gleichen Volumen Chloroform und 0,1 % 8-Hydroxychinolin versetzt. Hiervon wurde der gleiche Anteil zu der zu reinigenden DNA-Lösung gegeben. Durch Schütteln erfolgte die Vermischung der Phasen, die anschließend durch Zentrifugation bei RT in der Tischzentrifuge bei 13000 UpM für 5 min wieder voneinander getrennt wurden. Denaturierte Proteine bildeten eine weisstrübe Schicht in der Interphase oder waren zusammen mit Fetten in der unteren organischen Phase gelöst. Die DNA befand sich in der oberen wässrigen Phase. Je nach dem Grad der Verunreinigung wurde mit

dieser Phase die Reinigung mehrfach wiederholt.

2.2.4.8 Photometrische DNA- und RNA-Mengenbestimmung

Das Absorptionsmaximum der DNA liegt bei 260 nm. Wenn man nach einem Strahlendurchtritt dieser Wellenlänge durch eine 1 cm dicke Quarzküvette eine Absorption von 1 misst, so entspricht dies für doppelsträngige DNA einer Konzentration von ca. 50 µg/ml. Der entsprechende Wert für einzelsträngige DNA und RNA ist ca. 40 µg/ml. Für Oligonukleotide liegt er bei 25 µg/ml. Durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums zwischen 310 und 210 nm erhält man Hinweise auf die Reinheit der DNA-Lösung. Dabei sollte insbesondere das Verhältnis A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2 liegen. Eine zu starke Abweichung von diesem Bereich zeigt noch vorhandene Verunreinigungen an.

2.2.4.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA gliederte sich in die folgenden drei Schritte:

1. Wachstum der Bakterien und Vermehrung des Plasmides
2. Lyse der Bakterien
3. Reinigung der Plasmid-DNA

Plasmid-DNA-Präparationen wurden nach Protokollen der Firma Qiagen durchgeführt. Sie beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienzellen mit anschließender Isolation der Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA und Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie. Bei der Abtrennung der Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA macht man sich die unterschiedlichen Eigenschaften beider DNAs zunutze. So werden bei der Denaturierungsreaktion unter alkalischen Bedingungen die Wasserstoffbrückenbindungen sämtlicher bakterieller DNA-Moleküle aufgebrochen. Die komplementären, kovalent geschlossenen, ringförmigen Stränge der Plasmid-DNA können aber nicht voneinander getrennt werden. Diese erhalten bei der anschließenden Renaturierung

ihre native Konfiguration zurück, während die linearen Stränge der hochmolekularen chromosomalen DNA in denaturiertem Zustand verbleiben und somit nicht mehr löslich sind.

2.2.4.9.1 Minipräparation

Minipräparationen wurden mit Qiagen-Säulen durchgeführt, deren Matrix aus Silica-Gel-Membranen besteht. Dies bewirkte eine selektive Adsorption der Plasmid-DNA an die Säulenmatrix unter Hochsalzbedingungen und Elution der DNA von der Säule unter Niedrigsalzbedingungen.

Eine Bakterien-Einzelkolonie wurde in 3 ml LB- oder 2YT-Medium überimpft und bei 37°C für 12-16 Stunden unter Schütteln inkubiert. Die in dieser Arbeit isolierten Plasmide trugen alle ein Ampicillin-Resistenzgen, weshalb dem Medium Ampicillin (50 µg/ml) zugesetzt wurde. Von der Übernachtskultur wurden 1,5 ml für 2 min bei 8000 UpM (Tisch-Zentrifuge) zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 250 µl Puffer P1/RNase A resuspendiert und mit 250 µl Puffer P2 vermischt, was zur Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA führte. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden zur Neutralisierung 500 µl Puffer N3 zugegeben und unmittelbar vermischt. Das Lysat wurde für 10 min bei 13000 UpM in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine Qiagen-Säule geladen und durch Anlegen von Vakuum durch die Säule gezogen. Dabei fand die Bindung der Plasmid-DNA an die Säulenmatrix statt. Anschließend wurde die Säulenmatrix 1 x mit 1 ml Puffer PB und 2 x mit 1 ml Puffer PE durch Anlegen von Vakuum gewaschen. Die Elution der DNA geschah durch Zugabe von 150 µl Puffer PE unter Vakuum.

2.2.4.9.2 Midipräparation

Zur Präparation größerer DNA-Mengen (bis 100 µg) wurden Midipräparationen durchgeführt. Die verwendeten Qiagen-Säulen haben an ihrer Matrix positiv geladene DEAE-Gruppen gebunden, über die negativ geladene Moleküle wie DNA und Proteine zunächst an die Säulenmembran binden. Anschließend werden in pH-abhängigen Reaktionen die verschiedenen gebundenen Bestandteile durch

Verwendung von NaCl-Salzpuffern unterschiedlicher Konzentration differentiell eluiert.

Zum Anziehen einer Vorkultur wurde eine Bakterienkolonie in 3 ml LB-Medium (enthaltend 50 µg/ml Ampicillin) überführt und 7-9 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von der Vorkultur wurden 25-50 µl in 25 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) überführt und die Kultur für 12-18 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Die Bakterienzellen wurden danach durch eine Zentrifugation für 15 min bei 6000 x g und 4°C sedimentiert und in 4 ml Puffer P1/RNase A resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 4 ml Puffer P2 zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 4 ml vorgekühltem Puffer P3 und anschließender Inkubation bei 4°C für 15 min. Dann wurde das Lysat für 30 min bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand enthielt die Plasmid-DNA, der ein weiteres Mal für 15 min bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde auf eine mit 4 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Säule 100 geladen und mit 2 mal 10 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wurde mit 5 ml Puffer QF von der Säule eluiert. Das Eluat wurde mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und für 30 Minuten bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen, erneut für 10 min bei 15000 x g zentrifugiert, anschließend für 5-10 min an der Luft getrocknet und in einer geeigneten Menge TE-Puffer gelöst.

2.2.5 Arbeiten mit RNA

Wegen möglicher Kontaminationen mit schwer zu inaktivierenden RNasen waren beim Arbeiten mit RNA besondere Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten. Wässrige Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt, Kästen für Pipettenspitzen über Nacht in DEPC-haltigem Wasser eingelegt und anschließend autoklaviert und die RNA-Präparationen unter dem Abzug durchgeführt. Beim Arbeiten wurden generell Handschuhe getragen und alle Arbeitsschritte, soweit nicht anders aufgeführt, auf Eis verrichtet.

Diethylpyrocarbonat (DEPC) ethyliert und inaktiviert dadurch Proteine. Hierzu wurde H₂O mit 0,1% DEPC (v/v) kräftig vermischt und über Nacht bei RT inkubiert. Danach wurde das DEPC durch Autoklavieren zerstört, da es sonst nachfolgende enzymatische Reaktionen inhibiert hätte.

2.2.5.1 Isolation der Gesamt-RNA aus Säugerzellen

Zur Präparation der Gesamt-RNA aus L6-Zellen wurde das TRIzol-Reagens der Firma Gibco-BRL verwendet. Es handelt sich dabei um eine Mischung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat und stellt eine Weiterentwicklung der von Chomzynski und Sacchi 1987 beschriebenen Ein-Schritt-RNA-Isolationsmethode dar (Chomzynski & Sacchi 1987). Sie beruht auf der Eigenschaft von RNA, in einer sauren (pH 4) 4 M Guanidiniumisothiocyanatlösung in Anwesenheit einer organischen Phenol/Chloroform-Phase wasserlöslich zu bleiben, während sich Proteine, DNA und Fette in der organischen Phase und der Interphase befinden. Guanidiniumisothiocyanat ist eine der stärksten proteindenaturierenden Agentien. Seine Anwendung wurde ursprünglich entwickelt, um RNA aus Zellen mit hohem RNase-Gehalt zu isolieren (Chirgwin *et al.*, 1979).

Nachdem das Medium abgesaugt war, wurden pro

50 ml Kulturflasche und 6 cm Kulturschale	1 ml TRIzol
94 mm Kulturschale	2 ml TRIzol
145 mm Kulturschale	5 ml TRIzol

auf dem Zellrasen homogen verteilt. Das Zellysate wurde mehrfach resuspendiert und jeweils 1 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der folgenden Inkubation für 5 min bei RT wurden pro ml eingesetztem TRIzol 0,2 ml Chloroform zugegeben, die Mischung für 15 sek heftig geschüttelt und 3 min bei RT stengelassen. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 13000 UpM in der Tischzentrifuge, in dessen Verlauf die Mischung in eine untere organische Phase, eine Interphase und eine obere wässrige Phase separiert wurde, die die zu isolierende RNA enthielt. Die obere Phase wurde abgezogen und die RNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro ml eingesetztem TRIzol präzipitiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei RT erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 13000 UpM in der Tischzentrifuge. Anschließend wurde die RNA mit 75%igem Ethanol gewaschen, 15 min an der Luft unter dem Abzug getrocknet und in einem geeignetem Volumen DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Die Lagerung der RNA fand bei -70 °C statt.

2.2.5.2 Präparation von Poly(A)⁺-RNA aus Gesamt-RNA

Die meisten eukaryotischen mRNAs tragen am 3'-Ende einen 20-250 Nu langen Poly(A)-Schwanz. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um aus einer Gesamt-RNA-Präparation selektiv die mRNA zu isolieren.

Zur mRNA-Isolation wurde der Oligotex-mRNA-Isolationskit von Qiagen verwendet. Das Produkt enthält in einer als Oligotex-Suspension bezeichneten Mischung kugelige Polystyren-Latex-Partikel mit einheitlichem Durchmesser (1,1 µm), an die dT₃₀-Oligonukleotide kovalent gebunden sind. Über letztere erfolgt unter Hochsalzbedingungen die Bindung polyadenylierter mRNA an die Latex-Partikel. Nach Waschschriffen zur Entfernung nicht polyadenylierter RNA-Spezies wird die Poly(A)⁺-mRNA durch Erniedrigung der Salzkonzentration von den Oligo-dT-Partikeln freigesetzt.

2.2.5.3 Northern Blot-Analyse

2.2.5.3.1 Auftrennung von RNA in formaldehydhaltigen Agarosegelen

Gesamt-RNA oder Poly(A)⁺-RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem Formaldehyd/Agarose-Gel aufgetrennt. Die denaturierende Wirkung des Formaldehyds war nötig, um Sekundärstrukturen in der einzelsträngigen RNA aufzulösen, die ansonsten eine schlechtere elektrophoretische Auftrennung bewirkt hätten.

Für ein 1,2%iges denaturierendes Agarose/Formaldehyd-Gel wurden 125 ml der folgenden Gelösung hergestellt: 1,5 g Agarose wurden in 12,5 ml 10 x MOPS-Puffer und 110 ml DEPC-behandeltem Wasser unter Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf 65 °C erfolgte die Zugabe von 2,25 ml 37%igem Formaldehyd. Die Gellösung wurde auf einen Gelträger gegossen und durch das Einsetzen eines Kammes am oberen Ende beim Festwerden Taschen für die RNA-Proben gebildet. Als Laufpuffer wurden 1,2 l einer Mischung aus 120 ml 10 x MOPS, 24 ml 37%iges Formaldehyd und 1056 ml DEPC-behandeltem Wasser verwendet. Vor dem Auftragen der RNA-Proben wurde zu diesen die entsprechende Menge 5 x RNA-Ladepuffer für Formaldehyd/Agarose-Gele gegeben, der unter anderem zur späteren Visualisierung

der RNA unter UV-Licht Ethidiumbromid enthielt. Um Sekundärstrukturen aufzulösen, wurde die RNA vor dem Auftragen für 5 min bei 65 °C erhitzt. Der Gellauf erfolgte für 4 h bei 80-100 V. Als Richtwert für die Dauer des Gellaufs diente generell die Laufstrecke der Bromphenolblaufront: Sie sollte ca. 2/3 - 3/4 der Gellänge betragen. Um beim Gellauf entstehende pH-Gradienten zwischen den Elektroden zu kompensieren, wurde der Ladepuffer zweimal zwischen den Elektroden umgepumpt. Nach dem Gellauf wurde das Gel unter UV-Licht photographiert, die Laufstrecken der 28S-, 18S- und 5S-rRNA notiert und das Gel für den anschließenden Northern Blot weiterbehandelt.

2.2.5.3.2 Northern Blot

Der Northern Blot ist der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter RNAs vom Gel auf eine Membran. Die Membran trägt nach dem Transfer eine Reproduktion des Bandenmusters auf dem Gel. Das Gel wurde zur Entfernung des Formaldehyds für 5 min bei RT in DEPC-behandeltem Wasser und anschließend für 30 min in 10 x SSC geschwenkt. Auf das so vorbehandelte Gel wurde eine angefeuchtete Nylonmembran gelegt (Hybond-N+, Amersham), wobei durch das Auflegen von trockenem, saugfähigem Filterpapier auf die Membran durch Kapillarkräfte ein Pufferfluss durch das Gel hin zur Membran erzeugt wurde. Als Transferpuffer wurde 10 x SSC verwendet. Der Transfer erfolgte stets über Nacht. Danach wurde die RNA durch zweistündiges Backen bei 80°C auf der Membran fixiert. Gelagert wurde die Membran trocken, in Folie eingeschweisst und bei 4°C.

2.2.5.3.3 Radioaktive Markierung von DNA-Proben

Die Markierung von DNA-Proben für die Hybridisierung erfolgte unter Verwendung des *random prime labelling*-Kit von Gibco-BRL nach Angaben des Herstellers. Bei Vorliegen spezifischer Primer war eine radioaktive Markierung durch PCR möglich. Bei Verwendung von $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10 μCi = 1 μl) betrug der Anteil des nichtradioaktiven dCTP im dNTP-Mix 1/10 dessen von dATP, dGTP und dTTP. Bei Verwendung von Oligonukleotiden als Sonden wurden diese durch 5'-Endmarkierung

mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase radioaktiv markiert (siehe Abschnitt 2.2.4.1.2, „Direkte Sequenzierung von PCR-Produkten“).

2.2.5.3.4 Reinigung radioaktiv markierter DNA-Proben

Die Reinigung der DNA-Proben zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide nach der Markierung erfolgte durch eine Ethanol-fällung mit $\frac{1}{2}$ Volumen 7,5 M Ammoniumacetat (bei Oligonukleotiden $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2), $\frac{1}{20}$ Volumen Glykogen (20 mg/ml) als Carrier-Substanz und dem dreifachen (Oligos: achtfachen) Volumen Ethanol. Das Präzipitat wurde mit 85%igem Ethanol gewaschen und in 100 μ l TE-Puffer für 15 min bei 65°C gelöst. Vor Zugabe zur Membran wurde die DNA für 5 min bei 100°C denaturiert.

2.2.5.3.5 Hybridisierung von RNA auf Northern Transfermembranen mit radioaktiv markierten DNA-Proben

Um spezifische RNA-Sequenzen, die auf eine Membran übertragen waren, nachzuweisen, wurde diese mit einer zur nachzuweisenden Sequenz komplementären, radioaktiv markierten DNA-Probe hybridisiert. Unspezifische Bindungen wurden durch mehrmalige Waschschriffe danach gelöst.

Nach Fixierung der RNA auf der Membran wurde diese für mindestens 4 Stunden bei 42°C in Hybridisierungslösung (1ml/10cm² Membran) und 100 μ g denaturierter Fisch-Sperma-DNA inkubiert. Zu der Hybridisierungslösung (bei Verwendung von Oligo-Sonden enthielt die Hybridisierungslösung kein Formamid) wurde dann die radioaktiv markierte DNA-Probe nach vorheriger Denaturierung zugegeben. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte bei 42°C über Nacht. Im Anschluss daran wurde die Membran mit zunehmender Stringenz (abnehmende SSC-Konzentration und zunehmende Temperatur) gewaschen:

2 x15 Minuten	bei 45°C mit	2	× SSC / 0.1% SDS
2 x 15 Minuten	bei 45°C mit	1	× SSC / 0.1% SDS
2 x 15 Minuten	bei 45°C mit	0,5	× SSC / 0.1% SDS
2 x30 Minuten	bei 60°C mit	0,1	× SSC / 0.1% SDS

Anschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweisst und auf einem Röntgenfilm oder einem Phosphorimager-Screen exponiert.

2.2.6 Klonierungen in Bakterienzellen

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurde der „pMOS*Blue*-blunt ended cloning“-Kit der Firma Amersham eingesetzt. Vor der Ligation wurden überhängende Einzelstrangbereiche des zu klonierenden Fragmentes durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt und die 5'-Enden durch Polynukleotidkinase phosphoryliert. Anschließend wurde die DNA in den linearisierten (glatte Enden) und dephosphorylierten pMOS*Blue*-Vektor ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in kompetente Bakterienzellen eingeschleust und dort vermehrt. Der pMOS*Blue*-T-Vektor besteht aus 2887 Bp und enthält neben einem Replikationsursprung ein Gen, das für die Resistenz gegenüber Ampicillin codierte und denjenigen Anteil des *lacZ*-Gens, der für den aminoterminalen Bereich der β -Galaktosidase codiert. Innerhalb dieses Gensegments lag eine *EcoRV*-Schnittstelle, über die der Vektor linearisiert ist. Dadurch ist die codierende Region unterbrochen. Im Kit sind außerdem kompetente *E.coli*-Zellen enthalten. Sie tragen ein F'-Plasmid, auf dem unter anderem die Gene für Tetracyclinresistenz und *lacZDM15* liegen. Im Gen *lacZDM15* sind die Codons für die Aminosäuren 11-41 deletiert. Nach Expression des Gens entsteht daher eine enzymatisch inaktive β -Galaktosidase. Wird in einer Zelle zusätzlich der auf dem pMOS-Vektor codierte aminoternale Anteil der β -Galaktosidase exprimiert, dann assoziieren die beiden Proteinfragmente zu einer funktionstüchtigen β -Galaktosidase (Prinzip der α -Komplementation). Diese setzt das Substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktosid) zu einem blauen Farbstoff um. Unter Selektion mittels Ampicillin und Tetracyclin konnten nur Zellen Kolonien bilden, die zum einen das F'-Plasmid nicht verloren und zum anderen das pMOS*Blue*-Plasmid aufgenommen

hatten. Waren die Kolonien weiss, dann war durch Ligation eines Inserts in den pMOS*Blue*-Vektor der hier codierte *lacZ*-Anteil unterbrochen, wodurch in den Zellen nach Induktion der *lacZ*-Transkription mittels Isopropylthiogalaktosid (IPTG) eine funktionierende β -Galaktosidase fehlte. Die Zellen der blauen Kolonien trugen kein Insert im Vektor.

2.2.6.1 Vorbereitung der DNA und Ligation

Auffüllen der Enden und Phosphorylierung des Inserts:

10 x <i>polishing kinase</i> Puffer	1	μ l
100 mM DTT	0,5	μ l
<i>polishing kinase</i> Enzym-Mix	1	μ l
DNA (10-100 ng) + H ₂ O	<u>7,5</u>	μ l
	10	μ l

Der Ansatz wurde 40 min bei RT inkubiert, kurz zentrifugiert, 10 min bei 75°C erhitzt, 2 min auf Eis abgekühlt, wiederum kurz zentrifugiert und mit Vektor und Ligase wie folgt vermischt:

Dazu:	pMOS <i>Blue</i> -Vektor (50 ng)	1	μ l
	T4-DNA-Ligase	<u>1</u>	μ l
		12	μ l

Inkubation: 2 h - über Nacht bei RT

2.2.6.2 Vorbereitung der Agarplatten

Zur Herstellung von Agarplatten wurden 1,5 g Bactoagar in 100 ml LB- oder 2YT-Medium unter Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurden pro ml 50 μ g Ampicillin, 15 μ g Tetracyclin, 25 μ g X-Gal und 25 μ g IPTG zugesetzt. Von diesem Gemisch wurden ca. 15 ml luftblasenfrei auf eine Bakterienplatte gegossen (Durchmesser: 82 mm).

2.2.6.3 Transformation kompetenter E.coli-Zellen und Ausplattierung

Für jeden Transformationsansatz wurden 20 µl MOS*Blue*-kompetente Zellen verwendet. Die Zellen wurden bei 4 °C aufgetaut und mit 1 µl des oben genannten Ligationsansatzes vorsichtig vermischt. Das Gemisch wurde für 30 min bei 4 °C belassen, was eine Anlagerung der einzuschleusenden DNA an die Bakterienzellen ermöglichte. Anschließend erfolgte eine Hitzeschockbehandlung für 40 sek bei 42 °C, was zur Aufnahme der DNA in die Zellen führte. Danach wurden die Zellen für 2 min auf Eis belassen und mit 80 µl SOC-Medium (RT) versetzt. Vor dem Ausplattieren auf die vorbereiteten Platten wurden die Zellen 1h bei 37 °C auf dem Schüttler mit 150-180 Upm inkubiert, was ihnen ermöglichte, die Resistenzgene gegen die beiden verwendeten Antibiotika zu exprimieren. Von dem Transformationsansatz wurden 50 µl tropfenweise auf eine Agarplatte verteilt und mit einer sterilen Glaspipette ausgestrichen. Damit sich kein Kondenswasser auf dem Agar sammeln konnte, wurden die Platten umgedreht bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.6.4 Untersuchung der erhaltenen Klone

Bei gelungener Transformation waren auf den Agarplatten am nächsten Tag weisse und blaue Kolonien zu sehen. Wie oben dargestellt, konnten nur die Zellen der weissen Kolonien Insert-DNA im pMOS-Vektor enthalten. Die weissen Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen, in 3 ml LB-Medium überführt, das mit 25 µl Ampicillin (10 mg/ml) versetzt worden war und für eine Plasmid-Präparation angezogen. Eine Selektion durch Tetracyclin war ab hier nicht mehr nötig, da die Klone mit Insert bereits identifiziert worden waren.

2.2.7 Arbeiten mit Proteinen

2.2.7.1 Proteinisolation mit RIPA-Puffer

L6-Zellen wurden auf 94mm-Kulturschalen angezogen, zweimal mit PBS (RT) gewaschen und auf Eis gestellt. Zur RIPA-Stammlösung (1 x PBS, 1% NP-40, 0,1% SDS) wurden vor der Zellyse pro ml 1 μ l Aprotinin (10 mg/ml) und 20 μ l Na-Orthovanadat (50 mM) gegeben (RIPA-Gebrauchslösung). Von der bei 4°C vorgekühlten RIPA-Gebrauchslösung wurden 600 μ l auf der Kulturschale verteilt, die Zellen abgeschabt, das Lysat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt, die Kulturschale mit 300 μ l RIPA-Gebrauchslösung nachgespült und zu dem gesammelten Zellysat 10 μ l bei 37°C vorgewärmtes PMSF (10 mg/ml in Isopropanol) pro ml RIPA-Puffer zugegeben. Das Lysat wurde mehrfach resuspendiert und 30-60 min bei 4°C stehen gelassen. Anschließend wurde für 30 min bei 4°C und 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Von dem Überstand wurden 200 μ l entnommen und mit 1 ml absolutem Ethanol vermischt, über Nacht bei 4°C die Proteine gefällt und anschließend durch Zentrifugation bei 4°C und 13000 UpM für 10 min sedimentiert. Das Sediment wurde für 15 min bei RT getrocknet und in 20 μ l Probenpuffer für 5 min bei 37°C gelöst. Vor dem Auftragen auf das Proteingel wurden die Proben 5 min bei 100°C gekocht und anschließend auf Eis gelagert.

2.2.7.2 Präparation von Plasmamembranen durch diskontinuierliche Gradientenzentrifugation

L6-Zellen wurden auf zwei 145mm-Kulturschalen angezogen, abtrypsiniert, zweimal mit 5 ml 0,9% NaCl (4°C) gewaschen und in 1 ml 0,9% NaCl (4°C) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml 1 mM ZnCl₂ vermischt, für 10 min bei RT inkubiert und dann auf Eis mit einem *Dounce* Homogenisator durch ca. 150 Stöße aufgebrochen. Das Zellysat wurde vorsichtig auf einen bereits gebildeten Sucrosegradienten gegeben, der zur Vermeidung einer Durchmischung auf Eis gelagert wurde.

Der erste Gradient bestand aus 7 ml 47%, 6 ml 43%, 5 ml 40% und 3 ml 35% Sucrose, gelöst in 25 mM Imidazol/ 1 mM EDTA pH 7,4. Verwendet wurden 26 ml Corexröhrchen, geeignet für Ultrazentrifugationen und ein Ti55-Beckman-Ultrazentrifugenrotor. Die Austarierung der Röhrchen hatte auf 0,050 g genau zu sein, der Flüssigkeitsmeniskus in den Röhrchen musste den Röhrchenhals erreichen. Der erste Gradient wurde 30 min bei 1500 g (4300 UpM) zentrifugiert. Die Membranfraktion haftete konvexförmig an der Röhrcheninnenwand im Bereich der 40%- und 43%-Fraktion. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig abgesaugt, das Plasmamembransediment in 35% Sucrose gelöst und für 15 min bei 6000 g (8500 UpM) sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Sediment in 4 ml 35% Sucrose gelöst und zur weiteren Aufreinigung auf folgenden Gradienten geschichtet: 8 ml 60%, 7 ml 55% und 6 ml 40% Sucrose. Der zweite Gradient wurde 1 h bei 90000 g (33000 UpM) zentrifugiert. Die 55%-Fraktion (enthaltend die Plasmamembranen) wurde abgenommen, in ein frisches Röhrchen überführt, auf 35% Sucrose verdünnt, 30 min bei 10000 g (11000 UpM) zentrifugiert, das Sediment in 500 µl 10% Sucrose gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.7.3 Bestimmung der Proteinmenge

Hierzu wurde das Bradford-Reagenz von Biorad verwendet. Bradford's Reagenz wurde 1:5 mit Wasser verdünnt und filtriert. Für die Ermittlung von Eichwerten wurde BSA auf Werte zwischen 0,05 – 0,5 mg/ml verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden 100 µl mit 1 ml filtriertem Bradford-Reagenz vermischt und nach 5-60 min die OD bei 595 nm gemessen. Für die Messung der Proben wurde 1-10 µl Lysat mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt mit 1 ml Bradford-Reagenz vermischt und wie oben gemessen. Als Leerwert wurde 1-10 µl Lysepuffer wie die Proben behandelt.

2.2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei dieser Methode handelt es sich um ein analytisch-präparatives Verfahren zur Trennung von Proteinen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte. Die Proteine werden durch die dem Polyacrylamidgel zugesetzten amphipatischen SDS-

Moleküle (Natriumdodecylsulfat) denaturiert und bilden mit diesen einen negativ geladenen Protein-SDS-Komplex, dessen Gesamtladung der Größe des Proteinmoleküls proportional ist. Im elektrischen Feld des SDS-Polyacrylamidgels bewegen sich die Proteinkomplexe daher zur Anode hin. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ist proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes und wird durch die Konzentration des Polyacrylamids im Gel (Porengröße) und die angelegte Spannung bestimmt. Vor der Auftrennung der Proteine im Trenngel werden die Proben in einem vorgeschalteten Sammelgel konzentriert. Da das Verfahren nur relative Werte liefert, muß das Gelsystem geeicht werden, indem Standardproteine mit bekanntem Molekulargewicht mit aufgetrennt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die SDS-PAGE unter Verwendung von 7.5% Polyacrylamidgelen und 1x Laufpuffer durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 80 V für 3 Stunden.

2.2.7.4.1 Anfertigung eines Gels

Zwischen zwei saubere, mit Ethanol entfettete Glasplatten, wurden Trennsteg (Spacer) gelegt und die Platten fixiert. Die Trenngel-Lösung wurde bis auf eine Höhe von 2,5 cm unterhalb des kammerseitigen Glasplattenrandes zwischen die Glasplatten gegossen. Um eine glatte Trennschichtoberfläche zwischen Sammelgel und Trenngel zu erhalten, wurde das noch nicht polymerisierte Trenngel mit aqua bidest überschichtet. Nach etwa 30 min war das Gel polymerisiert, das Wasser wurde entfernt und das Sammelgel über das Trenngel geschichtet. Ein Plexiglaskamm mit rechteckigen Zähnen wurde in das noch flüssige Sammelgel geklemmt. Nach 15 min war das Sammelgel polymerisiert und der Kamm wurde entfernt.

2.2.7.4.2 Färben von SDS-Polyacrylamidgelen nach der Elektrophorese

Durch Anfärben des Gels nach einer SDS-PAGE können die Proteine der aufgetrennten Proben sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Proteine zunächst für 30 min in 20% TCA fixiert. Anschließend wurde das Gel 3 mal 20 min mit aqua

bidest gewaschen, dann 15-30 min in Coomassieblau-Färbelösung geschüttelt und dann für 3-4 Stunden in Coomassie-Entfärbelösung, bei mehrmaligem Wechsel derselben, geschwenkt. War die überschüssige Farbe aus dem Gel entfernt, wurden die Proteinbanden sichtbar und das Gel gewässert. Zum Schluß wurde das Gel im Geltrockner auf Chromatographiepapier, bedeckt durch Klarsicht-Haushaltsfolie, getrocknet.

2.2.7.5 Western-Blot

Das Gel wurde für 15 min in Transferpuffer gelegt. Die Transfermembran (PVDF Böhlinger) und zwölf Whatman-Papiere wurden auf Gelgröße zugeschnitten. Die Whatman-Papiere wurden in Transferpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde 1-2 sek in Methanol, dann einige sek in aqua bidest und schließlich bis zum Blotaufbau in Transferpuffer gelegt. Der Transfer geschah mit Hilfe der semi-dry-Transfer Apparatur von Biorad. Die Anode (untere Platte) wurde mit Transferpuffer befeuchtet und sechs in Transferpuffer befeuchtete Whatman-Papiere luftblasenfrei aufgelegt. Hierauf wurden ebenfalls luftblasenfrei die PVDF-Membran, das Gel und weitere sechs angefeuchtete Whatman-Papiere platziert. Der Transfer wurde mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Membran und maximal 25 V für 120 min durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran 1 h bei RT in Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Rabbit-Anti-FGFR2-Antikörper (Santa Cruz AK C-17, $2 \mu\text{g/ml}$ Blockierungslösung) inkubiert. Danach wurde die Membran 3 mal 10 min in TBST gewaschen. Als Zweitantikörper wurde der Peroxidase-gekoppelte Anti-Rabbit-Antikörper aus dem ECL-Kit von Amersham verwendet. Die Inkubation der Membran mit dem Zweitantikörper geschah in einer 1:1000-Verdünnung in Blockierungslösung für 2 h bei RT. Danach wurde die Membran wiederum 3 mal 10 min in TBST gewaschen und die Chemolumineszenz gemäß den Angaben des ECL-Protokolls detektiert.

3 Ergebnisse

3.1 Vorbemerkungen zu den experimentellen Ansätzen

Die Bearbeitung der Fragestellung nach *downstream*-Genen von FGF-Rezeptor Typ 2 geschah mit Hilfe der Rattenmyoblastenzelllinie L6, die mit der FGFR2-cDNA transfiziert wurde. L6-Zellen schienen für die Experimente geeignet, da sie ihre endogenen FGFR-Gene nicht exprimieren. Die Transfektion der Zellen mit der humanen FGFR2-cDNA im Expressionsvektor pcDNA3 lieferte stabile FGFR2-exprimierende L6-Klone. Die Zellen dieser Klone wurden als Ausgangsmaterial für die Suche nach FGFR2-regulierten Genen verwendet. Das Grundprinzip der hierfür angewandten Methoden war der Vergleich der RNA-Expression zwischen FGF2-behandelten und unbehandelten Zellen desselben Klons. Unterschiede der Expression bestimmter RNAs sollten auf dem einzigen Unterschied in der Behandlung der Zellen beruhen, das heißt dem Vorhandensein des Liganden FGF2 und damit der Aktivierung von FGF-Rezeptor 2. Der Vergleich der RNA-Expression wurde mit zwei Methoden durchgeführt: dem auf RT-PCR basierenden Differential Display (ddPCR) und der Hybridisierungsanalyse an kommerziellen cDNA-Arrays (Clontech). Alle zunächst mit diesen Techniken identifizierten Kandidatengene wurden anschließend in Northern Blots auf die Echtheit ihrer FGFR2-bedingten differentiellen Expression hin getestet. Die RNA für die ddPCR- und Array-Analysen einerseits und für die Northern Blots andererseits stammte aus jeweils separaten Zellbehandlungen. Das Flussdiagramm in Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die Versuchsabläufe.

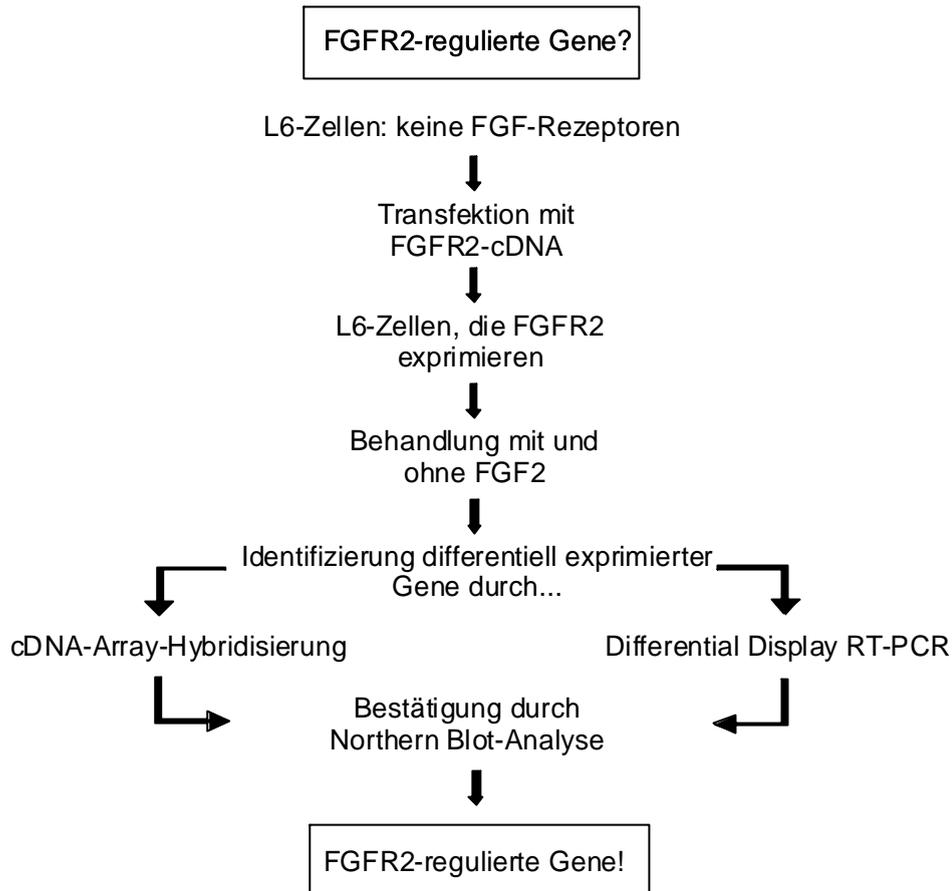


Abbildung 3.1: Überblick über die experimentellen Systeme und Versuchsabläufe zur Identifizierung von durch FGFR2 regulierten Genen.

3.2 Herstellung von FGFR2-exprimierenden L6-Zellen

Die verwendete FGFR2-cDNA codierte für die Spleissvariante IIIc von FGFR2 (*bacterially expressed kinase*, BEK). BEK ist der in Cranialsuturen exprimierte FGFR2-Subtyp. Der translatierte Anteil der FGFR2-cDNA war über HindIII-Schnittstellen in den Expressionsvektor pcDNA3 ligiert. Abbildung 3.2 zeigt eine schematische Darstellung des transfizierten pcDNA3-BEK-Konstruktes.

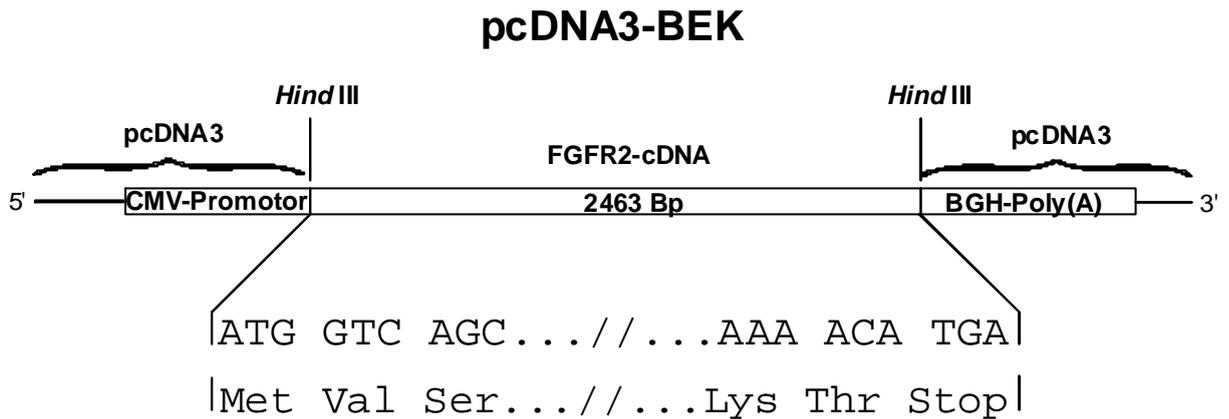
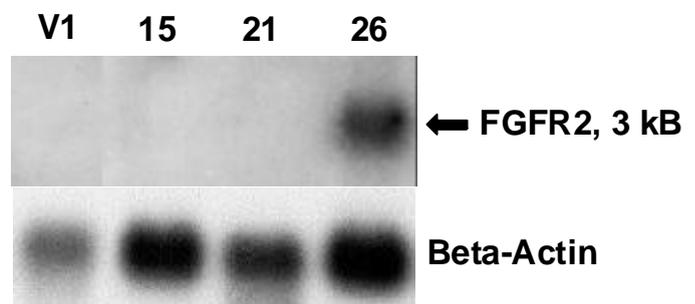


Abbildung 3.2: Schema des pcDNA3-BEK-Konstruktes. Die in den Vektor ligierte cDNA beginnt unmittelbar mit dem Translationsstartcodon ATG und endet mit dem Stopcodon TGA. Die ersten 9 Nukleotide und die daraus abgeleiteten Aminosäuren sind angegeben. CMV-Promotor: Promotor des Cytomegalievirus; BGH-Poly(A)-Signal: Polyadenylierungssignal des *bovine growth hormone*-Gens.

Zur besseren Ausbeute stabil transfizierter Zellen wurde das FGFR2-pcDNA3-Konstrukt vor der Transfektion mit BsmI linearisiert. Transfizierte Zellen wurden durch Geneticin-Zugabe zum Medium selektioniert, da pcDNA3 ein Geneticin-Resistenzgen trägt. Die Transfektanden wurden subkloniert und die insgesamt 28 Einzelklone auf BEK-mRNA-Expression getestet. Abbildung 3.3 zeigt den Northern Blot mit dem einzigen BEK-positiven Klon 26, der im folgenden als BEK26 bezeichnet wird und mit dem die Differential Display-Analysen durchgeführt wurden.

Abbildung 3.3: Autoradiogramm des Northern Blots zur Überprüfung auf BEK-mRNA-Expression. Klon 26 („BEK26“) exprimiert die etwa 3 kB große BEK-mRNA. Die Klone 15 und 21 sind negativ. Als Sonde wurde die ³²P-markierte BEK-cDNA verwendet. V1: L6-Zellen, die nur mit pcDNA3 transfiziert worden waren.



Um das FGFR2-Protein in BEK26-Zellen nachzuweisen, wurden in Immunoblotanalysen BEK26-Zelllysate mit Hilfe von 3 verschiedenen Anti-FGFR2-Antikörpern unter-

sucht: einem polyklonalen Ziege-Anti-FGFR2-Antikörper, freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von J. Heath, Birmingham, U.K. zur Verfügung gestellt, dem monoklonalen Maus-Anti-FGFR1, -2 und -3 Antikörper GR21 von Calbiochem-Novabiochem und dem polyklonalen Hase-Anti-FGFR2-Antikörper C17 von Santa Cruz Biotechnologies. In keinem dieser Experimente war das FGFR2-Protein nachweisbar. Anzumerken ist, dass mit den beiden erstgenannten Antikörpern FGFR2 aber auch in den später generierten FGFR2-positiven L6-Klonen WT26, WT37 und WT44 (s. Abbildung 3.8) nicht nachweisbar war.

Die Immunoblotanalysen an Gesamtlysaten von BEK26-Zellen legten nahe, dass die Translation der BEK-mRNA möglicherweise wenig effizient war. Untersuchungen von M. Kozak an 699 verschiedenen Vertebraten-mRNAs hatten gezeigt, dass der Sequenzkontext, in dem sich ein ATG-Startcodon befindet, mitbestimmen kann, wie effizient dieses als Startcodon der Translation benutzt wird. Die Initiation der Translation findet demnach umso effizienter statt, je größer die Übereinstimmung des Sequenzkontextes um das ATG-Codon mit einem Konsensusmotiv ist, das auch als Kozak-Motiv bezeichnet wird (Kozak 1986, 1987 a und b, 1991, 1996). In diesem Sinne war der Sequenzkontext um das ATG-Translationsstartcodon im pcDNA3-BEK-Konstrukt nicht optimal (Abbildung 3.4).

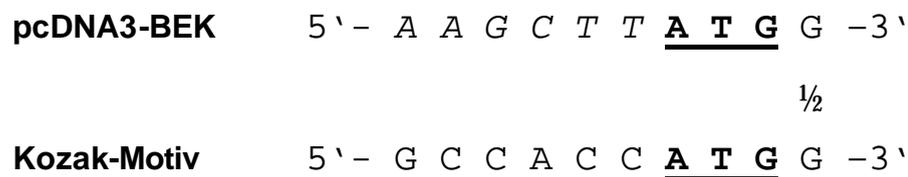


Abbildung 3.4: Vergleich der Sequenzen um das ATG-Translationsstartcodon in dem Konstrukt pcDNA3-BEK mit dem Kozak-Motiv. Die kursiv gedruckten Nukleotide sind Vektorsequenz aus pcDNA3. Das einzige mit dem Kozak-Motiv übereinstimmende Nukleotid im pcDNA3-BEK-Konstrukt ist durch einen vertikalen Balken markiert.

Die Annahme zugrundelegend, dass mit der Optimierung des Sequenzkontextes um das ATG-Codon die Translationsrate der BEK-mRNA gesteigert werden würde, wurden anschließend FGFR2-exprimierende L6-Zellen mit Hilfe eines veränderten pcDNA3-BEK-Konstruktes generiert. Hierzu wurde die BEK-cDNA mit den Primern FR2Kpn und FR2Bam reamplifiziert. Die Primersequenzen waren komplementär zum äußersten 5'- bzw. 3'-Ende der FGFR2-cDNA. Der Primer FR2Kpn hatte an seinem

5'-Ende einen 12 Nukleotide langen Überhang. Dieser Überhang entsprach den ersten 12 Nukleotiden stromaufwärts vom ATG-Translationsstartcodon im humanen FGFR2-Gen. Der Vergleich mit dem Kozak-Motiv zeigt, dass durch Anhängen dieses Überhangs nun 5 von 8 Nukleotiden des Sequenzkontextes um das ATG-Codon mit dem Kozak-Motiv übereinstimmten (Abbildung 3.5).

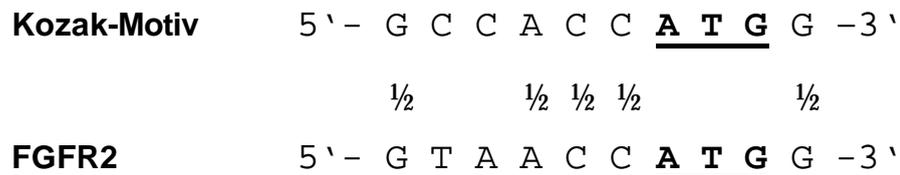


Abbildung 3.5: Vergleich der Sequenzen um das ATG-Translationsstartcodon in der FGFR2-cDNA mit zusätzlich 12 Nukleotiden 5'-untranslatiertem Bereich mit dem Kozak-Motiv. Die 5 mit dem Kozak-Motiv übereinstimmenden Nukleotide sind durch vertikale Balken markiert.

Die FGFR2-cDNA mit zusätzlich 12 Nukleotiden 5'-untranslatiertem Bereich wurde über KpnI- und BamHI-Schnittstellen in pcDNA3 ligiert. Zur Unterscheidung vom ursprünglichen pcDNA3-BEK-Konstrukt wurde dieses als pcDNA3-WT-Konstrukt bezeichnet (WT für Wildtyp). Die FGFR2-cDNA codierte jedoch weiterhin für die BEK-Variante des FGFR2. Abbildung 3.6 zeigt eine schematische Darstellung des pcDNA3-WT-Konstruktes.

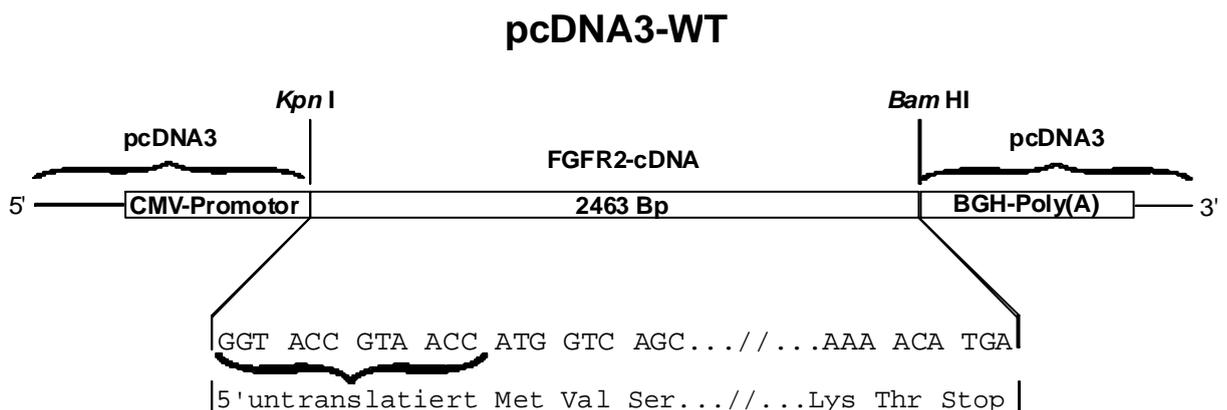


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des pcDNA3-WT-Konstruktes. Die translatierte Sequenz ist identisch mit dem pcDNA3-BEK-Konstrukt. Zusätzlich enthält das pcDNA3-WT-Konstrukt 12 Nukleotide stromaufwärts vom ATG-Startcodon, die denen im humanen FGFR2-Gen entsprechen. Zu den Abkürzungen siehe Legende zu Abbildung 3.2.

Die Transfektion und Selektion der L6-Zellen geschah wie bereits für das pcDNA3-BEK-Konstrukt beschrieben. Nach Subklonierung wurden die insgesamt 48 Einzelklone zunächst wieder in Northern Blots auf die Expression der FGFR2-mRNA hin untersucht. Dabei erwiesen sich die Klone 26, 37 und 44 als positiv (Abbildung 3.7). Diese Klone werden im weiteren als „WT26“, „WT37“ und „WT44“ bezeichnet.

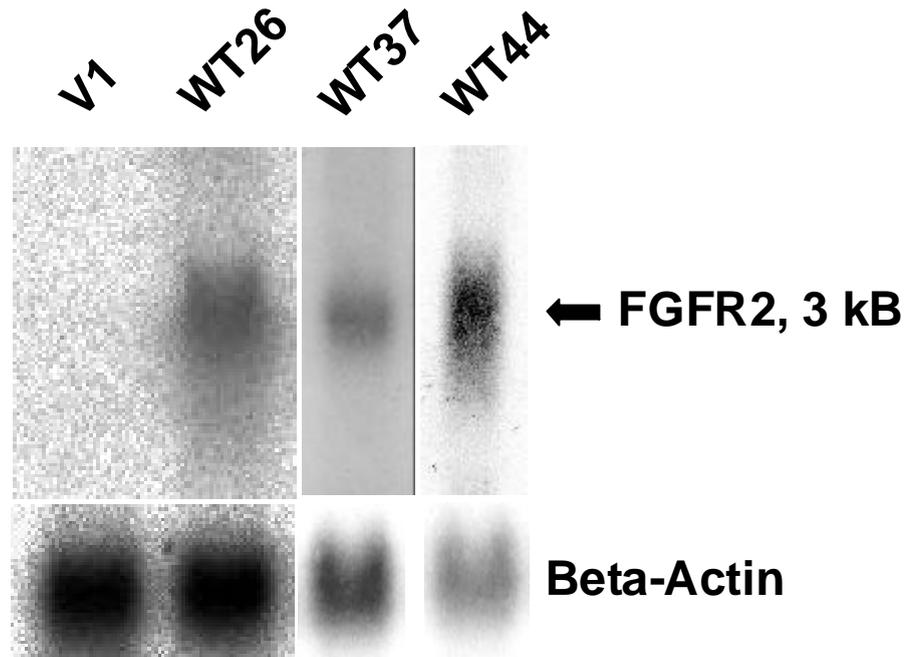


Abbildung 3.7: Autoradiogramm des Northern Blots zur Überprüfung auf BEK-mRNA-Expression. Die Klone 26, 37 und 44 exprimieren die etwa 3 kB große BEK-mRNA. Als Sonde wurde die ^{32}P -markierte BEK-cDNA verwendet. V1: L6-Zellen, die nur mit pcDNA3 transfiziert worden waren.

Im folgenden konnte die FGFR2-Expression in den Zellen der Klone WT26, WT37 und WT44 auch immunologisch nachgewiesen werden. Hierzu wurden aus diesen Zellen die Plasmamembranfraktionen mit Hilfe der diskontinuierlichen Gradientenzentrifugation isoliert, in einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und dort mit dem polyklonalen Anti-FGFR2-Antikörper C-17 von Santa Cruz Biotechnologies inkubiert (Abbildung 3.8).

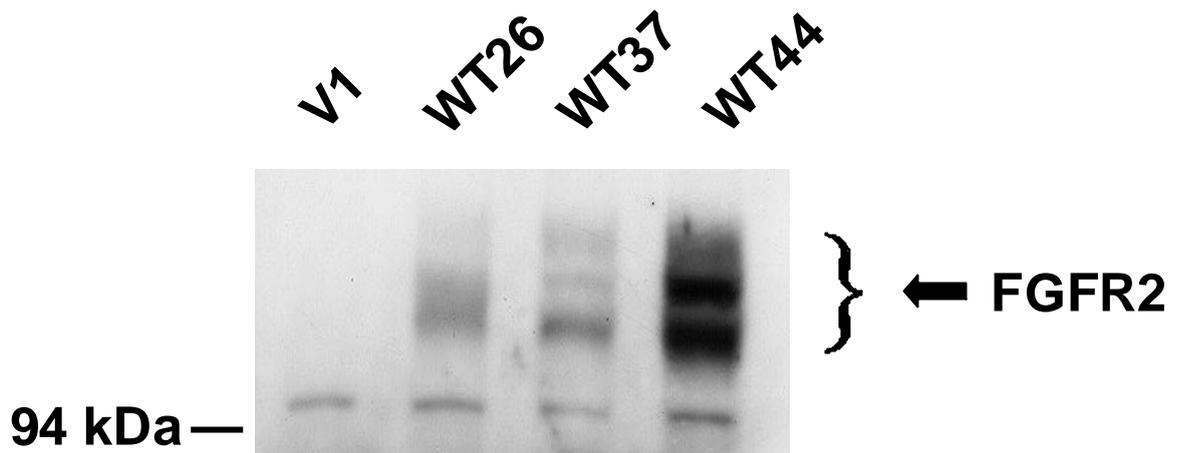


Abbildung 3.8: Autoradiogramm eines Western Blots zum Nachweis einer effizienten FGFR2-Expression. Als primärer Antikörper wurde der Rabbit-Anti-FGFR2-Antikörper von Santa Cruz Biotechnologies verwendet und als sekundärer Antikörper der *horseradish peroxidase*-gekoppelte Anti-Rabbit-Antikörper aus dem ECL-Kit von Amersham. Aufgetragen waren ca. 10 µg Protein aus den Plasmamembranfraktionen von V1-, WT26-, WT37- und WT44-Zellen.

Das FGFR2-Protein von etwa 110-140 kDa in den Plasmamembranpräparationen von Zellen der Klone WT26, WT37 und WT44 ist angezeigt.

V1: L6-Zellen, die nur mit pcDNA3 transfiziert worden waren.

Die Zellen des Klons WT26 wurden für die cDNA-Array-Analysen eingesetzt (siehe Abschnitt 3.4).

3.3 Differential Display RT-PCR Analysen an BEK26-Zellen zur Identifizierung FGFR2-regulierter Gene

3.3.1 Übersicht

Die Zellen der Klone BEK26 (siehe Abbildung 3.3) und V1 (wurden nur mit pcDNA3 transfiziert) wurden für das Differential Display verwendet. Vor der Inkubation mit bzw. ohne FGF2 wurden die Zellen zur Synchronisation über Nacht für 16 h in DMEM/0,1% FKS gehalten. Anschließend wurden die Zellen für variierende Zeiten (1, 2, 4, 8 h) mit bzw. ohne FGF2-Zusatz in DMEM/0,1% FKS inkubiert. Bei FGF2-

Inkubation enthielt das Medium stets außer dem FGF2-Zusatz (200 ng/ml Medium) noch den FGF-Cofaktor Heparin (10 µg/ml Medium). Die Inkubationen geschahen in unabhängigen Doppelansätzen. Die Genexpression der verschieden behandelten Zellen wurde durch Analyse der RNA-Expression miteinander verglichen. Hierzu wurden die RNAs durch RT-PCR mit den Primern *Differential Display Reverse Transcription* (DDRT)-A, -C, -G und -T sowie 00-19 in Gegenwart eines radioaktiven Nukleotids ($\alpha^{35}\text{S}$ -dATP) amplifiziert und anschließend in Polyacrylamidgelelektrophoresen aufgetrennt. Reproduzierte Unterschiede in der Amplifikationsstärke einzelner Transkripte sollten auf ihrer unterschiedlich starken Expression beruhen. Diese differentielle Expression von Genen sollte letztlich die Konsequenz des einzigen Unterschieds in der Behandlung der verglichenen Zellen gewesen sein, nämlich der Inkubation mit oder ohne FGF2.

3.3.2 Im Differential Display war trotz Durchführung unabhängiger Doppelansätze die Anzahl falsch positiver Ergebnisse hoch

Die ddPCR-Analysen lieferten insgesamt 52 cDNA-Fragmente, die reproduziert unterschiedlich stark aus den verglichenen Zellen amplifiziert worden waren. Diese Fragmente wurden nach ihrer Isolierung aus den Polyacrylamidgelen als Sonden für Northern Blot-Analysen benutzt, um die Echtheit ihrer FGFR2-bedingten differentiellen Expression zu überprüfen. Für die Northern Blots wurde RNA verwendet, die aus Zellen nach einer weiteren unabhängigen FGF2-Behandlung isoliert worden war. In diesen anschließenden Tests wurden 50 der 52 cDNAs als falsch-positiv identifiziert. In Abbildung 3.9 ist exemplarisch das Differential Display für eines dieser 50 Transkripte gezeigt.

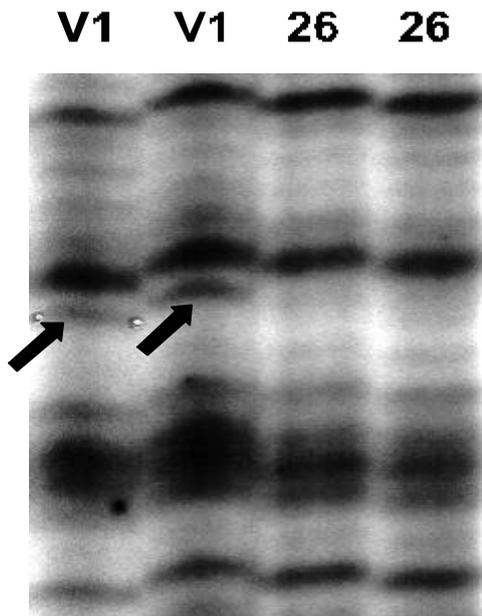
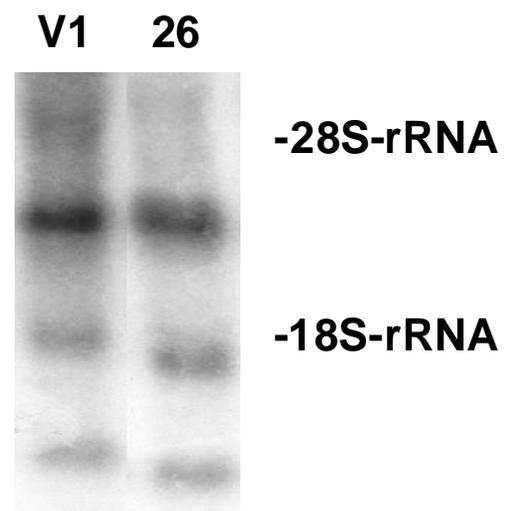


Abbildung 3.9: Autoradiogramm eines Polyacrylamid-Gelausschnitts. Die aufgetrennten cDNAs waren mit den Primern „DDRT-G“ und „15“ generiert worden. RNA-Quellen waren in unabhängigen Doppelansätzen Leervektortransfizierte L6-Zellen des Klons V1 und L6-Zellen des Klons BEK26 („26“). Die Zellen waren 4 h mit FGF2 inkubiert worden. Die Pfeile markieren ein amplifiziertes Transkript, das in BEK26-Zellen nach 4-stündiger FGF2-Behandlung reprimiert zu sein scheint.

Die Northern Blot-Analyse mit der aus dem Polyacrylamidgel reamplifizierten cDNA als Sonde zeigte, dass die ursprünglich angenommene Repression dieses Gens nicht zutrifft (Abbildung 3.10). Weiterhin ist an diesem Beispiel zu sehen, dass als Sonden verwendete Differential Display-Banden typischerweise mit mehreren RNAs auf dem Northern Blot hybridisierten. Für das ddPCR-Fragment „G-15“ konnte nach Subklonierung und Sequenzierung gezeigt werden, dass dies auf dem Vorhandensein mehrerer cDNAs gleicher Größe aber unterschiedlicher Identität in der Bande beruhte.

Abbildung 3.10: Autoradiogramm des Northern Blots nach Hybridisierung mit der cDNA „G-15“ (s. Abb. 3.9) als Sonde. „G-15“ besteht aus mindestens 4 verschiedenen cDNAs gleicher Größe. Aufgetragen ist die RNA aus Zellen des Klons V1 (Leervektortransfektion) und BEK26 („26“). Rechts sind die ungefähren Positionen der 28S-rRNA (4,7 kB) und 18S-rRNA (1,9 kB) angegeben. Inkubation V1 und BEK26: 4 h mit FGF2.



3.3.3 Die mitochondriale 16S-rRNA war nach FGF2-Behandlung von BEK26-Zellen stärker fragmentiert

Das in Abbildung 3.11 dargestellte Differential Display-Produkt wies auf ein Transkript hin, dessen Expression nach 4-stündiger Inkubation von BEK26-Zellen mit FGF2 erhöht war.

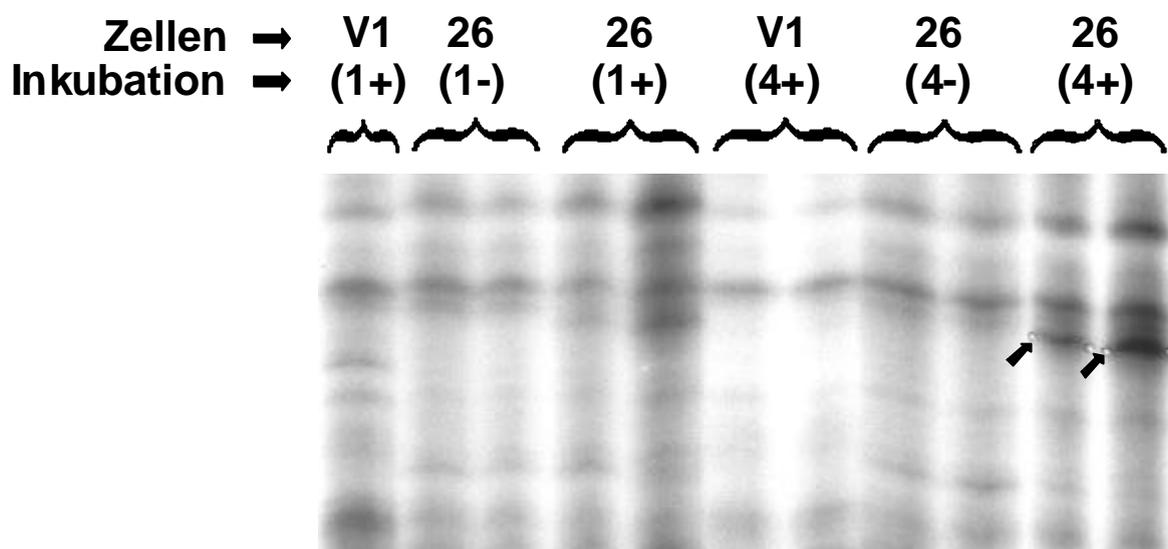


Abbildung 3.11: Autoradiogramm eines Differential Display-Gelausschnitts. Die cDNAs waren mit den Primern „DDRT-A“ und „10“ generiert worden. Als RNA-Quelle dienten in unabhängigen Doppelansätzen Zellen der Klone V1 (Leervektortransfektion) und BEK26 („26“). In Klammern sind die Inkubationszeiten in Stunden mit (+) und ohne (-) FGF2 angegeben. Die Pfeile markieren ein Transkript, das aus BEK26-Zellen nach 4-stündiger Behandlung mit FGF2 stärker amplifiziert worden war.

Die Sequenzierung der eluierten cDNA ergab, dass es sich um ein Fragment der mitochondrialen 16S-rRNA handelte. Mit dieser cDNA als Sonde war im Northern Blot ein differentielles Signal der ungefähren Größe von 0,5 kB zu erkennen (Abbildung 3.12).

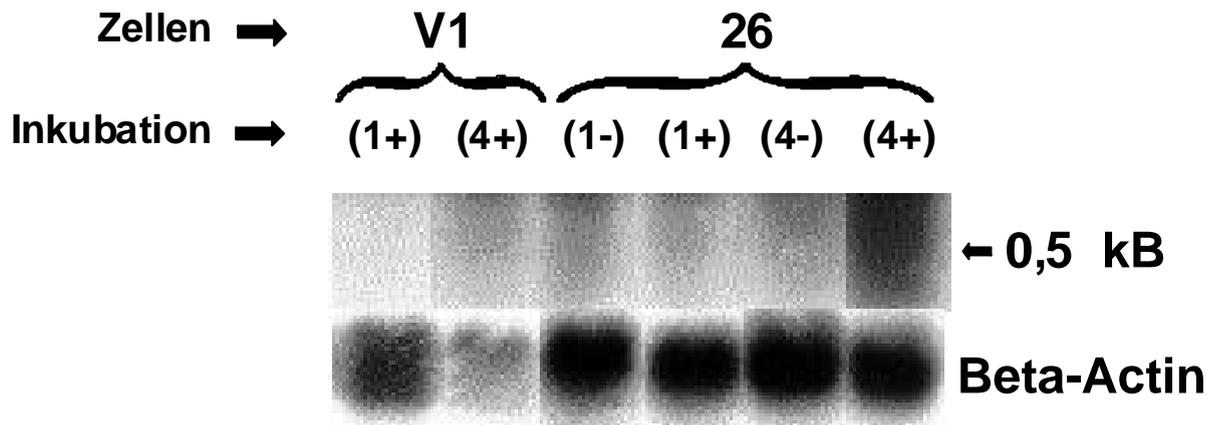


Abbildung 3.12: Autoradiogramm des Northern Blots mit der cDNA „A-10“ aus Abb.10 als Sonde. Die stärker vorhandene RNA in BEK26-Zellen nach 4-stündiger FGF2-Behandlung war ca. 0,5 kB groß. Zur Bedeutung der Abkürzungen siehe Legende zu Abbildung 3.11.

Die vollständige mitochondriale 16S-rRNA ist ca. 1,5 kB groß. Demnach führte die Inkubation mit FGF2 in den BEK26-Zellen zum verstärkten Auftreten mitochondrialer 16S-rRNA-Fragmente der ungefähren Größe von 0,5 kB.

3.3.4 Nach FGF2-Behandlung der BEK26-Zellen war die verstärkte Expression eines unbekanntes Gens detektierbar

Bei dem im folgenden beschriebenen Differential Display-Produkt sah es zunächst nach einer Bestätigung der ddPCR-Daten durch den Northern Blot aus (Abbildung 3.13).

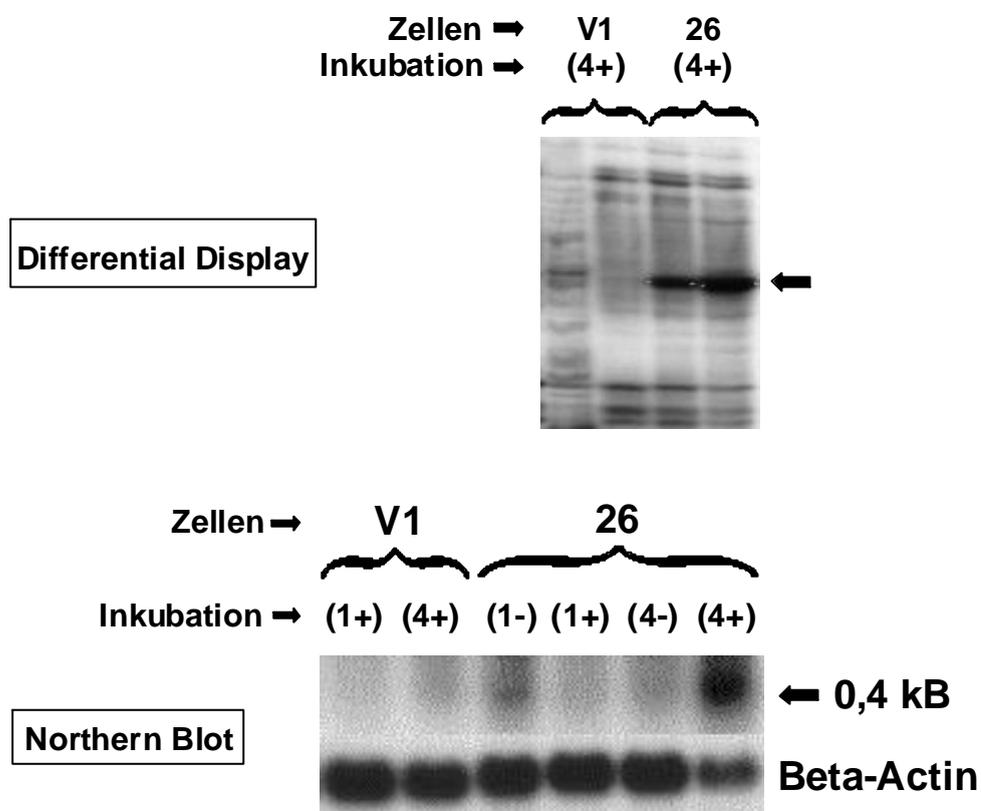


Abbildung 3.13: Autoradiogramm eines Differential Display-Gels (oben) und des korrespondierenden Northern Blots (unten). Als RNA-Quelle dienten in unabhängigen Doppelansätzen Zellen der Klone V1 (Leervektortransfektion) und BEK26 („26“). In Klammern sind die Inkubationszeiten in Stunden mit (+) und ohne (-) FGF2 angegeben. Der Pfeil am Differential Display-Gel markiert ein Transkript, das aus BEK26-Zellen nach 4stündiger FGF2-Behandlung mit den Primern „DDRT-A“ und „05“ stärker amplifiziert worden war (Spuren 3 & 4). Die differentielle Expression schien sich im Northern Blot zu bestätigen (unten). Mit dem ddPCR-Produkt als Sonde wurde im Northern Blot eine stärker exprimierte RNA von 0,4 kB in BEK26-Zellen nach 4stündiger FGF2-Behandlung detektiert (rechte Spur).

Das ddPCR-Produkt „A-05“ wurde in den pMOS-Vektor aus dem „blunt end cloning“-Kit von Amersham kloniert und mit T7-Sequenase sequenziert. Die Verwendung der klonierten DNA als durch PCR mit den Primern „DDRT-A“ und „05“ markierte Sonde im Northern Blot bestätigte, dass das richtige Fragment kloniert worden war, da das Ergebnis des in Abb. 3.13 unten dargestellten Northern Blots damit reproduziert werden konnte. Die Sequenzierung ergab, dass es sich bei dem subklonierten Fragment um ein Dimer aus zwei verschiedenen cDNAs handelte. Der Vergleich mit Sequenzdatenbanken (*BLAST search*) zeigte, dass die eine cDNA einem Stück des rpL23a-Gens (ribosomales Protein L23a) entsprach und die andere cDNA keine Homologien zu bereits bekannten Genen aufwies (Abbildung 3.14).

```

AAGCTT... (pMOS-Vektor 45 Nu)

GGTACCTTTT TTTTTTTTGG CAAGcAGCAT TATTTATGGT GGAAAAAAG TATATATTTA 60
GAATTAACCA TCTGGACTCA CTTTAGATGA TCCCAATCTT GTTGGCAACA TCCAGAGCAT 120
CATAATCAGG AGCCAAAAAT AAGCTTCCCG CGGTACCTTT TTTTTTTTGG GAAGGAGTTT 180
CCACTGTGGA AAAGAGTTTA TTGTATGGCT GCAGGGATCT ACTACAGAAT CCCCTGGCT 240
GCAGTTAGCT GTGCTTACTC TGGACATATC TCCGAAGACT TGGAGCCAAA AATAAGCTTC 300

CCG 303

ATCGGAT CCCCXXX

```

Abbildung 3.14: Dargestellt ist die Sequenz des in den pMOS-Vektor einklonierten ddPCR-Produktes „A-05“. Das Insert ist 303 Nukleotide lang und besteht aus zwei aneinanderligierten cDNAs. In der ersten und letzten Zeile ist zur Orientierung pMOS-Vektorsequenz angegeben. Die Schriftformatierungen bedeuten: Fettdruck und unterstrichen – HindIII-Schnittstelle; Einfachdruck und unterstrichen – RT-Primer; Nur Fettdruck – rpL23a-Sequenz; kursiver Fettdruck – unbekannte Sequenz.

Um herauszufinden, welche der beiden cDNAs mit dem differentiell exprimierten Gen korrespondierte, wurden diese durch HindIII-Spaltung separiert. Das 191 Nukleotide große Produkt bestand aus der rpL23a-Sequenz zuzüglich 45 Nukleotiden pMOS-Vektor und das 153 Nukleotide große Produkt enthielt die Sequenz der unbekanntes cDNA. Nach Auftrennung in einem 2%igen Agarosegel und Aufreinigung wurden beide Produkte als Sonden in Northern Blots verwendet (Abbildung 3.15).

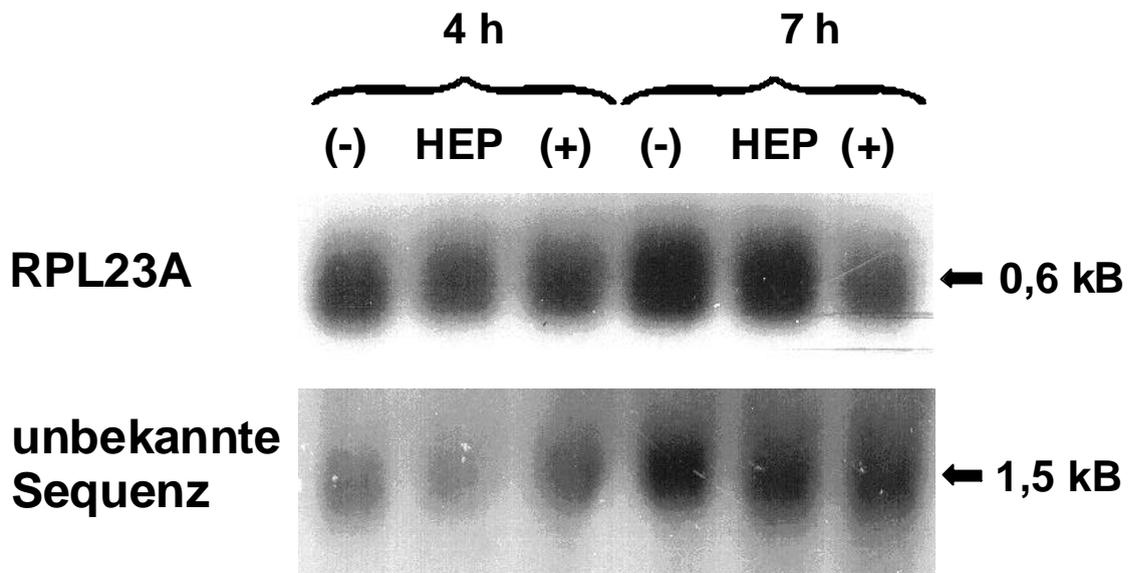


Abbildung 3.15: Autoradiogramme der Northern Blots mit der RPL23A-Sequenz (oben) und der unbekanntem Sequenz (unten) als Sonde. Die RNA stammte aus BEK26-Zellen, die jeweils 4 und 7 Stunden entweder unbehandelt belassen (-), nur mit dem FGF-Cofaktor Heparin behandelt (HEP) oder mit Heparin und FGF2 (+) behandelt worden waren.

Überraschenderweise zeigte die Northern Blot-Analyse, dass keine der beiden Sonden nach 4- und 7-stündiger Behandlung der BEK26-Zellen mit einer differentiell exprimierten RNA hybridisierte. Beide Hybridisierungssignale waren zudem größer (0,6 kB und 1,5 kB) als das ursprünglich detektierte Signal (0,4 kB, Abb. 3.13 unten). Die 0,4 kB große und nach FGF2-Behandlung der BEK26-Zellen stärker exprimierte RNA wurde reproduziert dann detektiert, wenn das gesamte ddPCR-Produkt „A-05“ in einer radioaktiven PCR mit den Primern „DDRT-A“ und „05“ markiert und als Sonde im Northern Blot verwendet wurde. Das differentielle Hybridisierungssignal war demnach als das Ergebnis einer Kreuzhybridisierung des cDNA-Dimers „A-05“ an eine nach FGF2-Behandlung stärker exprimierte, aber nicht weiter charakterisierbare, RNA anzusehen.

3.4 Hybridisierungsanalysen an cDNA-Arrays zur Identifizierung von durch FGFR2 regulierten Genen

3.4.1 Übersicht

Für diese Analysen wurden die Zellen des FGFR2-exprimierenden Klons WT26 verwendet (siehe Abb. 3.7 & 3.8). Zur Synchronisation wurden die Zellen über Nacht (16 h) in DMEM/0,5% FKS gehalten. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für 2 und 6 Stunden in DMEM ohne FKS. Als Zusätze enthielt das Medium FGF2 (200 ng/ml Medium) und Heparin (10 µg/ml Medium). Die Zellen der Vergleichspopulation (Inkubation ohne FGF2) wurden mit DMEM und 10 µg/ml Medium Heparin versorgt. Aus den so behandelten Zellen wurde die Gesamt-RNA und daraus die Poly(A)+RNA extrahiert. Die Poly(A)+RNA wurde in Gegenwart von $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP revers transkribiert. Die Primer für die cDNA-Synthese befanden sich in der als CDS-Mix bezeichneten Kit-Komponente der ATLAS RAT 1.2 ARRAYS von Clontech, die hier benutzt wurden. Es handelte sich um ein Gemisch aus 1176 verschiedenen Oligonukleotiden, die den 1176 (bekannten) Gensequenzen auf dem Array entsprachen. Somit sollten nur jene mRNAs revers transkribiert worden sein, die auf dem Array repräsentiert waren. Nach der Hybridisierung der Arrays mit diesem Einzelstrang-cDNA-Sondengemisch wurden die Signalstärken über ebenfalls sich auf dem Array befindende Haushaltsgene (β -Actin, RPS29, Polyubiquitin) normalisiert. Die Hybridisierung der Arrays wurde zweimal durchgeführt, um die Anzahl falsch-positiver Unterschiede zu minimieren. Reproduziert aufgetretene Unterschiede in der Signalstärke einzelner cDNA-Dots auf den Vergleichs-Arrays (mit und ohne FGF2 einer Inkubationsdauer) wiesen auf eine mögliche FGFR2-bedingte differentielle Expression dieser Gene hin. Auf diese Weise wurden 22 Kandidatengene gefunden. Durch RT-PCR wurden Bereiche dieser 22 mRNAs aus der Poly(A)+-Population amplifiziert. Die RT-PCR-Produkte bzw. kurze Oligonukleotide aus codierenden Bereichen dienten in den anschließenden Northern Blot-Analysen als Sonden. Für die Northern Blots wurde die RNA aus einer zweiten unabhängigen Zellbehandlung verwendet.

3.4.2 Anordnung von Sequenzgruppen auf den ATLAS RAT 1.2 cDNA Expressionsarrays

Bei den ATLAS RAT 1.2 Arrays von Clontech handelt es sich um Nylonmembranen der Größe 12 x 8 cm, auf die 1176 verschiedene Gensequenzen in Form von cDNA-Dots aufgetragen sind. Zur besseren Orientierung sind die cDNA-Dots in 6 quadratische Felder zu je 14 x 14 (=196) Dots angeordnet. Diese Felder sind mit A, B, C, D, E und F bezeichnet. Jeder Einzeldot ist durch ein Koordinatensystem definiert. Dies erlaubt die Zuordnung eines Dots zu einer bestimmten Gensequenz (Abbildung 3.16).

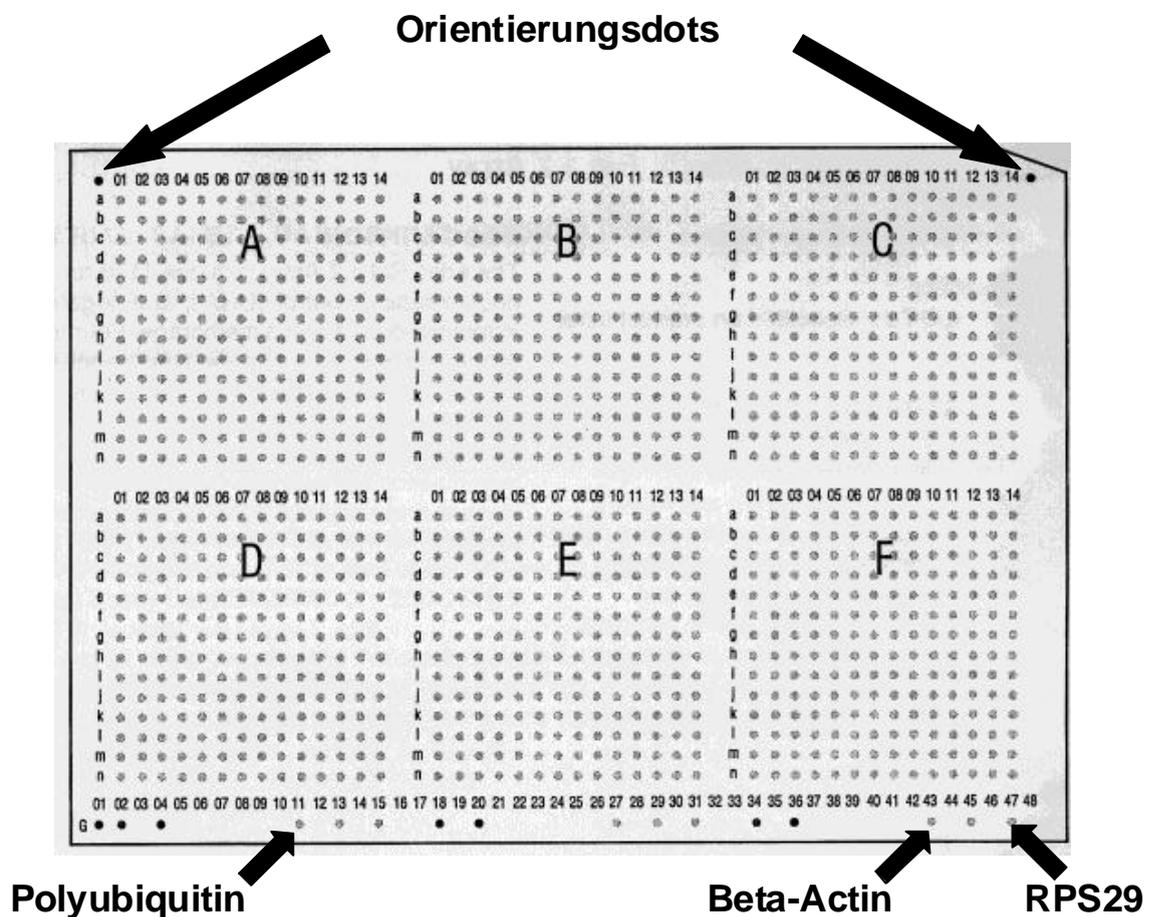


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung der Anordnung der 1176 cDNA-Dots auf einem ATLAS RAT 1.2 Array von Clontech. Die Dots sind in 6 Quadraten (A-F) zu je 196 Dots angeordnet. Jeder Einzel-Dot ist durch drei Koordinaten einer bestimmten Gensequenz zugeordnet. In der unteren Reihe sind Haushaltsgene zum Abgleich von Hybridisierungssignalen aufgetragen. In der oberen linken und rechten Ecke befinden sich Orientierung-Dots, die das korrekte Anlegen eines Rasters zur Identifizierung der Dot-Koordinaten ermöglichen.

Die Zuordnung eines Dots zu einer bestimmten Koordinate erfolgt durch Anlegen eines Rasters. Das korrekte Anlegen des Rasters auf den Array wird durch Orientierungsdots an den Ecken der Membranen ermöglicht. Dadurch ist weiterhin die Unterscheidung von Dot-Signalen von unspezifischen Hybridisierungen an die Nylonmembranmatrix möglich, da sich letztere gewöhnlich nicht in das Koordinatensystem integrieren lassen. In der unteren Reihe eines Arrays sind Sequenzen von Haushaltsgenen aufgetragen. Dies ermöglicht den Abgleich der Hybridisierungssignale von verschiedenen Hybridisierungen.

Die Gensequenzen auf dem Array sind einzelnen Funktionsgruppen zugeordnet (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Funktionsgruppen, von denen Gensequenzen auf dem ATLAS RAT 1.2 Array repräsentiert sind. Der Array-Bereich, in dem die entsprechenden Gene aufgetragen sind, ist durch Angabe der Koordinaten gekennzeichnet. Der Großbuchstabe definiert hierbei eines der 6 Quadrate A-F (s. Abb. 3.16), die Zahl und der Kleinbuchstabe die Koordinaten innerhalb dieses Quadrates.

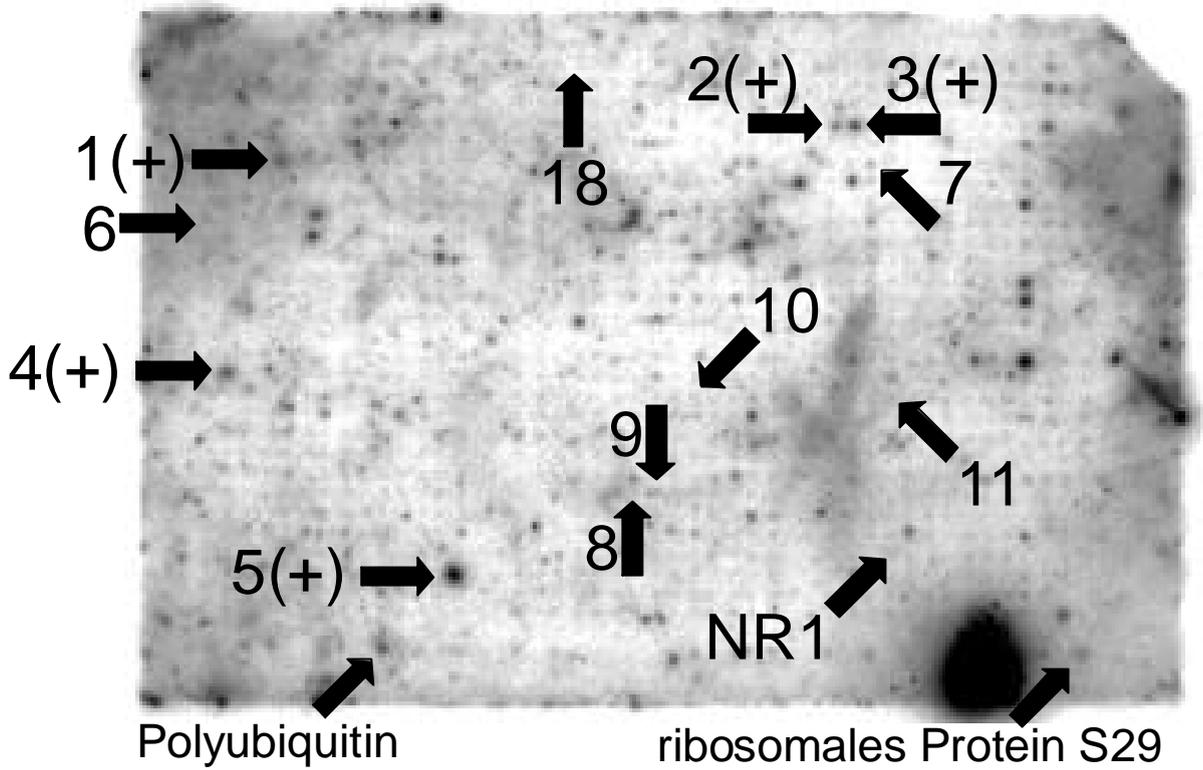
Gruppe	Array-Bereich	Funktion
A	A01a-A05b	Zelloberflächenantigene
B	A05c-A06l	Transkriptionsfaktoren und DNA-bindende Proteine
C	A06m-A08c	Zellzyklusregulatoren
D	A08d-A09l	Proteine des Immunsystems
E	A09j-A10b	Extrazelluläre Transporter
F	A10c-A13l	Onkogene und Tumorsuppressorgene
G	A13j-B02b	Stressantwort-Proteine
H	B02c-B12g	Ionenkanäle und Transportproteine
I	B12h-B12k	Proteine der extrazellulären Matrix
J	B12l-C02a	Zielsteuerung von Proteinen und intrazellulärer Transport
K	C02b-C12n	Stoffwechselproteine
L	C11a-C11c	Posttranslationale Modifizierung und Proteinfaltung
M	C11d-C12g	Translation
N	C12h-C13a	Apoptose-assoziierte Proteine
O	C13b-C13d	RNA-Prozessierung, -Turnover und-Transport
P	C13e-C13f	Chromatinproteine
Q	C13h-D13l	Rezeptoren (nach Liganden geordnet)
R	D13j-E06h	Extrazelluläre Signalgebung und Zellkommunikation
S	E06l-F06h	Intrazelluläre Signalgebung, -übermittlung und-weiterleitung
T	F06i-F11k	Protein-Turnover
U	F11l-F13i	Rezeptoren (nach Aktivität geordnet)
V	F13j-F14b	Cytoskelett und Zellbewegung
W	F14c-F14n	DNA-Synthese, -Reparatur und -Rekombination

3.4.3 Hybridisierungen der cDNA-Expressionsarrays

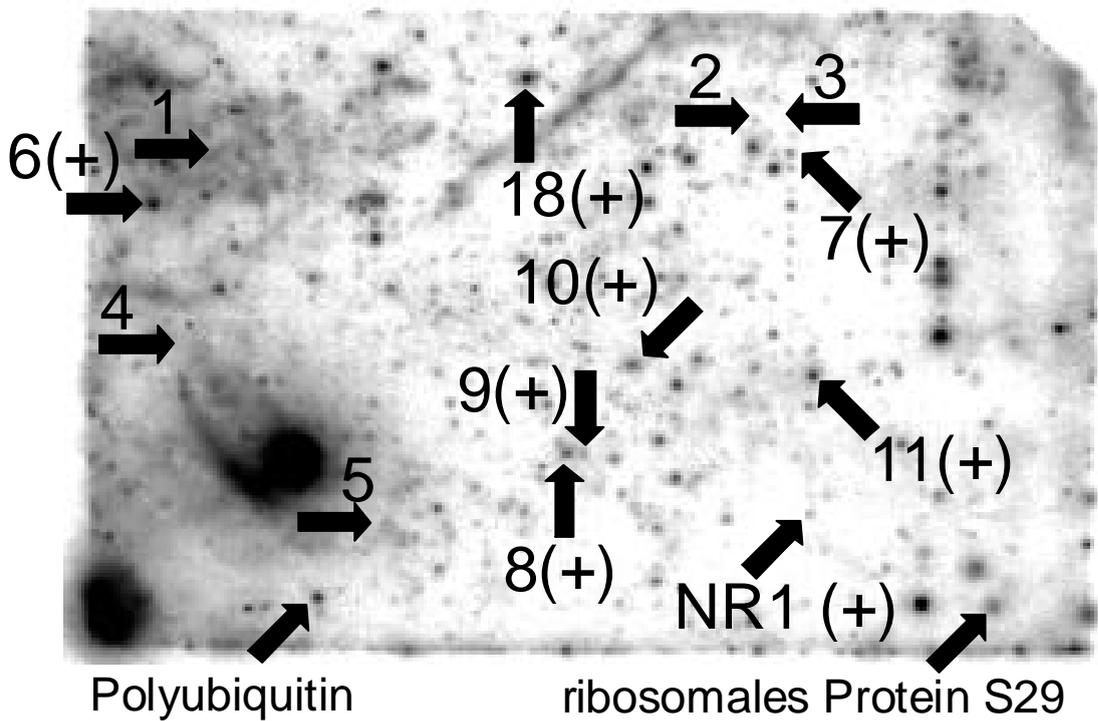
Die cDNA-Arrays wurden mit Einzelstrang-cDNAs hybridisiert, die an der Poly(A)+-RNA von WT26-Zellen gebildet worden waren. Die WT26-Zellen waren 2 und 6 Stunden mit und ohne FGF2 behandelt worden. Die zweimalige Hybridisierung der cDNA-Arrays führte zur Identifizierung von 22 Dots mit Signalstärkeunterschieden auf den Vergleichsarrays (Abbildung 3.17 und Tabelle 3.2). Die Signalstärkeunterschiede lagen dabei zwischen Werten von 1,8 (Gene 14 und 21) bis maximal 7,8 (Gen 5).

Abbildung 3.17, auf den folgenden 4 Seiten: Dargestellt sind die Autoradiogramme von beiden cDNA-Array-Hybridisierungen. Hybridisiert wurde mit Einzelstrang-cDNAs, die an der Poly(A)+-RNA von WT26-Zellen gebildet worden waren. Die WT26-Zellen waren zuvor 2 und 6 h mit (+) und ohne (-) FGF2 behandelt worden. Die Pfeile weisen auf Dots hin, die in beiden Hybridisierungen eine unterschiedliche Signalstärke auf den Vergleichsarrays aufwiesen. Die Nummern an den Pfeilen beziehen sich auf die Nummerierung der Dots bzw. Gene in Tabelle 3.2. Ein Pluszeichen (+) hinter einer Nummer deutet an, das auf diesem Array das Dotsignal stärker war als auf dem Vergleichsarray. Exemplarisch sind weiterhin 2 Dots angezeigt, für die eine Reproduktion der Signalstärkeunterschiede nicht möglich war. Sie sind mit NR1 und NR2 bezeichnet (NR = Nicht reproduziert).

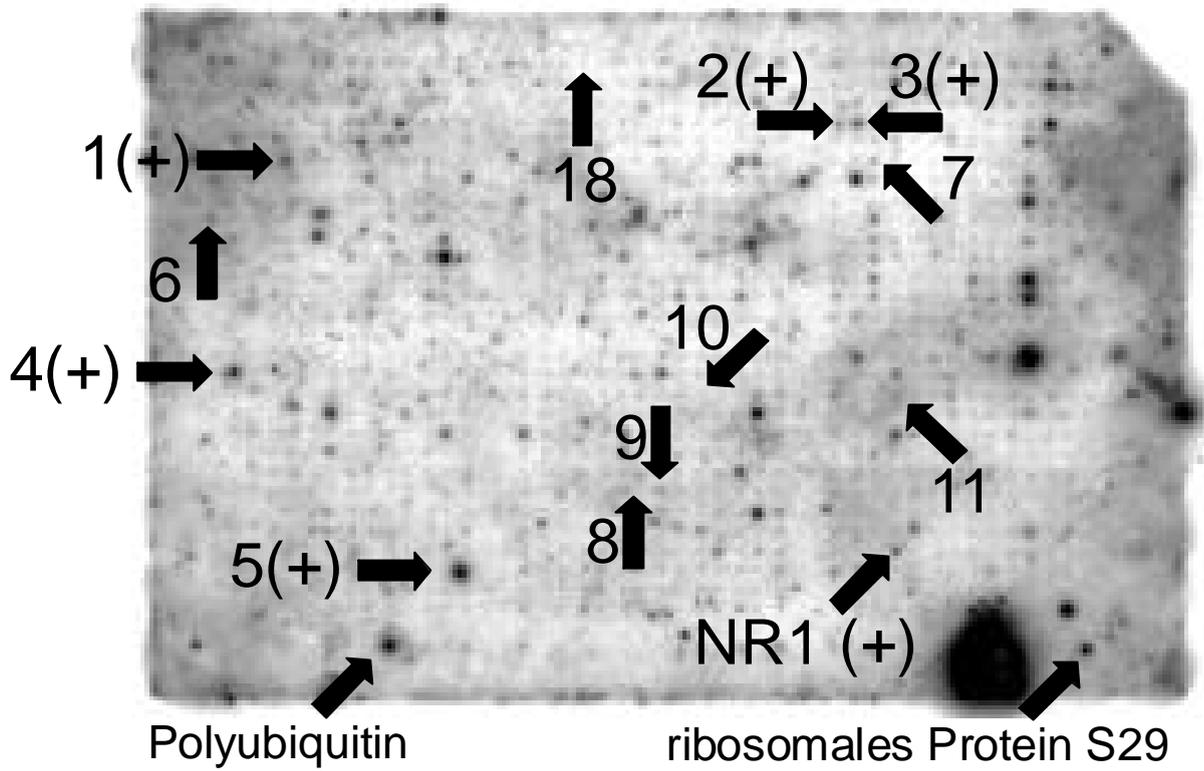
2h(+) 1. Hybridisierung



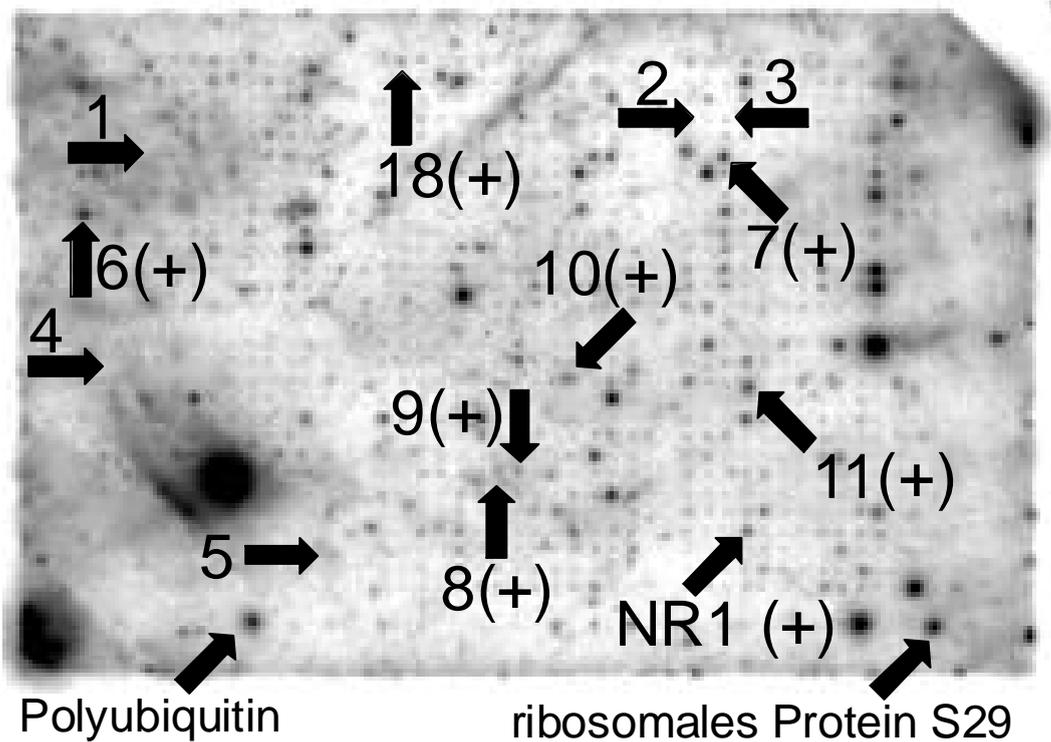
2h(-) 1. Hybridisierung



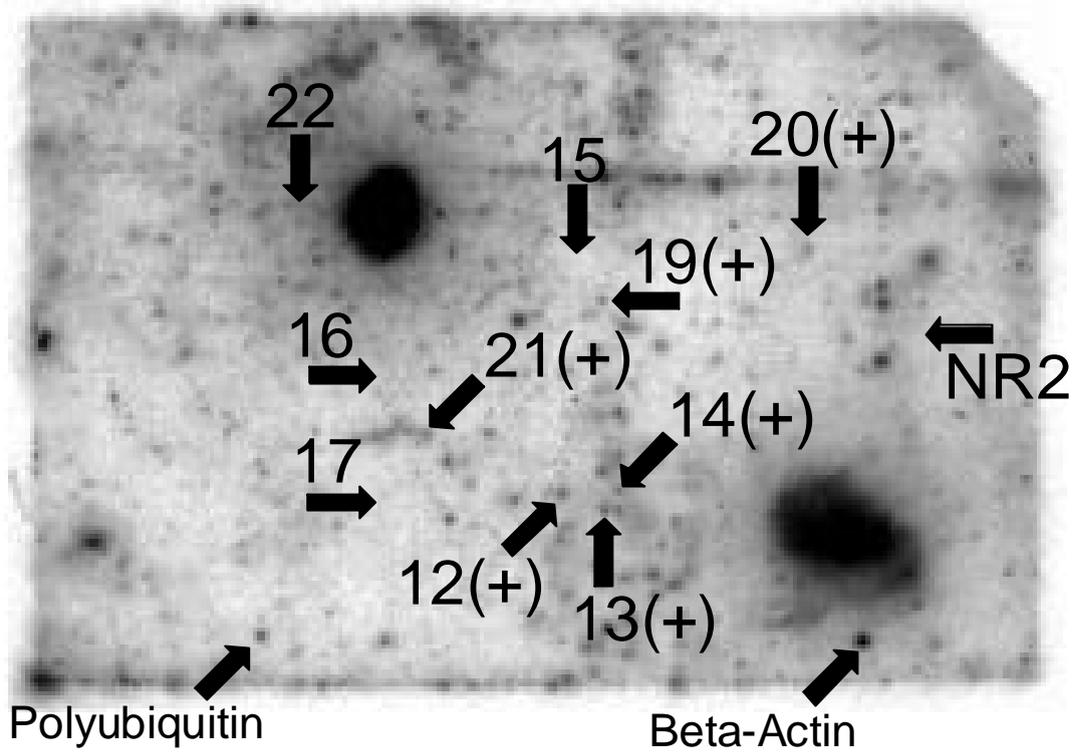
2h(+) 2. Hybridisierung



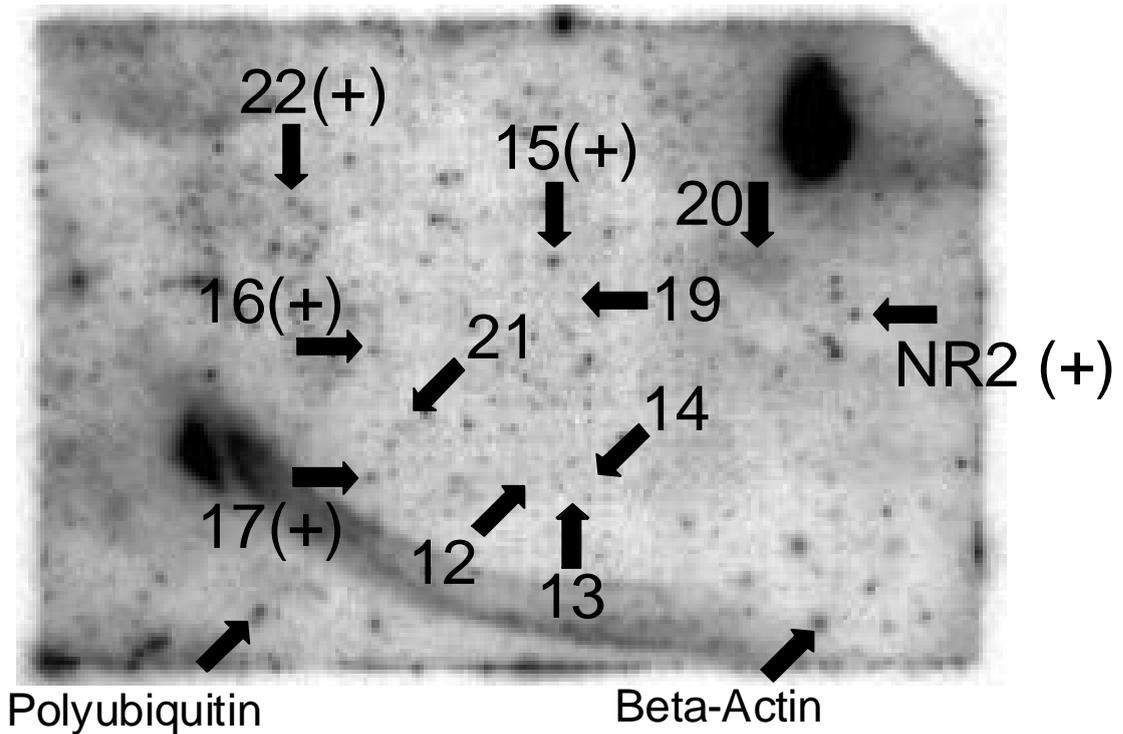
2h(-) 2. Hybridisierung



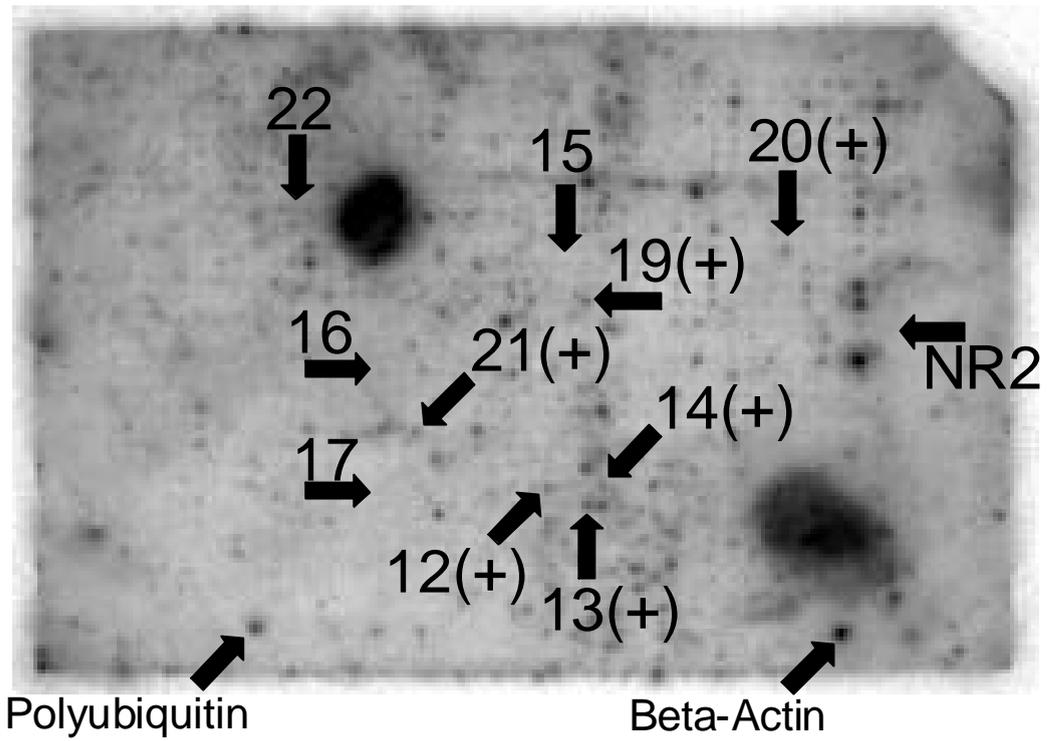
6h(+) 1. Hybridisierung



6h(-) 1. Hybridisierung



6h(+) 2. Hybridisierung



6h(-) 2. Hybridisierung

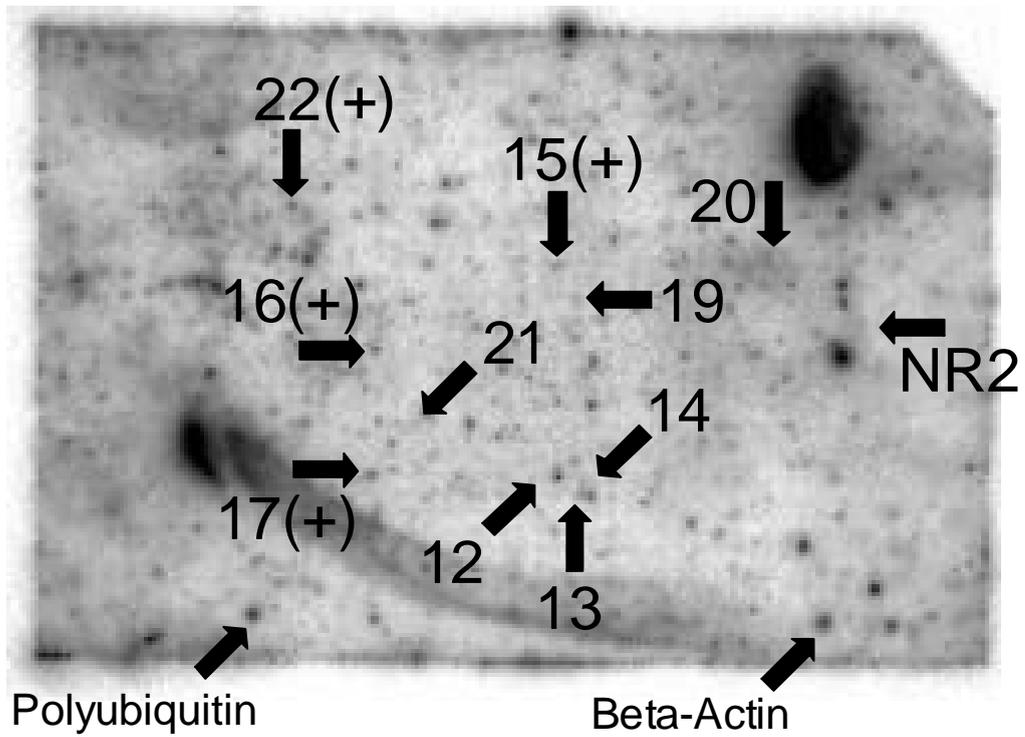


Tabelle 3.2: cDNA-Dots, deren Hybridisierungssignalstärken auf den Vergleichsarrays in zwei Hybridisierungen unterschiedlich waren. Die Nummerierung der Dots bzw. Gene ist willkürlich. Angegeben ist die Genbank-Accession-Nummer des jeweiligen Gens, der Hinweis, in welcher Hybridisierung ein stärkeres Signal detektiert wurde, soweit bekannt die ungefähre Größe der Ratten-mRNA in kB und der Mittelwert der Quotienten der Signalstärken von beiden Hybridisierungen.

Gen ¹⁾ (Dotkoordinate)	Genbank- Accession -Nr.	Hinweis auf Regulation ²⁾	Ungefähre Tran- skriptgröße (kB) ohne Poly-(A) ³⁾	Quotient der Si- gnalstärken auf Arrays ⁴⁾ (+):(-)
1 (A05f)	D26307	2+	1,4	4,0
2 (C01d)	M97380	2+	2,4	2,8
3 (C02d)	L26009	2+	?	3,9
4 (D02b)	J04811	2+	3,0	3,9
5 (D14l)	D79215	2+	0,7	7,8
6 (A01i)	U00995	2-	3,3	0,17
7 (C03f)	S79304	2-	2,1	0,32
8 (E07h)	L29281	2-	4,0	0,47
9 (E08h)	D14592	2-	1,2	0,52
10 (E11c)	U28356	2-	2,2	0,28
11 (F04c)	M29275	2-	2,4	0,29
12 (E10h)	L01624	6+	2,5	4,1
13 (E12i)	L01702	6+	3,0	4,1
14 (E13h)	M20713	6+	3,1	1,8
15 (B11k)	L41254	6-	1,4	0,40
16 (E01a)	M13969	6-	mind. 1,8	0,43
17 (E01h)	D14839	6-	1,1	0,37
18 (B05b)	L35771	2-	3,2	0,18
19 (B12m)	D38224	6+	mind.1,0	1,8
20 (C07j)	U39206	6+	2,2	2,3
21 (E03e)	M13750	6+	1,1	1,8
22 (A12h)	U35365	6-	mind. 1,8	0,4

1) In Klammern sind die Koordinaten der Dots auf dem Array angegeben. Bei den Genen handelt es sich im einzelnen um: 1 = jun-D; c-jun verwandter Transkriptionsfaktor; 2 = Chromaffin-granula-Amintransporter; 3 = Galactosid-2-L-Fucosyltransferase; 4 = Growth hormone receptor

precursor; 5 = Fibroblast growth factor 10; 6 = Tumor-assoziiertes Gen 1; L-Typ-Aminosäuretransporter; 7 = Cytochromoxidase, Untereinheit 1; 8 = Doppelstrang-RNA-aktivierte eIF2a-Kinase; 9 = MAP Kinase Kinase 2 (MAPKK2); 10 = Hämatopoietische Protein-Tyrosin-Phosphatase (HEPTP); 11 = katalytische α -Untereinheit der Serin/Threonin-Phosphatase 2B; 12 = Glucocorticoid-regulierte Serin/Threonin-Kinase (SGK); 13 = Rezeptor-Proteintyrosinphosphatase alpha; 14 = G-Alpha-i3; Alpha-Untereinheit eines G-Proteins; 15 = Corticosteroid-induziertes Protein (CHIF); 16 = Insulin-like growth factor 2 (IGF 2); 17 = Fibroblast growth factor 9; 18 = G-Protein aktivierter Kaliumkanal (GIRK 4); 19 = Annexin IV; 20 = Cytochrom P-450; 21 = Prolactin-like Protein A; 22 = Src-ähnliche Proteintyrosinkinase Fyn.

2) Angegeben ist die Dauer der Behandlung der WT26-Zellen mit FGF2 in Stunden (2 oder 6) und ob eine verstärkte (+) oder abgeschwächte (-) Expression des jeweiligen Gens in jener RNA-Quelle beobachtet wurde, die aus FGF2-behandelten WT26-Zellen isoliert worden war.

3) Für die Gene 3, 16, 19 und 22 ist keine genauere Angabe möglich, da entweder Teile der codierenden Sequenz (3) oder die 3'-untranslatierten Bereiche der mRNAs nicht bekannt sind (16, 19, 22).

4) Die Zahlen geben den Quotienten der Signalstärken des jeweiligen Dots auf den Vergleichsarrays an (mit und ohne FGF2-Behandlung, (+):(-)). Angegeben sind die Mittelwerte aus beiden Hybridisierungen. Die Stärke der Hybridisierungssignale der 22 aufgelisteten Dots wurde mit Hilfe des Programms TINA (Raytest Isotopenmessgeräte) an den Phosphoimager-Dateien der Hybridisierungen bestimmt und über die Signalstärken der Beta Actin- oder Polyubiquitin-Hybridisierungssignale auf den Arrays normalisiert.

Die Kandidatengene (zur Bedeutung der Gennummern siehe Legende zu Tabelle 3.2) lassen sich nach Tabelle 3.1 folgenden Funktionsgruppen zuordnen:

- A Zelloberflächenantigene: 6
- B Transkriptionsfaktoren und DNA-bindende Proteine: 1
- F Onkogene und Tumorsuppressorgene: 22
- H Ionenkanäle und Transportproteine: 15, 18
- J Proteine zur Zielsteuerung und des intrazellulären Transports: 2, 19
- K Stoffwechselproteine: 3, 7, 20
- Q Rezeptoren (nach Liganden geordnet): 4
- R Extrazelluläre Signalgebung und Zellkommunikation: 5, 16, 17, 21
- S Intrazelluläre Signalübermittlung: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14

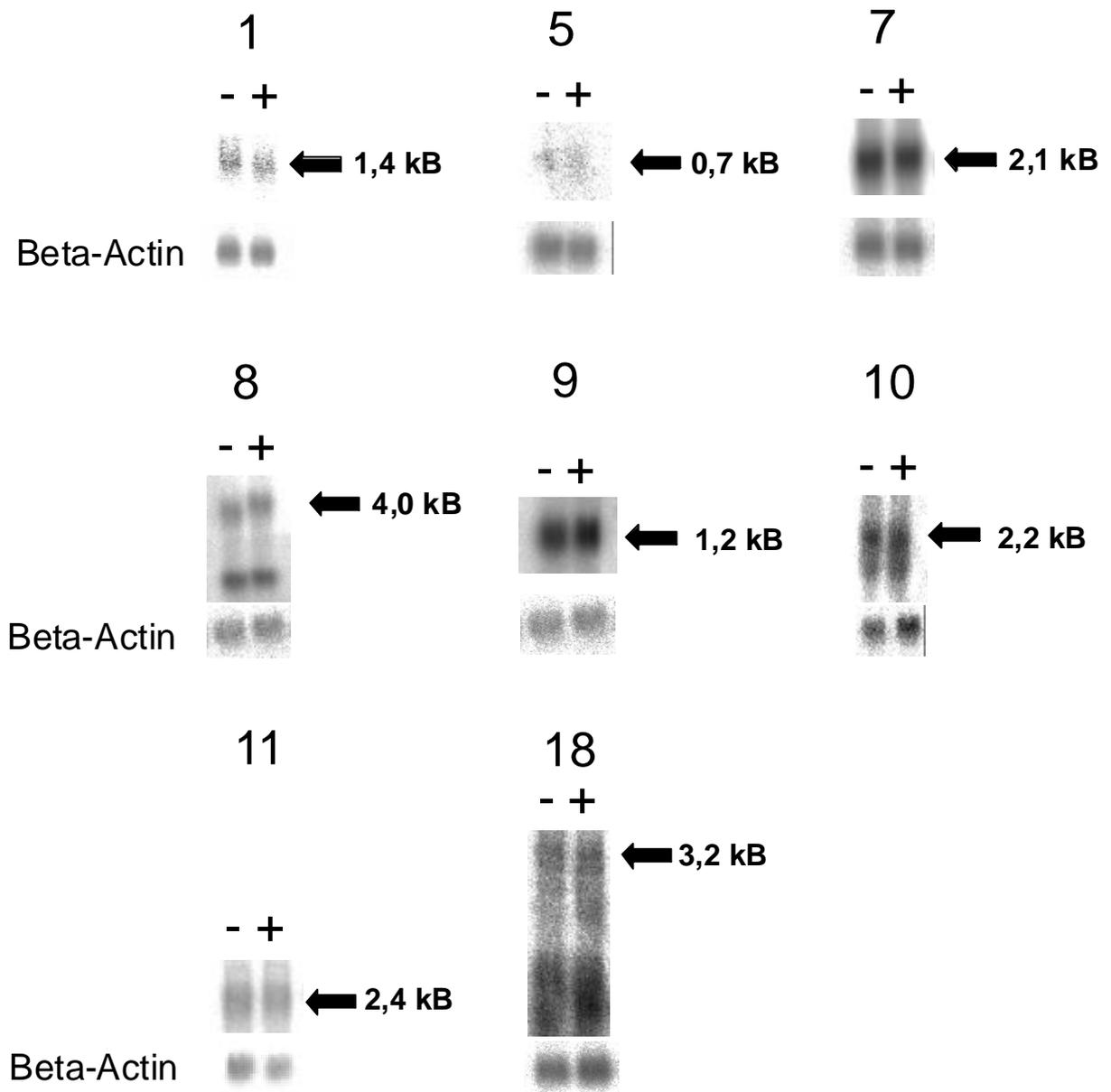
3.4.4 Northern Blot-Analysen zur Untersuchung der differentiellen Expression von Kandidatengen aus den Array-Hybridisierungen

In Northern Blot-Analysen wurde anschließend die differentielle Expression der 22 Kandidatengene aus den cDNA-Array-Hybridisierungen überprüft. Als Sonden wurden genspezifische Oligonukleotide (Gene 15, 18, 21) oder RT-PCR-Produkte eingesetzt, die mit Hilfe genspezifischer Primer an der Poly(A)+RNA von WT26-Zellen generiert worden waren (Gene 1-14, 16, 17, 19, 20, 22). In den Northern Blot-Analysen war die Expression von 19 der 22 Gene detektierbar. Die Transkriptgrößen entsprachen etwa den in Tabelle 3.2 genannten Erwartungswerten. Für die Gene 8, 10, 16, 19 und 22 wurden jeweils zwei Transkripte detektiert (Abbildungen 3.18 und 3.19). Für die Gene 16, 19 und 22 sind nur die Mindestgrößen der mRNAs bekannt (1,8 kB, 1,0 kB und 1,8 kB). In Abbildung 3.18 sind daher für diese Gene die Größen beider detektierter mRNAs angegeben. Zumindest für das Gen 22 (Fyn) ist beschrieben, dass das Auftreten von zwei mRNAs an der Verwendung alternativer Polyadenylierungsstellen liegen kann (siehe unten). Bei den Genen 15 und 18 wurden neben den erwarteten Transkripten von 1,4 kB und 3,2 kB noch weitere mRNAs in der Northern-Hybridisierung detektiert. Möglicherweise lag dies an der Verwendung von Oligonukleotidsonden bei der Untersuchung dieser beiden Gene. Die geringere Stringenz der Hybridisierungsbedingungen bei Verwendung von Oligonukleotiden als Sonden kann zu Kreuzhybridisierungen mit anderen mRNAs führen.

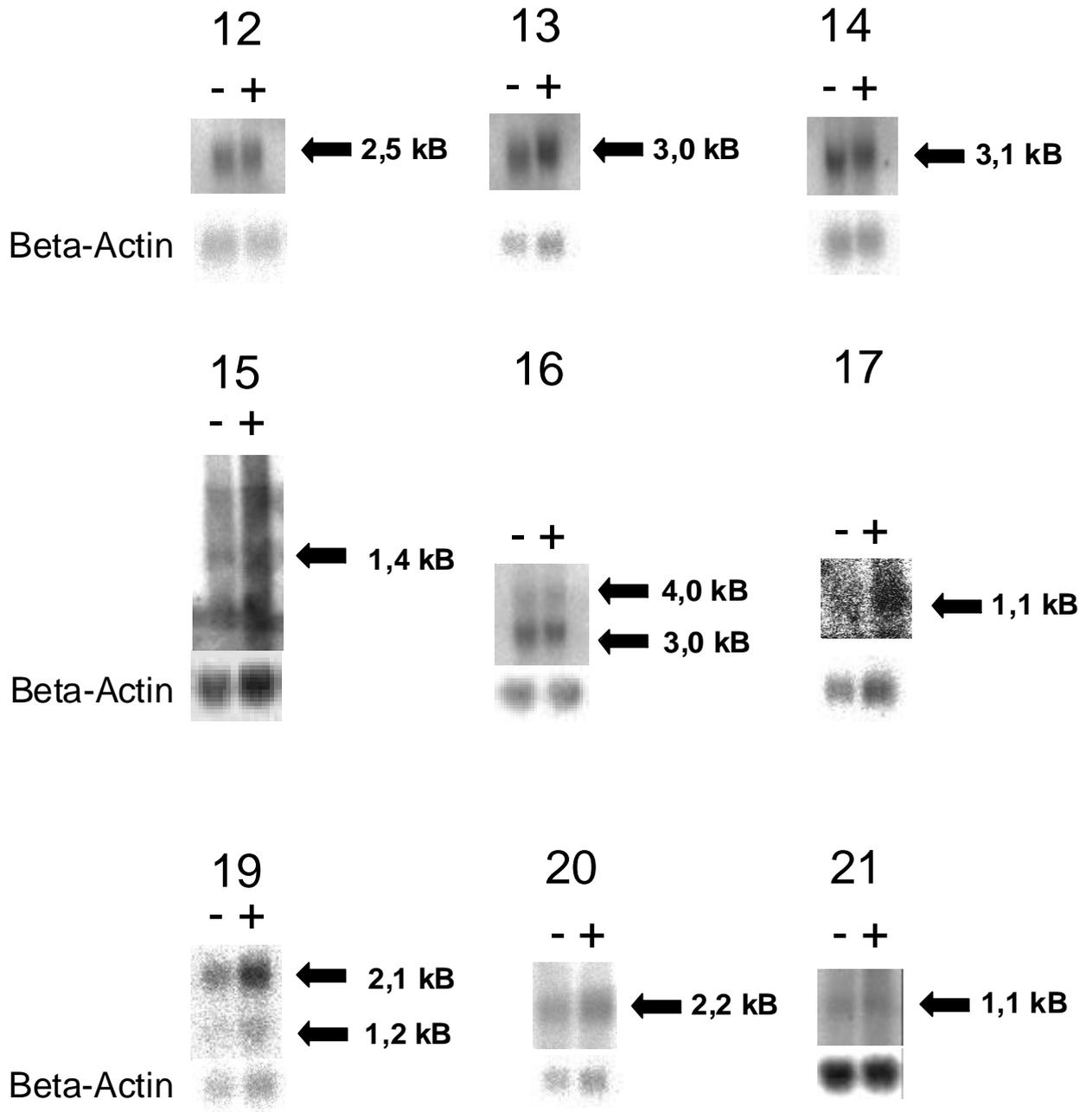
Unter den 19 im Northern Blot detektierten Transkripten fand sich bei 17 kein Hinweis auf eine differentielle Expression (Abbildung 3.18). Bei 2 Genen war ein Expressionsunterschied detektierbar (Abbildung 3.19): dem Gen Nr. 6 (TA1) und dem Gen Nr. 22 (Fyn). Ein Zusammenhang zwischen Signalstärkeunterschieden bei den Array-Hybridisierungen und dem in den Northern Blot-Analysen beobachteten Expressionsmuster war dabei nicht zu erkennen. So lagen die Signalstärkeunterschiede für TA1 und Fyn, für die im Northern Blot eine Expressionsdifferenz detektiert worden war, in den Array-Hybridisierungen bei 0,17 und 0,4 (5,8 und 2,5). Andere Gene hingegen, für die stärkere Signalunterschiede in den cDNA-Array-Hybridisierungen ermittelt worden waren (z.B. Gen 5 mit einem Wert von 7,8 oder die Gene 12 und 13 mit Werten von jeweils 4,1) zeigten hingegen keine differentielle Ex-

pression in den Northern Blot-Analysen (siehe Tabelle 3.2 sowie die Abbildungen 3.17 und 3.18).

Abbildung 3.18. auf den folgenden beiden Seiten: Northern Blot-Analysen zur Untersuchung des Expressionsmusters von Kandidatengen aus den cDNA-Array-Hybridisierungen. Dargestellt sind jene Northern Blot-Analysen, die die Abwesenheit einer differentiellen Expression von Kandidatengen zwischen FGF2-behandelten und unbehandelten Zellen des Klons WT26 demonstrieren. Angegeben ist jeweils die Gennummer (s.a. Legende zu Tabelle 3.2), die Transkriptgröße in kB sowie die Dauer der Zellbehandlung in Stunden (2 und 6) mit (+) und ohne (-) FGF2. Als Sonden wurden in den Hybridisierungen der Gene 1, 5, 7-14, 16, 17, 19 und 20 genspezifische RT-PCR-Produkte eingesetzt und in den Hybridisierungen der Gene 15, 18 und 21 genspezifische Oligonukleotidsonden.

Untersuchte Gene nach 2h ohne (-) und mit (+) FGF2

Untersuchte Gene nach 6h ohne (-) und mit (+) FGF2



Das TA1-Gen wurde 1995 als cDNA isoliert, die in Hepatomzellen aber nicht in normalen Leberzellen der Ratte exprimiert wird (Sang et al. 1995). Etwas später wurde eine verstärkte Expression des humanen homologen Gens „E16“ in verschiedenen Tumoren beobachtet (Wolf et al. 1996). TA1/E16 codiert für die leichte Kette (40 kDa) des CD98-Proteinkomplexes, der in der Plasmamembran lokalisiert ist und als Aminosäuretransporter und Permease fungiert (Mannion et al. 1998).

Das Protoonkogen Fyn wurde 1986 als src-ähnliche Nichtrezeptor-Proteintyrosinkinase beschrieben (Kawakami et al. 1986, Semba et al. 1986). Fyn codiert ein 59 kDa großes zellmembranassoziiertes Protein mit Tyrosinkinaseaktivität und steht im Zusammenhang mit Differenzierungsprozessen wie der Myelinisierung von Axonen (Unemori et al. 1994, Osterhout et al. 1999), der Ausbildung der Retina (Ingraham et al. 1992) oder der T-Zell-Aktivierung (Takeuchi et al. 1993).

Für die Gene TA1 und Fyn wiesen die cDNA-Array-Analysen auf eine verminderte Expression in FGF2-behandelten WT26-Zellen hin (Abbildung 3.17 und Tabelle 3.2). Diese Abnahme der Expression in FGF2-behandelten WT26-Zellen zeigte sich in den Northern Blot-Analysen ebenfalls für das TA1-Gen (Abbildung 3.19), wobei die Repression des TA1-Gens 1,8-fach nach 2-stündiger FGF2-Behandlung war.

Von dem Protoonkogen Fyn können zwei mRNA-Spezies der Größe 3,8 kB und 2,8 kB exprimiert werden (Lee et al. 1998). Dies wurde auch an der RNA von WT26-Zellen beobachtet (Abbildung 3.19). Während die 3,8 kB Fyn-mRNA in FGF2-behandelten Zellen geringer exprimiert war (2,2-fach), war die Expression der 2,8 kB langen Fyn-mRNA in diesen Zellen verstärkt (2,1-fach). Demnach war eine Korrelation der Daten aus den cDNA-Array-Analysen mit dem Expressionsmuster von Fyn nicht zu erkennen. Denn beide Fyn-mRNA-Spezies enthalten den gleichen translatierten Anteil (Lee et al. 1998) und sollten daher gleichermaßen an der Stärke eines Dot-Signals auf dem verwendeten Array beitragen, da nur Sequenzen aus translatierten mRNA-Bereichen auf dem Array aufgetragen sind.

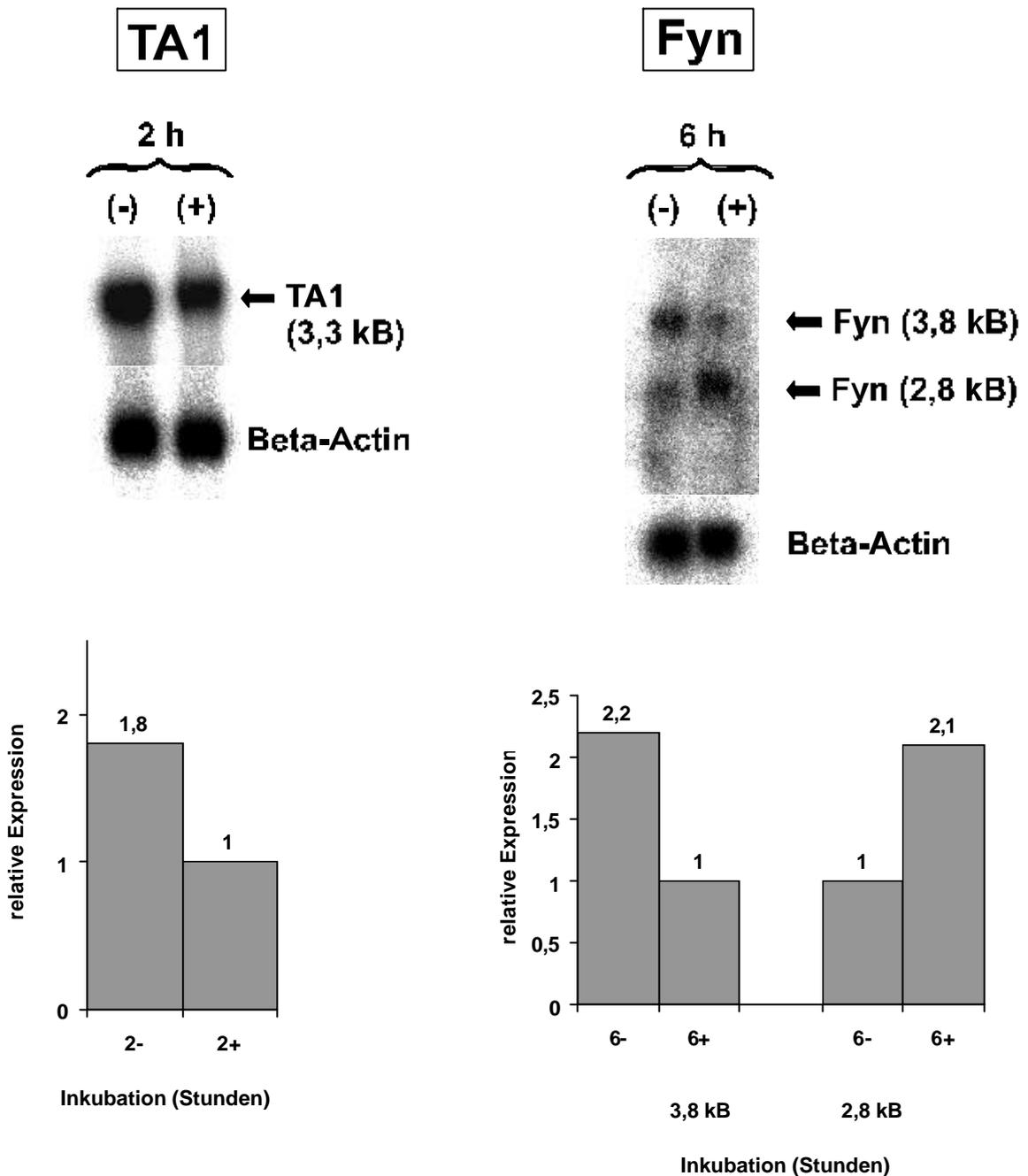


Abbildung 3.19: Dargestellt sind Northern Blot-Analysen zur Untersuchung des Expressionsmusters von TA1 (Gen 6, links) und Fyn (Gen 22, rechts) an der RNA von WT26-Zellen. Die Zellen waren 2 bzw. 6 Stunden mit (+) und ohne (-) FGF2 behandelt worden. Der Pfeil am linken Autoradiogramm markiert das etwa 3,3 kB große TA1-Transkript, die Pfeile am rechten Autoradiogramm markieren die beiden Fyn-Transkripte der Größe 2,8 kB und 3,8 kB. Die Stärke der Hybridisierungssignale wurde mit Hilfe des Programms TINA (Raytest Isotopenmessgeräte) bestimmt und über die Signalstärke der Beta-Actin-Hybridisierung normalisiert. Die berechneten Expressionsunterschiede sind als relative Expressionen jeweils unterhalb der Autoradiogramme graphisch als Balkendiagramme dargestellt. Der der niedrigeren Expression entsprechende Wert wurde jeweils als 1 gesetzt. Als Sonden in beiden dargestellten Hybridisierungen wurden jeweils genspezifische RT-PCR-Produkte eingesetzt.

3.4.5 Die über das Array-System detektierte differentielle Expression von TA1 und Fyn ist nicht auf die FGFR2-Aktivierung zurückzuführen

3.4.5.1 Untersuchung des Expressionsmusters von TA1 und Fyn nach unterschiedlichen FGF2-Inkubationszeiten in WT26-Zellen

Um zu untersuchen, ob die differentielle Expression der Gene TA1 und Fyn tatsächlich auf die FGFR2-Aktivierung zurückzuführen war, wurden für beide Gene jeweils 3 unabhängige Versuche zur Reproduktion der Effekte an der RNA von WT26-Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen für 1-6 Stunden (TA1) bzw. 1-10 Stunden (Fyn) in einstündlichen Intervallen mit und ohne FGF2 behandelt. Die Untersuchung der TA1- und Fyn-Expression in Northern Blot-Analysen nach verschiedenen FGF2-Inkubationszeiten sollte weiterhin einen Hinweis darauf geben, ob es sich bei den anfänglich beobachteten Expressionsdifferenzen von TA1 und Fyn lediglich um experimentell oder biologisch bedingte FGFR2-unabhängige Schwankungen gehandelt hatte. Denn waren die Expressionsdifferenzen von TA1 und Fyn FGFR2-abhängig gewesen, so war eine Reproduktion der Effekte in allen 3 Experimenten in einem vergleichbaren Zeitfenster der FGF2-Inkubationsdauer zu erwarten.

Bei der Untersuchung der TA1-Expression wurden in einem von den drei Versuchen keine Expressionsunterschiede von TA1 innerhalb einer Inkubationsdauer mit und ohne FGF2 detektiert, in 2 Experimenten hingegen wieder eine Repression der TA1-Expression nach FGF2-Behandlung der WT26-Zellen (Abbildung 3.20).

Der Repressionseffekt des TA1-Gens war demnach nicht in allen drei Experimenten zu beobachten. In den beiden Experimenten, in denen eine verminderte TA1-Expression nach FGF2-Behandlung der WT26-Zellen detektiert wurde, war der Effekt nach 3-stündiger FGF2-Inkubation zu sehen (1,9- bzw. 1,8-fach), nahm nach 4 Stunden wieder ab (1,4- bzw. 1,5-fach) und war nach 5 Stunden nicht mehr vorhanden. Die differentielle Expression des TA1-Gens erfolgte demnach in diesen beiden Experimenten während einer Zeitspanne von 2 Stunden.

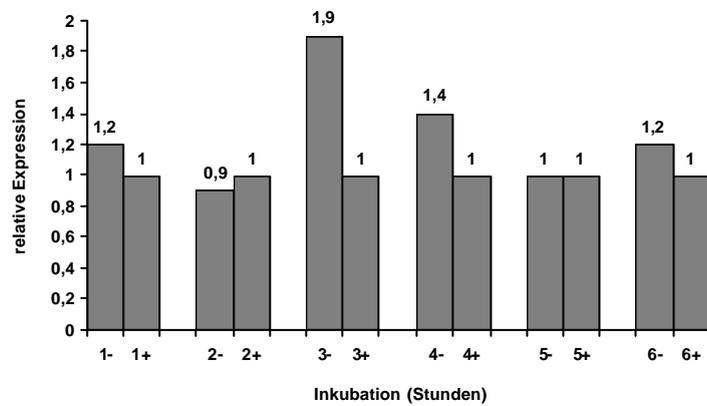
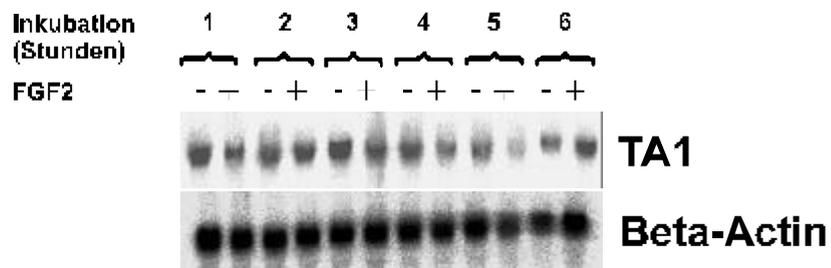
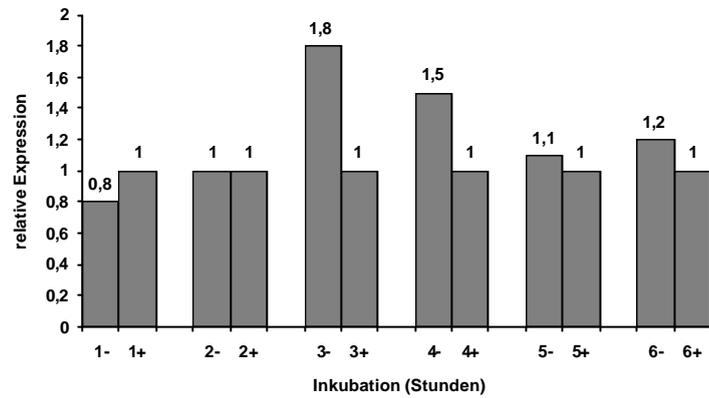
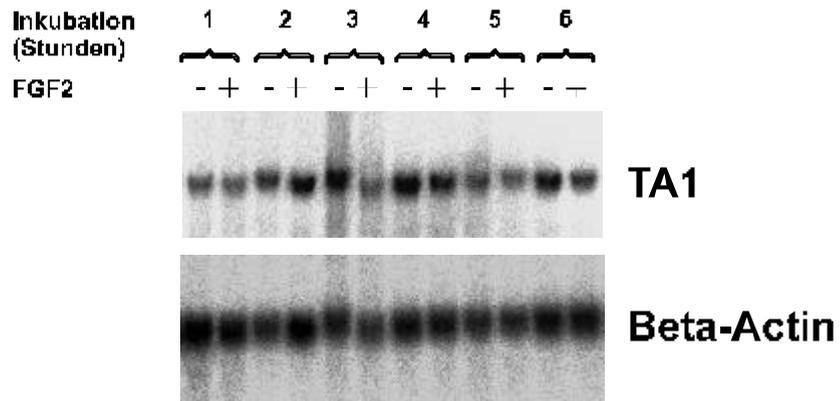
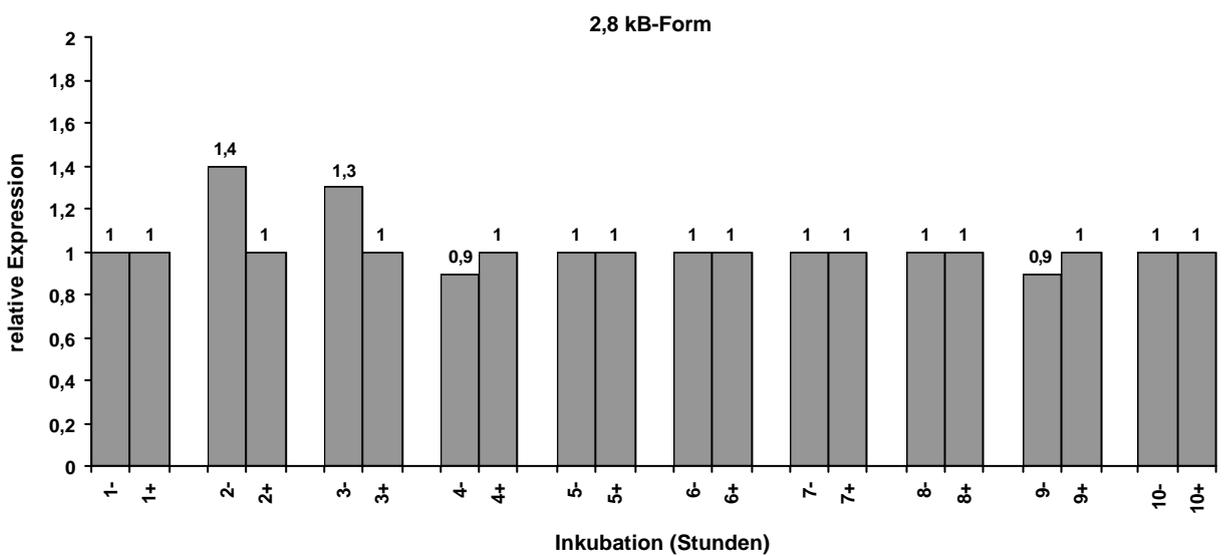
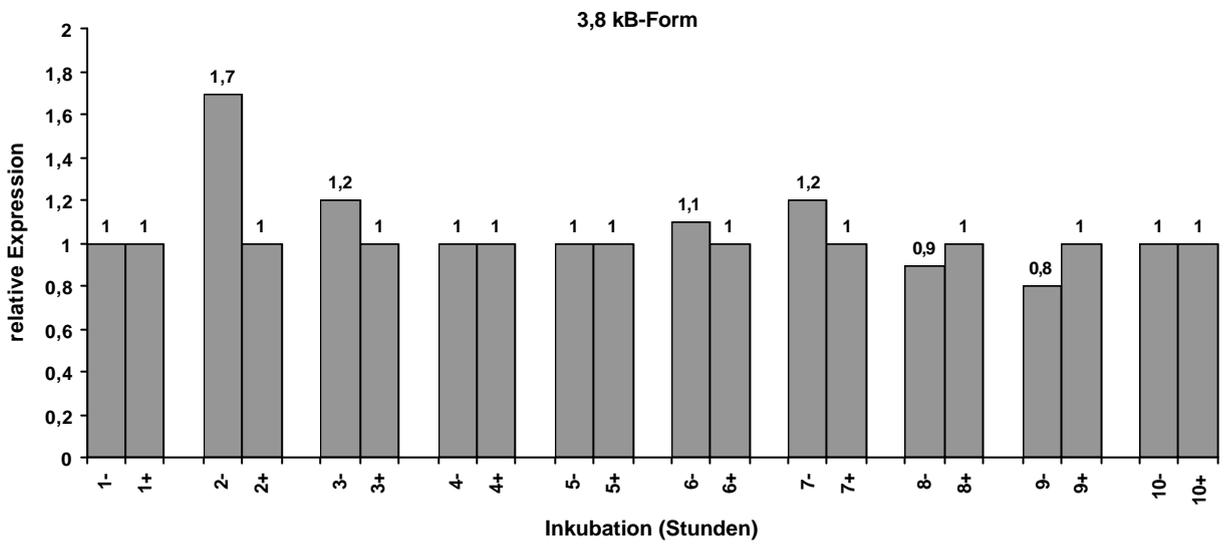
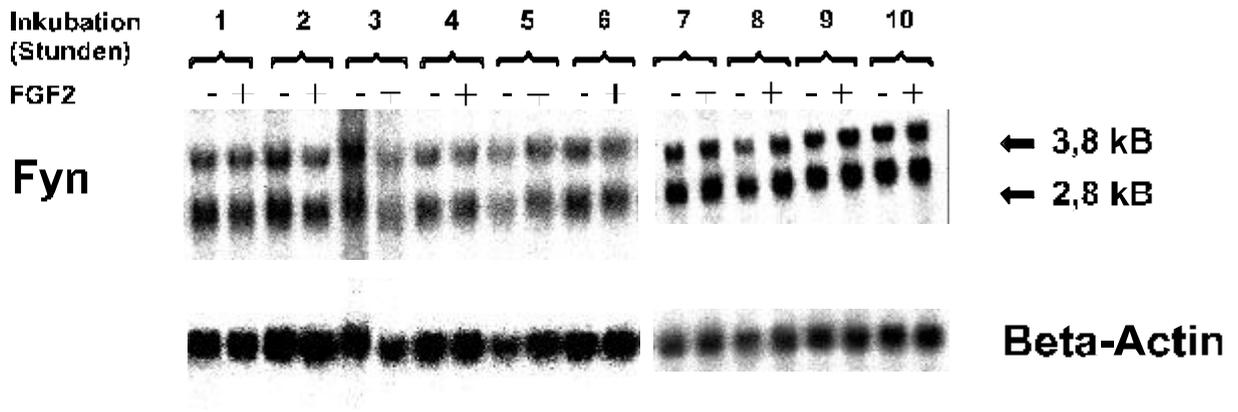
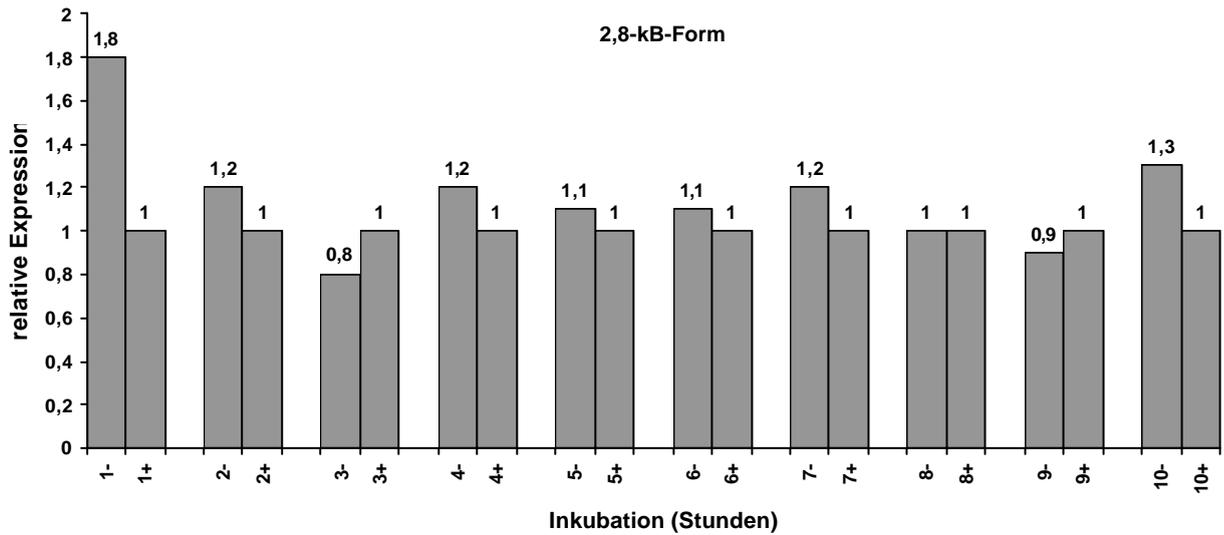
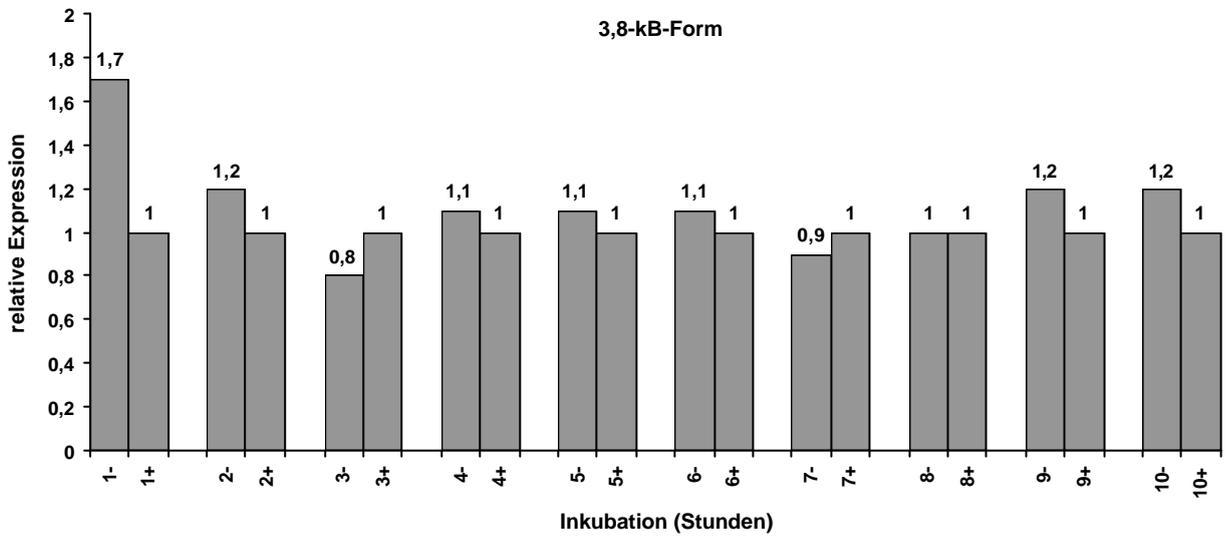
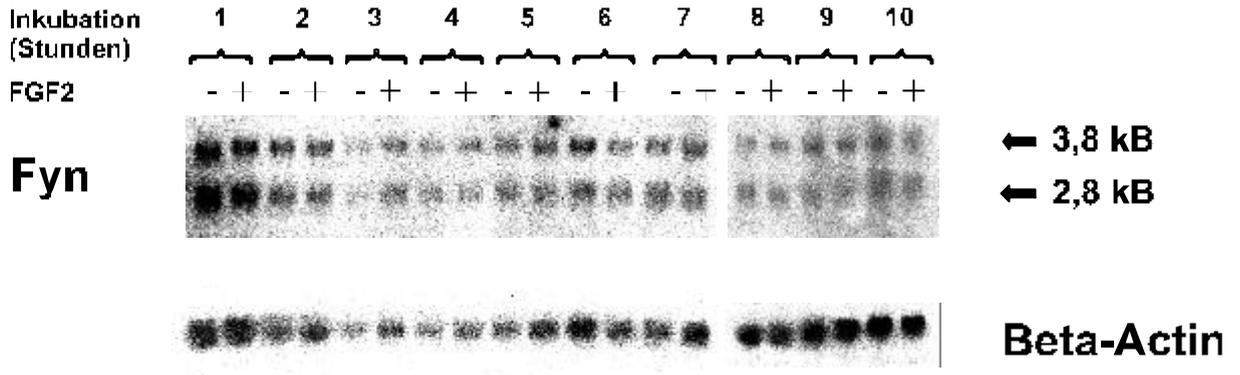


Abbildung 3.20, vorherige Seite: Dargestellt sind jene zwei Northern Blot-Analysen, in denen eine verminderte Expression des TA1-Gens in FGF2-behandelten WT26-Zellen zu beobachten war. Aufgetragen wurde jeweils RNA aus WT26-Zellen, die 1-6 Stunden ohne (-) oder mit (+) FGF2 inkubiert worden waren. Unterhalb der Autoradiogramme sind die TA1-Expressionsunterschiede innerhalb einer Inkubationsdauer jeweils graphisch als Balkendiagramme dargestellt. Die TA1-Signalstärke nach Behandlung mit FGF2 (+) wurde jeweils als 1 gesetzt. Die Messung und Korrektur der Hybridisierungssignale geschah wie in der Legende zu Abb. 3.19 beschrieben.

Bei den Untersuchungen zur Fyn-Expression waren ebenfalls in einem der drei oben beschriebenen Experimente keine Expressionsdifferenzen innerhalb einer Inkubationsdauer mit und ohne FGF2 zu beobachten. In den beiden anderen Versuchen waren zwar Fyn-Expressionsunterschiede innerhalb einer Inkubationsdauer mit und ohne FGF2 detektierbar. Jedoch waren diese Differenzen hinsichtlich Qualität und Zeitfenster der FGF2-Inkubation verschieden von dem Fyn-Expressionsmuster, das in Abbildung 3.19 dargestellt ist (Abbildung 3.21). Zum einen war die Expression der 3,8 kB langen Fyn-mRNA schon nach wesentlich kürzeren FGF2-Inkubationszeiten vermindert. Sie erfolgte in den beiden in Abbildung 3.21 dargestellten Versuchen nach 1 und 2 Stunden FGF2-Inkubation der WT26-Zellen, bei dem in Abbildung 3.19 dargestellten Versuch hingegen nach 6 Stunden FGF2-Inkubation. Die Stärke der Repression der 3,8 kB-mRNA lag dabei in den beiden in Abbildung 3.21 dargestellten Versuchen bei 1,7 und war damit etwas schwächer als bei dem in Abb. 3.19 dargestellten initialen Versuch (dort 2,2-fach). Zum anderen kam es in keinem der drei Reproduktionsversuche zu einer Zunahme der Expression der 2,8 kB langen Fyn-mRNA nach FGF2-Inkubation. Stattdessen wurde in 2 Experimenten im jeweils gleichen Zeitfenster wie für die lange Fyn-mRNA eine Abschwächung der Expression detektiert (1,4-fach nach 2 Stunden und 1,3-fach nach 3 Stunden bzw. 1,8-fach nach 1 Stunde und 1,2-fach nach 2 Stunden).

Abbildung 3.21, nächste 2 Seiten: Dargestellt sind jene 2 Northern Blot-Analysen, in denen Fyn-Expressionsdifferenzen nach FGF2-Inkubation der WT26-Zellen innerhalb einer FGF2-Inkubationsdauer detektiert worden waren. Aufgetragen wurde jeweils RNA aus WT26-Zellen, die 1-10 Stunden ohne (-) oder mit (+) FGF2 inkubiert worden waren. Unterhalb der Autoradiogramme sind die Fyn-Expressionsunterschiede innerhalb einer Inkubationsdauer jeweils graphisch als Balkendiagramme dargestellt. Die Fyn-Signalstärke nach Behandlung mit FGF2 (+) wurde jeweils als 1 gesetzt. Die Messung und Korrektur der Hybridisierungssignale geschah wie in der Legende zu Abb. 3.19 beschrieben.





3.4.5.2 Expressionsunterschiede des TA1- und Fyn-Gens innerhalb einer FGF2-Inkubationsdauer sind auch in L6-Zellen detektierbar, die keinen FGFR2 exprimieren

Die Verminderung der Expression des TA1- und Fyn-Gens nach FGF2-Behandlung von WT26-Zellen war nicht in allen Experimenten detektierbar. Weiterhin variierte der Effekt zumindest für das Fyn-Gen zeitlich sehr stark (zwischen 1 und 6 Stunden). Zum dritten war in keinem Folgeexperiment eine verstärkte Expression der 2,8 kB langen Fyn-mRNA zu beobachten. Zudem war die differentielle Expression dieser Gene auf WT26-Zellen beschränkt und nicht in den Zellen der Klone WT37 und WT44 zu beobachten. Da weiterhin der Faktor der Repression lediglich bei 1,7-2,2 lag, bestand die Möglichkeit, dass zufällig physiologische Schwankungen der Expression von TA1 und Fyn detektiert worden waren. Um einen Eindruck von der physiologischen FGFR2-unabhängigen Schwankungsbreite der TA1- und Fyn-Expression zu erhalten, wurden Kontrollexperimente an den Zellen des Klons V1 durchgeführt, die nur mit dem Expressionsvektor pcDNA3 alleine transfiziert worden waren. In vier unabhängigen Experimenten wurden V1-Zellen für 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Stunden mit bzw. ohne FGF2 behandelt und anschließend die Expression von TA1 und Fyn in Northern Blot-Analysen untersucht. Für das TA1-Gen zeigte sich in 1 von 4 Versuchen eine 1,7-fache FGFR2-unabhängige Expressionsdifferenz nach 4-stündiger Behandlung der V1-Zellen mit und ohne FGF2 (Abbildung 3.22). Für das Fyn-Gen zeigte sich ebenfalls in 1 von 4 Versuchen eine 1,6-fache FGFR2-unabhängige Expressionsdifferenz der 3,8 kB langen mRNA nach 2-stündiger Behandlung der V1-Zellen mit und ohne FGF2 (Abbildung 3.22). Die in Abbildung 3.22 dargestellten Expressionsschwankungen des TA1- und Fyn-Gens sind das Ergebnis von zwei verschiedenen Experimenten an den V1-Zellen.

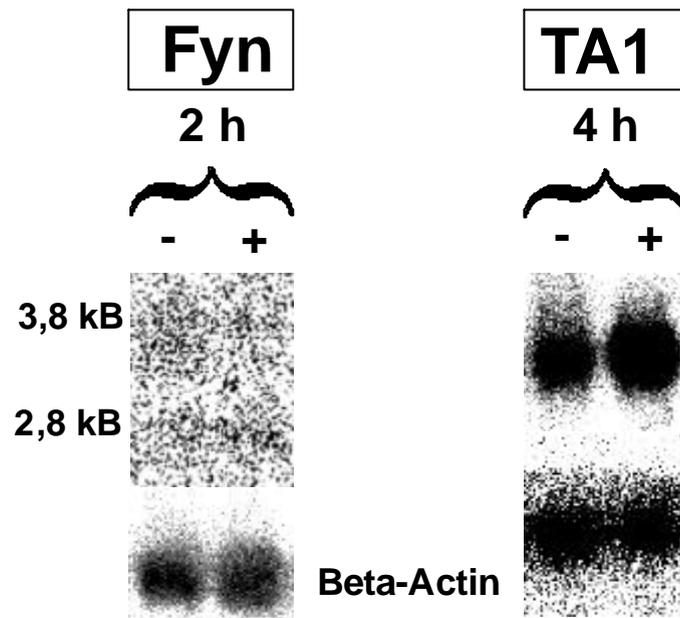


Abbildung 3.22: Dargestellt sind zwei Northern Blot-Analysen, die die FGFR2-unabhängige Schwankung der TA1- und Fyn-Expression demonstrieren. Als RNA-Quelle dienten V1-Zellen, die 2h (Fyn) oder 4h (TA1) ohne (-) oder mit (+) FGF2 inkubiert worden waren. Die Messung und Korrektur der Hybridisierungssignale geschah wie in der Legende zu Abb. 3.19 beschrieben. Für das Fyn-Gen wurde eine 1,6-fache Verminderung der Expression der 3,8 kB langen mRNA nach 2-stündiger FGF2-Behandlung und für das TA1-Gen eine 1,7-fache Verstärkung der Expression nach 4-stündiger FGF2-Behandlung detektiert.

Aufgrund dieser Befunde an V1-Zellen und der nur zum Teil gelungenen Reproduktion der Effekte an WT26-Zellen ist es nicht möglich, die über das cDNA-Array-System detektierte differentielle Expression von TA1 und Fyn als FGFR2-vermittelt anzusehen.

3.5 Untersuchung von weiteren Genen auf eine FGFR2-abhängige Regulation

Durch Verwendung 5'-endmarkierter Oligonukleotidsonden wurden weiterhin einige Gene direkt auf eine FGFR2-abhängige Regulation hin getestet, deren cDNAs auf den verwendeten cDNA-Arrays nicht repräsentiert waren. Dabei handelte es sich um Gene, für die ein Funktionszusammenhang mit Zellzyklusregulation (Cyclin D1, p21), Zelldifferenzierung (myogene Faktoren wie MRF4, Myf5, Myogenin oder MyoD) oder

zu Craniosynostosen (MSX2) bekannt war. Tatsächlich konnte eine Repression des MyoD-Gens nach FGF2-Behandlung von WT26-Zellen demonstriert werden.

3.5.1 Nach FGF2-Behandlung von WT26-Zellen war die Expression des Transkriptionsfaktors MyoD vermindert

MyoD gehört zu den Transkriptionsfaktoren mit Helix-Loop-Helix Motiv und ist einer der Hauptregulatoren der Myogenese (Yun & Wold 1996, Rawls & Olson 1997). MyoD übt diesen Effekt über die Bindung an die Regulationssequenzen muskelspezifischer Gene aus (Weintraub et al. 1990). Im Zellsystem der L6-Myoblasten war eine verminderte MyoD-Expression nach FGF2-Behandlung von WT26-Zellen zu beobachten (Abbildung 3.23).

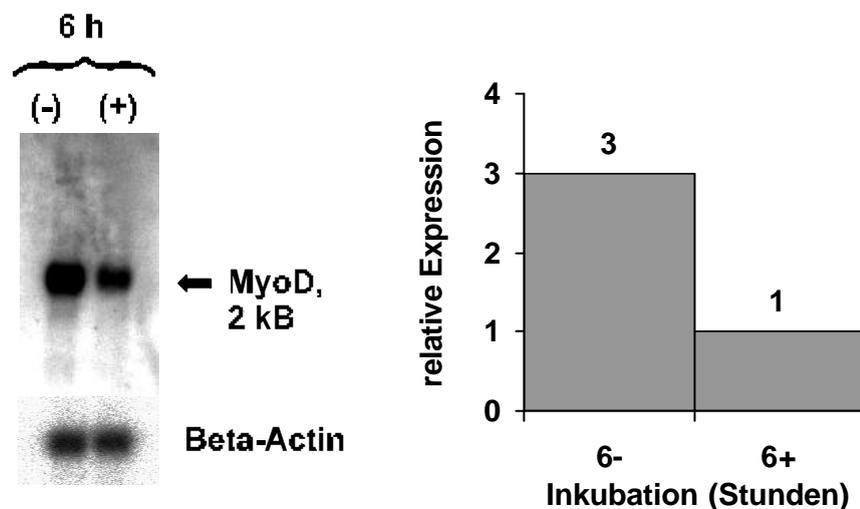


Abbildung 3.23: Northern Blot-Analyse (links), die die Repression des MyoD-Gens nach FGF2-Behandlung von WT26-Zellen demonstriert. Als Sonde diente ein am 5'-Ende mit g^{32} P-ATP markiertes 50 Nukleotide langes Oligonukleotid, das in der MyoD-mRNA der Ratte dem Bereich von 422-471 entsprach. Die MyoD-mRNA ist 1833 Nukleotide groß, die codierende Sequenz erstreckt sich von den Nukleotiden 192-1148. Als RNA-Quelle dienten WT26-Zellen, die 6 h ohne (-) bzw. mit (+) FGF2 inkubiert worden waren. Das ca. 2 kB große Transkript ist angezeigt. Rechts: Balkendiagramm zur graphischen Darstellung der MyoD-Repression. Die Messung und Korrektur der Hybridisierungssignale geschah wie in der Legende zu Abb. 3.19 beschrieben. Für die graphische Darstellung des Expressionsunterschiedes wurde der Wert der niedrigeren Expression als 1 gesetzt.

Die Ausmessung der Signalstärken ergab eine 3-fache Repression der MyoD-mRNA in WT26-Zellen nach 6-stündiger Behandlung mit FGF2.

3.5.1.1 Die MyoD-Repression in WT26-Zellen läßt sich nicht auf FGFR2 zurückführen

Wie im Abschnitt 3.4.5.1 für TA1 und Fyn beschrieben, wurden auch für das MyoD-Gen 3 unabhängige Versuche zur Reproduktion der MyoD-Repression an der RNA von WT26-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen für 1-10 Stunden in einständlichen Intervallen mit und ohne FGF2 behandelt und die MyoD-Expression anschließend in Northern Blot-Analysen untersucht. Dabei wurde in 2 der 3 Experimente keine differentielle Expression des MyoD-Gens innerhalb einer Inkubationsdauer mit und ohne FGF2 detektiert. Nur in einem Experiment war ein Expressionsunterschied innerhalb einer Inkubationsdauer zu sehen. Der Expressionsunterschied war allerdings mit dem Faktor 1,5 wesentlich schwächer als bei dem in Abbildung 3.23 dargestellten Versuch (dort 3-fach). Weiterhin trat der Effekt zeitlich stark verschoben bereits nach 2 Stunden FGF2-Inkubation auf anstatt wie ursprünglich detektiert nach 6-stündiger FGF2-Inkubation (Abbildung 3.24).

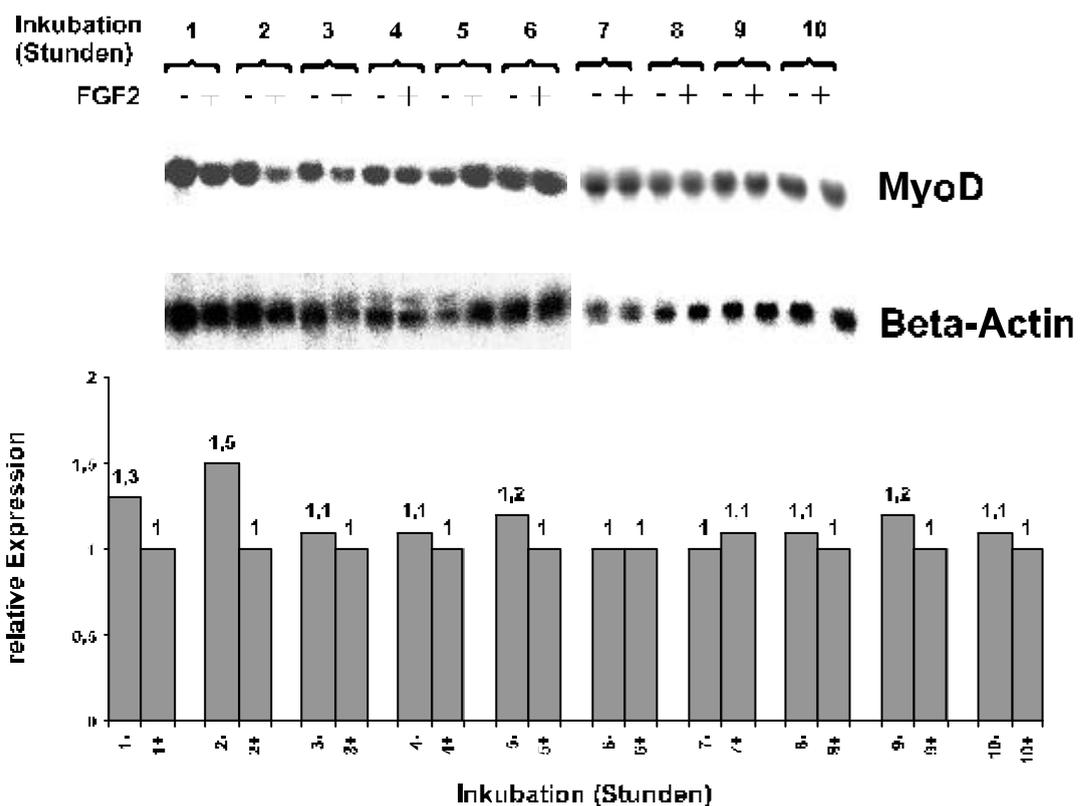


Abbildung 3.24: Dargestellt ist jene Northern Blot-Analyse, in der eine Expressionsdifferenz des MyoD-Gens innerhalb einer Inkubationsdauer der WT26-Zellen mit FGF2 beobachtet wurde. Aufgetragen wurde RNA aus WT26-Zellen, die 1-10 Stunden ohne (-) oder mit (+) FGF2 inkubiert worden waren. Als Sonde wurde das in der Legende zu Abb. 3.23 beschriebene 50-mer aus der MyoD-mRNA verwendet.

Unterhalb des Autoradiogramms sind die MyoD-Expressionsunterschiede innerhalb einer Inkubationsdauer graphisch als Balkendiagramm dargestellt. Die MyoD-Signalstärke nach Behandlung mit FGF2 (+) wurde jeweils als 1 gesetzt. Die Messung und Korrektur der Hybridisierungssignale geschah wie in der Legende zu Abb. 3.19 beschrieben.

In keinem der drei Experimente war demnach die MyoD-Repression mit einem vergleichbaren Faktor in einem ähnlichen Zeitfenster wie bei dem in Abbildung 3.23 dargestellten Versuch zu reproduzieren. Da weiterhin auch in WT37- und WT44-Zellen keine Expressionsdifferenzen des MyoD-Gens nach FGF2-Behandlung beobachtbar waren, ist es wie für TA1 und Fyn auch für das MyoD-Gen nicht möglich, die in Abbildung 3.23 gezeigte Expressionsminderung als FGFR2-vermittelt anzusehen.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe verschiedener experimenteller Systeme versucht, an FGFR2-transfizierten L6-Rattenmyoblasten FGFR2-regulierte Gene zu identifizieren. Die L6-Zellen schienen für diese Ansätze geeignet, da sie ihre endogenen FGFR-Gene nicht exprimieren. Nach Transfektion mit der humanen FGFR2-cDNA wurden L6-Klone mit stabiler FGFR2-Expression isoliert. Die Klone BEK26 und WT26 wurden für Differential Display RT-PCR-Analysen bzw. cDNA-Array-Hybridisierungsanalysen verwendet. Beide Techniken ermöglichten den Vergleich der RNA-Expression FGF2-behandelter versus unbehandelter Zellen desselben Klons. Weiterhin wurden einige Gene direkt in WT26-Zellen auf eine FGFR2-abhängige Regulation hin untersucht.

Das Differential Display der RNA aus BEK26-Zellen lieferte 52 Kandidaten für FGFR2-regulierte Gene. Von diesen ddPCR-Produkten erwiesen sich 50 als falsch positiv. Typischerweise enthielten die Banden in ddPCR-Gelen mehrere verschiedene cDNAs gleicher Größe. Ein ddPCR-Fragment führte im Northern Blot

zwar zur Detektion eines differentiell exprimierten Transkripts. Es zeigte sich aber, dass dies vermutlich das Ergebnis einer Kreuzhybridisierung war. Durch die ddPCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass nach FGF2-Behandlung der BEK26-Zellen eine verstärkte Fragmentierung der mitochondrialen 16S-rRNA zu beobachten war. Da die Translation der FGFR2-mRNA in BEK26-Zellen jedoch nicht nachgewiesen werden konnte, kann die Fragmentierung der mitochondrialen 16S-rRNA nach Behandlung der Zellen mit FGF2 nicht auf FGFR2 zurückgeführt werden.

Die Analyse der RNA aus WT26-Zellen an cDNA-Arrays lieferte 22 Kandidaten für FGFR2-regulierte Gene. Von diesen wurde für 2 Gene eine differentielle Expression nach FGF2-Behandlung der WT26-Zellen durch Northern Blots bestätigt. Es handelte sich um das TA1-Gen, welches die kleine Untereinheit des plasmamembranständigen Aminosäuretransporters CD98 codiert und um das Fyn-Protoonkogen, welches eine src-ähnliche cytoplasmatische Protein-Tyrosinkinase codiert. Die differentielle Expression von TA1 und Fyn wurde jedoch nicht in allen Experimenten nach FGF2-Behandlung der WT26-Zellen beobachtet. Weiterhin war sie auch nicht in WT37- und WT44-Zellen zu sehen. Darüberhinaus wurde eine differentielle Expression von TA1 und Fyn in FGF2-behandelten V1-Zellen detektiert, die keinen FGFR2 exprimieren. Aufgrund dieser Befunde kann die differentielle TA1- und Fyn-Expression nicht als FGFR2-abhängig angesehen werden.

Nach Einsatz 5'-endmarkierter Oligonukleotide zur direkten Testung ausgewählter Gene auf eine FGFR2-abhängige Regulation wurde eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktors MyoD nach FGF2-Behandlung der WT26-Zellen detektiert. Der Effekt war jedoch in keinem der drei Reproduktionsversuche an WT26-Zellen in dem anfänglich beobachteten Zeitfenster (6 Stunden FGF2-Inkubation) und in dieser Stärke (3-facher Expressionsunterschied) wieder zu finden. Weiterhin war auch in WT37- und WT44-Zellen keine differentielle Expression des MyoD-Gens detektiert worden. Daher ist es auch für das MyoD-Gen nicht möglich, die einmal beobachtete differentielle Expression auf die Aktivierung von FGFR2 zurückzuführen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in allen drei experimentellen Ansätzen (Differential Display, cDNA-Array-System und Kandidatengentestung) zwar differentiell exprimierte Gene bzw. Geneffekte gefunden wurden (mt16S-rRNA-Fragmentierung, TA1, Fyn und MyoD). Keine dieser Effekte lässt sich jedoch mit Sicherheit auf die Aktivierung von FGFR2 zurückführen, da entweder die FGFR2-Translation in den verwendeten Zellen nicht nachweisbar war (mt-16S-rRNA-Fragmentierung in BEK26-

Zellen), die Effekte nur zum Teil oder gar nicht reproduzierbar waren (TA1, Fyn und MyoD) oder differentielle Expressionen auch FGFR2-unabhängig in V1-Zellen auftraten (TA1 und Fyn).

4 Diskussion

Zur Vertiefung des Verständnisses FGFR2-abhängiger Prozesse wurde versucht, Gene zu identifizieren, die von FGFR2 reguliert werden. Hierzu wurden L6-Rattenmyoblasten verwendet, die mit der humanen FGFR2-cDNA transfiziert worden waren und erst dadurch den Rezeptor exprimierten. Die Suche nach über FGF2/FGFR2 angesteuerten Genen geschah durch den Vergleich der RNA-Expression zwischen FGF2-behandelten und unbehandelten L6-Zellen desselben Klons. Die RNA-Populationen wurden mit Differential Display und cDNA-Array-Hybridisierungen analysiert. Weiterhin wurden einige Gene direkt auf eine FGFR2-abhängige Regulation hin untersucht.

In jedem dieser drei Ansätze wurden Hinweise auf differentiell exprimierte Gene bzw. Geneffekte erhalten. So schien die mitochondriale 16S-rRNA in FGF2-behandelten BEK26-Zellen im Vergleich zu Kontrollen fragmentiert zu sein. Untersuchungen mit dem Array-System ergaben Befunde, die mit einer Expressionsminderung von TA1 und Fyn in FGF2-behandelten WT26-Zellen konsistent waren. Außerdem schien die Expression von MyoD aufgrund von Northern Blot-Hybridisierungsexperimenten reduziert zu sein. Keine der Effekte kann jedoch zweifelsfrei auf die Aktivierung von FGFR2 zurückgeführt werden, da die Effekte nur zum Teil reproduzierbar waren und auch FGFR2-unabhängig auftraten (TA1, Fyn und MyoD) oder die FGFR2-Expression lediglich als mRNA aber nicht als Protein nachgewiesen werden konnte (BEK26-Zellen).

Das in Abbildung 3.1 dargestellte experimentelle System zur Identifizierung FGF2/FGFR2-regulierter Gene hat daher nicht zur gesicherten Ermittlung FGFR2-abhängiger Genexpressionen geführt. Dieser Befund muss eine kritische Betrachtung der Komponenten dieses Systems und ein Überdenken des experimentellen Ansatzes zur Folge haben. Die wesentlichen Komponenten des Systems sind dabei das Differential Display, das Array-System und die Verwendung der L6-Zellen.

4.1 Differential Display-Analysen: Die Fragmentierung der mt16S-rRNA und eine Einschätzung der Technik

Differential Display wurde seit seiner Erstbeschreibung 1992 (Liang und Pardee 1992) häufig als Methode angewendet, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren.

Die Durchführung der Differential Display-Methode an der RNA von BEK26-Zellen lieferte 52 cDNAs, deren Expression differentiell reguliert zu sein schien. Von diesen 52 ddPCR-Produkten führten zwei zu einem differentiellen Signal in Northern Blot-Analysen. Die weiteren Untersuchungen ergaben, dass von diesen beiden Effekten die verstärkte Fragmentierung der mitochondrialen 16S-rRNA nach FGF2-Behandlung der BEK26-Zellen das einzige anscheinend differentiell exprimierte ddPCR-Produkt war (Abschnitt 3.3.3). Die Induktion der mt16S-rRNA-Degradierung ist im Prinzip ein interessanter Effekt, der von anderen Untersuchern ebenfalls über das Differential Display detektiert wurde und dabei in Zusammenhang mit einem Wachstumsstopp von HA1-Fibroblasten stand, die oxidativem Stress ausgesetzt worden waren (Crawford et al. 1997). In BEK26-Zellen kann dieser Effekt nicht in Zusammenhang mit FGFR2 gebracht werden, da die Translation der FGFR2-mRNA in den Zellen letztlich nicht nachweisbar war. Es wäre allerdings denkbar, dass es sich bei der Fragmentierung der mt16S-rRNA um einen FGF2-vermittelten Effekt handelte, der über sogenannte *low affinity*-FGF-Rezeptoren vermittelt wurde. Diese niedrigaffinen FGF-Rezeptoren sind Heparansulfatproteoglykane (HSPGs). Sie befinden sich an der Zelloberfläche der meisten Zellen und wirken als Corezeptoren für hochaffine FGFRs (s. Abschnitt 1.1, „FGF-Rezeptoren“). L6-Zellen, die keine signifikante FGFR-Expression haben, können FGF2 über HSPGs binden und internalisieren. Dies hat in den Zellen eine erhöhte Aktivität des proteolytischen Enzyms Urokinase-Plasminogenaktivator (Quarto und Amalric 1994) sowie eine nukleäre Akkumulation des FGF2 kombiniert mit einer schwachen Inhibierung der Gesamt-RNA-Expression (Hawker und Granger 1994) zur Folge. Die HSPG-vermittelte FGFR-unabhängige FGF2-Internalisierung wurde auch in *chinese hamster ovary*-Zellen (CHO-Zellen) und endothelialen GM7373-Zellen beobachtet (Roghani und

Moscatelli 1992, Rusnati et al. 1993). Es ist letztlich spekulativ, ob es über diesen Mechanismus zur Fragmentierung der mt16S-rRNA in FGF2-behandelten BEK26-Zellen kam. Die Möglichkeit dieses Mechanismus zeigt aber die Komplexität des FGF-FGFR-HSPG-Systems.

Durch die Detektion dieses Effekts im Differential Display ist jedoch die Annahme begründet, dass die Technik an sich in dieser Arbeit in einer Form durchgeführt wurde, die geeignet war, differentiell exprimierte Gene zu finden. Dadurch ist eine solidere Einschätzung der Differential Display-Technik vor dem Hintergrund des zweiten hervorstechenden Befundes aus den Differential Display-Analysen möglich: dem Auftreten einer hohen Anzahl *reproduzierter* falsch-positiver Fragmente (51 von 52 ddPCR-Produkten).

Die Generierung einer hohen Anzahl falsch-positiver Fragmente im Differential Display ist eine gängige Beobachtung im Zusammenhang mit dieser Technik. Der Anteil der Artefakte liegt gewöhnlich bei 70-98% (z.B. Yang et al. 1996, Tiao et al. 1996, Livesey & Hunt 1998, Plonczynski et al. 1999, Lakaye et al. 2000, Tang et al. 2000).

Mögliche Ursachen für die hohe Anzahl falsch-positiver Ergebnisse sind partielle Degradation von mRNA, Pipettierunterschiede und Verwendung verschiedener Enzymchargen (Doss 1996), Kontamination der RNA mit genomischer DNA (Zhao et al. 1995), defekte PCR-Reaktionsgefäße (Chen et al. 1994) und Limitierungen in der Auflösung von ddPCR-Produkten durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Letzteres führt dazu, dass eine ddPCR-Bande mehrere cDNAs gleicher Größe enthalten kann (Callard et al. 1994). Bis auf die limitierte Auflösung durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese sind diese Ursachen für falsch-positive Amplifikate allerdings dann weitgehend auszuschließen, wenn das Differential Display, wie in dieser Arbeit geschehen, in unabhängigen Doppelansätzen durchgeführt wird. Dadurch sollten experimentell bedingte Schwankungen der Amplifikation von mRNAs von echten differentiellen Effekten unterscheidbar sein.

Weitere Schwierigkeiten im Zusammenhang mit der Differential Display-Technik sind die Unterrepräsentation und Redundanz von mRNA-Signalen (Linskens et al. 1995), das häufige Anlagern des GC-reichen 5'-Primers an beiden Enden (Hadman et al. 1995, Graf et al. 1997) und die bevorzugte Amplifikation stark exprimierter mRNAs (Linskens et al. 1995, Bertioli et al. 1995).

Die Produktion vieler falsch-positiver Ergebnisse, das häufige aberrante Anlagern der Primer (was vermutlich zur Bildung des in Abschnitt 3.3.4 beschriebenen cDNA-Dimers geführt hatte) und die bevorzugte Amplifikation stark exprimierter RNAs sind Komplikationen im Differential Display, die vermutlich an der nicht zu umgehenden Verwendung von degenerierten Primern liegen. Aufschlussreiche Experimente hierzu beschreiben Ledakis et al. 1998 an der modellhaften Amplifikation des *multiple drug resistance 1*- (MDR1-) Gens (Ledakis et al. 1998). Die Autoren amplifizierten die MDR1-mRNA aus den beiden humanen Kolonkarzinom-Zelllinien SW620 und Ad1000. SW620-Zellen haben eine niedrige und Ad1000-Zellen eine hohe MDR1-Expression. Aus der RNA von Ad1000-Zellen (starke MDR1-Expression) wurde das MDR1-Transkript im Differential Display mit 3 verschiedenen geankerten Oligo-dT-Primern ($T_{12}MA$, $T_{12}MC$ und $T_{12}MT$, wobei M für A, C oder G steht) und 2 unterschiedlichen 5'-Primern amplifiziert. Aus der RNA von SW620-Zellen (schwache MDR1-Expression) hingegen wurde selbst mit der optimalen Primerkombination (das heißt einem passenden geankerten Oligo-dT-Primer und einem MDR1-spezifischen 10mer als 5'-Primer) MDR1 nicht amplifiziert. Dies war umso bemerkenswerter, da die MDR1-Expression in SW620-Zellen noch ausreichend hoch war, um in Northern Blot-Analysen nachweisbar zu sein (Ledakis et al. 1998). Hochabundante mRNAs werden demnach auch unter suboptimalen Bedingungen amplifiziert. Schwächer exprimierte mRNAs können dagegen vielfach nicht einmal unter optimalen Bedingungen amplifiziert werden, da die Primer durch Konkurrenz der stark exprimierten mRNAs abgefangen werden. Die meisten der in einer Zelle vorhandenen mRNAs werden nur schwach exprimiert. Etwa 86% der mRNAs einer Zelle liegen in weniger als 5 Kopien vor (Zhang et al. 1997). Daher ist die Amplifikation des weitaus größten Anteils der mRNAs im Differential Display mit erheblichen Unsicherheiten behaftet. Die bevorzugte Amplifikation stark exprimierter mRNAs bei Verwendung degenerierter Primer könnte neben den oben genannten Gründen eine weitere Ursache für das Auftreten zahlreicher falsch-positiver Fragmente sein: Leichte (nichtsignifikante) Schwankungen in der Menge einer stark exprimierten mRNA könnten sich bei 30-40 PCR-Zyklen bereits als unterschiedlich starke Expression bemerkbar machen. Weiterhin gestalteten sich die nachfolgenden Untersuchungen auf die Echtheit der differentiellen Expression von cDNAs aus dem Differential Display oft weit aufwendiger als ursprünglich angenommen, da:

1. die cDNA-Banden aus Differential Display-Gelen meist mehrere cDNAs enthielten (Abschnitt 3.3.2), von denen jede für sich isoliert und untersucht werden musste.
2. die cDNA-Banden Amplifikate der 3'-Enden von mRNAs waren, die auf Northern Blots wegen repetitiver Elemente im 3'-untranslatierten Bereich oft mit vielen RNAs hybridisierten. In Extremfällen hybridisierten Sonden über die gesamte RNA-Spur auf dem Northern Blot. In diesen Fällen musste eine Sonde aus nichtrepetitiven Bereichen dieser mRNA generiert werden. Dazu war zunächst die Charakterisierung durch Sequenzierung nötig und gegebenenfalls eine Subklonierung, falls das ddPCR-Produkt aus mehreren verschiedenen cDNAs bestand (siehe Punkt 1).
3. selbst eine isolierte und klonierte cDNA ein Dimer aus zwei RNA-Anteilen sein konnte (Abschnitt 3.3.4), was mit weitergehenden Charakterisierungen verbunden war (Abschnitt 3.3.4).

Die vielfältigen, der Differential Display-Technik inhärenten Schwierigkeiten haben dazu geführt, dieses System zur Analyse von RNA-Expressionen durch die Methode der cDNA-Array-Hybridisierungen zu ersetzen.

4.2 Befunde aus den cDNA-Array-Analysen

Die Schwächen des Differential Display scheinen vornehmlich in der Amplifikation von mRNAs mit Gen-unspezifischen Primern begründet zu sein. Die Methode der Hybridisierung von cDNA-Expressions-Arrays unterscheidet sich daher vorteilhaft von der Differential Display-Technik durch die Spezifität der Reaktionen. Diese Spezifität wird ermöglicht durch den Einsatz genspezifischer Primer bei der reversen Transkription zur Sondensynthese und durch die Vermeidung einer Amplifikation durch PCR.

Auf den in dieser Arbeit verwendeten ATLAS Rat 1.2 Arrays von Clontech sind 1176 Gensequenzen aus einem funktionell breiten Spektrum aufgetragen (Tabelle 3.1). Die Gene stehen mit grundlegenden zellphysiologischen Prozessen wie Wachstum, Differenzierung, Zellstoffwechsel, Zellkommunikation, intra- und interzellulärer Signalgebung, Transportmechanismen und -raten sowie Apoptose in Zusammenhang. Die funktionelle Vielfalt der auf dem Array repräsentierten Sequenzen ermöglicht demnach auch eine simultane Untersuchung unterschiedlichster Reaktionsmöglich-

keiten von Zellen auf einen externen Stimulus. Die Analysen der RNA-Expressionen FGF2-behandelter und unbehandelter WT26-Zellen durch Hybridisierung dieser Arrays führte zur Identifizierung von 22 Kandidatengenen, die nach FGFR2-Aktivierung differentiell reguliert zu sein schienen und funktionell tatsächlich auch sehr unterschiedlichen Bereichen zuzuordnen waren. Es handelte sich dabei um ein Zelloberflächenantigen (Gen 6), einen Transkriptionsfaktor (Gen 1), ein Onkogen (Gen 22), um Ionenkanäle und Transportproteine (Gene 15 und 18), um Proteine zur Zielsteuerung und des intrazellulären Transports (Gene 2 und 19), um Stoffwechselproteine (Gene 3, 7 und 20), um Rezeptoren (Gen 4), um Proteine zur Signalgebung und Zellkommunikation (Gene 5, 16, 17 und 21) sowie um Proteine in der intrazellulären Signalübermittlung (Gene 8-14). Jeweils 11 der Gene schienen verstärkt bzw. vermindert exprimiert zu sein nach FGF2-Behandlung der WT26-Zellen.

Für 2 dieser 22 Gene wurde in den anschließenden Northern Blot-Analysen eine differentielle Expression detektiert. Es handelte sich dabei um das TA1-Gen, welches einen zellmembranständigen Aminosäuretransporter codiert (Gen 6) und um das Fyn-Protoonkogen, das für eine cytoplasmatische Protein-Tyrosinkinase der src-Familie codiert (Gen 22). Die Quantität der differentiellen Expression beider Gene in FGF2-behandelten und unbehandelten WT26-Zellen lag dabei in einem Bereich von 1,8 bis 2,2.

Im Falle des TA1-Gens hatten die Array-Hybridisierungen auf eine verminderte Expression in FGF2-behandelten WT26-Zellen hingewiesen. Diese Qualität der differentiellen Expression wurde im Northern Blot ebenfalls beobachtet. Das Fyn-Gen schien gemäß den Array-Hybridisierungen in FGF2-behandelten WT26-Zellen ebenfalls abgeschwächt exprimiert zu sein. Dieses Bild zeigte sich im Northern Blot jedoch nur für die 3,8 kB lange mRNA, während gleichzeitig die 2,8 kB lange mRNA verstärkt exprimiert war. Dieser Befund ist insofern nicht zu erklären, als beide Fyn-mRNAs an der Signalstärke des Array-Dots gleichermaßen beteiligt sein sollten. Denn auf den verwendeten Arrays sind translatierte mRNA-Bereiche als cDNAs aufgetragen und beide Fyn-mRNA-Spezies enthalten den gleichen translatierten Anteil (Lee et al. 1998).

Nach diesen Analysen waren TA1 und Fyn aussichtsreiche Kandidaten für FGFR2-regulierte Gene in WT26-Zellen: Es waren wiederholt differentielle Expressionen in den Array-Hybridisierungen zu beobachten gewesen und das Vorhandensein als auch die Qualität (zumindest bei der Repression des TA1-Gens) einer differentiellen

Expression im Northern Blot gezeigt. Wiederholte Experimente an FGF2-behandelten und unbehandelten WT26-Zellen sowie an WT37- und WT44-Zellen zeigten jedoch, dass die differentielle Expression von TA1 und Fyn nur zum Teil reproduzierbar war. Weiterhin waren auch in V1-Zellen, die keinen FGFR2 exprimieren, Expressionsunterschiede der beiden Gene nach Behandlung der Zellen mit und ohne FGF2 zu beobachten. Es ist daher möglich, dass über die Array-Hybridisierungen zufällig physiologische Schwankungen der Expression beider Gene detektiert worden sind, die in keinem kausalen Zusammenhang zur FGFR2-Aktivierung stehen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass damit keines der auf dem Array repräsentierten 1176 Gene nachweislich aufgrund der FGFR2-Aktivierung in WT26-Zellen differentiell exprimiert wurde.

4.3 Einschätzung des cDNA-Array-Systems und der Eignung der L6-Rattenmyoblasten zur Identifizierung FGFR2-regulierter Gene

Hybridisierungsanalysen an cDNA-Expressions-Arrays sind grundsätzlich geeignet zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene. Dies zeigen sowohl die in dieser Arbeit beschriebenen Detektionen der Expressionsunterschiede von TA1 und Fyn in WT26-Zellen über das Array-System als auch die Dokumentationen der erfolgreichen Anwendung der Clontech-Arrays in der Literatur (z.B. Wellmann et al. 2000, Kelly & Rizzino 2000, Smid-Koopman et al. 2000, Anderson et al. 1999, Spirin et al. 1999, Hilsenbeck et al. 1999, Lendeckel et al. 1998). In einigen dieser Studien war die Anzahl der detektierten differentiell exprimierten Gene allerdings gering. So fanden Smid-Koopman et al. (2000) 3 differentiell exprimierte Gene zwischen benignem und malignem endometrialem Gewebe, Wellman et al. (2000) 1 differentiell exprimiertes Gen zwischen ALCL-lymphomatischen Zelllinien (*anaplastic large cell lymphoma*) und anderen lymphomatischen Zelllinien des B- und T-Zell-Systems sowie Lendeckel et al. (1998) 1 differentiell exprimiertes Gen zwischen proliferationsaktiven und proliferationsinhibierten Zellen der T-Zelllinie KARPAS-299. Diese Studien demonstrieren, dass trotz signifikanter biologischer Unterschiede der verglichenen RNA-Quellen die Unterschiede im Genexpressionsmuster gering sein können. Dieser Aspekt sollte

beachtet werden bei der Einschätzung, ob sich die L6-Zellen für Studien eignen, die die Identifizierung FGFR2-regulierter Gene zum Ziel haben. Der Befund aus den Array-Hybridisierungen ist, dass keines der 1176 Gene auf den ATLAS Rat 1.2 Arrays nachweislich auf die FGFR2-Aktivierung mit einer differentiellen Expression reagiert hat. Demnach könnte es sein, dass FGFR2 in den WT26-Zellen nur in geringem Umfang oder gar nicht das Expressionsmuster von Genen beeinflusst, was zumindest für die 1176 untersuchten Sequenzen anzunehmen ist. Dies könnte daran liegen, dass zwischen FGF2-behandelten und unbehandelten WT26-Zellen kein signifikanter biologischer Unterschied besteht.

Die L6-Zellen schienen aus zwei Gründen geeignet zu sein, um *downstream*-Gene von FGFR2 zu identifizieren. Zum einen exprimieren die Zellen ihre FGF-Rezeptoren nicht. Dadurch ist nach Transfektion der Zellen mit einer spezifischen FGFR-cDNA die Untersuchung der Biologie dieses speziellen FGFR-Subtyps möglich. Aus diesem Grund wurden und werden L6-Zellen häufig verwendet, um bestimmte Aspekte der FGFR-Wirkung aufzuklären. Die folgenden Beispiele stellen nur eine Auswahl dar. So wurde an FGFR2-transfizierten L6-Zellen die Bedeutung der IgIII-Domäne der FGFRs für die Spezifität der Ligandenbindung ermittelt (Dell und Williams 1992), an FGFR1-transfizierten L6-Zellen beobachtet, dass die Aktivierung des Grb2-Sos-Ras-Signalweges über das Adapterprotein Shc erfolgt (Klint et al. 1995), dass die FGF2-Behandlung FGFR1-exprimierender L6-Zellen zur Aktivierung der p70-S6-Kinase führt (Kanda et al. 1997), dass ein erhöhter Lipidmetabolismus in FGF2-behandelten FGFR1-exprimierenden L6-Zellen stattfindet (van Dijk und van Blitterswijk 1998), dass verschiedene FGFR1-Subtypen das Adapterprotein FRS2 unterschiedlich stark aktivieren (Lopez und Korc 2000) oder dass die Ligandenbindungsspezifität und -affinität der IgIIIb-Variante von FGFR1 für FGF1 und FGF2 verschieden ist (Beer et al. 2000). Diese Studien zeigen, dass FGFRs in L6-Zellen biologisch wirksam sind. Sie binden ihre Liganden und sie beeinflussen die Aktivität von Signaltransduktionskomponenten. Die Annahme war daher begründet, dass die Aktivierung von FGFR2 in L6-Zellen über die Aktivierung der Signaltransduktionskaskade das Expressionsmuster einiger Gene verändern würde. Dies war der zweite Grund, weswegen L6-Zellen für die Identifizierung FGFR2-regulierter Gene geeignet schienen.

Es ist jedoch nicht bekannt, ob FGFRs tatsächlich in L6-Zellen das Expressionsmuster von Genen beeinflussen. Dies muss nicht notwendigerweise die Konsequenz sein, wenn Komponenten der Signaltransduktion in ihrer Aktivität reguliert werden.

Zum einen sind vielleicht entscheidende Mediatoren wie zum Beispiel spezifische Transkriptionsfaktoren in den L6-Zellen nicht exprimiert. Zum anderen muss eine FGFR2-induzierte physiologische oder strukturelle Veränderung in den L6-Zellen nicht unbedingt über eine Veränderung der mRNA-Menge eines bestimmten Gens vermittelt werden. Ebenso gut könnten FGFR2-induziert mRNAs alternativ gespleißt, alternativ polyadenyliert oder ihre Transportraten vom Kern ins Cytoplasma verändert werden. Schließlich könnte die Aktivität bestimmter bereits vorhandener Schlüsselproteine auch direkt reguliert werden. Es sollte bedacht werden, dass Differential Display- und Array-Analysen nur RNA-Expressionen respektive deren Unterschiede detektieren können und damit nur ein Aspekt von Genexpression erfaßt wird. Ob sich L6-Zellen zur Identifizierung FGFR2-regulierter Gene eignen, bleibt damit offen. Die Negativ-Befunde in dieser Arbeit legen jedoch nahe, die Eignung der L6-Zellen für diese Analysen zumindest in Frage zu stellen, da möglicherweise die mRNA-Mengen von *downstream*-Genen durch FGFR2 in diesen Zellen nicht signifikant beeinflusst werden.

4.4 Einschätzung des in dieser Arbeit gewählten experimentellen Ansatzes zur Identifizierung FGFR2-regulierter Gene und mögliche Alternativen

Der in dieser Arbeit verfolgte experimentelle Ansatz zur Identifizierung FGFR2-regulierter Gene bestand in Differential Display- und cDNA-Array-Analysen der RNA FGFR2-transfizierter L6-Zellen. Das Ziel, FGFR2-regulierte Gene zu finden, wurde mit diesem Ansatz nicht erreicht. Damit hat sich dieses Versuchssystem in der hier durchgeführten Form für diese Analysen nicht bewährt. Die Techniken Differential Display und cDNA-Array-Hybridisierungen wurden dabei erfolgreich etabliert und angewendet, da einige differentiell exprimierte Gene in L6-Zellen identifiziert werden konnten, die schließlich aber nicht mit der FGFR2-Aktivierung in Zusammenhang zu bringen waren. Die Erfahrungen mit beiden Methoden zeigen, dass das cDNA-Array-System dem Differential Display vorzuziehen ist. Die Primäranalysen zur Identifizie-

rung von differentiell exprimierten Kandidatengenen waren im Differential Display wesentlich aufwendiger und dabei nicht mit einer quantitativ größeren Ausbeute echter differentieller Effekte verbunden.

Die biologische Komponente in diesem System waren FGFR2-transfizierte L6-Zellen. Ihre Eignung ist fraglich, da nicht bekannt ist, ob FGFRs in diesen Zellen Effekte induzieren, die dann über Techniken wie Differential Display oder Array-Hybridisierungen detektiert werden können.

Zur Identifizierung FGFR2-regulierter Gene sollte daher eine andere biologische Komponente verwendet werden, an der dann die Genexpression über das geeigneter zu sein scheinende Array-System untersucht werden kann. Um den Einfluss der FGFRs auf die Cranialsuturenentwicklung zu untersuchen, kämen hier Studien an Primärgeweben in Frage. Da der Zugang zu humanen Geweben begrenzt ist, wären geeignete Tiermodelle zu erstellen. Ein interessanter Ansatz wäre die Generierung einer transgenen Maus mit einer FGFR2-Mutation, die beim Menschen zu einer Craniosynostose führt. Die Expression von Genen in den Cranialsuturen dieser Tiere könnte dann in Array-Analysen verglichen werden mit der Genexpression in Cranialsuturen von Tieren, die den Wildtyp-FGFR2 exprimieren. Der Vorteil solcher Studien läge in der direkten Untersuchung der *in vivo*-Situation. Neben der Untersuchung von Primärgeweben ist auch die Verwendung primärer kultivierter Osteoblasten denkbar. Osteoblasten, die aus Cranialsuturen von Craniosynostose-Patienten mit verschiedenen FGFR2-Mutationen kultiviert wurden, zeigten ein unterschiedliches Proliferations- und Differenzierungsmuster während der Kultivierung (Fragale et al. 1999). Dies legt nahe, dass die Zellen auch in der Kultur Eigenschaften beibehalten, die auf der Präsenz einer spezifischen FGFR2-Mutation beruhen. Ein Vergleich der Genexpressionen von primären kultivierten Osteoblasten, die den Wildtyp-FGFR2 exprimieren mit Osteoblasten, die einen mutierten FGFR2 exprimieren, wäre daher vielleicht sinnvoll.

4.5 Schlussfolgerungen

Die in dieser Arbeit etablierten *in vitro*-Systeme zur Detektion FGFR2-regulierter Gene (Differential Display und cDNA-Array-Hybridisierungen) bestanden in der vergleichenden Analyse der RNA-Expressionen von mit FGF2 behandelten und unbe-

handelten FGFR2-exprimierenden L6-Zellen. Die Techniken Differential Display und Array-Analysen haben sich zwar als geeignet erwiesen, differentiell exprimierte Gene zu detektieren. Jedoch war es nicht möglich zu beweisen, dass diese Effekte auf der Aktivierung von FGFR2 beruhten. Da die Eignung der L6-Zellen für die Untersuchung FGFR2-abhängiger Genexpression letztlich unklar ist, liegt hier vielleicht der Schwachpunkt dieses *in vitro*-Systems. Als Konsequenz aus diesen Befunden erscheint es sinnvoll, andere Untersuchungsobjekte zu verwenden. In Frage kämen hier Primärgewebe von zum Beispiel FGFR2-transgenen Mäusen oder primäre kultivierte humane Osteoblasten von Craniosynostose-Patienten. Als Untersuchungsmethode sollten dabei Array-Hybridisierungen den Differential Display-Analysen vorgezogen werden.

5 Zusammenfassung

FGF-Rezeptoren sind an der Regulation zahlreicher physiologischer Vorgänge beteiligt. Weiterhin können Mutationen in den Genen für FGFR1, FGFR2 und FGFR3 zu autosomal-dominant vererbten Craniostosesyndromen führen. Besonders häufig sind dabei Mutationen im FGFR2-Gen. Die Identifizierung von durch FGFR2 regulierten Genen kann das molekulare Verständnis FGFR-regulierter normaler und abnormaler Prozesse vertiefen. Zur Identifizierung FGFR2-regulierter Gene wurde ein *in vitro*-System an der Zelllinie L6 (Rattenmyoblasten) etabliert. L6-Zellen exprimieren ihre FGFR-Gene nicht. Die L6-Zellen wurden durch Transfektion mit der humanen FGFR2-cDNA zur FGFR2-Expression gebracht. Dabei wurden die zwei FGFR2-exprimierenden L6-Klone BEK26 und WT26 isoliert. Bei den Zelllinien war die FGFR2-Expression auf RNA-Ebene nachweisbar und in WT26-Zellen darüberhinaus auch auf Protein-Ebene. Die RNA aus FGF2-behandelten Zellen beider Klone wurde auf FGFR2-regulierte Gene hin untersucht. Hierzu wurden Differential Display-Analysen an der RNA aus BEK26-Zellen und cDNA-Expressionsarray-Analysen an der RNA von WT26-Zellen durchgeführt. In beiden Ansätzen wurden zunächst Hinweise auf FGF2/FGFR2-regulierte Gene bzw. Geneffekte gefunden. So konnte über das Differential Display der RNA von BEK26-Zellen nach FGF2-Behandlung eine verstärkte Fragmentierung der mitochondrialen 16S-rRNA detektiert werden. Die Array-Analysen ergaben Hinweise, wonach in WT26-Zellen FGF2-vermittelt die Expression der Gene TA1 und Fyn vermindert zu sein schien. In Northern Blot-Analysen wurde außerdem in einem Experiment eine erniedrigte Expression des Transkriptionsfaktors MyoD nach FGF2-Behandlung der WT26-Zellen detektiert.

Diese Effekte sind jedoch nicht sicher auf die Aktivierung von FGFR2 zurückzuführen, da sie nur zum Teil (TA1 und Fyn) oder gar nicht (MyoD) reproduzierbar waren, auch unabhängig von FGFR2 Expressionsunterschiede beobachtet wurden (TA1 und Fyn in V1-Zellen, die keinen FGFR2 exprimieren) oder die Translation des FGFR2-Proteins in den BEK26-Zellen letztlich nicht nachweisbar war (wodurch die Fragmentierung der mitochondrialen 16S-rRNA nicht als FGFR2-vermittelt angesehen werden kann).

Es ist demnach nicht gelungen, mit dem in dieser Arbeit gewählten experimentellen Ansatz gesicherte FGFR2-regulierte Gene zu identifizieren.

Da das Differential Display und das Array-System sich prinzipiell als geeignet erwiesen haben, Unterschiede in der Expression von Genen zu detektieren, liegt der Schwachpunkt des in dieser Arbeit gewählten experimentellen Ansatzes möglicherweise in der Verwendung der L6-Zellen. Es ist nicht bekannt und bleibt offen, ob L6-Zellen für Studien geeignet sind, die die Identifizierung von *downstream*-Genen eines FGF-Rezeptors zum Ziel haben. Die Negativbefunde dieser Arbeit legen jedoch nahe, dies in Frage zu stellen. Die biologische Komponente dieses Versuchsansatzes könnte beispielsweise ersetzt werden durch Gewebe von transgenen Tieren oder durch primäre humane Osteoblastenkulturen. Es sollte dann versucht werden, mit Hilfe dieser RNA-Quellen FGFR2-regulierte Gene zu ermitteln. Als Untersuchungsmethode wäre hierbei das anscheinend effektivere cDNA-Array-System dem Differential Display vorzuziehen.

6 Literaturverzeichnis

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular biology of the cell. Garland 1989, New York.

Anderson J, Burns HD, Enriquez-Harris P, Wilkie AOM, Heath JK. Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand. *Hum Mol Genet.* 1998 Sep; 7(9): 1475-83.

Anderson KM, Alrefai WA, Bonomi P, Dudeja P, Ou D, Anderson C, Harris JE. Altered oncogene, tumor suppressor and cell-cycle gene expression in PANC-1 cells cultured with the pleiotrophic 5-lipoxygenase inhibitor, MK886, assessed with a gene chip. *Anticancer Res.* 1999 Sep-Oct;19(5B):3873-87.

Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, Heath JK, Lonai P. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 28; 95(9): 5082-7.

Armelin HA. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973 Sep; 70(9): 2702-6.

Bashkin P, Doctrow S, Klagsbrun M, Svahn CM, Folkman J, Vlodavsky I. Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry* 1989 Feb 21; 28(4): 1737-43.

Beer HD, Vindevoghel L, Gait MJ, Revest JM, Duan DR, Mason I, Dickson C, Werner S. Fibroblast Growth Factor (FGF) receptor 1-IIIb is a naturally occurring functional receptor for FGFs that is preferentially expressed in the skin and the brain. *J Biol Chem* 2000. 275(21): 16091-7.

Bellot F, Crumley G, Kaplow JM, Schlessinger J, Jaye M, Dionne CA. Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors. *EMBO J.* 1991 Oct; 10(10): 2849-54.

Bellus GA, Gaudenz K, Zackai EH, Clarke LA, Szabo J, Francomano CA, Muenke M. Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. *Nat Genet.* 1996 Oct; 14(2): 174-6.

Berridge MJ. Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature.* 1993 Sep 30; 365(6445): 388-9.

Bertioli DJ, Schlichter UH, Adams MJ, Burrows PR, Steinbiss HH, Antoniow JF. An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 1995 Nov 11;23(21):4520-3.

Burgess WH, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem.* 1989; 58: 575-606. Review.

Callard D, Lescure B, Mazzolini L. A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. *Biotechniques*. 1994 Jun;16(6):1096-7, 1100-3.

Chellaiah AT, McEwen DG, Werner S, Xu J, Ornitz DM. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. *J Biol Chem*. 1994 Apr 15;269(15):11620-7.

Chen Z, Swisshelm K, Sager R. A cautionary note on reaction tubes for differential display and cDNA amplification in thermal cycling. *Biotechniques*. 1994 Jun;16(6):1002-4, 1006.

Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18: 5294-5299.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.

Cohen MMJ. *Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation, And Management*. New York, Raven Press, 1986.

Cohen MMJ. Syndromes with craniosynostosis: general aspects and well known syndromes, in: Gorlin RJ, Cohen MMJ, Levin LS (Hrsg.): *Syndromes of the head and neck*. Oxford University Press, New York, 1990, S. 519-564.

Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet*. 1996 Apr; 12(4): 390-7.

Crawford DR, Wang Y, Schools GP, Kochheiser J, Davies KJ. Down-regulation of mammalian mitochondrial RNAs during oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(3):551-9.

Del Gatto F, Breathnach R. A Crouzon syndrome synonymous mutation activates a 5' splice site within the IIIc exon of the FGFR2 gene. *Genomics*. 1995 Jun 10; 27(3): 558-9.

Dell KR, Williams LT. A novel form of fibroblast growth factor receptor 2. Alternative splicing of the third immunoglobulin-like domain confers ligand binding specificity. *J Biol Chem* 1992. 267(29): 21225-9.

Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell*. 1996 Mar 22; 84(6): 911-21.

Deng CX, Wynshaw-Boris A, Shen MM, Daugherty C, Ornitz DM, Leder P. Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev*. 1994 Dec 15; 8(24): 3045-57.

Dionne CA, Crumley G, Bellot F, Kaplow JM, Searfoss G, Ruta M, Burgess WH, Jaye M, Schlessinger J. Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO J.* 1990 Sep; 9(9): 2685-92.

Doss RP. Differential display without radioactivity-a modified procedure. *Biotechniques.* 1996 Sep;21(3):408-10, 412.

Eisemann A, Ahn JA, Graziani G, Tronick SR, Ron D. Alternative splicing generates at least five different isoforms of the human basic-FGF receptor. *Oncogene.* 1991 Jul; 6(7): 1195-202.

el Ghouzzi V, Le Merrer M, Perrin-Schmitt F, Lajeunie E, Benit P, Renier D, Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Munnich A, Bonaventure J. Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chatzen syndrome. *Nat Genet.* 1997 Jan; 15(1): 42-6.

Fragale A, Tartaglia M, Bernardini S, Michela Di Stasi AM, Di Rocco C, Velardi F, Teti A, Battaglia PA, Migliaccio S. Decreased Proliferation and Altered Differentiation in Osteoblasts from Genetically and Clinically Distinct Craniosynostotic Disorders. *American Journal of Pathology* 1999. 154 (5): 1465-1478.

Galvin BD, Hart KC, Meyer AN, Webster MK, Donoghue DJ. Constitutive receptor activation by Crouzon syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor (FGFR)2 and FGFR2/Neu chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jul 23; 93(15): 7894-9.

Gorlin RJ, Cohen MMJ, Levin LS (Hrsg.): *Syndromes of the head and neck.* Oxford University Press, New York, 1990.

Graf D, Fisher AG, Merckenschlager M. Rational primer design greatly improves differential display-PCR (DD-PCR). *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun 1;25(11):2239-40.

Hadman M, Adam BL, Wright GL Jr, Bos TJ. Modifications to the differential display technique reduce background and increase sensitivity. *Anal Biochem.* 1995 Apr 10;226(2):383-6.

Hawker JR, Granger HJ. Nuclear accumulation of exogenous basic fibroblast growth factor in endothelial, fibroblast, and myoblast cell lines results in diverse biological responses. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1994. 30A(10): 653-63.

Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell.* 1995 Jan 27; 80(2): 213-23. Review.

Hilsenbeck SG, Friedrichs WE, Schiff R, O'Connell P, Hansen RK, Osborne CK, Fuqua SA. Statistical analysis of array expression data as applied to the problem of tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Mar 3;91(5):453-9.

Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI, Garcia Delgado C, Gonzalez-Ramos M, Kline AD, Jabs EW. Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chatzen syndrome. *Nat Genet.* 1997 Jan; 15(1): 36-41.

- Hunter AG, Rudd NL. Craniosynostosis. I. Sagittal synostosis: its genetics and associated clinical findings in 214 patients who lacked involvement of the coronal suture(s). *Teratology*. 1976 Oct; 14(2): 185-93.
- Ingraham CA, Cooke MP, Chuang YN, Perlmutter RM, Maness PF. Cell type and developmental regulation of the *fyn* proto-oncogene in neural retina. *Oncogene* 1992; 7(1): 95-100.
- Iseki S, Wilkie AO, Heath JK, Ishimaru T, Eto K, Morriss-Kay GM. *Fgfr2* and osteopontin domains in the developing skull vault are mutually exclusive and can be altered by locally applied FGF2. *Development*. 1997 Sep; 124(17): 3375-84.
- Jabs EW, Muller U, Li X, Ma L, Luo W, Haworth IS, Klisak I, Sparkes R, Warman ML, Mulliken JB, et al. A mutation in the homeodomain of the human *MSX2* gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell*. 1993 Nov 5; 75(3): 443-50.
- Johnson DE, Lee PL, Lu J, Williams LT. Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol*. 1990 Sep; 10(9): 4728-36.
- Johnson DE, Lu J, Chen H, Werner S, Williams LT. The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol Cell Biol*. 1991 Sep; 11(9): 4627-34.
- Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res*. 1993; 60: 1-41. Review.
- Kan M, Wang F, Xu J, Crabb JW, Hou J, McKeehan WL. An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. *Science*. 1993 Mar 26; 259(5103): 1918-21.
- Kanda S, Hodgkin MN, Woodfield RJ, Wakelam MJ, Thomas G, Claesson-Welsh L. Phosphatidylinositol 3'-kinase-independent p70 S6 kinase activation by fibroblast growth factor receptor-1 is important for proliferation but not differentiation of endothelial cells. *J Biol Chem* 1997. 272(37): 23347-53.
- Kato S, Sekine K. FGF-FGFR signaling in vertebrate organogenesis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1999 Jul; 45(5): 631-8. Review.
- Kawakami T, Pennington CY, Robbins KC. Isolation and oncogenic potential of a novel human *src*-like gene. *Mol Cell Biol* 1986; 6(12):4195-201.
- Keating MT, Escobedo JA, Williams LT. Ligand activation causes a phosphorylation-dependent change in platelet-derived growth factor receptor conformation. *J Biol Chem*. 1988 Sep 15; 263(26): 12805-8.
- Keegan K, Johnson DE, Williams LT, Hayman MJ. Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, *FGFR-3*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Feb 15; 88(4): 1095-9.

- Kelly DL, Rizzino A. DNA microarray analyses of genes regulated during the differentiation of embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev.* 2000 Jun;56(2):113-23.
- Klint P, Claesson-Welsh L. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front Biosci.* 1999 Feb 15; 4:D165-77. Review.
- Klint P, Kanda S, Claesson-Welsh L. Shc and a novel 89-kDa component couple to the Grb2-Sos complex in fibroblast growth factor-2-stimulated cells. *J Biol Chem* 1995. 270(40): 23337-44.
- Klint P, Kanda S, Kloog Y, Claesson-Welsh L. Contribution of Src and Ras pathways in FGF-2 induced endothelial cell differentiation. *Oncogene.* 1999 Jun 3; 18(22): 3354-64.
- Kostrzewa M, Muller U. Genomic structure and complete sequence of the human FGFR4 gene. *Mamm Genome.* 1998 Feb;9(2):131-5.
- Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, Schlessinger J. A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell.* 1997 May 30; 89(5): 693-702.
- Kozak M (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell.* 1986 Jan 31;44(2):283-92.
- Kozak M (1987a). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 1987; 196: 947-950.
- Kozak M (1987b). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 8125-48.
- Kozak M (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem.* 1991 Oct 25;266(30):19867-70. Review.
- Kozak M (1996). Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm Genome.* 1996 Aug;7(8):563-74. Review.
- Lajeunie E, Le Merrer M, Bonaiti-Pellie C, Marchac D, Renier D. Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. *Am J Med Genet.* 1995 Feb 13;55(4):500-4.
- Lakaye B, de Borman B, Minet A, Arckens L, Vergnes M, Marescaux C, Grisar T. Increased expression of mRNA encoding ferritin heavy chain in brain structures of a rat model of absence epilepsy. *Exp Neurol.* 2000 Mar;162(1):112-20.
- Ledakis P, Tanimura H, Fojo T. Limitations of differential display. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Oct 20;251(2):653-6.
- Lee C, Kim MG, Jeon SH, Park DE, Park SD, Seong RH. Two species of mRNAs für the fyn proto-oncogene are produced by an alternative polyadenylation. *Mol Cells* (1998); 8(6): 746-9.

Lee PL, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA, Williams LT. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science*. 1989 Jul 7; 245(4913): 57-60.

Lendeckel U, Kahne T, Arndt M, Frank K, Ansorge S. Inhibition of alanyl aminopeptidase induces MAP-kinase p42/ERK2 in the human T cell line KARPAS-299. *Biochem Biophys Res Commun* 1998. 252(1): 5-9.

Li X, Park WJ, Pyeritz RE, Jabs EW. Effect on splicing of a silent FGFR2 mutation in Crouzon syndrome. *Nat Genet*. 1995 Mar; 9(3): 232-3.

Liang P, Averboukh L, Pardee AB. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res* 1993; 21 (14): 3269-75.

Liang P, Pardee AB. Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction. *Science* 1992; 257: 967-71.

Lin HY, Xu J, Ischenko I, Ornitz DM, Halegoua S, Hayman MJ. Identification of the cytoplasmic regions of fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 which play important roles in induction of neurite outgrowth in PC12 cells by FGF-1. *Mol Cell Biol*. 1998 Jul; 18(7): 3762-70.

Linskens MHK, Junli F, Andrews WH, Enlow BE, Saati SM, Tonkin LA, Funk WD, Villeponteau B. Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucleic Acids Res* 1995; 23 (16): 3244-51.

Livesey FJ, Hunt SP. Differential display cloning of genes induced in regenerating neurons. *Methods*. 1998 Dec; 16(4): 386-95.

Lopez ME, Korc M. A novel type I fibroblast growth factor receptor activates mitogenic signaling in the absence of detectable tyrosine phosphorylation of FRS2. *J Biol Chem* 2000. 275(21): 15933-9.

Mannion BA, Kolesnikova TV, Lin SH, Wang S, Thompson NL, Hemler ME. The light chain of CD98 is identified as E16/TA1 protein. *J Biol Chem* 1998; 273(50): 33127-9.

Miki T, Fleming TP, Bottaro DP, Rubin JS, Ron D, Aaronson SA. Expression cDNA cloning of the KGF receptor by creation of a transforming autocrine loop. *Science*. 1991 Jan 4; 251(4989): 72-5.

Muenke M, Schell U, Hehr A, Robin NH, Losken HW, Schinzel A, Pulleyn LJ, Rutland P, Reardon W, Malcolm S, et al. A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nat Genet*. 1994 Nov; 8(3): 269-74.

Muller U, Steinberger D, Kunze S. Molecular genetics of craniosynostotic syndromes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1997 Sep; 235(9): 545-50. Review.

Muller U, Warman ML, Mulliken JB, Weber JL. Assignment of a gene locus involved in craniosynostosis to chromosome 5qter. *Hum Mol Genet*. 1993 Feb; 2(2): 119-22.

Murgue B, Tsunekawa S, Rosenberg I, deBeaumont M, Podolsky DK. Identification of a novel variant form of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3 IIIb) in human colonic epithelium. *Cancer Res.* 1994 Oct 1;54(19):5206-11.

Naski MC, Ornitz DM. FGF signaling in skeletal development. *Front Biosci.* 1998 Aug 1; 3: D781-94.

Naski MC, Wang Q, Xu J, Ornitz DM. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet.* 1996 Jun; 13(2): 233-7.

Neilson KM, Friesel RE. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor-2 by a point mutation associated with Crouzon syndrome. *J Biol Chem.* 1995 Nov 3; 270(44): 26037-40.

Oldridge M, Wilkie AO, Slaney SF, Poole MD, Pulleyn LJ, Rutland P, Hockley AD, Wake MJ, Goldin JH, Winter RM, et al. Mutations in the third immunoglobulin domain of the fibroblast growth factor receptor-2 gene in Crouzon syndrome. *Hum Mol Genet.* 1995 Jun; 4(6): 1077-82.

Oldridge M, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Iseki S, Morriss-Kay GM, Twigg SR, Johnson D, Wall SA, Jiang W, Theda C, Jabs EW, Wilkie AO. De novo alu-element insertions in FGFR2 identify a distinct pathological basis for Apert syndrome. *Am J Hum Genet.* 1999 Feb; 64(2): 446-61.

Orr-Urtreger A, Bedford MT, Burakova T, Arman E, Zimmer Y, Yayon A, Givol D, Lonai P. Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol.* 1993 Aug;158(2):475-86.

Osterhout DJ, Wolven A, Wolf RM, Resh MD, Chao MV. Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of Fyn tyrosine kinase. *J Cell Biol* 1999; 145(6): 1209-18.

Osterhout DJ, Ebner S, Xu J, Ornitz DM, Zazanis GA, McKinnon RD. Transplanted oligodendrocyte progenitor cells expressing a dominant-negative FGF receptor transgene fail to migrate in vivo. *J Neurosci.* 1997 Dec 1; 17(23): 9122-32.

Partanen J, Makela TP, Eerola E, Korhonen J, Hirvonen H, Claesson-Welsh L, Alitalo K. FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO J.* 1991 Jun; 10(6): 1347-54.

Peters K, Ornitz D, Werner S, Williams L. Unique expression pattern of the FGF receptor 3 gene during mouse organogenesis. *Dev Biol.* 1993 Feb; 155(2): 423-30.

Peters KG, Werner S, Chen G, Williams LT. Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development.* 1992 Jan; 114(1): 233-43.

Plonczynski M, Hardy CL, Safaya S, Harrell A, McCoy L, Brinson A, Agwarangbo L, Steinberg MH. Induction of globin synthesis in K562 cells is associated with

differential expression of transcription factor genes. *Blood Cells Mol Dis.* 1999 Jun-Aug;25(3-4):156-65.

Przylepa KA, Paznekas W, Zhang M, Golabi M, Bias W, Bamshad MJ, Carey JC, Hall BD, Stevenson R, Orlow S, Cohen MM Jr, Jabs EW. Fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome. *Nat Genet.* 1996 Aug;13(4):492-4.

Quarto N, Amalric F. Heparan sulfate proteoglycans as transducers of FGF-2 signaling. *J Cell Sci* 1994. 107(Pt 11): 3201-12.

Rawls A, Olson EN. MyoD meets its maker. *Cell* 1997 ; 89(1): 5-8.

Robertson SC, Meyer AN, Hart KC, Galvin BD, Webster MK, Donoghue DJ. Activating mutations in the extracellular domain of the fibroblast growth factor receptor 2 function by disruption of the disulfide bond in the third immunoglobulin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 14; 95(8): 4567-72.

Roghani M, Moscatelli D. Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. *J Biol Chem* 1992. 267(31): 22156-62.

Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Feb; 86(3): 802-6.

Rusnati M, Urbinati C, Presta M. Internalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in cultured endothelial cells: role of the low affinity heparin-like bFGF receptors. *J Cell Physiol* 1993. 154(1): 152-61.

Sang J, Lim YP, Panzica M, Finch P, Thompson NL. TA1, a highly conserved oncofetal complementary DNA from rat hepatoma, encodes an integral membrane protein associated with liver development, carcinogenesis, and cell activation. *Cancer Res* 1995; 55(5): 1152-9.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12): 5463-7.

Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 1981; 214(4526):1205-10.

Semba K, Nishizawa M, Miyajima N, Yoshida MC, Sukegawa J, Yamanashi Y, Sasaki M, Yamamoto T, Toyoshima K. yes-related protooncogene, syn, belongs to the protein-tyrosine kinase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(15):5459-63.

Smid-Koopman E, Blok LJ, Chadha-Ajwani S, Helmerhorst TJ, Brinkmann AO, Huikeshoven FJ. Gene expression profiles of human endometrial cancer samples using a cDNA-expression array technique: assessment of an analysis method. *Br J Cancer* 2000. 83(2): 246-51.

Spirin KS, Ljubimov AV, Castellon R, Wiedoeft O, Marano M, Sheppard D, Kenney MC, Brown DJ. Analysis of gene expression in human bullous keratopathy corneas containing limiting amounts of RNA. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Dec;40(13):3108-15.

Stark KL, McMahon JA, McMahon AP. FGFR-4, a new member of the fibroblast growth factor receptor family, expressed in the definitive endoderm and skeletal muscle lineages of the mouse. *Development.* 1991 Oct; 113(2): 641-51.

Steinberger D, Mulliken JB, Muller U. Crouzon syndrome: previously unrecognized deletion, duplication, and point mutation within FGFR2 gene (1996b). *Hum Mutat.* 1996; 8(4): 386-90.

Steinberger D, Mulliken JB, Muller U. Predisposition for cysteine substitutions in the immunoglobulin-like chain of FGFR2 in Crouzon syndrome. *Hum Genet.* 1995 Jul; 96(1): 113-5.

Steinberger D, Reinhartz T, Unsold R, Muller U (1996a). FGFR2 mutation in clinically nonclassifiable autosomal dominant craniosynostosis with pronounced phenotypic variation. *Am J Med Genet.* 1996 Dec 2; 66(1): 81-6.

Su WC, Kitagawa M, Xue N, Xie B, Garofalo S, Cho J, Deng C, Horton WA, Fu XY. Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature.* 1997 Mar 20; 386(6622): 288-92.

Takeuchi M, Kuramochi S, Fusaki N, Nada S, Kawamura-Tsuzuku J, Matsuda S, Semba K, Toyoshima K, Okada M, Yamamoto T. Functional and physical interaction of protein-tyrosine kinases Fyn and Csk in the T-cell signaling system. *J Biol Chem* 1993; 268(36): 27413-9.

Tang X, Lasbury ME, Davidson DD, Bartlett MS, Smith JW, Lee CH. Down-regulation of GATA-2 transcription during *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun.* 2000 Aug;68(8):4720-4.

Tiao GM, Hudson K, Lieberman MA, Fischer JE, Hasselgren PO. Identification of Altered Gene Expression in Skeletal Muscle during Sepsis Using Differential Display. *J Surg Res.* 1996 Jul 15;64(1):63-7.

Unemori H, Sato S, Yagi T, Aizawa S, Yamamoto T. Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signalling. *Nature* 1994; 367(6463): 572-6.

van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol.* 1994; 10: 251-337. Review.

van Dijk MC, van Blitterswijk WJ. Lipid metabolism in fibroblast growth factor-stimulated L6 myoblasts: a receptor mutation (Y766F) abrogates phospholipase D and diacylglycerol kinase activities. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1391(2): 273-9.

Webster MK, D'Avis PY, Robertson SC, Donoghue DJ. Profound ligand-independent kinase activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the activation loop mutation

responsible for a lethal skeletal dysplasia, thanatophoric dysplasia type II. *Mol Cell Biol.* 1996 Aug; 16(8): 4081-7.

Webster MK, Donoghue DJ. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J.* 1996 Feb 1; 15(3): 520-7.

Weintraub H, Davis R, Lockshon D, Lassar A. MyoD binds cooperatively to two sites in a target enhancer sequence: occupancy of two sites is required for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(15): 5623-7.

Wellmann A, Thieblemont C, Pittaluga S, Sakai A, Jaffe ES, Siebert P, Raffeld M. Detection of differentially expressed genes in lymphomas using cDNA arrays: identification of clusterin as a new diagnostic marker for anaplastic large-cell lymphomas. *Blood.* 2000 Jul 15;96(2):398-404.

Werner S, Duan DS, de Vries C, Peters KG, Johnson DE, Williams LT. Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand-binding specificities. *Mol Cell Biol.* 1992 Jan; 12(1): 82-8.

Winter RM and Baraitser M. *The London Dysmorphology Database.* Oxford, Oxford University Press, 1996.

Wolf DA, Wang S, Panzica MA, Bassily NH, Thompson NL. Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: homology to *Schistosoma mansoni* amino acid permease and *Caenorhabditis elegans* gene products. *Cancer Res* 1996; 56(21): 5012-22.

Yang X, Nakao Y, Pater MM, Pater A. Identification of two novel cellular genes associated with multistage carcinogenesis of human endocervical cells by mRNA differential display. *Carcinogenesis.* 1996 Mar;17(3):563-7.

Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 1991 Feb 22; 64(4): 841-8.

Yun K, Wold B. Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8(6): 877-89.

Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science.* 1997 May 23;276(5316):1268-72.

Zhao S, Ooi SL, Pardee AB. New primer strategy improves precision of differential display. *Biotechniques.* 1995 May;18(5):842-6, 848, 850.

Zhou S, Cantley LC. Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *Trends Biochem Sci.* 1995 Nov; 20(11): 470-5. Review.

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Die Bedeutungen der Abkürzungen für Reagenzien und Chemikalien sind im Abschnitt 2.2 („Material“) angegeben.

Allgemeine Abkürzungen

ACH	Achondroplasie
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BEK	<i>Bacterially Expressed Kinase</i>
Bp	Basenpaare
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Centimeter
ddPCR	<i>differential display reverse transcription polymerase chain reaction</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ds	doppelsträngig
E	Einheiten
et al.	et altera
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
HCH	Hypochondroplasie
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
Igl, -II, -III	Immunoglobulinähnliche Domänen I, II und III in FGFRs (nummeriert von N- nach C-terminal)
kB	kilo-Basen
kDa	kilo-Dalton
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
KGFR	<i>keratinocyte growth factor receptor</i>
l	Liter
M	mol/l
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mA	Milli-Ampère
mg	Miligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA

ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
Nu	Nukleotide
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pg	Pikogramm
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPTK	Rezeptor-Proteintyrosinkinase
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
sek	Sekunden
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
TA1	Tumor-assoziiertes Gen 1
TD	Tanatophore Dysplasie
TK	Protein-Tyrosinkinase-Domäne
TM	Transmembrandomäne
tRNA	transfer-RNA
U	Uridin
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
W	Watt
WT	Wildtyp
Zpm	Zerfälle pro Minute

Aminosäuren

(im 3- und 1-Buchstaben-Code, Ladungen)

Alanin	Ala	A	
Arginin	Arg	R	(+)
Asparagin	Asn	N	
Asparaginsäure	Asp	D	(-)
Cystein	Cys	C	
Glycin	Gly	G	
Glutamin	Gln	Q	
Glutaminsäure	Glu	E	(-)
Histidin	His	H	(+)
Isoleucin	Ile	I	
Leucin	Leu	L	
Lysin	Lys	K	(+)
Methionin	Met	M	
Phenylalanin	Phe	F	
Prolin	Pro	P	
Serin	Ser	S	
Threonin	Thr	T	
Tryptophan	Trp	W	
Tyrosin	Tyr	Y	
Valin	Val	V	

Basen und Nukleotide

A, C, G, T (U)	Die vier Basen der DNA Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin (RNA: Uracil)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat

Komponenten und Akronyme der Signaltransduktion

DAG	<i>Diacycle glycerol</i>
FRS2	<i>FGF receptor substrate 2</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>
IP3, InsP3	<i>Inositoltrisphosphate</i>
MAPK	<i>Mitogenic activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>MAPK kinase</i>
MEK	<i>Mitogenic and extracellular regulated kinase</i>
PI3-K	<i>Phosphatidyl inositole 3-kinase</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PTB	<i>Phosphotyrosine binding domain</i>
P-Tyr	<i>Phosphotyrosine</i>
Raf	<i>Rat fibroma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
SH2	<i>Src homology 2 domain</i>
SHP-2	<i>Src homology phosphatase 2</i>
SOS	<i>Son of sevenless</i>
Src	<i>Sarcoma</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>

Danksagung

Mein Dank gilt ganz besonders...

- ... Herrn Prof. Dr. Ulrich Müller für die intensive Betreuung, Unterstützung und Begutachtung der Arbeit, die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Humangenetik.
- ... Herrn Prof. Dr. Rainer Renkawitz für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit im Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften.
- ... Frau Dr. Daniela Steinberger für die Erstellung der FGFR2-Konstrukte, die Mitarbeit beim FGFR2-Expressionsnachweis und die zahlreichen interessanten Diskussionen.
- ... Herrn Prof. Dr. Alfred Pingoud und den Mitgliedern des Graduiertenkollegs "Biochemie von Nukleoproteinkomplexen" für die fruchtbare Zusammenarbeit.
- ... Kirsten besonders in der Endphase der Arbeit für ihre geduldigen Erklärungen, ihr Händchen für die passende Musik und die sonntäglichen Flens.
- ... Jörg, Markus, Christine, Iris und Dorit für ihre Freundschaft und Unterstützung, die überlangen Telefonate und die gemeinsam geleerten Weinflaschen.
- ... meinen Eltern Josefine und Werner Wagner sowie meinen Schwestern Barbara und Christiane für die vielen Hilfestellungen und Ermutigungen.