

"Differenzielle Genexpression im klarzelligen Nierenzellkarzinom"

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
"Doktor der
Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

von
Friederike Wilmer
geb. in Kirchhellen

Heidelberg, 2000

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen der Krebsentstehung	1
1.1.1	Molekulare Mechanismen der Krebsentstehung.....	2
1.1.2	Auswirkungen einer genetischen Veränderung auf das Expressionsprofil am Beispiel des VHL-Gens	3
1.2	Nierenzellkarzinome.....	5
1.2.1	Allgemeine Charakteristika.....	5
1.2.2	Klassifizierung des Nierenzellkarzinoms.....	6
1.3	Molekulare Marker im klarzelligen Nierenzellkarzinom	8
1.4	Nachweis differenziell exprimierter Gene in Krebszellen	9
1.4.1	cDNA-Subtraktion (<i>suppression subtractive hybridization</i> , SSH)	10
1.4.2	DNA-Arrays	13
1.4.3	Hybridisierung auf DNA-Arrays	16
1.5	Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Puffer und Lösungen.....	19
2.1.3	Nährmedien und Antibiotika	20
2.1.4	Enzyme und Puffer.....	20
2.1.5	Vektoren und Bakterienstämme	21
2.1.6	Gewebe.....	21
2.1.7	Längenstandards und DNA	21
2.1.8	Geräte.....	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Isolierung von RNA aus Gewebe	23
2.2.2	Isolierung von mRNA	23
2.2.3	Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien.....	24
2.2.4	Restriktionsanalyse	25
2.2.5	Nucleinsäurefällung.....	25
2.2.5.1	Fällung von RNA mit Isopropanol.....	25
2.2.5.2	Natriumacetat-Ethanol-Fällung.....	25
2.2.5.3	Ammoniumacetat-Ethanol Fällung.....	26
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.2.7	Formaldehyd-Gelelektrophorese	27
2.2.8	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....	27
2.2.8.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	27
2.2.8.2	Fluoreszenzbasierte Konzentrationsbestimmung	28
2.2.9	Konzentrationsbestimmung über ein Agarosegel	28
2.2.10	Reinigung von DNA-Fragmenten	28
2.2.10.1	Gelextraktion von DNA-Fragmenten.....	28
2.2.10.2	Elektroelution von DNA-Fragmenten	29
2.2.10.3	Abtrennung von Primern über Gelfiltrations-Säulen.....	29
2.2.10.4	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	30
2.2.11	Klonierung.....	30
2.2.11.1	Ligation	30
2.2.11.2	Ligation von PCR-Produkten	30
2.2.11.3	Ligation von cDNA.....	30
2.2.11.4	Ligation von Subtraktions-cDNAs	31

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.12	Transformation kompetenter Bakterien	31
2.2.12.1	Chemische Transformation	31
2.2.12.2	Elektroporation	31
2.2.13	Nucleinsäuretransfer auf Membranen	32
2.2.13.1	Southern Blot Analyse	32
2.2.13.2	Northern Blot Analyse	32
2.2.14	Radioaktive Markierung von Nucleinsäuren	33
2.2.14.1	Random-Hexamer Markierung	33
2.2.14.2	Oligo-Endmarkierung	33
2.2.14.3	Komplexe Proben.....	34
2.2.15	Hybridisierung auf membrangebundene Nucleinsäuren	34
2.2.15.1	Hybridisierung von Southern Blots	34
2.2.15.2	Hybridisierung von Northern Blots	35
2.2.15.3	Hybridisierung von <i>high density</i> PCR-Filtern	35
2.2.15.4	Oligo-Hybridisierungen	36
2.2.16	Entfernen der hybridisierten radioaktiv markierten Proben von DNA-Filtern (<i>Strippen</i>)	36
2.2.17	Digitales Einlesen von radioaktiven Signalen durch den Phosphorimager	36
2.2.18	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.18.1	Standard-PCR.....	37
2.2.18.2	Hochdurchsatz -Kolonie-PCR.....	37
2.2.18.3	RT-PCR	38
2.2.19	Herstellung konventioneller cDNA-Bibliotheken.....	39
2.2.20	cDNA-Subtraktion (<i>suppression subtractive hybridization, SSH</i>)	40
2.2.20.1	cDNA-Synthese.....	40
2.2.20.2	<i>Rsa</i> I-Verdau und Adapterligation.....	41
2.2.20.3	Kontrolle der Adapterligationseffizienz.....	42
2.2.20.4	Hybridisierungen	42
2.2.20.5	PCR-Amplifikation	43
2.2.21	Picken und Drucken (<i>Spotting</i>) von cDNA-Bibliotheken mit dem Q-Bot Roboter.....	43
2.2.21.1	Picken einer cDNA-Bibliothek.....	43
2.2.21.2	Herstellung von Koloniefiltern.....	44
2.2.22	Herstellung von PCR-Filtern.....	45
2.2.23	Sequenzierung	45
2.2.24	Sequenz-Analyse	46
3	Ergebnisse	47
3.1	cDNA-Subtraktion (<i>suppression subtractive hybridization, SSH</i>)	47
3.1.1	System der SSH und Optimierungsansätze	48
3.1.2	Adapterligation	49
3.1.3	Hybridisierung	50
3.1.4	Anreicherungs- bzw. Subtraktionskontrollen.....	51
3.2	Analyse der Subtraktionsbibliothek durch Sequenzierung	53
3.3	Analyse der Subtraktionen auf Koloniefiltern	54
3.3.1	Herstellung von Koloniefiltern der Subtraktionsbibliotheken	54
3.3.2	Herstellung einer konventionellen cDNA-Bank und zugehöriger Koloniefilter	55
3.3.3	Analyse der Subtraktionen durch komplexe Hybridisierung auf Koloniefilter	55
3.3.4	Analyse der Subtraktionen durch Hybridisierung der Subtraktionen auf Koloniefilter	57
3.4	Nachweis potenzieller Tumormarker durch RT-PCR	58
3.5	Expressionsanalyse durch Hybridisierung auf cDNA-Arrays.....	62
3.5.1	Komplexe Hybridisierung auf ein 31500 cDNAs umfassenden PCR-Filter.....	62
3.5.2	Hybridisierung der Subtraktionen auf ein cDNA Set von 31500 cDNAs.....	67
3.6	Bekanntes Gene als potenzielle Tumormarker.....	70
3.6.1	β_2 -Microglobulin.....	70

INHALTSVERZEICHNIS

3.6.2	α -NAC	72
3.6.3	Annexin II	74
3.6.4	Kininogen	76
3.6.5	BRAK	77
3.7	Unbekannte Gene als potenzielle Tumormarker.....	79
3.7.1	hkid3_4a21	80
3.7.2	hkid3_5m9	82
3.7.3	hkid3_5o9	85
3.8	Nierenspezifische Hybridisierungsanalyse	88
3.8.1	Herstellung eines nierenspezifischen cDNA-Arrays.....	88
3.8.2	Hybridisierung auf tumorspezifische Spezialfilter.....	89
4	Diskussion	91
4.1	Methoden zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene	91
4.1.1	cDNA-Subtraktion	92
4.1.2	Erstellen von Expressionsprofilen mit Nucleinsäure-Arrays.....	94
4.1.3	Vergleich der Methoden SSH und der komplexen Hybridisierung auf cDNA-Arrays	96
4.2	Hochregulierte Gene des klarzelligen NZK.....	97
4.2.1	β_2 -Microglobulin.....	97
4.2.2	Nascent-Polypeptide-Associated Complex (NAC)	98
4.2.3	Annexin II	99
4.3	Herunterregulierte Gene des klarzelligen NZK	100
4.3.1	Kininogen	100
4.3.2	BRAK	101
4.4	Nicht-charakterisierte hochregulierte Gene des klarzelligen NZK	103
4.4.1	Unbekanntes Gen hkid3_4a21	103
4.4.2	Gen mit Homologie zu Ornithin-Aminotransferase (OAT)	103
4.4.3	Gen mit Homologie zu 3- β -hydroxysteroid Dehydrogenase (b3DH)	104
4.5	Veränderungen in Stoffwechselwegen im klarzelligen NZK.....	106
4.5.1	Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels im klarzelligen NZK	106
4.5.2	Einfluss des klarzelligen NZK auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	108
4.6	Therapieansätze für das NZK.....	110
5	Zusammenfassung.....	114
6	Literaturverzeichnis	116
7	Anhang.....	130
7.1	<i>One Letter Code</i> der Aminosäuren.....	130
7.2	Bekannte Consensussequenz des Gens hkid3_4a21.....	130
7.3	Genklassifizierungssymbole	131
7.4	Genklassifizierungssymbole speziell für die komplexe Hybridisierung auf UniGene-Filter.....	132
7.5	Primer	133
7.6	Genklassifikationstabellen.....	137

Abkürzungen und Fachtermini

A	Adenin
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy/complementary DNA
Contig	von <i>contiguous</i> ; Gruppe überlappender DNA-Fragmente bzw. Klone oder Sequenzen
CTP	Cytidin-Triphosphat
C	Cytosin
cm	Zentimeter
cpm	gezählte radioaktive Zerfälle pro Minute
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidin-Triphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuclein Acid (Desoxyribonucleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Natriumsalz)
EMBL	European Molecular Biology Laboratories
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i> (exprimierte Sequenz)
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HMFM	Einfriermedium für Bakterien (<i>Hodgness Modified Freezing Media</i>)
kb	Kilobase(n)
l	Liter
LB	Luria Bertani (Bakterienmedium)
M	molar
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupt-Gewebeverträglichkeitskomplex)
min	Minute
mM	millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NAD	Nicotinamidadeninucleotid
ng	Nanogramm
ns	Nanosekunde
NZK	Nierenzellkarzinom
OD	optische Dichte
ORF	Open Reading Frame (offenes Leseraster)

ABKÜRZUNGEN UND FACHTERMINI

p.a.	pro analysi
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polmerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonuclein Acid (Ribonucleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Rounds per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
SSC	Standard Salz-Citrat Lösung
SSH	<i>Supression Subtractive Hybridisation</i> (cDNA Subtraktionsmethode)
T	Thymin
TBI	Abteilung Theoretische Bioinformatik
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-Hydroxyethylaminomethan
tRNA	transfer RNA
TTP	Thymidintriphosphat
U	units, internationale Enzymeinheit
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHL	von-Hippel-Lindau
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Krebsentstehung

Der Begriff "Krebs" fasst eine große Gruppe unterschiedlicher Erkrankungen zusammen, die die unkontrollierte Teilung von Zellen eines Organs oder Gewebes gemeinsam haben. Die autonome und progressive Proliferation körpereigener Zellen führt zur Entstehung eines Tumors (Neoplasie). Nur maligne Tumoren, die sich von benignen Tumoren durch infiltratives und destruktives Wachstum sowie durch die Fähigkeit zur Metastasenbildung unterscheiden, führen zur Krebserkrankung.

Neoplasien lassen sich anhand ihres Ursprungsgewebes einteilen. Karzinome sind epithelialen Ursprungs, während Sarkome aus dem Mesoderm hervorgehen. Diese beiden Tumorarten bilden primär einen Zellverband und werden daher als *solide* Tumoren bezeichnet. Leukämien dagegen sind Neoplasien des hämatopoetischen Systems und wachsen primär nicht-solid.

Jeder Tumor entsteht aus einer einzigen Normalzelle und ist damit klonalen Ursprungs (Nowell, 1976). Diese Ursprungszelle hat durch eine oder mehrere Mutationen einen Wachstumsvorteil, der sich dann auf alle folgenden Zellen überträgt. Durch zusätzliche Mutationen können weitere Vorzüge für die Zelle entstehen. Dieses Prinzip setzt sich fort und führt zu einer Kaskade von durch Mutationen verursachten Vorteilen für die Zelle. Damit wird die klonale Selektion maligner Transformanden erreicht und der maligne Tumor zeigt ungehemmte Proliferation.

Auf molekularbiologischer Ebene entsteht Krebs durch eine stufenweise Akkumulierung von Mutationen, die sich auf die Wachstumskontrolle, die Zelldifferenzierung und den programmierten Zelltod auswirken (Fearon und Vogelstein, 1990; Vogelstein und Kinzler, 1993). Der Verlust der normalen Kontrollmechanismen entsteht durch Mutationen in den Genen dreier großer Kategorien. *Protoonkogene* sind normale Genprodukte der Signalkaskaden, die die Proliferation regeln. Sind diese Gene mutiert, liegen sie als dominante Onkogene vor. Die durch die Mutation ausgelöste, andauernde Induktion der Signalwege führt zu einer erhöhten Zellteilung.

Durch die Inaktivierung von *Tumorsuppressorgenen* werden alle folgenden Stoffwechselwege und Signalkaskaden beeinflusst. Im Gegensatz zu Protoonkogenen müssen bei Tumorsuppressorgenen beide Allele des Gens inaktiviert vorliegen. Ihr Funktionsverlust führt zu einer verminderten Kontrolle des Zellzyklus (1.1.2).

Als dritte große Gruppe sind die *DNA-Reparaturenzyme* zu nennen, deren Mutation sich in genetischer Instabilität zeigt. Sie reparieren die DNA nach Schäden durch

Umwelteinflüsse oder oxidative Veränderungen und korrigieren Lesefehler während und nach der Replikation (Paulovich und Hartwell, 1995; Paulovich *et al.*, 1997).

1.1.1 Molekulare Mechanismen der Krebsentstehung

Protoonkogene und Tumorsuppressorgene stehen an Schaltstellen von Stoffwechselwegen, hauptsächlich des Zellzyklus. Mutationen in Protoonkogenen, wie z.B. Deletionen oder Punktmutationen innerhalb der kodierenden Sequenz sowie Genamplifikationen oder chromosomale Rearrangements, führen direkt oder indirekt zur Aktivierung des Onkogens. Die daraus resultierende Überexpression des Gens endet in der unkontrollierten Proliferation der Zellen. Die Mutationen der Onkogene ist dominant. Damit reicht die Mutation eines Allels aus, um zu einer Überexpression oder veränderten Funktion bzw. Aktivität des Onkogen-Produktes zu führen. Das vorliegende Genprodukt entspricht jedoch nicht dem physiologischen Zustand der Zelle und bringt diese, z.B. durch den quantitativen oder qualitativen Unterschied des Produktes im Vergleich zum Normalstatus, in ein Ungleichgewicht. Die Onkogen-Produkte sind somit auch Auslöser von Signalkaskaden, die einen verstärkenden Effekt auf das Zellwachstum haben.

Die Inaktivierung von Tumorsuppressoren führt ebenfalls zu der Entartung der Zellen. Eine Mutation eines Allels ist jedoch nicht ausreichend, um zu einer Inaktivierung der Funktion zu führen (*two-hit*-Theorie). Erst wenn beide Allele eines Tumorsuppressorgens entweder deletiert oder mutiert sind, ist der Tumorsuppressor ausgeschaltet. Als klassisches Beispiel für diese *two-hit*-Theorie von Knudson gilt die hereditäre Form des Retinoblastoms, bei dem die Mutation des RB1-Gens schon in der Keimbahn vorhanden ist. Eine somatische Mutation des zweiten Allels in einer Retinazelle führt zur Entstehung des Tumors. Bei Formen ohne genetische Disposition müssen hingegen beide Allele mutiert sein (Knudson, 1971; Knudson, 1985).

Tumorsuppressorgene wurden von Kinzler und Vogelstein in verschiedene Klassen eingeteilt, die *gatekeeper*- und die *caretaker*-Gene. Eine Mutation in einem Allel eines *caretaker*-Gens führt nicht zu einem Ausfall dieses Gens. Erst eine weitere Mutation im zweiten Allel dieses Gens führt zu genetischer Instabilität. Auf die genetische Instabilität folgt nicht automatisch die Ausbildung eines Tumors, jedoch wird die Mutationsrate aller Gene erhöht. Zu den *caretaker*-Genen, deren Inaktivierung zu genetischer Instabilität führen, gehören z.B. DNA-*mismatch*-Reparaturenzyme. Parallel zu dem Inaktivierungsweg der *caretaker*-Gene verläuft der Weg der *gatekeeper*-Gene. Hier führt die Mutation beider Allele eines Gens direkt zur Ausbildung einer Neoplasie. Die klassischen Tumorsuppressorgene, wie z.B. das von-Hippel-Lindau (VHL)-Gen, zählen zu den *gatekeeper*-Genen (Kinzler und Vogelstein, 1997).

1.1.2 Auswirkungen einer genetischen Veränderung auf das Expressionsprofil am Beispiel des VHL-Gens

Das von-Hippel-Lindau-Gen (VHL-Gen) ist ein Beispiel für einen Tumorsuppressor, der Einfluss auf die Angiogenese eines Tumors hat. Durch die Inaktivierung dieses Gens werden verschiedene, die Angiogenese betreffende Stoffwechselwege aktiviert und das Expressionsprofil der entsprechenden Zellen verändert.

Das von-Hippel-Lindau-Syndrom ist eine autosomal dominant vererbte Krankheit, die mit einer Disposition für benigne und maligne Tumoren einhergeht. Das Risiko von Betroffenen an einem malignen Tumor der Niere, des Gehirns oder des Auges zu erkranken, liegt bei 70 %. 1993 wurde das VHL-Gen charakterisiert, das aus 3 Exons besteht, die auf dem Chromosom 3p25 liegen (Seizinger *et al.*, 1988, Latif, 1993). Auch im sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinom (NZK) ist der Verlust des VHL-Gens eines der grundlegenden Ereignisse in der Krebsentstehung. Der Verlust entsteht durch Deletion des einen Allels (Loss Of Heterozygosity, LOH) in etwa 98 % der sporadischen klarzelligen NZK und zusätzlicher zweiter Mutation in etwa 60 % (Gnarra *et al.*, 1994) oder Inaktivierung des zweiten Allels durch Methylierung (Herman *et al.*, 1994).

Die Funktion des VHL-Gens liegt in der Regulation der Transkription. Diese wird durch einen Multiproteinkomplex unterstützt, der sich aus drei verschiedenen Proteinen zusammensetzt, Elongin A, Elongin B und Elongin C. Dieser Protein-Komplex beschleunigt die Transkription durch Stabilisierung der Polymerase (Aso *et al.*, 1995). Das VHL-Protein scheint mit Elongin A um die Bindung an Elongin B und C zu konkurrieren. Dies würde zu einer Hemmung der Aktivität des Proteinkomplexes führen und damit zu einer verlangsamten Transkription (Duan *et al.*, 1995).

Da der größte Teil des VHL-Genproduktes im Zytoplasma lokalisiert ist, könnten die Proteine Elongin B und C gebunden an das VHL-Protein noch eine andere Rolle als die zur Unterstützung der Transkription spielen (Kaelin und Maher, 1998). So wurde nachgewiesen, dass der VHL-Elongin-B-Elongin-C-Komplex ein weiteres Protein im Zytoplasma bindet, Cullin 2. Culline sind am Abbau zellulärer Proteine beteiligt und in einigen Fällen Zellzyklus-Regulatoren (Patton *et al.*, 1998). Iwai *et al.* schlagen ein Modell vor, bei dem das VHL-Protein Teil eines Ubiquitinierungs-Komplexes ist. Der Ubiquitin-vermittelte Proteinabbau ist an einer Reihe zellulärer Funktionen beteiligt, wie z.B. die Signaltransduktion und die Regulation des Zellzyklus. Durch die mutationsbedingte Veränderung des VHL-Proteins kann entweder der Ubiquitinierungskomplex nicht mehr hergestellt oder keine Bindung zwischen dem VHL-Protein und den zu ubiquitinierenden Proteinen aufgebaut werden (Iwai *et al.*, 1999).

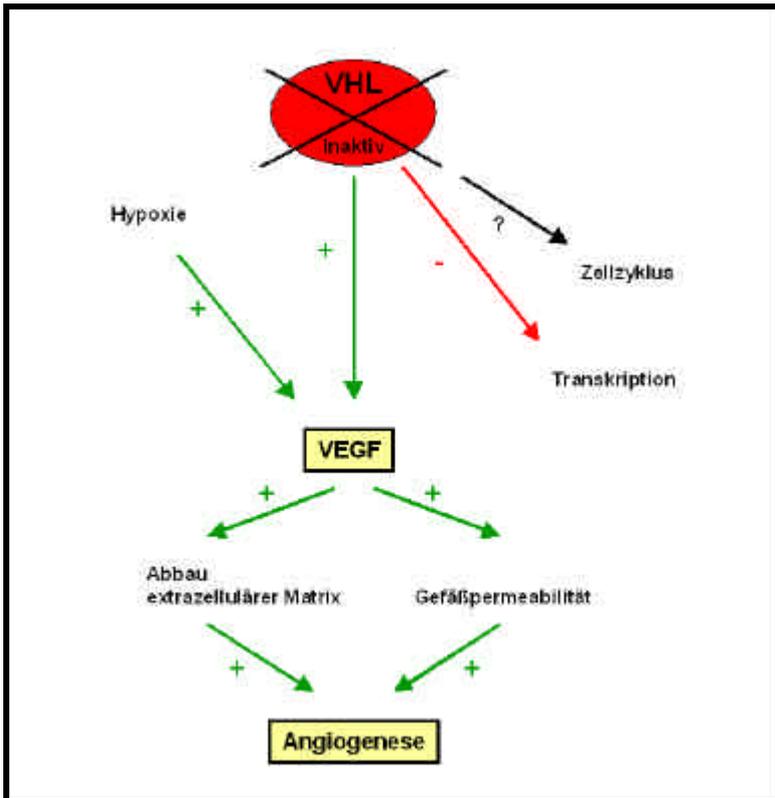


Bild 1.1 Schematische Darstellung der Folgen der Inaktivierung des VHL-Gens

Die Inaktivierung des VHL-Gens hat die Hemmung oder Stimulation verschiedene Reaktionen im Organismus oder zur Folge: minus - : hemmende Wirkung plus + : stimulierende Wirkung Fragezeichen ? : Wirkung nicht bekannt

Wie zuvor erwähnt, zeigen Untersuchungen eine Verbindung des VHL-Gens mit der Angiogenese. Das klarzellige NZK zeigt eine starke Vaskularisierung und eine hohe Expression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Die Überexpression dieses Faktors ist für viele Krebsarten bekannt und ist primär auf den Sauerstoffmangel (Hypoxie) innerhalb des Tumors zurückzuführen, der zu einer Aktivierung VEGF-stimulierender Transkriptionsfaktoren führt. VEGF selbst ist beteiligt an der Regulation des Abbaus der extrazellulären Matrix, der Zelladhäsion und der Migration (Veikkola und Alitalo, 1999). Klarzellige NZKs, in denen das VHL-Gen inaktiviert vorlag, zeigten unabhängig vom Sauerstoffgehalt der Umgebung eine starke VEGF-Expression (Brieger *et al.*, 1999, Maxwell, 1999). Damit wird durch das Fehlen des VHL-Gens eine Kaskade ausgelöst, die sich in verstärkter Angiogenese manifestiert. Durch Expressionsstudien, z.B. Northern Blot Analysen oder Hybridisierungen auf cDNA-Arrays, könnte die Kaskade nachgewiesen werden. Alle beteiligten Gene zeigen in den Zellen mit dem mutierten VHL-Gen ein verändertes Expressionsverhalten (Bild 1.1).

1.2 Nierenzellkarzinome

1.2.1 Allgemeine Charakteristika

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist ein maligner epithelialer Tumor des Nierenparenchyms. Insgesamt macht er 2 % aller Krebsarten aus und 85 % aller bösartigen Nierentumoren. In diesem Jahr werden in den USA etwa 31.200 neue Fälle des Nierenkarzinoms erwartet und etwa 12.000 Todesfälle registriert (Society, 2000).

Vor allem Erwachsene in der sechsten Lebensdekade erkranken an dieser Krebsart. Männer sind von diesem Krebs doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Risikofaktoren sind Rauchen, Übergewicht und Bluthochdruck (Yu *et al.*, 1986). Außerdem soll die Exposition gegenüber Schwermetallen wie Cadmium und Arsen sowie gegenüber Asbest die Wahrscheinlichkeit erhöhen, an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken (Vogelzang und Stadler, 1998).

NZK treten meist sporadisch auf, können aber auch im Rahmen von Syndromen vorkommen. Beispiele hierfür sind das im Mendelschen Sinne autosomal dominant vererbte von-Hippel-Lindau-Syndrom (Verlust von 3p25.5) sowie die erworbene Zystenniere, die gehäuft bei chronischen Dialysepatienten beobachtet wird (Vogelzang und Stadler, 1998).

Die klinische Symptomatik des NZK umfasst Hämaturie (Blut im Urin), Flankenschmerzen und die Tastbarkeit des Tumors. Weiterhin können Gewichtsverlust und Anämie als allgemeine Zeichen für eine Krebserkrankung auftreten. NZK werden in der Regel erst spät klinisch auffällig und haben deshalb zum Zeitpunkt der Diagnosefindung oft bereits fortgeschrittene Tumorstadien erreicht. Ca. 60 % der NZK werden zufällig bei Routineuntersuchungen durch Sonografie identifiziert, obwohl noch keine Symptome vorhanden waren. Durch die Identifizierung des Tumors in fortgeschrittenen Stadien (Tabelle 1.1 und Tabelle 1.2) sind die Therapiemöglichkeiten oft eingeschränkt. So ist die operative Entfernung des Tumors dann häufig nicht mehr möglich oder es liegen bereits Metastasen vor. Dies macht eine Heilung fast unmöglich (Motzer *et al.*, 1996).

Histo-morphologisch lassen sich fünf verschiedene Arten des NZK unterscheiden (Kovacs *et al.*, 1997, Storkel, 1997). Das klarzellige NZK macht etwa 80 % der Nierenzellkarzinome aus. Es zeigt große Zellen, die aufgrund des hohen Gehaltes an Glykogen ein helles Zytoplasma aufweisen. Dadurch haben die Zellen ein pflanzenzellartiges Aussehen. Dieser Tumortyp wächst eher in einem soliden Muster. Zytogenetisch ist dieser Tumor in mehr als 80 % der Fälle durch den Verlust einer oder beider Kopien des Chromosoms 3p gekennzeichnet (Kovacs *et al.*, 1988; Kovacs *et al.*, 1987). Als weitere Charakteristika gelten Trisomien der Chromosome 5, 7 und 12,

während Verluste vor allem die Chromosomenregionen 6q, 8p, 9, 14q und des Y-Chromosoms betreffen (Moch *et al.*, 1996; Thrash-Bingham *et al.*, 1995).

Der zweithäufigste Tumortyp ist das papilläre Nierenzellkarzinom, das etwa 11 % aller Nierenzellkarzinome ausmacht. Seinen Namen erhält es durch die vorwiegend in papillären Mustern angeordneten Zellen. Diese Tumoren zeigen typischerweise keinen Verlust der 3p Region, sondern Trisomie 7 oder Trisomie 17. Das klarzellige und das papilläre Nierenzellkarzinom stammen vom proximalen Tubulus des Nephron ab (Thoenes und Storkel, 1991).

Die Zellen des chromophoben Tumortyps weisen ein transparentes feinretikuläres Zytoplasma auf und bevorzugen ein solides Wachstumsmuster. Es macht etwa 2-5 % der NZK aus. Im Gegensatz zum klarzelligen und papillären Typ exprimiert er nur ein keratinhaltiges Zytoskelett und hat eine günstigere Prognose. Die Veränderungen umfassen Verluste der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13 und 17 (Gunawan *et al.*, 2000).

Der Bellini-Gang-Typ ist ein seltenes (etwa 1 % der NZK), vornehmlich in der Markzone liegendes Nierenzellkarzinom (Thoenes und Storkel, 1991). Es zeichnet sich durch eine starke Invasivität aus und hat dementsprechend auch eine schlechte Prognose. Zytogenetisch sind keine konstanten chromosomalen Veränderungen beobachtet worden. Alle bisher genannten Formen der NZK können, im Rahmen einer Entdifferenzierung der Tumoren unterschiedlich stark ausgeprägte spindelzellige Komponenten enthalten. Spindelzellige NZK sind in der Regel sehr proliferationsaktiv und breiten sich aggressiv in ihre Umgebung aus.

Das Nierenonkozytom besteht aus mitochondrienreichen eosinophilen Zellen. Es ist ein sehr langsam wachsender, gutartiger Tumor, der etwa 5 % aller Nierentumoren ausmacht und nicht metastasiert. Damit ist es von den malignen NZK zu trennen (Thoenes und Storkel, 1991).

1.2.2 Klassifizierung des Nierenzellkarzinoms

Es existieren zwei Arten der Klassifizierung des Nierenzellkarzinoms, das *Grading* und das *Staging*. Beim *Grading* handelt sich um eine histopathologische Einteilung, mit der der Grad der Differenzierung der Tumorzellen bestimmt werden kann. Es berücksichtigt die Kerngröße und integriert zusätzlich die Merkmale der zellulären Anaplasie. Das *Grading* des Nierenzellkarzinoms hat seinen Ursprung in Amerika, als 1932 herausgefunden wurde, dass diese Art der Klassifizierung korreliert war mit der Prognose der Krebserkrankung (Hand und Broders, 1932). Das *Grading* kombiniert die verschiedenen Atypiegrade mit immunhistologisch bestimmten Proliferationsraten und autoradiographischen Ergebnissen (Thoenes *et al.*, 1986). Es lassen sich drei verschiedene Differenzierungsgrade unterscheiden (Tabelle 1.1).

EINLEITUNG

Tabelle 1.1 Zusammenfassung des Tumorgradings nach der WHO-Klassifikation von 1997 (World Health Organisation, WHO)

G	Zellkerne	Nukleolen	Mitosen	Sonstiges
1	regelmäßig, rund, in der Größe normale Tubuluszellkerne	nicht vergrößert	fast keine	
2	vergrößert, mäßige Größen- und Formdifferenzen	vergrößert, 1-2	gelegentlich	
3	beträchtlich vergrößert, stark polymorph, Hyperekromasie	z.T. stark vergrößert, in der Regel mehrere	häufig, atypische Mitosen	Riesenkern, mehrkernige Riesenzellen

Das *Staging* hingegen beschreibt die Ausbreitung des Tumors im Bezug auf umgebende Gewebe. Die Stadieneinteilung beruht vor allem auf den Ausmaßen des Tumors und seiner Lage (Guinan *et al.*, 1997). Ebenso wie das *Grading* ist das *Staging* ein Teil der Diagnose.

Tabelle 1.2 TNM-Tumorstaging des Nierenzellkarzinoms (Tumor, Node, Metastasis, TNM) (Guinan *et al.*, 1997)

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
T1	Tumor < 7cm in größter Ausdehnung; lokal auf die Niere begrenzt
T2	Tumor ≥ 7cm in größter Ausdehnung; lokal auf die Niere begrenzt
T3	Tumor breitet sich in größeren Venen aus oder infiltriert die Nebenniere oder perirenales Gewebe, jedoch nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3a	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe, aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3b	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene(n) oder Vena cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Vena cava oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten
M	Fernmetastasen
MX	Metastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Beide Arten der Klassifizierung ergeben eine genaue Beschreibung des Tumors im Bezug auf seine Umgebung. Je höher ein Tumor klassifiziert ist, desto schlechter ist die Prognose der Erkrankung des Patienten. Diese Informationen sind zum einen wichtig für standardisierte Diagnosen, zum anderen bieten sie Anhaltspunkte für eine gezielte Therapie.

1.3 Molekulare Marker im klarzelligen Nierenzellkarzinom

Wie unter 1.4 beschrieben wird, existieren viele verschiedene molekularbiologische Methoden, differenziell exprimierte Gene von Tumoren zu identifizieren. Das Auftreten und die Höhe der Expression dieser Gene können Aufschluss über die Tumorart, das Stadium eines Tumors und sein Wachstumsverhalten geben. Damit bietet sich die Möglichkeit, genaue Diagnosen zu erstellen und Therapien spezifisch anzupassen. Weiterhin kann die stärkere Expression eines bestimmten Gens auf die Veränderungen anderer Gene hinweisen, die demselben Stoffwechselweg angehören oder ein Teil derselben Signalkaskade sind. Solche Zusammenhänge lassen sich z.B. bei dem Verlust des VHL-Gens zeigen (1.1.2).

Verschiedene Gene wurden im Zusammenhang mit dem klarzelligen NZK als molekulare Marker vorgeschlagen. Zu diesen Genen gehört Vimentin, das zur Klasse der Intermediärfilamente gehört. Während der Zellteilung findet eine verstärkte Phosphorylierung des Proteins statt. Es wurde gezeigt, dass dieses Gen vor allem im klarzelligen und papillären NZK exprimiert wird, kaum aber im chromophoben NZK und Onkozytom. Weiterhin konnte die Expression von Vimentin mit einer schlechten Prognose, unabhängig vom Tumorstadium und -grad korreliert werden (Moch *et al.*, 1999). Clusterin ist ein Gen, das in vielen Geweben exprimiert wird und verschiedene Funktionen hat, unter anderem während der Apoptose. Im Zusammenhang mit dem NZK wurde es als stärker im Tumor exprimiert beschrieben (Parczyk *et al.*, 1994).

Mit immunhistochemischen Methoden wurde eine stärkere Expression *des Transforming Growths Factors a* (TGF α) und *des Epidermal Growth Factor Receptors* (EGFR) im klarzelligen NZK gezeigt (Hise *et al.*, 1996; Lager *et al.*, 1994). Die Veränderung der TGF α -Expression konnte schon in frühen Stadien des NZKs nachgewiesen werden (Everitt *et al.*, 1997). Nicht nur strukturelle Gene und Wachstumsfaktoren zeigen ein verändertes Expressionsprofil im klarzelligen NZK, sondern auch Onkogene wie *c-fos*, *c-neu*, *c-myc* und *k-ras* (Kohler *et al.*, 1997; Kozma *et al.*, 1997). Die differenzielle Expression von Hitzeschock-Proteinen im Zusammenhang mit dem klarzelligen NZK wurde ebenfalls untersucht. Eine erhöhte Expression des *Heat Shock Proteins 70* (HSP-70) ließ sich im Tumorgewebe nachweisen. HSP-70 wird während Stresssituationen exprimiert und scheint mit der Aktivierung von *c-myc*, *c-fos* und p53 zusammenzuhängen. Es wird vermutet, dass HSP-70 eine Rolle beim Schutz der Tumorzellen vor der Zell-Lyse durch den *Tumor Necrosis Factor* (TNF) spielt (Kohler *et al.*, 1997; Kozma *et al.*, 1997).

Viele dieser Gene verschiedener Klassen bieten sich als molekulare Marker an. Die Identifizierung molekularer Marker für das klarzellige NZK bietet die Chance, bessere Diagnosen zu erhalten und neue, spezifisch angepasste Therapieansätze zu entwickeln.

1.4 Nachweis differenziell exprimierter Gene in Krebszellen

Die Untersuchung der genetischen Zusammenhänge der Krebsentstehung bezog sich zu Beginn der experimentellen Arbeiten auf diesem Gebiet auf zwei verschiedene Ansätze, erstens die Mutationsstudien und zweitens die Untersuchung der Onkogene und Tumorsuppressorgene. Diese Ansätze ließen komplett die Rolle der nicht-mutierten Gene außer acht. Krebs entwickelt sich jedoch durch eine Vielzahl von Veränderungen im zellulären Phänotyp, und es gibt keine einfache Verknüpfung von mutierten Genen zu einer Krebserkrankung. Ein mutiertes Gen mag Auslöser einer Kaskade sein, in deren Verlauf sich viele unmutierte Gene befinden, die sich gut als Marker zur Diagnose und als Ziele von Chemotherapeutika eignen (Zhang *et al.*, 1998).

Zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene im Krebsgewebe bieten sich verschiedene Methoden an wie die Subtraktion und *Representational Difference Analysis* (RDA) (Hubank und Schatz, 1994; Lisitsyn und Wigler, 1993). *Expressed-Sequence-Tag* (EST)-Analysen werden vor allem von Großsequenzierungslabors verfolgt und finden Einsatz in dem *Cancer Genome Anatomy Project* des *National Health Institute* in den USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap/>). Eine weitere Untersuchungsmöglichkeit bietet die *serielle Analyse der Genexpression* (*Serial Analysis of Gene Expression*, SAGE) (Velculescu *et al.*, 1995) und *Differential Display* (DD) (Liang und Pardee, 1992).

Die Methode der RDA verläuft in zwei Schritten. In einem ersten Schritt wird die Komplexität des Ausgangsmaterials verringert. Im zweiten Schritt werden nach subtraktiver Hybridisierung selektiv Unterschiede der beiden Fraktionen, die z.B. aus Tumor- und Normalmaterial gewonnen wurden, amplifiziert (Hubank und Schatz, 1994).

SAGE ist eine Methode, die die EST-Sequenzierung beschleunigt, da 9-Basenpaareinheiten verschiedener Gene eines Ursprungsmaterials zusammenligiert werden und anschließend in konkatenierter Form sequenziert werden. Die sequenzierten 9-Basenpaareinheiten reichen zu Datenbankabgleichen aus und ergeben so ein Bild der spezifisch in dem untersuchten Gewebe exprimierten Gene (Velculescu *et al.*, 1995).

Beim DD werden PCR-Produkte von mRNAs zweier Zelltypen Seite an Seite auf einem Gel verglichen. Dies erlaubt die Identifizierung von Banden, die nur in dem einen oder anderen Zelltyp vorhanden sind, also wahrscheinlich differenziell exprimierte Gene repräsentieren (Liang und Pardee, 1992).

Eine weitere Methode der Expressionsanalyse wurde von Sarto *et al.* eingesetzt. Zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene im NZK wurden Proteine aus Normal- und Tumorgewebe über 2D-Gelelektrophorese miteinander verglichen (Sarto *et al.*, 1997). Gewebearrays bieten die Möglichkeit, Gewebeschnitte verschiedener Patienten gleichzeitig mit immunhistochemischen Methoden auf Expression eines Gens zu

überprüfen (Moch *et al.*, 1999; Richter *et al.*, 2000). Dabei wird nicht nur Information über die Expression eines Gens gesammelt, sondern auch über den Ort der Expression.

Die beschriebenen Methoden ermöglichen die Identifikation einzelner, differenziell exprimierter Gene, die durch weitere Expressionsanalysemethoden, wie Northern Blot Analyse (Alwine *et al.*, 1977) und quantitative PCR bestätigt werden können. Ergänzend zu den beschriebenen, auf einzelne Gene spezialisierten Methoden stehen die auf Hybridisierungen basierenden, wie reverse Northern Blots (von Stein *et al.*, 1997), cDNA-Arrays und Microarrays. Diese Methoden basieren auf der Fixierung der zu untersuchenden DNA auf einem festen Untergrund (wie Nylon-Membranen oder Glas) und der Hybridisierung verschiedener markierter cDNAs auf diese (siehe 1.4.2). Damit ist eine simultane Untersuchung vieler verschiedener Gene möglich, mit dem Ziel, ein Gesamtprofil der Expression der untersuchten Gene eines Gewebes zu erkennen und damit neue Ansatzpunkte für Diagnose und Therapie zu finden (Zhang *et al.*, 1998).

1.4.1 cDNA-Subtraktion (*suppression subtractive hybridization, SSH*)

Die Technik der cDNA-Subtraktion ermöglicht den Vergleich zweier mRNA-Fractionen, wie z.B. von Tumor- und Normalmaterial eines Patienten, durch die selektive Anreicherung einer Population. Gene, die ausschließlich in einem Gewebe exprimiert werden, werden mit dieser Methode bevorzugt isoliert. Außerdem bietet sich die Möglichkeit, auch schwach exprimierte Gene zu identifizieren (Diatchenko *et al.*, 1999).

Die cDNA-Subtraktion verläuft in mehreren Schritten. Die mRNA-Fraktion, in der die Genexpression untersucht werden soll, wird *Tester* genannt, die Referenz mRNA-Fraktion *Driver*. Zunächst werden die beiden mRNA-Fractionen unabhängig voneinander revers transkribiert und doppelsträngige cDNA erstellt. Folgend werden *Tester* und *Driver* getrennt voneinander mit einem *4-cutter*-Enzym verdaut, um kurze *blunt-end*-Fragmente zu erhalten. Die Fragmente der *Tester*-cDNA werden in zwei Ansätze aufgeteilt und daran zwei verschiedene Adapter ligiert. Die Enden der Adapter besitzen keine Phosphatgruppen, so dass nur ein Strang eines jeden Adapters an das 5'-Ende der cDNA ligiert werden kann. An die *Driver*-Fragmente werden keine Adapter ligiert.

Es folgen zwei Hybridisierungsschritte. Zur ersten Hybridisierung werden *Tester* und *Driver* im Überschuss in einem Ansatz hybridisiert. Dieser Schritt dient der Normalisierung. Transkripte, die in beiden Fractionen vorhanden sind und Transkripte, die in einer Population sehr häufig vertreten sind, lagern sich schneller aneinander an (Bild 1.2, Moleküle 2,3,4, oberer Abschnitt), als Transkripte, die selten vorkommen (Bild 1.2 Molekül 1, oberer Abschnitt). Zur zweiten Hybridisierung werden alle Moleküle zusammengegeben und zusätzlich *Driver*-cDNA hinzugefügt, ohne zuvor zu Denaturieren. Nun können nur noch die normalisierten einzelsträngigen Moleküle Hybridisierungspartner finden. Sie werden in den folgenden Schritten amplifiziert und liegen dann angereichert in

dem subtrahierten und amplifizierten cDNA-Gemisch vor. DNA-Moleküle, die sowohl an ihrem 5'- wie auch an ihrem 3'-Ende den gleichen Adapter ligiert haben, bilden während der Anlagerung der Primer eine Pfannenstielstruktur (*pan-handle-structure*) aus. Diese entsteht durch die Anlagerung der beiden an den Enden des Moleküls gelegenen Adapter aneinander (Bild 1.2, Molekül 2).

EINLEITUNG

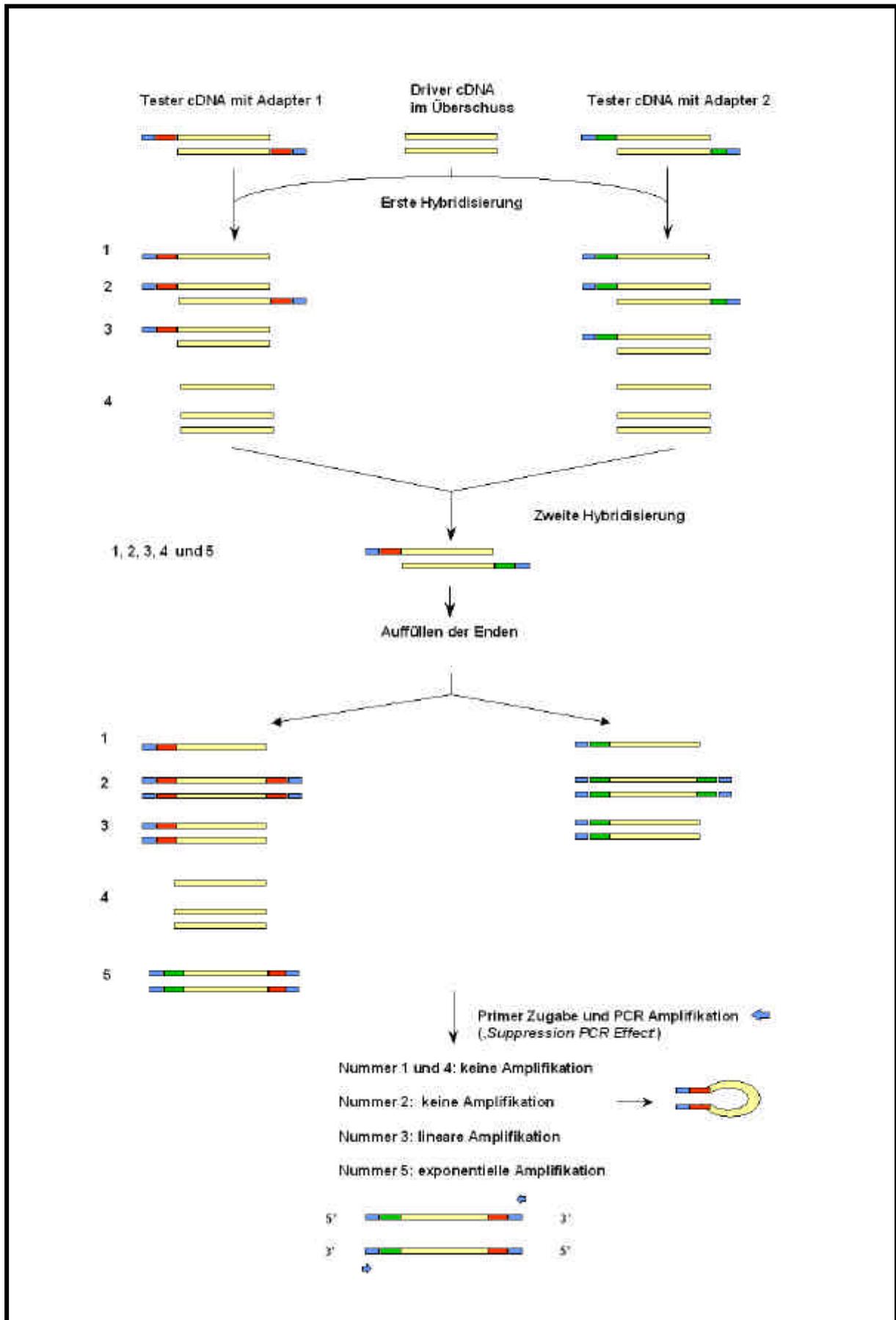


Bild 1.2 Übersicht der einzelnen Teilschritte einer cDNA-Subtraktion (*Suppression Subtractive Hybridization, SSH*)

gelbe Linie: einzelsträngige Zweitstrang-cDNA; grün-blaue Linie: Adapter 1 (grün) mit Primerbindungsstelle für die anschließende Amplifikation (blau); rot-blaue Linie: Adapter 2 (rot) mit Primerbindungsstelle für die anschließende Amplifikation (blau); Zeichnung angelehnt an Skizze aus dem Clontech *PCR-Select cDNA Subtraction* Handbuch. Der erste Teil der Hybridisierungen verläuft in zwei getrennten Reaktionsgefäßen. Adapter 1 ligierte Moleküle hybridisieren parallel zu Adapter 2 ligierten Molekülen mit den Driver-Molekülen, die keine Adapter tragen. Es entstehen vier verschiedene Moleküle: (1) mit Adapter an einer Seite und keinem Hybridisierungspartner, (2) mit Adapter an einer Seite und Hybridisierungspartner mit Adapter an einer Seite, (3) mit Adapter an einer Seite und Hybridisierungspartner ohne Adapter, (4) ohne Adapter, mit oder ohne Hybridisierungspartner. Zur zweiten Hybridisierung werden Ansatz eins und zwei aus zwei getrennten Reaktionsgefäßen in eines vereint und ohne Denaturierung die zweite Hybridisierung angeschlossen. Nach der zweiten Hybridisierung entstehen die Moleküle 1-4 sowie das Molekül 5, das zwei Hybridisierungspartner mit verschiedenen Adapter zeigt. Es folgt nach dem Auffüllen der Enden die Amplifikation. Moleküle 1 und 4 lassen sich aufgrund fehlender Primerbindungsstellen nicht amplifizieren. Molekül 2 lässt sich ebenfalls nicht amplifizieren, da sich die Enden dieses Molekül, die aus derselben Adapterart bestehen, aneinander lagern und eine Pfannenstielstruktur ausbilden, so dass keine Primerbindung mehr möglich ist. Eine lineare Amplifikation des Moleküls 3 ist möglich, da an einer Seite eine Primerbindungsstelle existiert. Nur Molekül 5 kann exponentiell amplifiziert werden, da es an beiden Seiten verschiedene Adapter trägt.

Nach der Subtraktion von Tumor- und Normal-cDNA liegen zwei amplifizierte cDNA-Gemische vor. In einem Gemisch befinden sich die vor allem im Tumor verstärkt exprimierte Gene, in dem anderen die im Normalgewebe stärker exprimierte cDNAs. Es können nun verschiedene Arten der Analyse folgen. Diese kann durch Klonierung der subtrahierten cDNA-Fragmente erfolgen, mit anschließender Sequenzierung oder durch Rückhybridisierungsexperimente auf bekannte oder unbekannte cDNAs (von Stein *et al.*, 1997).

1.4.2 DNA-Arrays

Eine Art der Charakterisierung bekannter und unbekannter Gene ist das Erstellen von Expressionsprofilen. Diese Profile erzeugen eine Momentaufnahme der Genexpression während eines bestimmten physiologischen Zustandes.

Bei dieser Methode macht man sich die inhärente Eigenschaft einzelsträngiger Nucleinsäure-Moleküle zu nutze, die nur bei Vorliegen komplementärer Sequenz durch Basenpaarung spezifisch aneinander binden können. Durch die Selektivität dieses Hybridisierungsvorganges sind sehr genaue Analysen möglich (Schena *et al.*, 1995; Southern, 1975). Durch die Methode der Hybridisierung boten sich viele molekularbiologische Möglichkeiten. Eine Richtung war die parallele Analyse vieler Klone z.B. einer Cosmid-Bibliothek, die auf eine Membran als Punkte in einem engen Muster aufgedruckt wurden (*high density filter*). Dieser Ansatz diente zunächst der Herstellung von Cosmid-Karten (Nizetic *et al.*, 1991). *High density filter* wurden später zur Analyse von cDNA-Bibliotheken eingesetzt, aus denen differenziell exprimierte cDNA durch Fingerprinting identifiziert wurden (Gress *et al.*, 1992). Ein ähnlicher Ansatz wurde von Zhao *et al.* beschrieben, bei dem Expressionsprofile verschiedener cDNA-Bibliotheken erstellt wurden (Zhao *et al.*, 1995).

Zur Herstellung von Expressionsprofilen werden Membranen oder Glasobjektträger (*glas slides*) eingesetzt, die PCR-Produkte verschiedener Gene tragen. Mit diesen werden Hybridisierungsexperimente mit radioaktiv- oder fluoreszenz-markierten Sonden

EINLEITUNG

durchgeführt und so z.B. zwei physiologische Zustände einer Zelle miteinander verglichen.

Bekannte PCR-amplifizierte cDNA-Klone werden auf Membranen oder Glasobjektträger mit Robotern punktförmig gedruckt (*gespottet*) und fixiert. Die auf einen festen Untergrund aufgetragene cDNA wird Element genannt. So lassen sich Arrays mit den unterschiedlichsten Elementen herstellen. Membranen mit krebstspezifischen Genen oder Genen des Immunsystems sind kommerziell erhältlich. Zu Untersuchungen können Gruppen von Genen zusammengestellt werden, die einer spezifischen Fragestellung entsprechen, z.B. Onkogene und Tumorsuppressorgene, die dann mit Material verschiedener Krebsarten hybridisiert werden können und ein spezifisches Expressionsprofil zeigen. Ein weiterer Ansatz ist die Betrachtung des Expressionsprofils eines physiologischen Zustandes für alle bekannten Gene. Um ein alle Gene umfassendes Array zu erstellen, bieten sich die *expressed sequence tags* (ESTs) an.

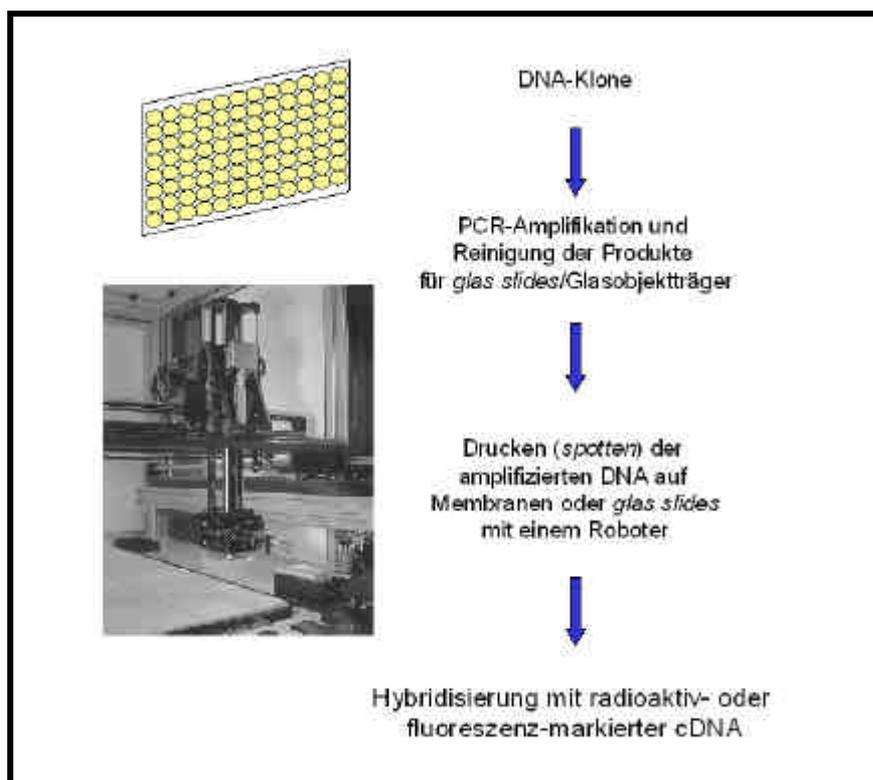


Bild 1.3 Herstellungsablauf der cDNA-betdruckten Membranen und *glas slides*

In den EST-Datenbanken befinden sich etwa zwei Millionen humane ESTs. Obwohl diese oft nur von schlechter Qualität sind, bilden sie eine einzigartige Ressource zur Analyse neuer Gene im Rahmen der Herstellung von Expressionsprofilen. Da die in den Datenbanken vorhandene Information sehr redundant ist, kann es sein, dass ein einziges Gen durch tausende von ESTs vertreten ist, die jeweils verschiedene Bereiche dieses

Gens umfassen können. Durch das Zusammenführen aller EST-Sequenzen eines Gens entstehen sogenannte *EST-Cluster*. Dadurch kann diese Redundanz minimiert und die Analyse einzelner Gene vereinfacht werden. Somit lässt sich aus vielen EST-Sequenzen eines Gens eine *Konsensus-Sequenz* erstellen. Die Konsensus-Sequenzen sind dann jeweils nicht mehr redundant. Verschiedene Institute verfolgen mit unterschiedlichen Methoden eine solche Strategie (Adams *et al.*, 1995; Burke *et al.*, 1998; Schuler, 1997). Ein solches Set aller charakterisierten und nicht-charakterisierten Gene wurde in der Abteilung Theoretische Bioinformatik/DKFZ auf Grundlage der Arbeiten von Schuler *et al.* neu berechnet und zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Filter (Unigene-Filter/-Membranen) eingesetzt (Haas *et al.*, 2000; Schuler, 1997). Diese Filter umfassen 31500 Klone, die bis zum September 1999 sequenziert und in die EST-Datenbank eingegeben wurden (<http://www.ncbi.edu>). Damit stehen zur Expressionsanalyse Sequenzinformationen von maximal 31500 Genen zur Verfügung (<http://www.rzpd.de>).

Neben der Herstellung von Membranen, die alle bekannten Gene umfassen, werden auf Filter und Glasobjektträger cDNAs gedruckt, die biologische Zusammenhänge repräsentieren und Antworten auf spezielle medizinische oder biologische Fragestellungen geben sollen. Ein Beispiel ist hier ein Filter oder ein *glas slide*, auf dem nur Onkogene gespottet sind. Der Einsatz eines solchen Arrays ist gerade für tumorrelevante Fragestellungen sinnvoll und kann Aufschluss über veränderte Genexpression z.B. in Signalkaskaden geben.

Eine andere Methode der Herstellung von Arrays ohne cDNAs sind die Oligonukleotid-Arrays der Firma Affymetrix (Fodor *et al.*, 1993; Fodor *et al.*, 1991; Lipshutz *et al.*, 1999). Auf Glasobjektträger werden photolithographisch Oligonukleotide synthetisiert. Pro Gen werden mehrere Oligonukleotide aus verschiedenen Regionen des 3'-Bereichs synthetisiert. Weiterhin wird für jedes Gen eine Reihe *match*-Oligos, also genau zur Sequenz des zu untersuchenden Gens passende Oligos und eine Reihe *mismatch*-Oligos, die eine Mutation in der Mitte des Oligos tragen, auf dem Chip synthetisiert. Signale der *mismatch*-Oligos nach der Hybridisierung lassen sich auf Kreuzhybridisierungen und Hintergrundrauschen zurückzuführen. Diese Signale werden von den Signalen der *match*-Oligos abgezogen. Damit liegt zur Auswertung ein von Hintergrund gereinigtes Signal vor.

1.4.3 Hybridisierung auf DNA-Arrays

Das Gegenstück zu der auf festem Material immobilisierten DNA bildet das zu hybridisierende Material, die Sonde (*Sample*). Diese Sonde ist ein Nucleinsäuregemisch mit unbekannter Gen-Zusammensetzung. Aus unterschiedlichen Ausgangsmaterialien z.B. Normal- und Tumorgewebe, wird die RNA isoliert. Diese RNA wird in zwei verschiedenen Ansätzen in cDNA umgeschrieben. Während der Erststrang-cDNA-Synthese werden Markierungsmoleküle eingebaut, entweder α -dCTP³³ oder fluoreszenzmarkierte Nukleotide.

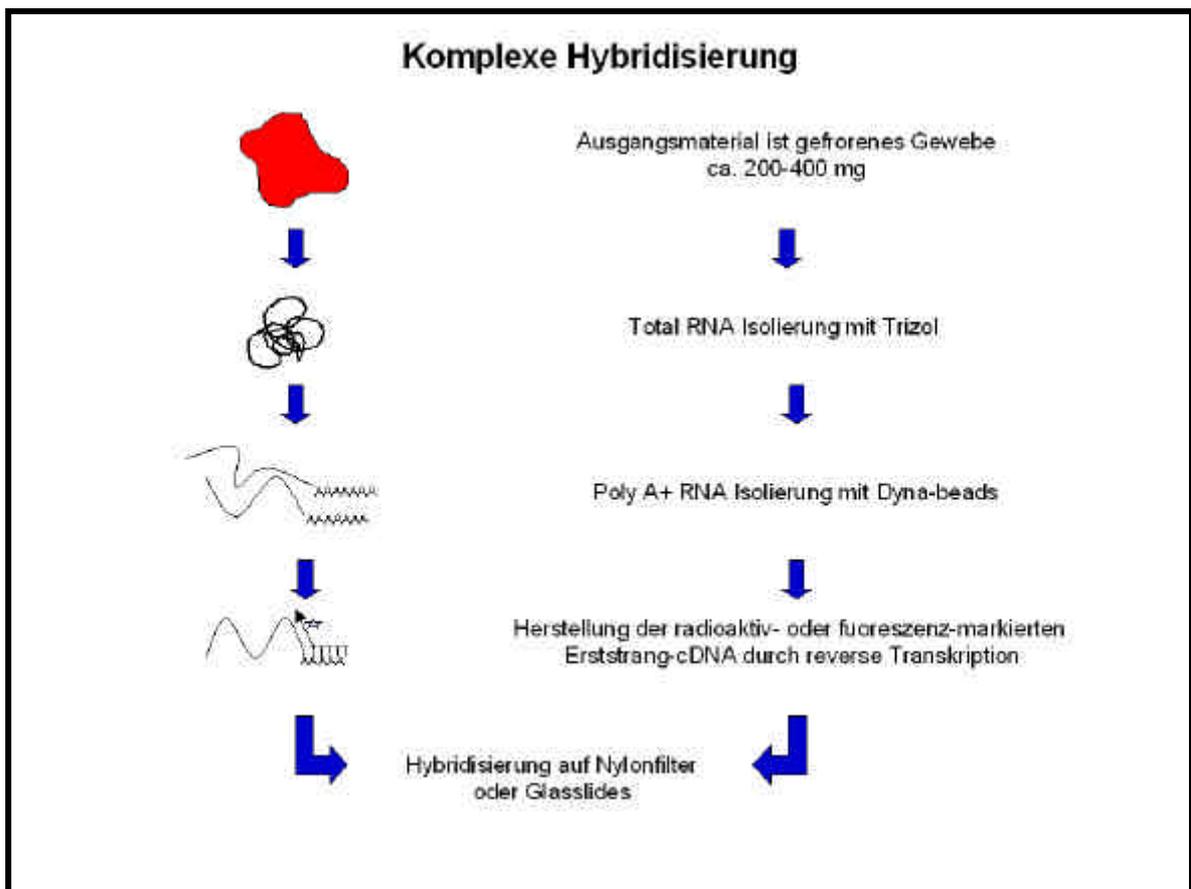


Bild 1.4 Schema der Herstellung einer cDNA-Sonde für die komplexe Hybridisierung auf cDNA-Nylonfilter oder -glas slides

Die Sonde wird dann auf die trägergebundenen, bekannten DNA-Moleküle hybridisiert (Bild 1.4). Eine Hybridisierung wird durch ein Farbsignal oder ein radioaktives Signal an der entsprechenden Stelle auf dem Array angezeigt. Für die Hybridisierung auf Oligonukleotid-Arrays gilt ähnliches, es wird zur Hybridisierung jedoch nicht markierte Erststrang-cDNA eingesetzt, sondern in vitro transkribierte cRNA.

Die Signalintensität lässt eine Aussage über die Anzahl der gebundenen Moleküle zu und ist damit quantifizierbar. Damit ergibt sich für jedes Gen ein spezifischer Expressionsgrad.

Werden alle Informationen jedes auf dem Array untersuchten Gens zusammengefasst, ergibt sich ein typisches Expressionsprofil des untersuchten Materials.

Neben der Herstellung von Expressionsprofilen durch Hybridisierung komplexer Proben lassen sich auch subtrahierte cDNAs auf Arrays hybridisieren. Da es sich dabei um PCR-amplifiziertes Material handelt, ist keine direkte Relation zwischen Signalintensität und Expressionsstärke des Gens herzustellen. Es ist aber möglich, differenziell exprimierte Gene zu identifizieren. Der besondere Schwerpunkt liegt auf den schwach und differenziell exprimierten Genen, die erst nach Amplifikation nachgewiesen werden können. Schwach exprimierte Gene können sich an Schaltstellen des Stoffwechsels befinden und sind damit im Rahmen der Krankheitsanalyse von größter Bedeutung (Wang *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1999).

Die Struktur und die biologischen Prozesse in einer Zelle werden durch ein Genexpressionsmuster beschrieben. Nur ein Bruchteil der Gene einer Zelle wird aktiv transkribiert. In Krebszellen sind Struktur und biologische Prozesse verändert, teilweise aufgrund zytogenetischer Aberrationen. Diese Zustände werden durch unterschiedliche Expressionsprofile der verschiedenen Zelltypen repräsentiert. Die verschiedenen Expressionsprofile können bei Krebszellen die Ursache für z.B. eine fehlende Wachstumskontrolle und genomische Instabilität sein. Expressionsprofile bieten die Möglichkeit, die molekularbiologischen Zusammenhänge besser zu verstehen (Khan *et al.*, 1999). Damit bietet die komplexe Hybridisierung auf cDNA-Arrays die parallele Untersuchung der Expression vieler bekannter und unbekannter Gene. Weiterhin bietet sich die Möglichkeit einer neuen, genaueren Klassifizierung von Tumoren bzw. der Entdeckung neuer Klassen. Dies wurde am Beispiel der akuten myeloischen Leukämie und der akuten lymphoblastischen Leukämie gezeigt (Golub *et al.*, 1999).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die differenzielle Genexpression im Tumor-, verglichen mit der im Normalgewebe, ist der Schlüssel zum Verständnis maligner Tumoren. Die Entdeckung differenziell exprimierter Gene gibt Einblicke in die komplexen Stoffwechselwege des Menschen, die zu neuen Diagnosemethoden und Therapieansätzen führen.

In dieser Arbeit wurden zwei Ziele verfolgt. In einem methodischen Ansatz wurden zwei Expressionsanalysemethoden miteinander verglichen, die *suppression subtractive hybridization* und die Hybridisierung komplexer cDNAs auf cDNA-Arrays. Eine genaue Bewertung dieser Methoden und Darstellung der Schwerpunkte ermöglicht deren gezielteren Einsatz und optimale Auswertungsmöglichkeiten.

Das zweite Ziel war die Identifizierung differenziell exprimierter Gene im klarzelligen NZK. Das Wissen um differenziell exprimierte Gene in Tumorzellen ermöglicht den Einblick in die an der Krebsentstehung und -progression beteiligten Stoffwechselwege. Diese Stoffwechselwege und deren Moleküle bieten sich als Ziele für die Entwicklung neuer Therapeutika an. Nicht charakterisierte, neue Gene, bei denen man eine differenzielle Expression nachweisen kann, können sowohl neue Hinweise auf biochemische Zusammenhänge der Krebsentstehung liefern, als auch selbst ein guter Ansatzpunkt für neue Therapien sein.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders beschrieben, von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig; nur Radioisotope), Gibco BRL (Eggestein), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Heidelberg) erworben.

2.1.2 Puffer und Lösungen

Amasino-Lösung	88,9 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ ; 41,1 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ ; 50 ml 5 M NaCl; 350 ml 20 % SDS; 470 ml Millipore-H ₂ O
C-Mix	300 µM dATP; 300 µM dGTP; 300 µM dTTP
Church-Puffer	0,25 M NaPi (pH 7,2); 7 % SDS; 10 mM EDTA in H ₂ O
6 x DNA-Ladepuffer	0,25 % Xylen Cyanol FF; 15 % Ficoll (Typ 400 ; Amersham Pharmacia Biotech) in H ₂ O
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
50 x Denhardt's Reagenz	Ficoll (Typ 400, Serva), Polyvinylpyrolidon (Merck), BSA (Fraktion V; Roche)
2 x Hybridisierungspuffer	6 x SSC; 5 x Denhardt's Reagenz; 0,5 % SDS; 50 µg/ml <i>salmon sperm</i> DNA (denaturiert)
LS-Puffer	1 M HEPES pH 6,6 : TM-Puffer : <i>random hexamers</i> (50 A ₂₆₀ Units in 1 ml H ₂ O, Amersham Pharmacia Biotech) im Verhältnis 25:25:1; steril filtriert (0,22 µm)
Millipore-H₂O	steril filtriertes (0,22 µm Millipore Filteranlage) deionisiertes Wasser
5 x MOPS-Puffer	0,1 M MOPS (pH 7,0); 40 mM Natriumacetat; 5 mM EDTA (pH 8,0)
Natrium-Phosphat-Puffer (NaPi)	pH 7,2, 0,1 M: 68,4 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ ; 31,6 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ ad 1000 ml mit Millipore-H ₂ O pH 7,6, 0,1 M: 84,5 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ ; 15,5 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ ad 1000 ml mit Millipore-H ₂ O

MATERIAL UND METHODEN

Oligo-Waschpuffer	54,7 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ ; 25,3 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ ; 100 ml 20 % SDS; 820 ml Millipore-H ₂ O
6 x RNA-Ladepuffer	50 % Glycerin; 1 mM EDTA (pH 8,0); 0,25 % Bromphenol Blau
20 x SSC	300 mM NaCl ; 30 mM Natriumcitrat
Stripping-Lösung	5 mM NaPi pH 7,6; 0,25 % SDS
TAE-Puffer	40 mM Tris/Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA
TE-Puffer	1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 7,3, pH 7,5, pH 8,0, pH 8,3
TEN-Puffer	0,1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)
TM-Puffer	250 mM Tris pH 8,0; 25 mM MgCl ₂ ; 50 mM β- Mercaptoethanol

2.1.3 Nährmedien und Antibiotika

LB-Medium (Luria Bertani-Medium)	1 % NaCl; 1 % Casein oder Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt
LB-Agar	LB-Medium und 1,5 % Agar
SOB-Medium	2 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt 0,05 % NaCl; 2,5 mM KCl; pH 7 einstellen; nach dem Autoklavieren 10 mM MgCl ₂ hinzugeben
2 x YT-Medium	1,6 % Bacto-Trypton, 1 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl
10 x HMFM-Einfriermedium	360 mM K ₂ PO ₄ ; 132 mM KH ₂ PO ₄ ; 17 mM Natriumcitrat, 3,6 mM MgSO ₄ ; 68 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 44 % Glycerin
Ampicillin	50 mg/ml in 50 % EtOH gelöst; Lagerung bei -20 °C

2.1.4 Enzyme und Puffer

Ampli-Taq-Polymerase	5 units/μl (Roche)
DNase I	10 mg/ml (Roche)
Glykogen	20 mg/ml (Roche)
Expand High Fidelity PCR System	3,5 units/μl (Roche)
Klenow-Fragment	1 unit/μl (Roche)
Pellet Paint Co-Precipitant	keine Angaben (Novagen)
Pfu-Polymerase	2,5 units/μl (Stratagene)

Restriktionsendonucleasen	variierende units (NEB)
RNase H	5 units/ μ l (Gibco BRL)
Rnasin	40 units/ μ l (Promega)
Superscript II Reverse Transkriptase	5 units/ μ l (Gibco BRL)
T4-DNA-Ligase	10 units/ μ l (NEB)
T4-Polynucleotidkinase	1 unit/ μ l (NEB)
Uracil DNA-Glycosylase	1 unit/ μ l (Gibco BRL)

2.1.5 Vektoren und Bakterienstämme

pAmp 10	Gibco BRL
pGEM	Perkin Elmer
pGEM-T Easy	Promega
pSport 1	Gibco BRL
<i>E. coli</i> DH10B	Gibco BRL

2.1.6 Gewebe

Das Gewebe wurde von Prof. Dr. Füzezi (Universitätsklinikum Göttingen) präpariert und zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Proben des klarzelligen NZKs und Proben aus normalem Nierengewebe. Diese wurden spätestens 30 min nach Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Aufgrund histochemischer Untersuchungen konnte die Kontamination des Tumormaterials durch Normalgewebe auf < 5 % festgelegt werden.

2.1.7 Längenstandards und DNA

DNA-Längenstandard Marker IV	Fragmentlängen in bp: 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220, 154 (Roche)
DNA-Längenstandard Marker II	Fragmentlängen in bp: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125 (Roche)
RNA-Längenstandard	Fragmentlängen in bp: 240, 1350, 2370, 4400, 7460, 9490 (0,24- 9,5 kb RNA ladder; Gibco BRL)
Hexamere	(Amersham Pharmacia Biotech)
Cot1-DNA	1 mg/ml (Gibco BRL)
Primer	soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Primer und Oligos von ARK Scientific, Darmstadt bezogen; Primersequenzen siehe Anhang

salmon sperm DNA

Natriumsalz Typ III (Sigma)

dNTPs

100 mM Stammlösungen (Roche, Amersham Pharmacia Biotech, PEQLAB Biotechnologie)

2.1.8 Geräte

Autoradiographiefilme

Scientific Imaging Film, Kodak

DNA-Präparationsroboter

Biorobot 9600, Qiagen

Elektroelutionskammer

Centrilutor, Amicon Millipore

Fluorometer

FLUOstar, BMG

Geldokumentationssystem

E.A.S.Y., Herolab

Gelelektrophoresekammern

Renner

Hybridisierungsöfen

Sauer

Phosphoimager

Storm 860, Molecular Dynamics

Phosphoimager-Kassetten

Molecular Dynamics

Pipettierroboter

Biomek 2000, Beckman

Picking- und Spottingroboter

Q-Bot, Genetix, UK

Schwingmühle

B. Braun Biotech Int.

Spectrophotometer

SmartSpec 3000, Biorad

Spottingroboter

Biogrid I , Biorobotic lmtd., UK

Thermocycler

MJ Research, Biozym

Tischzentrifuge

Hereaus

UV-Crosslinker

Stratagene

Wasserbad

GLK

Zentrifuge

Megafuge 1.0, Hereaus

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von RNA aus Gewebe

RNA wurde aus gefrorenem Nierengewebe durch die Phenol/Guanidin-Isothiocyanat Methode mit dem TRIzol-Reagenz (Gibco BRL) isoliert. Es handelt sich dabei um eine abgewandelte Methode von *Chomczynski und Sacchi* (Chomczynski und Sacchi, 1987). Dazu wurden in flüssigem N₂ gelagertes Gewebe unter ständiger N₂-Kühlung abgewogen und jeweils 200-300 mg Gewebe in eine vorgekühlte Teflonkapsel mit Wolframkugel in einer Schwingmühle (B. Braun Biotech Int.) gegeben. Die Zerkleinerung des Gewebes erfolgte bei 3000 rpm für 10 s. War die Zerkleinerung nicht vollständig, so wurde das pulverisierte Gewebe in TRIzol gegeben und die verbleibenden Gewebestücke erneut zerkleinert. Das pulverisierte Gewebe wurde sofort in ein entsprechend vorgelegtes Volumen an TRIzol überführt. Für 50 mg Gewebe wurde 1 ml TRIzol eingesetzt und durch kräftiges Schütteln das Gewebe mit dem TRIzol vermischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Viskosität der Flüssigkeit überprüft. War diese hochviskos, was auf genomische DNA zurückzuführen war, wurde die Flüssigkeit 2-3 mal durch eine 0,7 x 30 mm Kanüle gezogen und die genomische DNA so geschert. Darauf folgte eine 5 min Zentrifugation (4°C, 4000 x g, Megafuge). Der Überstand wurde in ein neues 15 ml Falcongefäß überführt, größere Gewebestücke verblieben im ersten Gefäß. Nach Zugabe von Chloroform (0,2 ml Chloroform/1 ml TRIzol), 15 s manuellem Schütteln und 3-10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 30 min bis 2 h bei 4000 x g zentrifugiert. Die klare, wässrige Phase wurde in ein neues Falcongefäß überführt. Darauf folgte die Isopropanolfällung der RNA (2.2.5.1).

2.2.2 Isolierung von mRNA

Aus total RNA wurde die poly (A)⁺ RNA mit Hilfe von *Dynabeads* isoliert. Bei diesen *beads* handelt es sich um Magnetkügelchen, an die ein oligo(dT)₂₅-Rest gebunden ist. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Anlagerung der poly (A)⁺-Reste der meisten mRNAs an die kovalent an die Oberfläche der *Dynabeads* gebundenen oligo(dt)-Reste. RNA-Spezies, die keinen poly (A)⁺-Rest besitzen, wie rRNA und tRNA, werden in mehreren Waschschrritten von der gebundenen mRNA separiert.

Vor Beginn der Extraktion sollten alle RNase-freien Materialien vorbereitet werden, so dass das Protokoll zügig durchgeführt werden kann, um eine Degradation der RNA zu vermeiden. Alle Puffer wurden mit RNase-freien Reagenzien oder Lösungen (Ambion) hergestellt. Es wurde immer mit RNase-freien Filterspitzen pipettiert. Als Ausgangsmaterial wurde 75-500 µg total RNA eingesetzt. Die RNA wurde laut Protokoll

des Herstellers in einem von der RNA-Menge abhängigen Volumen aufgenommen. Dabei war auf die angestrebte EDTA-Endkonzentration von 1 mM zu achten. Nach Zugabe des Bindungspuffers wurde das Gemisch für 2 min auf 65 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA zu zerstören und eine optimale Bindung der mRNA an die *beads* zu gewährleisten. Die *beads* wurden zur Vorbereitung von ihrem Lagerungspuffer getrennt, indem sie in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß auf einen Magneten gestellt wurden. Der Lagerungspuffer wurde abgenommen und das Gefäß vom Magneten genommen. Zu den *beads* wurde darauf die RNA-Lösung pipettiert, die mRNA band an die *beads*. Das Gemisch wurde auf den Magneten gestellt, so dass der Überstand abgenommen und in ein weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Der Überstand wurde auf Eis zwischengelagert. Er enthielt die poly(A)⁻-RNAs, aber auch noch nicht gebundene mRNA. Es folgten zwei Waschschriffe und die Elution der mRNA von den *beads*. Darauf wurde mit der auf Eis gelagerten RNA-Lösung eine zweite Extraktionsrunde durchgeführt, die mRNA eluiert und mit dem ersten Eluat vereinigt. Die mRNA wurde in RNase-freien Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert.

2.2.3 Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien

Die Plasmidpräparationen wurden nach den Arbeitsprotokollen und mit den Reagenzien der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Bakterien wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium und einem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C und 250 rpm angezogen. Von dieser Bakteriensuspension wurden 2 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß dekantiert und bei 1500 x g für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in dem RNase-haltigen Puffer 1 resuspendiert. Darauf folgte ein 5 min alkalischer Lyseschriff (Puffer P2). Dieses stark basische SDS-haltige Gemisch wurde durch den sauren, guanidinhydrochloridhaltigen Puffer P3 neutralisiert und die genomische DNA sowie Zellwandreste gefällt. Es schloss sich ein 10 min Zentrifugationsschriff (13000 x g) an, bei dem sich die Zellwandrest und die genomische DNA auf dem Boden des Reaktionsgefäßes sammeln. Der Plasmid-DNA-haltige Überstand wurde auf eine Qiaprep Spin-Säule pipettiert. Die Plasmid-DNA band während eines kurzen 1 min 13000 x g Zentrifugationsschriffs an die Säulenmatrix. Durch einen Waschriff mit dem ethanolhaltigen Puffer PE wurde die DNA von Salzen befreit. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde anschließend mit 100 µl Millipore-H₂O eluiert. Die DNA wurde bei -20°C gelagert. Dem gleichen Prinzip folgte die automatisierte Plasmidpräparation mit dem Qiagen Biorobot 9600. Im 96-*well* Maßstab wurden hier Bakterien in 1,25 ml 2 x YT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37°C und 350 rpm. Nach dem Wachstum wurden die Bakterien abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die 96-*well*-Platte in den Qiagen-Roboter gestellt. Hier wurden automatisiert die Schritte ausgeführt, die für die Plasmid-Minipräparation beschrieben

wurden. Ein Unterschied war jedoch der Ersatz der Zentrifugation durch ein Vakuum-Abpumpsystem. Die Plasmid-DNA wurde mit 100 µl Elutionspuffer (EP) in eine 96-well PCR-Platte eluiert und bei –20°C gelagert.

2.2.4 Restriktionsanalyse

Zur Größen-Analyse von DNA-Fragmenten in Plasmiden wurde Plasmid-DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten. Dazu wurden Restriktionsenzyme der Firma NEB Biolabs eingesetzt und gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls verwendet. Handelte es sich um einen Kontrollverdau zur Fragmentgrößenbestimmung, so wurde der gesamte Verdau auf ein Agarosegel aufgetragen. Sollte das Fragment weiter verwendet werden, z.B. als DNA-Sonde (2.2.14.1), wurde das Enzym, wenn möglich, hitzeinaktiviert. Darauf schloss sich die Auftrennung der geschnittenen DNA auf einem Agarosegel an (2.2.6) und, wenn notwendig, die Gelextraktion (2.2.10.1). Konnte die Restriktionsendonuklease nicht durch Hitze inaktiviert werden, so wurde die Phenolisierung (2.2.10.4) des Reaktionsansatzes angeschlossen.

2.2.5 Nucleinsäurefällung

2.2.5.1 Fällung von RNA mit Isopropanol

Auf den Aufschluss des Gewebes und die Isolierung der RNA durch das TRIzol-Reagenz, folgte die Fällung der RNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml eingesetztem TRIzol. Nach einer 10 min Inkubation bei Raumtemperatur und einer Zentrifugation (30 min bis 2 h, 4°C, 10000 x g), wurde der Überstand verworfen, die RNA mit 1 ml 75 % EtOH/ 1 ml TRIzol gewaschen und erneut kurz zentrifugiert (10 min, 4000 x g). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment an der Luft getrocknet und in DEPC-Wasser aufgenommen und, wenn erforderlich, durch eine bis zu 10 min Inkubation bei 55°C resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei –80°C.

2.2.5.2 Natriumacetat-Ethanol-Fällung

Die Fällung von Nucleinsäuren wurde zu ihrer Reinigung und zur Konzentrierung eingesetzt. Bei der Natriumacetat-Ethanol-Fällung wurde zu einer nucleinsäurehaltigen Lösung ein Zehntel des Ausgangsvolumens 3 M Natriumacetat (pH 5,2) gemischt und anschließend das zweieinhalbfache Volumen an Ethanol p.a. hinzugegeben. Bei geringer Nucleinsäurekonzentration wurde Glykogen oder *Pellet Paint* als Fällhilfe dem Ansatz hinzugefügt. Nach guter Durchmischung wurde die Nucleinsäure direkt für 30 min bis 2h bei 4°C und 10000 x g pelletiert. Auf die Abnahme des Überstandes folgten zwei Waschschriffe mit 70 % Ethanol und das Trocknen des Nucleinsäure-Sedimentes. Das

Sediment wurde in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer oder in Millipore- oder DEPC-H₂O aufgenommen.

2.2.5.3 Ammoniumacetat-Ethanol Fällung

Die Fällung von Nucleinsäuren mit dem Ammoniumacetat-Ethanol Gemisch wurde zum Abtrennen nicht-inkorporierter Nucleotide nach der radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten (2.2.14.1) eingesetzt. Bei der Fällung mit Ammoniumacetat werden vor allem Oligonucleotide, die größer als 50 bp sind, gefällt, dNTPs und kleine Oligonucleotide werden nicht mitgefällt. Zu der Nucleinsäurelösung wurden 7,5 M NH₄OAC (Endkonzentration) und 100 % Ethanol bis zu einer Ethanol-Endkonzentration von 70-75 % hinzugegeben. Zusammen mit tRNA (Gibco BRL) als Fällhilfe wurde für 20 min mit 13000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Nucleinsäuresediment getrocknet. Danach wurde es in 100 µl TE (pH 8) aufgenommen, die radioaktiv markierte DNA bei 95 °C für 5 min denaturiert und auf Eis bis zur Hybridisierung (2.2.15) gelagert.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese können Nucleinsäure-Moleküle ihrer Größe, Konformation und Ladung nach aufgetrennt werden. Die Agarose wirkt wie ein Molekularsieb, durch das die negativ geladenen DNA-Moleküle, angetrieben durch ein elektrisches Feld, migrieren. Die Auflösung der Agarosegele liegt je nach Konzentration zwischen 0,1 kb und 50 kb für lineare DNA-Fragmente. Für die qualitative und quantitative Analyse von Nucleinsäuren, für Restriktionsanalysen, für den Transfer von Nucleinsäuren auf Membranen und für die Isolierung von Nucleinsäuren aus Gelen wurden Nucleinsäuren elektrophoretisch aufgetrennt. DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6 x Ladepuffer versehen. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TAE Puffer eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern für 1 bis 6 h bei 40-100 V (3-5V/cm Elektrodenabstand). Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Gelkammer genommen und für 20 min zum Färben in ein Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml Ethidiumbromidfärbelösung) gelegt. Ethidiumbromid ist eine sequenzunspezifisch-DNA-interkalierende Substanz, die durch Anregung mit UV-Licht von 254 nm oder 300 nm Wellenlänge fluoresziert. Die DNA-Banden im Gel werden so sichtbar. Die Dokumentation Ethidiumbromid-gefärbter Agarose-Gele erfolgte mit dem E.A.S.Y.-System der Firma Herolab.

Sollte auf die Elektrophorese die Isolierung der DNA aus dem Gel erfolgen, wurde LMP- (*low melting point*) Agarose eingesetzt, die aufgrund ihres niedrigen Schmelzpunktes eine leichte Elution der DNA ermöglicht (2.2.10.1).

2.2.7 Formaldehyd-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA wurde eine spezielle Form der Gelelektrophorese eingesetzt. Sie folgt dem Prinzip der unter 2.2.6 beschriebenen Methode, jedoch wird dem Agarosegel Formaldehyd zugesetzt, um die aufzutrennende RNA vor dem Abbau durch RNAsen zu schützen. Einem mit MOPS-Puffer angesetzten 1 % Agarosegel wurden nach dem Aufkochen und Abkühlen auf 65 °C, 6,5 % (Endkonzentration) Formaldehyd zugesetzt. Nach dem Gießen des Gels kühlte es für 1h auf Raumtemperatur ab. Zur Probenvorbereitung wurde die RNA mit RNA-Probenpuffer (2,25 µl RNA-Lösung; 1 µl 5 x MOPS-Laufpuffer; 5 µl Formamid; 1,75 µl Formaldehyd) versetzt, 15 min auf 65°C erhitzt und dann auf Eis gelagert. Dies diente zur Zerstörung der RNA-Sekundärstrukturen und sollte eine bessere Auftrennung ermöglichen. Das Formaldehydgel wurde in 1 x MOPS-Puffer äquilibriert und ein Vorlauf für 5 min in einer 15 x 9 cm Horizontalgelelektrophoresekammer bei 70 V gestartet. Nach dem Versehen der Proben mit 6 x RNA-Gelladepuffer wurden diese aufgetragen und die Proben im Gel für ca. 2 h bei 70 V aufgetrennt.

Nach der Elektrophorese wurde das RNA Gel in einer 1:10000 verdünnten SYBR-Gold (Molecular Probes) Lösung in steril filtriertem TE (pH 7,5) 20 min lichtgeschützt unter ständigem Schwenken inkubiert. Die RNA wurde unter UV-Bestrahlung nach der Färbung mit SYBR-Gold sichtbar. Mit einer Kamera wurden die RNA Gelbilder aufgenommen und mit einem Bilddokumentationssystem (2.1.8) gespeichert.

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

2.2.8.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen wurde die Absorption der Lösungen bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Bei 260 nm absorbieren vor allem Nucleinsäuren, während bei 280 nm Proteine absorbieren. Der Quotient dieser beiden Messwerte erlaubt eine Aussage über die Reinheit der DNA, für sehr reine DNA liegt er zwischen 1,8 und 1,95. Die Konzentration der Nucleinsäuren lässt sich bei Gebrauch einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke nach den folgenden Formeln berechnen:

RNA: $OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

doppelsträngige DNA: $OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

einzelsträngige DNA: $OD_{260} \times 30 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

2.2.8.2 Fluoreszenzbasierte Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren mit Fluoreszenzfarbstoffen ist genauer und sensitiver als die photometrische Konzentrationsbestimmung. Nucleinsäurekonzentrationen können bis zu 250 pg/ml genau bestimmt werden. Der Fluoreszenzfarbstoff RiboGreen (Molecular Probes) lagert sich an RNA an, während der Farbstoff PicoGreen (Molecular Probes) sich an doppelsträngige DNA anlagert. Diese Anlagerung wurde mit einem Spektrofluorometer (FLUOstar, BMG) gemessen. Die Signalintensität ist proportional zur Nucleinsäuremenge und wird durch den Abgleich mit einer Standardreihe berechnet. Zur Auswertung wurden Konzentrationsreihen von 6,25 ng, 12,5 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng und 150 ng für RNA und DNA erstellt. Die Farbstoffe wurden zum Einsatz 1 : 200 verdünnt. Von allen Proben wurden Doppelmessungen gemacht, mit Ausnahme der poly (A)⁺ RNA, die aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des Materials nur einmal vermessen wurde.

2.2.9 Konzentrationsbestimmung über ein Agarosegel

Zur Konzentrationsbestimmung wurden zwei verschiedene Mengen von DNA unbekannter Konzentration und verschiedene Mengen an Größenstandard-DNA auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese und dem Anfärben in einem Ethidiumbromidbad wurde der DNA-Gehalt der zu bestimmenden Bande über eine Intensitätsvergleich der Ethidiumbromidfärbung mit etwa gleichgroßen Markerbanden abgeschätzt.

Da Ethidiumbromid sich quantitativ in den DNA-Doppelstrang einlagert, so dass DNA-Fragmente gleichen Molekulargewichts und gleicher Konformation etwa die gleiche Farbeintensität aufweisen, war es möglich, mit Hilfe von DNA-Standards bekannten Molekulargewichtes die DNA-Menge einer unbekanntes DNA-Probe abzuschätzen.

2.2.10 Reinigung von DNA-Fragmenten

2.2.10.1 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung von Nucleinsäure-Sonden und zum Subklonieren wurde die elektrophoretisch aufgetrennte DNA aus dem Gel eluiert. Dazu wurden die entsprechenden DNA-Banden nach kurzer Ethidiumbromid (EtBr)-Färbung unter UV-Bestrahlung mit einem Skalpell aus dem LMP-Agarosegel geschnitten und die entsprechenden Agarosestücke abgewogen. Pro 100 mg Gel wurden 100 µl Solubilisierungspuffer (Qiagen, QX1-Puffer) hinzugegeben und das Gelstück bei 50 °C bis zu 10 min inkubiert, bis es gelöst war. Die Lösung wurde auf *QIAquick Spin Columns* (Qiagen) überführt und 1 min bei 10000 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Eluats

wurden die Säulen mit 700 µl PE-Waschpuffer (Qiagen) gewaschen, die Säulen für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und darauf die membrangebundene DNA mit 50 µl Millipore-H₂O eluiert. Die eluierte DNA wurde bei –20°C gelagert.

2.2.10.2 Elektroelution von DNA-Fragmenten

Durch den Einsatz einer Elektroelutionsapparatur in Verbindung mit Centricon-Filter-Systemen (Amicon Millipore) kann eine Geelution mit minimalem Verlust an Material und Konzentrierung des Materials erreicht werden. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandert die DNA aus dem Gelstück in den umgebenden TAE-Puffer innerhalb eines Centricon-Filterröhrchens. Ein Filter innerhalb des Röhrchens verhindert das Wegdiffundieren der DNA in die Pufferumgebung und ermöglicht die anschließende Konzentrierung der DNA durch Zentrifugation.

Nach dem Restriktionsverdau zur Abtrennung der Adapter der Subtraktions-cDNAs (2.2.20) wurde der Verdau auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Anfärben des Gels mit EtBr (2.2.6) wurde der cDNA-Schmier mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, die abgetrennten Adapter im Gel zu belassen und selektiv die cDNA auszuschneiden. Die Gelstücke wurden in Centricon YM-10 Röhrchen überführt und in eine Elektroelutionskammer eingesetzt. Diese wurde mit entgastem 1 x TAE-Puffer gefüllt. Die Elution erfolgte für 3 h bei 110 V. Nach der Elution wurden die Centricon-Röhrchen vorsichtig aus der Halterung genommen und mit einem Plastikauffanggefäß in Glascorexröhrchen gestellt. Es folgte die Zentrifugation für 1 h bei 20 °C und 5000 x g. Dabei sammelte sich die DNA auf der Membran und der TAE-Puffer wurde in das Auffangröhrchen abzentrifugiert. Der TAE-Puffer wurde nach der Zentrifugation verworfen und die auf der Membran verbliebenen DNA zweimal mit 500 µl Millipore-H₂O gewaschen. Nach dem Waschen befand sich die DNA auf der Membran des Centriconröhrchens. Dieses Röhrchen wurde zur Gewinnung der DNA umgedreht, in das Auffanggefäß gestellt und 2 min bei 1000 x g zentrifugiert. Es folgte die Konzentrationsbestimmung der Eluate mit PicoGreen (2.2.8.2). Die gereinigte, eluierte DNA wurde bei –20 °C in Eppendorfreaktionsgefäßen gelagert.

2.2.10.3 Abtrennung von Primern über Gelfiltrations-Säulen

Nach der Amplifikation der Subtraktions-cDNAs mit den *nested* Primern (inklusive CUA/CAU-Rest) (2.2.20.5) wurden die überschüssigen Primer über Chromaspin 100 Säulen (Clontech) abgetrennt. Damit werden alle Moleküle, die kleiner sind als 100 bp, in der Säulenmatrix festgehalten. Die Säule wurde vor Gebrauch für 2 min bei 1900 x g vorzentrifugiert, um den Lagerungspuffer TE zu entfernen. Mit TE-Puffer wurden die PCR-Ansätze auf 40 µl aufgefüllt, auf die vorbereitete Säule gegeben und 1 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Darauf wurde für 5 min bei 1900 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde aufgefangen und konnte dann zur Klonierung weiterverwendet werden (2.2.11).

2.2.10.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Reinigung der DNA von Enzymen, zellulären Proteinen und anderen organischen Bestandteilen, wurde ein Phenol/Chloroformgemisch (24:1, Roth) im Verhältnis 1:2 zum Reaktionsansatz gegeben. Diese Mischung wurde gut geschüttelt, so dass eine milchig viskose Flüssigkeit entstand, und dann 15 min bei 13000 x g abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es schloss sich die Fällung der DNA an (2.2.5.2,2.2.5.3).

2.2.11 Klonierung

Die gereinigten DNA-Fragmente, komplexe und subtrahierte cDNAs wurden in verschiedene Vektorsysteme kloniert.

2.2.11.1 Ligation

Ligationen wurden bei 16°C über Nacht für 12-20 Stunden durchgeführt. Die Ansätze von 10 µl Gesamtvolumen setzten sich aus 50-200 ng geschnittener Vektor-DNA und dem entsprechenden Anteil an einzusetzenden Fragmentenden zusammen. Zur Ligation wurden 1 µl (1 Weiss Unit) T4-DNA-Ligase (NEB, Biolab) eingesetzt sowie 1 µl 10 x Ligasepuffer hinzugegeben und schließlich mit Millipore-H₂O auf das gewünschte Volumen aufgefüllt.

2.2.11.2 Ligation von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden in einer direkten Ligation in das pGEM-T Easy System der Firma Promega integriert. Das Prinzip dieser speziellen Ligation beruht auf der Konstruktion des Vektors. Diesem Vektor ist an beiden 3'-Enden ein einfacher Thymin-Rest angefügt. Im Wissen, dass einige thermostabile Polymerasen, unter anderem die *Taq*-Polymerase, ihren Syntheseprodukten unspezifisch ein einfaches desoxy-Adenosin an deren 3'-Enden anfügen, wird die Möglichkeit einer effektiven Ligation zwischen Vektor und PCR-Produkt über diese A/T-Verbindung eröffnet. Die Reaktion wurde wie beschrieben mit den Reagenzien des Promega pGEM-T Easy Kits durchgeführt. Die Fällung dieser Reaktion wurde angeschlossen (2.2.5.2). Darauf folgte die Elektroporation der Bakterien (2.2.12.2).

2.2.11.3 Ligation von cDNA

Konventionelle cDNAs wurden nach der Ligation von *NotI*- und *SalI*-Schnittstellen tragenden Adaptern an die doppelsträngige cDNA, in den *NotI*/*SalI*-geschnittenen Vektor pSPORT (Gibco BRL) gerichtet kloniert. Zur Ligation wurden etwa 10-20 ng cDNA und

2,5 µg/ml pSPORT 1 *NotI/Sall*-geschnitten eingesetzt. Hinzugegeben wurden 0,5 units/ml T4-DNA-Ligase und Ligase-Puffer (Gibco, BRL). Die Reaktion wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert. Vor der Elektroporation (2.2.12.2) wurde die Ligation gefällt (2.2.5.2).

2.2.11.4 Ligation von Subtraktions-cDNAs

Die Klonierung der Subtraktions-cDNAs erfolgte über (CAU)₄ und (CUA)₄ Reste, die während des zweiten Amplifikationsschrittes als Teile der vorwärts und rückwärts gerichteten Primer eingefügt wurden. Die Klonierung erfolgte in den Vektor pAmp 1 (Gibco, BRL). Zum Anlagern (*annealing*) wurden 10-50 ng PCR Produkt, 50 ng Vektor pAmp 1, 1 x Taq Puffer (Roche) und 1 U Uracil-DNA-Glycosylase in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird auf Eis abgestoppt. Darauf folgte die chemische Transformation (2.2.12.1).

2.2.12 Transformation kompetenter Bakterien

2.2.12.1 Chemische Transformation

Zur chemischen Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* DH10B (Gibco, BRL) Zellen eingesetzt. Zu 100 µl kompetenten Zellen wurden 5 µl des Ligationsansatzes gegeben. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert, dann wurde für 45 sec in einem 42 °C warmen Wasserbad der Hitzeschock durchgeführt. Darauf folgte eine 2 min Inkubation auf Eis. Vor dem Ausplattieren wurden 900 µl SOB-Medium zu dem Gemisch pipettiert und für 1 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Von den Versuchsansätzen wurden je 10 µl und 100 µl auf LB-Amp Agarplatten (Ampicillin 100 µg/ml) ausplattiert. Als Kontrolle wurde das pGEM-Plasmid (1 ng) transformiert und nur 1 µl ausplattiert.

2.2.12.2 Elektroporation

Vor der Elektroporation wurden die Ligationsansätze gefällt, um störende Salze zu entfernen (2.2.5.2). Die gefällte DNA wurde in 5 µl Millipore-H₂O aufgenommen. Von diesen 5 µl wurde 1 µl zu den auf Eis aufgetauten elektrokompenten DH10B-Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Diese Mischung wurde luftblasenfrei in eine 1 mm-Spalt Küvette (Biozym) pipettiert und bei 25 µF, 200 µOhm und 1,7 kV (17 kV/cm) elektroporiert. Dabei sollte die Zeitkonstante τ einen Wert von 4,7 ns erreichen. Die elektroporierten Bakterien wurden sofort in 1 ml SOB-Medium überführt und für 1 h bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Auf die Inkubation folgte das Ausplattieren der Zellen auf LB-Amp-Agarplatten (Ampicillin 100 µg/ml) und die Inkubation bei 37 °C über Nacht.

2.2.13 Nucleinsäuretransfer auf Membranen

2.2.13.1 Southern Blot Analyse

Durch die von Southern beschriebene Kapillar-Transfermethode (Southern, 1975) wurden Nucleinsäuren auf Membranen übertragen. Nach dem Anfärben des Agarosegels mit EtBr und der Dokumentation wurde die DNA im Gel für 10 min in 0,4 N NaOH denaturiert. Es wurde darauf geachtet, dass das Gel immer mit NaOH benetzt war. Für einen Trockenblot wurde das Gel dann mit der Oberseite auf ein passendes Stück Parafilm gelegt und darauf die exakt zugeschnittene, in 0,4 N NaOH äquilibrierte Hybond-N⁺ Membran (Amersham Pharmacia Biotech) luftblasenfrei abgelegt. Darauf folgten drei mit 0,4 N NaOH angefeuchtete Lagen Whatman-Papier und viele Lagen zugeschnittene Zellstoff-Papiertücher. Eine Glasplatte mit einem Gewicht (ca. 250 g) bildete den Abschluss. Dieser Aufbau wurde über Nacht beibehalten. Nach dem Abbau des Blots wurden die Taschen des Gels auf der Membran markiert und diese in 2 x SSC neutralisiert. Es folgte die irreversible Bindung der DNA an die Membran durch das UV-Crosslinken (Stratagene) bei einer Einstellung von 1200 kJ. Darauf wurde der Blot getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.2.13.2 Northern Blot Analyse

Zur Northern Blot Analyse wurden die mit SYBR-Gold gefärbten Formaldehydgele (2.2.7) nach ihrer Dokumentation eingesetzt. Sie folgt dem gleichen Prinzip wie die Southern Blot Analyse (2.2.13.1). Das Gel wurde für 10 min in 50 mM NaOH geschwenkt und danach gründlich mit Millipore-H₂O abgespült. Darauf folgte eine 45 min Inkubation in ca. 500 ml 20 x SSC bei Raumtemperatur und ständigem Schwenken. Während dieser Äquilibrierungszeit wurde die Hybond N⁺-Membran passgenau zugeschnitten, ebenso drei Lagen von Whatman-Papier und Zellstofftücher. Um eine ständige Pufferzufuhr während des Blottens zu erreichen, wurde eine Pufferkammer angelegt, in die das Gel über dem Pufferspiegel gelegt wurde (z.B. auf eine Plastikbox). Weiterhin wurde ein größeres Whatman-Papier zugeschnitten, welches als Brücke zwischen dem Gel und dem Pufferreservoir diente. Aus einem Stück Plastikfolie wurde ein gelgroßer Bereich herausgeschnitten. Diese Plastikfolie wurde später um das Gel gelegt, um den Kontakt des Papiers mit der 20 x SSC Lösung zu vermeiden, so dass alle Flüssigkeit, der Kapillarkraft folgend, durch das Gel wandern musste. In das Pufferreservoir wurde 20 x SSC gefüllt und eine Plastikbox hineingelegt. Auf diese wurde die mit 20 x SSC angefeuchtete Whatman-Papier-Brücke luftblasenfrei gelegt. Darauf wurde das RNA-Gel platziert. Auf dieses wurde die mit 20 x SSC äquilibrierte Hybond N⁺-Membran gelegt, gefolgt von drei Lagen in 20 x SSC getauchten Whatman-Papiers. Um das Gel wurde nun

die zugeschnittene Plastikfolie angebracht. Zum Schluss wurde Zellstoff in mehreren Lagen auf den Gelaufbau gelegt, gefolgt von einer Glasplatte und Gewichten. Geblottet wurde für mindestens 16 h. Danach wurde der Blot vorsichtig abgebaut, die Taschen des Gels auf der Membran markiert und diese dann für 5 min in 6 x SSC geschwenkt. Darauf wurde der Blot getrocknet, bis keine Flüssigkeit mehr zu sehen war und die RNA bei 1200 kJ mit dem Stratalinker mit der Membran vernetzt. Die Northern-Blots wurden bei -20°C gelagert.

2.2.14 Radioaktive Markierung von Nucleinsäuren

2.2.14.1 *Random-Hexamer* Markierung

Feinberg und Vogelstein entwickelten 1983 eine Methode zur radioaktiven Markierung doppelsträngiger DNA (Feinberg und Vogelstein, 1983). Bei dieser Methode dienen zufällig gewählte Oligo-Hexamere (*random hexamers*), die sich an die komplementäre Sequenz der zu markierenden einzelsträngigen DNA-Sonde anlagern, als Startpunkte der Klenow-Polymerase, die dann beginnt, das fehlende DNA-Stück zu synthetisieren. Dabei bedient sie sich der zugegebenen Nukleotide, von denen eines radioaktiv markiert ist. 10 bis 50 ng DNA wurden in 11 μl Millipore- H_2O aufgenommen und für 10 min bei 95°C denaturiert. Danach wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt und die folgenden Reagenzien hinzugegeben: 18 μl LS, 3 μl BSA (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 3 μl C-Mix, 4 μl $\alpha\text{-P}^{32}/\text{P}^{33}\text{-dCTP}$ (40 μCi) und 1 μl Klenow-Polymerase (5 units/ μl ; Roche). Dieser Ansatz wurde für 30-150 min bei 37°C inkubiert und eine Ammoniumacetat-Ethanol-Fällung angeschlossen (2.2.5.3), um nichtinkorporierte radioaktive Nukleotide zu entfernen. Das DNA-Sediment musste vor dem Aufnehmen in TE-Puffer oder Millipore- H_2O vollständig trocken sein, da Ethanolreste einen hohen unspezifischen Hintergrund bei der Hybridisierung auf den Membranen erzeugen. Es wurde durch 5 min Aufkochen bei 100°C gelöst und denaturiert und konnte zur Hybridisierung (2.2.15) eingesetzt werden. Die Aktivität der Sonde wurde durch die Messung mit einem Szintillationszähler bestimmt und sollte zwischen 5×10^6 und 3×10^7 cpm liegen.

2.2.14.2 *Oligo-Endmarkierung*

Eine andere Methode der radioaktiven Markierung stellt die Endmarkierung einzelsträngiger DNA, z.B. von Oligo-Nucleotiden dar. Dabei wird über eine Kinasierung das Oligo an der freien 5'-OH-Gruppe radioaktiv markiert. 100 ng eines Oligo-Nucleotides wurden mit 3 μl $\gamma\text{-P}^{33}$ ATP (30 μCi), 2 μl 10 x Kinasepuffer (NEB) und 1 μl Polynukleotidkinase (1 U/ μl , NEB) in einem 20 μl Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde direkt zur Hybridisierung eingesetzt.

2.2.14.3 Komplexe Proben

Das Ausgangsmaterial der komplexen Proben ist poly (A)⁺-RNA, die aus NZK-Patienten isoliert wurde (2.2.1, 2.2.2). Damit enthält eine komplexe Probe die mRNA aller in dem Gewebestück exprimierten Gene. Um die radioaktive Markierung aller dieser Gene zu erreichen, wurde die mRNA radioaktiv revers transkribiert. Es wurden für die Hybridisierung auf einen 22 x 22 cm großen UniGene-Filter 350 ng, für die Hybridisierung auf einen kleinen 11 x 7 cm großen nierenspezifischen Spezialfilter (3.8.1) je nach Experiment 75-100 ng poly (A)⁺-RNA eingesetzt. Der gesamte Reaktionsansatz für die Spezialfilter umfasste 1/6 des Volumens der folgend beschriebenen Zusammensetzungen für einen UniGene-Filter Ansatz.

Die poly (A)⁺-RNA wurde zusammen mit 500 ng (dT)₁₈V Primer (Gibco, BRL) in einem Volumen von 10,5 µl für 10 min auf 70 °C erhitzt und danach auf Eis gestellt. Darauf wurden 20 U Rnasin (Promega), 10 mM DTT, Erststrangpuffer (Gibco, BRL; 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ Endkonzentration), je 400 µM dATP, dTTP und dGTP und 50 µCi α-dCTP³³ hinzugegeben und der Ansatz auf 37 °C für 1 min erwärmt. Darauf wurden 200 U Superscript II Reverse Transkriptase hinzupipettiert und der 25 µl Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die RNA zur Herstellung einer Einzelstrang-Probe hydrolysiert. Dazu wurden dem 25 µl Ansatz 1 µl 0,5 M EDTA, 0,5 µl 20 % SDS und 3 µl 3 N NaOH hinzugegeben und 30 min bei 68 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz mit 1 µl 1 M Tris-HCl (pH 8,0) und 3 µl 2 N HCl neutralisiert. Die nicht-inkorporierten Nucleotide der radioaktiv markierten Erststrang-cDNA wurden folgend durch Gelfiltration in einer S-300 Spin-Column (Mobitec) abgetrennt. Die Inkorporationsrate lag immer bei >30 % (10-30 x 10⁶ cpm). Vor dem Einsatz zur Hybridisierung wurde die cDNA für 5 min bei 95 °C inkubiert, auf Eis zwischengelagert und dann zur Hybridisierung eingesetzt (2.2.15.3).

2.2.15 Hybridisierung auf membrangebundene Nucleinsäuren

2.2.15.1 Hybridisierung von Southern Blots

Die Hybridisierung von Southern-Blots (2.2.13.1) wurde nach dem Prinzip von Church und Gilbert durchgeführt (Church und Gilbert, 1984). Dazu wurden die Nylonmembranen für 2-3 h in einer Plastikdose oder einem schraubdeckelverschlossenem Glasrohr bei 65 °C in einem entsprechenden Volumen Church-Puffer prähybridisiert. Vor der Hybridisierung wurde der Puffer ausgetauscht und frischer, vorgewärmter Church-Puffer zum Blot gegeben. Nach Hinzupipettieren der Probe wurde über Nacht bei 65 °C in einem Hybridisierungsofen oder in einem Wasserbad hybridisiert. Danach wurde der Puffer abgegossen und vorgewärmter Waschpuffer (0,2 % SDS, 0,2 x SSC) hinzugegeben und

15 min inkubiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und danach die Radioaktivität des Blots mit einem Handmessgerät überprüft. Der Blot wurde zur Exposition in Frischhaltefolie verpackt und entweder über Nacht in einer Phosphoimager-Kassette exponiert oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einem Autoradiographiefilm exponiert.

2.2.15.2 Hybridisierung von Northern Blots

RNA-Blots wurden in Schraubdeckel-Glasröhren in 4 ml ExpressHyb-Lösung (Clontech) für mindestens 4 h bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Rotationsofen prähybridisiert. Danach wurde die denaturierte markierte Probe ohne zusätzlichen Pufferwechsel hinzugegeben. Die Hybridisierung wurde für 16 bis 24 h durchgeführt. Darauf wurde der Hybridisierungspuffer abgegossen und zweimal für 10 min bei Raumtemperatur mit einem $2 \times \text{SSC}$, $0,05\%$ SDS Puffer gewaschen. Zur Überprüfung der Effizienz des Waschens wurden mit einem Handmessgerät die Radioaktivität des Blots bestimmt. Zeigten diese einen Wert um 50 cpm an, wurde das Waschen gestoppt. Sonst wurde ein weiterer Waschschrift 1×15 min mit $0,1 \times \text{SSC}$, $0,1\%$ SDS bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ angeschlossen. Nach dem Waschen wurde der Blot in Frischhaltefolie verpackt und in einer Phosphoimager-Kassette exponiert.

2.2.15.3 Hybridisierung von *high density* PCR-Filtern

Vor der ersten Hybridisierung der *high density* PCR-Filter wurden diese gestrippt (2.2.16). Die 22×22 cm großen Membranen wurden mit 7,5 ml Millipore- H_2O angefeuchtet und in Glasröhren (24×7 cm) gelegt. Dazu wurde dasselbe Volumen an vorgewärmter Hybridisierungslösung gegeben. Prähybridisiert wurde für 3 bis 6 h bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Rotationsofen. Dann wurde die komplexe Probe (2.2.14.3) zusammen mit einem Klenow-markierten Kanamycin-Gen-Fragment (2.2.14.1) zu den Filtern pipettiert. Die Proben sollten direkt in die Flüssigkeit gegeben und dort gut vermischt werden, da es sonst zu Flecken durch zu stark konzentrierte Proben auf den Filtern kommen kann. Das Kanamycin-Genfragment wurde mithybridisiert, da es als Leitpunkt (*guide dot*) in regelmäßigen Abständen auf den Membranen aufgedruckt vorlag. Der Leitpunkt diente zur besseren Justierung des Bildanalyseprogramms xdigitise (AG Prof. Dr. Lehrach, MPI Berlin). Dieser Ansatz wurde für 12 bis 16 h bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Es folgten vier Waschschriffe.

Puffer	Zeit	Temperatur	Volumen	Abfall
$1 \times \text{SSC}/0,1\% \text{ SDS}$	20 min	65°C	50 ml in Röhre	Radioaktivabfall
$0,3 \times \text{SSC}/0,1\% \text{ SDS}$	10 min	65°C	50 ml in Röhre	Radioaktivabfall
$0,3 \times \text{SSC}/0,1\% \text{ SDS}$	10 min	65°C	500 ml pro Box	Abwasser
$0,1 \times \text{SSC}/0,1\% \text{ SDS}$	10 min	65°C	500 ml pro Box	Abwasser

Tabelle 2.1 Waschschriffe nach der komplexen Hybridisierung

Die gewaschenen Filter wurden in eine mit TE gefüllte Box überführt, nacheinander in Plastikfolie verpackt und in Phosphoimager-Kassetten 16 bis 20 h exponiert. Darauf folgte die Detektion mit einem Phosphoimager (2.2.17).

2.2.15.4 Oligo-Hybridisierungen

Oligo-Hybridisierungen wurden sowohl bei Northern Blots als auch bei den cDNA-Filtern zur Qualitätskontrolle eingesetzt. Dazu wurde die jeweilige Membran in Amasino-Lösung für 3 bis 4 h bei 28 °C prähybridisiert. Darauf wurde die radioaktiv markierte Oligo-Probe hinzugegeben und bei gleicher Temperatur über Nacht hybridisiert (12-16 h). Gewaschen wurde 2 x 30 min bei 28 °C mit Oligo-Waschpuffer. Danach wurden die Filter 12-20 h in einer Phosphoimagerkassette exponiert und darauf gescannt (2.2.17).

2.2.16 Entfernen der hybridisierten radioaktiv markierten Proben von DNA-Filtern (*Strippen*)

Um die während der Hybridisierung gebildeten DNA-Doppelstränge auf den Membranen zu lösen, wurden diese 1 x 5 min und danach 1 x ca 45 min mit 95 °C heißer *Stripping*-Lösung (5 mM NaPi (pH 7,6); 0,25 % SDS) inkubiert. Die zweite Inkubation wurde gestoppt, nachdem die Lösung Raumtemperatur erreicht hatte. Die *Stripping*-Lösung wurde verworfen und die Filter in TE pH 8,0 gelagert. Nach dem *Strippen* wurde ein Filter über Nacht in einer Phosphoimager-Kassette exponiert und danach gescannt, um die *Stripping*-Effizienz zu überprüfen. Bei erfolgreichem Strippen konnten die Membranen nun bei Raumtemperatur auf Filterpapier (Whatman-Papier) getrocknet werden. Sie wurden bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.17 Digitales Einlesen von radioaktiven Signalen durch den Phosphoimager

Die radioaktiv markierten Membranen wurden in Phosphoimagerkassetten auf Phosphorschirmen exponiert. Je nach Stärke des radioaktiven Signals betrug die Expositionszeit 30 min bis 24 h. Der exponierte Phosphorschirm wurde in dem Phosphoimager so platziert, dass der Laser die exponierte Seite des Schirms anregen konnte. Mit einem roten Lichtstrahl (635 nm) wurde die Expositionsfläche des Schirms pixelweise abgescannt. Traf der Lichtstrahl auf einen Bereich, der radioaktiv exponiert war, emittierte das Phosphor blaues Licht. Das optische System sammelt dieses und leitet es durch Filter zu einer Photomultiplier-Röhre, die dieses Signal in elektrische Spannung, abhängig von der Signalintensität, umwandelt. Die Stärke des Signals war direkt proportional zu der Signalstärke. Das analoge Signal der Photomultiplier-Röhre wurde in digitale Information umgewandelt und im Computer gespeichert.

So können mit den digitalisierten Bildern Quantifizierungen vorgenommen werden. Dazu wurde das Programm ImageQuant (Molecular Dynamics) für die Auswertung von Northern Blots eingesetzt. Die Quantifizierung der Signale auf den UniGene-Filtern und den nierenspezifischen Filtern wurde durch das Programm xdigitise (AG Prof. Dr. Lehrach, MPI, Berlin) vorgenommen.

2.2.18 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.18.1 Standard-PCR

Der Standard-PCR Ansatz bestand aus folgenden Reagenzien:

Reagenzien	Einsatzmenge
DNA-Matrize	1-100 ng
10 x PCR-Puffer (Roche)	5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
5'-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
3'-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Ampli-Taq-Polymerase (5 units/µl; Roche)	0,25 µl
Millipore-H ₂ O	ad 50 µl

Die PCR-Bedingungen wurden je nach Primer und DNA-Matrize angepasst. Sie schwankten in den folgenden Grenzen. Denaturierung: 1 min. 95 °C; variierende Zyklen: 25-35 mal: Denaturierung: 94 °C 15 bis 60 s; Primer Anlagerung: 48 °C bis 68 °C 30 bis 60 s; Kettenverlängerung: 68 °C bis 72 °C 1 bis 3 min; Auffüllreaktion: 72 °C 10 min.

2.2.18.2 Hochdurchsatz -Kolonie-PCR

Zur Herstellung von PCR-Filtern wurden Amplifikate von über 31500 Klonen benötigt. Die Amplifikation dieser Klone wurde als Kolonie-PCR im *384-well* Maßstab durchgeführt. Dazu wurde mit einem Pipettierroboter (Biomek 2000, Beckman) PCR-Mix in die *384-well* Platten vorgelegt und die DNA durch Überstempeln von Bakterienkolonien in die *wells* übertragen. Die *Taq*-Polymerase wurde von Rainer Will (RZPD, Heidelberg) isoliert, die Reaktionsbedingungen von Rainer Wittig (AG Prof. Dr. Poustka, DKFZ, Heidelberg) optimiert. Für die Amplifikation wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

Reagenzien	Einsatzmenge
Bakteriensuspension	
10 x PCR-Puffer pH 9 (100 mM Tris-HCl pH 9; 500 mM KCl)	2 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,4 µl
M13u-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
M13r-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
Taq-Polymerase (variable units)	x µl
Millipore-H ₂ O	ad 20 µl

Es wurden folgende Zyklen mit den PCR-Maschinen gefahren: Denaturierung: 94 °C 3 min; 25 x: 94 °C 30 s; 57 °C 50 s; 72 °C 2 min; abschließend Kettenverlängerung: 72 °C 10 min.

Der Erfolg der PCR wurde durch die Gelelektrophorese (2.2.6) nachgewiesen. Dazu wurden von jeder Platte je 1 µl der PCR-Produkt aus acht verschiedenen *wells* überprüft.

2.2.18.3 RT-PCR

Die RT-PCR verlief in zwei großen experimentellen Blöcken. Im ersten Block wurde von total RNA, isoliert aus normaler Niere und klarzelligem NZK dreier Patienten, Erststrang-cDNA synthetisiert. Diese Erststrang-cDNA diente als Matrize für PCR-Analysen verschiedener Gene im zweiten Block.

500 ng total RNA (Konzentrationsbestimmung mit Ribogreen, 2.2.8.2) wurden auf 5 µl aufgefüllt und zum DNase-Verdau eingesetzt. Dazu wurden 3 µl Millipore-H₂O, 1 µl 10 x DNase I-Puffer (500 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 0,5 µl RNase free DNase I (20 units/µl, Roche), 0,5 µl Rnasin (40 units/µl, Promega) zusammenpipettiert und für 20 min auf 37 °C erwärmt. Danach wurde die DNase I für 10 min bei 75 °C inaktiviert.

Die DNase I verdaute RNA wurde zusammen mit dem oligo(dT)₁₈V-Primer (50 pmol Primer/500 µg total RNA) in einem 10 µl Ansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert, auf Eis gestellt und die folgenden Reagenzien zur angegebenen Endkonzentration in einem 20 µl Ansatz hinzupipettiert: 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 µM von je dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Diese Mischung wurde für 2 min auf 42 °C erwärmt und dann 0,5 µl Superscript II Reverse Transkriptase (20000 units/ml) hinzugegeben. Nach der 2 h Inkubation bei 42 °C wurden 0,5 µl RNase H (5 units/µl, Gibco) hinzugegeben und für 20 min auf 37 °C erwärmt. Die RNase wurde für 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Damit lag einzelsträngige cDNA vor. Diese wurde in kleinen Aliquots bei – 80 °C gelagert. Parallel wurde zu diesem Ansatz eine Kontrolle ohne Superscript II Reverse Transkriptase angesetzt.

Vor dem Einsatz zur PCR wurde die cDNA 1 : 2 mit Aqua ad iniectabilia (B. Braun Melsungen) verdünnt. Die Kontrolle ohne Superscript wurde unverdünnt eingesetzt. Je 1 µl Matrize wurde zur PCR angesetzt. Das Volumen jeder Reaktion betrug 25 µl und setzte sich wie unter 2.2.18.1 beschrieben zusammen. Ebenso verhielt es sich mit den Reaktionsbedingungen. Zyklenzahl und *annealing*-Temperatur wurden je nach Primerpaar variiert (2.2.18.1). Soweit es möglich war, wurden die Reaktionen im 96-*well* Maßstab angesetzt. Neben der Kontrolle ohne Superscript, die nur einmal pro cDNA-Synthese durchgeführt wurde, erfolgte bei jeder PCR-Runde eine Kontrolle ohne Matrize und zwei Positiv-Kontrollen mit GAPDH-Primern und Actin-Primern. Diese Kontrollen wurden immer zusammen mit den allen anderen PCRs eines Durchlaufes auf dasselbe Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese mit Bilddokumentation angeschlossen (2.2.6).

Die Auswertung der computergespeicherten Gelbilder erfolgte mit dem Quantifizierungsprogramm Imagequant (Molecular Dynamics).

2.2.19 Herstellung konventioneller cDNA-Bibliotheken

Aus der mRNA von Tumor- und Normal-Nierengewebe des Patienten 00929 wurde je eine konventionelle cDNA-Bibliothek erstellt. Diese cDNA-Bibliotheken sollten nach der Analyse der Subtraktionsbibliotheken eine Verlängerung der durch die Subtraktionen identifizierten kurzen Transkripte ermöglichen.

Soweit nicht anders beschrieben, stammen die hier eingesetzten Reagenzien von der Firma Gibco BRL. Je 1 µg poly(A)⁺ RNA wurde mit 500 ng *NotI Primer Adapter* (*NotI Primer Adapter* 5'-pGACTAGT TCTAGA TCGCGA GCGGCCGC CC (T)₁₅-3') in 10 µl Gesamtvolumen für 10 min bei 70 °C inkubiert, um eine optimale Anlagerung des Primers an die mRNA zu ermöglichen. Zusätzlich zu dem oligo(dT)-Rest hat der Primer eine *SpeI*, *XbaI*, *NruI* und *NotI* Schnittstelle. Dies ermöglicht später den Restriktionsverdau mit einem spezifischen Enzym z.B. *NotI* und führt zu einer Asymmetrie der cDNA, die eine gerichtete Klonierung zulässt. Auf die Anlagerung der Primer und einer kurzen Inkubation des Ansatzes auf Eis folgt die Erststrangsynthese der cDNA. Vor der Zugabe der Reagenzien wurde die Temperatur des Ansatzes auf 42 °C äquilibriert. In dem 20 µl Ansatz liegen folgende Reagenzien vor: 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 µM von je dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 50 µg/ml *NotI Primer Adapter* 1 µg mRNA und 20000 units/ml Superscript II Reverse Transkriptase. Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 42°C in einer PCR-Maschine mit beheiztem Deckel inkubiert. Nach dem Abschluss der Erststrangsynthese wurde der Ansatz auf Eis gestellt und nacheinander zur Zweitstrangsynthese die folgenden Reagenzien zu folgenden Endkonzentrationen hinzugegeben: 25 mM Tris-Cl (pH 7,5), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,15 mM β-NAD⁺, 250 µM je dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1,2 mM dTT, 65 units/ml DNA Ligase, 250 units/ml DNA Polymerase I, 1 µCurie α-dCTP³² und 13 units/ml Rnase H. Nach kurzem Mischen wurde dieser Ansatz für 2 h bei 16 °C inkubiert. Zum Auffüllen der Enden wurden nach dieser Inkubationszeit 10 units T4-DNA-Polymerase hinzugegeben und für 5 min bei 16 °C inkubiert. Darauf schloss sich die Phenol/Chloroform-Extraktion (2.2.10.4) und die Fällung der cDNA (2.2.5.3) an. Die Qualität der Zweitstrang-cDNA wurde über Southern Blot Hybridisierung (2.2.13.1) überprüft.

Auf die Qualitätskontrolle folgte die Ligation von *SalI*-Adaptoren an die *blunt end* cDNA. Die Reaktion setzte sich wie folgt zusammen: 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 5 % (w/v) PEG 8000, 1 mM DTT, 200 µg/ml *Sal I Adapter* und 100 units/ml T4 DNA Ligase. Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt und über Nacht (16 h) bei 16 °C

inkubiert. Darauf folgte erneut eine Phenol/Chloroform-Extraktion (2.2.10.4) und die Fällung der adapterligierten cDNA (2.2.5.3).

Da an beide Seiten der cDNA Adapter ligiert wurden, jedoch die cDNA gerichtet kloniert werden sollte, schloss sich ein *NotI*-Verdau an. Der Verdau wurde für 2 h bei 37 °C durchgeführt und hatte die folgende Zusammensetzung: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl und 1200 units/ml *NotI*. Angeschlossen wurde die Phenol/Chloroform-Extraktion (2.2.10.4) und die Ammoniumacetat-Fällung (2.2.5.3).

Um möglichst große cDNA-Fragmente klonieren zu können und um störende Adapter- und Primerreste zu entfernen, wurde eine Säulenchromatographie angeschlossen, die alle DNA-Stücke kleiner als 500 bp entfernen sollte. Die 1 ml Säulen wurden 4 x mit 0,8 ml TEN-Puffer gewaschen, dann wurde die in 100 µl TEN-Puffer aufgenommene cDNA auf die Säule gegeben und einzelne Tropfen aus der Säule in einzelnen Eppendorfreaktionsgefäßen aufgefangen. Gleichzeitig wurde in 100 µl Schritten TEN-Puffer nachpipettiert. Nachdem 20 Gefäße gefüllt waren, wurde das Volumen in jedem einzelnen Gefäß gemessen. Danach wurde aus jeder Fraktion 1 µl im Szintillationszähler vermessen. Das Verhältnis der gemessenen Radioaktivität zum Totalvolumen wurde berechnet und so einzelne Fraktionen ausgewählt, die zur Herstellung der cDNA-Bibliotheken eingesetzt wurden. Diese Fraktionen wurden vereinigt, gefällt (2.2.5.3) und in je 10 µl TEN-Puffer aufgenommen. Darauf folgte die Ligation der cDNA (2.2.11) und die Transformation in *E. coli* (2.2.12.2).

2.2.20 cDNA-Subtraktion (*suppression subtractive hybridization*, SSH)

Die cDNA-Subtraktion verläuft in mehreren Schritten (1.4.1). Zunächst wird aus mRNA doppelsträngige cDNA hergestellt, an die dann Adapter ligiert werden. Darauf folgen zwei spezifische Amplifikationsschritte. Die amplifizierte cDNA kann dann entweder zur Hybridisierung eingesetzt werden (2.2.14.1, 2.2.15.3) oder kloniert werden (2.2.11.4).

2.2.20.1 cDNA-Synthese

Um eine ausreichend hohe Konzentration der poly (A)⁺-RNA zu erhalten, wurde diese mit Na-Acetat gefällt (2.2.5.2). Für die cDNA-Synthese von Material der Probe 00929 wurden je 1,6 µg poly (A)⁺-RNA, von der Probe 13009 wurden 1,8 µg poly (A)⁺-RNA eingesetzt. Das gesamte Experiment wurde, soweit nicht anders vermerkt, mit Reagenzien der Firma Clontech durchgeführt. Die meisten dieser Reagenzien gehörten zu dem *Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit*.

Zur Erststrangsynthese wurden 4 µl poly (A)⁺-RNA und 1 µl cDNA-Synthese Primer (5'-TTTTGTACAAGCT(T)₃₀-3'; 10 µM) gemischt, für 2 min auf 70 °C erhitzt und danach auf

Eis gestellt. Nacheinander wurden 2 µl 5 x Erststrangpuffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,5); 40 mM MgCl₂; 150 mM KCl; 5 mM DTT), 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µl DEPC-H₂O und 1 µl AMV-Reverse Transkriptase (20 units/µl) hinzugegeben und bei 42 °C für 90 min inkubiert. Um möglichst vollständige Transkripte aller Gene zu erhalten, wurde die Temperatur der reversen Transkription auf 42 °C angehoben, während 37 °C dem Temperaturoptimum des eingesetzten Enzyms entspräche. Je höher die Temperatur während dieses Schrittes liegt, desto besser wird die Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNA verhindert. Dieselbe Temperatur wurde auch für die Herstellung der Erststrang-cDNA zur RT-PCR gewählt (2.2.18.3). Die Erststrangsynthese wurde auf Eis abgestoppt und nacheinander die folgenden Reagenzien, auf Eis vorgekühlt, hinzugegeben: 48,4 µl DEPC-H₂O, 16 µl Zweitstrangpuffer (100 mM Tris-HCl (pH 7,5); 25 mM MgCl₂; 500 mM KCl; 50 mM Ammoniumsulfat; 0,75 mM β-NAD; 0,25 mg/ml BSA); 1,6 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 4 µl Zweitstrangenzymcocktail (DNA-Polymerase I, 6 units/µl; Rnase H, 0,25 units/µl; *E. coli* DNA Ligase, 1,2 units/µl). Es wurde gemischt, kurz abzentrifugiert und für 2 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Nach 2 h wurden 6 U T4-DNA Polymerase hinzupipettiert und bei 16 °C für weitere 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Glykogen/EDTA-Gemisches (0,2 M EDTA; 1 mg/ml Glykogen) abgestoppt. Die DNA wurde phenolisiert (2.2.10.4) und gefällt (2.2.5.3). Die cDNA wurde in 50 µl Millipore-H₂O aufgenommen und davon 6 µl zur Kontrolle (Kontrolle 1) abgenommen. Es schloss sich der *Rsa* I-Verdau an.

2.2.20.2 *Rsa* I-Verdau und Adapterligation

Von dem *Rsa* I-Verdau wurde je 1 µl zur Adapterligation abgenommen und in 5 µl Millipore-H₂O verdünnt. Die doppelsträngige cDNA wurde mit 15 U *Rsa* I (NEB) in dem entsprechenden Restriktionspuffer (NEB) für 90 min bei 37 °C geschnitten. Danach wurde eine weitere Kontrolle abgenommen (Kontrolle 2) und die Reaktion durch ein Glykogen/EDTA-Gemisch gestoppt. Es folgte die Phenolisierung (2.2.10.4) und Fällung (2.2.5.3) des Ansatzes. Das Sediment wurde in 5,5 µl Millipore-H₂O aufgenommen. Um die Qualität der cDNA und des *Rsa* I-Verdau zu überprüfen, wurden die Kontrollen 1 und 2 auf ein Agarosegel aufgetragen (Bild 3.1).

Da die Subtraktion in beide Richtungen vorgenommen wurde (NT und TN), gilt dies für alle hergestellten cDNAs und wurde parallel durchgeführt. Aus der Verdünnung wurden 2 µl entnommen. Dieses Aliquot wurde zur Adapter 1 (10 µM; 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3') Ligation eingesetzt, während ein zweites 2 µl Aliquot zur Adapter 2R (10 µM; 3'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3') Ligation genutzt wurde. Je 2 µl Adapter, 1 µl 10 x Ligase Puffer (NEB), 1,5 µl T4 DNA Ligase (400 units/µl;

NEB), 2 µl 25 % PEG 8000 (Sigma) und 1,5 µl Millipore-H₂O wurden zu den Reaktionen eingesetzt. Die Reaktion verlief bei 16 °C über Nacht. Nach ersten Versuchen lag die Ligationseffizienz unter 25 %. Auf einem Agarosegel ließ sich nach PCR-Amplifikation (2.2.20.3) keine Adapter-ligierten Produkte nachweisen. Durch die Zugabe von Polyethylenglykol (PEG) zum Reaktionsgemisch konnte die Ligationseffizienz gesteigert werden (Bild 3.2). Durch Makromoleküle wie PEG werden Reaktionsgemische verdichtet (*crowding effect*). Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, daß die Ligase auf ihre Substrate trifft. Dies erhöht die Ligationseffizienz um das bis zu 2000fache (Zimmerman und Harrison, 1985; Zimmerman und Pfeiffer, 1983). Die Reaktion wurde durch Zugabe des Glykogen/EDTA Gemisches abgestoppt und die Ligase 5 min bei 72 °C hitzeinaktiviert.

2.2.20.3 Kontrolle der Adapterligationseffizienz

Je 1 µl jeder adapterligierten cDNA wurde 1 : 200 verdünnt und dann gemäß dem in Tabelle 2.2 dargestellten Schema eingesetzt. Der Reaktionsmix setzte sich wie folgt zusammen: 18,5 µl Millipore-H₂O; 2,5 µl 10 x LR-Puffer (1 M Tris pH 9,3; 0,5 M Ammoniumsulfat; 0,5 M MgCl₂); 0,5 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,5 µl 19 : 1 *Taq/Pfu*-Polymerase (*Taq*-Polymerase, Roche, 5 units/µl; *Pfu*-Polymerase, Stratagene, 2,5 units/µl).

Tabelle 2.2 Pipettierschema des Adapterligationseffizienztests

Dieser PCR-Test wurde für die Ligationen beider Patienten durchgeführt. Alle Angaben sind in µl. GAPDH 5'-Primer: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; GAPDH 3'-Primer: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'.

Reaktionsgefäß	1	2	3	4
Tester NT (ligiert an Adapter1); 1 : 200 Verdünnung	1	1	-	-
Tester TN (ligiert an Adapter 2R); 1 : 200 Verdünnung	-	-	1	1
GAPDH 3' Primer (10 µM)	1	1	1	1
GAPDH 5' Primer (10 µM)	-	1	-	1
PCR Primer 1 (10 µM)	1	-	1	-
Gesamtvolumen	3	3	3	3

Die Reaktionsbedingungen für die PCR waren 5 min, 75 °C; 94 °C 30 s; dann 20 x hintereinander 94 °C, 10 s; 60 °C 30 s; 68 °C 2,5 min. Je 5 µl von jedem Ansatz wurden auf ein 2 % Agarosegel (2.2.6) aufgetragen (Bild 3.2).

2.2.20.4 Hybridisierungen

Zur Hybridisierung der adapterligierten cDNAs (Tester mit Adapter 1 und Tester mit Adapter 2R) mit den nicht-adapterligierten cDNAs (Driver) wurden jeweils 1,5 µl des Testers und Drivers und 1 µl 4 x Hybridisierungspuffer (10 min vorgewärmt bei 68 °C; Clontech) gemischt, mit einem Tropfen Mineralöl (Sigma) überschichtet und für 8 h bei 68 °C mit auf 80 °C beheiztem Deckel in einem Thermocycler inkubiert. Zur zweiten Hybridisierung wurden die beiden Tester-cDNAs mit verschiedenen Adaptern vereinigt

und frisch denaturierter Driver hinzugegeben. Die zweite Hybridisierung inkubiert für 20 h bei 68 °C im Thermocycler (Deckel 68 °C). Jeder Ansatz wurde in 50 µl Verdünnungspuffer (20 mM HEPES-HCl (pH 8,3); 50 mM NaCl; 0,2 mM EDTA) aufgenommen und für 7 min bei 68 °C inkubiert.

2.2.20.5 PCR-Amplifikation

Für die erste Amplifikation wurde von der 50 µl Verdünnung 1 µl, zusammen mit 18,5 µl Millipore-H₂O, 2,5 µl High Fidelity PCR System Puffer 2 (Roche), 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µl PCR-Primer 1 (10 µM, 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3') und 0,5 µl Expand High Fidelity PCR System (Roche) eingesetzt. Nach 5 min Inkubation bei 75 °C zur Verlängerung der Adapter wurde 25 s bei 94 °C denaturiert und dann 27 x hintereinander bei 94 °C 10 s, 62 °C 30 s, 68 °C 90 s inkubiert. Nach Abschluss der ersten PCR folgte eine zweite PCR-Runde. Das PCR-Produkt der ersten Runde wurde 1 : 10 verdünnt und 1 µl davon zur 2. Runde mit denselben Reaktionsbedingungen wie in der ersten Runde eingesetzt. Zur Amplifikation wurden nested Primer mit den folgenden Sequenzen eingesetzt: nested PCR Primer 1: 5'-TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3' und nested PCR Primer 2: 5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'. Für die cDNA des Patienten 00929 wurden nested Primer mit CAU-Resten eingesetzt (2.2.11.4; CUA-nested PCR Primer 1: 5'-CUACUACAUCUATCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3', CAU-nested PCR Primer 2: 5'-CAUCAUCAUCAUAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'). Nur die Zyklen variierten, so dass 15 x 94 °C 10 s, 62 °C 30 s, und 70 °C 90 s lang inkubiert wurde.

Nach den PCRs wurde jeweils ein Aliquot zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen und die Gelelektrophorese angeschlossen. Die amplifizierte, subtrahierte cDNA des Patienten 00929 wurde kloniert (2.2.11.4) und zwei Bibliotheken gepickt (2.2.21), die auf Membranen gedruckt wurden (2.2.21).

2.2.21 Picken und Drucken (*Spotten*) von cDNA-Bibliotheken mit dem Q-Bot Roboter

2.2.21.1 Picken einer cDNA-Bibliothek

Das Picken von Klonen einer cDNA-Bank ist ein mehrteiliges Experiment. Mindestens einen Tag vor dem Experiment wurden 22,5 x 22,5 cm große Plastikschaalen mit 200 ml LB-Amp-Agar gefüllt. Ebenso wurden 384-well Platten mit LB-amp-HMFM Medium befüllt und zum Sterilitätstest über Nacht je eine Platte bei 37 °C inkubiert. Der Rest der Agarplatten wurde bei 4 °C, die HMFM-Platten bei -80 °C gelagert. Waren die Testplatten steril, so konnten am folgenden Tag die Transformationsansätze ausplattiert werden. Pro

Agarplatte sollten 3000 Klone vorhanden sein, die, wenn eine blau/weiß Selektion vorhanden war, unter 5 % blaue Kolonien zeigten. Die Klone wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Tag des Experimentes wurde der Q-Bot Roboter (Genetix) mit 80 % EtOH gereinigt und 20 min UV bestrahlt. Die LB-Amp-HMFM Platten wurden aufgetaut, in die Roboterhalterung geschoben und die Agarplatte mit den zu pickenden Klonen in den Roboter gelegt. Die Einstellungen des Roboters wurden jeweils auf den spezifischen Versuchsaufbau angepasst.

Für die beiden Subtraktionsbibliotheken (NT (hkid2) und TN (hkid3) von 00929) wurden jeweils 9000 Klone, für die konventionellen Bibliotheken (N (hkid4) und T (hkid5) von 00929) wurden jeweils 27000 Klone gepickt. Nach dem Picken der Klone wurden die LB-Amp-HMFM Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dazu wurden sie in Frischhaltefolie gewickelt, um die Verdunstung des Mediums zu verhindern. Am folgenden Tag wurde das Wachstum der Bakterien in den Platten überprüft. Waren die Klone gleichmäßig gewachsen, konnten die Platten zum Drucken von Filtern eingesetzt werden (2.2.21.2). Gelagert wurden die mit Klonen gefüllten 384-well Platten bei -80 °C.

2.2.21.2 Herstellung von Koloniefiltern

Vorbereitend wurden für das Drucken von Koloniefiltern 22,5 x 22,5 cm große LB-Amp-Agarplatten gegossen und LB-Medium hergestellt. Für jeden zu spottendem Filter wurden zwei 22,3 x 22,3 cm große Papierquadrate (Whatman-Papier) zugeschnitten. Die Hybond N⁺ Membranen (22 x 22 cm) wurden beschriftet. Der Q-Bot Roboter wurde wie unter 2.2.21.1 beschrieben gereinigt. Auf 22,5 x 22,5 cm große Plexiglasblöcke wurden die in LB-Medium getränkten Whatman-Papierquadrate gelegt, und darauf die trockene Membran. Die Membran sollte luftblasenfrei auf gut durchfeuchtem Untergrund liegen. Die so präparierten Filter wurden in den Roboter-Innenraum gelegt und 20 min mit UV-Licht bestrahlt. Danach wurden die 384-well Platten mit den Kolonien in die Haltevorrichtung gestellt.

Die Subtraktionsbibliotheken wurden in einem 3 x 3 Muster gedruckt, während die konventionellen Bibliotheken ein 5 x 5 Muster haben (beim RZPD in Berlin gedruckt). Die fertig gedruckten Filter wurden mit Pinzetten auf die vorbereiteten Agarplatten gelegt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Auf die Inkubation folgte die Prozessierung der mit Kolonien bewachsenen Membranen. Diese wurden 4 min bei 95 °C (Dampfbad) auf mit Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) getränktem Whatman-Papier inkubiert. Dieser Schritt wurde noch einmal auf frisch getränktem Whatman-Papier wiederholt. Darauf folgte die Neutralisierung für 4 min in Neutralisierungspuffer pH 7,4 (1 M Tris-HCl, 1 M Tris Base; 1,5 M NaCl) bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Membranen 30 min bei 37 °C mit 25 mg Pronase pro Filter in 100 ml Pronasepuffer (50 mM EDTA; 100 mM NaCl; 50 mM Tris-

HCl; 1 % Sarkosyl) inkubiert. Die so behandelten Filter wurden für mindestens 2 Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die DNA bei 1200 kJ (Stratagene Crosslinker) vernetzt.

Vor dem ersten Gebrauch zur Hybridisierung wurden die Membranen einmal *gestrippt* (2.2.16), eine Kontrollhybridisierung mit einem M13u-Oligo durchgeführt (2.2.14.2, 2.2.15.4) und wieder gestrippt.

2.2.22 Herstellung von PCR-Filtern

Die UniGene Filter wurden am RZPD (Berlin) gedruckt. 31500 PCR-Produkte wurden amplifiziert (2.2.18.2). Die Produkte wurden in einem quadratischen 5 x 5 Muster auf einen 22 x 22 cm großen Filter aufgedruckt, in dessen Mitte der Kanamycin-Leitpunkt (*guide-dot*) lag. Zur Qualitätsüberprüfung wurde eine Hybridisierung mit einem Klenow markierten (2.2.14.1), aus einem Cosmid-Vektor PCR-amplifizierten Kanamycin-Fragment und eine Hybridisierung mit einem endmarkierten (2.2.14.2) M13u-Oligo durchgeführt. Nach diesen beiden Hybridisierungen sollten alle PCR-Produkte des Filters ein gleichmäßiges Signal geben. War dies nicht der Fall, so wurde der Filter nicht zu weiteren Hybridisierungen eingesetzt.

Die nierenspezifischen Filter wurden mit dem Roboter Biogrid I (BioRobotic lntd., Cambridge, UK) hergestellt. Die PCR Produkte wurden in einem 4 x 4 Muster mit Leitpunkt gedruckt. Es wurde mit 0,4 mm Durchmesser Pins gedruckt. Die 7 x 11 cm großen Membranen wurden vor dem *spotten* für 5 min in Denaturierungspuffer äquilibriert in Plastikschaalen auf 4 Lagen mit Denaturierungspuffer getränktes Whatman-Papier gelegt. Nach dem Spotten wurden die Membranen 2 x 5 min mit Denaturierungspuffer, 2 x 5 min mit Neutralisierungspuffer und 1 x 5 min in 3 x SSC inkubiert. Die Filter wurden 3 Tage getrocknet und die DNA kreuzvernetzt (Crosslinker Stratagene, 1200 kJ). Zur Qualitätsprüfung wurden die gleichen Hybridisierungen wie für die UniGene-Filter durchgeführt.

2.2.23 Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Plasmiden wurde jeweils 1 µg DNA eingesetzt. Die Reaktion wurde mit *Big dye* Terminatoren (PE Applied Biosystems) oder mit ET-Terminatoren der Firma Amersham durchgeführt. Die DNA wurde mit 10 pmol eines Primers und Terminatoren-Mix angesetzt und 25 x je 95 °C 15 s, 55 °C 15 s und 60 °C 4 min inkubiert (Thermocycler, MJ Research). Nach der Reaktion wurden die Produkte gefällt (2.2.5.2), um nicht-inkorporierte Terminatoren abzutrennen. Darauf folgte die Analyse über automatische Sequenzierer (ABI 377).

2.2.24 Sequenz-Analyse

Die Analyse der Sequenzen erfolgte auf verschiedenen Ebenen. Die direkte Analyse, Assemblierung und Editierung der Sequenzen wurde mit dem Programm gap4 des Staden Packages (Bonfield *et al.*, 1995; Staden *et al.*, 2000) durchgeführt. Das Programm PRIDE (Haas *et al.*, 1998) wurde zur Auswahl von Primern eingesetzt.

Datenbankabgleiche der Nucleinsäuresequenzen wurden gegen die Genbank und gegen die Swissprot Datenbank durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Zur näheren Analyse von offenen Leserahmen und Lage einzelner EST-Klone der UniGene Consensus Sequenzen wurde das Programm GeneNest (Haas *et al.*, 2000) und die GeneCards-Datenbank (<http://herkules.inet.dkfz-heidelberg.de/GeneCards/>) eingesetzt.

Des weiteren wurden Programme des HUSAR-Paketes (*Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources*) genutzt. Zu diesem Programmen gehört auch Clustal, mit dem verschiedene Aminosäuresequenzen aligniert wurden.

3 Ergebnisse

Zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene im klarzelligen Nierenkarzinom wurden zwei molekularbiologische Expressionsanalysemethoden eingesetzt. Die cDNA-Subtraktion konzentrierte sich auf die Gene, deren Expression in zwei verschiedenen physiologischen Zuständen nur schwach unterschiedlich ist bzw. so gering ist, dass sie bei anderen experimentellen Ansätzen unter der Detektionsgrenze liegt. Das Ziel lag in der Identifizierung neuer Gene. Dagegen ermöglichte die komplexe Hybridisierung auf einem Set bekannter Gene den vergleichenden Blick auf biochemische Zusammenhänge zweier oder mehrerer Proben.

Um eine möglichst hohe Qualität der erstellten Subtraktions-Bibliotheken zu gewährleisten, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. Dasselbe galt für alle anderen cDNA-Bibliotheken. Auf die Qualitätskontrolle folgten die Analysen der Bibliotheken mit Hilfe molekularbiologischer Methoden. Durch komplexe Hybridisierungen wurde der Expressionsgrad vieler Gene gleichzeitig ermittelt, während durch die Methoden der RT-PCR und Northern Blot Analyse exemplarisch einzelne Gene und deren Verhalten im klarzelligen Nierenkarzinom beschrieben wurden.

3.1 cDNA-Subtraktion (*suppression subtractive hybridization, SSH*)

Bei der cDNA-Subtraktion handelt es sich um eine Folge von Experimenten, an deren Ende für einen physiologischen Zustand, z.B. Tumor- oder Normalgewebe, angereicherte cDNA steht. Diese cDNA ermöglichte die Identifizierung und Untersuchung schwach exprimierter Gene des klarzelligen Nierenzellkarzinom- und Nierengewebes eines Patienten. Die Beurteilung des Gesamtexperimentes konnte erst am Ende der Versuchsreihe durch die Analyse der Anreicherungs- bzw. Subtraktionseffizienz festgestellt werden.

Für den Erfolg der cDNA-Subtraktion war die Hybridisierung der beiden abzugleichenden cDNA-Gemische entscheidend. Eine gute Normalisierung der beiden zu vergleichenden cDNAs war die Voraussetzung für die weiteren Anreicherungs-schritte.

Das Experiment wurde mit RNA aus Geweben zweier Patienten verschiedener Stadien des klarzelligen Nierenkarzinoms durchgeführt, Stadium III b (Patient 00929) und Stadium IV (Patient 13009). Die Tumoren ließen sich beide dem Differenzierungsgrad G2 zuordnen. Mit Material des Patienten 00929 wurde die erste Subtraktion durchgeführt. Von diesem Material wurde eine cDNA-Bibliothek kloniert, die folgend genau untersucht wurde (3.3 und 3.4). Anders verhielt es sich mit der Subtraktion des 13009 Materials.

Nach der Qualitätskontrolle wurde dieses Material zu Hybridisierungen eingesetzt (3.3.4), nicht jedoch kloniert.

Zur Identifizierung stadienspezifisch differenziell exprimierter Gene ist eine genaue Einordnung der Tumoren aufgrund des histologischen Befundes hilfreich. Eine andere Möglichkeit der Einordnung des Tumormaterials ist die zytogenetische Charakterisierung (1.2.2). Es ist möglich, dass die Expression der Gene in den verschiedenen Tumorstadien differiert oder sich im zytogenetischen Profil unterscheidet.

3.1.1 System der SSH und Optimierungsansätze

Als Ausgangsmaterial wurde poly (A)⁺ RNA eingesetzt, deren Qualität zuvor mit einem Northern Blot überprüft wurde (2.2.13.2., 2.2.15.2). Die Herstellung der cDNA erfolgte wie im Methodenteil (2.2.20.1) beschrieben. Diese cDNA bildete das Ausgangsmaterial für alle weiteren Arbeitsschritte.

Um einen optimalen Verlauf der Subtraktion zu gewährleisten, musste das Ausgangsmaterial, in diesem Fall doppelsträngige cDNA, auf einem Agarosegel qualitätsüberprüft werden. Migrierten die cDNA Fraktionen als *Schmier* bis in große Basenpaarfragmentlängen (ca. 8-10 kb), waren sie zur weiteren Verarbeitung geeignet.

Zwei Hybridisierungsschritte waren entscheidend für das Gelingen der Subtraktion. Zu dieser Hybridisierung wurde jedoch nicht ein *volle Länge* cDNA-Gemisch eingesetzt, sondern *Rsal* Fragmente der cDNAs. Da das Restriktionsenzym *Rsal* ein 4-*cutter* Enzym ist, ergab sich nach dem Verdau eine durchschnittliche Fragmentlänge von 256 bp.

Das gesamte cDNA-Gemisch wurde mit dem Enzym verdaut und zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen, auf welchem die geschnittene cDNA deutlich als kleinere Fragmente von der ungeschnittenen zu unterscheiden war (Bild 3.1). Es wurde weiterhin eine unterschiedliche Menge an cDNA auf dem Gel detektiert (Bild 3.1; Bahn 1 und 2, verglichen mit Bahn 3 und 4, verglichen mit Bahn 5 und 6). Ausgehend von gleichen poly (A)⁺ RNA-Mengen wurden gleiche cDNA-Mengen erwartet. Da dies nicht der Fall war, wurde die Einsatzmenge zur Hybridisierungsreaktion entsprechend verändert, um eine gleiche Ausgangskonzentration an cDNA zu erhalten.

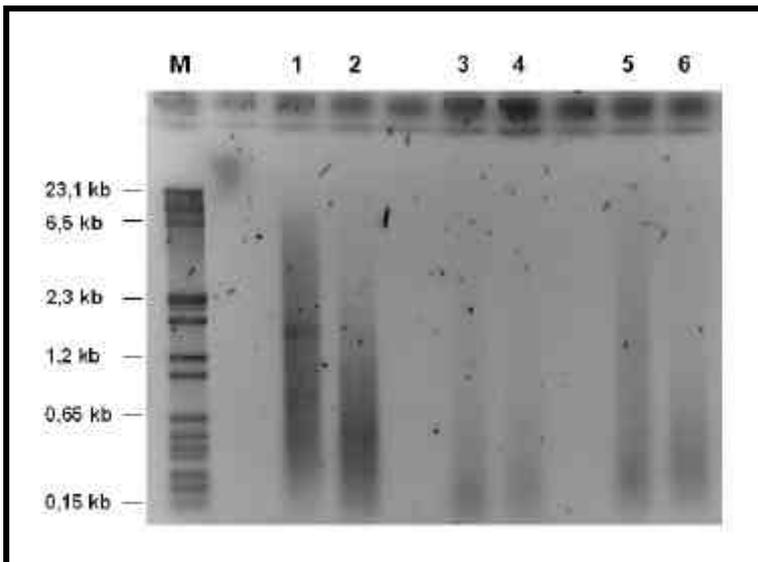


Bild 3.1 Qualitätskontrolle der Zweitstrang-cDNA nach *Rsa* I-Verdau

Bahn M: Längenstandard: Roche Marker II und VI

Bahn1: Zweitstrang cDNA unverdaut von Skelettmuskel Kontroll-poly (A)⁺ RNA

Bahn2: Zweitstrang cDNA *Rsa* I verdaut von Skelettmuskel Kontroll-poly (A)⁺ RNA

Bahn3: Zweitstrang cDNA unverdaut von Nierencortex-poly (A)⁺ RNA des Patienten 00929

Bahn4: Zweitstrang cDNA *Rsa* I verdaut von Nierencortex-poly (A)⁺ RNA des Patienten 00929

Bahn5: Zweitstrang cDNA unverdaut von RCCC-poly (A)⁺ RNA des Patienten 00929

Bahn6: Zweitstrang cDNA *Rsa* I verdaut von RCCC-poly (A)⁺ RNA des Patienten 00929

3.1.2 Adapterligation

Für jeden Patienten wurden zwei subtrahierte Bibliotheken erstellt. Dies bedeutete, dass in einem Fall die cDNA aus Normalgewebe die Referenzmenge (Driver) und die cDNA aus Tumormaterial die Anreicherungsmenge (Tester) darstellt. In dem zweiten Fall lag die Tester/Driver Zuordnung genau umgekehrt vor (Abb. Einleitung). Für die folgenden Schritte war es wichtig, eine effiziente Adapterligation an die Anreicherungsmenge zu ermöglichen, da zur PCR-Anreicherung adapterkomplementäre Primer eingesetzt wurden. Eine ineffiziente Adapterligation hätte die folgenden Amplifikationsschritte beeinträchtigt und damit das Experiment uneffektiv werden lassen.

An die durch das Enzym *Rsa* I *blunt-end* geschnittene cDNA wurden Adapter ligiert. Da die vollständige Adapterligation der sehr geringen Menge cDNA nach den Angaben im Protokoll des Herstellers nicht gelang, wurde dem Reaktionsgemisch PEG 8000 hinzugesetzt und die Konzentration an Adaptern erhöht. Die Effizienz der Adapterligation wurde durch eine adapterspezifische PCR überprüft. In Bild 3.2 ist in den Bahnen 1, 3, 5 und 7 das Produkt der PCR mit für Adapter 1 und 2 spezifischen Primern und einem GAPDH-spezifischen Primer dargestellt, während in Bahn 2, 4, 6 und 8 nur GAPDH-spezifische Primer eingesetzt wurden. Das PCR-Produkt der GAPDH-Primer allein repräsentiert alle GAPDH-Moleküle im Reaktionsgemisch, dagegen die Adapter/GAPDH-PCRs nur die Moleküle mit ligiertem Adapter. Aus dem Vergleich der Bandenstärke lassen sich damit Rückschlüsse auf die Effizienz der Adapterligation ziehen. Die Intensität

ERGEBNISSE

der Adapter/GAPDH PCR-Banden sollte nicht geringer als 25 % bezogen auf die GAPDH-PCR-Banden sein. Dieses Ziel ist nach der oben beschriebenen Optimierung erreicht worden.

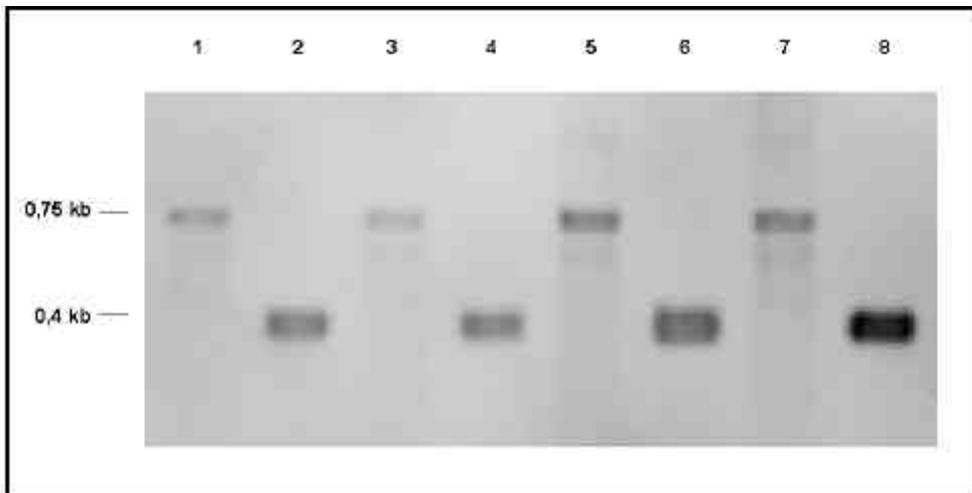


Bild 3.2 Ergebnisse Kontroll-PCR nach Adapterligation

Es wurden jeweils 5 µl PCR-Produkt auf das 2 % TAE-Agarosegel aufgetragen.

Bahn1: aus normalem Nierengewebe des Patienten 13009 (Adapter 1 ligiert) mit PCR-primer 1 und GAPDH 3'-Primer

Bahn2: aus normalem Nierengewebe des Patienten 13009 (Adapter 1 ligiert) mit GAPDH 3' und 5'-Primern

Bahn3: aus normalem Nierengewebe des Patienten 13009 (Adapter 2 ligiert) mit PCR-primer 1 und GAPDH 3'-Primer

Bahn4: aus normalem Nierengewebe des Patienten 13009 (Adapter 2 ligiert) mit GAPDH 3' und 5'-Primern

Bahn5: aus dem RCCC (Tumor) des Patienten 13009 (Adapter 1 ligiert) mit PCR-primer 1 und GAPDH 3'-Primer

Bahn6: aus dem RCCC (Tumor) des Patienten 13009 (Adapter 1 ligiert) mit GAPDH 3' und 5'-Primern

Bahn7: aus dem RCCC (Tumor) des Patienten 13009 (Adapter 2 ligiert) mit PCR-primer 1 und GAPDH 3'-Primer

Bahn8: aus dem RCCC (Tumor) des Patienten 13009 (Adapter 2 ligiert) mit GAPDH 3' und 5'-Primern

Vor der Änderung des Protokolls und der Zugabe von PEG 8000 wurden in diesem Experiment keine Banden der Adapter/GAPDH-PCR detektiert.

3.1.3 Hybridisierung

Während der Hybridisierung der Tester- mit der Driverfraktion wurde in einem ersten Schritt die Konzentration von stark exprimierten (*hochabundanten*) und schwach exprimierten (*niedrigabundanten*) Transkripte aneinander angeglichen, da aufgrund der Reaktionskinetik zweiter Ordnung die Neuanlagerung für häufig vorkommende einzelsträngige DNA-Moleküle zu einem doppelsträngigen Molekül schneller ist als für selten vorkommende Moleküle. Im zweiten Hybridisierungsschritt lagerten sich dann vor allem die subtrahierten und normalisierten cDNAs aneinander an. Ein neuer Typ von Molekül entstand, der nach erneuter Zugabe der Driver cDNA vor allem durch differenziell exprimierter Gene repräsentiert wird (Bild 1.2).

Ein zweiter wichtiger Aspekt dieses Experimentes war die Anreicherung differenziell exprimierte Gene. In den folgenden PCR-Schritten wurden testerspezifisch Genfragmente angereichert. In der ersten PCR-Reaktion wurden Moleküle exponentiell amplifiziert, die zwei verschiedene Adapter besitzen. Es handelte sich um die normalisierten, differenziell exprimierten Gene. In einem zweiten Schritt wurde das Reaktionsgemisch der ersten PCR

mit *nested* Primern erneut amplifiziert, um unspezifische Amplifikate der ersten PCR zu unterdrücken und differenziell exprimierte Sequenzen anzureichern. Um den Erfolg der Anreicherung zu bestätigen, wurde das Subtraktionsgemisch mit einer PCR basierten Methode untersucht. Durch genspezifische Southern Blot Analyse konnte sowohl eine Anreicherung als auch eine Subtraktion nachgewiesen werden.

3.1.4 Anreicherungs- bzw. Subtraktionskontrollen

Zur Analyse der Subtraktion gab es verschiedene Möglichkeiten. In der PCR-basierten Methode lässt sich der Grad der Anreicherung oder Subtraktion durch das Auftreten von Banden eines Haushaltsgens, z.B. GAPDH, in einer in fünf Schritten aufsteigenden Anzahl von PCR-Zyklen zeigen.

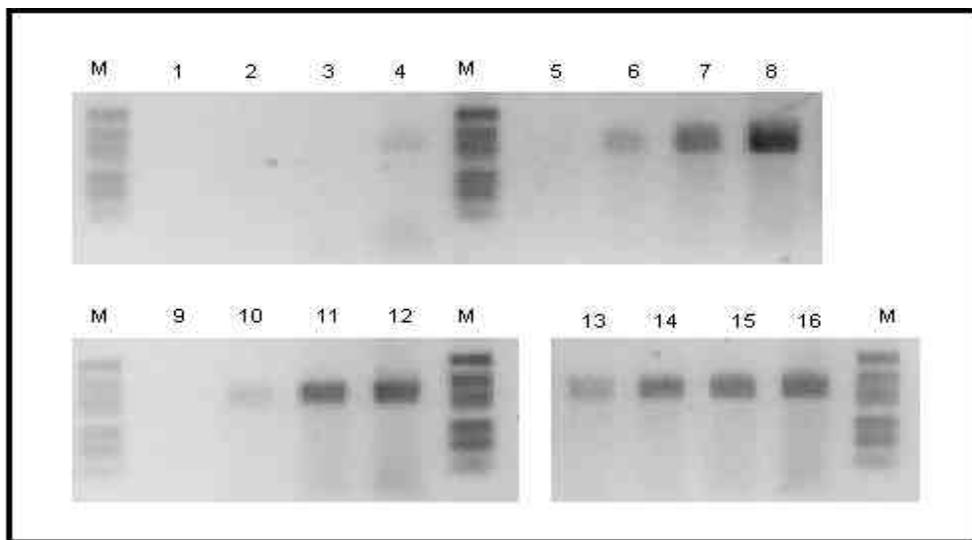


Bild 3.3 Abnahme der GAPDH-Häufigkeit in subtrahierten cDNAs des Patienten 00929

Jeweils 5 µl der PCR-Produkte wurden auf ein 2 % TAE Agarosegel aufgetragen. Bahn 1-4: NT-Subtraktionsprodukt; Bahn 5-8: N Kontrolle; Bahn 9-12: TN-Subtraktionsprodukt; Bahn 13-16: T Kontrolle; Produkt nach 18 Zyklen: Bahnen 1, 5, 9, 13; Produkt nach 23 Zyklen: Bahnen 2, 6, 10, 14; Produkt nach 28 Zyklen: Bahnen 3, 7, 11, 15; Produkt nach 28 Zyklen: Bahnen 4, 8, 12, 16. M ist der Marker VI von Roche.

In Bild 3.3 zeigt sich ein verzögertes Auftreten von PCR-Produkten der subtrahierten cDNAs (Bahnen 1 bis 4 und 9 bis 12) im Vergleich zu den Kontrollen (Bahnen 5 bis 8 und 13 bis 16), was auf eine starke Verringerung der häufig vorkommenden Transkripte wie GAPDH rückschließen lässt. Damit wurde gezeigt, dass der Normalisierungsschritt erfolgreich war.

Eine andere Möglichkeit der Subtraktions- bzw. Anreicherungskontrolle bot der Southern-Blot. Aufgetragen wurden die sekundären PCR-Produkte der subtrahierten und der Kontroll-cDNAs. Als Hybridisierungsproben dienten zum einen Gene, deren Expression in beiden cDNAs gleich ist, zum Test der Subtraktionseffizienz, zum anderen Gene, deren differenzielle Expression für die eine oder andere cDNA bekannt ist. Dieses Experiment wurde mit zwei verschiedenen Genen durchgeführt, mit β -Actin als konstant bleibendes

ERGEBNISSE

Gen, mit VEGF, einem Gen, welches im RCCC hochreguliert ist und deshalb in der Tumor-minus-Normal-cDNA (TN-cDNA) angereichert ist. Der Nachweis auf dem Southern-Blot zeigte eine Anreicherung des Gens VEGF und eine Subtraktion bzw. Verringerung der cDNA des Gens β -Actin. Das auf dem Southern Blot detektierte cDNA-Gemisch wurde vor der Subtraktion mit dem Restriktionsenzym *RsaI* verdaut. Aus diesem Grund sind verschieden große Banden auf dem Southern-Blot nachgewiesen worden. Sie repräsentieren unterschiedliche *RsaI* Fragmente desselben Transkriptes, wie über einen virtuellen Verdau überprüft wurde.

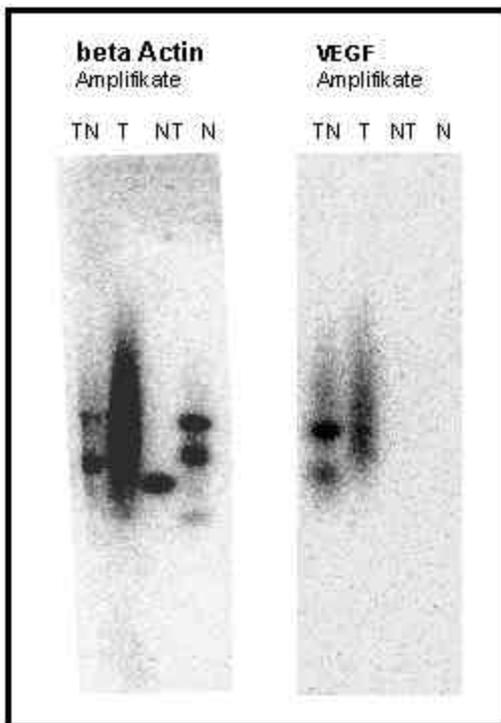


Bild 3.4 Kontrolle der Subtraktion und Amplifikation

PCR-Amplifikate der folgenden cDNAs des Patienten 00929.

Es wurden jeweils 200 ng PCR-Produkt auf ein 1%TAE-Agarosegel aufgetragen und geblotet. Mit genspezifischen Sonden, die durch random Hexamer Markierung radioaktiv gekennzeichnet wurden, wurde hybridisiert. Als Kontrolle diente nicht subtrahierte cDNA, an die Adapter ligiert wurden.

TN: Tumor minus Normal subtrahiert; T: Tumor Kontrolle; NT: Normal minus Tumor subtrahiert; N: Normal Kontrolle

Die Auswertung ergab eine 1,5fache Anreicherung des VEGF PCR-Produktes, während bei den Subtraktionsprodukten von β -Actin in beiden Fällen, TN (Tumor minus Normal Subtraktion) und NT (Normal minus Tumor Subtraktion), ein Faktor von 4,6 erreicht wurde. Mit diesem Ergebnis war sicher, dass die Subtraktion und die Anreicherung erfolgreich verliefen und mit dem erzeugten Material weitergearbeitet werden konnte.

3.2 Analyse der Subtraktionsbibliothek durch Sequenzierung

Als eine Möglichkeit, die Subtraktionsbibliotheken näher zu beschreiben, wurden 123 Klone der Fraktion TN des Patienten 00929 sequenziert. Diese sequenzierten Klone hatten eine durchschnittliche Länge von 200 bp, was etwas unter der erwarteten Länge von 256 bp lag. Durch einen Abgleich der Sequenzen mit den Programmen BlastN2 und BlastX gegen verschiedene Datenbanken, wie Swissprot, UniGene und Genbank wurden die Sequenzhomologien bestimmt. Alle identifizierten Gene wurden in Tabelle 7.4 des Anhangs zusammengestellt (n=100). Eine Einordnung der einzelnen Gene in funktionelle Klassen bzw. eine Ordnung nach ihrer Lokalisation führte zu folgender Übersicht:

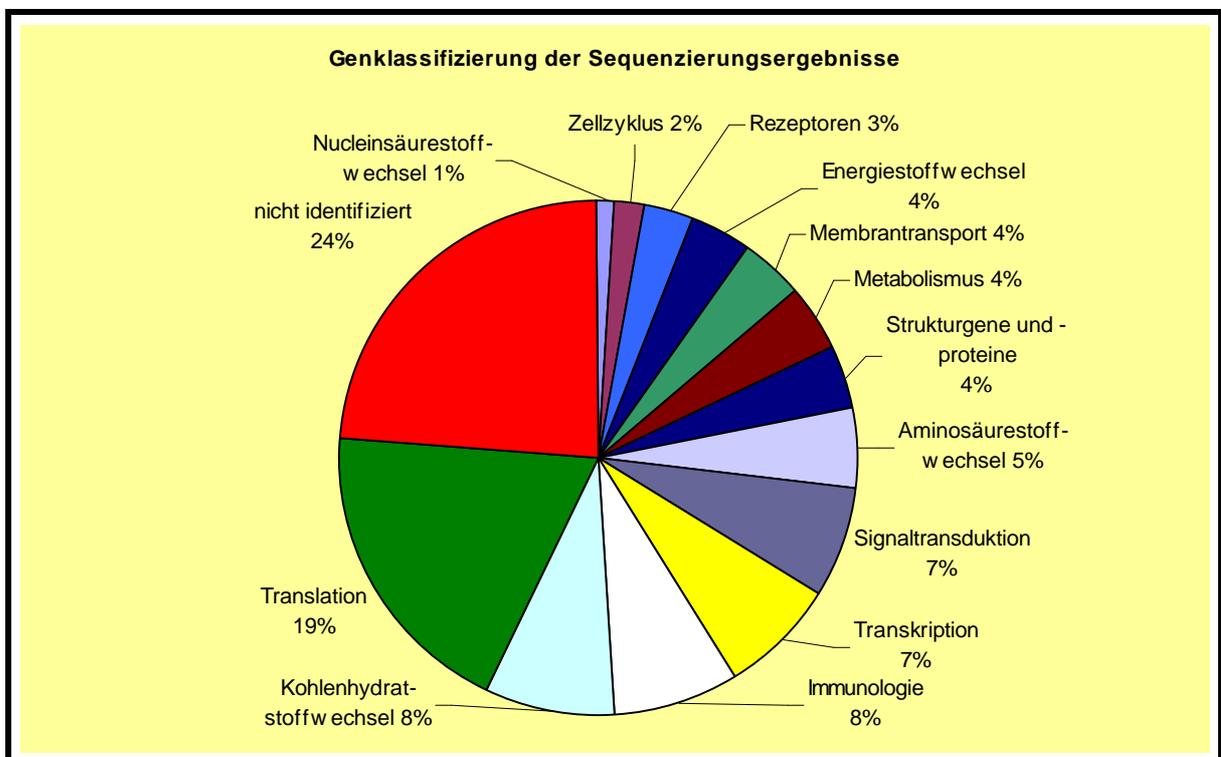


Bild 3.5 Zusammenfassung der Sequenzierungsergebnisse der TN-Subtraktion des Patienten 00929 (n=100)

Bei Auswertung der Sequenzen fanden sich viele Gene, die als differenziell exprimiert in verschiedenen Krebsarten beschrieben sind, sowie eine große Anzahl nicht charakterisierter ESTs (Bild 3.5). Hohe prozentuale Anteile hatten auch die Kategorien *Translation* und *nicht identifiziert*. Die zweite Kategorie ergab sich aus den verschiedenen ESTs, von denen keine oder nur schwache Homologien bekannt sind. Die erste Kategorie der *Translation* setzte sich vor allem aus ribosomalen Genen zusammen. Besonders interessant waren die noch nicht charakterisierten Gene (EST). Aus diesen wurde eine

Auswahl für weitere Analysen getroffen, mit dem Ziel, potenzielle neue Tumormarker zu isolieren (3.7).

3.3 Analyse der Subtraktionen auf Koloniefiltern

Die Sequenzierung stellte eine Methode dar, die lediglich die Analyse eines kleinen Teils der Bibliotheken erlaubte und damit nur einige Klone der TN-Subtraktionsbibliothek zu einer genaueren Analyse brachte. Um eine umfassendere Möglichkeit der Analyse der Subtraktionsbibliotheken zu erhalten, wurden die klonierten Subtraktionsbibliotheken als Kolonien auf Nylonmembranen aufgebracht. Ein zielgerichteter Ansatz war die Hybridisierung komplexer Proben sowie subtrahierter cDNAs auf diese Koloniefilter. Nur die Klone, die nach den Hybridisierungen ein positives Signal zeigten, wurden anschließend sequenziert. Dieser Ansatz führte zu einer erheblichen Reduktion des Sequenzierungsaufwandes.

3.3.1 Herstellung von Koloniefiltern der Subtraktionsbibliotheken

Aus den Subtraktionsbibliotheken NT (Normal- minus Tumor-cDNA) und TN (Tumor- minus Normal-cDNA) des Patienten 00929 wurden Koloniefilter hergestellt (2.2.21.2). Jede 22 cm x 22 cm große Nylonmembran umfasste 9000 Klone einer Subtraktionsbibliothek, so dass zwei verschiedene Filtertypen vorlagen. Filtertyp 1 trug die TN-Subtraktionsbibliothek, während Filtertyp 2 NT-cDNA-Klone trug. Jeder Klon wurde im Duplikat gedruckt (*gespottet*), um echte Signale von zufälligen Reaktionen oder Verschmutzungen auf dem Filter leicht unterscheiden zu können (Bild 3.6).

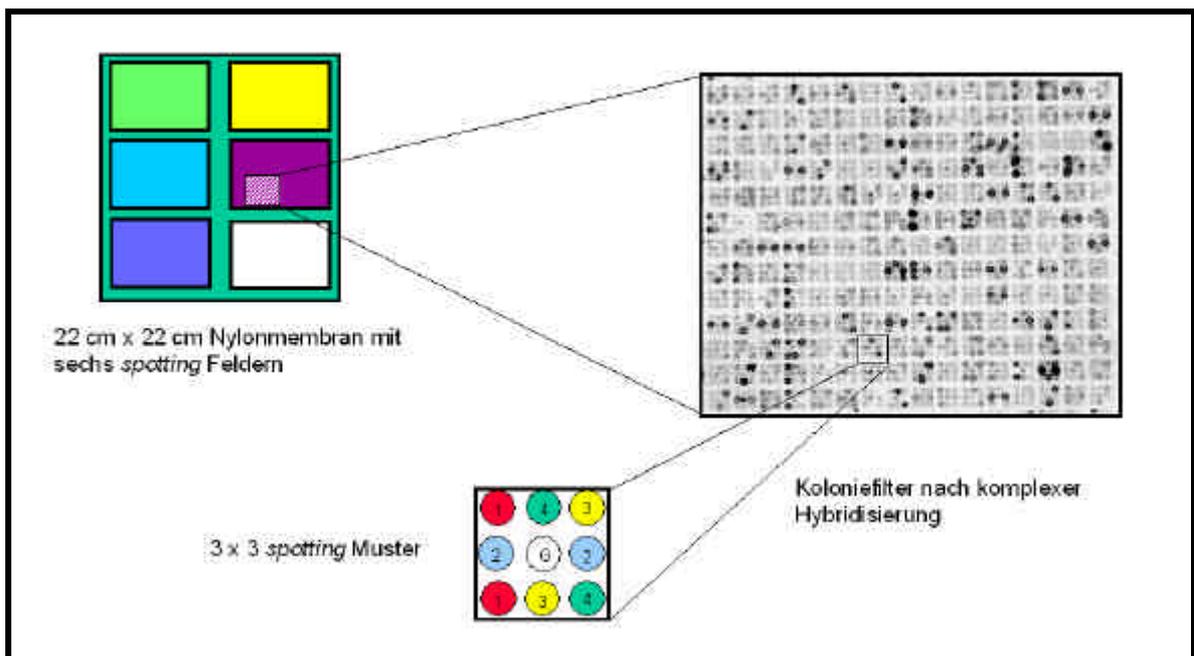


Bild 3.6 Schematische Darstellung des Aufbaus eines Koloniefilters

In Bild 3.6 wurde schematisch das Druckmuster im 3 x 3 Format dargestellt. Die Duplikatkclone liegen auf den Filtern nicht in direkter Nachbarschaft, sondern in einem festen Muster vor, hier durch verschiedene Farben gekennzeichnet. Dieser unregelmäßige Aufbau ermöglicht eine leichte Auswertung ohne ein Verrutschen des Druckmusters. Die so hergestellten Filter wurden vor der ersten komplexen Hybridisierung durch die Hybridisierung eines radioaktiv markierten M13u Primers qualitätskontrolliert. Die Sequenz dieses Primers kam in allen gespotteten Klonen in der multiplen Klonierungsstelle vor, so dass alle Klone auf dem Filter nach der Hybridisierung ein radioaktives Signal zeigen sollten. Dies war der Fall und deshalb wurde mit den Filtern weiter gearbeitet (3.3.3 und 3.3.4).

3.3.2 Herstellung einer konventionellen cDNA-Bank und zugehöriger Koloniefilter

Die Methode der SSH erzeugte cDNA-Produkte mit einer durchschnittlichen Länge von 200 bp. Mit dem Ziel, vor allem neue Gene zu identifizieren und diese auch als Transkripte voller Länge zu erhalten, ergaben sich mit der oben genannten Durchschnittslänge Schwierigkeiten. Um eine Ressource an längeren Transkripten desselben zuvor schon zur Subtraktion eingesetzten Tumors zu erhalten, wurde aus Material des Patienten 00929 eine Oligo-dT geprimte cDNA-Bank hergestellt. Durch Restriktionsanalyse von 96 Klonen dieser Bibliothek wurde eine durchschnittliche Fragmentgröße von 1,5 kb bestimmt.

Von dieser Bibliothek wurden 27000 Klone in einem 5 x 5 Muster auf 22 cm x 22 cm große Membranen gedruckt. Das Bedrucken der Filter mit den Klonen wurde vom RZPD in Berlin durchgeführt (<http://www.rzpd.de>). Für die weitere Analyse standen diese Klone und Filter zur Verfügung (cDNA-Bank: DKFZp435).

3.3.3 Analyse der Subtraktionen durch komplexe Hybridisierung auf Koloniefilter

Der nächste Schritt im Rahmen der Analyse der Subtraktionsbibliotheken war die Identifizierung der durch Subtraktion angereicherten Klone auf den entsprechenden Koloniefiltern. Dazu wurde radioaktiv revers-transkribierte cDNA aus Tumor- und Normalgewebe desselben Patienten 00929 auf beide Filtertypen 1 und 2 komplex hybridisiert. Der Grad der Expression ließ sich durch die Intensität des radioaktiven Signals auf dem Filter ablesen. Es wurden zwei Hybridisierungen durch das Übereinanderlegen der eingelesenen Hybridisierungsbilder verglichen. Die Positionen, die auf nur einem Filter positiv erschienen sowie die, die auf einem Filter eine stärkere Schwärzung aufwiesen als auf dem Referenzfilter, wurden aus den entsprechenden

Bibliotheken ausgewählt und sequenziert. Insgesamt wurden 254 Klone mit stärkeren Signalen auf dem Filter TN des Patienten 00929 identifiziert (Tabelle 7.5 und Bild 3.7).

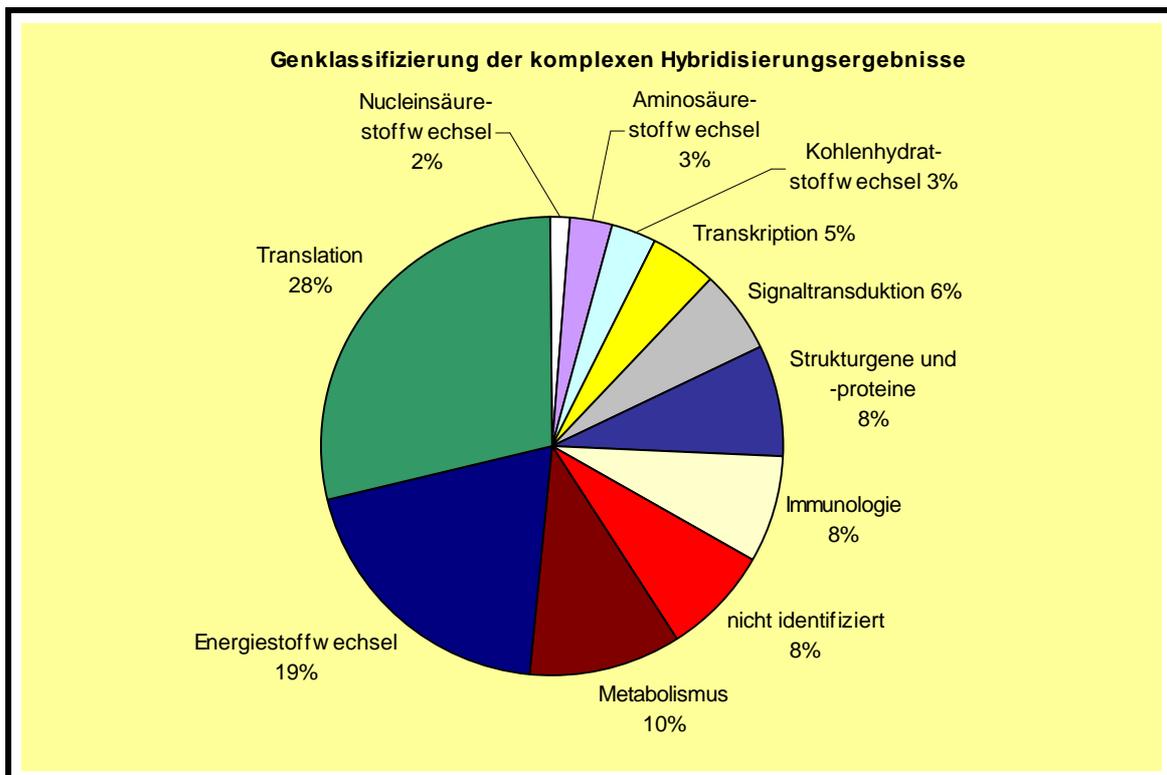


Bild 3.7 Genklassifizierung der komplexen Hybridisierungsergebnisse auf TN-Koloniefiltern (n=66)

Darstellung der identifizierten Gene als Genklassen. Die Häufigkeit des Auftretens eines Gens wurde nicht berücksichtigt, sondern nur die Genverteilung.

Ausgewertet wurden hier die Ergebnisse der komplexen Hybridisierungen auf die selbst hergestellten Koloniefilter der TN-Subtraktionsbibliothek. Auf diesen Filtern wurden spezifisch für das Tumorgewebe angereicherte Gene immobilisiert. Nach der komplexen Hybridisierung auf diese Filter wurden vor allem Gene erwartet, deren Expression höher im Tumor-, als im Normalgewebe war. Auf solche tumorspezifischen Gene wurde zuvor zweifach selektiert, erstens durch die cDNA-Subtraktion und zweitens durch die folgende komplexe Hybridisierung auf eine Auswahl der subtrahierten cDNA-Klone.

Ebenso wie in der Tabelle der zufällig sequenzierten Klone wurden viele Gene kodierend für ribosomale Proteine gefunden, die in dem Diagramm unter der Rubrik *Translation* zusammengefasst wurden. Auffallend ist weiterhin der große Anteil an mitochondrialen Genen, die sich dem *Energiestoffwechsel* zuordnen lassen. Einzelne Gene aus dieser Liste wurden zuvor schon als molekulare Marker für das klarzellige Nierenkarzinom vorgeschlagen, so zum Beispiel das Gen Clusterin (Parczyk *et al.*, 1994).

3.3.4 Analyse der Subtraktionen durch Hybridisierung der Subtraktionen auf Koloniefilter

Nach der komplexen Hybridisierung auf die Subtraktions-Koloniefilter erfolgte die Rückhybridisierung der subtrahierten cDNAs auf diese Koloniefilter. Da die subtrahierten cDNAs in der Probe ebenfalls auf den Nylonmembranen immobilisiert vorlagen und alle cDNAs dieselben Adapter trugen, mussten die Adapter von den als Probe verwendeten cDNAs abgetrennt werden, um Kreuzhybridisierungen zu vermeiden. Die Abtrennung erfolgte durch drei aufeinanderfolgende Restriktionsverdau. Um die freien Adapter und deren Bruchstücke aus dem cDNA-Gemisch zu entfernen, wurde eine Auftrennung über ein Agarosegel vorgenommen und die cDNA-Fraktion aus diesem ausgeschnitten. Die freien Adapter verblieben im Gel. Anschließend folgte die Elektroelution der cDNA-Fragmente aus dem Gelstück (2.2.10.2.). Kleine Nucleinsäurefragmente wurden hier noch einmal durch Filtration abgetrennt und nur Fragmente ab einer Größe von 200 bp eluiert. Diese wurden aneinander ligiert und durch die enzymatische Reaktion des Klenow-Fragmentes radioaktiv markiert und danach hybridisiert. Da es sich um ein weniger komplexes Gemisch handelte als bei der reversen Transkription der kompletten, nicht subtrahierten cDNA, wurden wesentlich weniger positiv reagierende Klone erwartet.

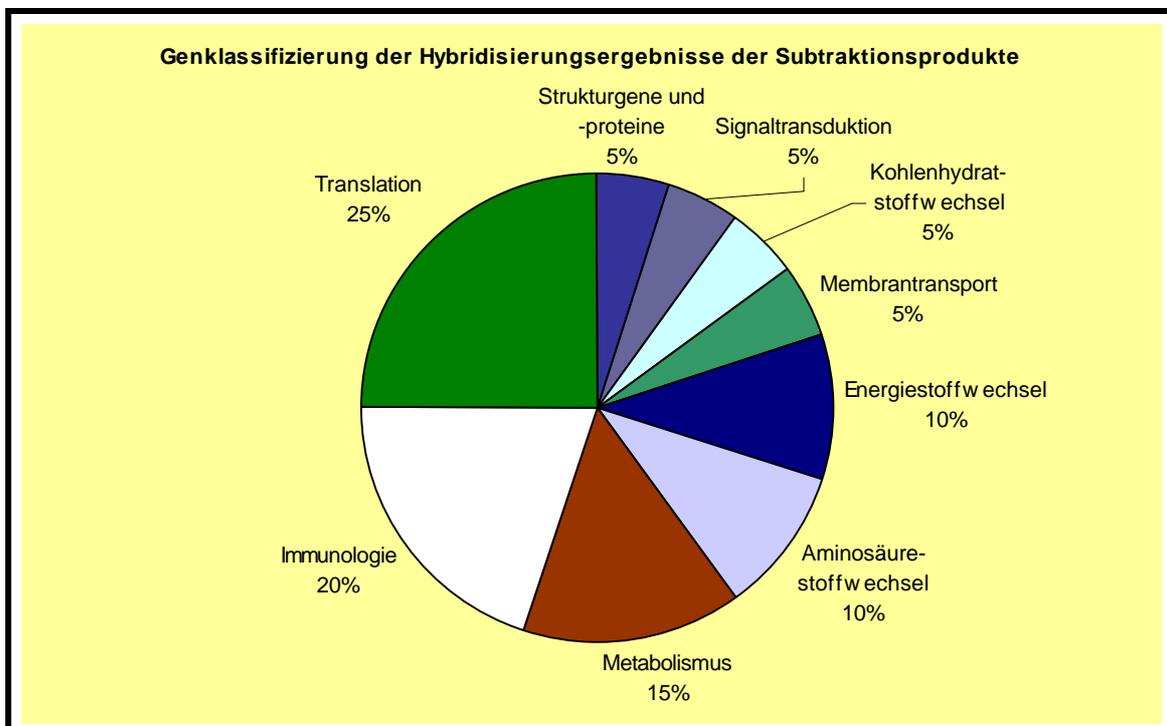


Bild 3.8 Genklassifizierung der Ergebnisse der Hybridisierung von Subtraktionsprodukten auf TN Koloniefilter (n=21)

Diese Erwartung wurde, wie in Tabelle 7.6 und Bild 3.8 zu sehen erfüllt. Es zeigten sich wieder Überlappungen mit den vorhergehenden Tabellen (Tabelle 7.4, Tabelle 7.5) z.B. durch das Gen β_2 -Microglobulin sowie Gene, die zuvor nicht auftraten. Dazu gehört eine Epoxid Hydrolase.

3.4 Nachweis potenzieller Tumormarker durch RT-PCR

Eine Auswahl von Genen der Sequenzierung und Hybridisierungsexperimente (3.2, 3.3) wurde weitergehend, z. B. durch RT-PCR und Northern Blot Analyse (3.7), untersucht. Der Schwerpunkt lag vor allem auf den nicht charakterisierten ESTs, da es sich bei diesen um potenzielle neue molekulare Tumormarker handelte. Es wurden auch Gene betrachtet, die schon zuvor als Tumormarker beschrieben waren, bzw. in der Subtraktionsbibliothek auftraten, jedoch nicht bekannt im Zusammenhang mit dem klarzelligen Nierenzellkarzinom waren.

Von den durch Hybridisierungsexperimente identifizierten Genen wurden 65 durch semiquantitative RT-PCR untersucht. Mit der RT-PCR wurde ein hybridisierungsunabhängige Methode zur Bestätigung der erzielten Resultate gewählt. Ein weiteres Charakteristikum der RT-PCR war die hohe Sensitivität dieser PCR-basierten Methode im Vergleich zu anderen klassischen Expressionsanalysemethoden wie dem Northern Blot. Somit war gewährleistet, dass keine Information durch zu geringe Sensitivität der Nachweismethode verloren ging. Dies ist besonders wichtig, da durch die Methode der Subtraktion schwach differenziell exprimierte Gene isoliert werden sollten.

Die Auswahl der Gene zur PCR ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Sie ergaben sich aus den vorhergehenden Experimenten. Besonders interessant erschien die Untersuchung der durch *random* Sequenzierung identifizierten ESTs, die noch keine genaue Genbeschreibung hatten. Die folgende Übersicht in Bild 3.9 zeigt die funktionelle Gliederung der einzelnen untersuchten Gene.

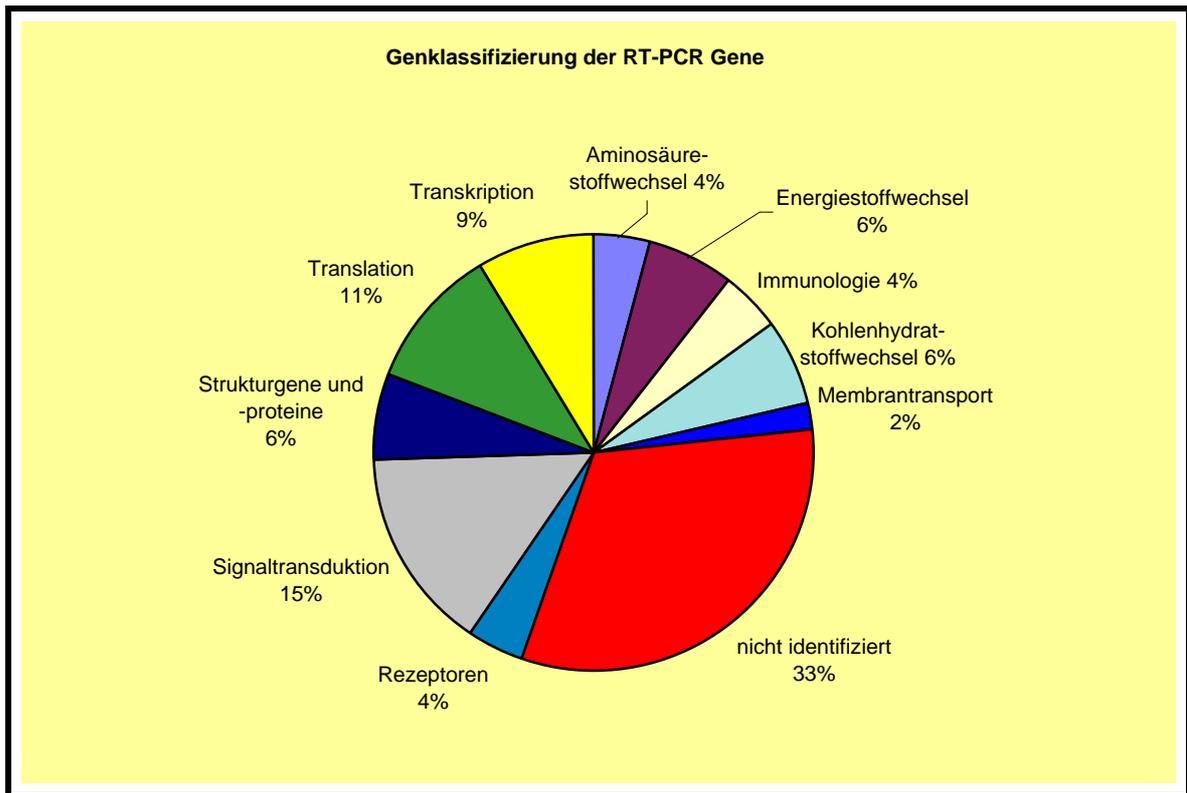


Bild 3.9 Klassifizierung der durch die RT-PCR untersuchten Gene (n=49)

Zur RT-PCR wurde total RNA von drei Patienten verschiedener Stadien revers transkribiert. Das Material von zwei der Patienten war zuvor schon zur Herstellung der cDNA-Subtraktionsbibliotheken eingesetzt worden. Es handelte sich um die Patienten Nummer 32382 (Stadium I), Nummer 00929 (Stadium IIIb) und Nummer 13009 (Stadium IV).

Um weitgehend gleiche Reaktionsbedingungen zu erreichen, wurden mit dem Primerauswahlprogramm PRIDE (Haas *et al.*, 1998) die genspezifischen Primer so ausgewählt, dass alle bei einer Anlagerungstemperatur von 60 °C ein Produkt von 200 bp erzeugen. Jede PCR wurde mindestens zweimal auf unabhängig voneinander hergestellten Erststrang-cDNAs durchgeführt und die Ergebnisse über Agarosegelelektrophorese überprüft. Um die einzelnen Gene in ihrer Expression miteinander vergleichen zu können, wurde immer eine Reaktion mit β -Actin-Primern als Standard-Reaktion mitgeführt. Um Expressionsunterschiede detektieren zu können, mussten die Produkte der exponentiellen Amplifikationsphase der PCR miteinander verglichen werden. Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde deshalb primerspezifisch angepasst. Sie lag zwischen 25 und 30 Zyklen. Ein Vergleich der Bandenstärken der einzelnen PCR-Produkte gegen das β -Actin Produkt ermöglichte den Vergleich aller gebildeten Verhältnisse miteinander. Ein absoluter Wert des Regulationsgrades ließ sich

ERGEBNISSE

mit dieser Art der Methode nicht bestimmen, Trends der Regulation konnten jedoch bestätigt werden (Tabelle 3.1).

Da nicht alle Primer bei der ausgewählten Temperatur funktionierten, wurde für diese das Temperaturoptimum schrittweise angepasst. Somit reicht die Anlagerungstemperatur (*annealing* Temperatur) von 50 °C bis 60 °C. Für 18 von 65 Genen wurde selbst mit einer Anlagerungstemperatur von 50 °C kein Produkt erhalten (Tabelle 7.3). Die Temperatur wurde nicht weiter abgesenkt, da bei geringer Anlagerungstemperatur ein Fehlpriming selbst genspezifischer Primer nicht auszuschließen war.

Tabelle 3.1 Beschreibung der zur RT-PCR eingesetzten Gene und Ergebnisse

Genbeschreibung	Accession #	Identifizierung	Patient 32382	Patient 00929	Patient 13009	Klassifizierung
hmunc-13 gene	AF020202	C	diff t	diff t	diff t	car
UCP2 (uncoupling protein 2)	H43703	C	diff t	diff t	diff t	ene
complement component C3 mRNA, alpha and beta subunits	A1539526	SC	diff t	diff t	diff t	im
β_2 -microglobulin	W81137	S	diff t	diff t	diff t	im
Wilm's tumor-related protein (QM)	AA886931	C	diff t	diff t	diff t	lat
NPT4 sodium-dependent phosphate transport protein 4	A1247271	C	diff t	diff t	diff t	mem
hkid3_4a21	AA515481	R	diff t	diff t	diff t	nid
hkid3_5m9	A1436552	R	diff t	diff t	diff t	nid
hkid3_5o9	A1685254	R	diff t	diff t	diff t	nid
KIAA0127 gene	D50917	R	diff t	diff t	diff t	nid
hkid3_5o13	D87119	R	diff t	diff t	diff t	nid
hkid3_5i15	H02943	R	diff t	diff t	diff t	nid
c-myc	AA857170		diff t	diff t	diff t	scr
VEGF	A1445310	R	diff t	diff t	diff t	sig
Annexin II (lipocortin II)	D00017	C	diff t	diff t	diff t	sig
calcineurin beta	M30773	C	diff t	diff t	diff t	sig
follistatin related protein FLRG	U76702	R	diff t	diff t	diff t	sig
thymosin beta 4	H98710	S	diff t	diff t	diff t	str
NAP (nucleosome assembly protein)	AA599720	C	diff t	diff t	diff t	str
superoxide dismutase (SOD-1) gene, exon 5 with a mutation causing familial amyotrophic lateral sclerosis	A1005141	C	diff t	diff t	nicht diff	ene
ferritin heavy chain	L20941	CR	diff t	diff t	nicht diff	met
α NAC	AA573212	CS	diff t	diff t	nicht diff	met
hkid3_5i13	A1291305	R	diff t	diff t	nicht diff	nid
hkid3_19d4	hkid3_19d4	C	diff t	diff t	nicht diff	nid
vascular endothelial growth factor B (VEGF-2)	AA983317	R	diff t	diff t	nicht diff	sig
TCB gene (cytosolic thyroid hormone binding protein)	A1859954	R	diff t	diff t	nicht diff	sig
hkid3_5i19	AA436183	R	diff t	nicht diff	diff t	nid
vimentin	AA147847	S	diff t	nicht diff	diff t	str
L7a	A1445014	C	nicht diff	diff t	diff t	lat
NADH ubiquinone oxidoreductase	A1471888	S	diff t	nicht diff	nicht diff	ene
hkid3_4e7	AA046652	R	diff t	nicht diff	nicht diff	nid
hkid3_5e1	AF070660	R	diff t	nicht diff	nicht diff	nid
hkid3_5g1	AF124522	R	diff t	nicht diff	nicht diff	nid
hkid3_5e19	AF147354	R	diff t	nicht diff	nicht diff	nid
transferrin α			diff t	nicht diff	nicht diff	rec
GAPDH	J02642	CSR	nicht diff	diff t	nicht diff	car
nucleophosmin	AA614780	S	nicht diff	diff t	nicht diff	lat

ERGEBNISSE

Genbeschreibung	Accession #	Identifizierung	Patient 32382	Patient 00929	Patient 13009	Klassifizierung
nardilysin precursor (n-arginine dibasic convertase) NRD-2; convertase 2	AI380619	S	nicht diff	nicht diff	nicht diff	ami
phosphatidylinositol transfer protein	D30037	C	nicht diff	nicht diff	nicht diff	car
S11	AA101266	C	nicht diff	nicht diff	nicht diff	lat
hkid3_5i21	AI750308	R	nicht diff	nicht diff	nicht diff	nid
hkid3_5i1	AI814366	R	nicht diff	nicht diff	nicht diff	nid
Interferon induced leucine zipper protein	AA435595	CS	nicht diff	nicht diff	nicht diff	scr
reducing agents and tunicamycin-responsive protein (RTP) mRNA	AI287374	CR	nicht diff	nicht diff	nicht diff	scr
c-myc binding protein	D89667	R	nicht diff	nicht diff	nicht diff	scr
GST (1)	AA575872	C	diff n	diff n	diff n	ami
sortilin (transmembrane neuropeptide receptor)	AI365213	R	diff n	Diff n	diff n	rec
β-Actin	AA152235	C	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	str

Die Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse der RT-PCRs von 49 Genen zusammen (47 zu testende Gene und β-Actin als Kontrollgen, ebenso Transferrin α, das aufgrund differenzieller Expression nicht als Kontrollgen eingesetzt werden konnte) Aufgeführt sind die Gene, die ein PCR-Produkt ergaben. Gene, die kein Produkt zeigten sind im Anhang in Tabelle 7.3 zusammengefasst. Neben der Genbeschreibung und der Accession Nummer ist die Art der Identifizierung der Gene aufgeführt, dabei bedeutet C – komplexe Hybridisierung, R – ‚random Sequenzierung‘ und S – Hybridisierung der Subtraktionsprodukte. Zu den drei untersuchten Patienten gibt es jeweils die Aussage über das Expressionsniveau:
diff n stärkeres Signal von Normalmaterial (differenziell Normalmaterial)
diff t stärkeres Signal von Tumormaterial (differenziell Tumormaterial)
nicht diff keine Signalunterschiede von Normal- und Tumormaterial
Kontrolle Kontroll-PCR, gegen die alle anderen PCRs normalisiert wurden
Die in der letzten Spalte aufgeführten Genannotationen sind durch Abkürzungen repräsentiert:

ami	Aminosäurestoffwechsel	ion	Ionenhomöostase	nuc	Nucleinsäurestoffwechsel
car	Kohlenhydratstoffwechsel	lat	Translation	phys	Physiologie
cyc	Zellzyklus	lip	Fettstoffwechsel	rec	Rezeptor
ene	Energiestoffwechsel	lys	Proteolyse	scr	Transcription
geno	genomische Sequenz	mem	Membrantransport	sig	Signaltransduktion
hsr	Hitzeschock-/Stressantwort	met	Metabolismus allgemein	str	Strukturgene und-proteine
im	Immunologie	nid	nicht identifiziert/nicht bekannt	tra	Transport
				vec	Vektorsequenz

In Bild 3.10 ist eine Übersicht der RT-PCR-Ergebnisse aufgeführt, geordnet nach den drei getesteten Patienten. Als Balken wurde die Anzahl der Gene aufgeführt, die in entsprechend vielen Patienten auftraten.

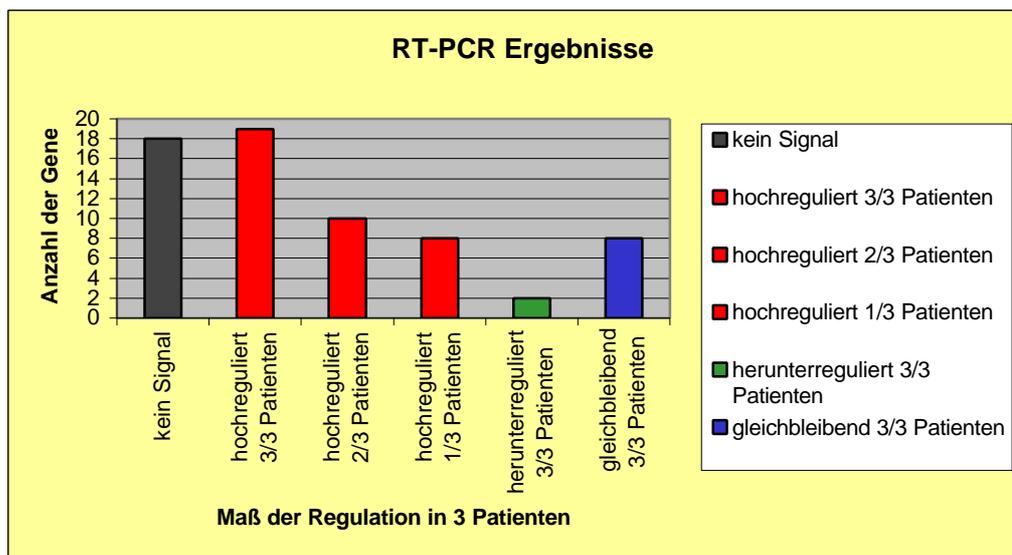


Bild 3.10 Zusammenfassung der RT-PCR-Ergebnisse (n=49)

Nicht alle Gene konnten als differenziell exprimiert in allen Patienten identifiziert werden. Vier Gene zeigten keine Veränderung in ihrer Expression. Bei sieben Genen wurde eine Abnahme der Expression im Tumorgewebe festgestellt. Dieses Ergebnis war konträr zu den vorausgehenden Hybridisierungen, da die Zusammenstellung der Gene nach Hybridisierung von Tumorsubtraktion bzw. Tumor-cDNA auf Tumorsubtraktionsfilter erfolgte. Daraus ergab sich die Erwartung, dass alle mit RT-PCR überprüften Gene eine stärkere Expression im Tumor- als im Normalgewebe zeigen sollten. Bei diesen entgegengesetzt reagierenden Klonen handelte es sich um falsch positive Signale der Hybridisierungen (Hybridisierungsartefakte). Die restlichen Gene wurden in mindestens einem Patienten als differenziell exprimiert bestätigt.

Diese Ergebnisse bestätigten die Hybridisierungsergebnisse und bildeten die Grundlage für weitere und genauere Untersuchungen einzelner Gene. Diese Untersuchungen umfassten bekannte (z. B. β_2 -Microglobulin), wie auch unbekannte Gene (EST hkid3_4a21).

3.5 Expressionsanalyse durch Hybridisierung auf cDNA-Arrays

Die bisher beschriebenen Hybridisierungen auf Koloniefilter lassen zwar eine Aussage über das Vorkommen eines Hybridisierungssignals zu, eine genaue Angabe über den Faktor der Regulation ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Daher wurden zusätzliche komplexe Hybridisierungsexperimente auf Membranen durchgeführt, die ein Genset von 31500 PCR-amplifizierten cDNAs tragen (3.5.1). Dieses Genset ermöglichte die parallele Untersuchung vieler Gene und die Erstellung von Expressionsprofilen für definierte Stadien einer Krebsart. Aus diesem Grund wurden ebenfalls die subtrahierten cDNAs auf diese cDNA-Filter hybridisiert (3.5.2).

3.5.1 Komplexe Hybridisierung auf ein 31500 cDNAs umfassenden PCR-Filter

Die cDNAs auf dem PCR-Filter wurden aus Clustern des UniGene-Sets (<http://www.dkfz-heidelberg.de/tbi/services/GeneNest/index>, (Haas *et al.*, 2000)) berechnet und dadurch die Redundanz einzelner Gene minimiert. Die Amplifikation erfolgt mit Universal-Primern (M13u und M13r), das robotergestützte Drucken der Filter in einem 4 x 4 Muster im RZPD/Berlin. Eine Qualitätskontrolle der Filter wurde durch Oligo-M13u Hybridisierung (2.2.15.4), durchgeführt. Zusätzlich zu den gespotteten Genen wurde auf die Filter noch heterologe DNA, ein Fragment des bakteriellen Kanamycinresistenzgens, gespottet. Der Kanamycin-Kontrollpunkt ermöglichte eine digitale Auswertung der Hybridisierungen mit dem Bildanalyseprogramm xdigitse (AG Prof. Dr. Lehrach, MPI, Berlin). Ein Punkt in dem 4 x 4 Quadrat blieb leer.

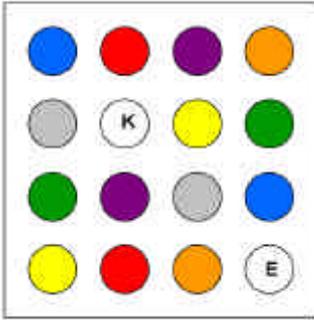


Bild 3.11 Schematische Darstellung eines 4 x 4 Druckfeldes

Die Darstellung zeigt Duplikatpunkte in derselben Farbe.
Als weiße Kreise liegen der Kanamycin Kontrollpunkt K und der leere Punkt E vor.

Um ein stabiles Versuchssystem zu erhalten, wurden die Expressionsprofile auf den UniGene-Filtern nach dem in Tabelle 3.2 beschriebenen Schema erstellt.

Tabelle 3.2 Hybridisierungsschema der komplexen Proben auf UniGene-Filtersets

	Experiment 1	Experiment 2
Part 1	Tumor-cDNA	Normal-cDNA
Part 2	Normal-cDNA	Tumor-cDNA

Experiment 1 wurde an einem Tag durchgeführt. Tumor- und Normal-cDNA eines Patienten wurden auf Part 1 und Part 2 eines Filtersets hybridisiert. Nach Auswertung dieses Experimentes, dem *Strippen* der Filter und einer zwei Halbwertszeiten einnehmenden Abklingphase (28 Tage) der Membranen wurde das umgekehrte Experiment, also die Hybridisierung mit ausgetauschten Proben durchgeführt. Für jeden Patienten wurden insgesamt zwei Filtersets hybridisiert. Damit wurde die folgende Anzahl hybridisierter Punkte für eine cDNA pro Patient wurden 8 Datenpunkte erzeugt:

**2 Gewebe x 2 Experimente x 2 Duplikatpunkte auf dem Filter =
8 Datenpunkte**

Durch diese Art des Doppelversuches wurden in einem Experiment zufällig auftretende positive Signale nicht ausgewertet und folglich die Anzahl falsch positiver Klone so gering wie möglich gehalten. Insgesamt wurden 10 Patienten der Stadien III und IV getestet.

Tabelle 3.3 Histologische Charakterisierung der zur komplexen Hybridisierung eingesetzten Nierentumoren

Patient	Differenzierungsgrad	Stadium
04764	G2	III
18378	G2	III
18705	G2	III
19229	G2	III
21511	G2	III
30495	G2	III
31821	G2	III
00409	G2	IV
11739	G2	IV
13009	G2	IV

Nach Abschluss der Hybridisierungsexperimente wurden die digitalisierten Bilder der Membranen mit dem Bildverarbeitungsprogramm xdigitise ausgewertet. Dieses Programm quantifizierte die Intensität jedes Hybridisierungspunktes. Als Hintergrundwert eines 4 x 4 Spotting-Quadrates wurde das 30 % Quantil über alle Pixelintensitäten des Quadrates benutzt. Diese Analyse wurde für alle Quadrate auf dem Filter durchgeführt.

Die Daten wurden durch den paarweisen Vergleich zweier Filter, auf die jeweils Tumor- und Normalmaterial desselben Patienten hybridisiert wurde, mit dem Programm fdiffs (T. Beißbarth, TBI, DKFZ, Heidelberg) ausgewertet. Das Programm repräsentierte die Messwerte aus zwei Hybridisierungen durch Punkte im ersten Quadranten eines x/y-Plots. Waren y_i ($i = 1,2$; für die Duplikate) die Messwerte für einen Klon aus der Hybridisierung des zu testenden Materials und x_j ($j = 1,2$; für die Duplikate) die Messwerte für einen Klon aus der Hybridisierung der Referenz, so wurde dasjenige Paar von Koordinaten benutzt, das den Abstand $|y_i - x_j|$ minimierte. Die Ergebnisse dieses Vergleiches für alle Klone wurden als *Scatterplot* dargestellt. Die Normalisierung erfolgte über den Median der Verhältnisse aller Punkte, deren Intensität über einer selbstgewählten Schwelle lag.

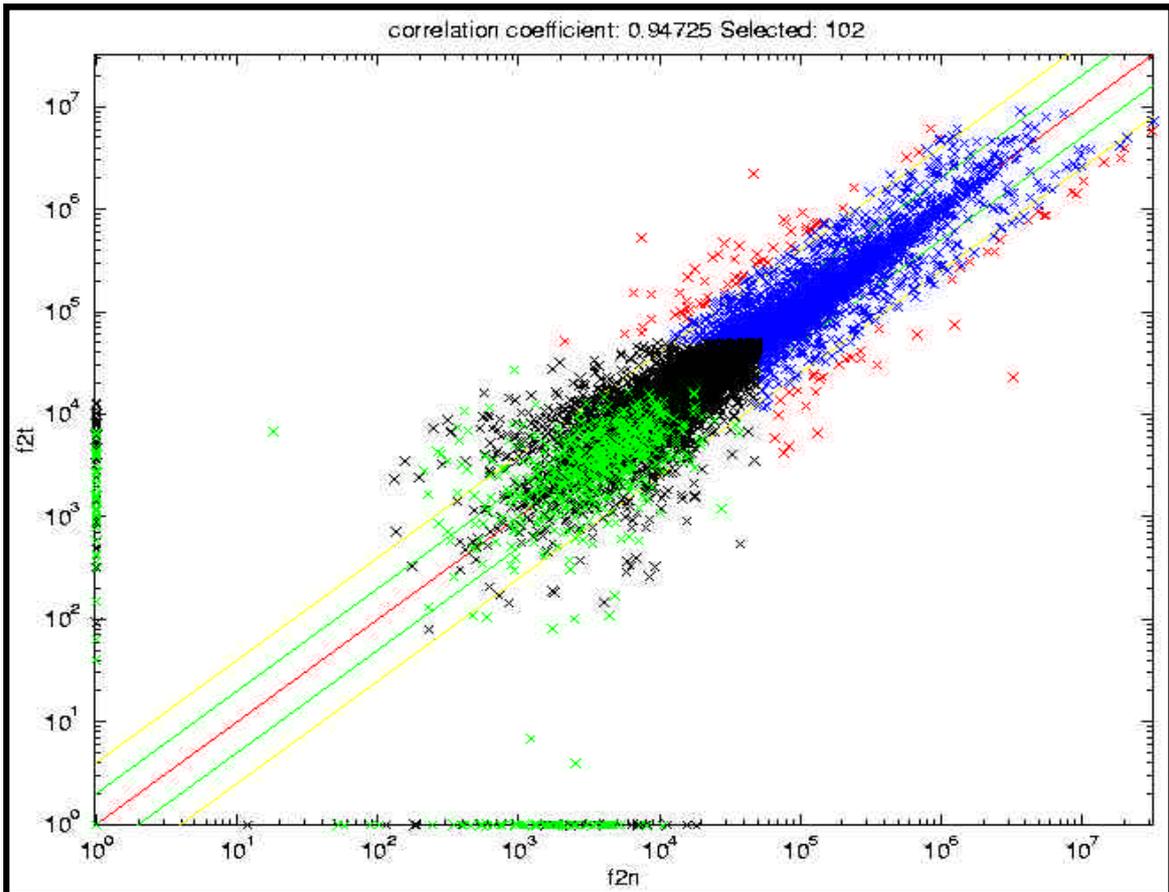


Bild 3.12 Scatterplot einer komplexen Hybridisierung von Material des Patienten 13009 auf UniGene-Filter

X-Achse: log Spotintensitäten Experiment 1; komplexe cDNA Probe aus Normalgewebe
 Y-Achse: log Spotintensitäten Experiment 2; komplexe cDNA Probe aus Tumorgewebe
 Rote Diagonale: Identitätslinie
 Grüne Diagonale: 2facher Intensitätsquotient
 Gelbe Diagonale: 4facher Intensitätsquotient
 Grüne Kreuze: leere Punkte auf dem UniGene-Filter
 Schwarze Kreuze: Punkte unter einer Intensitätsschwelle von 80000
 Blaue Kreuze: Punkte, über der Intensitätsschwelle
 Rote Kreuze: Punkte, bei denen der Intensitätsquotient über 5 oder unter 1/5 lag

In dem in Bild 3.12 dargestellten Koordinatensystem wurden zwei Hybridisierungsexperimente von Normal- und Tumor-cDNA auf demselben Filter miteinander verglichen. Auf der x-Achse wurden logarithmisch die Spotintensitäten des ersten Experimentes gegen den Logarithmus der Spotintensitäten des zweiten Experimentes aufgetragen. Entlang der roten Linie, der Identitätslinie, liegen alle Gene, die in beiden Experimenten ein ungefähr gleich starkes Signal zeigten. Die schwarz markierten Gene waren solche, die in keiner Hybridisierung ein überschwelliges Signal zeigten, während es sich bei den grünen Kreuzen um Platzhalter für die leeren Spots handelt. Mit roten Kreuzen wurden hier die Gene dargestellt, die ein Expressionsniveau mit mehr als fünffachem Unterschied zeigten. Dies sind Kandidaten für differenziell exprimierte Gene.

Zur Zusammenfassung mehrerer paarweiser Vergleiche (Repetitionen) gibt es unterschiedliche Ansätze. Eine Möglichkeit ist, ein Gen als differenziell exprimiert zu erkennen, wenn es in einem gewissen Anteil (z.B. 30 %) aller Vergleiche über einer Schwelle (z.B. 3,5) liegt. Eine zweite Möglichkeit bedient sich der Vorzeichenstatistik (Bild 3.13).

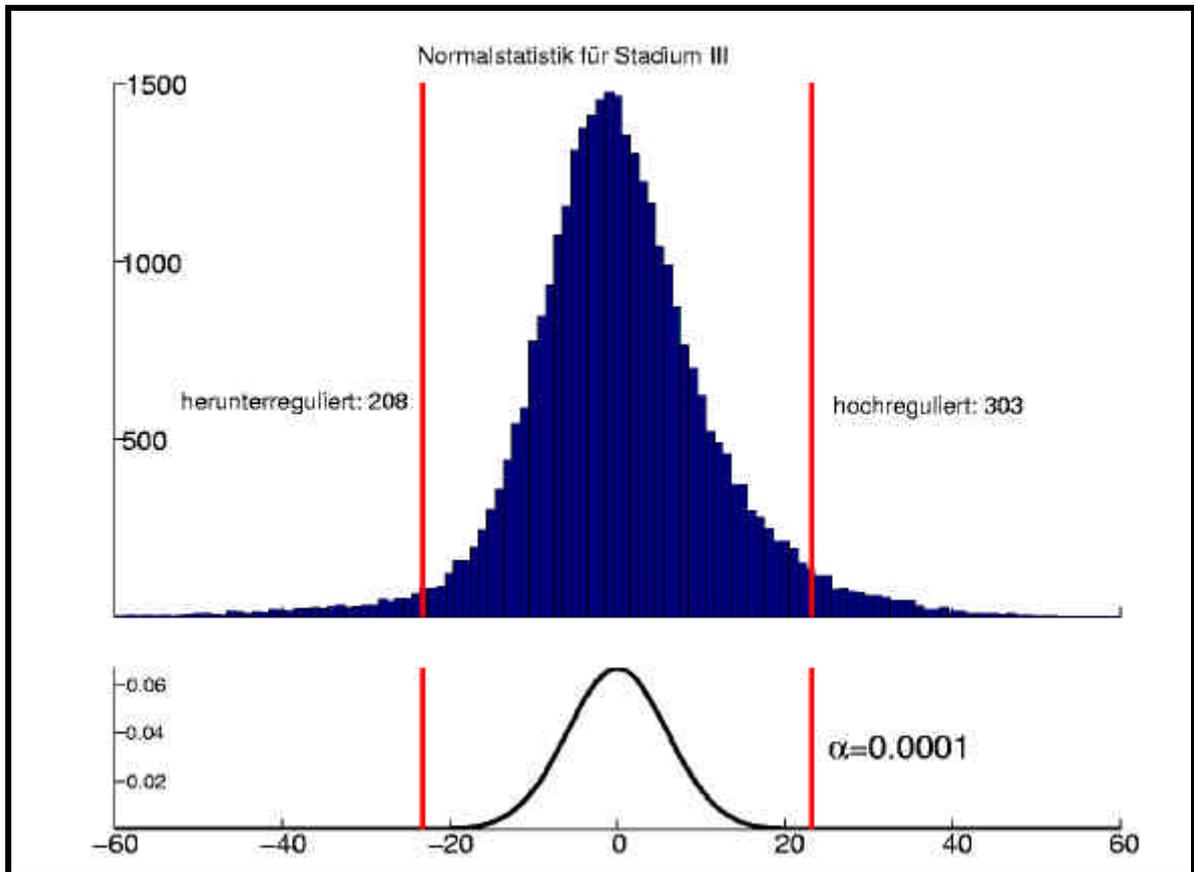


Bild 3.13 Vorzeichenstatistik für Stadium III Tumoren

Für jedes Gen und jeden paarweisen Vergleich, vergibt diese den Wert +1, wenn die Signalintensität des Gens in der einen Probe (z.B. Tumormaterial) höher ist als in der Referenz (z.B. Normalgewebe) und den Wert -1 im umgekehrten Fall. Für eine Reihe von paarweisen Vergleichen werden die Werte aufsummiert. Die Summe S wird mit der Zufallsverteilung verglichen. Dies ergibt ein Maß für die Wahrscheinlichkeit (p -Value) der differenziellen Expression der entsprechenden Gene.

oberes Histogramm:

y-Achse: Häufigkeit der verschiedenen Werte von S ermittelt über alle Gene ; x-Achse: mögliche Werte von S

unterer Graph:

x-Achse: mögliche Werte von S ; y-Achse: Wahrscheinlichkeit der Verteilung von S unter der Nullhypothese

α :: Schwelle für den p -Value

Der untere Graph zeigt die Dichte der Verteilung der Vorzeichenstatistik S unter der Nullhypothese nicht differenzieller Expression. Sie kann durch eine Normalverteilung approximiert werden. Die roten Balken markieren das 10^{-4} und das $(1 - 10^{-4})$ Quantil. Der obere Graph zeigt das Histogramm der S -Statistik für alle Gene. Ein Gen wird als differenziell exprimiert erkannt, wenn sein Wert für S links oder rechts der roten Balken liegt. Die testweise Wahrscheinlichkeit für eine falsch positive Entscheidung ist somit kleiner als 2×10^{-4} . Bei 31500 Elementen (gespotteten cDNAs) werden ≤ 6 falsch positive Entscheidungen erwartet.

Für Tabelle 7.9 wurden die cDNAs ausgewählt, die nach mindestens einem der beiden beschriebenen Kriterien als differenziell exprimiert identifiziert werden konnten. Für den paarweisen Vergleich wurde die Quotientenschwelle von 3,5 und die Quantilschwelle von 30 % eingesetzt. Insgesamt wurden 511 Gene als differenziell exprimiert identifiziert. Davon waren 303 Gene hochreguliert und 208 Gene herunterreguliert (Bild 3.13).

3.5.2 Hybridisierung der Subtraktionen auf ein cDNA Set von 31500 cDNAs

Subtrahiertes cDNA-Material der beiden Patienten 00929 und 13009 wurde auf die gleichen UniGene-Filter wie die komplexen Proben hybridisiert. Die Hybridisierung der subtrahierten cDNAs ließ jedoch keine Aussage über den Grad der Regulation der positiv reagierenden Gene zu, da es sich um PCR amplifizierte cDNA handelte. Es war aber eine Aussage über den Grad der Anreicherung eines bestimmten Gens sowie des Auftretens einer cDNA in dem Anreicherungs- bzw. Subtraktionsgemisches möglich. Durch den zusätzlichen Amplifikationsschritt der zu hybridisierenden cDNA wurde eine weitere Sensitivitätsstufe eingeführt. Schwach differenziell exprimierte Gene konnten nach einer Anreicherung als solche auf den UniGene-Filtern identifiziert werden.

Die Hybridisierung der subtrahierten cDNAs wurde in zwei Experimenten (Tabelle 3.2) durchgeführt. Vergleiche der einzelnen Filterhybridisierungen und die Auswertung mit dem Programm fdiffs (T. Beißbarth, TBI, DKFZ, Heidelberg) ergaben folgendes Bild in der Ansicht eines Korrelationsplots:

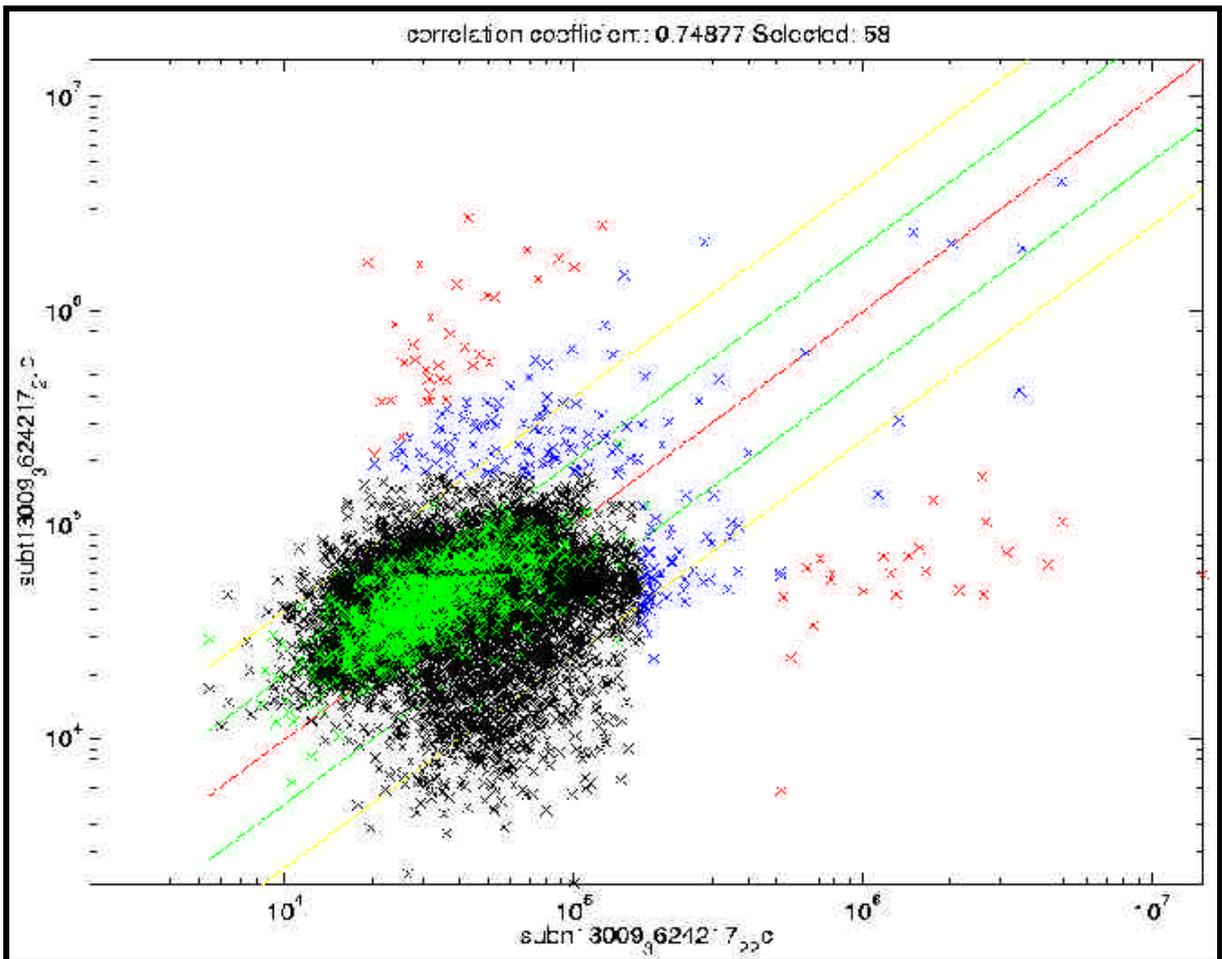


Bild 3.14 Korrelationsplot der Subtraktionshybridisierung des Patienten 13009 auf UniGene-Filter

X-Achse: log Spotintensitäten Experiment 1; subtrahierte cDNA NT des Patienten 13009
 Y-Achse: log Spotintensitäten Experiment 2; subtrahierte cDNA TN des Patienten 13009
 Rote Diagonale: Identitätslinie
 Grüne Diagonale: 2facher Intensitätsquotient
 Gelbe Diagonale: 4facher Intensitätsquotient
 Grüne Kreuze: leere Punkte auf dem UniGene-Filter
 Schwarze Kreuze: Punkte unter einem Intensitäts cutoff von 110000
 Blaue Kreuze: Punkte, die ein Signal zeigten
 Rote Kreuze: Punkte, die über oder gleich einer Intensitätsdifferenz von 8 lagen

In Bild 3.14 wurde die Auswertung eines Hybridisierungsexperimentes mit subtrahiertem Material des Patienten 13009 dargestellt. Im Gegensatz zur Darstellung der komplexen Hybridisierung waren entlang der Identitätslinie keine oder nur kaum cDNAs, hier repräsentiert durch blaue Kreuze, zu identifizieren. Dies entspricht der Erwartung, die in den Subtraktionsschritt gesetzt wurde. Jenseits der 4fach Linien (in gelb dargestellt) zeigten sich Wolken, die durch die amplifizierten cDNAs gebildet wurden. In der Abbildung wurden die cDNAs rot markiert, die jeweils ein 8fach höheres Signal zu der einen oder anderen Seite zeigten. Es wurden insgesamt 292 cDNAs ausgewählt, die durch die Amplifikation ein mindestens 8fach höheres Signal aufwiesen. Das TN-Experiment ergab eine Liste von 161 cDNAs, die ein stärkeres Signal zeigten, 131 cDNAs wurden durch das NT-Experiment identifiziert. Diese Gene wurden in Tabelle 7.7 und Tabelle 7.8 im Anhang

ERGEBNISSE

zusammengefasst. In Bild 3.15 und Bild 3.16 wurden die Verteilungen amplifizierten Gene in einzelne Klassen dargestellt.

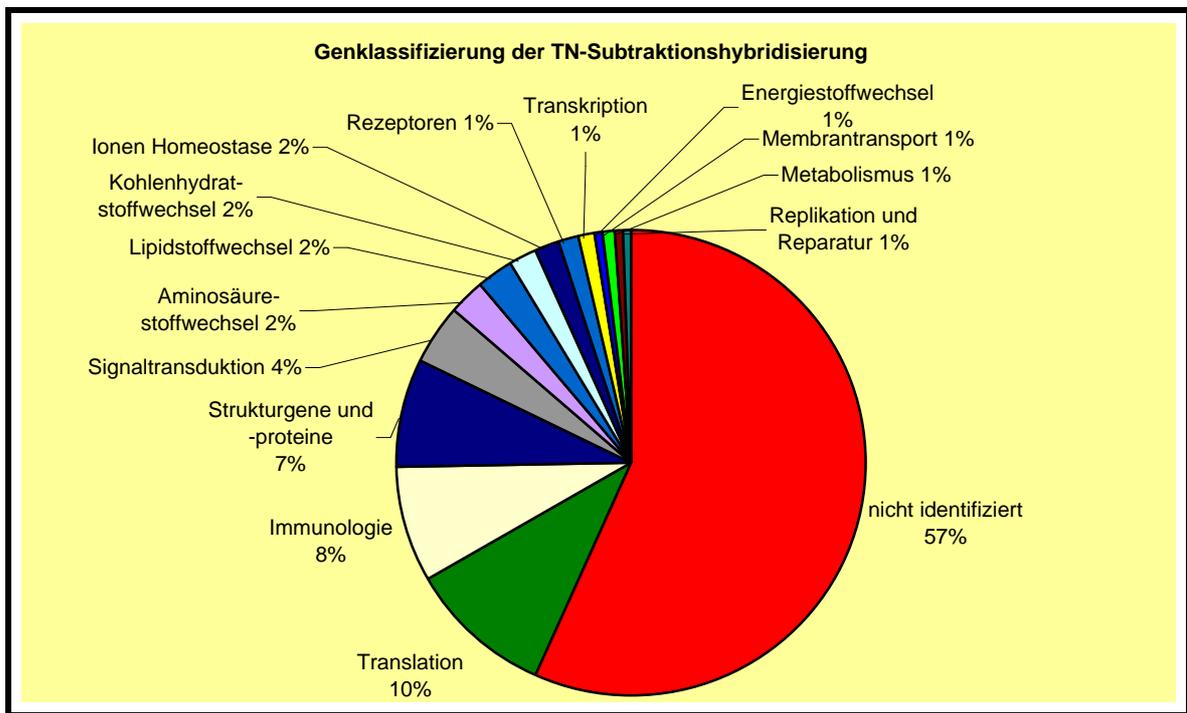


Bild 3.15 Genklassifizierung der TN-Subtraktionshybridisierung auf das UniGene-Filterset (n=162)

Besonders auffallend war der sehr hohe Anteil von ESTs in beiden NT- und TN-Ansätzen, den es noch weiter zu untersuchen gilt. Unter der Rubrik *Translation* wurden vor allem die ribosomalen Gene zusammengefasst. Dieser Anteil war in dem TN-Experiment höher als im reversen Ansatz. Es wurden weiterhin Gene identifiziert, die in den verschiedenen zuvor beschriebenen Ansätzen auftraten, wie β_2 -Microglobulin und Kininogen.

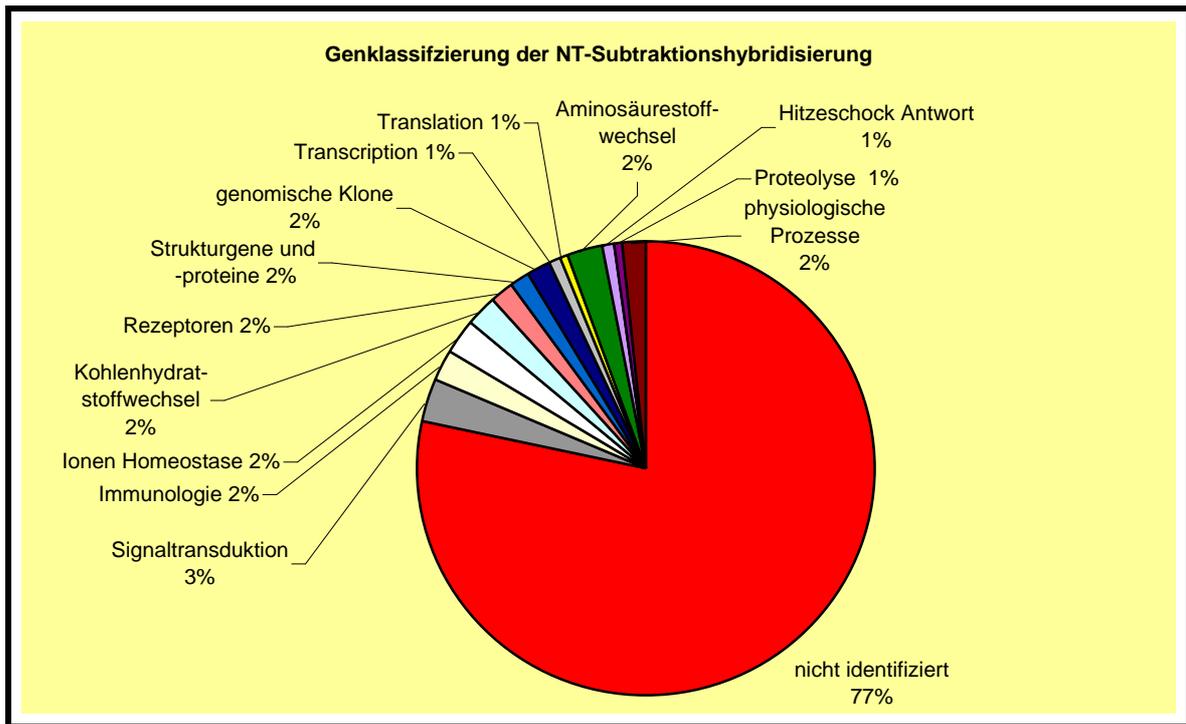


Bild 3.16 Genklassifizierung der NT-Subtraktionshybridisierung auf das UniGene-Filterset (n=128)

3.6 Bekannte Gene als potenzielle Tumormarker

Folgend wurden einige bekannte Gene näher untersucht, die im Zusammenhang mit dem klarzelligem Nierenkarzinom noch nicht beschrieben waren. Exemplarisch wurden für diese Transkripte die klassischen Methoden der Expressionsanalyse, der Northern Blot und die RT-PCR zur Konsolidierung der durch die Hybridisierung erzeugten Daten eingesetzt.

3.6.1 β_2 -Microglobulin

Das Gen β_2 -Microglobulin wurde bei allen Hybridisierungsmethoden als stärker im Tumor exprimiert identifiziert. β_2 -Microglobulin wurde als ein Gen des antigenerkennenden Weges im Cytosol ausgewählt. Es ist Bestandteil des MHC-Klasse-I (MHC I)-Moleküls, das als Heterodimer aus einer Alpha-Kette und einer Beta-Kette, dem β_2 -Microglobulin, aufgebaut ist. Im Cytosol kommt es zur Bindung von Peptiden an die MHC I-Moleküle, die die Peptide aktiv zum endoplasmatischen Reticulum transportieren.

Das Histogramm der komplexen Hybridisierungen gab eine Übersicht über die Verteilung der Hybridisierungssignale für dieses Gen (Bild 3.17).

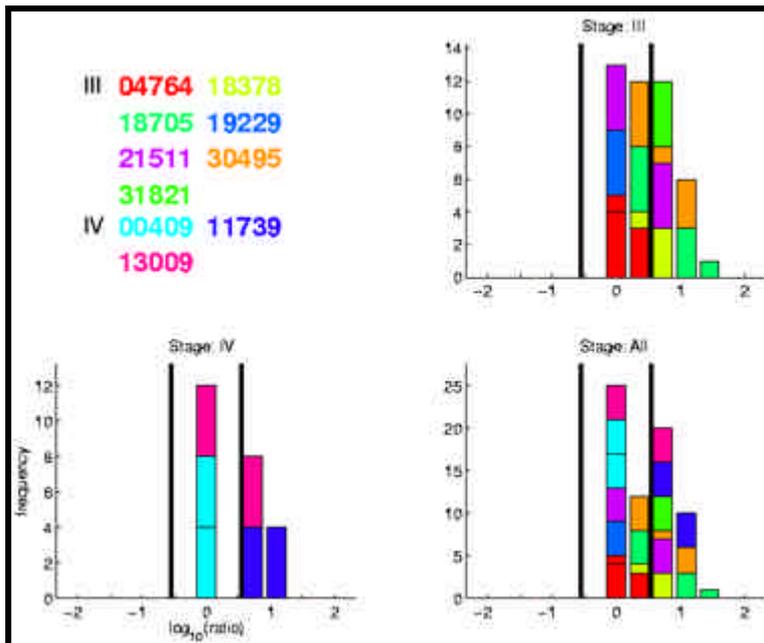


Bild 3.17 Ergebnisse der komplexen Hybridisierung für β_2 -Microglobulin

Dargestellt wurden die 10 Patienten der zwei Stadien (Stage) III und IV in verschiedenen Farben. Aufgetragen wurde die Häufigkeit (*frequency*) der Signale gegen den log der Verhältnisse (*ratio*) von Tumor/Normal Hybridisierung. Die Höhe der vertikalen Balken ergibt sich aus Anzahl der entsprechenden Signalintensitäten der Duplikatpunkte aus allen Experimenten (3.5).

Die Expression des β_2 -Microglobulin wurde durch verschiedene weitere Methoden untersucht. Wie in Tabelle 3.1 aufgeführt, wurde ein für alle Patienten positives Ergebnis in der RT-PCR erzielt. In allen Patienten ließ sich eine stärkere Expression im Tumormaterial nachweisen. Diese Ergebnisse wurden durch eine Northern Blot Analyse bestätigt.

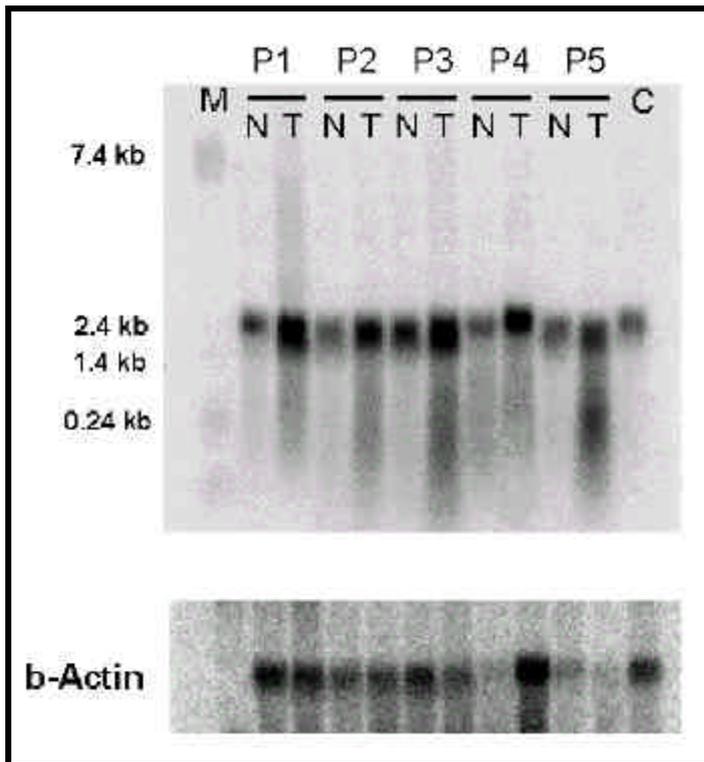


Bild 3.18 β_2 -Microglobulin Expression in 5 RCC Patienten

Total RNA Northern Blot mit je 20 μ g total RNA pro Bahn. Von fünf verschiedenen Patienten der Stadien I und III wurde nebeneinander Normal- und Tumor-RNA (N, T) aufgetragen. M steht für den RNA Marker (Gibco) und C für die Plazenta total RNA in der Kontrollbahn. Nebeneinander sind die folgenden Patienten RNAs aufgetragen:

P1: 32206; Stadium I P2: 30495; Stadium I P3: 29829; Stadium III P4: 14078; Stadium III
P5: 00929; Stadium III

Die Hybridisierung wurde mit einem Klenow-markierten β_2 -Microglobulin-Fragment durchgeführt. Die Exposition wurde in Phosphoimagerkassetten vorgenommen, die nach 20 h gescannt wurden.

Berechnungen der Signalintensität der einzelnen Banden auf dem Northern Blot ergaben eine 2,5 mal stärkere Intensität der Tumorsignale im Vergleich zu den Normalgewebe Signalen. Alle Ergebnisse wurden mit den β -Actin Kontrollen abgeglichen. Die erzielten Ergebnisse der komplexen Hybridisierungen und der Subtraktionen wurden durch klassische Expressionsanalysemethoden bestätigt.

3.6.2 α -NAC

α -NAC ist ein Protein Komplex, der für die signalspezifische Sortierung und Translokation der Proteine während der Translation verantwortlich ist. Der Protein-Komplex bindet an nascente Polypeptidomänen, bis das Leaderpeptid komplett fertiggestellt ist. und verhindert so falsche Interaktionen zwischen cytosolischen Proteinen und den im Translationsprozeß befindlichen Polypeptidketten.

Auch hier wurden die durch die verschiedenen Hybridisierungsmethoden erreichten Ergebnisse verifiziert. Die Verlagerung auf die tumorspezifische Seite war hier nicht ganz so stark wie in dem zuvor gezeigten Histogramm für das β_2 -Microglobulin (Bild 3.1),

jedoch war eine deutliche Verlagerung in Richtung einer stärkeren Expression im Tumor zu beobachten.

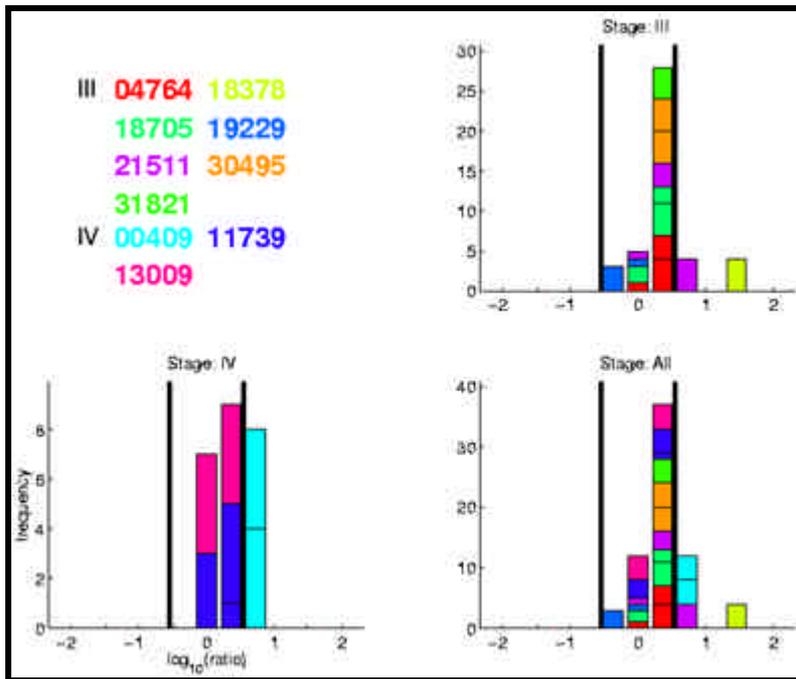


Bild 3.19 Ergebnisse der komplexen Hybridisierung für a-NAC

Dargestellt wurden die 10 Patienten der zwei Stadien (Stage) III und IV in verschiedenen Farben. Aufgetragen wurde die Häufigkeit (*frequency*) der Signale gegen den log der Verhältnisse (*ratio*) von Tumor/Normal Hybridisierung. Die Höhe der vertikalen Balken ergibt sich aus Anzahl der entsprechenden Signalintensitäten der Duplikatpunkte aus allen Experimenten (3.5).

In Patienten der Stadien I und III wurde in der RT-PCR ein stärkeres Signal ausgehend vom Tumormaterial gezeigt. In dem Stadium IV wurde mit dieser Methode kein Expressionsunterschied festgestellt, während die Daten in Bild 3.19 auch auf eine höhere Expression im Stadium IV verweisen.

Northern Blot Analyse zeigte selbst auf einem Blot mit wenig Material noch gute Signale, dies deutete auf eine sehr starke Expression hin. Da nur 1 μg total RNA aufgetragen worden war, waren nur sehr schwache Signale in den Tumorbahnen zu detektieren, während in Bahnen, in denen aus normalem Nierengewebe isolierte RNA aufgetragen worden war, keine Signale zu beobachten waren.

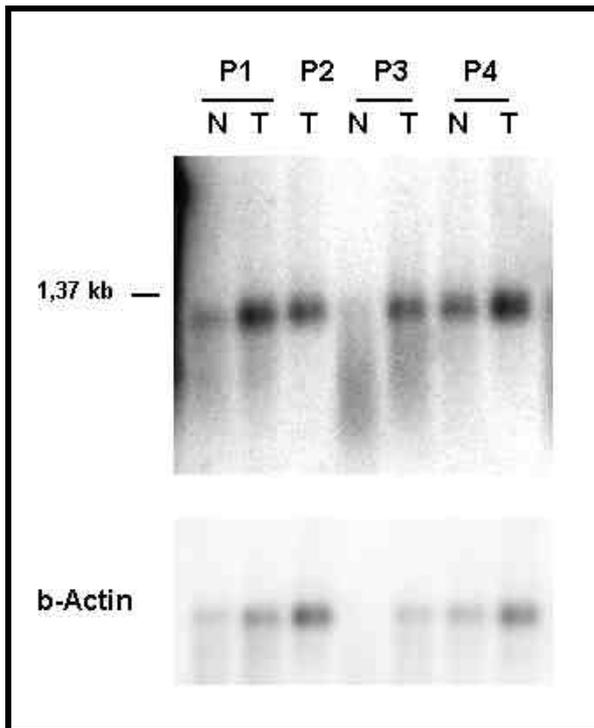


Bild 3.20 Northern Blot Hybridisierung des α -NAC Gens

Zur Analyse wurden 100 ng poly (A)⁺ RNA pro Bahn auf ein 1% Formaldehydgel aufgetragen, durch Elektrophorese aufgetrennt und geblottet. In den Bahnen nebeneinander wurden Normal- und Tumorproben (N, T) desselben Patienten aufgetragen.

P1: 13009; Stadium IV P2: 01385; Stadium III P3: 30495; Stadium III P4: 18378; Stadium III

Damit wurde gezeigt, dass es sich bei dem Gen α -NAC, um ein tumorrelevantes Gen handelt.

3.6.3 Annexin II

Dieses kalzium-regulierte, membranbindende Protein hat wahrscheinlich verschiedene Aufgaben in der Zelle. Lokalisiert ist es in der Lamina unter der Plasmamembran. Es wurde ebenso wie die beiden anderen Gene durch verschiedene Hybridisierungen als differenziell im Tumor exprimiert gefunden. In dem Histogramm Bild 3.21 zeigt sich eine deutliche Verteilung der Hybridisierungsintensitäten hin zu einem Faktor größer 3,5, also jenseits der im positiven Bereich gelegenen schwarzen Markierungslinie.

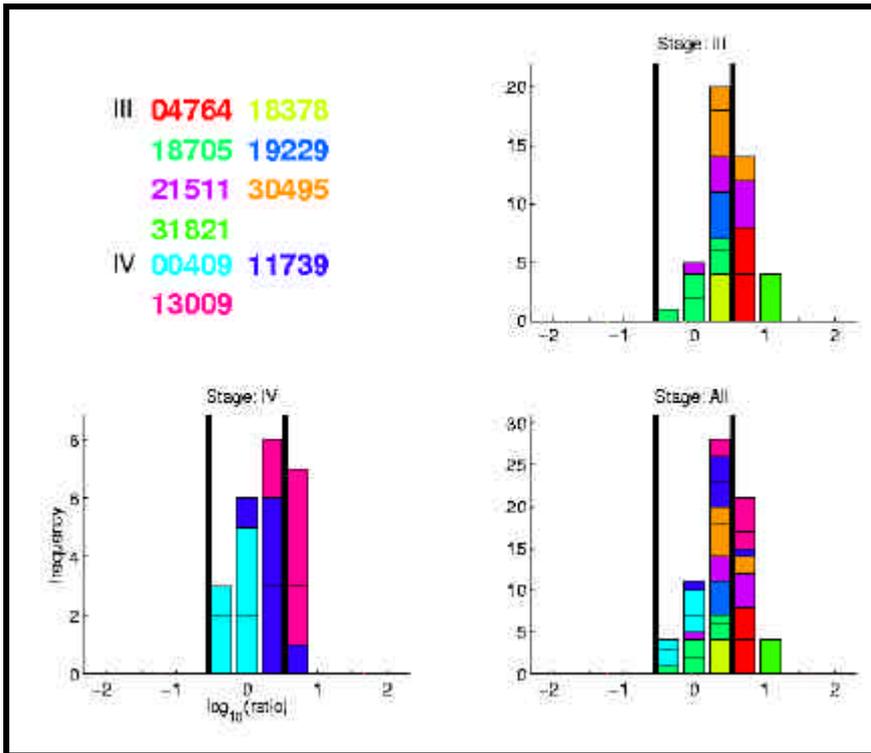


Bild 3.21 Ergebnisse der komplexen Hybridisierung für Annexin II

Dargestellt wurden die 10 Patienten der zwei Stadien (*Stage*) III und IV in verschiedenen Farben. Aufgetragen wurde die Häufigkeit (*frequency*) der Signale gegen den log der Verhältnisse (*ratio*) von Tumor/Normal Hybridisierung. Die Höhe der vertikalen Balken ergibt sich aus Anzahl der entsprechenden Signalintensitäten der Duplikatpunkte aus allen Experimenten (3.5).

Durch RT-PCR wurden die Hybridisierungsergebnisse bestätigt, ebenso durch die Northern Blot Analyse, wie in Bild 3.22 gezeigt.

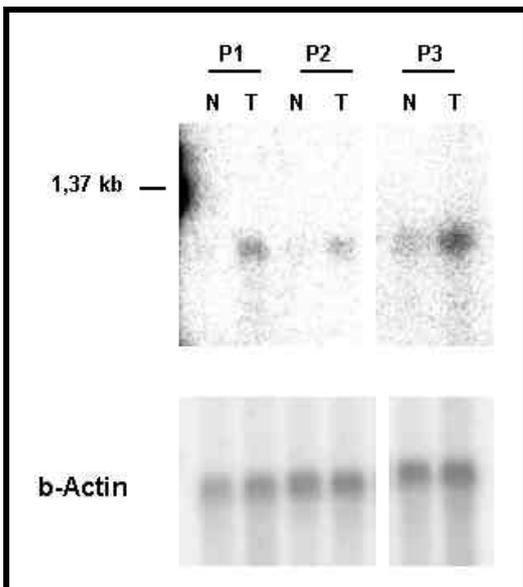


Bild 3.22 Northern Blot Hybridisierung des Annexin II

Zur Analyse wurde 1 µg total RNA auf ein 1 % Formaldehydgel aufgetragen und geblotet. Hybridisiert wurde mit einer genspezifischen Sonde. Nebeneinander wurde Normal- und Tumor-RNA aufgetragen. Die Klassifizierung der Patienten (P) wurde folgend angegeben. Nach einer Expositionszeit von 22 h wurde nach beiden Hybridisierungen (b-Actin und Annexin II) gescannt. P1: 04216; G3; pTIIIb P2: 10608; G1; pT1 P3: 00100; G1; pT1

Da ein Northern Blot mit sehr wenig Material eingesetzt wurde, waren keine sehr starken Signale zu erwarten. Es wurde jedoch ein deutlicher Expressionsunterschied des Annexin II im Vergleich zu der β -Actin Kontrollhybridisierung nachgewiesen.

3.6.4 Kininogen

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Genen wurde Kininogen als stärker exprimiert im Normalgewebe als im Tumorgewebe identifiziert. Es hat verschiedene Funktionen, so sind Kininogene Inhibitoren von Thiol-Proteasen.

In der Darstellung des Histogramms zeigen die Hybridisierungen den genau umgekehrten Effekt der bei den drei zuvor genannten Genen festgestellt werden konnte. In der Expression im Tumorgewebe wurde Kininogen herunterreguliert.

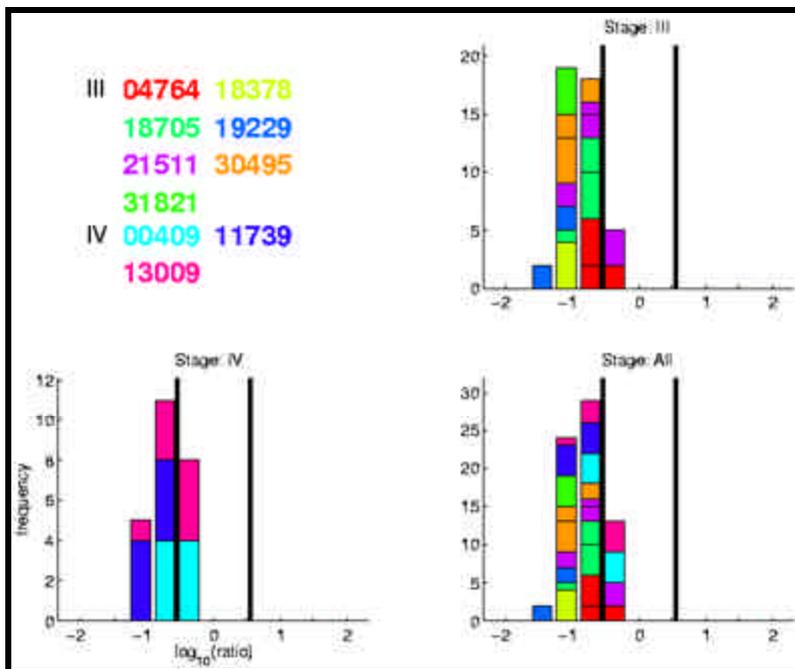


Bild 3.23 Ergebnisse der komplexen Hybridisierung für Kininogen

Dargestellt wurden die 10 Patienten der zwei Stadien (*Stage*) III und IV in verschiedenen Farben. Aufgetragen wurde die Häufigkeit (*frequency*) der Signale gegen den \log_{10} der Verhältnisse (*ratio*) von Tumor/Normal Hybridisierung. Die Höhe der vertikalen Balken ergibt sich aus Anzahl der entsprechenden Signalintensitäten der Duplikatpunkte aus allen Experimenten (3.5).

Der Großteil der Hybridisierungssignale liegt im negativen logarithmischen Bereich der schwarzen vertikal verlaufenden Linie, die einen Faktor des Verhältnisses der Tumor/Normal-Hybridisierung von 3,5 indiziert. Dieses Gen ist in den Stadien III und IV herunterreguliert und wird innerhalb der Nachweisgrenzen nur im Normalgewebe exprimiert, was durch den Northern Blot in Bild 3.24 bestätigt wurde. Es war kein Signal auf dem Tumormaterial nach 44 h Exposition in Phosphoimagerkassetten zu erkennen. Kininogen schien daher ausschließlich im Normalgewebe exprimiert zu werden.

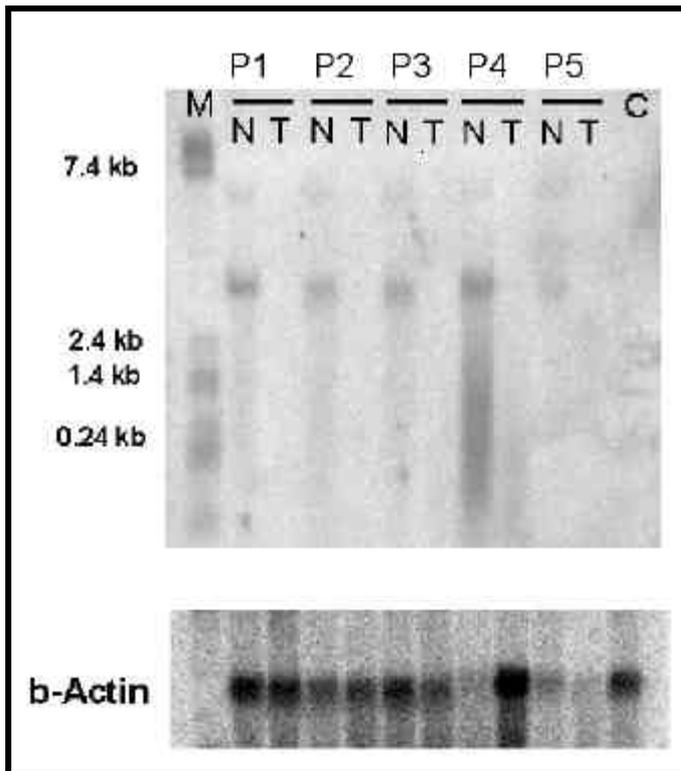


Bild 3.25 Kininogen Expression in 5 RCC Patienten

Total RNA Northern Blot mit je 20µg total RNA pro Bahn. Von fünf verschiedenen Patienten der Stadien I und III wurde nebeneinander Normal- und Tumor-RNA (N, T) aufgetragen. M steht für dem RNA Marker und C für die Plazenta Kontrollbahn.

P1: 32206; Stadium I

P2: 30495; Stadium I

P3: 29829; Stadium III

P4: 14078; Stadium III

5: 00929; Stadium III

Die Hybridisierung wurde mit einem Klenow-markierten Kininogen-Fragment durchgeführt. Die Exposition wurde in Phosphoimagerkassetten vorgenommen, die nach 44h gescannt wurden.

3.6.5 BRAK

Das Gen BRAK (*breast and kidney gene*) gehört zur Familie der CXC-Chemokine. CXC-Chemokine sind potente Regulatoren der Angiogenese. Es ist herunterreguliert im Tumorgewebe.

Auf nierenspezifischen Filtern (3.8.2) wurde eine differenzielle Expression dieses Gens nachgewiesen. Im Histogramm (Bild 3.26) zeigt sich diese Tendenz der geringeren Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe.

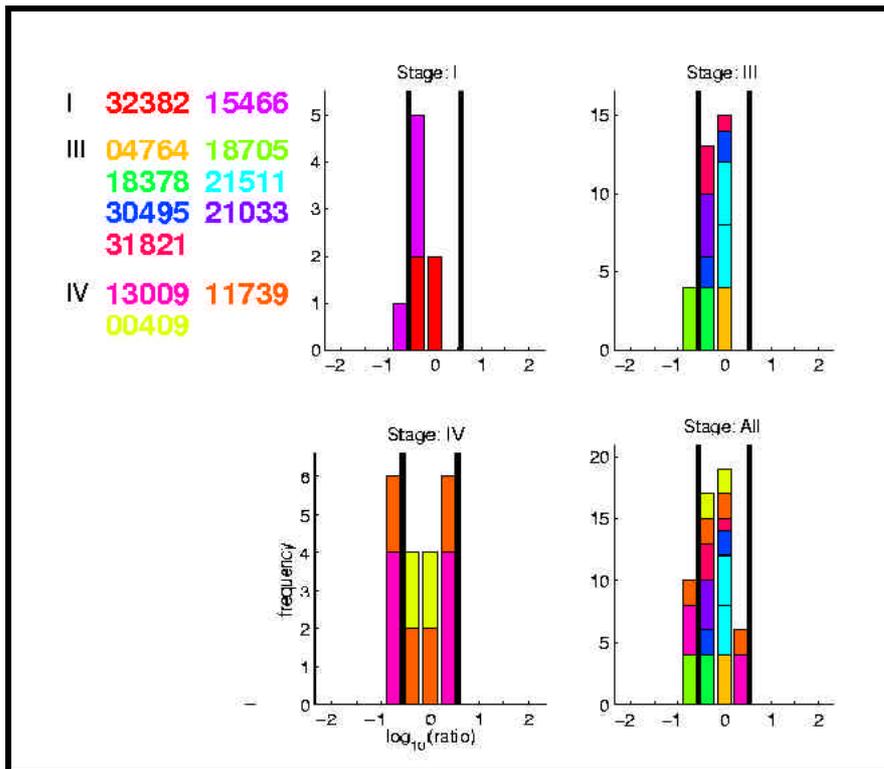


Bild 3.26 Ergebnisse der komplexen Hybridisierung auf nierenspezifische Filter für das Gen BRAK

Dargestellt wurden die 12 Patienten der Stadien I, III und IV (*stage*) in verschiedenen Farben. Aufgetragen wurde die Häufigkeit (*frequency*) der Signale gegen den log der Verhältnisse (*ratio*) von Tumor/Normal Hybridisierung. Die Höhe der vertikalen Balken ergibt sich aus Anzahl der entsprechenden Signalintensitäten der Duplikatpunkte aus allen Experimenten (siehe 3.8.2).

Auf den UniGene-Filtern wurde BRAK nicht als differenziell exprimiert identifiziert. Dagegen wurde es auf den nierenspezifischen cDNA-Arrays (siehe Abschnitt 3.8.2) durch komplexe Hybridisierung als stärker im Normalgewebe exprimiert nachgewiesen. Dies ist vor allem im Stadium I und III zu beobachten.

Diese Aussage wurde durch die Northern Blot Analyse bestätigt (Bild 3.27). Es wurde RNA von fünf Patienten getestet, die drei verschiedene Stadien repräsentierten. Differenzielle Genexpression von BRAK wurde in allen Fällen nachgewiesen.

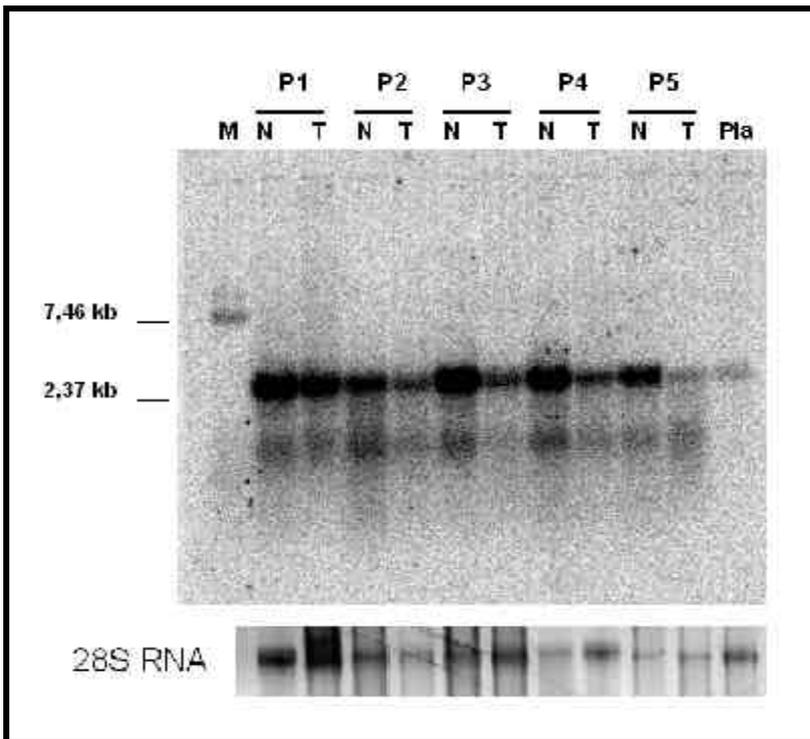


Bild 3.27 Northern Blot Analyse des Chemokines BRAK

Untereinander wurden ein 5 Tage exponierter Northern-Blot und das dazugehörige RNA-Gelfoto gezeigt. Die 28S und 18S-Banden der RNAs wurden markiert. Sie dienten als Referenzwerte zum Mengenabgleich der RNAs. Nebeneinander wurden jeweils 15 µg total RNA aufgetragen; N: total RNA aus Nierencortexgewebe; T: total RNA aus Tumorgewebe; M: Markerbahn; Pla: total RNA aus Plazenta isoliert

P1: 09644; G2; pTI
 P3: 13009; G2; pTIV
 P5: 00929; G2; pTIIIb

P2: 13596; G2; pTI
 P4: 11739; G2; pTIV

3.7 Unbekannte Gene als potenzielle Tumormarker

Besonders interessant erschienen differenziell exprimierte, unbekannte Gene, die durch die zuvor beschriebenen Experimente identifiziert wurden. Der Schwerpunkt der weitergehenden Charakterisierung lag dabei auf Genen, die nur schwach exprimiert wurden. Eine Einordnung der differenziellen Expression wurde zuvor schon durch die RT-PCR als hybridisierungs-unabhängige Methode beschrieben. Diese Ergebnisse wurden als Grundlage für die genauere Charakterisierung, wie die Expressionsanalyse dieser Gene in verschiedenen Geweben und Homologievergleiche einzelner ESTs, eingesetzt.

3.7.1 hkid3_4a21

Der Klon hkid3_4a21 wurde durch Sequenzierung der Subtraktionsbibliothek des Patienten 00929 identifiziert. Dass eine weitere Untersuchung des Gens sinnvoll war, zeigte sich nach der RT-PCR (Bild 3.28).

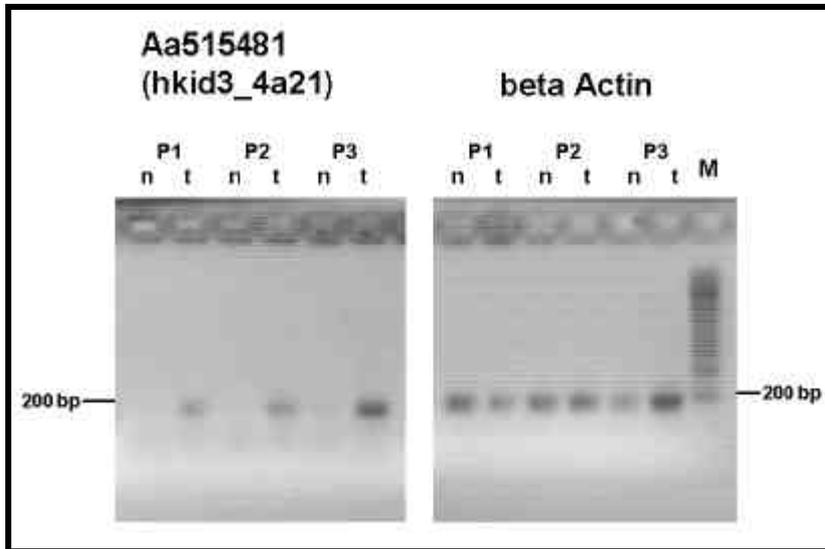


Bild 3.28 RT-PCR-Nachweis des hkid3_4a21 Genproduktes

2% TAE Agarosegel zur Überprüfung der RT-PCR-Produkte. Es wurden jeweils 10 μ l einer 25 μ l PCR-Reaktion aufgetragen. Die PCR wurde über 30 Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur von 55 $^{\circ}$ C durchgeführt. Aa515481: Genbank Accession # der Sequenz auf der die Primer für diese Reaktion gelegt wurden. P1: 96-32382 pT1 G2; P2: 13009 pT4 G2; P3: 00929 pT3b G2, n: Ausgangsmaterial: cDNA von Normalgewebe; T: Ausgangsmaterial: cDNA von Tumorgewebe

Es war eine deutliche differenzielle Expression in Tumor- und Normal-cDNA zu beobachten. Ausgehend von dem RT-PCR-Ergebnis wurde aus dem zugehörigen UniGene-Cluster ein Klon am 3'-Ende des Clusters ausgewählt und als Sonde für Northern Blots eingesetzt. Da auf einem total RNA Northern Blot auch nach langer Exposition kein Signal beobachtet werden konnte, wurden die Experimente ausschließlich auf poly (A)⁺ Northern Blots fortgesetzt. In Bild 3.29 wird ein patientenspezifischer Northern Blot gezeigt.

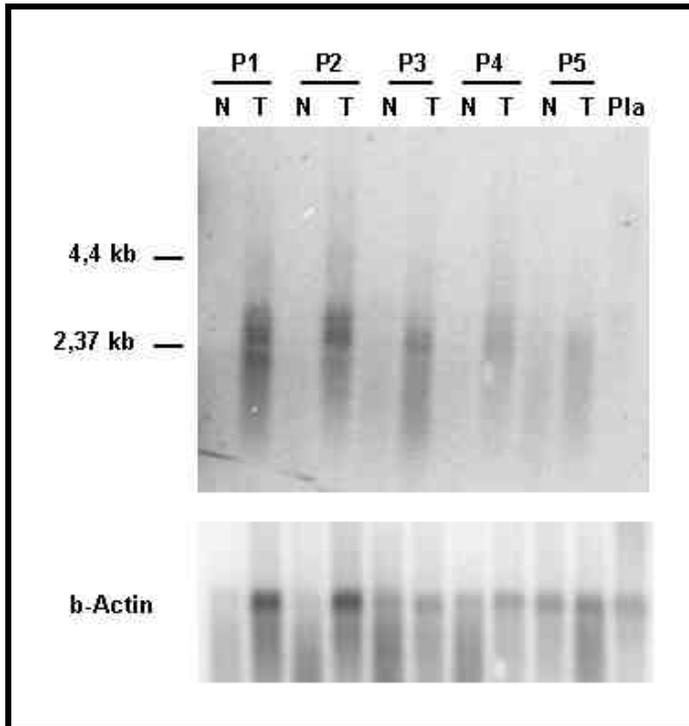


Bild 3.29 Northern Blot Analyse des Gens hkid3_4a21

Der Northern Blot mit je 500 ng poly (A)⁺ RNA pro Bahn hergestellt. Nebeneinander wurde Normal- und Tumor-Material desselben Patienten aufgetragen. Die Einordnung des Materials in verschiedene Stadien ist folgend aufgeführt.

P1: 15466; G2; pT1
 P2: 32382; G2; pT1
 P3: 21511; G2; pTIIIb
 P4: 00929; G2; pTIIIb

P5: 29829; G3; pTIII

Hybridisiert wurde mit einer hkid3_4a21 genspezifischen Sonde, als Kontrolle diente die β -Actin-Hybridisierung. Die Expositionszeit betrug für die β -Actin-Hybridisierung 20 h und für das hkid3_4a21 Experiment 48 h in einer Phosphoimagerkassette.

Auf dem *multiple tissue* Northern Blot zeigten sich selbst nach einer Expositionszeit von 10 Tagen keine spezifischen Signale, während auf dem patientenspezifischen Northern Blot Signale nur in den Bahnen des Tumormaterials in einer Höhe von etwa 2,4 kb zu sehen waren. In allen getesteten Geweben wurde nur eine Expression im Tumormaterial nachgewiesen. In allen anderen Geweben war keine Expression zu detektieren.

Der durch die Subtraktion identifizierte cDNA-Klon hatte eine Länge von 140 bp. Eine Verlängerung der Sequenz wurde durch die Hybridisierung einer 3' Sonde auf den 27000 Klone umfassende Koloniefilter der Bibliothek DKFZp435 erreicht. Die Bibliothek DKFZp435 wurde zuvor aus der cDNA des Patienten 00929, der auch zur Subtraktion eingesetzt wurde, hergestellt (Abschnitt 3.3.2). Durch diese Ressource wurde ein Sequenz-Contig einer Länge von 1092 bp zusammengefügt (7.2), das jedoch noch nicht dem kompletten Transkript, dessen Länge aus der Northern Blot Hybridisierung abgeschätzt wurde, entspricht.

Ausgehend von dieser Sequenzinformation wurden Homologievergleiche mit verschiedenen Datenbanken durchgeführt. Dabei zeigten sich keine relevanten Homologien zu bekannten Genen. Die *in silico* translatierte Aminosäuresequenz selbst ist gekennzeichnet durch einen Prolinreichtum. Als ein zusätzliches Ergebnis der

Homologievergleiche zeigte sich Sequenzidentität mit dem genomischen Klon AC01663, der auf Chromosom 11 lokalisiert ist. Weitere Informationen waren über dieses Gen nicht zu erhalten, da der vollständige offene Leserahmen noch nicht bekannt ist.

3.7.2 hkid3_5m9

Das Gen hkid3_5m9 wies nach einem Abgleich der Aminosäuresequenz gegen die Datenbank Swissprot starke Homologien zu dem Enzym Ornithin-Aminotransferase auf. Das homologe Enzym Ornithin-Aminotransferase ist als pyridoxal-Phosphat-abhängiges Molekül in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Die Überprüfung des hkid3_5m9 Transkriptes durch die RT-PCR bestätigte ein stärkere Expression im Tumorgewebe.

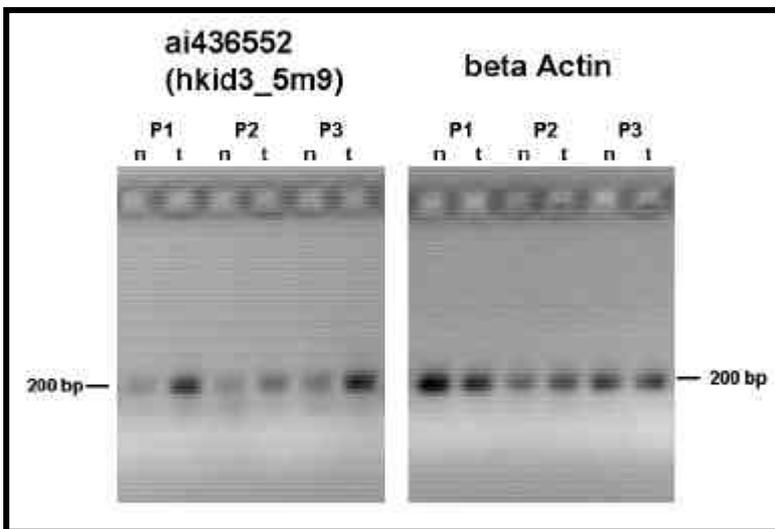


Bild 3.30 RT-PCR-Nachweis des hkid3_5m9 Genproduktes

2% TAE Agarosegel zur Überprüfung der RT-PCR-Produkte. Es wurden jeweils 10 µl einer 25µl PCR-Reaktion aufgetragen. Die PCR wurde über 30 Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur von 55 °C durchgeführt. ai436552: Genbank Accession # der Sequenz, auf die die Primer für diese Reaktion gelegt wurden. P1: 96-32382 pT1 G2; P2: 13009 pT4 G2; P3: 00929 pT3b G2, n: Ausgangsmaterial: cDNA von Normalgewebe; T: Ausgangsmaterial: cDNA von Tumorgewebe.

Durch Hybridisierung auf einen *multiple tissue* Northern Blot konnte die Transkriptlänge des Gens von 1,5 kb bestimmt werden. Stark exprimiert wird dieses Gen in Pankreas, Skelettmuskel, Leber und Herzen, während in der Niere ein schwächeres Signal nachzuweisen war, wie auch in Lunge, Plazenta und Gehirn (Bild 3.31).

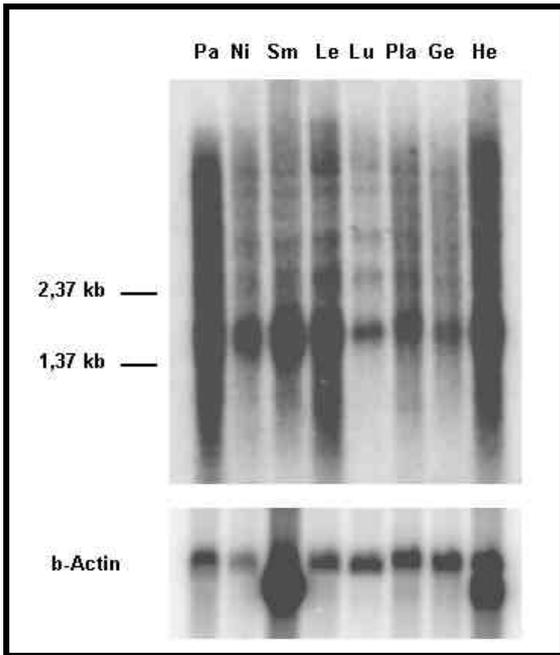


Bild 3.31 Northern Blot unterschiedlicher Gewebe (*multiple tissue northern blot*) mit einer Probe des Gens hkid3_5m9 hybridisiert

Ein *multiple tissue* Northern Blot der Firma Clontech mit je 1 µg poly (A)⁺ RNA pro Bahn, wurde mit einer 3' Sonde des Gens hkid3_5o9 hybridisiert. Als Kontrolle wurde eine β-Actin-Hybridisierung auf demselben Blot durchgeführt. Die Expositionszeit betrug für die hkid3_5o9 Hybridisierung 2 Tage, für die β-Actin-Hybridisierung 20 h. Die Abkürzungen sind Platzhalter für folgende Gewebe:

Pa: Pankreas
Ni: Niere
Sm: Skelettmuskel
Le: Leber
Lu: Lunge
Pla: Plazenta
Ge: Gehirn
He: Herzmuskel

Weitere Homologieabgleiche mit der UniGene-Datenbank ergaben ein Cluster, in das sich der EST einordnen ließ. Zwei Klone dieses Clusters zeigten nach Restriktionsverdaus eine Fragmentlänge von 1,5 kb, die der auf dem Northern Blot nachgewiesenen Größe des Transkriptes entsprechen. Am 3' Ende der Sequenz wurde das poly (A)-Signal ATAAA identifiziert. Mit dem Programm Clustal wurde ein Homologievergleich zu Aminotransferasen des Menschen, der Ratte und *C. elegans* erstellt.

	1				50
hkid3_5m9_orf	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
OAT_human	~~~~~	~~~~~	~MFSKLAHL	QRFAVLSRGV	HSSVASATSV
AT_caeel	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~MSTLVN	ALGFFTSSTP
AT_rat	MSLAWRTLQK	AFYLETSLRI	LQMRPSSLSCA	SRIYVPKLLT	HTKHNMPPCD
	51				100
hkid3_5m9_orf	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
OAT_human	AKKTVGPP	TSDDFEREY	KYG...AHNV	HPLFVALERG	KGIYLWDVEG
AT_caeel	AAAATKIVRS	KEEIKRDK	TIGSKCQIFY	SDDPFMVSRA	SMQYLYDEKS
AT_rat	FSPEKYQSLA	YNHVEIHKQ	HLS.PVNTAY	FQKPLLHQG	HMEWLFDFEG
	101				150
hkid3_5m9_orf	~~~~~	~~~~~CPE	NLAAGRVL	PSAFLS.GKL	LDYSLS....
OAT_human	RKYPDFLSSY	SAVNOGHCHP	KIVNALKSQV	DKLTLSRAF	YNNVLGEYEE
AT_caeel	NKFLDCISNV	QHV..GHCHP	KVVEAISKQL	ATSTCN.VRF	VSTQLTDCAE
AT_rat	NRYLDFFSGI	VTVGVGHCHP	KVTAVAKKQ	DRLWHTSSVF	FHSPMHEYAE

ERGEBNISSE

	151		200
hkid3_5m9_orf	HAHLEGHR.S	EANDLALRLA RHYTGHQDVV VLDHAYHGHL
OAT_human	YITKLEN..Y	HKVILPMNTGV	EAGETACKLA RKWGYTVKGI QKYKAKIVFA
AT_caeel	QLLSTLPG.L	DTVLFCNSGS	EANDLALRLA RDYTKHKDAI VIEHAYHGHV
AT_rat	RLSALLPEPL	KVILFVNSGS	EANDLAMVMA RAYSNHTDII SFRGAYHGCS
	201		250
hkid3_5m9_orf	SSLIDISPYK	FRNLD..GQK	EWVIVVCTAQ LN..... NRLQPSSLS.
OAT_human	AGNFWGRTLS	AISSSTDPTS	YDGFPGPFMPG FDIIP....Y NDLPALERAL
AT_caeel	TTTMEISPYK	FDHGSTVSQP	DWVHVAPCPD VFRG....K HRLADNELTN
AT_rat	BYTLGLTNVG	IYKMK.VPST	IACOSTMCPD VFRGPWGGSH CRDSPVQTVR
	251		300
hkid3_5m9_orfLCP VWE..... ...GRSFP..
OAT_human	Q.....DPN VAAFVVEPIQ GEAGVVVPDP
AT_caeel	EDKLYAAGKQ	YSDDVKSILN	DVE..SRQCG VAAVFAEALQ SCGGQVIPPK
AT_rat	KCSCAPDGCQ	AKERYIEQFK	DTLNSTVATS IAGFFAEPIQ GVNGVVQYPK
	301		350
hkid3_5m9_orfLLAATSP	KWQN.....	EIQVGFGRVG KHFWAFQLQG KDFVDPDIVTM
OAT_human	GYLMGVRELC	TRHQVLFVAD	EIQTGLARTG R..WLAVDYE N.VRPDIVLL
AT_caeel	DYFKDVATHV	RNHGGLMVID	EVQTFGRIG RKYWAHQLYD DGFLPDIVTM
AT_rat	EFLKEALALV	REKGGVCTAD	EVQTFGRIG SHFYGFQTQA T..MPDIVTM
	351		400
hkid3_5m9_orf	GKSIGNG.HP	VACVAATQPV	ARAFEATGVE YFNTFGGSPV SCAVGLAVLN
OAT_human	GKALSGGLYP	VSAVLCDDDI	MLTIKP..GE HGSTYGGNPL GCRVAIAALE
AT_caeel	GKPMGNG.FP	VSAVATRKEI	ADALGG.EVG YFNTYGGNPV ACAAVISVMK
AT_rat	AKGIGNG.FP	MAAVVITPEI	ASSLAK.HLH HFSTFGGSPL ACAIGSAVLE
	401		450
hkid3_5m9_orf	VLEKEQLRDH	ATSVAGFXMQ	LLGKQKIKHP FVGDVRGVGL FIGVDLIKDE
OAT_human	VLEEEENLAEN	ADKLGIIIRN	ELMKL..PSD VVTAVRGKGL LNAIVIKETK
AT_caeel	VVKDENLLEH	SQQMGKLEEV	AIRDLOKKHE CIGDIRGVGL FWGIDLKDR
AT_rat	VIEEENLQRN	SQEVGTYMLL	KFAKLRDEFD IVGDVRGKGL WWGIEMVQDK
	451		500
hkid3_5m9_orf	ATRTAATEEA	AYLVSRLKEN	Y.VLLSTDGP GRNILKFKPP MCFSLDNARQ
OAT_human	D.....WDA	WKVCLRLRDN	G...LLAKPT HGDIIRFAPP LVIKEDELRE
AT_caeel	NTRFDQKLA	IATLALRKS	YGLLNADGP HTNLIKIKPP LCFNENNILE
AT_rat	ISRQELPKTE	VNQTHEDECK	MGLLVGRGGN FSQTFRIAPP MRVTKLEVLD
	501		526
hkid3_5m9_orf	VVAKLDAILT	DMEEKVRSCE	TLRLQP
OAT_human	SIEIINKTIL	SF~~~~~	~~~~~
AT_caeel	TVTALDQVLT	LMNR~~~~~	~~~~~
AT_rat	ALEVERSAIT	QHMERRAK~~	~~~~~

Bild 3.32 Clustal Homologievergleich des Gens hkid3_5m9 und Aminotransferasen verschiedener Organismen

Homologievergleich vier verschiedener offener Leserahmen durch das Programm Clustal des HUSAR Programmpaketes. Zur Gewichtung der einzelnen Aminosäuren wurde eine blosum Matrix verwendet.

OAT_human: humane Ornithin-Aminotransferase; Swissprot Acc. # P04181

AT_caeel: C. elegans mögliche Aminotransferase; Swissprot Acc. # P91408

AT_rat: Ratte Aminotransferase; Swissprot Acc. # Q64565

Farbkodierung:

Blau: 100 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der aufgeführten Proteine

Rot: 75 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der aufgeführten Proteine

Orange: 50 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der aufgeführten Proteine

Bei diesem Abgleich stellte sich heraus, dass es sich bei dem beschriebenen cDNA-Klon nicht um ein volle-Länge Transkript handelte, sondern um eine partiell gespleißte cDNA. Damit ist der offene Leserahmen nicht vollständig.

3.7.3 hkid3_5o9

Dieses EST wurde durch die Sequenzierung (3.2) identifiziert. Die cDNA hatte ein Länge von 205 bp und gehörte zu dem Klon hkid3_5o9. Durch RT-PCR (Bild 3.33) wurde zunächst gezeigt, dass eine differenzielle Expression des Gens im Tumorgewebe vorlag.

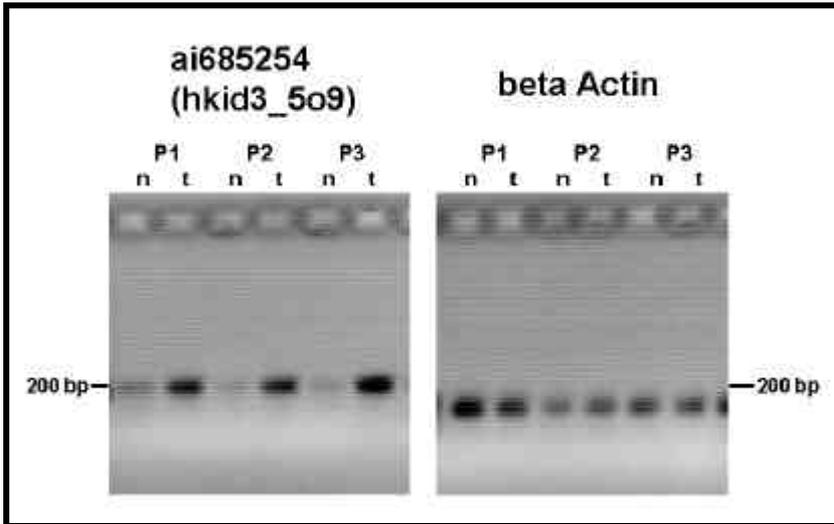


Bild 3.33 RT-PCR-Nachweis des hkid3_5o9 Produktes

2% TAE Agarosegel zur Überprüfung der RT-PCR-Produkte. Es wurden jeweils 10 μ l einer 25 μ l PCR-Reaktion aufgetragen. Die PCR wurde über 30 Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur von 55 $^{\circ}$ C durchgeführt. ai685254: Genbank Accession # der Sequenz auf der die Primer für diese Reaktion gelegt wurden. P1: 96-32382 pT1 G2; P2: 13009 pT4 G2; P3: 00929 pT3b G2, n: Ausgangsmaterial: cDNA von Normalgewebe; T: Ausgangsmaterial: cDNA von Tumorgewebe.

Um eine Bestätigung auch auf Northern Blot-Ebene zu erhalten, wurde zunächst eine Hybridisierung auf total RNA Northern Blots durchgeführt, die jedoch nicht sensitiv genug waren und kein Ergebnis erbrachten. Auf einem poly (A)⁺ Northern Blot mit Material verschiedener Patienten wurde die Expression dieses Gens nachgewiesen (Bild 3.34).

ERGEBNISSE

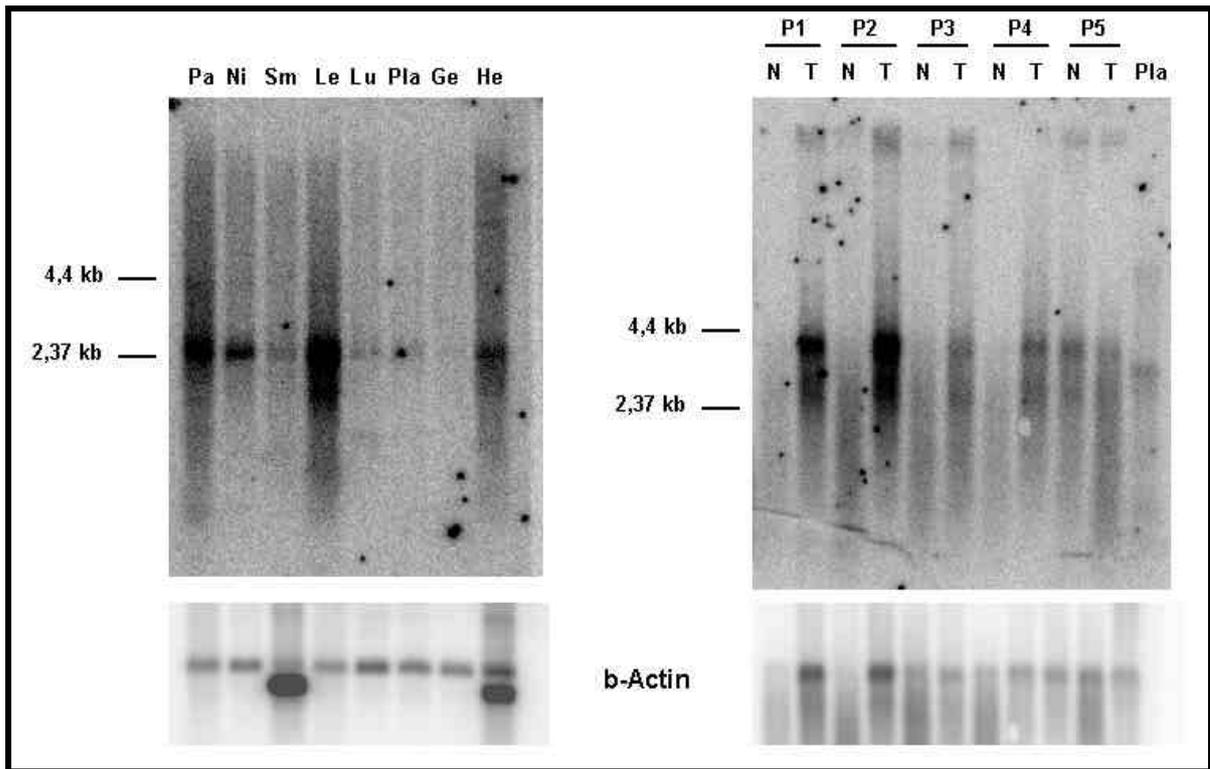


Bild 3.34 Northern Blot Analyse des Gens hkid3_5o9

Beide dargestellten Blots wurden zunächst mit der hkid3_5o9 spezifischen Sonde hybridisiert, anschließend mit einer β -Actin (b-Actin) Kontrollprobe. Die Blots wurden nach hkid3_5o9 Hybridisierung für 4 Tage in einer Phosphorimagerkassette exponiert und anschließend gescannt. Das Scannen nach der b-Actin-Hybridisierung erfolgte nach 22 h Exposition. Links wurde ein *multiple tissue* Northern Blot der Firma Clontech mit je 1 μ g poly (A)⁺ RNA pro Bahn abgebildet. Die Abkürzungen sind Platzhalter für folgende Gewebe:

Pa: Pankreas	Ni: Niere
Sm: Skelettmuskel	Le: Leber
Lu: Lunge	Pla: Plazenta
Ge: Gehirn	He: Herzmuskel

Rechts wurde ein poly (A)⁺ RNA Blot mit je 500 ng RNA pro Bahn dargestellt. Nebeneinander wurde Normal- und Tumormaterial desselben Patienten aufgetragen. Die Einordnung des Materials in verschiedene Stadien ist folgend aufgeführt.

P1: 15466; G2; pT1	P2: 32382; G2; pT1
P3: 21511; G2; pTIIIb	P4: 00929; G2; pTIIIb
P5: 29829; G3; pTIII	

Eine starke Expression dieses neuen Gens wurde in Pankreas, Leber und Herz gezeigt (Bild 3.34). Schwach wird es nur in Skelettmuskel, Lunge, Plazenta und Hirn exprimiert, während eine deutliche Bande in der Nieren-RNA Bahn zu sehen war (Bild 3.34). Im Northern Blot in Bild 3.34 ist neben der 2,5 kb großen Bande eine weitere Bande in einer Höhe von etwa 4,3 kb zu beobachten. Dabei kann es sich um ein alternatives Spleißprodukt handeln, welches tumorspezifisch auftritt, da kein Produkt dieser Größe auf dem *multiple tissue* Northern Blot zu detektieren war. Auf diesem letztgenannten Northern Blot wurden nur Normalgewebe untersucht und keine Tumormaterialien.

Nach Sequenzhomologievergleichen wurde die Sequenz des Gens in ein UniGene-Cluster eingeordnet. Die Gensequenz in diesem Cluster war jedoch nicht vollständig, so dass eine 3'-Probe durch PCR erzeugt wurde. Diese wurde radioaktiv markiert auf verschiedene *high density* Koloniefilter der Bibliotheken DKFZp564 (*human fetal brain*, hfb2), DKFZp566 (*human fetal kidney*, hfk2) und DKFZp435 (hkid5) hybridisiert. Bei den

ERGEBNISSE

Bibliotheken DKFZp564 und DKFZp566 handelt es sich um Bibliotheken, die für volle-Länge-Transkripte ausgerichtet sind, DKFZp435 (*human kidney*, hkid5) ist eine konventionelle cDNA Bibliothek, die aus dem Tumormaterial des Patienten 00929 hergestellt wurde und damit besonders tumorspezifische Gene enthält (3.3.2). Es wurden keine Hybridisierungsergebnisse auf den Filtern der Bibliothek DKFZp566 erzeugt. In der Bibliothek hkid5/ DKFZp435 wurde ein Klon isoliert, der kein volle-Länge-Transkript hatte (hkid5_6l8), jedoch konnte ein Klon (hfb2_5b22) aus 27000 hybridisierten Klonen des DKFZp564 Filters isoliert werden. Nach Sequenzierung ergab sich ein ORF von 1263 bp und eine Gesamtlänge der cDNA von 2189 bp. Das Start ATG lag bei Base 118, das Polyadenylierungssignal ATAAA reichte von den Basen 2171-2176. Nach *in silico* Translation in eine Aminosäuresequenz und folgendem BlastX Homologievergleich zeigten sich diese zu den humanen Genen 3- β -hydroxysteroid Dehydrogenase/delta5-4-Isomerase Typ I und II sowie zu dem Gen *cca2* (Hayashi *et al.*, 1997) der Ratte. Dies wurde deutlich durch die Analyse mit dem Programm Clustal (Bild 3.35).

	1		50
3bh1_human	~~~~~MGW	SCLVTGAGGF	LGQRIIRLLV K.EKELKEIR VLDKAFGPPEL
3bh2_human	~~~~~MGW	SCLVTGAGGL	LGQRIVRLLV E.EKELKEIR ALDKAFRPEL
cca2_rat	MADSAQVPAL	VYLVGTGCGF	LGEHIVRMLL EWEPRRLREL VFDLHLSSWL
hfb2_5b22_orf	MADSAQAQKL	VYLVGTGCGF	LGEHVVRMLL OREPRLGELR VFDQHLGPWL
	51		100
3bh1_human	REFS	SKLQNK	TKLTVLEGDI LDEPFLKRAC QDVSVIIHTA CIIDVFGVTH
3bh2_human	REFS	SKLQNR	TKLTVLEGDI LDEPFLKRAC QDVSVVIHTA CIIDVFGVTH
cca2_rat	EELKT...	GP	VQVTAIQGDV TOAHEVAAAM AGSHVVIHTA GLVDVFGKAS
hfb2_5b22_orf	EELKT...	GP	VRVTAIQGDV TOAHEVAAAV AGAHVVIHTA GLVDVFGRAS
	101		150
3bh1_human	RESIMNVNVK	GTQLLLEACV	QASVPVFIYT SSIEVAGPNS YKEIIQNGHE
3bh2_human	RESIMNVNVK	GTQLLLEACV	QASVPVFIYT SSIEVAGPNS YKEIIQNGHE
cca2_rat	PETIHKVNVO	GTQNVIDACV	QTGTRLLVYT SSMEVVGPNV KGHPFYRGNE
hfb2_5b22_orf	PKTIHEVNVO	GTRNVIEACV	QTGTRFLVYT STWKLWGLTP KGHPFYRGNE
	151		200
3bh1_human	EEPLENTWPA	PYPHSKKLAE	KAVLAANGWN LKNGGTLYTC ALRPMYIYGE
3bh2_human	EEPLENTWPT	PYPYSKKLAE	KAVLAANGWN LKNGDTLYTC ALRPTYIYGE
cca2_rat	DTPYEAIHRH	PYPCSKALAE	QLVLEANGR.
hfb2_5b22_orf	DTPYEAVHRH	PYPCSKALAE	WLVLEANGRK VRGGLPLVTC ALRPTGIYGE
	201		250
3bh1_human	GSRF	SASIN	EALNNGIIS SVGKFSTVN. PVYVGNVAWA HILALRALQD
3bh2_human	GGPF	SASIN	EALNNGIIS SVGKFSTVN. PVYVGNVAWA HILALRALRD
cca2_rat	KGLRFGGRLF	RAIPASVEHG RVYVGNVAWM HILVARELEQ
hfb2_5b22_orf	CHQIMRDFYR	QGLRLGGWLF	RAIPASVEHG RVYVGNVAWM HVLAARELEQ
	251		300
3bh1_human	PKKAPS	IRGQ	FYYISDDTPH QSYDNLNYTL SKEFGLRLD. SRWSFPLSLM
3bh2_human	PKKAPS	VRGQ	FYYISDDTPH QSYDNLNYIL SKEFGLRLD. SRWSLPLTLM
cca2_rat	..RAALMGGQ	VYFCYDKSPY	KSYEDFNMEF LSPCGLRLIG THPLLPYWLL
hfb2_5b22_orf	..RAALMGGQ	VYFCYDGSFY	RSYEDFNMEF LGPCGLRLVG ARPLLPYWLL
	301		350

ERGEBNISSE

3bh1_human	YWIGFILLEIV	SFLLRPTITY	RPPFNRHIVT	LSNSVFTFSY	KKAQRDLAYK
3bh2_human	YWIGFILLEVV	SFLLSPITYS	QPPFNRHTVT	LSNSVFTFSY	KKAQRDLAYK
cca2_rat	VLLTALNALL	QWLLRPLVLY	TPLLNPYTLA	VANTTFVST	NKAQRHFGYK
hfb2_5b22_orf	VFLAALNALL	QWLLRPLVLY	APLLNPYTLA	VANTTSPSAP	TRLSAISAMS
	351				400
3bh1_human	PLYSWEEAK	..Q..KTVEW	VGSLVDRHKE	TLKSKTQ	~~~~~
3bh2_human	PLYSWEEAK	..Q..KTVEW	VGSLVDRHKE	TLKSKTQ	~~~~~
cca2_rat	PLFSWEES	..R.ARTIHW	VQAMEGSAW	~~~~~	~~~~~
hfb2_5b22_orf	PCSRGRVAGP	APFSGYSPLR	VQPSDGGAGA	WRPRYSTSTQ	VPSPHTLDGK
	401				420
3bh1_human	~~~~~	~~~~~			
3bh2_human	~~~~~	~~~~~			
cca2_rat	~~~~~	~~~~~			
hfb2_5b22_orf	GQLHSRAGGR	ALGPEWLSLS			

Bild 3.35 Clustal Homologievergleich der b-hydroxysteroid Dehydrogenase Aminosäuresequenzen

Homologievergleich vier verschiedener offener Leserahmen durch das Programm Clustal des HUSAR Programmpaketes. Zur Gewichtung einzelner Aminosäuren wurde eine blosum Matrix verwendet.

3bh1_human: humane 3-β-hydroxysteroid Dehydrogenase/delta5-4-Isomerase Typ I Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens ;

3bh2_human: humane 3-β-hydroxysteroid Dehydrogenase/delta5-4-Isomerase Typ II Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens;

cca2_rat: Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens des cca2 Gens der Ratte;

hfb2_5b22_orf: Aminosäuresequenz des möglichen offenen Leserahmens des neuen Gens zuerst identifiziert in hkid3_5o9; hfb2_5b22 repräsentiert das volle-Länge Transkript.

Farbkodierung:

Blau: 100 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der aufgeführten Proteine

Rot: 75 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der aufgeführten Proteine

Orange: 50 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der aufgeführten Proteine

3.8 Nierenspezifische Hybridisierungsanalyse

Potenzielle molekulare Markergene, identifiziert und charakterisiert durch die zuvor beschriebenen Experimente, wurden auf einem Spezialfilter zusammengefasst. Dadurch war die Analyse vieler Tumoren mit wenig Material pro Experiment ermöglicht. Dieser Spezialfilter wurde zu weiteren Expressionsstudien eingesetzt. Um einen besseren Überblick über die Einbindung der einzelnen Gene in biochemische Signalwege zu erhalten, wurden zusätzlich bekannte tumorassoziierte Gene auf den Spezialfilter aufgetragen.

3.8.1 Herstellung eines nierenspezifischen cDNA-Arrays

Zur Herstellung des Spezialfilters wurden 114 cDNAs, die durch die vorhergehenden Experimente identifiziert wurden und insgesamt 1800 cDNAs tumorrelevanter Gene, vom RZPD des Humanen Genomprojekts zur Verfügung gestellt, auf einen Filter gedruckt. Dieser Filter entsprach 1/6 der Größe der UniGene-Filter. Die Verringerung der Größe ergab einen großen Vorteil gegenüber dem UniGene-Filterset, da zur Hybridisierung auch nur 1/6 des Ausgangsmaterials der Patienten benötigt wurde. Vor dem Spotten wurden diese Gene mit M13u und M13r Primern amplifiziert, die PCR-Produkte über Agarosegele qualitätsüberprüft und in einem 4 x 4 Muster gedruckt. Eine Qualitätskontrolle der fertigen Filter wurde durch eine Hybridisierung mit einem M13u-Oligo, das zur Amplifikation zuvor

genutzt wurde, durchgeführt. Nur Membranen, die ein gleichmäßiges Druckmuster aufwiesen, wurden zur weiteren Hybridisierung eingesetzt.

3.8.2 Hybridisierung auf tumorspezifische Spezialfilter

Ebenso wie auf die großen UniGene-Filter wurde Patientenmaterial auf die hergestellten Spezialfilter hybridisiert. Insgesamt wurde das Material von 14 verschiedenen Patienten eingesetzt. Im Gegensatz zu den Hybridisierungen der UniGene-Filter wurde auf das in Tabelle 3.2 dargestellte Hybridisierungsschema verzichtet, da es sich nicht um zwei Filter eines Sets handelte, aber auch nicht jede Hybridisierung als Doppexperiment durchgeführt wurde. Die Krankheitsstadien der Patienten sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4 Klassifizierung der Nierentumoren

Patient	Differenzierungsgrad	Stadium
32382	G2	I
15466	G2	I
04764	G2	III
18705	G2	III
18378	G2	III
21511	G2	III
30495	G2	III
21033	G2	III
31821	G2	III
13009	G2	IV
11739	G2	IV
00409	G2	IV
01385	G2	M
06236	G2	M

Die Auswertung der Hybridisierungen erfolgte nach dem paarweisen Schema (3.5). Dazu wurde wieder das Programm fdiffs verwendet. Die Auswertung und die Erstellung der Genliste erfolgte durch Betrachtung der Hybridisierungsergebnisse der Stadien III und IV. Insgesamt wurde bei 63 Genen eine differenzielle Expression nachgewiesen. Die Kriterien, die zur Auswertung angelegt wurden, waren aufgrund des kleineren Probensets strenger als bei den zuvor ausgewerteten Hybridisierungen. Kriterien waren die 3,5fache differenzielle Expression in mindestens 30 % der zu vergleichenden Hybridisierungen (hier Stadium III und IV). Stehen mehr Proben zur Hybridisierung zur Verfügung, ist die Anwendung derselben Kriterien wie bei der Auswertung der komplexen Hybridisierungen auf die UniGene-Filtersets notwendig.

Alle differenziell exprimierten Gene sind in Tabelle 4.1 im Anhang zusammengestellt. Einzelne Gene, die zuvor schon auffielen, wurden wieder identifiziert.

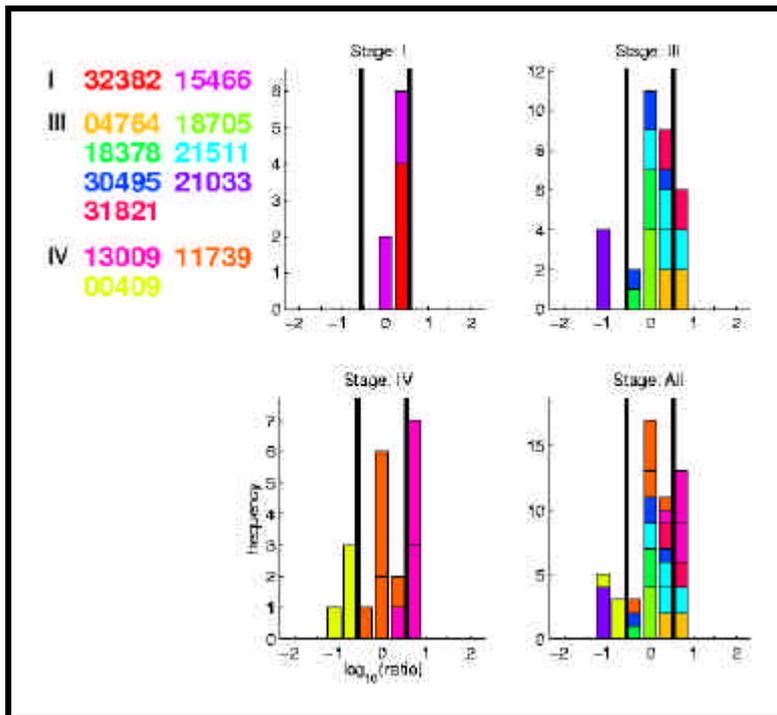


Bild 3.36 Ergebnisse der komplexen Hybridisierung auf nierenspezifische Filter für das Gen Annexin II

Dargestellt wurden die 12 Patienten der Stadien (*Stage*) I, III und IV in verschiedenen Farben (Tabelle 3.4). Aufgetragen wurde die Häufigkeit (*frequency*) der Signale gegen den \log der Verhältnisse (*ratio*) von Tumor/Normal Hybridisierung. Die Höhe der vertikalen Balken ergibt sich aus Anzahl der entsprechenden Signalintensitäten der Duplikatpunkte aus allen Experimenten.

Unter den hochregulierten Genen fiel Annexin II auf (3.6.3). Die Darstellung im Histogramm zeigte eine Intensitätsverteilung (Bild 3.36). Als Kalzium-bindendes Protein ist Annexin II wahrscheinlich auch in der Verbindung der Plasmamembran mit Actin oder anderen Zytoskelett-Elementen beteiligt. Damit ist es im Rahmen der Angiogenese stärker im Tumorgewebe exprimiert.

Als bekannte hochregulierte Gene im klarzelligem Nierenkarzinom wurden unter anderen Vimentin und Clusterin identifiziert. Vimentin ist ein Klasse III Intermediär-Filament, welches auch im Zusammenhang mit dem verstärkten Zellwachstum höher exprimiert wird. Clusterin dagegen ist ein Protein mit verschiedenen Funktionen, das bereits als Markergen für das klarzellige Nierenkarzinom vorgeschlagen wurde.

Herunterreguliert lag auch hier das Metallothionein II, das im Rahmen des Metallothionein-Clusters nach der komplexen Hybridisierung auf die UniGene-Filter deutlich hervortrat. Ebenfalls eine geringere Expression im Tumorgewebe konnte für zwei CXC-Cytokine nachgewiesen werden. Es sind RANTES und BRAK, von denen BRAK in der Northern Blot Analyse eine deutlich geringere Signale auf Tumormaterial zeigte (Bild 3.27) und dieses Verhalten auch für Zellkulturzellen zuvor beschrieben wurde.

4 Diskussion

Die differenzielle Expression von Genen lässt sich mit verschiedenen molekulargenetischen Methoden nachweisen. Die cDNA-Subtraktion (SSH) und die komplexe Hybridisierung auf cDNA-Arrays sind zwei moderne Methoden, die zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene im klarzelligen NZK gegen Normalgewebe mit dem Ziel eingesetzt wurden, neue potenzielle Tumormarker zu identifizieren.

Die Analyse dieser Gene führt zu einem besseren Verständnis der biologischen Mechanismen, die hinter der Tumorentstehung und -entwicklung stehen. Durch die Fähigkeit, stoffwechselphysiologische Zusammenhänge zu erkennen, wird ein besseres Verständnis des Phänomens Krebs sowie eine angepasste Therapie der Tumorerkrankung möglich.

4.1 Methoden zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene

Zur Etablierung und Optimierung der SSH wurden cDNAs von zwei NZK Patienten eingesetzt. Die subtrahierte cDNA-Bibliothek eines Patienten (00929) wurde mit den Methoden der Sequenzierung (3.2) und Rückhybridisierung (3.3) sowie Hybridisierung auf UniGene-Filter (3.5.2) eingehend analysiert (Tabelle 4.1). Dabei wurden differenziell exprimierte Gene nachgewiesen, die sich als potenzielle Tumormarker eignen.

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der Methoden zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene

	subtrahierte cDNA/Probe	komplexe Probe
Sequenzierung zufälliger Klone	x	
Hybridisierung auf Koloniefilter	x	x
Hybridisierung auf UniGene-Filter	x	x
Hybridisierung auf Spezialfilter		x

Mit Hilfe der Methode der komplexen Hybridisierung auf UniGene-Filter wurden ebenfalls differenziell exprimierte Gene identifiziert (3.5.2; Tabelle 4.1). Dazu wurden zehn Patienten analysiert. Auf einem kleineren nierenspezifischen Spezialfilter wurden die cDNAs aus den verschiedenen Hybridisierungsansätzen zusammengefasst und zur Kontrolle noch einmal komplexe Proben von 14 Patienten hybridisiert (3.8.2). Einzelne differenziell exprimierte Gene wurden mit weiteren molekularbiologischen Methoden genauer charakterisiert und sind potenzielle Tumormarker (3.6, 3.7).

4.1.1 cDNA-Subtraktion

Zur Identifizierung von differenziell exprimierten Genen bieten sich verschiedene Techniken, wie RDA, DD, SAGE und SSH an (1.4). Mit der Methode der SSH sollten vor allem schwach exprimierte Gene, die differenziell im Tumor- und im Normalgewebe exprimiert werden, angereichert werden.

Um einen Eindruck der Subtraktions- und Anreicherungs-effizienz zu erhalten, wurden Qualitätskontrollen der Subtraktionseffizienz vorgenommen. PCR-gestützt wurde die Subtraktion des Gens GAPDH nachgewiesen (3.1.4). Eine gute Möglichkeit, die Anreicherung und Subtraktion zu bestätigen, war die Southern Blot Analyse der Subtraktionsprodukte nach PCR-Amplifikation. Damit wurde für das Gen Actin eine Reduktion der cDNA in der Subtraktionsfraktion und für das Gen VEGF eine Anreicherung des Materials belegt (3.1.4). Somit war gezeigt, dass die Subtraktion erfolgreich verlief und das hergestellte Material eine sehr gute Basis für weitere Versuche bot.

Die Analyse der Subtraktionsbibliotheken erfolgte durch vier verschiedene experimentelle Ansätze (Tabelle 4.1, alle Kombinationen der Spalte *subtrahierte cDNA* und die Kombination *komplexe Probe* und *Hybridisierung auf Koloniefilter*). Ein erster Ansatz war die Sequenzierung zufällig ausgewählter Klone der TN-Subtraktionsbibliothek. Die drei anderen basierten methodisch auf Hybridisierungen. Auf die Koloniefilter der Subtraktionsbibliotheken (3.3) wurde zum einen eine komplexe Probe, zum anderen die subtrahierten cDNAs hybridisiert. Für den dritten Hybridisierungsansatz wurden die subtrahierten cDNAs auf das UniGene-Filterset hybridisiert.

In dem ersten Ansatz, der Sequenzierung zufällig ausgewählter Klone, wurden cDNAs identifiziert, die zu Genen gehören, deren differenzielle Expression im klarzelligen Nierenzellkarzinom bekannt war, z.B. VEGF (Brieger *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 1999) oder Clusterin (Parczyk *et al.*, 1994) (1.3). Dies bestätigte erneut das erfolgreich verlaufende Experiment, da molekulare Marker des klarzelligen NZK identifiziert wurden. Auffallend bei den zufällig ausgewählten Klonen war der große Anteil an, im Tumormaterial stärker exprimierten, ribosomalen Genen (unter Translation zusammengefasst, Bild 3.5) und der ebenfalls hohe Anteil von 24 % an nicht identifizierten Genen. Diese Kategorie umfasst alle Gene, von denen nur Teilstücke bekannt sind (ESTs) oder deren Funktion nicht charakterisiert wurde. Einige dieser unbekannt Genen wurden mit anderen molekularbiologischen Methoden untersucht und wurden als differenziell exprimiert bestätigt. Sie sind potenzielle neue Tumormarker (4.4). Nach der Analyse durch die Sequenzierung folgten Hybridisierungsexperimente. Mit der Hybridisierung auf die Koloniefilter der TN-Subtraktionsbibliothek sollten falsch positive

Klone, die in der Liste der zufällig sequenzierten Klone wahrscheinlich noch auftraten, eliminiert werden.

Nach komplexer Hybridisierung von NZK-Proben (Patient 00929, RNA war Ausgangsmaterial eines Subtraktionsexperimentes) und Proben normaler Niere auf einen Koloniefilter der TN-Subtraktionsbibliothek wurden durch manuelle Auswertung 254 stärker exprimierte cDNAs des NZK isoliert. Diese 254 cDNAs ließen sich 67 Genen zuordnen (Tabelle 7.5). Ribosomale Gene (28 %) und mitochondriale Gene (19 %) bildeten die beiden Hauptfraktionen. Wesentlich geringer fiel der Anteil an nicht-charakterisierten Genen aus (8 %).

Die Rückhybridisierung der radioaktiv markierten subtrahierten cDNAs auf die Koloniefilter der TN-Subtraktionsbibliothek ergab ein wiederum anderes Bild. Hier betrug die Summe aller identifizierten Gene 20 von 56 sequenzierten Klonen. Dies Ergebnis spiegelte die hohe Redundanz einzelner Gene, z.B. des Gens für das ribosomale Protein S18 (tritt 29 mal auf), wider. Es wurden keine nicht-charakterisierten Gene identifiziert (Tabelle 7.6). Die Hybridisierung der subtrahierten Bibliotheken auf die Koloniefilter der TN-Subtraktionsbibliothek ergab ein sehr reduziertes Bild der differenziell exprimierten Klone. Es gaben nur solche Klone ein manuell auswertbares Signal, die insgesamt starkes exprimiert wurden (z.B. das ribosomale Protein S18). Es wurden vor allem Klone nachgewiesen, die schon durch mindestens eine der beiden zuvor beschriebenen Methoden (Sequenzierung und komplexe Hybridisierung auf Koloniefilter) als differenziell exprimiert im Tumor dokumentiert wurden, wie z.B. β_2 -Microglobulin (4.2.1). Hier stieß das System der Koloniefilter jedoch auf seine Sensitivitätsgrenze, da zum einen auf Koloniefiltern weniger DNA gebunden vorlag als auf PCR-Filtern, zum anderen gaben Zellreste der Bakterien einen unspezifischen Hintergrund, der schwache echte Signale durch ein schlechtes Signal/Rausch Verhältnis überdeckte. Ein weiterer Nachteil dieser Experimente war die Notwendigkeit der manuellen Auswertung der Hybridisierungen. Schwache Signale und Signalunterschiede wurden nicht erkannt. Gene, die ein starkes Signal gaben und damit ohne Computerunterstützung gut erkannt wurden, lagen nach der Auswertung in hoher Redundanz vor (Tabelle 7.6). Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass die Kombination der Hybridisierung auf Koloniefilter und manueller Auswertung nicht sensitiv genug war, komplette Expressionsprofile zu erstellen. Sie eignete sich jedoch für eine erste Charakterisierung von cDNA-Bibliotheken und die Suche nach einzelnen differenziell exprimierten Genen.

Ein verändertes Bild zeigte sich bei der Hybridisierung der subtrahierten Bibliotheken auf die UniGene-Filter. Die Auswertung erfolgte automatisiert durch Bildverarbeitungs- und Analyseprogramme. So wurden insgesamt 160 verschiedene Gene durch die TN-Hybridisierung auf die UniGene-Filter identifiziert. Dies sind die Gene, die ausgehend von

dem Tumormaterial spezifisch angereichert wurden (1.4.1 und 3.5.2). Davon sind 57 % nicht-charakterisierte Gene (Bild 3.15). Ein ähnliches Ergebnis gab die Hybridisierung der NT-cDNA auf die UniGene-Membranen. Dort ließen sich 80 % der Signale nicht-charakterisierten Genen zuordnen. Die Analyse dieser nicht-charakterisierten Gene wird in Zukunft noch weiter verfolgt. Exemplarisch wurden in dieser Arbeit fünf bekannte und drei nicht-charakterisierte Gene näher untersucht (3.7, 3.6, 4.1.3, 4.3, 4.4).

Die Hybridisierung von Subtraktionsbibliotheken gegen ein menschliches Genset, immobilisiert als PCR-Produkte auf Nylonmembranen, stellt eine sehr effektive und sensitive Methode der Analyse dar. Die Methode der Hybridisierung von subtrahierten cDNAs auf immobilisierte cDNA-Sets wurden von anderen Wissenschaftlern in abgewandelter Form angewandt (Yang *et al.*, 1999). Zur Identifizierung therapierelevanter Gene gegen Prostatakrebs wurde die Kombination von Microarrays und SSH von Xu *et al.* eingesetzt (Xu *et al.*, 2000). Mit einem ähnlichen Ansatz wurden Gene identifiziert, die in rheumatoiden Geweben differenziell exprimiert wurden (Zanders *et al.*, 2000). Zur Analyse der SSH war der Ansatz der Hybridisierung der Subtraktionsprodukte auf UniGene-Filter ein guter experimenteller Aufbau, da zum einen der Erfolg der Subtraktion anhand von bekannten NZK Tumormarkern nachgewiesen wurde, zum anderen viele unbekannte Gene identifiziert wurden. Letztere bilden einen großen Pool potenzieller Tumormarker.

4.1.2 Erstellen von Expressionsprofilen mit Nucleinsäure-Arrays

Die Methode der Hybridisierung auf *high density PCR filter*, hier die UniGene-Filter, wurde ebenfalls zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene eingesetzt. Durch computergestützte Berechnungen ist die Redundanz einzelner Gene in diesem Genset minimiert (1.4.2) und bei der Herstellung des Arrays berücksichtigt worden. Als interne Kontrollklone sind jedoch einzelne Gene gezielt durch mehrere cDNAs vertreten. Sie machen etwa 20 % aller cDNAs auf den UniGene-Filtern aus. Nach Hybridisierungen sollten alle cDNAs eines Gens ein gleiches Signal geben. War dies nicht der Fall, konnte während der Hybridisierung ein Fehler aufgetreten sein, der die Auswertung des Hybridisierungsexperimentes erschwerte oder unmöglich machte.

Die Hybridisierung auf Membranen ermöglichte die parallele Analyse von 31500 cDNAs (1.4.2). Dazu wurden auf dem Filter gebundenen cDNAs PCR-amplifiziert und die PCR-Produkte auf die Membranen gedruckt und nicht direkt Bakterienkolonien mit entsprechendem Plasmid. Hybridisierungen von subtrahierten cDNAs auf Koloniefilter zeigten, dass selbst diese zum Erstellen von Expressionsprofilen niedrig exprimierter Gene nicht sensitiv genug sind (4.1.1).

Neben den auf Membranen oder *glas slides* immobilisierten cDNAs wurde zur Hybridisierung die komplexe Probe benötigt (2.2.14.3). Der Ursprung der Proben können

Gewebeproben von Patienten oder Zellkulturzellen sein. Für die Hybridisierungen auf Membranen wurde, unter Berücksichtigung der Spotkapazität, weniger Patientenmaterial benötigt als für vergleichbare Arbeiten auf *glas slides* (Bertucci *et al.*, 1999; Duggan *et al.*, 1999). Da das Gewebe von Patienten oft der limitierende Faktor eines solchen Experimentes ist, bieten die hier eingesetzten Membranen (UniGene-Filter) einen großen Vorteil. Soll ein ähnliches Experiment auf *glas slides* durchgeführt werden, müsste ein Amplifikationsschritt zwischengeschaltet werden, um genug Ausgangsmaterial für ein Experiment zu erhalten. Dieser Amplifikationsschritt kann zu einer Verschiebung (*bias*) des Expressionsprofils führen. Damit wäre die Qualität jener Ergebnisse schlechter als die Qualität der hier durchgeführten Experimente.

Wurde die Anzahl der zu untersuchenden Gene verringert, bot es sich an, mit Microarrays, membran- oder glasbasierend, weiterzuarbeiten. Die Herstellung des tumorspezifischen Spezialfilter/Arrays (3.8) ist ein Schritt zur Vorbereitung von Microarrays. Auf den nierenspezifischen Filter wurden die tumorrelevanten Gene auf ihre differenzielle Expression überprüft. Ein Vorteil dieser nierenspezifischen Filter war, dass weniger Material zur Hybridisierung eingesetzt werden musste als für die Hybridisierungen auf die UniGene-Filter. Weiterhin war diese Methode zeitsparend, da weniger, dafür aber spezifisch ausgewählte cDNAs amplifiziert und auf Membranen oder *glas slides* gedruckt werden mussten. Die Hybridisierung wurde mit Material von 14 Patienten verschiedener Stadien durchgeführt und es wurde die differenzielle Expression der durch die komplexe Hybridisierung auf UniGene-Filter identifizierten Gene verifiziert (Tabelle 7.10).

In Zukunft könnten die für die tumorspezifischen Filter selektierten Gene auf einen Glasobjektträger gedruckt werden. Expressionsprofile von vielen Patienten könnten durch die Hybridisierung fluoreszenzmarkierter Proben auf *glas slides* in einem noch kürzeren Zeitraum erstellt werden, als mit der auf Radioaktivität beruhenden Hybridisierungsmethode, da es keine Abklingphasen mehr einzuhalten gälte. Weiterhin ist durch die Arbeit mit *glas slides* eine Automatisierung einzelner Arbeitsschritte, wie z.B. die der Hybridisierung, möglich. Damit bietet diese Methode die Möglichkeit, Hochdurchsatzexperimente durchzuführen. Liegen nur tumorrelevante Gene auf dem Glasobjektträger vor, ließe sich schnell ein Bild der differenziell exprimierten Gene im Patientenmaterial erstellen, das auf lange Sicht zur Diagnose in Routinelabors eingesetzt werden könnte.

4.1.3 Vergleich der Methoden SSH und der komplexen Hybridisierung auf cDNA-Arrays

Werden die beiden Methoden der SSH und der komplexen Hybridisierung miteinander verglichen, so lässt sich zusammenfassen, dass die Identifizierung differenziell exprimierter Gene mit beiden Methoden möglich ist. Es zeigten sich jedoch deutlich unterschiedliche Schwerpunkte.

Während bei der SSH verschiedene physiologische Zustände einer einzelnen Probe untersucht werden, hier waren es Tumor- und Normalgewebe von zwei Patienten, die jedoch unabhängig voneinander bearbeitet wurden (Diatchenko *et al.*, 1999), werden bei der komplexen Hybridisierung viele Proben verschiedener Patienten miteinander verglichen (Skena *et al.*, 1995). Die experimentelle Information aus der SSH bezieht sich also nur auf das Material eines Patienten, während die Ergebnisse der komplexen Hybridisierung durch den Vergleich der Ergebnisse vieler Versuche mit dem Material verschiedener Patienten entstehen. Die limitierte Patientenzahl der SSH ergibt sich aus dem komplizierten Versuchsaufbau, der nicht zu automatisieren ist. Um eine erfolgreiche Subtraktion zu gewährleisten, müssen nach jedem Versuchsschritt Kontrollen durchgeführt werden (3.1). Damit eignet sich diese Methode nicht alleine zur Hochdurchsatzanalyse, im Gegensatz zu der komplexen Hybridisierung (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2 Vergleich der SSH und der komplexen Hybridisierung auf cDNA-Arrays

+ : ja o : mittel - : nein

	SSH	komplexe Hybridisierung auf cDNA-Arrays
Sensitivität	+	o
Hochdurchsatzanalyse	-	+
Automatisierbarkeit	-	+
Analyseaufwand	o	o
niedriger Materialbedarf	-	o
Identifizierung unbekannter Sequenzen	+	-

Gegen den Einsatz der SSH als Hochdurchsatzmethode spricht auch die hohe Menge an Ausgangsmaterial (2 µg poly (A)⁺ RNA). Nur in Einzelfällen ist es möglich, ausreichend humanes Material für ein solches Experiment zu sammeln, soll nicht eine Amplifikation der RNA vorgeschaltet werden. Ein großer Vorteil der SSH ist hingegen die sehr hohe Sensitivität. Die in dieser Arbeit durch SSH als differenziell identifizierten unbekanntes Gene (4.4) konnten jeweils nicht durch die komplexe Hybridisierung bestätigt werden. Ebenso ließen sie sich nicht auf einem total RNA Northern Blot nachweisen. Der Nachweis der differentiellen Expression wurde ausschließlich durch die RT-PCR und die Hybridisierung auf einen poly (A)⁺ Northern Blot erbracht (Bild 3.29, Bild 3.34).

Ein weiterer Unterschied zwischen der SSH und der Hybridisierung auf ein cDNA-Array ist, dass bei der Hybridisierung auf das Array die Sequenz aller gespotteten cDNA zumindest teilweise bekannt ist. Gene mit komplett unbekannter Sequenz werden deshalb nicht untersucht. Dagegen ergibt sich durch die SSH die Möglichkeit, gänzlich unbekannte, differenziell exprimierte Gene, z.B. über die Ansequenzierung von Klonen der subtrahierten Bibliothek, zu identifizieren (Tabelle 4.2).

Die Kombination der SSH mit der Hybridisierung auf cDNA-Arrays erscheint daher sinnvoll. Durch die Kombination beider Methoden wird die höhere Sensitivität der SSH mit der Möglichkeit des Hochdurchsatz-Experimentes durch das cDNA-Array verbunden (Wang *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1999). Die Hybridisierung der subtrahierten cDNAs auf die UniGene-Filter bestätigte schon als differenziell beschriebene Gene (wie β_2 -Microglobulin) und führte zur Identifizierung vieler potenziell differenziell exprimierter Gene unbekannter Funktion, die weiterer Analyse bedürfen (Tabelle 7.7, Tabelle 7.8).

4.2 Hochregulierte Gene des klarzelligen NZK

4.2.1 β_2 -Microglobulin

β_2 -Microglobulin ist die β -Kette der Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse I-Moleküle (*major histocompatibility complex*, MHC I). Der Nachweis der höheren Expression dieses Gens im Tumorgewebe wurde durch alle in dieser Arbeit eingesetzten molekularbiologischen Methoden erbracht (RT-PCR, Northern Blot Analyse, komplexe Hybridisierung, 3.6.1). Für das klarzellige NZK ist diese stärkere Expression des Gens auf molekulargenetischer Ebene bisher noch nicht beschrieben worden.

MHC I und MHC II-Moleküle binden im Zytosol Peptide, die aktiv zum endoplasmatischen Reticulum transportiert werden. Die Peptide werden von den MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert und können dort durch T-Zellen erkannt werden. Diese leiten dann die Zerstörung der antigenpräsentierenden Zelle ein.

Immunhistochemische Untersuchungen verschiedener Tumoren, wie Melanome, Brustkrebs, Darmkrebs und Nierenzellkarzinom ergaben, dass in den primären Melanomen HLA Klasse I-Antigene (HLA I; *human leucocyte antigen*) exprimiert werden, in Metastasen diese Expression jedoch abnimmt. Für das klarzellige NZK wurde immunhistochemisch β_2 -Microglobulin in Zellen des Primärtumors dokumentiert, während in Zellen, die in die Blutgefäße eindringen sowie in Metastasen β_2 -Microglobulin nicht mit einem Antikörper nachgewiesen werden konnte (Cordon-Cardo *et al.*, 1991). Für Melanome, Darmkrebs und Lymphome wurde der Verlust der HLA I-Moleküle mit der Mutation des β_2 -Microglobulin-Gens begründet. Durch Punktmutationen oder Deletion

sowie Leseraster-Mutationen des Gens wird das Protein entweder inaktiv oder nicht mehr exprimiert (Benitez *et al.*, 1998; Hicklin *et al.*, 1997; Perez *et al.*, 1999). Ist keine HLA I-Expression vorhanden, können die Krebszellen nicht von der Immunabwehr erkannt werden und entgehen den zelleigenen Erkennungsmechanismen zur Zerstörung dieser Zellen. Dies könnte ein Schritt der Tumorprogression sein.

Im klarzelligen NZK wurde dagegen eine stärkere Expression nachgewiesen als im korrespondierenden Normalgewebe (Bild 3.17, Bild 3.18). Eine falsch positive Reaktion durch mit Normalgewebe kontaminiertem Tumormaterial war hier wie bei allen anderen Experimenten unwahrscheinlich, da die histochemische Überprüfung des eingesetzten Materials einen > 95 % Anteil an Tumorzellen in den Tumorgewebeproben ergab. Ein methodischer Fehler ist ebenfalls unwahrscheinlich, da β_2 -Microglobulin mit unabhängigen molekularbiologischen Methoden als stärker exprimiert im Tumorgewebe nachgewiesen wurde (3.6.1). Da das Gen stärker im Tumor- als im Normalgewebe exprimiert wird, liegt wahrscheinlich keine Mutation des Gens vor, die für Melanome und andere Krebsarten beschrieben wurde. Die erhöhte β_2 -Microglobulin-Expression könnte ein Bestandteil der sich gegen die Tumorzellen richtenden Immunantwort sein und bedarf in diesem Zusammenhang weiterer Untersuchung.

4.2.2 Nascent-Polypeptide-Associated Complex (NAC)

Bei NAC handelt es sich um einen heterodimeren Proteinkomplex, der sich aus einer α - und einer β -Kette zusammensetzt. Die α -Kette wird im Tumormaterial stärker exprimiert als im normalen Nierengewebe. Dieser Expressionsvergleich mit den Methoden der komplexen Hybridisierung und cDNA Subtraktion zeigt hier zum ersten Mal dieses Ergebnis, das anschließend auch mit sensitiven, klassischen molekularbiologischen Methoden bestätigt wurde (3.6.2).

Der NAC-Proteinkomplex kann verschiedene Funktionen innerhalb der Zelle ausführen. Als Komplex bindet NAC an naszierende Polypeptidketten, die durch das Ribosom synthetisiert werden. Diese Polypeptidketten haben zunächst noch nicht das vollständige Signalpeptid. NAC bindet an diese Polypeptidketten und verhindert dadurch einen Transport durch an die Signalsequenzen bindende Proteine (*signal recognition particles*, SRPs), die zusammen mit anderen Proteinen das 'Zielprotein' zum Translokationsort leiten. Erst wenn die Signalsequenzen vollständig ausgebildet sind, entlässt NAC die Polypeptidketten, SRP kann binden und die Proteine werden signalspezifisch sortiert (Lauring *et al.*, 1995; Wiedmann *et al.*, 1994). Die β -Kette ist der *basic transcription factor 3* (btf3). Er bindet stabil an die RNA-Polymerase II und ist damit an der Initiierung der Transkription beteiligt (Zheng *et al.*, 1990). Für α -NAC sind ebenfalls Transkriptions-aktivierende Eigenschaften beschrieben worden (Yotov und St-Arnaud, 1996). α -NAC

wechselwirkt mit dem TATA-binding-protein (TBP) und mit dem Transkriptionsaktivator GAL4/VP16. Transfektionsstudien zeigten eine Aktivierung der Transkription durch α -NAC (Yotov *et al.*, 1998). Ein Modell für die Interaktion zwischen α -NAC, TBP und dem Transkriptionsfaktor c-Jun wurde im Rahmen der Untersuchung der Osteoblasten-Differenzierung vorgeschlagen. Danach wirkt α -NAC während der Knochenentwicklung als Cofaktor, der die Interaktion von c-Jun und TBP stabilisiert (Moreau *et al.*, 1998).

Die Auswertungen der TN-Subtraktionsbibliothek durch komplexe Hybridisierung (Bild 3.19) führte zu der Identifizierung des α -NAC-Gens. Im Zusammenhang mit dem klarzelligen NZK könnte dieses Protein sowohl auf der Ebene der Translation als Proteinkomplex als auch auf der Ebene der Transkription als Cofaktor aktiv sein. Beide Funktionen sind im Zusammenhang mit der Krebsentstehung und Proliferation von Interesse. In dem dominant vererbten Nierenkarzinom in Ratten (Eker-Ratten-Modell) konnte eine erhöhte Expression von c-Jun im Vergleich zu normalem Nierengewebe der Ratte nachgewiesen werden (Urakami *et al.*, 1997). Diese erhöhte c-Jun-Expression könnte durch einen ähnlichen Mechanismus wie von Moreau *et al.* beschrieben unterstützt werden. Damit wäre es möglich, dass α -NAC auch im Nierenkarzinom des Menschen eine ähnlich Rolle einnimmt und damit als Cofaktor transkriptionsverstärkend wirkt (Moreau *et al.*, 1998).

Die differenzielle Expression dieses Gens lässt sich auf molekularer Ebene verwerten. Es könnte im Rahmen eines Tumorarrays als Marker für das klarzellige NZK eingesetzt werden. Liegt eine Schlüsselfunktion als transkriptionsverstärkender Cofaktor vor, so würde eine Hemmung dieses Faktors, z.B. durch Zerstörung spezifischer Bindungsstellen, auch den transkriptionsverstärkenden Effekt verhindern. Damit würde eine zum Zellwachstum führende Signalkaskade unterbrochen und dieses eingeschränkt.

4.2.3 Annexin II

In dieser Arbeit wurde eine verstärkte Expression des Gens im klarzelligen NZK durch alle eingesetzten Expressionsanalysemethoden gezeigt (3.6.3). In verschiedenen anderen Krebsarten wurde die mRNA und das Protein als überexprimiert nachgewiesen. Beispiele sind der Pankreastumor (Chiang *et al.*, 1993; Vishwanatha *et al.*, 1993), Gliome und Glioblastome multiforme (Reeves *et al.*, 1992; Roseman *et al.*, 1994) sowie das humane heptazelluläre Karzinom (Frohlich *et al.*, 1990). Ein erhöhter Spiegel von Annexin II wurde in Venenseren von an Nierenzellkarzinom erkrankten Patienten nachgewiesen. Dies gab Hinweise auf eine lokale Produktion dieses Proteins (Aarli *et al.*, 1997).

Annexin II wurde in vielen verschiedenen Organismen nachgewiesen, angefangen beim Schleimpilz, über Pflanzen bis hin zu Tieren und dem Menschen. Es kann in

verschiedenen Formen in der Zelle vorliegen, als Monomer, Heterodimer und Heterotetramer.

Die physiologischen Funktionen dieses Proteins sind vielfältig. Es wurde eine Beteiligung an der Ca^{2+} -abhängigen Exozytose, der Endozytose und der Zell-Zell-Adhäsion vorgeschlagen (Mai *et al.*, 2000). Für die an der Zelloberfläche liegenden Proteine Annexin II und den Heterotetramer-Komplex ist bekannt, dass sie Rezeptoren und Bindungspartner für viele Polypeptidliganden sind. Mai *et al.* spekulieren, dass der Annexin II Heterotetramer-Komplex eine Colokalisation von Proteasen und ihren Substraten auf der Zelloberfläche ermöglicht und damit zum einen zu einer Aktivierung von Proenzymen in der proteolytischen Kaskade führen, zum anderen ein selektiver Abbau der extrazellulären Matrix stattfinden kann (Mai *et al.*, 2000). Der Abbau der extrazellulären Matrix ist ein Teil der Tumorprogression und würde die erhöhte Expression des unterstützenden Proteins Annexin II im klarzelligen NZK erklären. Extrazelluläres Annexin II kann eine Rolle innerhalb verschiedener biologischer Prozesse spielen, z.B. Plasminogenaktivierung, Tenascin-C-vermittelte Signaltransduktion, Zell-Zell-Adhäsion, Zell-Matrix-Interaktionen und Immunglobulintransport (Siever und Erickson, 1997). Da die Expression von Annexin II Hinweise auf eine verstärkte Tumorprogression gibt, bietet dieses Gen sich ebenfalls als prognostischer Faktor an.

4.3 Herunterregulierte Gene des klarzelligen NZK

4.3.1 Kininogen

In Säugetieren lassen sich drei Typen von Kininogenen unterscheiden, das *high molecular weight* (HMW), das *low molecular weight* (LMW) und das T-Kininogen. Letzteres wurde bisher nur in der Ratte nachgewiesen. Kininogene werden primär in der Leber synthetisiert. Es wurde aber auch der Nachweis von Kininogenen in der Niere erbracht (Hermann *et al.*, 1996). Durch die Hybridisierung der Subtraktionen und komplexer Proben wurde Kininogen im Rahmen dieser Arbeit als schwächer exprimiert im klarzelligen NZK als im normalen Nierengewebe nachgewiesen (3.6.4). Diese Ergebnisse wurde durch eine Northern Blot Analyse bestätigt (Bild 3.25).

HMW- und LMW-Kininogen werden durch alternatives Spleißen eines Kininogen-Gens erzeugt. Zu Beginn der Untersuchungen dieser Proteine wurde angenommen, dass ihre Funktion ausschließlich in dem Transport der vasoaktiven Kinine lag. Kinine sind hochaktive Polypeptide, die durch proteolytische Spaltung von Kininogen durch die Protease Kallikrein freigesetzt werden. Nach der Spaltung liegen dann die aminoternale schwere Kette und die carboxyterminale leichte Kette neben dem Kinin vor. Kinine beeinflussen die Kontraktion der glatten Muskelzellen, sie setzen den Blutdruck herab und

erhöhen die Gefäßpermeabilität. Sie sind damit Teil der zum Renin-Angiotensin-Aldosteron-System antagonistischen Reaktionskette. Im Rahmen dieser Arbeit war eine Einordnung des Kininogens in dieses Systems zusammen mit seinen Antagonisten erstmalig möglich (Bild 4.2 und 4.5.2). Eine weitere Funktion des HMW-Kininogens liegt in der Initiierung der Wundheilungs-Kaskade (Muller-Esterl *et al.*, 1986). Es wurde gezeigt, dass Kininogene potente Inhibitoren der Cysteinproteasen, wie z.B. der Cathepsine sind (Muller-Esterl *et al.*, 1985). Damit gehört Kininogen zu den endogenen Cystein-Protease-Hemmern, die unter dem Oberbegriff Cystatin zusammengefasst werden. Zu der Cystatin-Familie gehören Stefine, Cystatine, Kininogene und nicht-hemmende Proteine, wie das humane Histidin-reiche Glycoprotein (Kos und Lah, 1998).

Vor allem die Fähigkeit der Kininogene, Proteasen wie Cathepsin B, H und L zu inhibieren (Salvesen *et al.*, 1986), gewinnt im Zusammenhang mit der malignen Progression von Tumoren an Bedeutung. Im Verlauf der malignen Progression wird die extrazelluläre Matrix von Karzinomzellen invadiert und abgebaut. Der Abbau verschiedener extrazellulärer Matrix-Proteine geschieht durch Proteasen, z.B. Kollagenasen, die spezifisch Kollagen abbauen und zu den Matrix-Metalloproteasen gehören. In verschiedenen Tumoren wurden unterschiedliche Proteasen nachgewiesen. Cathepsine konnten unter anderem in den Seren von Patienten mit Brust-, Darm-, Lungen-, Leber- und Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden und wurden als biologische Marker für die Tumorprogression vorgeschlagen (Kos und Lah, 1998). Für HMW-Kininogen wurden Grundlagen für den anti-adhäsiven Effekt nachgewiesen, durch die Spaltung der Integrin-abhängigen zellulären Kontakte (Chavakis *et al.*, 2000).

Die Untersuchung des Kininogens ist im Bezug auf das Tumorwachstum von besonderer Bedeutung, da es wie Annexin II Einfluss auf den Abbau der extrazellulären Matrix hat. Diese beiden Proteine sind Bestandteil proteolytischer Kaskaden, wobei durch die Abwesenheit des Inhibitors Kininogen Proteasen im Tumor aktiviert vorliegen können. Eine Aktivierung der Expression von Kininogen in Tumoren könnte zu einer Verzögerung des Abbaus der extrazellulären Matrix führen und damit auch zu einer Verlangsamung der malignen Progression.

4.3.2 BRAK

Das Chemokin BRAK wurde zunächst in Brust- und Nierengewebe (***Breast and Kidney***) entdeckt (Hromas *et al.*, 1999). Sowohl durch die komplexe Hybridisierung als auch durch Northern Blot Analyse wurde hier gezeigt, dass BRAK im klarzelligen NZK schwächer exprimiert wurde als im normalen Nierengewebe (3.6.5). Die Untersuchung von Chemokinen ist in dem Kontext der Krebserkrankung interessant, da diese Proteine die Aktivierung und Chemotaxis von Leukozyten regulieren sowie an vielen Krankheitsprozessen, wie z.B. rheumatische Arthritis, beteiligt sind. Sie lassen sich

aufgrund der Lage der ersten zwei konservierten Cysteine in zwei verschiedene Gruppen einteilen, die CC- und CXC-Chemokine (Oppenheim *et al.*, 1991). Weiterhin haben einige CXC-Chemokine Angiogenese-regulierende Eigenschaften. Haben die Chemokine ein ERL-Motiv (ERL+), so sind sie Angiogenese-fördernd, fehlt ihnen dieses Motiv (ERL-), so haben sie angiostatische Wirkung. BRAK ist ein (ERL-)-CXC-Chemokin. Durch Über- oder Unterexpression dieser Faktoren kommt es während der Tumorentstehung zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen (ERL+)- und (ERL-)-Chemokinen (Moore *et al.*, 1998). In vitro wurde die Expression von BRAK in vielen Normalgeweben nachgewiesen. Jedoch wurde in nur zwei von achtzehn Krebszelllinien eine Expression gezeigt (Hromas *et al.*, 1999). *In situ* Hybridisierungen auf verschiedenen Normal- und Krebsgeweben bestätigten diesen Trend, es wurde jedoch eine Coexpression von BRAK in inflammatorischen Zellen auf colorektalen Krebsgewebeschnitten belegt (Frederick *et al.*, 2000). Damit besteht die Möglichkeit, dass BRAK ein Angiogenese-hemmendes Chemokin ist. Als Angiogenese-hemmender Faktor könnte BRAK auch in der Niere auftreten. Durch komplexe Hybridisierung auf nierentumorspezifische Membranen (Tabelle 7.10) wurde BRAK als niedriger im Tumor- als im Normalgewebe exprimiert identifiziert. Die Northern Blot Analyse bestätigte diese Ergebnisse. Durch die geringe Expression dieses Gens im Tumormaterial ist dort eine verstärkte Angiogenese möglich. Damit würde die Invasion der Tumorzellen in das umgebende Gewebe unterstützt und die maligne Progression des Tumors vorangetrieben. Auch hier würde eine Steigerung der Proteinexpression zu einer Verzögerung der malignen Progression der Tumoren führen. Diese Steigerung könnte durch die Entwicklung spezifischer transkriptionsfördernder Medikamente erreicht werden.

4.4 Nicht-charakterisierte hochregulierte Gene des klarzelligen NZK

4.4.1 Unbekanntes Gen hkid3_4a21

Für das Gen hkid3_4a21 liegt keine Analyse des offenen Leserahmens vor, da dieser nicht vollständig bekannt ist. Die Expression dieses Gens in Normalgeweben verschiedener Organe lag unterhalb der Detektionsgrenze von Northern Blots, da kein Ergebnis nach Hybridisierung auf einen *multiple tissue* Northern Blot erzielt wurde. Es wurden keine Signale nach langer Expositionszeit detektiert (3.7.1). Die Expression wurde für das klarzellige NZK, durch einen poly (A)⁺ Northern Blot mit Tumormaterial nachgewiesen. Versuche, den offenen Leserahmen dieses Gens durch 5'-RACE oder Screening von verschiedenen cDNA-Bibliotheken zu vervollständigen, waren nicht erfolgreich. Die Suche nach einem volle-Länge-Transkript in cDNA-Bibliotheken führte zu einem 1080 bp langen Klon. Da der 5'-Bereich der Sequenz sehr GC-reich ist, deuten alle Ergebnisse, die mit Datenbankabgleichen erhalten werden, auf eine prolinreiche Sequenz hin. Prolinreiche Abschnitte sind in vielen Proteinen zu finden. Dadurch lassen sich keine Aussagen über mögliche Funktionen dieser RNA und des resultierenden Proteins treffen. Abgleiche mit Motiv-Datenbanken wie SMART (Schultz *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 1998) blieben erfolglos, so dass auch hier keine Information über eine mögliche Funktion zur Verfügung steht. Im Rahmen von Funktionsanalysen wäre eine genaue Lokalisation des Gens bzw. des Proteins in der Zelle hilfreich. Auf RNA-Ebene bietet sich hier die Analyse der *in situ* Hybridisierung an, bei der mit einer RNA-komplementären Sonde auf Gewebeschnitte hybridisiert wird. Die Signale der hybridisierten Moleküle geben dann Aufschluss über die Orte der Transkription. Diese Experimente bedürfen nicht eines kompletten offenen Leserahmens, während die Versuche der subzellulären Lokalisation des Proteins diesen voraussetzen. Damit bieten sich viele weitere Untersuchungsmöglichkeiten.

4.4.2 Gen mit Homologie zu Ornithin-Aminotransferase (OAT)

Das Gen hkid3_5m9 zeigt starke Homologie zu der humanen Ornithin-Aminotransferase und zu einer möglichen Aminotransferase von *C. elegans* und der Ratte (Bild 3.32). Es wird stärker im Tumormaterial exprimiert. Dies wurde anhand von RT-PCR und Northern Blot Analysen gezeigt.

Ornithin-Aminotransferase katalysiert die reversible Transaminierung von Ornithin zu Glutamat Semialdehyd. Es ist ein mitochondriales Enzym und wird in vielen Geweben exprimiert. Dies wurde für das neue, nicht-charakterisierte Gen ebenfalls bestätigt (Bild

3.3). Das 5'-Ende des OAT-Homologs fehlt, da der durch Hybridisierung identifizierte positive Klon etwa der erwarteten Länge eines OAT-Transkriptes im Vergleich mit den Homologen entsprach, jedoch dieser Klon teilweise ungespleißt war. Werden die Homologen mit dem neu isolierten Transkript verglichen, so fehlen etwa 150 bis 300 bp am 5'-Ende der Sequenz.

Arginin und Ornithin sind Vorläufer der Polyamine. In stark wachsenden Geweben wurde eine stärkere Expression der Polyamine Spermidin und Putrescin nachgewiesen. Als proliferierendes Gewebe sind im Tumor die Polyamin-Biosynthese, -Interkonversion und -Aufnahme verstärkt (Pegg und McCann, 1982). In Fibroblasten und epithelialen Zellen von Ratten wurde eine wachstumsunterstützende Wirkung der Polyamine gezeigt (Tabib und Bachrach, 1999). Damit ist die stärkere Expression im klarzelligen NZK dieses neuen OAT-Homologs zu erklären.

Untersuchungen an Ratten ergaben ferner, dass in der Niere Östrogen und das Thyroid-Hormon (3',3,5-Triiodthyronin, T₃) die OAT-Synthese um das 13fache bzw. das 2fache erhöhen konnten (Mueckler *et al.*, 1984; Mueckler und Pitot, 1983). Es wurde weiterhin beschrieben, dass auf der Ebene der Translation Östrogen aktivierend wirkt, während das Thyroid-Hormon T₃ auf der Ebene der Transkription eine 6fach höhere Transkription der OAT in Retinoblastomzelllinien bewirken konnte (Fagan und Rozen, 1993).

Die Beziehung zwischen Ornithin-Synthese und -Konversion ist im Zusammenhang mit dem klarzelligen NZK noch nicht geklärt. Dennoch ist diese neue Form einer OAT ein guter molekularer Marker für das klarzellige NZK. Funktionelle Studien dieses Gens sollten angeschlossen werden. Diese können z.B. Aufschluss geben über die Auswirkung dieses Gens auf die Polyaminherstellung.

4.4.3 Gen mit Homologie zu 3- β -hydroxysteroid Dehydrogenase (b3DH)

Das Gen mit Homologie zu 3- β -hydroxysteroid Dehydrogenase wurde durch SSH isoliert. Northern Blot Analyse bestätigte die differenzielle Expression des Gens im klarzelligen NZK, ebenso RT-PCR (Bild 3.33, Bild 3.34). Da es nur schwach im Tumormaterial exprimiert wird, konnte es nur auf poly (A)⁺ RNA Northern Blots nachgewiesen werden.

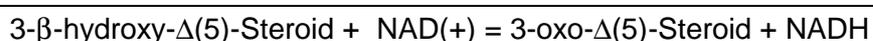
Gene für 3- β -hydroxysteroid Dehydrogenasen liegen geclustert auf dem Chromosom 1p13.1 (Morissette *et al.*, 1995). Neben den zwei humanen Formen (HSD3B1 und HSD3B2) wurden noch fünf Pseudogene kloniert (McBride *et al.*, 1999), die ebenfalls auf dem Chromosom 1p13.1 lokalisiert sind. Die Homologie des neuen Gens ist am stärksten zu dem Ratten-Gen *cca2* (Hayashi *et al.*, 1997). *Cca2* (confluent 3Y1 cell associated No.2) ist ein 338 Aminosäuren langes Protein (Bild 3.35), das aus wachstumsgehemmten Zellen isoliert wurde. Dazu wurde die Methode des *Differential Display* eingesetzt und

DISKUSSION

normal wachsende mit wachstumsgehemmten Zellen verglichen. Die Expression dieses Proteins führte jedoch nicht zu einer Unterdrückung des Zellwachstums, so dass die biologische Funktion unklar ist (Hayashi *et al.*, 1997).

Die humane Form HSD3B1 wird in Plazenta und Haut exprimiert und in geringen Mengen in Brust, Testes und Ovarien. Die Expression von HSD3B2 ist gewebespezifisch in Testes und den Ovarien (Rheaume *et al.*, 1991). Die Überprüfung der gewebeabhängigen Expression des Homologs zeigte auf einem *multiple tissue* Northern Blot Signale in fast allen Geweben, außer dem Gehirn (Bild 3.34). Damit verhält es sich anders als die beiden vorgestellten humanen Homologe HSD3B1 und HSD3B2.

Das Homolog 3- β -hydroxysteroid Dehydrogenase katalysiert verschiedene Reaktionen in der Mineral-, Glucocorticoid- und Sexualhormon-Biosynthese vom Typ:



Es ist damit an der Initialisierung der Steroid-Biosynthese beteiligt (Morel *et al.*, 1997; Sutcliffe *et al.*, 1996). Lokalisiert ist es im endoplasmatischen Reticulum und in der mitochondrialen Membran. Um die Lokalisation des neu identifizierten Homologs festzustellen, bietet sich die Fusion des exprimierten Proteins mit einem *green fluorescent protein* (GFP)-Anteil als Folgeexperiment an. Wird ein Protein mit einem solchen Fusionsanteil in eine Zelle transfiziert, lässt sich durch Fluoreszenzmikroskopie dieses Protein und seine Lokalisation in der transfizierten Zelle erkennen (Simpson *et al.*, 2000). Dies gibt Hinweise auf eine mögliche Funktion.

Liegt eine genetische Veränderung der humanen 3- β -hydroxysteroid Dehydrogenase vor, so ist sie in vielen Fällen letal. Oft sterben die Patienten an hohem Salzverlust, da auch die Synthese der Mineralcorticoide, die der Aufrechterhaltung des Salzhaushaltes dienen, durch das mutierte Gen unterbrochen ist. Damit könnte es auch Bestandteil des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) sein. Gene dieses blutdruckregulierenden Systems sind im klarzelligen NZK hochreguliert und führen so zu einer Erhöhung des Blutdrucks (4.5.2). Der Nachweis der krankheitsspezifischen Regulation dieses Stoffwechselweges wurde in dieser Arbeit erstmalig erbracht (Bild 4.2).

4.5 Veränderungen in Stoffwechselwegen im klarzelligen NZK

4.5.1 Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels im klarzelligen NZK

Die Methode der komplexen Hybridisierung auf einer großen Gensammlung bietet die Möglichkeit, sowohl stoffwechselphysiologische Zusammenhänge als auch Signalkaskaden (4.5.2), die spezifisch für ein Gewebe sind, zu identifizieren.

Es ließen sich die unterschiedlich regulierten Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels nachweisen. Für einzelne Enzyme der Glykolyse und Glukoneogenese konnten zuvor schon unterschiedliche Enzymaktivitäten in normaler Niere und klarzelligem NZK bestimmt werden (Steinberg *et al.*, 1992). Diese Unterschiede zeigen deutlich eine Aktivierung der Glykolyse und eine Deaktivierung der Gluconeogenese. Dass eine Veränderung des Kohlenhydratstoffwechsels während der Krebsentstehung stattfindet, wurde gezeigt (Bannasch, 1986). Um den erhöhten Energiebedarf der proliferierenden Zelle zu decken, findet verstärkt die Glykolyse statt. Insgesamt wurden durch die komplexe Hybridisierung auf die UniGene-Filter fünf differenziell exprimierte Gene dieses Stoffwechselweges identifiziert (Tabelle 7.9; Bild 4.1 blaue Beschriftung), die in Übereinstimmung mit der Literatur stehen. Weitere vier Gene wurden durch die Hybridisierungen der Subtraktionen auf die UniGene-Membranen (Tabelle 7.7, Tabelle 7.8) identifiziert (Bild 4.1 violette Beschriftung).

Der Vergleich mit den Expressionsdaten der komplexen Hybridisierung auf die UniGene-Filter (Tabelle 7.9) bestätigt die Ergebnisse aus der Literatur und erweitert diese. Mit dieser Methode wurden nahezu lückenlos die beteiligten Enzyme als differenziell exprimiert nachgewiesen. Damit ist gezeigt, dass sich die Methode der komplexen Hybridisierung auch zur Analyse von Stoffwechselwegen eignet. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, die differenzielle Genexpression innerhalb eines gesamten Stoffwechselweges als Referenz für die Detektion und Analyse des klarzelligen NZKs einzusetzen.

DISKUSSION

Glykolyse und Glukoneogenese im klarzelligen NZK

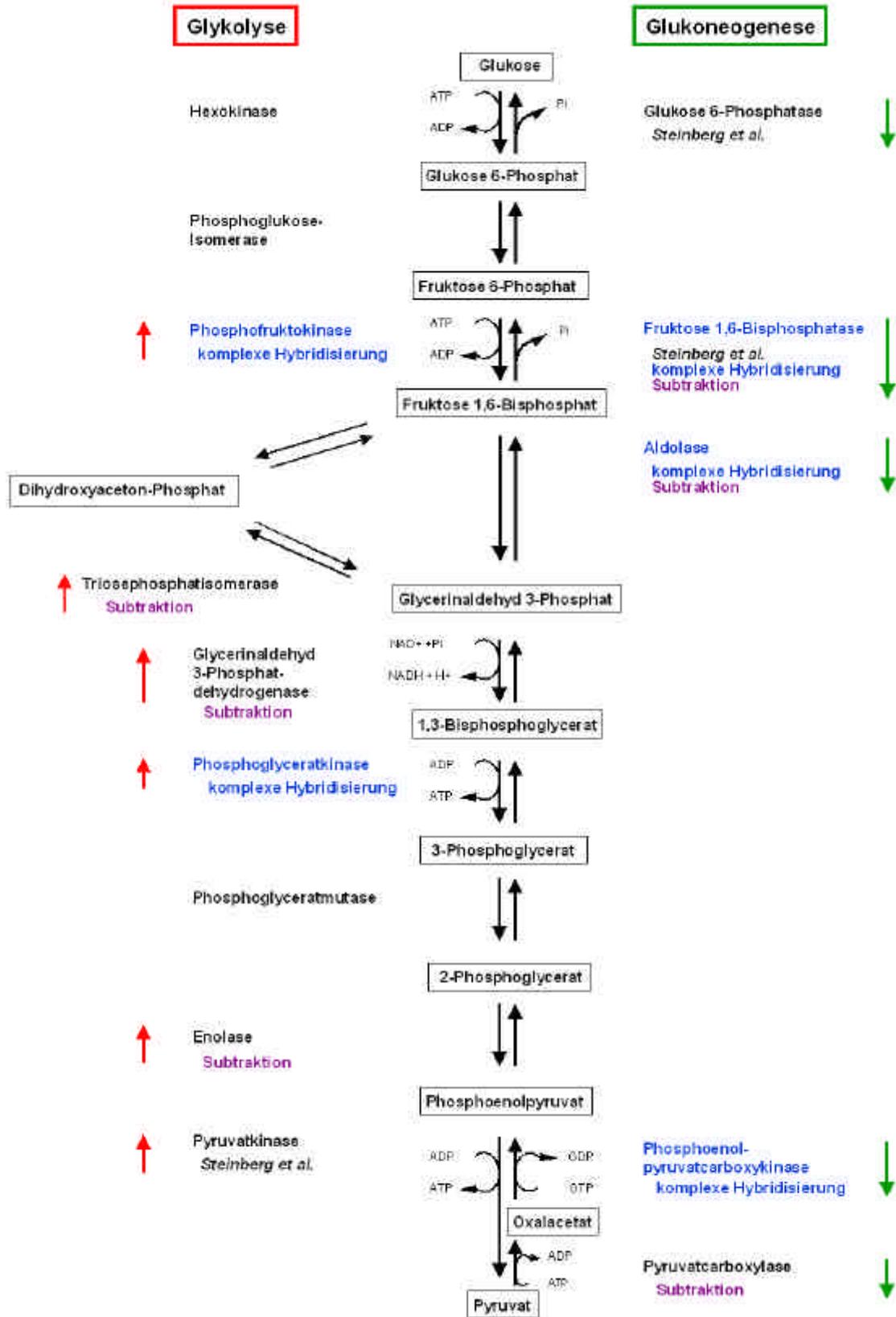


Bild 4.1 Regulation der Glykolyse und Glukoneogenese im klarzelligen NZK

Schematische Darstellung der Regulation der Glykolyse und Glukoneogenese im klarzelligen NZK. Die differenzielle Expression der beteiligten Gene wird mit kleinen roten und grünen Pfeilen hinter den Enzymnamen angedeutet. Roter Pfeil: stärkere Expression des Gens im Tumor. Grüner Pfeil: stärkere Expression des Gens im Normalgewebe. Blaue Schrift: Gen wurde durch die komplexe Hybridisierung auf UniGene-Filter identifiziert. Violette Schrift: Gen wurde durch die

Hybridisierung der Subtraktionen auf UniGene-Filter identifiziert. *Steinberg et al.*: Enzymaktivität wurde in Enzym-Assays nachgewiesen (*Steinberg et al.*, 1992).

4.5.2 Einfluss des klarzelligen NZK auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Wie in der Einleitung am Beispiel des VHL-VEGF-Verhältnisses dargestellt, kann die veränderte Expression eines Gens zu einer Veränderung einer gesamten Signalkaskade oder einer Stoffwechselweges führen (1.1.2).

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist eine Reaktionskette zur Regelung von Blutdruck, Blutvolumen und der Konzentration an gelösten Salzen im Blutplasma. In dieser Arbeit wurde eine verstärkte Expression einzelner Gene dieses Systems im Tumor nachgewiesen. Außerdem lässt sich das hier beschriebene 3- β -hydroxysteroid Dehydrogenase-Homolog als neu identifiziertes Gen möglicherweise in diesen Stoffwechselweg einfügen. Zusätzlich wurde der Nachweis erbracht, dass Gene des antagonistischen Stoffwechselweges schwächer im Tumor exprimiert werden (Bild 4.2). Hier ist besonders das Gen Kininogen zu erwähnen, dessen differenzielle Expression im klarzelligen NZK nicht bekannt war und dessen Aufgabe im Stoffwechsel nicht auf diesen einen Weg beschränkt ist (4.3). Damit wurde gezeigt, dass die Kombination aus cDNA-Subtraktion und komplexer Hybridisierung sich hervorragend zur Identifizierung und Analyse antagonistischer Stoffwechselwege eignet. Zusätzlich lassen sich ausgehend von einem differenziell exprimierten Gen dieses Weges, dem Angiotensin II-Rezeptor Ia, Verknüpfungen und Abhängigkeiten zu anderen differenziell exprimierten Genen erkennen (Bild 4.3).

Renin steht am Anfang der RAAS-Reaktionskette. Es wird in der Niere bei niedrigem Blutdruck und entsprechend verminderter Durchblutung, bei Natriummangel und Stress gebildet. Eine erhöhte Renin-Produktion wurde in einigen klarzelligen NZKs beobachtet, die sich durch die nicht ausreichende Durchblutung der Niere aufgrund des starken Tumorwachstums erklären ließe (*Steffens et al.*, 1992). Renin ist eine Protease und überführt Angiotensinogen in Angiotensin I. Angiotensin I wird wiederum durch das Enzym ACE (Angiotensin converting enzyme) in das aktive Hormon Angiotensin II überführt. Dieses Proteinormon wirkt auf der einen Seite direkt gefäßverengend auf die Arteriolen, auf der anderen Seite stimuliert es die Freisetzung weiterer Hormone. So werden die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nebennierenmark freigesetzt. Aldosteron wird aus der Nebenniere und ADH (antidiuretisches Hormon) aus der Hypophyse abgegeben. Aldosteron bewirkt, dass in den Nieren verstärkt Natrium und Wasser zurückgehalten werden und Kalium ausgeschieden wird. Das durch die Subtraktion identifizierte 3- β -hydroxysteroid Dehydrogenase-Homolog (4.4.3) könnte an der Aldosteronsynthese beteiligt und damit Bestandteil dieser Reaktionskette sein. ADH

DISKUSSION

unterstützt das Zurückhalten von Wasser in den Nieren. Damit steigen Natriumkonzentration und Blutvolumen, was zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt. Als antagonistischer Stoffwechselweg ist der Kininogen-Bradykinin-Weg bekannt. Durch proteolytische Spaltung wird Bradykinin freigesetzt. Kinine setzen den Blutdruck herab und erhöhen die Gefäßpermeabilität (4.3). Da Bradykinin jedoch von ACE metabolisiert und damit inaktiviert wird, ist diese Reaktionskette unterbrochen. Dies resultiert in der Blutdruckerhöhung und damit auch zu einer verbesserten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Tumors.

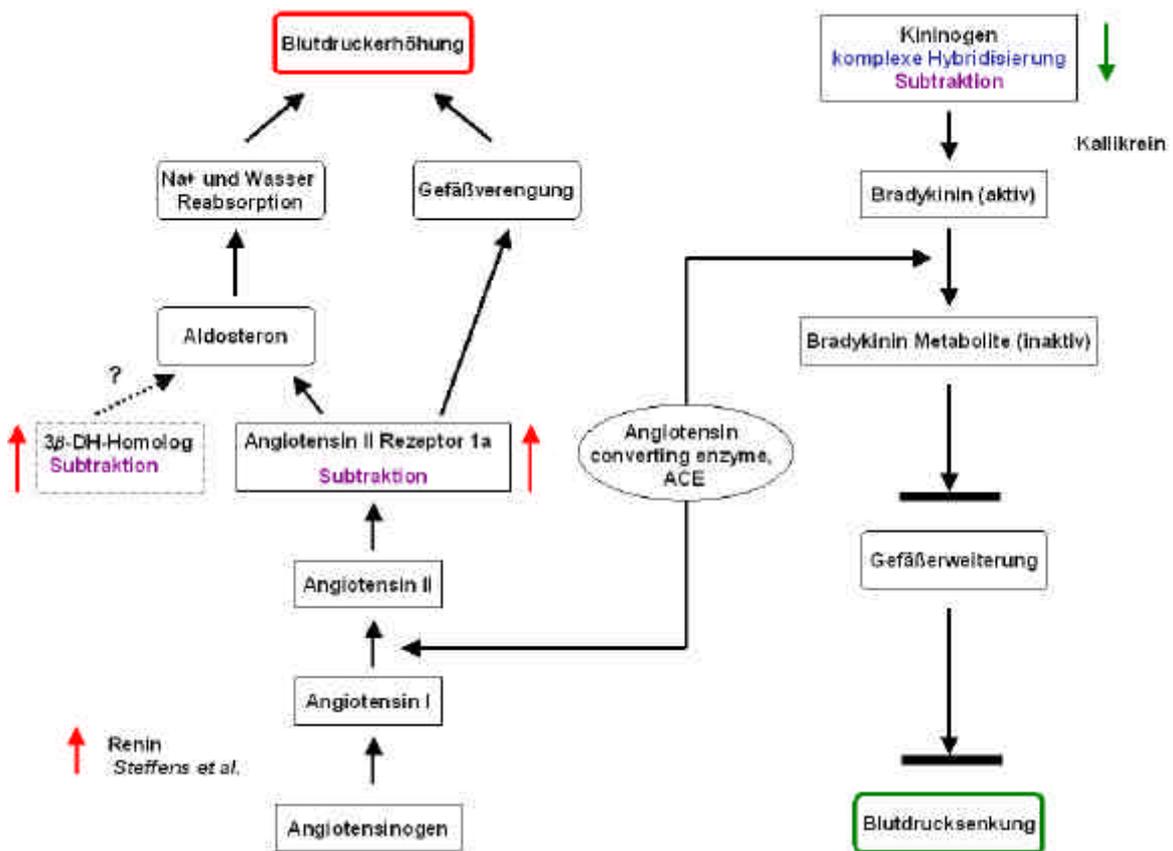


Bild 4.2 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Darstellung zweier antagonistischer Reaktionsketten. Links sind die Reaktionen des RAAS aufgeführt, rechts die des Kininogen-Weges. Rote Pfeile: stärkere Expression des Gens im klarzelligen NZK. Grüne Pfeile: stärkere Expression des Gens im normalen Nierengewebe. Violette Schrift: durch Subtraktionshybridisierung auf UniGene-Filter als differenziell exprimiert identifiziert. Blaue Schrift: durch komplexe Hybridisierung auf UniGene-Filter als differenziell exprimiert identifiziert. Steffens et al.: Literaturhinweis auf (Steffens et al., 1992).

Der Angiotensin II-Rezeptor 1a leitet die von Angiotensin II ausgelösten, intrazellulären Signale weiter. Seine differenzielle Expression im klarzelligen NZK wurde durch die Hybridisierung der Subtraktionen auf UniGene-Filter gezeigt. Durch Untersuchungen mit Rezeptor-Antagonisten in verschiedenen glomerulären Tierkrankheitsmodellen wurden die mRNA-Gehalte verschiedener Gene in Bezug auf die Hemmung des Angiotensin II-Rezeptor 1a untersucht (Kim und Iwao, 2000). Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit vieler

extrazellulärer Matrix Proteine (ECM-Proteine) (z.B. Laminin, Fibronectin, Kollagene) sowie von dem *transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1) (Bild 4.3).

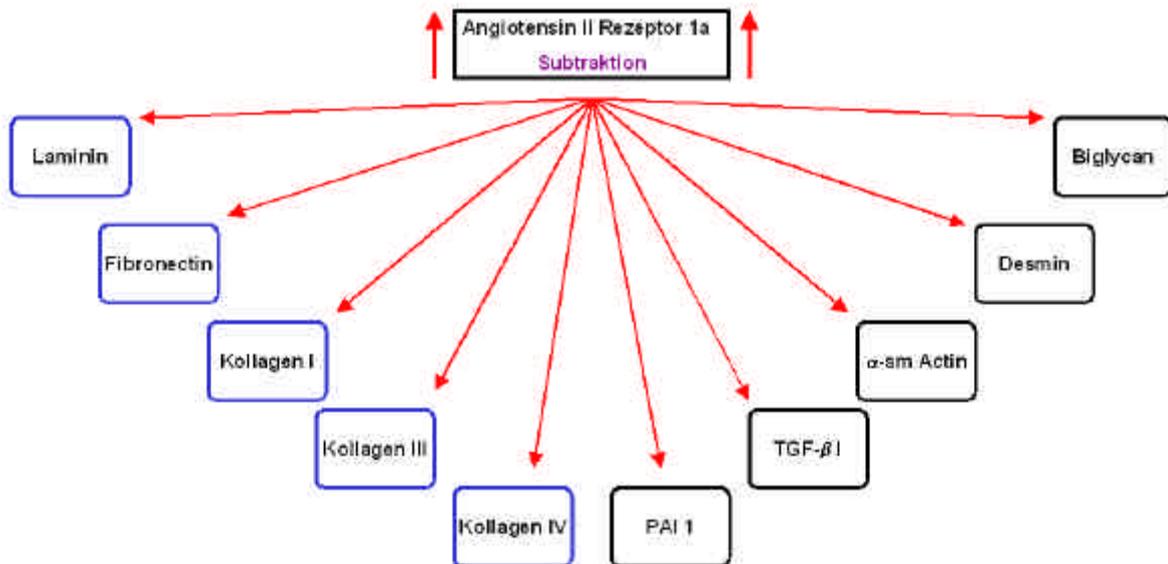


Bild 4.3 Genaktivierung durch den Angiotensin II-Rezeptor 1a

Darstellung der Genaktivierung durch einen differenziell im Tumorgewebe exprimierten Angiotensin II Rezeptor 1a. Violette Schrift: durch Hybridisierung der Subtraktionsbibliotheken auf Unigene-Filter als differenziell im Tumor exprimiert identifiziert, blauer Rahmen: differenzielle Expression im Tumorgewebe; durch komplexe Hybridisierung auf UniGene-Filter identifiziert. Alle aufgeführten Gene wurden in verschiedenen Versuchen durch Rezeptorantagonisten in unterschiedlichen glomerulären Krankheitsmodellen als abhängig vom Angiotensin II Rezeptor 1a beschrieben (Kim und Iwao, 2000).

Zusätzlich zu den in Bild 4.3 zusammengefassten Genen (blau gerahmt) wurden durch die komplexe Hybridisierung weitere Gene der ECM als differenziell exprimiert identifiziert (Tabelle 7.9). Besonders hervorzuheben ist das *human transforming growth factor- β induced gene product* (BIGH3). Es bindet an Kollagene und ist damit wahrscheinlich an der Zell-Kollagen-Interaktion beteiligt. Da BIGH3 TGF- β -induziert ist, wird eine weitere Stufe innerhalb dieser Reaktionskette erreicht. Damit wurden durch diese Experimente Zusammenhänge deutlich, die zuvor durch Einzelgenanalysen nicht nachgewiesen werden konnten. Die gezielte Hemmung einzelner Gene innerhalb dieser Kaskade könnte zu einer Verzögerung bzw. zur Stagnation des Tumorwachstums führen.

4.6 Therapieansätze für das NZK

Ein Charakteristikum des Nierenzellkarzinoms ist das Fehlen einer guten Früherkennung, da Symptome erst zu einem späten Zeitpunkt der Tumorentwicklung bei den Patienten auftreten. Die konventionelle Methode der Untersuchung bei einem Krankheitsverdacht ist die Sonographie der Nieren, durch die Tumoren größenabhängig identifiziert werden können. Größere Tumoren lassen sich in ein späteres Tumorstadium einordnen, was einhergeht mit einer schlechteren Prognose für den Patienten. Die Identifizierung der

Tumoren in einem späten Stadium führt zu einem hohen Anteil an Patienten mit Metastasen, was die Behandlung der Tumoren erschwert und eine Heilung fast unmöglich macht (Motzer *et al.*, 1996). Damit wird deutlich, dass die Entwicklung neuer Methoden zur Früherkennung notwendig sind.

Die in dieser Arbeit als differenziell exprimiert identifizierten Gene könnten als molekulare Marker zur Früherkennung eingesetzt werden. Wird durch RT-PCR auf cDNA des Nierengewebes oder aus Blutzellen eines potenziellen Patienten die Expressionslevel der hier diskutierten, möglichen molekularen Markergenen bestimmt, wie z.B. α -NAC, Kininogen oder dem 3- β -hydroxysteroid Dehydrogenase-Homolog, so ist eine Aussage über die Erkrankung möglich.

Um die Relevanz potenzieller molekularer Marker für das klarzellige NZK festzustellen, muss die Expression der interessierenden Gene jedoch zunächst in vielen NZK-Patienten nachgewiesen werden, erst dann ist eine statistische Absicherung der Ergebnisse möglich. Ohne statistische Auswertung kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um individuelle Expressionsschwankungen einzelner Patienten handelt. Diese individuellen Schwankungen können, neben anderen experimentellen Artefakten, ein Grund für die Ergebnisse der RT-PCR Versuche sein. 40 % der getesteten Gene zeigten die erwartete stärkere Expression im Tumormaterial aller drei Patienten. Bei 21 % der Gene wurde die differenzielle Expression in zwei von drei Patienten und bei 17 % in einem von drei Patienten (Tabelle 3.1, Bild 3.9) festgestellt. Insgesamt wurde bei 38 % der getesteten Genen patientenabhängige Schwankungen detektiert. Die Expression potenzieller Tumormarker sollte zusätzlich in anderen Nierenerkrankungen überprüft werden, um die spezifischen, NZK-abhängigen Expressionsveränderungen von Sekundäreffekten, die auf allgemeine Nierenkrankheiten zurückzuführen sind, unterscheiden zu können. Gleichzeitig müssten in Patientenanalysen größere Zahlen von Tumormarkergenen analysiert werden, um trotz Heterogenitäten einzelner Patienten für bestimmte Gene signifikante Aussagen treffen zu können.

Sollen nicht nur einzelne Gene überprüft werden, sondern mehrere hundert, um gleichzeitig Veränderungen innerhalb von Reaktionsketten beobachten zu können, so bietet sich die komplexe Hybridisierung auf ein *Subset*, wie die in dieser Arbeit beschriebenen tumorspezifischen Spezialfilter (3.8) oder *glas slides* an. Da diese Methode jedoch aufwändiger ist als eine RT-PCR und Gewebematerial zur Herstellung der Proben benötigt wird, sollte diese zur besseren Klassifizierung von Tumoren eingesetzt werden. Durch eine genauere Klassifizierung der Tumoren ist eine auf den jeweiligen Patienten optimierte Therapie möglich, mit der in Zukunft Art und Umfang von Nebenwirkungen minimiert werden sollen.

Ist die Prävention gescheitert, werden verschiedene Therapieansätze zur Bekämpfung des klarzelligen Nierenkarzinoms eingesetzt. Der einzige zur Zeit vollkommen heilende Ansatz nicht metastasierender Tumoren der Stadien I und II ist die komplette chirurgische Entnahme der Niere (Giberti *et al.*, 1997). Liegen schon Metastasen vor, hat die Entnahme des Primärtumors nur einen palliativen Effekt.

Chemotherapie hatte in den meisten Fällen keinen positiven Effekt auf die Entwicklung des Tumors. Sowohl hormonelle als auch cytotoxische Chemotherapeutika zeigen nur sehr begrenzte Wirkung (Yagoda *et al.*, 1995). Ein Beispiel ist der Einsatz von Toremifene, einer Substanz, die mit hoher Affinität an zytoplasmatische Östrogenrezeptoren bindet und damit die Wirkung anderer Therapeutika verstärken sollte. Sie zeigte einen Wirkungsgrad von 17 %, was im Vergleich zu anderen Substanzen hoch ist (Gershanovich *et al.*, 1997, Yagoda, 1995). Eine andere Art der Therapie wurde von A. L. Harris vorgeschlagen, der bei dem VHL-Syndrom die Möglichkeit der anti-VEGF-Therapie sieht. Er schlägt vor, VEGF-Rezeptoren mit Medikamenten zu blockieren, um die Angiogenese und damit ein Fortschreiten des Krebses zu verhindern bzw. zu verlangsamen. Erste Studien mit dem VEGF-Tyrosin-Kinase-Inhibitor SU5416 werden durchgeführt (Harris, 2000). Eine solche Art der Therapie wäre auch für andere Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren denkbar. Würden etwa Rezeptorblocker für den Angiotensin II-Rezeptor 1a eingesetzt, wie dies im Tiermodell für andere Krankheiten beschrieben wurde (Kim und Iwao, 2000), würde die Expression vieler ECM Proteine und auch TGF- β unterdrückt (4.5.2). Dies könnte sich wachstumshemmend auf den Tumor auswirken.

Vorgeschlagen wurde die Chemoprävention für Patienten mit erhöhtem Risiko einer NZK-Erkrankung. Durch die Gabe von natürlichen oder synthetischen Medikamenten mit geringer Toxizität soll das Tumorstadium unterdrückt oder verzögert werden. Dazu wurden Agentien wie Cytokine, Retinoide und Interferone vorgeschlagen (Hanash *et al.*, 1997). Die Gabe eines gewebespezifischen Chemokins wie BRAK, das vor allem in Niere und Brust exprimiert, könnte von Nutzen sein. Hier wurde die schwächere Expression dieses Gens im Nierentumor gezeigt. Würde die Differenz der Transkripthäufigkeit dieses Gens zwischen dem Tumor- und Normalgewebe, etwa durch die lokale Einnahme dieses Chemokins, ausgeglichen, könnte es Angiogenese-hemmend wirken.

Als dritte Möglichkeit der Behandlung eines Nierenzellkarzinoms stellt die Immuntherapie die vielversprechendste Alternative dar. Metastasierende NZK zeigen sich wenig sensitiv gegenüber verschiedensten Therapieansätzen, wie Bestrahlung, Hormontherapie und Chemotherapie. Die Immuntherapie ist ein neuer Ansatz, basierend auf der Verstärkung der Immunantwort der Patienten gegen den Tumor (Haas und Hillman, 1996). Es wurde gezeigt, dass durch Immunisierung mit Hybriden von Tumor- und

DISKUSSION

Antigenrepräsentierenden-Zellen bei 41 % der Patienten eine komplette oder partielle Remission des Tumors erreicht werden konnte (Kugler *et al.*, 2000). Genexpressionsprofile von erfolgreich therapierten gegenüber nicht erfolgreich therapierten NZK-Patienten könnten Aufschluss geben über die Gründe des Versagens der Immuntherapie bei 60 % der Patienten. Die Identifizierung der differenziell exprimierten Gene während dieser Therapie ließe vielleicht eine Prognose zu über einen erfolgreichen oder nicht erfolgreichen Verlauf der Immuntherapie zu.

Durch Untersuchungen auf molekulargenetischer Ebene werden Grundlagen für ein besseres Verständnis der Tumorentwicklung und -progression geschaffen. Sie sind ein wertvoller Beitrag zur Diagnose und Therapie des klarzelligen NZK. Dies wurde in dieser Arbeit durch die Identifizierung neuer potenzieller Tumormarkergene sowie durch die Analyse im Tumor veränderter Stoffwechselwege anschaulich dargelegt.

5 Zusammenfassung

Das klarzellige Nierenzellkarzinom (NZK) ist ein maligner epithelialer Tumor des Nierenparenchyms. Er macht 2 % aller Krebsarten und 85 % der bösartigen Nierentumoren aus. Die Identifizierung differenziell exprimierter Gene mit Hilfe zweier moderner molekularbiologischer Methoden war das Ziel dieser Arbeit. Die Untersuchung der differentiellen Expression der Gene dieses Tumors schafft die Grundlage für ein besseres Verständnis der biochemischen und stoffwechselphysiologischen Zusammenhänge in der Tumorzelle. Differenziell exprimierte Gene können als Tumormarker zu Diagnosezwecken oder als Angriffspunkte neuer Therapien dienen.

Verglichen wurde die Methode der cDNA-Subtraktion (*suppression subtractive hybridization*, SSH) mit der Methode der komplexen Hybridisierung auf hochdichte cDNA-Arrays. Die Methode der SSH erwies sich als sehr sensitiv. Schwach und differenziell exprimierte Gene wurden isoliert. Die Hybridisierung auf cDNA-Arrays wurde zur parallelen Expressionsanalyse von 31500 cDNAs eingesetzt und resultierte in Expressionsprofilen von Genen des Tumor- und Normalgewebes des klarzelligen NZK. Für die Analyse mit cDNA-Arrays sprach die Möglichkeit, im hohen Durchsatz parallel die Expression vieler Gene zu überprüfen, und die gute Automatisierbarkeit dieses Ansatzes. Somit ergänzen sich beide Methoden und führen zu einem umfassenden Bild der differenziell exprimierten Gene der untersuchten Gewebe. Als ein Ergebnis dieser Experimente wurde ein nierenspezifischer Spezialfilter hergestellt, auf dem nierenspezifische und tumorrelevante cDNAs aufgetragen sind. Sie eignen sich zur schnellen Analyse von Patientenmaterial und wurden zur komplexen Hybridisierung eingesetzt.

Die differentielle Expression im Tumorgewebe wurde für einige Gene exemplarisch mit sensitiven konventionellen molekularbiologischen Methoden wie RT-PCR und Northern Blot Analysen bestätigt. Zu diesen Genen zählten β_2 -Microglobulin, Annexin II und α -NAC als stärker exprimiert im Tumorgewebe, Kininogen und BRAK als Beispiele für schwächer exprimierte Gene im Tumor- verglichen mit dem Normalgewebe. Zusätzlich wurden drei neue Gene identifiziert, deren Expression im Tumor stärker ist als im Normalgewebe. Zwei dieser Gene haben Homologien zu bekannten Genen, zu einer humanen β -hydroxysteroid Dehydrogenase und zu einer humanen Ornithin-Aminotransferase. Von einem Gen konnte noch kein offener Leserahmen bestimmt werden, da es sich um ein unvollständiges Transkript handelt. Diese bekannten und unbekanntes Gene sind potenzielle neue Tumormaker und könnten nach weiteren Untersuchungen in Zukunft zur Diagnose und Therapie eingesetzt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Kombination von SSH und komplexer Hybridisierung wurde die antagonistische Regulation einzelner Stoffwechselwege im klarzelligen NZK, wie z.B. der Glykolyse und der Glukoneogenese, nachgewiesen. Die Enzyme der Glykolyse sind im klarzelligen NZK hochreguliert, während die Enzyme der Glukoneogenese herunterreguliert sind. Dies könnte mit dem verstärkten Energieverbrauch des proliferierenden Gewebes erklärt werden. Als Beispiel für einen nierenspezifischen Regulationsmechanismus wurde die differenzielle Genexpression der Enzyme des blutdruckregulierenden Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) im klarzelligen NZK nachgewiesen. Die Gene, die zu einer Blutdruckerhöhung führen, werden stärker exprimiert als ihre Antagonisten. Zu den Antagonisten gehört das Gen Kininogen, dessen Expression im normalen Nierengewebe nicht nachzuweisen war und am Beginn des zum RAAS entgegengesetzten Stoffwechselweges steht.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich sowohl die Methode der SSH als auch die der komplexen Hybridisierung auf cDNA-Arrays eignen, differenziell exprimierte Gene zu identifizieren. Diese differenziell exprimierten Gene im Tumor- und Normalgewebe des klarzelligen NZK sind mögliche neue Markergene und geben Einblick in Veränderungen von Stoffwechselwegen während der Tumorentstehung und -progression.

6 Literaturverzeichnis

- Aarli A, Skeie Jensen T, Kristoffersen EK, Bakke A, Ulvestad E (1997), Inhibition of phytohaemagglutinin-induced lymphoproliferation by soluble annexin II in sera from patients with renal cell carcinoma. *Apmis* 105: 699-704
- Adams MD, Kerlavage AR, Fleischmann RD, Fuldner RA, Bult CJ, Lee NH, Kirkness EF, Weinstock KG, Gocayne JD, White O, et al. (1995), Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* 377: 3-174
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977), Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5350-4
- Aso T, Lane WS, Conaway JW, Conaway RC (1995), Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II [see comments]. *Science* 269: 1439-43
- Bannasch P (1986), Modulation of carbohydrate metabolism during carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 9: 243-9
- Benitez R, Godelaine D, Lopez-Nevot MA, Brasseur F, Jimenez P, Marchand M, Oliva MR, van Baren N, Cabrera T, Andry G, Landry C, Ruiz-Cabello F, Boon T, Garrido F (1998), Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 52: 520-9
- Bertucci F, Bernard K, Loriod B, Chang YC, Granjeaud S, Birnbaum D, Nguyen C, Peck K, Jordan BR (1999), Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples [published erratum appears in *Hum Mol Genet* 1999 Oct;8(11):2129]. *Hum Mol Genet* 8: 1715-22
- Bonfield JK, Smith K, Staden R (1995), A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res* 23: 4992-9

- Brieger J, Weidt EJ, Schirmacher P, Storkel S, Huber C, Decker HJ (1999), Inverse regulation of vascular endothelial growth factor and VHL tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinomas is correlated with vascular growth: an in vivo study on 29 tumors. *J Mol Med* 77: 505-10
- Burke J, Wang H, Hide W, Davison DB (1998), Alternative gene form discovery and candidate gene selection from gene indexing projects. *Genome Res* 8: 276-90
- Chavakis T, Kanse SM, Lupu F, Hammes HP, Muller-Esterl W, Pixley RA, Colman RW, Preissner KT (2000), Different mechanisms define the antiadhesive function of high molecular weight kininogen in integrin- and urokinase receptor-dependent interactions. *Blood* 96: 514-22
- Chiang Y, Schneiderman MH, Vishwanatha JK (1993), Annexin II expression is regulated during mammalian cell cycle. *Cancer Res* 53: 6017-21
- Chomczynski P, Sacchi N (1987), Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-9
- Church GM, Gilbert W (1984), Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 1991-5
- Cordon-Cardo C, Fuks Z, Drobnjak M, Moreno C, Eisenbach L, Feldman M (1991), Expression of HLA-A,B,C antigens on primary and metastatic tumor cell populations of human carcinomas. *Cancer Res* 51: 6372-80
- Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD (1999), Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 303: 349-80
- Duan DR, Pause A, Burgess WH, Aso T, Chen DY, Garrett KP, Conaway RC, Conaway JW, Linehan WM, Klausner RD (1995), Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein [see comments]. *Science* 269: 1402-6
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM (1999), Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21: 10-4

- Everitt JI, Walker CL, Goldsworthy TW, Wolf DC (1997), Altered expression of transforming growth factor-alpha: an early event in renal cell carcinoma development. *Mol Carcinog* 19: 213-9
- Fagan RJ, Rozen R (1993), Translational control of ornithine-delta-aminotransferase (OAT) by estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 90: 171-7
- Fearon ER, Vogelstein B (1990), A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-67
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983), A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13
- Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams CL (1993), Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 364: 555-6
- Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D (1991), Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251: 767-73
- Frederick MJ, Henderson Y, Xu X, Deavers MT, Sahin AA, Wu H, Lewis DE, El-Naggar AK, Clayman GL (2000), In vivo expression of the novel CXC chemokine BRAK in normal and cancerous human tissue. *Am J Pathol* 156: 1937-50
- Frohlich M, Motte P, Galvin K, Takahashi H, Wands J, Ozturk M (1990), Enhanced expression of the protein kinase substrate p36 in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biol* 10: 3216-23
- Gershanovich MM, Moiseyenko VM, Vorobjev AV, Kapyla H, Ellmen J, Anttila M (1997), High-dose toremifene in advanced renal-cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 39: 547-51
- Giberti C, Oneto F, Martorana G, Rovida S, Carmignani G (1997), Radical nephrectomy for renal cell carcinoma: long-term results and prognostic factors on a series of 328 cases. *Eur Urol* 31: 40-8

LITERATURVERZEICHNIS

- Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM, et al. (1994), Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 7: 85-90
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES (1999), Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286: 531-7
- Gress TM, Hoheisel JD, Lennon GG, Zehetner G, Lehrach H (1992), Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome* 3: 609-19
- Guinan P, Sobin LH, Algaba F, Badellino F, Kameyama S, MacLennan G, Novick A (1997), TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80: 992-3
- Gunawan B, Weber M, Bergmann F, Wildberger J, Niethard FU, Fuzesi L (2000), Clonal chromosome abnormalities in enchondromas and chondrosarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 120: 127-30
- Haas GP, Hillman GG (1996), Update on the Role of Immunotherapy in the Management of Kidney Cancer. *Cancer Control* 3: 536-541
- Haas S, Vingron M, Poustka A, Wiemann S (1998), Primer design for large scale sequencing. *Nucleic Acids Res* 26: 3006-12
- Haas SA, Beissbarth T, Rivals E, Krause A, Vingron M (2000), GeneNest: automated generation and visualization of gene indices. *Trends Genet* 16: 521-3
- Hanash KA, Aquilina JW, Barrett DM, Blute ML, Cockett AT, Corica FA, Hillman GG, Zbar B, Zhuang Z (1997), Clinical research priorities in renal cell carcinoma: renal cell carcinoma chemoprevention strategies including target populations, proposed agents, and clinical trial designs--Workgroup No. 6. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80: 999-1001

- Hand JR, Broders A (1932), Carcinoma of the kidney: the degree of malignancy in relation to factors bearing on prognosis. *J Urol* 28: 199-216
- Harris AL (2000), von Hippel-Lindau syndrome: target for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor therapy. *Oncologist* 5: 32-6
- Hayashi Y, Kiyono T, Fujita M, Ishibashi M (1997), Isolation of a novel cDNA whose corresponding mRNA is accumulated in growth-arrested confluent but not in growing sub-confluent rat 3Y1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1352: 145-50
- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM, et al. (1994), Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9700-4
- Hermann A, Braun A, Figueroa CD, Muller-Esterl W, Fritz H, Rehbock J (1996), Expression and cellular localization of kininogens in the human kidney. *Kidney Int* 50: 79-84
- Hicklin DJ, Dellaratta DV, Kishore R, Liang B, Kageshita T, Ferrone S (1997), Beta2-microglobulin gene mutations in human melanoma cells: molecular characterization and implications for immune surveillance. *Melanoma Res* 7: S67-74
- Hise MK, Jacobs SC, Papadimitriou JC, Drachenberg CI (1996), Transforming growth factor-alpha expression in human renal cell carcinoma: TGF-alpha expression in renal cell carcinoma. *Urology* 47: 29-33
- Hromas R, Broxmeyer HE, Kim C, Nakshatri H, Christopherson K, 2nd, Azam M, Hou YH (1999), Cloning of BRAK, a novel divergent CXC chemokine preferentially expressed in normal versus malignant cells. *Biochem Biophys Res Commun* 255: 703-6
- Hubank M, Schatz DG (1994), Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 22: 5640-8

LITERATURVERZEICHNIS

- Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, Minato N, Conaway RC, Conaway JW, Klausner RD, Pause A (1999), Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12436-41
- Kaelin WG, Jr., Maher ER (1998), The VHL tumour-suppressor gene paradigm. *Trends Genet* 14: 423-6
- Khan J, Saal LH, Bittner ML, Chen Y, Trent JM, Meltzer PS (1999), Expression profiling in cancer using cDNA microarrays. *Electrophoresis* 20: 223-9
- Kim S, Iwao H (2000), Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52: 11-34
- Kinzler KW, Vogelstein B (1997), Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers [news; comment] [see comments]. *Nature* 386: 761, 763
- Knudson AG, Jr. (1971), Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 820 ff.
- Knudson AG, Jr. (1985), Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 45: 1437-43
- Kohler G, Veelken H, Rosenthal F, Mackensen A, Lindemann A, Schaefer HE, Lahn M (1997), Oncogene and HSP-70 expression in primary tumor cell cultures of renal cell carcinoma compared to their corresponding cell line. *Anticancer Res* 17: 3225-31
- Kos J, Lah TT (1998), Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep* 5: 1349-61
- Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B, Eble JN, Fleming S, Ljungberg B, Medeiros LJ, Moch H, Reuter VE, Ritz E, Roos G, Schmidt D, Srigley JR, Storkel S, van den Berg E, Zbar B (1997), The Heidelberg classification of renal cell tumours [editorial]. *J Pathol* 183: 131-3

LITERATURVERZEICHNIS

- Kovacs G, Erlandsson R, Boldog F, Ingvarsson S, Muller-Brechlin R, Klein G, Sumegi J (1988), Consistent chromosome 3p deletion and loss of heterozygosity in renal cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 1571-5
- Kovacs G, Szucs S, De Riese W, Baumgartel H (1987), Specific chromosome aberration in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 40: 171-8
- Kozma L, Kiss I, Nagy A, Szakall S, Ember I (1997), Investigation of c-myc and K-ras amplification in renal clear cell adenocarcinoma. *Cancer Lett* 111: 127-31
- Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Muller GA, Ringert RH (2000), Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids [see comments]. *Nat Med* 6: 332-6
- Lager DJ, Slagel DD, Palechek PL (1994), The expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in renal cell carcinoma. *Mod Pathol* 7: 544-8
- Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, et al. (1993), Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene [see comments]. *Science* 260: 1317-20
- Lauring B, Sakai H, Kreibich G, Wiedmann M (1995), Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1995 Aug 15;92(17):8088]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5411-5
- Liang P, Pardee AB (1992), Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [see comments]. *Science* 257: 967-71
- Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ (1999), High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 21: 20-4
- Lisitsyn N, Wigler M (1993), Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259: 946-51

- Mai J, Waisman DM, Sloane BF (2000), Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression. *Biochim Biophys Acta* 1477: 215-30
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999), The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis [see comments]. *Nature* 399: 271-5
- McBride MW, McVie AJ, Burridge SM, Brintnell B, Craig N, Wallace AM, Wilson RH, Varley J, Sutcliffe RG (1999), Cloning, expression, and physical mapping of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene cluster (HSD3BP1-HSD3BP5) in human. *Genomics* 61: 277-84
- Moch H, Presti JC, Jr., Sauter G, Buchholz N, Jordan P, Mihatsch MJ, Waldman FM (1996), Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 56: 27-30
- Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G (1999), High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma [see comments]. *Am J Pathol* 154: 981-6
- Moore BB, Arenberg DA, Addison CL, Keane MP, Strieter RM (1998), Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines. *J Lab Clin Med* 132: 97-103
- Moreau A, Yotov WV, Glorieux FH, St-Arnaud R (1998), Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 18: 1312-21
- Morel Y, Mebarki F, Rheume E, Sanchez R, Forest MG, Simard J (1997), Structure-function relationships of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: contribution made by the molecular genetics of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Steroids* 62: 176-84
- Morissette J, Rheume E, Leblanc JF, Luu-The V, Labrie F, Simard J (1995), Genetic linkage mapping of HSD3B1 and HSD3B2 encoding human types I and II 3 beta-

LITERATURVERZEICHNIS

- hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase close to D1S514 and the centromeric D1Z5 locus. *Cytogenet Cell Genet* 69: 59-62
- Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM (1996), Renal-cell carcinoma [see comments]. *N Engl J Med* 335: 865-75
- Mueckler MM, Moran S, Pitot HC (1984), Transcriptional control of ornithine aminotransferase synthesis in rat kidney by estrogen and thyroid hormone. *J Biol Chem* 259: 2302-5
- Mueckler MM, Pitot HC (1983), Regulation of ornithine aminotransferase mRNA levels in rat kidney by estrogen and thyroid hormone. *J Biol Chem* 258: 1781-4
- Muller-Esterl W, Fritz H, Kellermann J, Lottspeich F, Machleidt W, Turk V (1985), Genealogy of mammalian cysteine proteinase inhibitors. Common evolutionary origin of stefins, cystatins and kininogens. *FEBS Lett* 191: 221-6
- Muller-Esterl W, Iwanaga S, Nakanishi S (1986), Kininogens revisited. *Trends Biochem Sci* 11: 336-339
- Nizetic D, Zehetner G, Monaco AP, Gellen L, Young BD, Lehrach H (1991), Construction, arraying, and high-density screening of large insert libraries of human chromosomes X and 21: their potential use as reference libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3233-7
- Nowell PC (1976), The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-8
- Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K (1991), Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9: 617-48
- Parczyk K, Pilarsky C, Rachel U, Koch-Brandt C (1994), Gp80 (clusterin; TRPM-2) mRNA level is enhanced in human renal clear cell carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 120: 186-8
- Patton EE, Willems AR, Tyers M (1998), Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet* 14: 236-43

- Paulovich AG, Hartwell LH (1995), A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* 82: 841-7
- Paulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH (1997), When checkpoints fail. *Cell* 88: 315-21
- Pegg AE, McCann PP (1982), Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 243: C212-21
- Perez B, Benitez R, Fernandez MA, Oliva MR, Soto JL, Serrano S, Lopez Nevot MA, Garrido F (1999), A new beta 2 microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line. *Tissue Antigens* 53: 569-72
- Reeves SA, Chavez-Kappel C, Davis R, Rosenblum M, Israel MA (1992), Developmental regulation of annexin II (Lipocortin 2) in human brain and expression in high grade glioma. *Cancer Res* 52: 6871-6
- Rheaume E, Lachance Y, Zhao HF, Breton N, Dumont M, de Launoit Y, Trudel C, Luu-The V, Simard J, Labrie F (1991), Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Mol Endocrinol* 5: 1147-57
- Richter J, Wagner U, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Kononagel H, Rist M, Wilber K, Anabitarte M, Hering F, Hardmeier T, Schonenberger A, Flury R, Jager P, Luc Fehr J, Schraml P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser T, Kallioniemi OP, Sauter G (2000), High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer [In Process Citation]. *Am J Pathol* 157: 787-94
- Roseman BJ, Bollen A, Hsu J, Lamborn K, Israel MA (1994), Annexin II marks astrocytic brain tumors of high histologic grade. *Oncol Res* 6: 561-7
- Salvesen G, Parkes C, Abrahamson M, Grubb A, Barrett AJ (1986), Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. *Biochem J* 234: 429-34

LITERATURVERZEICHNIS

- Sarto C, Marocchi A, Sanchez JC, Giannone D, Frutiger S, Golaz O, Wilkins MR, Doro G, Cappellano F, Hughes G, Hochstrasser DF, Mocarelli P (1997), Renal cell carcinoma and normal kidney protein expression. *Electrophoresis* 18: 599-604
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995), Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [see comments]. *Science* 270: 467-70
- Schuler GD (1997), Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med* 75: 694-8
- Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P (2000), SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* 28: 231-4
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998), SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5857-64
- Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, Lane AH, Farmer GE, Lamiell JM, Haines J, Yuen JW, Collins D, Majoor-Krakauer D, et al. (1988), Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* 332: 268-9
- Siever DA, Erickson HP (1997), Extracellular annexin II. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1219-23
- Simpson JC, Wellenreuther R, Poustka A, Pepperkok R, Wiemann S (2000), Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Reports* 1: 287-92
- Society AC (2000), Renal Cell Carcinoma-Overview., Vol 2000
- Southern EM (1975), Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-17
- Staden R, Beal KF, Bonfield JK (2000), The Staden package, 1998. *Methods Mol Biol* 132: 115-30

- Steffens J, Bock R, Braedel HU, Isenberg E, Buhle CP, Ziegler M (1992), Renin-producing renal cell carcinomas--clinical and experimental investigations on a special form of renal hypertension. *Urol Res* 20: 111-5
- Steinberg P, Storkel S, Oesch F, Thoenes W (1992), Carbohydrate metabolism in human renal clear cell carcinomas. *Lab Invest* 67: 506-11
- Sutcliffe RG, Russell AJ, Edwards CR, Wallace AM (1996), Human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: genes and phenotypes. *J Mol Endocrinol* 17: 1-5
- Tabib A, Bachrach U (1999), Role of polyamines in mediating malignant transformation and oncogene expression. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 1289-95
- Takahashi A, Sasaki H, Kim SJ, Kakizoe T, Miyao N, Sugimura T, Terada M, Tsukamoto T (1999), Identification of receptor genes in renal cell carcinoma associated with angiogenesis by differential hybridization technique. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 855-9
- Thoenes W, Storkel S (1991), [Pathology of benign and malignant renal cell tumors]. *Urologe [A]* 30: W41-50
- Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ (1986), Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol Res Pract* 181: 125-43
- Thrash-Bingham CA, Salazar H, Freed JJ, Greenberg RE, Tartof KD (1995), Genomic alterations and instabilities in renal cell carcinomas and their relationship to tumor pathology. *Cancer Res* 55: 6189-95
- Urakami S, Tsuchiya H, Orimoto K, Kobayashi T, Igawa M, Hino O (1997), Overexpression of members of the AP-1 transcriptional factor family from an early stage of renal carcinogenesis and inhibition of cell growth by AP-1 gene antisense oligonucleotides in the Tsc2 gene mutant (Eker) rat model. *Biochem Biophys Res Commun* 241: 24-30

- Veikkola T, Alitalo K (1999), VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 9: 211-20
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995), Serial analysis of gene expression [see comments]. *Science* 270: 484-7
- Vishwanatha JK, Chiang Y, Kumble KD, Hollingsworth MA, Pour PM (1993), Enhanced expression of annexin II in human pancreatic carcinoma cells and primary pancreatic cancers. *Carcinogenesis* 14: 2575-9
- Vogelstein B, Kinzler KW (1993), The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9: 138-41
- Vogelzang NJ, Stadler WM (1998), Kidney cancer [see comments]. *Lancet* 352: 1691-6
- von Stein OD, Thies WG, Hofmann M (1997), A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 25: 2598-602
- Wang T, Hopkins D, Schmidt C, Silva S, Houghton R, Takita H, Repasky E, Reed SG (2000), Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using combination of cDNA subtraction and microarray analysis. *Oncogene* 19: 1519-28
- Wiedmann B, Sakai H, Davis TA, Wiedmann M (1994), A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 370: 434-40
- Xu J, Stolk JA, Zhang X, Silva SJ, Houghton RL, Matsumura M, Vedvick TS, Leslie KB, Badaro R, Reed SG (2000), Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *Cancer Res* 60: 1677-82
- Yagoda A, Abi-Rached B, Petrylak D (1995), Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983-1993. *Semin Oncol* 22: 42-60
- Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ (1999), Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 27: 1517-23

LITERATURVERZEICHNIS

- Yotov WV, Moreau A, St-Arnaud R (1998), The alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex functions as a transcriptional coactivator. *Mol Cell Biol* 18: 1303-11
- Yotov WV, St-Arnaud R (1996), Differential splicing-in of a proline-rich exon converts alphaNAC into a muscle-specific transcription factor. *Genes Dev* 10: 1763-72
- Yu MC, Mack TM, Hanisch R, Cicioni C, Henderson BE (1986), Cigarette smoking, obesity, diuretic use, and coffee consumption as risk factors for renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 77: 351-6
- Zanders ED, Goulden MG, Kennedy TC, Kempell KE (2000), Analysis of immune system gene expression in small rheumatoid arthritis biopsies using a combination of subtractive hybridization and high-density cDNA arrays. *J Immunol Methods* 233: 131-40
- Zhang M, Martin KJ, Sheng S, Sager R (1998), Expression genetics: a different approach to cancer diagnosis and prognosis. *Trends Biotechnol* 16: 66-71
- Zhao N, Hashida H, Takahashi N, Misumi Y, Sakaki Y (1995), High-density cDNA filter analysis: a novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression. *Gene* 156: 207-13
- Zheng XM, Black D, Chambon P, Egly JM (1990), Sequencing and expression of complementary DNA for the general transcription factor BTF3. *Nature* 344: 556-9
- Zimmerman SB, Harrison B (1985), Macromolecular crowding accelerates the cohesion of DNA fragments with complementary termini. *Nucleic Acids Res* 13: 2241-9
- Zimmerman SB, Pfeiffer BH (1983), Macromolecular crowding allows blunt-end ligation by DNA ligases from rat liver or Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 5852-6

7 Anhang

7.1 One Letter Code der Aminosäuren

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Asparaginsäure	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutaminsäure	E	Serin	S
Glutamin	Q	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

7.2 Bekannte Consensussequenz des Gens hkid3_4a21

```

1  ccacgcgtcc gagcgcgacc ctcttgcccc cgtgtccggg tctggcgggc
51  aggcgagcgg ccacacgggg acgcgagggc agctggatac cgtggggagg
101  gggtgcccta tggacggggg gtgcctgtct ggccagcagg gacggcgggt
151  gggggtaagc gaaatcattc gggggccttg ctgccctccg cttggtgggg
201  ctgaggctgg gccagatacc ctcttgaggg gaactttctt ttccttgtgt
251  gcgcagggta ccagtgtgcg gagttcctgt tgccaagctg aaggtggccc
301  tgggcaggca caggtgtggt catatcttca gccaacagga ccatcctccg
351  gagggccacc tctggggact tcctacggga agagagtgac agatttggtg
401  cttctgtgtg tttctgccgc ttcagtgggg ccgctgcccc agacagcccc
451  tggatcctcc agcagcctgt ctgctgagcc tggcttctca agtctactgt
501  taaaatcagg accgggtcgt gtccgagcct acaggccctg tctccgctcc
551  ccaggcctgc aggagttgag ggctgcacct gctcgctgga gagggagagg
601  cagatttagt ggacgcctgg catggactcg gactggcctt tggaagctcc
651  cctgccctga ccggcgtgcc tgtcaccact gcgaagtgag gcttggcagg
701  acctgcacct gagaaaggct gtgtgtggtc ttgggggtcca cacctgcaga
751  gctaacttac tgccagacgg cgacttactg tgggccaccc tcagtgaacc
801  ggggtgtcct cagctggccc tacagagcac ttctgtgctg gggatgagta
851  ggaactctgg gcgaggaggg tcccagcgcc gccctcgat acagcctggc

```

```

901  tctgccctct gcccgtactt ataccaggtg ggatccctgc cctgcattgc
951  ctggggattg gctgggcttg ggcccgcctt gctgtggaac tggatgtttt
1001 cagggagccc agccttttct catgtcaaca cagttcacia tatagttttc
1051 aaagtacagt ttaaaactca aaagtaaaact tttcagcaac tc
    
```

Bild 7.1 Consensussequenz des Gens hkid3_4a21

Consensussequenz des bekannten Teils des Gen hkid3_4a21 (3.7.1). Base 1 markiert das 5'-Ende der Sequenz, Base 1092 das 3'-Ende. Da es sich um eine unvollständige Sequenz handelt, konnte der offene Leserahmen nicht bestimmt werden. Von Base 1063-1069 reicht ein potenzielles poly-Adenylierungssignal (agtaa). Die Sequenz des Klonen hkid3_4a21 aus der TN-Subtraktionsbibliothek (Tumor minus Normal Subtraktionsbibliothek), mit dem diese cDNA zum ersten Mal als differenziell exprimiert identifiziert wurde und der als 'Namensgeber' dieses neuen Gens fungierte, reicht von den Basen 915 bis 1055.

7.3 Genklassifizierungssymbole

ami	Aminosäurestoffwechsel
car	Kohlenhydratstoffwechsel
cyc	Zellzyklus
ene	Energiestoffwechsel
geno	genomische Sequenz
hsr	Hitzeschock-/Stressantwort
im	Immunologie
ion	Ionenhomöostase
lat	Translation
lip	Fettstoffwechsel
lys	Proteolyse
mem	Membrantransport
met	Metabolismus allgemein
nid	nicht identifiziert/nicht bekannt
nuc	Nucleinsäurestoffwechsel
phys	Physiologie
rec	Rezeptor
scr	Transcription
sig	Signaltransduktion
str	Strukturgene und-proteine
tra	Transport
vec	Vektorsequenz

7.4 Genklassifizierungssymbole speziell für die komplexe Hybridisierung auf UniGene-Filter

ami	Aminosäurestoffwechsel
apo	Apoptose
cadh	Zelladhäsion
car	Kohlenhydratstoffwechsel
cyc	Zellzyklus
dev	Entwicklung
ene	Energiestoffwechsel
hsr	Hitzeschock-/Stressantwort
imm	Immunologie
ion	Ionenhomöostase
ipt	intrazellulärer Proteintransport
lat	Translation
lif	Zellproliferation
lip	Fettstoffwechsel
lyt	Proteolyse
met	Metabolismus allgemein
nid	nicht identifiziert/nicht bekannt
nuc	Nucleinsäuremetabolismus
oxi	oxidative Stressantwort
oxra	Sauerstoffmetabolismus, Umsatz freier Radikale
phy	physiologische Prozesse
sha	Zellstruktur (<i>shape</i>)
sig	Signaltransduktion
tar	Protein Targeting
tra	Transport

7.5 Primer

Tabelle 7.1 Universell genutzte Primer

M13u	5'-CGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'
M13r	5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'
T7	5'-GCGTAATACCGACTCACTATAGGG-3'
Sp6	5'-AATTTAGGTGACACTATAGAA-3'

Tabelle 7.2 PCR-Primer der RT-PCR-Experimente

In dieser Tabelle wurden alle Primersequenzen, die zur RT-PCR genutzt wurden, zusammengefasst. Untereinander sind jeweils vorwärts (*forward*, _F) und rückwärts (*reverse*, _R) Primer aufgeführt. Die Genbeschreibung steht in der ersten der beiden Zeilen eines Primerpaars. Neben der Genbank Accession Nummer (Accession #) ist die Genbeschreibung angegeben (soweit bekannt). Die Identifizierungs-Methode fasst zusammen, ob die Sequenz durch ein Hybridisierungsexperiment oder durch Sequenzierung der subtraktions-cDNAs identifiziert wurde. R: *random* Sequenzierung der TN-Subtraktionsbibliothek (3.2); C: komplexe Hybridisierung auf Koloniefilter der TN-Subtraktionsbibliothek (3.3); S: Hybridisierung der Subtraktionsbibliotheken auf Koloniefilter (3.3). Die Primersequenzen wurden alle in 5' – 3' Richtung angegeben.

Primernamen	Accession #	Genbeschreibung	Identifizierungs-Methode	Primersequenz
fw_aa046652_F2	AA046652	hkid3_4e7	R	CGCCAGATCGACCACCT
fw_aa046652_R3				GGTGTTCCTTGGATGTT
fw_aa101266_F2	AA101266	S11	C	GGACAGGTGTACAGACATG
fw_aa101266_R3				ACCCAAGGAGGCTATTGAG
fw_aa147847_F2	AA147847	vimentin	S	CGTCTTAATCAGAAGTGTC
fw_aa147847_R3				CACTTCGTGATACCAGACC
fw_aa152235_F2	AA152235	beta Actin	C	CCTTACACAATGACGTGTTG
fw_aa152235_R3				TGAGTTGGAAGCGGTTTG
fw_aa161018_F2	AA161018	TFE3	R	AGAGCCAAGCGCAGACT
fw_aa161018_R3				AAAGGGTGCAGCTGACC
fw_aa194989_F2	AA194989	bFGF2		TGTTGAGGAAATTAATGTGTTA
fw_aa194989_R3				ATTAGCCGCCAATATATCG
fw_aa344647_R4	Aa344647	hkid3_4i1	R	GAGCAGGTCAAACTCCC
fw_aa344647_S4				CAGAAATGATTCTGAGTGAG
fw_aa435595_F2	AA435595	interferon induced leucine zipper protein	CS	GGAAGTGGATCTCCAGGAC
fw_aa435595_R3				AGGGATGGAATGGCTCAG
fw_aa436183_F2	AA436183	hkid3_5i19	R	GAATTTACCAGGGAGTAAAA
fw_aa436183_R3				CAGGGTTCGAGGGTAAGA
fw_aa495827_F2	Aa495827	hkid3_4i3	R	GGAATTTATGCTTCTATATTATCA
fw_aa495827_R3				AATGTTCAATTACACATAATAAACA
fw_aa515481_F2	AA515481	hkid3_4a21	R	TGAACTGTGTTGACATGAGG
fw_aa515481_R3				CAGCTGGCCCTACAGAG
fw_aa573212_F2	AA573212	alpha NAC	CS	CTGGGATAAATCTTCGATCTT
fw_aa573212_R3				CGATGAAGAACCAGTCAGT
fw_aa575872_F2	AA575872	GST (1)	C	AATCTTCCTTGCTTCTTCT
fw_aa575872_R3				AGCCTGGACAAGACTACCT
fw_aa599720_F2	AA599720	NAP (nucleosome assembly protein)	C	AGGGAAGCAGAAGGTAGA
fw_aa599720_R3				TATGACCACACCCAATAACTG
fw_aa614780_F2	AA614780	nucleophosmin	S	GGACAACACATTCTTGGCAA
fw_aa614780_R3				TCTCTGGCAGTGGAGGA
fw_aa633010_F2	AA633010	insulin like growth factor binding protein-4 (IGFBP4)	RC	GGAACAGGACCCAGGAAG
fw_aa633010_R3				ATTCTGCTTGGTTGGCTGC
fw_aa857170_F2	AA857170	c-myc		GTTATTTACATTTAATGGCAATATTT
fw_aa857170_R3				ACCTCACACCTTGGCTG

ANHANG

Primername	Accession #	Genbeschreibung	Identifizierungs-Methode	Primersequenz
fw_aa885912_F2	AA885912	vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1)	C	CTGTCAGCAAATATTAATGTGAAA
fw_aa885912_R3				GGTTGAGAGAACGGAGGA
fw_aa886931_F2	AA886931	Wilm's tumor-related protein (QM)	C	GTCTTCAAATTCATCAGCATTG
fw_aa886931_R3				ACAGGCATGCGAGGTG
fw_aa934655_F2	AA934655	ribosomal protein S29	C	AGTTCATTTGCAAGAAGAGG
fw_aa934655_F2				ACTGGCGGCACATATTGA
fw_aa934655_R3				AAATTGAGAACCTGGAACCTC
fw_aa934655_R3				GCTCTTAACCTCAGCAACA
fw_aa983317_F2	AA983317	vascular endothelial growth factor B (VEGF-2)	R	CTTACTTGACAGAGTGGT
fw_aa983317_R3				CAGCCAAGCCCCAAGA
fw_ab018310b_F2	AB018310	hkid3_5e5	R	ACTAATCACTGAACTAGACGAA
fw_ab018310b_R3				TTTATACAATACTTTTTCTTTAAACA
fw_af020202b_F2	AF020202	hmunc-13 gene	C	TCTGTACAGGCTGGATGGAA
fw_af020202b_R3				AGATGCTTGGTTTCTTGTTC
fw_af070660_F2	AF070660	hkid3_5e1	R	CTACACTGCTCAGGCTTCA
fw_af070660_R3				TTAGCCAAGCAATAAAGATGT
fw_af124522_F2	AF124522	hkid3_5g1	R	ATGCTTGTGAGAATCATTAAAC
fw_af124522_R3				TCTTTCCATATTCTGAGAAATAAC
fw_af147354_F2	AF147354	hkid3_5e19	R	CAGTTGTCACATATAAAGAAGAT
fw_af147354_R3				CAGCAAATTTAAATACATACACTT
fw_ai005141_F2	AI005141	superoxide dismutase (SOD-1) gene, exon 5 with a mutation causing familial amyotrophic lateral sclerosis	C	GGAACATAACAGGAAATGTCA
fw_ai005141_R3				CTATGTCCCAAGGCCTCT
fw_ai038070_F2	Ai038070	hkid3_5g23	R	AACACCTGCCCACTAAACA
fw_ai038070_R3				CTACTCCAGAATCTGTGGC
fw_ai247271_F2	AI247271	NPT4 sodium-dependent phosphate transport protein 4	C	TTCTTGGACATCTGCTTCTC
fw_ai247271_R3				TGTCTTCTTCTTGGCTTTG
fw_ai287374_F2	AI287374	reducing agents and tunicamycin-responsive protein (RTP) mRNA	CR	TCTTGCCCCGATCCCC
fw_ai287374_R3				CATAGGAAGTTTGGTCAGAGT
fw_ai291305_F2	AI291305	hkid3_5i13	R	TTACTGATTTTTTTTGTCTATTGT
fw_ai291305_R3				TGCACATTAACCTTGTTAGAGG
fw_ai365213_F2	AI365213	sortilin (transmembrane neuropeptide receptor)	R	ACTACCTTCCATGTACCACT
fw_ai365213_R3				GATTCTTCTCCACGACTT
fw_ai380619_F2	AI380619	nardilysin precursor (n-arginine dibasic convertase) NRD-2; convertase 2	S	TCATACTTCCCATATCCAACA
fw_ai380619_R3				CTGGTCAACTGGTTCAAGG
fw_ai436552_F2	AI436552	hkid3_5m9	R	TTCTCCTCAGCCTTGATAC
fw_ai436552_R3				GCCGTCTGAATGTCTTG
fw_ai445014_F2	AI445014	L7a	C	TTAGTGGCAAGTTCTTTAGC
fw_ai445014_R3				CTATCAGGACCAATTACAATGAC
fw_ai445310_F2	AI445310	VEGF	R	GGGAGGGCAGAGCTGA
fw_ai445310_R3				AGTAGGGTTTTTTTTCAGTATTC
fw_ai469817_F2	AI469817	pM5 protein	C	GGCTGAAGATCAAGAATGAC
fw_ai469817_R3				CCGCACCCATTGTCCCT
fw_ai471888_F2	AI471888	NADH ubiquinone oxidoreductase	S	TTTACAGTTCAATATAAATTAAGG
fw_ai471888_R3				GAGCTCAAGGCTGGCAA
fw_ai491893_F2	AI491893	protective protein for beta-galactosidase (galactosialidosis)	C	TTAGAAGAGGACTCTCCTAG
fw_ai491893_R3				ACAGCGTGGAGCAGATT

ANHANG

Primername	Accession #	Genbeschreibung	Identifizierungs-Methode	Primersequenz
fw_ai539526_F2	AI539526	complement component C3 mRNA, alpha and beta subunits	SC	GTGTCCTTCCCGATGATG
fw_ai539526_R3				GAGCAGACCATCAAGTCAG
fw_ai685254_F2	AI685254	hkid3_5o9	R	AAACAATGGGAACATCACCTC
fw_ai685254_R3				CTTCCTCTGTCTCTCATC
fw_ai750308_F2	AI750308	hkid3_5i21	R	GAGCAGGAGATCGTGAAC
fw_ai750308_R3				CAGCCACCACGTCTCG
fw_ai814366_F2	AI814366	hkid3_5i1	R	GGGACATGACAAGGTTTAGA
fw_ai814366_R3				AGTGCAGCGGCCTGT
fw_ai859954_F2	AI859954	TCB gene (cytosolic thyroid hormone binding protein)	R	GGACAGAGTACACACAGGA
fw_ai859954_R3				CGTGGCACTGGTAGGTT
fw_d00017_F2	D00017	Annexin II (lipocortin II)	C	ACCATGCTTCCAGCTAACA
fw_d00017_R3				TCACATCATAGACTTCACTTCC
fw_d30037_F2	D30037	phosphatidylinositol transfer protein	C	GAACAACAATCTGACCAGTATC
fw_d30037_R3				GGAGAAATTGTAATAATCCCTTC
fw_d50917b_F2	D50917	KIAA0127 gene	R	GTACATAGTGACATGTTTGGTG
fw_d50917b_R3				AGTAAGACTGCTCATTTCCA
fw_d87119b_F2	D87119	hkid3_5o13	R	TGGAAGATAGAAAGGAGAGAA
fw_d87119b_R3				CATTAACCAAATACAGGACAAAG
fw_d89667_F2	D89667	c-myc binding protein	R	CTAACCAAGCAGATGGAGA
fw_d89667_R3				AGACCCTTCCCATCACCA
fw_h02943_F2	H02943	hkid3_5i15	R	AAAGGATATTTGTGTACAATTACC
fw_h02943_R3				GCTGTAGTGAACACTTGTAAG
fw_h24379_F2	H24379	iduronate-2-sulfatase (IDS)	C	TTTGTGGGTAATATTCATGTATT
fw_h24379_R3				CTGATGTGTCCAGTTACGGA
fw_h27199_F2	H27199	hkid3_5e3	R	AAGAGAGAGCAGCTGGAA
fw_h27199_R3				GCCTCGGCCTACCCTAA
fw_h43703_F2	H43703	UCP2 (uncoupling protein 2)	C	ACGAAGATTCTGGCTGAACT
fw_h43703_R3				CACCTCTTCTTCCGCT
fw_h65764_F2	H65764	L31	C	TCTGATTGTGATATTCATACTGT
fw_h65764_R3				TTGTCTGCACTCTAGCTTT
fw_h98710_F2	H98710	thymosin beta 4	S	ACTTCTTCTTCCACCAACAT
fw_h98710_R3				ATGCACTGTACATTCCACAA
fw_j02642_F2	J02642	GAPDH	CSR	GACAACGAATTTGGCTACAG
fw_j02642_R3				CTACATGGCAACTGTGAGGA
fw_l20941_F2	L20941	ferritin heavy chain	CR	TCTATCCAGGCTATCTTCCA
fw_l20941_R3				TGGAAACATTTAACTCAGACTCT
fw_m27877_F2	M27877	zinc finger protein 83 (hpf1)	C	CATACTAAAGACATTTATAATAATT
fw_m27877_R3				CTTTAATGCTAACTGAACACTC
fw_m30773_F2	M30773	calcineurin beta	C	CTCTGAAGATCTGCTCAAGAC
fw_m30773_R3				TCTCCACCACATTGATATGC
fw_m33600_F2	M33600	MHC class II Protein HLA-DR-beta1	C	TTCCTGCTTGGCAGTTATT
fw_m33600_R3				TGTTTGTCTGACAGGGTGA
fw_transferrin_a		Celine transferrin a		GACACGTCTGCCTACCCATT
fw_transferrin_b		Celine transferrin b		TAACACCCGAACCAGGAATC
fw_u11292_F2	U11292	human ki nuclear antigen	S	CTCTGGTGGCTAGGGATGTA
fw_u11292_R3				CTAACTTCCATAATTCAGACT
fw_u76702_F2	U76702	follistatin related protein FLRG	R	AGCCTCAGACCAGCTATG
fw_u76702_R3				TGGCTGAGGCTCCTGTAG
fw_w81137_F2	W81137	beta 2 microglobulin	S	AACTTATGCACGCTTAACTAT
fw_w81137_R3				ATGATCTTCTTTATAATTCTACTTT
fw_x05608b_F2	X05608	neurofilament subunit NF-L	C	ACATGAGTAAATGAATTCATAAT
fw_x05608b_R3				TCAATAGTTCCTGACACAC
fw_19d4probeR1	hkid3_19d4		C	AAAGTTTATATACTCTCTTAGGAA
fw_19d4probeS1	hkid3_19d4			TAGCTTTACAAGCAACTTGAG

Tabelle 7.3 Zusammenfassung der Primerpaare, die in der RT-PCR kein Produkt ergaben

Aufgeführt wurden die Primernamen und Genbank Accession Nummern sowie die Genbeschreibung und die Identifizierungsmethode. Mit diesem Primern konnte auf Erststrang-cDNA kein PCR-Produkt synthetisiert werden. Alle Primer wurden mit einer *annealing*-Temperatur von 60 °C ausgewählt (PRIDE Software). Es wurden verschiedene *annealing*-Temperaturen in 2 °C Schritten getestet. Die Primer ergaben selbst einer *annealing*-Temperatur von 48 °C kein Produkt. Die Identifizierungs-Methode fasst zusammen, ob die Sequenz durch ein Hybridisierungsexperiment oder durch Sequenzierung der subtrahierten cDNAs identifiziert wurde. R: *random* Sequenzierung der TN-Subtraktionsbibliothek (3.2); C: komplexe Hybridisierung auf Koloniefilter der TN-Subtraktionsbibliothek (3.3); S: Hybridisierung der Subtraktionsbibliotheken auf Koloniefilter (3.3).

Primername	Accession #	Genbeschreibung	Identifizierungs-Methode
fw_aa161018_F2/R3	AA161018	TFE3	R
fw_aa194989_F2/R3	AA194989	bFGF2	
fw_aa344647_R4/S4	Aa344647	hkid3_4i1	R
fw_aa495827_F2/R3	Aa495827	hkid3_4i3	R
fw_aa633010_F2/R3	AA633010	insulin like growth factor binding protein-4 (IGFBP4)	RC
fw_aa885912_F2/R3	AA885912	vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1)	C
fw_aa934655_F2/R3	AA934655	ribosomal protein S29	C
fw_ab018310b_F2/R3	AB018310	hkid3_5e5	R
fw_ai038070_F2/R3	Ai038070	hkid3_5g23	R
fw_ai469817_F2/R3	AI469817	pM5 protein	C
fw_ai491893_F2/R3	AI491893	protective protein for beta-galactosidase (galactosialidosis)	C
fw_h24379_F2/R3	H24379	iduronate-2-sulfatase (IDS)	C
fw_h27199_F2/R3	H27199	hkid3_5e3	R
fw_h65764_F2/R3	H65764	L31	C
fw_m27877_F2/R3	M27877	zinc finger protein 83 (hpf1)	C
fw_m33600_F2/R3	M33600	MHC class II Protein HLA-DR-beta1	C
fw_u11292_F2/R3	U11292	human ki nuclear antigen	S
fw_x05608b_F2/R3	X05608	neurofilament subunit NF-L	C

7.6 Genklassifikationstabellen

Tabelle 7.4 Genklassifizierung der Sequenzierungsergebnisse der TN-Subtraktionsbibliothek des Patienten 00929

Zur Qualitätskontrolle der TN-Subtraktionsbibliothek wurden einige Klone ansequenziert. Die Ergebnisse der Datenbankabgleiche dieser Sequenzen wurden in dieser Tabelle zusammengefasst. Neben der Genbank Accession Nummer ist eine *Genbeschreibung* angegeben. Die Rubrik *Genklassifizierung* gibt Auskunft über die Funktion des Gens bzw. des Proteins. Unter *Anzahl der Klone* wurde die Redundanz des Auftretens einer Sequenz angegeben.

Accession #	Genbeschreibung	Gen-klassifizierung	Anzahl der Klone
M22806	prolyl 4-hydroxylase beta-subunit and disulfide isomerase (P4HB)	ami	1
Q60597	oxoglutarate dehydrogenase e1 component	ami	1
U60819	solute carrier family 3; cystine transporter rBAT	ami	1
X79389	glutathione S-transferase, theta 1	ami	1
U46499	glutathione S-transferase, microsomal 1	ami	2
AF020202	hmunc-13 gene	car	1
D87989	UDP-galactose transporter related isozyme	car	1
L12711	Transketolase (Wernicke-Korsakoff-Syndrom)	car	1
M22960	protective protein for beta-galactosidase (galactosialidosis)	car	1
M83088	Phosphoglucomutase 1 (PMG1)	car	1
X01677	GAPDH	car	1
X02152	lactate-dehydrogenase A (LDH-A)	car	3
D14878	protein D123	cyc	1
X61123	B-cell translocation gene 1, anti proliferative (BTG1)	cyc	2
M36693	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	ene	1
V00662	cytochrome c oxidase I	ene	1
X05409	aldehyde dehydrogenase2	ene	1
X13923	cytochrome c oxidase Vib (COX6b)	ene	1
J00105	beta-2-microglobulin gene	im	1
M13560	HLA class II histocomp. antigen gamma chain	im	1
M33600	MHC class II Protein HLA-DR-beta1	im	1
X00457	HLA-SB alpha gene precursor	im	1
X64364	basigin	im	1
Z50022	surface glycoprotein	im	1
K02765	complement component C3 mRNA, alpha and beta subunits	im	3
X03100	HLA-SB alpha gene	im	3
D28877	hnRNP protein A2/B1	lat	1
D78333	thermophilic factor 55; TCP1	lat	1
D79205	ribosomal protein L39	lat	1
L05093	ribosomal protein L18a	lat	1
M19997	eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2)	lat	1
M58458	ribosomal protein S4 (X-linked)	lat	1
M81757	ribosomal protein S19	lat	1
U10248	ribosomal protein 239	lat	1
U12465	ribosomal protein L35	lat	1
U14970	ribosomal protein S5	lat	1
U14972	ribosomal protein S10	lat	1
X69391	ribosomal protein L6	lat	1
X7346	ribosomal protein L3	lat	1
L01124	ribosomal protein S13	lat	2
M15661	ribosomal protein L44	lat	2
L06432	ribosomal protein S18	lat	4
S35960	ribosomal protein L10	lat	4
X06617	ribosomal protein S11	lat	5
AF007216	sodium bicarbonate cotransporter (HNBC1)	mem	1
AF030302	organic cation transporter (kidney)	mem	1
M19483	ATP synthase beta chain (precursor)	mem	1
L20941	ferritin heavy chain	met	1
M58028	ubiquitin-activating enzyme 1	met	1
M74816	clusterin precursor (clusterin)	met	1
U07736	NAD(P)H menadione oxidoreductase 2 (NMOR2)	met	1
M11147	ferritin light chain	met	2
AA046652	hkid3_4e7	nid	1
AA167094	hkid3_4c5	nid	1
AA344647	hkid3_4i1	nid	1
AA436183	hkid3_5i19	nid	1

ANHANG

Accession #	Genbeschreibung	Gen-klassifizierung	Anzahl der Klone
AA495827	hkid3_4i3	nid	1
AA515481	hkid3_4a21	nid	1
AB018310	hkid3_5e5	nid	1
Af015416	hkid3_5o23	nid	1
AF115384	hkid3_5a11	nid	1
AF115384	hkid3_5a9	nid	1
AF124522	hkid3_5g1	nid	1
AF147354	hkid3_5e19	nid	1
Ai038070	hkid3_5g23	nid	1
AI291305	hkid3_5i13	nid	1
AI309856	hkid3_5o7	nid	1
AI436552	hkid3_5m9	nid	1
AI685254	hkid3_5o9	nid	1
D50917	KIAA0127 gene	nid	1
D87119	hkid3_5o13	nid	1
Ai525635	hkid3_4i7	nid	1
H02943	hkid3_5i15	nid	1
H27199	hkid3_5e3	nid	1
Ai750308	hkid3_5i21	nid	1
Ai814366	hkid3_5i1 (similar to seven transmembrane mRNA)	nid	1
Af070660	hkid3_5e1	nid	1
L40392	hkid3_4g19	nid	1
R48364	hkid3_4c13	nid	1
R73516	hkid3_4e15	nid	1
X66534	guanylate cyclase soluble, alpha-1 chain	nuc	1
X98248	sortilin (transmembrane neuro peptide receptor)	rec	2
D87953	n-myc downstream regulated; reducing agents and tunicamycin-responsive protein (RTP) mRNA	scr	1
D89667	c-myc binding protein	scr	1
L23959	E2F-related transcription factor (DP1)	scr	1
M27877	zinc finger protein 83 (hpf1)	scr	1
U72882	interferon induced leucine zipper protein	scr	1
X97160	TFE3	scr	1
M26252	TCB gene (cytosolic thyroid hormone binding protein)	sig	1
M27281	vascular endothelial growth factor (VEGF)	sig	1
M35878	insulin like growth factor binding protein-3 (IGFBP3)	sig	1
U20982	insulin like growth factor binding protein-4 (IGFBP4)	sig	1
U52819	vascular endothelial growth factor B (VEGF-2)	sig	1
U76702	follicle stimulating hormone related protein FLRG	sig	1
X58288	protein-tyrosine phosphatase mu precursor	sig/rec	1
AF237621	keratin type I cytoskeletal 10	str	1
X04098	actin, gamma1	str	1
Z19554	vimentin	str	1
J03191	profilin	str	2
	Vector	vec	1

ANHANG

Tabelle 7.5 Genklassifizierung der komplexen Hybridisierungsergebnisse auf TN-Koloniefiltern

In dieser Tabelle wurden die Gene zusammengefasst, die bei der Hybridisierung der komplexen Probe (Patient 00929) auf die TN-Koloniefilter identifiziert wurden. Die Auswahl der Klone erfolgte manuell. Über die Genbank Accession Nummer (*Accession #*) und die *Genbeschreibung* werden die einzelnen Sequenzen charakterisiert. Die Rubrik *Genklassifizierung* beschreibt die Funktion des Gens. In der Spalte *Anzahl der Klone* wurde die Häufigkeit des Auftretens eines Gens nach der Sequenzierung dargestellt.

Accession #	Genbeschreibung	Gen-klassifizierung	Anzahl der Klone
J03746	glutathione S-transferase	ami	4
M61832	S-adenosylhomocysteine hydrolase	ami	2
U52144	isocitrate dehydrogenase	car	4
X01677	GAPDH	car	10
L44746	superoxide dismutase (SOD-1) gene, exon 5 with a mutation causing familial amyotrophic lateral sclerosis	ene	1
M22960	protective protein for beta-galactosidase (galactosialidosis)	ene	1
M36693	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	ene	3
U04735	microsomal stress 70 protein ATPase core	ene	1
U82819	UCP2 (uncoupling protein 2)	ene	2
X15414	Aldolase reductase	ene	1
X62996	cytochrome c oxidase I	ene	3
X62996	cytochrome c oxidase III	ene	3
X62996	ATP synthase 6	ene	2
X62996	ATP synthase 8	ene	2
X62996	NADH dehydrogenase 2	ene	2
X62996	NADH dehydrogenase 4L	ene	2
X62996	NADH dehydrogenase 4	ene	1
J00204	HLA-DR beta chain	im	1
K02765	complement component C3 mRNA, alpha and beta subunits	im	2
M24095	HLA-DR	im	1
M33600	MHC class II Protein HLA-DR-beta1	im	13
M73255	vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1)	im	1
L01124	ribosomal Protein S1	lat	2
L06432	ribosomal Protein S18	lat	5
L06499	ribosomal Protein L37a	lat	1
L19527	ribosomal Protein L27	lat	2
M15661	ribosomal Protein L44	lat	1
M19997	eukaryotic translation elongation factor 2	lat	7
M58458	ribosomal Protein S4 (X-linked)	lat	1
M64241	Wilm's tumor-related protein (QM)	lat	1
M81757	ribosomal Protein S19	lat	1
S56985	ribosomal Protein L19	lat	4
U14972	ribosomal Protein S10	lat	2
V00710	ribosomal Protein 16S	lat	6
X06617	ribosomal Protein S11	lat	5
X15940	ribosomal Protein L31	lat	6
X52138	ribosomal Protein L7a	lat	3
X55954	ribosomal Protein L17	lat	1
X62996	16S rRNA gene	lat	23
X62996	12S rRNA gene	lat	2
X63526	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	lat	1
D30037	phosphatidylinositol transfer protein	met	1
L13329	iduronate-2-sulfatase (IDS)	met	1
L20941	ferritin heavy chain	met	32
L29433	factor X (blood coagulation factor)	met	1
S79522	ubiquitin carboxyl extension protein	met	2
X57398	pM5 protein	met	1
X80909	alpha NAC	met	13
	fwhkid3_19g19s1	nid	1
	fwhkid3_12j18s1	nid	1
	fwhkid3_18p6s1	nid	1
	fwhkid3_19d4s1 und fwhkid3_22n13s1	nid	2
	fwhkid3_20 e 10s1	nid	1
X62996	phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase beta (PDNP3)	nuc	1
D87953	reducing agents and tunicamycin-responsive protein (RTP) mRNA	scr	2
U09414	Zinc finger protein 137	scr	1
U72882	interferon induced leucine zipper protein	scr	1
M30773	calcineurin B	sig	2

ANHANG

Accession #	Genbeschreibung	Gen-klassifizierung	Anzahl der Klone
U20982	insulin like growth factor binding protein-4 (IGFBP4)	sig	1
AF073957	BRAK	sig	13
D00017	Annexin II (lipocortin II)	sig/met	2
M10277	cytoplasmic beta-actin gene	str	1
M19713	tropomyosin alpha chain	str	2
M86667	NAP (nucleosome assembly protein)	str	1
X01703	alpha tubulin	str	9
X05608	neurofilament subunit NF-L	str	1

Tabelle 7.6 Genklassifizierung der Hybridisierungsergebnisse von Subtraktionsprodukten auf TN-Koloniefilter

In dieser Tabelle wurden die Gene zusammengefasst, die bei der Hybridisierung der beiden subtrahierten cDNAs auf die TN Koloniefilter identifiziert wurden. Die Auswahl der Klone erfolgte manuell. Über die Genbank Accession Nummer (*Accession #*) und die Genbeschreibung werden die einzelnen Sequenzen charakterisiert. Die Rubrik *Genklassifizierung* beschreibt die Funktion des Gens. In der Spalte *Anzahl der Klone* wurde die Häufigkeit des Auftretens eines Gens nach der Sequenzierung dargestellt.

Accession #	Genbeschreibung	Gen-klassifizierung	Anzahl der Klone
J03746	glutathione S-transferase	ami	5
X93209	nardilysin precursor (n-arginine dibasic convertase) NRD-1	ami	1
X01677	GAPDH	car	1
M22538	nadh-ubiquinone oxidoreductase	ene	1
X62996	hit with genbank consensus sequence	ene	1
K02765	complement c3 precursor (contains c3a anaphylatoxin)	im	7
V00567	beta-2-microglobulin	im	3
X03100	Hla class II histocompatibility antigen; dp alpha and beta chain precursor	im	1
U11292	human ki nuclear autoantigen	im	1
L06432	ribosomal protein S18	lat	29
AB028893	ribosomal protein S11	lat	3
D14530	ribosomal protein S23 (oder Hefehomolog S28)	lat	2
X85373	Sm protein G	lat	1
M58458	ribosomal protein S4	lat	1
U90545	NPT4 sodium-dependent phosphate transport protein 4	mem	1
L25880	epoxide hydrolase	met	1
X80909	alpha NAC mRNA	met	3
L20941	ferritin heavy chain	met	2
M17733	thymosin beta 4	str	1
U52640	nucleophosmin	sig	1

Tabelle 7.7 Hybridisierungsergebnisse der TN-Subtraktionen auf das UniGene-Filterset

In dieser Tabelle wurden alle Elemente zusammengefasst, die nach der Hybridisierung mit der TN-Subtraktionsbibliotheken ein mindestens achtfach stärkeres Signal im Vergleich zu der NT-Subtraktionsbibliothek zeigten. Es handelt sich um potenziell im Tumorgewebe stärker exprimierte Gene. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen xdigitise (AG Prof. Dr. Lehrach, MPI, Berlin) und ddiffs (T. Beißbarth, TBI, DKFZ, Heidelberg).

Bei der Rubriken *Accession #* und *Genbeschreibung*, *chromosomale Lokalisation* und *IMAGp950 Klon* handelt es sich um Ausgabespalten der Filterpositions-/Klonnamenverknüpfungstabelle des RZPD (Berlin). Die Rubrik *Genklassifikation* wurde manuell durch Datenbankabgleiche und Literaturrecherchen angefügt.

Accession #	Genbeschreibung	Gen-klass.	chrom. Lok.	IMAGp950 Klon
AA293557	Human mRNA for suppressor for yeast mutant	ami	-	IMAGp950P0679
AA418380	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, MICROSOMAL	ami	12	IMAGp950E2387
H66107	Uroporphyrinogen III synthase	ami	10	IMAGp950N1731
N78145	Glutathione S-transferase A2	ami	6	IMAGp950B0238
AA018698	Enolase 1, (alpha)	car	1	IMAGp950N1761
AA021106	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	car	12	IMAGp950O0962
H69414	Triosephosphate isomerase 1	car	1	IMAGp950P0631
AA058654	CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE VIA-LIVER PRECURSOR	ene	1	IMAGp950O1468
AA010837	Human breast epithelial antigen BA46 mRNA, complete cds	im	-	IMAGp950C1361
AA032179	Major histocompatibility complex, class II, DR beta	im	6	IMAGp950O1967

ANHANG

Accession #	Genbeschreibung	Gen- klass.	chrom. Lok.	IMAGp950 Klon
AA039710	COMPLEMENT C3 PRECURSOR	im	19	IMAGp950I0663
AA101886	CD97 antigen (leucocyte antigen)	im	19	IMAGp950A0769
AA402885	B-factor, properdin	im	6	IMAGp950P0783
AA402903	Immunoglobulin gamma 3 (Gm marker)	im	14	IMAGp950P1983
H05307	HLA CLASS II HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, DR ALPHA	im	17	IMAGp950M0223
H68296	HLA CLASS I HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, B-27 ALPHA	im	6	IMAGp950P2031
N43864	MHC class I protein HLA-A (HLA-A28,-B40, -Cw3)	im	6	IMAGp950P2443
R09775	PROTEASOME COMPONENT C13 PRECURSOR	im	-	IMAGp950M199
R12066	MHC class I protein HLA-A (HLA-A28,-B40, -Cw3)	im	6	IMAGp950E0510
R48353	Human breast tumor autoantigen mRNA, complete sequence	im	1	IMAGp950H2221
W32198	BETA-2-MICROGLOBULIN PRECURSOR	im	15	IMAGp950D2254
H86554	Ceruloplasmin (ferroxidase)	ion	3	IMAGp950C0733
R26148	Annexin II (lipocortin II)	ion	15	IMAGp950C0817
W52107	Human nuclear chloride ion channel protein (NCC27)	ion	-	IMAGp950K1456
H73774	Ribosomal protein L28	lat	19	IMAGp950O1432
H84394	60S RIBOSOMAL PROTEIN L24	lat	6	IMAGp950A0739
N27409	ESTs, Highly similar to 40S RIBOSOMAL PROTEIN S23	lat	-	IMAGp950O0842
N57421	Ribosomal protein L7a	lat	9	IMAGp950O0640
N90702	HETEROGENEOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN	lat	-	IMAGp950M1753
N91909	Ribosomal protein L35a	lat	3	IMAGp950C2053
R33533	40S RIBOSOMAL PROTEIN S15A	lat	-	IMAGp950L1217
R34371	60S RIBOSOMAL PROTEIN L18	lat	-	IMAGp950E0518
R43068	PROTEIN TRANSLATION FACTOR SUI1 HOMOLOG	lat	9	IMAGp950A2212
R59301	Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion pr	lat	19	IMAGp950O1816
R99757	40S RIBOSOMAL PROTEIN S19	lat	-	IMAGp950M1330
W00584	Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion pr	lat	19	IMAGp950P0450
W04434	Human mRNA for polyA binding protein	lat	-	IMAGp950A2250
W07195	40S RIBOSOMAL PROTEIN S23	lat	5	IMAGp950J0651
W21087	Translation elongation factor 1-alpha-1	lat	1	IMAGp950O1853
W55914	Ribosomal protein L31	lat	2	IMAGp950B2254
H25590	SERUM AMYLOID A PROTEIN PRECURSOR	lip	11	IMAGp950J0222
R52945	Arachidonate 5-lipoxygenase	lip	10	IMAGp950O1018
W01957	Human carnitine palmitoyltransferase II precursor	lip	1	IMAGp950F1556
W67364	Homo sapiens inactive palmitoyl-protein thioesterase	lip	6	IMAGp950P0257
AA025089	Voltage-dependent anion channel 1	mem	X	IMAGp950F1762
AA126225	UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE 1A PRECURSOR, MICROSOM	met	2	IMAGp950D0771
AA001845	Human mRNA for KIAA0183 gene, partial cds	nid	3	IMAGp950L1065
AA009778	ESTs	nid	1	IMAGp950O0666
AA009778	ESTs	nid	1	IMAGp950O0666
AA015933	ESTs, Highly similar to HYPOTHETICAL 13.6 KD PROTEIN	nid	16	IMAGp950L1260
AA016179	ESTs, Moderately similar to HEMOGLOBIN ALPHA CHAIN	nid	-	IMAGp950P0460
AA017438	Homo sapiens clone 23764 mRNA sequence	nid	3	IMAGp950K1561
AA024615	ESTs	nid	-	IMAGp950B0762
AA026793	ESTs	nid	-	IMAGp950K0563
AA032198	ESTs	nid	2	IMAGp950K1963
AA034314	EST	nid	-	IMAGp950A2067
AA035427	ESTs	nid	-	IMAGp950G0667
AA045947	ESTs, Highly similar to UBIQUITIN CARBOXYL-TERMINUS	nid	17	IMAGp950N0368
AA046071	ESTs, Weakly similar to putative protein [M.musculus]	nid	13	IMAGp950B1668
AA047494	ESTs	nid	-	IMAGp950N0168
AA053064	ESTs	nid	-	IMAGp950C0271
AA053324	H.sapiens beta glucuronidase pseudogene	nid	-	IMAGp950O0868
AA056180	ESTs	nid	-	IMAGp950B1168
AA056928	ESTs	nid	-	IMAGp950F0468
AA058609	ESTs, Weakly similar to HYPOTHETICAL 54.9 KD PROTEIN	nid	10	IMAGp950O0468
AA058720	ESTs	nid	-	IMAGp950B0568
AA065163	ESTs	nid	7	IMAGp950P0271
AA074442	ESTs, Weakly similar to POSSIBLE GTP-BINDING PROTEIN	nid	-	IMAGp950P1171
AA085768	ESTs, Weakly similar to F38H4.7 [C.elegans]	nid	15	IMAGp950O0568
AA115692	ESTs	nid	13	IMAGp950K0469

ANHANG

Accession #	Genbeschreibung	Gen- klass.	chrom. Lok.	IMAGp950 Klon
AA121356	ESTs, Highly similar to WNT-11 PROTEIN PRECURSOR	nid	-	IMAGp950A0869
AA127221	EST	nid	-	IMAGp950O1770
AA127246	ESTs	nid	4	IMAGp950O1570
AA127742	ESTs	nid	-	IMAGp950C0869
AA130153	ESTs	nid	-	IMAGp950J0970
AA136991	ESTs	nid	22	IMAGp950B0769
AA150251	ESTs	nid	-	IMAGp950N0369
AA150707	ESTs	nid	17	IMAGp950N0670
AA156596	ESTs	nid	-	IMAGp950C1170
AA291430	ESTs	nid	-	IMAGp950L0579
AA293549	ESTs	nid	-	IMAGp950P0279
AA394039	ESTs	nid	9	IMAGp950L0679
AA394294	ESTs	nid	-	IMAGp950D0880
AA400815	ESTs, Highly similar to Munc13-1 [R.norvegicus]	nid	-	IMAGp950L0383
AA400965	ESTs	nid	9	IMAGp950J0783
AA412283	ESTs, Weakly similar to !!!! ALU SUBFAMILY SQ WARNING	nid	-	IMAGp950P0982
AA425362	ESTs, Highly similar to PAXILLIN [Homo sapiens]	nid	-	IMAGp950E1288
AA427606	Human Hlark mRNA, complete cds	nid	11	IMAGp950P0388
AA428054	ESTs, Weakly similar to LIV-1 protein [H.sapiens]	nid	-	IMAGp950E1188
AA428728	ESTs	nid	-	IMAGp950P1987
AA436442	ESTs	nid	-	IMAGp950P1385
AA463604	Human mRNA for KIAA0152 gene, complete cds	nid	12	IMAGp950P1788
H15606	ESTs	nid	12	IMAGp950P2424
H28041	ESTs	nid	-	IMAGp950F2227
H42123	ESTs, Weakly similar to unknown [H.sapiens]	nid	20	IMAGp950H2227
H46549	ESTs, Highly similar to HYPOTHETICAL 56.5 KD PROTEIN	nid	-	IMAGp950B2327
H56127	ESTs	nid	-	IMAGp950F0330
H57526	ESTs	nid	-	IMAGp950L1330
H83353	ESTs	nid	10	IMAGp950L1638
H86658	ESTs, Weakly similar to N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE	nid	6	IMAGp950P2432
H99646	ESTs, Highly similar to 60S RIBOSOMAL PROTEIN L35	nid	-	IMAGp950O1341
N20484	ESTs	nid	9	IMAGp950M1641
N39889	ESTs	nid	-	IMAGp950I0340
N39889	ESTs	nid	-	IMAGp950I0340
N64351	ESTs	nid	-	IMAGp950H1547
N69898	ESTs, Highly similar to DIAMINE ACETYLTRANSFERASE	nid	17	IMAGp950N0450
N73084	PROBABLE UBIQUITIN CARBOXYL-TERMINAL HYDROLASE	nid	6	IMAGp950C1449
N79937	TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN	nid	10	IMAGp950B0548
N91862	EST	nid	-	IMAGp950C0253
N92960	Prostatic binding protein	nid	2	IMAGp950O2253
N93925	ESTs, Weakly similar to NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE	nid	-	IMAGp950C0954
N98235	ESTs	nid	17	IMAGp950P2053
R12526	ESTs	nid	-	IMAGp950G2310
R13366	ESTs	nid	3	IMAGp950F2410
R13663	ESTs	nid	-	IMAGp950E2410
R21841	ESTs, Weakly similar to twitchin [C.elegans]	nid	-	IMAGp950N2316
R25797	ESTs, Moderately similar to kidney-specific transporter	nid	-	IMAGp950F1013
R32013	ESTs, Weakly similar to B0334.4 [C.elegans]	nid	-	IMAGp950D1717
R32516	EST	nid	-	IMAGp950D1217
R39362	ESTs	nid	4	IMAGp950P013
R48931	ESTs, Weakly similar to F10F2.1 [C.elegans]	nid	-	IMAGp950J0613
R49189	ESTs	nid	2	IMAGp950N1413
R49189	ESTs	nid	2	IMAGp950N1413
R49189	ESTs	nid	2	IMAGp950N1413
R51073	ESTs	nid	-	IMAGp950O1714
R86328	ESTs	nid	-	IMAGp950H2428
T87863	ESTs	nid	1	IMAGp950K016
T90838	ESTs	nid	1	IMAGp950A075
T91423	ESTs	nid	-	IMAGp950A046
T96868	ESTs, Weakly similar to TYL gene product [H.sapiens]	nid	8	IMAGp950E117
T99470	EST, Highly similar to PROTEIN-TYROSINE PHOSPHATASE	nid	-	IMAGp950B157

ANHANG

Accession #	Genbeschreibung	Gen-klass.	chrom. Lok.	IMAGp950 Klon
W02677	ESTs	nid	-	IMAGp950O1456
W35270	ESTs	nid	-	IMAGp950P0556
W52857	Human mRNA for KIAA0277 gene, complete cds	nid	7	IMAGp950B0454
W72579	ESTs, Highly similar to VACUOLAR PROTEIN SORTING	nid	-	IMAGp950F1058
W73969	ESTs	nid	9	IMAGp950P1958
W85967	ESTs, Moderately similar to !!!! ALU SUBFAMILY J W	nid	-	IMAGp950L0664
W95256	ESTs, Weakly similar to W04D2.5 [C.elegans]	nid	15	IMAGp950P0459
AA057324	CELL SURFACE GLYCOPROTEIN MUC18 PRECURSOR	rec	11	IMAGp950B2167
AA412302	TYPE-1A ANGIOTENSIN II RECEPTOR	rec	3	IMAGp950P2382
W16450	Human mRNA for HHR23A protein, complete cds	rep	-	IMAGp950P0451
AA046279	Homo sapiens mRNA for osteoblast specific factor 2	scr	13	IMAGp950B0668
W24700	Homo sapiens sin3 associated polypeptide p18 (SAP18)	scr	13	IMAGp950H2353
AA401023	Protein kinase C substrate 80K-H	sig	2	IMAGp950L1183
AA430320	Receptor protein-tyrosine kinase EDDR1	sig	6	IMAGp950J1387
N33586	Granulin	sig	-	IMAGp950L0337
N72101	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin)	sig	5	IMAGp950N1248
N93145	Human protein kinase (zpk) mRNA, complete cds	sig	-	IMAGp950D2252
R17265	Chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)	sig	8	IMAGp950G0112
R85911	Human calmodulin mRNA, complete cds	sig	19	IMAGp950P0527
AA404312	Human profilin mRNA, complete cds	str	-	IMAGp950P0979
AA404401	Human thymosin beta-4 mRNA, complete cds	str	20	IMAGp950K2388
AA417001	PERIPHERIN	str	-	IMAGp950L0882
H93048	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	str	4	IMAGp950G2037
N92410	Human mRNA fragment encoding beta-tubulin.	str	6	IMAGp950P0153
R31775	Keratin 19	str	-	IMAGp950N0117
R43542	Vimentin	str	10	IMAGp950I1012
R87232	Microtubule-associated protein 1A	str	15	IMAGp950D2227
W31655	H2AZ histone	str	4	IMAGp950B0554
W94028	PROBABLE PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE ER-60 PRECURSOR	str	-	IMAGp950N1259
AA416641	ACROSIN-TRYPSIN INHIBITOR II PRECURSOR	str	4	IMAGp950P1082
N75461	VON WILLEBRAND FACTOR PRECURSOR	str	12	IMAGp950K2451

Tabelle 7.8 Hybridisierungsergebnisse der NT-Subtraktionen auf das UniGene-Filterset

In dieser Tabelle wurden alle Elemente zusammengefasst, die nach der Hybridisierung mit der NT-Subtraktionsbibliotheken ein mindestens achtfach stärkeres Signal im Vergleich zu der TN-Subtraktionsbibliothek zeigten. Es handelt sich um potenziell im Tumorgewebe schwächer exprimierte Gene. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen xdigitise (AG Prof. Dr. Lehrach, MPI, Berlin) und dfiffs (T. Beißbarth, TBI, DKFZ, Heidelberg).

Bei der Rubriken *Accession # und Genbeschreibung*, *chromosomale Lokalisation* und *IMAGp950 Klon* handelt es sich um Ausgabespalten der Filterpositions-/Klonnamenverknüpfungstabelle des RZPD (Berlin). Die Rubrik *Genklassifikation* wurde manuell durch Datenbankgleiche und Literaturrecherchen angefügt.

Accession #	Genbeschreibung	Gen-klass.	chrom. Lokal.	IMAGp950 Klon
AA287244	AMINOACYLASE-1	ami	3	IMAGp950M1579
AA402915	AMINOACYLASE-1	ami	3	IMAGp950B0483
R41703	Argininosuccinate synthetase	ami	12	IMAGp950B0111
AA001982	Fructose-bisphosphatase 1	car	9	IMAGp950J1065
N91723	Aldolase B, fructose-bisphosphate	car	9	IMAGp950N0949
R39863	Pyruvate carboxylase	car	11	IMAGp950K2410
AA069467	Homo sapiens DNA sequence from cosmid ICK0721Q	geno	6	IMAGp950A0864
W05039	Human DNA sequence from cosmid F0811	geno	-	IMAGp950C2451
R40946	Crystallin zeta (quinone reductase)	hsr	1	IMAGp950H1810
AA039961	Myasthenic syndrome antigen B	im	10	IMAGp950N2167
AA419168	HLA CLASS II HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, DQ(5) ALP	im	-	IMAGp950J2185
H62387	Homo sapiens mRNA for ISLR, complete cds	im	15	IMAGp950I2334
H27808	Human SIP-1 mRNA, complete cds	ion	-	IMAGp950P1222
H80891	Metallothionein 1L	ion	16	IMAGp950M2137
R37451	Solute carrier family 3	ion	2	IMAGp950I2310
R15945	Homo sapiens GC20 protein mRNA, complete cds	lat	3	IMAGp950O231
AA416720	ACROSIN-TRYPSIN INHIBITOR II PRECURSOR	lys	4	IMAGp950P1082
H97142	H.sapiens mRNA for Lon protease-like protein	lys	8	IMAGp950E1139
	ESTs	nid	-	IMAGp950L0634
AA039999	ESTs	nid	-	IMAGp950N2367

ANHANG

Accession #	Genbeschreibung	Gen- klass.	chrom. Lokal.	IMAGp950 Klon
AA062832	ESTs, Weakly similar to Y48E1B.t [C.elegans]	nid	4	IMAGp950M2364
AA102130	ESTs, Highly similar to actin-binding protein	nid	-	IMAGp950M0471
AA115804	ESTs	nid	-	IMAGp950D1971
AA417305	EST	nid	-	IMAGp950O2282
AA417387	ESTs	nid	-	IMAGp950F0182
AA419008	ESTs	nid	-	IMAGp950B1985
AA430329	ESTs	nid	-	IMAGp950B2487
AA430407	ESTs	nid	-	IMAGp950D2487
AA435549	ESTs	nid	-	IMAGp950D2181
AA442428	ESTs, Highly similar to LONG-CHAIN-FATTY-ACID-- COENZYME	nid	17	IMAGp950L1186
AA477694	Human clone 23665 mRNA sequence	nid	17	IMAGp950O0283
H03080	ESTs, Weakly similar to p619 [H.sapiens]	nid	1	IMAGp950I1221
H11869	ESTs	nid	-	IMAGp950L2324
H11877	Homo sapiens KIAA0396 mRNA, partial cds	nid	-	IMAGp950N0924
H40486	ESTs, Weakly similar to !!!! ALU SUBFAMILY SP WARNING	nid	1	IMAGp950A1027
H47048	ESTs	nid	11	IMAGp950D1127
H69001	EST, Highly similar to RETROVIRUS-RELATED POL	nid	11	IMAGp950H2033
N44075	ESTs	nid	3	IMAGp950N0143
N74431	ESTs	nid	-	IMAGp950D1350
N77990	ESTs	nid	-	IMAGp950L0138
N78096	ESTs	nid	18	IMAGp950P0338
N78151	ESTs, Weakly similar to GOLIATH PROTEIN [Drosophila]	nid	-	IMAGp950P2338
N78924	ESTs	nid	10	IMAGp950B2451
N80983	ESTs	nid	2	IMAGp950K2449
N89599	ESTs, Moderately similar to !!!! ALU SUBFAMILY SB	nid	-	IMAGp950M0952
N92030	ESTs	nid	11	IMAGp950L2149
N95368	EST	nid	-	IMAGp950P1253
R13330	ESTs	nid	15	IMAGp950F0610
R13604	ESTs	nid	1	IMAGp950M2010
R13628	ESTs	nid	-	IMAGp950C2010
R14301	ESTs	nid	-	IMAGp950N2210
R21841	ESTs, Weakly similar to twitchin [C.elegans]	nid	-	IMAGp950N2316
R26194	ESTs	nid	19	IMAGp950A1817
R33377	ESTs	nid	-	IMAGp950N2417
R36935	ESTs	nid	4	IMAGp950O2210
R37056	ESTs, Moderately similar to nuclear autoantigen	nid	19	IMAGp950E1910
R37119	ESTs, Moderately similar to cytochrome c-like	nid	-	IMAGp950C2310
R37302	ESTs, Moderately similar to KIAA0273 [H.sapiens]	nid	10	IMAGp950D1910
R37309	ESTs	nid	3	IMAGp950D2310
R37362	ESTs	nid	2	IMAGp950H2010
R37364	Human clone 23878 mRNA sequence	nid	11	IMAGp950H2210
R37377	ESTs	nid	2	IMAGp950J2210
R37397	ESTs	nid	9	IMAGp950J2410
R37476	Human mRNA for KIAA0298 gene, complete cds	nid	11	IMAGp950J2010
R37651	ESTs	nid	-	IMAGp950G2010
R37727	ESTs	nid	15	IMAGp950I2010
R37740	Homo sapiens mRNA for neuropathy target esterase	nid	19	IMAGp950I2410
R37796	ESTs	nid	1	IMAGp950O2010
R38511	ESTs, Weakly similar to HYPOTHETICAL 32.5 KD PROTEIN	nid	7	IMAGp950E2210
R39120	ESTs	nid	2	IMAGp950G2210
R39124	ESTs, Highly similar to HYPOTHETICAL 433.2 KD PROTEIN	nid	7	IMAGp950G2410
R39777	ESTs	nid	2	IMAGp950M1910
R39804	ESTs	nid	-	IMAGp950O1910
R39901	ESTs	nid	4	IMAGp950M2210
R40173	ESTs, Weakly similar to putative p150 [H.sapiens]	nid	-	IMAGp950J2310
R40386	ESTs	nid	8	IMAGp950L2110
R40388	ESTs	nid	-	IMAGp950L1910
R40414	Homo sapiens neuroendocrine-specific protein A	nid	14	IMAGp950N1710
R40503	ESTs	nid	3	IMAGp950P1910
R40511	Homo sapiens mRNA for KIAA0559 protein, partial cds	nid	7	IMAGp950P2310
R40560	ESTs, Weakly similar to GPI-anchored protein p137	nid	12	IMAGp950L2410
R40563	Secretory granule, neuroendocrine protein 1	nid	15	IMAGp950L2210
R40595	ESTs	nid	5	IMAGp950N2110
R40731	ESTs	nid	12	IMAGp950N1810

ANHANG

Accession #	Genbeschreibung	Gen- klass.	chrom. Lokal.	IMAGp950 Klon
R40758	ESTs	nid	9	IMAGp950P2010
R40781	ESTs	nid	-	IMAGp950D1810
R40789	ESTs	nid	14	IMAGp950D2010
R40802	ESTs	nid	15	IMAGp950F0610
R40918	ESTs	nid	-	IMAGp950D2210
R45012	Homo sapiens putative tumor suppressor protein	nid	-	IMAGp950C2313
R46244	ESTs	nid	12	IMAGp950P1113
R49644	ESTs	nid	12	IMAGp950I1714
T61992	ESTs	nid	-	IMAGp950K012
T77020	ESTs	nid	1	IMAGp950O023
T79574	ESTs	nid	11	IMAGp950G025
T86515	ESTs	nid	-	IMAGp950A216
T86953	ESTs	nid	6	IMAGp950C236
T86956	ESTs	nid	-	IMAGp950C216
T87036	ESTs	nid	6	IMAGp950C236
T87914	ESTs	nid	-	IMAGp950M206
T91421	ESTs, Weakly similar to HYPOTHETICAL 37.0 KD PROTEIN	nid	-	IMAGp950A026
T91429	Human mRNA for KIAA0173 gene, complete cds	nid	2	IMAGp950A186
T91436	ESTs	nid	4	IMAGp950A226
T96998	ESTs	nid	-	IMAGp950B226
T97001	Homo sapiens mRNA for KIAA0286 gene, partial cds	nid	-	IMAGp950B246
T97234	ESTs, Weakly similar to kidney-specific transport	nid	-	IMAGp950D226
T98253	ESTs	nid	-	IMAGp950G067
T98253	ESTs	nid	-	IMAGp950G067
T98529	ESTs	nid	-	IMAGp950N077
W07032	ESTs	nid	-	IMAGp950F0451
W16952	ESTs, Moderately similar to !!!! ALU SUBFAMILY SB	nid	-	IMAGp950M0952
W21416	Prostatic binding protein	nid	2	IMAGp950O2253
W24825	ESTs, Moderately similar to !!!! ALU SUBFAMILY J W	nid	-	IMAGp950P1353
W42746	ESTs	nid	-	IMAGp950P0155
W52907	ESTs	nid	-	IMAGp950P1754
W92356	ESTs	nid	-	IMAGp950K1460
W96390	Homo sapiens mRNA for EDF-1 protein	nid	9	IMAGp950A1660
AA033856	Kininogen	phy	3	IMAGp950D0766
R80326	Membrane component, chromosome 1, surface marker 1	rec	1	IMAGp950I2220
R92249	Homo sapiens purinergic receptor P2Y5 mRNA, complete cds	rec	13	IMAGp950K1529
AA022747	Transcription factor 11 (basic leucine zipper type)	scr	17	IMAGp950I2262
AA054165	H.sapiens mRNA for STM-7 protein	sig	-	IMAGp950D2463
AA284558	Homo sapiens mRNA for Nck, Ash and phospholipase C	sig	-	IMAGp950E2479
AA418475	Cyclin-dependent kinase 2	sig	12	IMAGp950C2187
N49117	Cystic fibrosis conductance regulator	sig	7	IMAGp950B2445
AA477389	Homo sapiens ICB-1 mRNA, complete cds	str	1	IMAGp950E1283
R40734	Homo sapiens kinesin-related protein (KIF3C) mRNA	str	2	IMAGp950N2010
AA495769	Synuclein, beta	tra	5	IMAGp950O2287

Tabelle 7.9 Komplexe Hybridisierung auf das UniGene-Filterset

In dieser Tabelle wurden alle Gene zusammengefasst, die durch die komplexe Hybridisierung auf die UniGene-Filter identifiziert wurden. Die Auswahlkriterien wurden unter 3.5 beschrieben. Zu den Ergebnissen der Hybridisierungen der Stadien III und IV aus dieser Arbeit, wurden ergänzend Hybridisierungsergebnisse des Stadiums I zugefügt (Dr. J. Boer, AG Molekulare Genomanalyse, DKFZ, Heidelberg). Die Einordnung in verschiedene *biologische Prozesse* erfolgte manuell durch Literaturvergleiche und Datenbanksuchen. Neben den biologischen Prozessen wurde die Zelllokalisierung ebenso manuell ermittelt: cyt, Zytoplasma; ecm, extrazelluläre Matrix; endo, endoplasmatisches Reticulum; icm, in der Zellmembran nach außen schauend; mito, Mitochondrien; nid, nicht bekannt; nuc, Nucleus; sec, sekretiertes Protein. Bei der Rubrik *Accession # und Genbeschreibung* handelt es sich um eine Ausgabespalte der Filterpositions-/Klonnamenverknüpfungstabelle des RZPD (Berlin). Genecards ist eine Datenbank, die Verknüpfungen zu vielen medizinischen Servern bietet (<http://herkules.inet.dkfz-heidelberg.de/GeneCards/>). Die Beschreibungen unter *Genecards Beschreibung und Abkürzungen* wurden aus dieser Datenbank zusammengestellt. Die Intensität der Farben ist korreliert mit der Anzahl der Patienten, bei denen dieses Gen durch die komplexe Hybridisierung als differenziell exprimiert nachgewiesen wurde. Je intensiver die rote Farbe ist, desto mehr Patienten zeigten eine stärkere Expression des Gens im NZK-Tumormaterial, je intensiver die grüne Farbe, desto mehr Patienten zeigten die schwächere Expression des Gens im NZK-Tumormaterial verglichen mit dem normalen Nierenmaterial.

I	III	IV	IMAGp950 Klon	biol. Prozess	Zell-lokalisierung	Accession # und Genbeschreibung	Genecards Beschreibung und Abkürzungen
			IMAGp950B0111	ami	cyt	X01630: Human mRNA for argininosuccinate synthetase /cytoband=9q34-qter	
			IMAGp950H0919	ami	cyt	S68805: L-arginine:glycine amidinotransferase [human, kidney carcinoma cells, mRNA, 2330 nt] /chromosome=15	GATM (glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase))
			IMAGp950J0225	ami	cyt	L07548: Human aminoacylase-1 (ACY1) mRNA, complete cds /chromosome=3 /cytoband=3p21.1	
			IMAGp950C0743	ami	cyt	L07548: Human aminoacylase-1 (ACY1) mRNA, complete cds /chromosome=3 /cytoband=3p21.1	
			IMAGp950M1579	ami	cyt	L07548: Human aminoacylase-1 (ACY1) mRNA, complete cds /chromosome=3 /cytoband=3p21.1	
			IMAGp950B0483	ami	cyt	L07548: Human aminoacylase-1 (ACY1) mRNA, complete cds /chromosome=3 /cytoband=3p21.1	
			IMAGp950N1329	ami	cyt	L07548: Human aminoacylase-1 (ACY1) mRNA, complete cds /chromosome=3 /cytoband=3p21.1	
			IMAGp950G2423	ami	nid	U24267: Human pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (P5CDh) mRNA, short form, complete cds /chromosome=16	"ALDH4 (aldehyde dehydrogenase 4 (glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase; pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase))"
			IMAGp950N0124	cadh	ecm	M14219: Human chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan (PG40) core protein mRNA, complete cds /chromosome=6 /cytoband=12q23	DCN (decorin)
			IMAGp950O0133	car	nid	L29254: Human (clone P1-5) L-iditol-2 dehydrogenase gene /chromosome=15 /cytoband=15q15-q21.1	
			IMAGp950D2354	cyc	nid	L24498: Human gadd45 gene, complete cds /chromosome=1 /cytoband=1p34-p12	GADD45A (growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha)
			IMAGp950D2243	cyc	nuc	U22398: Human Cdk-inhibitor p57KIP2 (KIP2) mRNA, complete cds /cytoband=11p15.5	
			IMAGp950D1933	dev	sec	M34276: Human plasminogen gene /chromosome=2 /cytoband=6q26	
			IMAGp950C1138	dev	sec	M75106: Human prepro-plasma carboxypeptidase B mRNA, complete cds /chromosome=13 /cytoband=13q14.11	CPB2 (carboxypeptidase B2 (plasma))

ANHANG

I	III	IV	IMAGp950 Klon	biol. Prozess	Zell-lokalisation	Accession # und Genbeschreibung	Genecards Beschreibung und Abkürzungen
			IMAGp950K0253	ene	cyt	X03350: Human mRNA for alcohol dehydrogenase beta-1-subunit (ADH1-2 allele) /chromosome=4 /cytoband=4q21-q23	ADH2 (alcohol dehydrogenase 2 (class I), beta polypeptide)
			IMAGp950D0883	ene	cyt	L05144: Homo sapiens (clone lamda-hPEC-3) phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK1) mRNA, complete cds /chromosome=20 /cytoband=20q13.31	
			IMAGp950G039	ene	cyt	AF000573: Homo sapiens homogentisate 1,2-dioxygenase gene, complete cds /chromosome=3 /cytoband=3q21-q23	
			IMAGp950J1065	ene	cyt	U21931: Human fructose-1,6-biphosphatase (FBP1) gene /chromosome=9 /cytoband=9q22.3	
			IMAGp950O0988	ene	endo	X65140: H.sapiens ACAA gene (exons 1 & 2) for peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase /chromosome=3 /cytoband=3p23-p22	
			IMAGp950N0615	ene	mito	U87939: Human aconitate hydratase (ACO2) gene /chromosome=22 /cytoband=22q11.2-q13.31	
			IMAGp950D0763	ene	mito	AF095703: Homo sapiens short chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase precursor (HADHSC) gene, nuclear gene encoding mitochondrial protein, complete cds /chromosome=4 /cytoband=4q22-q26	
			IMAGp950F1381	ene	mito	U87939: Human aconitate hydratase (ACO2) gene /chromosome=22 /cytoband=22q11.2-q13.31	
			IMAGp950L2185	ene	mito	X14608: Human mRNA for propionyl-CoA carboxylase alpha-chain (EC 6.4.1.3) /chromosome=13 /cytoband=13q32	
			IMAGp950N0949	ene	nid	D00183: Homo sapiens gene for aldolase B /chromosome=9 /cytoband=9q21.3-q22.2	
			IMAGp950N0132	hsr	cyt	X14789: H.sapiens alpha-A crystallin gene exon 1,2 and pseudoexon /cytoband=21q22.3	
			IMAGp950J2250	hsr	cyt	Human heart mRNA for heat shock protein 90, partial cds	
			IMAGp950J2185	imm	icm	X00033: Human RNA sequence of the human DS glycoprotein alpha subunit from the HLA-D region of the major histocompatibility complex(MHC	HLA-DQA1 (major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1)
			IMAGp950F0949	imm	sec	Y00318: Human mRNA for complement control protein factor I /chromosome=4 /cytoband=4q25	IF (I factor (complement))
			IMAGp950C1033	ion	nid	X86400: H.sapiens mRNA for gamma subunit of sodium potassium ATPase /chromosome=11 /cytoband=11q23	
			IMAGp950B0236	ion	cyt	Y07755: H.sapiens S100A2 gene, exon 1, 2 and 3 /cytoband=1q21	S100A2 (S100 calcium-binding protein A2)
			IMAGp950N1029	ion	cyt	M10942: Human metallothionein-Ie gene (hMT-Ie) /cytoband=16q13	
			IMAGp950G2030	ion	cyt	J03910: Human (clone 14VS) metallothionein-IG (MT1G) gene, complete cds /chromosome=16 /cytoband=16q13	
			IMAGp950C1032	ion	cyt	X64177: H.sapiens mRNA for metallothionein /cytoband=16q13	
			IMAGp950D0437	ion	cyt	J03910: Human (clone 14VS) metallothionein-IG (MT1G) gene, complete cds /chromosome=16 /cytoband=16q13	

ANHANG

I	III	IV	IMAGp950 Klon	biol. Prozess	Zell-lokalisierung	Accession # und Genbeschreibung	Genecards Beschreibung und Abkürzungen
			IMAGp950D0837	ion	cyt	AJ011772: Homo sapiens MT1L gene /chromosome=16 /cytoband=16q13	
			IMAGp950M2137	ion	cyt	AJ011772: Homo sapiens MT1L gene /chromosome=16 /cytoband=16q13	
			IMAGp950H1050	ion	cyt	AJ011772: Homo sapiens MT1L gene /chromosome=16 /cytoband=16q13	
			IMAGp950M1029	ion	cyt	X64177: H.sapiens mRNA for metallothionein /cytoband=16q13	MT1H (metallothionein 1H)
			IMAGp950I2129	ion	cyt	X64177: H.sapiens mRNA for metallothionein /cytoband=16q13	MT1H (metallothionein 1H)
			IMAGp950J2249	ipt	endo	L40157: Human endosome-associated protein (EEA1) mRNA, complete cds /chromosome=12	EEA1 (early endosome antigen 1, 162kD)
			IMAGp950H1682	lip	endo	D88308: Homo sapiens mRNA for very-long-chain acyl-CoA synthetase, complete cds /chromosome=15 /cytoband=15q21.2	
			IMAGp950H0213	lip	icm	L00352: Human low density lipoprotein receptor gene /chromosome=15 /cytoband=19p13.3	
			IMAGp950P1165	lip	icm	L00352: Human low density lipoprotein receptor gene /chromosome=15 /cytoband=19p13.3	
			IMAGp950M1114	lip	nid	U89281: Human oxidative 3 alpha hydroxysteroid dehydrogenase mRNA, complete cds /chromosome=12	
			IMAGp950L1951	lyt	cyt	J03068: Human DNF1552 (lung) mRNA, complete cds /chromosome=3 /cytoband=3p21	APEH (N-acylaminoacyl-peptide hydrolase)
			IMAGp950M0311	lyt	nid	J04605: Human prolidase (imidodipeptidase) mRNA, complete cds /chromosome=19 /cytoband=19q12-q13.2	PEPD (peptidase D)
			IMAGp950C1356	met	nid	U07736: Human quinone oxidoreductase2 (NQO2) gene /chromosome=6 /cytoband=6pter-q12	NMOR2 (NAD(P)H menadione oxidoreductase 2, dioxin-inducible)
			IMAGp950N0412	nid	nid		ESTs
			IMAGp950B1420	nid	nid	"AL049313: Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564B076 (from clone DKFZp564B076) /chromosome=6"	
			IMAGp950D1633	nid	nid	AJ005821: Homo sapiens mRNA for X-like 1 protein /chromosome=5 /cytoband=5	
			IMAGp950I1839	nid	nid	AF068862: Homo sapiens BAC clone 157K21 from 8q21, complete sequence /chromosome=8 /cytoband=8q21.3-q22.1	
			IMAGp950I0954	nid	nid		ESTs
			IMAGp950F037	nid	nid	AF023466: Homo sapiens putative glycine-N-acyltransferase mRNA, complete cds /chromosome=11	
			IMAGp950B2164	oxi	nid	X77584: H.sapiens mRNA for ATL-derived factor/thioredoxin /chromosome=17 /cytoband=9	TXN (thioredoxin)
			IMAGp950G1882	oxra	cyt	J05459: Human glutathione transferase M3 (GSTM3) mRNA, complete cds /chromosome=1 /cytoband=1p13.3	
			IMAGp950H2142	oxra	cyt	J04794: Human aldehyde reductase mRNA, complete cds /chromosome=1 /cytoband=7q35	AKR1A1 (aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase))
			IMAGp950P0236	oxra	endo	M64082: Human flavin-containing monooxygenase (FMO1) mRNA, complete cds /cytoband=1q23-q25	

ANHANG

I	III	IV	IMAGp950 Klon	biol. Prozess	Zell-lokalisierung	Accession # und Genbeschreibung	Genecards Beschreibung und Abkürzungen
			IMAGp950I0371	oxra	sec	D16362: Human DNA for plasma glutathione peroxidase, exon 3, 4 and 5 /chromosome=5 /cytoband=5q23	GPX3 (glutathione peroxidase 3 (plasma))
			IMAGp950E1729	phy	sec	K02566: Human alpha-2-thiol proteinase inhibitor mRNA, complete coding sequence /chromosome=3 /cytoband=3q27	kininogen
			IMAGp950C1142	phy	sec		
			IMAGp950D0766	phy	sec	K02566: Human alpha-2-thiol proteinase inhibitor mRNA, complete coding sequence /chromosome=3 /cytoband=3q27	KNG (kininogen)
			IMAGp950C2485	sig	cyt	D42108: Human mRNA for phospholipase C, complete cds /cytoband=2q33	PLCE (phospholipase C, epsilon)
			IMAGp950K1458	sig	icm	X73617: H.sapiens mRNA for T-cell receptor delta /chromosome=14 /cytoband=14q11.2	
			IMAGp950F0857	sig	icm	X77753: H.sapiens TROP-2 gene /chromosome=1 /cytoband=1p32-p31	M1S1 (membrane component, chromosome 1, surface marker 1 (40kD glycoprotein, identified by monoclonal antibody GA733))
			IMAGp950K2484	sig	icm	M58051: Human fibroblast growth factor receptor (FGFR3) mRNA, complete cds /chromosome=4 /cytoband=4p16.3	
			IMAGp950K2484	sig	icm	M58051: Human fibroblast growth factor receptor (FGFR3) mRNA, complete cds /chromosome=4 /cytoband=4p16.3	
			IMAGp950D247	sig	nid	AF069301: Homo sapiens DBI-related protein mRNA, complete cds /chromosome=6 /cytoband=6	
			IMAGp950L0863	tar	cyt	AF069765: Homo sapiens signal recognition particle 72 (SRP72) mRNA, complete cds /chromosome=1 /cytoband=10q22	SRP72 (signal recognition particle 72kD)
			IMAGp950C0112	tra	icm	AF007216: Homo sapiens sodium bicarbonate cotransporter (HNBC1) mRNA, complete cds /cytoband=4q21	SLC4A4 (solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4)
			IMAGp950F1013	tra	icm	AF104038: Homo sapiens para-aminohippurate transporter mRNA, complete cds /chromosome=11 /cytoband=11q11.7	SLC22A6 (solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6)
			IMAGp950O0913	tra	icm	U41518: Human channel-like integral membrane protein (AQP-1) mRNA, clone AQP-1-2344, partial cds /chromosome=7 /cytoband=7p14	AQP1 (aquaporin 1 (channel-forming integral protein, 28kD))
			IMAGp950J1265	tra	icm	AJ001417: Homo sapiens mRNA for extraneuronal monoamine transporter /chromosome=6 /cytoband=6q26-q27	SLC22A3 (solute carrier family 22 (extraneuronal monoamine transporter), member 3)
			IMAGp950O1566	tra	icm	X71355: H.sapiens mRNA for sodium-phosphate transport system 1 /chromosome=6 /cytoband=6p23-p21.3	SLC17A1 (solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 1)
			IMAGp950F1950	tra	icm	AB001325: Human AQP3 gene for aquaporine 3 (water channel), partail cds /cytoband=9p13	

ANHANG

I	III	IV	IMAGp950 Klon	biol. Prozess	Zell-lokalisierung	Accession # und Genbeschreibung	Genecards Beschreibung und Abkürzungen
			IMAGp950P1583	tra	nuc	AF034102: Homo sapiens NBMPR-insensitive nucleoside transporter ei (ENT2) mRNA, complete cds /chromosome=11 /cytoband=11q13	SLC29A2 (solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2)
			IMAGp950M1241	ami	mito	X94453: H.sapiens mRNA for pyrroline 5-carboxylate synthetase /cytoband=10	
			IMAGp950L219	apo	cyt	AF070674: Homo sapiens inhibitor of apoptosis protein-1 (MIHC) mRNA, complete cds /chromosome=11 /cytoband=11q22	
			IMAGp950B2152	apo	cyt	U25804: Human Ich-2 cysteine protease mRNA, complete cds /chromosome=11 /cytoband=11q22.2-q22.3	CASP4 (caspase 4, apoptosis-related cysteine protease)
			IMAGp950M2154	cadh	ecm	X91171: H.sapiens mRNA for laminin alpha 4 protein /chromosome=6 /cytoband=6q21	LAMA4 (laminin, alpha 4)
			IMAGp950H0817	cadh	ecm	J02814: Human chondroitin sulfate proteoglycan core protein mRNA, 3 end /chromosome=5	
			IMAGp950I0118	cadh	ecm	X02761: Human mRNA for fibronectin (FN precursor) /chromosome=2 /cytoband=2q34	
			IMAGp950P0855	cadh	ecm	X02761: Human mRNA for fibronectin (FN precursor) /chromosome=2 /cytoband=2q34	
			IMAGp950C0656	cadh	ecm	X02761: Human mRNA for fibronectin (FN precursor) /chromosome=2 /cytoband=2q34	
			IMAGp950N1272	cadh	ecm	X02761: Human mRNA for fibronectin (FN precursor) /chromosome=2 /cytoband=2q34	
			IMAGp950N2139	cadh	ecm	M31165: Human tumor necrosis factor-inducible (TSG-6) mRNA fragment, adhesion receptor CD44 putative CDS	TNFAIP6 (tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6)
			IMAGp950A0220	cadh	ecm	M77349: Human transforming growth factor-beta induced gene product (BIGH3) mRNA, complete cds /chromosome=5 /cytoband=5q31	
			IMAGp950D1720	cadh	ecm	Y14690: Homo sapiens mRNA for procollagen alpha 2(V) /chromosome=2 /cytoband=2q14-q32	COL5A2 (collagen, type V, alpha 2)
			IMAGp950H0733	cadh	ecm	X06700: Human mRNA 3 region for pro-alpha1(III) collagen /chromosome=7 /cytoband=2q31	
			IMAGp950F186	cadh	ecm	X06700: Human mRNA 3 region for pro-alpha1(III) collagen /chromosome=7 /cytoband=2q31	COL3A1 (collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant))
			IMAGp950F1417	cadh	ecm	M26576: Human alpha-1 collagen type IV gene /chromosome=13 /cytoband=13q34	
			IMAGp950L1739	cadh	ecm	Z74616: H.sapiens mRNA for prepro-alpha2(I) collagen /chromosome=7 /cytoband=7q22.1	
			IMAGp950G0218	cadh	endo	D83174: Human mRNA for collagen binding protein 2, complete cds /chromosome=11 /cytoband=11q13.5	
			IMAGp950I1768	cadh	icm	M29277: Human isolate JuSo MUC18 glycoprotein mRNA (3 variant), complete cds /chromosome=11	MCAM (melanoma adhesion molecule)
			IMAGp950C0679	cadh	icm	AB003184: Homo sapiens mRNA for ISLR, complete cds /chromosome=4 /cytoband=15q23-q24	

ANHANG

I	III	IV	IMAGp950 Klon	biol. Prozess	Zell-lokalisierung	Accession # und Genbeschreibung	Genecards Beschreibung und Abkürzungen
			IMAGp950P0116	cadh	nid	M24487: Human prolyl 4-hydroxylase alpha subunit mRNA, complete cds, clone PA-15 /chromosome=10 /cytoband=10q21.3-q23.1	P4HA1 (procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide I)
			IMAGp950P1383	cadh	nid	D87433: Human mRNA for KIAA0246 gene, partial cds /chromosome=3	
			IMAGp950O2251	cadh	ecm	Z74616: H.sapiens mRNA for prepro-alpha2(I) collagen /chromosome=7 /cytoband=7q22.1	
			IMAGp950C0918	car	endo	Z12173: H.sapiens GNS mRNA encoding glucosamine-6-sulphatase /chromosome=12 /cytoband=12q14	
			IMAGp950E2342	cyc	nid	U82130: Human tumor susceptibility protein (TSG101) mRNA, complete cds /chromosome=8 /cytoband=11p15	
			IMAGp950A0849	dev	ecm	Human collagenase inhibitor mRNA, complete cds	TIMP1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor))
			IMAGp950J1012	ene	cyt	X02152: Human mRNA for lactate dehydrogenase-A (LDH-A, EC 1.1.1.27) /chromosome=11 /cytoband=11p15.4	
			IMAGp950D2128	ene	cyt	D25328: Human mRNA for platelet-type phosphofructokinase, complete cds /chromosome=10 /cytoband=10p15.3-p15.2	
			IMAGp950A2229	ene	cyt	V00572: Human mRNA encoding phosphoglycerate kinase /cytoband=Xq13	
			IMAGp950N2230	ene	mito	X05246: Human testis-specific PGK-2 gene for phosphoglycerate kinase (ATP:3-phospho-D-glycerate 1-phosphotransferase, EC 2.7.2.3) /cytoband=Xq13	
			IMAGp950A1052	ene	nid	D25328: Human mRNA for platelet-type phosphofructokinase, complete cds /chromosome=10 /cytoband=10p15.3-p15.2	
			IMAGp950P0459	ene	nid	X02152: Human mRNA for lactate dehydrogenase-A (LDH-A, EC 1.1.1.27) /chromosome=11 /cytoband=11p15.4	LDHA (lactate dehydrogenase A)
			IMAGp950I1885	imm	endo	Y13582: Homo sapiens mRNA for TAP-associated protein /chromosome=6 /cytoband=6p21.3	
			IMAGp950M0223	imm	icm	J00194: human hla-dr antigen alpha-chain mrna & ivs fragments /chromosome=6	HLA-DRA (major histocompatibility complex, class II, DR alpha)
			IMAGp950N2329	imm	icm	M20429: Human MHC class II HLA-DR-beta mRNA (DR2-DQw1/DR4 DQw3), complete cds, clone ROF-beta-2a /chromosome=6 /cytoband=6p21.3	
			IMAGp950C0831	imm	icm	X00457: Human mRNA for SB class II histocompatibility antigen alpha-chain /chromosome=6	
			IMAGp950P2031	imm	icm	M16102: Human MHC HLA-B7 class I cell surface glycoprotein heavy chain mRNA, complete cds /chromosome=6	
			IMAGp950G0950	imm	icm	X00033: Human RNA sequence of the human DS glycoprotein alpha subunit from the HLA-D region of the major histocompatibility complex(MHC	HLA-DQA1 (major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1)

ANHANG

I	III	IV	IMAGp950 Klon	biol. Prozess	Zell-lokalisation	Accession # und Genbeschreibung	Genecards Beschreibung und Abkürzungen
			IMAGp950H2252	imm	icm	M20429: Human MHC class II HLA-DR-beta mRNA (DR2-DQw1/DR4 DQw3), complete cds, clone ROF-beta-2a /chromosome=6 /cytoband=6p21.3	
			IMAGp950L0556	imm	icm	M83664: Human MHC class II lymphocyte antigen (HLA-DP) beta chain mRNA, complete cds /chromosome=6 /cytoband=6p21.3	HLA-DPB1 (major histocompatibility complex, class II, DP beta 1)
			IMAGp950E2157	imm	icm	M16942: Human MHC class II HLA-DRw53-associated glycoprotein beta-chain mRNA, complete cds /chromosome=6	
			IMAGp950O1967	imm	icm	M20429: Human MHC class II HLA-DR-beta mRNA (DR2-DQw1/DR4 DQw3), complete cds, clone ROF-beta-2a /chromosome=6 /cytoband=6p21.3	
			IMAGp950F0618	imm	icm	X00033: Human RNA sequence of the human DS glycoprotein alpha subunit from the HLA-D region of the major histocompatibility complex(MHC	HLA-DQA1 (major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1)
			IMAGp950N044	imm	nid	X03084: Human mRNA for C1q B-chain of complement system /chromosome=1 /cytoband=1p36.3-p34.1	C1QB (complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide)
			IMAGp950C0817	ipt	cyt	D00017: Homo sapiens mRNA for lipocortin II, complete cds /cytoband=15q21-q22	ANXA2 (annexin A2)
			IMAGp950B0818	ipt	nuc	AF039022: Homo sapiens exportin t mRNA, complete cds /chromosome=12	XPOT (exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs))
			IMAGp950C1411	lat	cyt	U79273: Human clone 23933 mRNA sequence /chromosome=17	
			IMAGp950G1513	lat	cyt	U79273: Human clone 23933 mRNA sequence /chromosome=17	
			IMAGp950L1217	lat	cyt	X84407: H.sapiens mRNA for ribosomal protein S15a /chromosome=6 /cytoband=16p	
			IMAGp950E0518	lat	cyt	L11566: Homo sapiens ribosomal protein L18 (RPL18) mRNA, complete cds	
			IMAGp950L1321	lat	cyt	AL022718: Human DNA sequence from clone 1052M9 on chromosome Xq25. Contains the SH2D1A gene for SH2 domain protein 1A, Duncan s disease (lymphoproliferative syndrome) (DSHP), part of a 60S Acidic Ribosomal protein 1 (RPLP1) LIKE gene and part of a mouse DOC4 LIKE gene. Contains ESTs and GSSs	mix
			IMAGp950B1626	lat	cyt	M60854: Human ribosomal protein S16 mRNA, complete cds /chromosome=19 /cytoband=19q	
			IMAGp950O1227	lat	cyt	L06498: Homo sapiens ribosomal protein S20 (RPS20) mRNA, complete cds /cytoband=8q	
			IMAGp950D1128	lat	cyt	M81757: H.sapiens S19 ribosomal protein mRNA, complete cds /chromosome=1 /cytoband=19q13.2	
			IMAGp950C042	lat	cyt	L06498: Homo sapiens ribosomal protein S20 (RPS20) mRNA, complete cds /cytoband=8q	
			IMAGp950C0230	lat	cyt	M64716: Human ribosomal protein S25 mRNA, complete cds /chromosome=11 /cytoband=11q23.3	

ANHANG

I	III	IV	IMAGp950 Klon	biol. Prozess	Zell-lokalisierung	Accession # und Genbeschreibung	Genecards Beschreibung und Abkürzungen
			IMAGp950M1330	lat	cyt	M81757: H.sapiens S19 ribosomal protein mRNA, complete cds /chromosome=1 /cytoband=19q13.2	
			IMAGp950K247	lat	cyt	U79273: Human clone 23933 mRNA sequence /chromosome=17	
			IMAGp950G0740	lat	cyt	D23661: Human mRNA for ribosomal protein L37, complete cds /chromosome=5 /cytoband=5	
			IMAGp950B2417	lif	icm	D11428: Homo sapiens mRNA for PMP-22(PAS-II/SR13/Gas-3), complete cds /chromosome=17 /cytoband=17p12-p11.2	PMP22 (peripheral myelin protein 22)
			IMAGp950M1720	lip	icm	AB006746: Homo sapiens hMmTRA1b mRNA, complete cds /chromosome=3 /cytoband=3q23	PLSCR1 (phospholipid scramblase 1)
			IMAGp950M098	met	nid	AF029893: Homo sapiens i-beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase mRNA, complete cds /chromosome=11	
			IMAGp950L2314	met	sec	AF001601: Homo sapiens paraoxonase (PON2) mRNA, complete cds /chromosome=7 /cytoband=7q21.3	
			IMAGp950K1017	nid	endo	AF013759: Homo sapiens calumein (Calu) mRNA, complete cds /chromosome=7 /cytoband=7q32	CALU (calumenin)
			IMAGp950L1712	nid	nid	D38522: Human mRNA for KIAA0080 gene, partial cds /chromosome=1	KIAA1128
			IMAGp950J1417	nid	nid	AB022718: Homo sapiens mRNA for DEPP (decidual protein induced by progesterone), complete cds /chromosome=10	
			IMAGp950B0323	nid	nid		ESTs
			IMAGp950H1241	nid	nid		ESTs
			IMAGp950A0337	nid	nid	AB014518: Homo sapiens mRNA for KIAA0618 protein, complete cds /chromosome=7	
			IMAGp950I1712	nuc	cyt	U33818: Human inducible poly(A)-binding protein mRNA, complete cds /chromosome=1	PABPC4 (poly(A)-binding protein, cytoplasmic 4 (inducible form))
			IMAGp950C0839	nuc	cyt	U33818: Human inducible poly(A)-binding protein mRNA, complete cds /chromosome=1	PABPC4 (poly(A)-binding protein, cytoplasmic 4 (inducible form))
			IMAGp950E1339	nuc	nuc	M57710: Human IgE-binding protein (epsilon-BP) mRNA, complete cds /chromosome=14 /cytoband=14q21-q22	LGALS3 (lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3))
			IMAGp950D0753	nuc	nuc	M57710: Human IgE-binding protein (epsilon-BP) mRNA, complete cds /chromosome=14 /cytoband=14q21-q22	LGALS3 (lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3) (NOTE: redefinition of symbol))
			IMAGp950C1917	nuc	nuc	D28877: Human DNA for hnRNP protein A2/B1, complete cds /chromosome=7 /cytoband=7p15	HNRPA2B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1)
			IMAGp950F2241	nuc	nuc	U24223: Human alpha-CP1 mRNA, complete cds /chromosome=2 /cytoband=2p12-p13	PCBP1 (poly(rC)-binding protein 1)
			IMAGp950C1332	oxra	mito	X14322: Human mRNA for manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) /chromosome=6 /cytoband=6q25	SOD2 (superoxide dismutase 2, mitochondrial)
			IMAGp950P1852	oxra	mito	X14322: Human mRNA for manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) /chromosome=6 /cytoband=6q25	SOD2 (superoxide dismutase 2, mitochondrial)

ANHANG

I	III	IV	IMAGp950 Klon	biol. Prozess	Zell-lokalisierung	Accession # und Genbeschreibung	Genecards Beschreibung und Abkürzungen
			IMAGp950E2219	sha	cyt	Homo sapiens Arp2/3 protein complex subunit p21-Arc (ARC21) mRNA, complete cds	ARPC3 (actin related protein 2/3 complex, subunit 3 (21 kD))
			IMAGp950P1318	sha	cyt	U32944: Human cytoplasmic dynein light chain 1 (hdlc1) mRNA, complete cds /cytoband=14q24	DLC1 (deleted in liver cancer 1)
			IMAGp950I1012	sha	cyt	Z19554: H.sapiens vimentin gene /chromosome=10 /cytoband=10p13	
			IMAGp950M2083	sha	cyt	X74929: H.sapiens KRT8 mRNA for keratin 8 /chromosome=12 /cytoband=12q13	
			IMAGp950B2060	sig	cyt	S59049: BL34=B cell activation gene [human, mRNA, 1398 nt] /chromosome=1 /cytoband=1q31	RGS1 (regulator of G-protein signalling 1)
			IMAGp950J1970	sig	cyt	M55543: Human guanylate binding protein isoform II (GBP-2) mRNA, complete cds /chromosome=1	GBP2 (guanylate binding protein 2, interferon-inducible)
			IMAGp950M072	sig	cyt	M17733: Human thymosin beta-4 mRNA, complete cds /chromosome=14 /cytoband=Xq21.3-q22	
			IMAGp950K2388	sig	cyt	M17733: Human thymosin beta-4 mRNA, complete cds /chromosome=14 /cytoband=Xq21.3-q22	
			IMAGp950K2388	sig	cyt	M17733: Human thymosin beta-4 mRNA, complete cds /chromosome=14 /cytoband=Xq21.3-q22	
			IMAGp950O1620	sig	cyt	D10522: Homo sapiens mRNA for 80K-L protein, complete cds /chromosome=21 /cytoband=6q22.2	MACS (myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS, 80K-L))
			IMAGp950K0743	sig	cyt	U31384: Human G protein gamma-11 subunit mRNA, complete cds /chromosome=7	
			IMAGp950F1633	sig	cyt	M98474: Human CAP protein (CAP) mRNA, complete cds /chromosome=1 /cytoband=1	
			IMAGp950N2284	sig	cyt	AF005058: Homo sapiens chemokine receptor (CXCR-4) gene, complete cds /chromosome=2 /cytoband=2q21	
			IMAGp950K0642	sig	endo	AF070648: Homo sapiens clone 24651 mRNA sequence /chromosome=7	CAV1 (caveolin 1 caveolae protein, 22kD)
			IMAGp950O142	sig	icm	D28137: Human mRNA for BST-2, complete cds /chromosome=19 /cytoband=19p13.2	BST2 (bone marrow stromal cell antigen 2)
			IMAGp950B026	sig	icm	U00921: Homo sapiens Lst-1 gene, complete cds	
			IMAGp950L1385	sig	icm	AF019562: Homo sapiens DAP12 mRNA, complete cds /chromosome=19 /cytoband=19q13.1	TYROBP (TYRO protein tyrosine kinase binding protein)
			IMAGp950M1421	sig	nid	U41654: Human adenovirus protein E3-14.7k interacting protein 1 (FIP-1) mRNA, complete cds /chromosome=9 /cytoband=9	RAGA
			IMAGp950B163	sig	nid	D16227: Human mRNA for BDP-1 protein (a member of the recoverin family), complete cds /chromosome=2 /cytoband=2	HPCAL1 (hippocalcin-like 1)
			IMAGp950H0155	sig	nuc	X52560: Human gene for nuclear factor NF-IL6 /chromosome=20 /cytoband=20q13.1	CEBPB (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta)
			IMAGp950I0442	sig	nuc	L29073: Human DNA-binding protein A gene, promoter region and /chromosome=12 /cytoband=12p13.1	CSDA (cold shock domain protein A)

ANHANG

I	III	IV	IMAGp950 Klon	biol. Prozess	Zell-lokalisierung	Accession # und Genbeschreibung	Genecards Beschreibung und Abkürzungen
			IMAGp950O0216	sig	sec	U02020: Human pre-B cell enhancing factor (PBEF) mRNA, complete cds /chromosome=17	
			IMAGp950G0453	sig	nuc	M63838: Human interferon-gamma induced protein (IFI 16) gene, complete cds /chromosome=1 /cytoband=1q12-qter	
			IMAGp950F1029	tar	cyt	AF054187: Homo sapiens alpha NAC mRNA, complete cds /chromosome=17 /cytoband=12q23-q24.1	NACA (nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide)
			IMAGp950L1319	tar	endo	U65090: Human carboxypeptidase D mRNA, complete cds /chromosome=17 /cytoband=17p11.1-q11.2	
			IMAGp950H1784	tar	endo	AF054184: Homo sapiens Sec61 gamma mRNA, complete cds	
			IMAGp950M0885	tra	icm	U81800: Homo sapiens monocarboxylate transporter (MCT3) mRNA, complete cds /chromosome=17	SLC16A3 (solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3)
			IMAGp950P2052	tra	icm	AF022853: untitled /chromosome=16 /cytoband=16p13.1	

ANHANG

Tabelle 7.10 Ergebnisse der komplexen Hybridisierungen auf den nierenspezifischen Filter

In dieser Tabelle wird die Anzahl der hoch- und herunterregulierten Gene aller Stadien zusammengefasst.

Hybridisierungen desselben Tages	I	III	IV	M	All
stärkere Expression im Tumorgewebe	76	9	17	29	8
schwächere Expression im Tumorgewebe	16	35	20	202	24

Zur Auswertung wurden nur die Gene einbezogen, die in Stadium III oder im gepoolten Set aller Patientenstadien als differenziell exprimiert identifiziert wurden. Hybridisierungen, die am selben Tag durchgeführt wurden, werden miteinander verglichen. Es wurde ein Percentil-Schwelle von 30 % gewählt und Klone gewählt, die eine Expressionsdifferenz (Verhältnis der Signalintensitäten der Hybridisierungen von Proben des Tumor- zum Normalgewebe) von 3,5 aufwies. Die Intensität der Farben ist korreliert mit der Anzahl der Patienten, bei denen dieses Gen durch die komplexe Hybridisierung als differenziell exprimiert nachgewiesen wurde. Je intensiver die rote Farbe ist, desto mehr Patienten zeigten eine stärkere Expression des Gens im NZK-Tumormaterial, je intensiver die grüne Farbe desto mehr Patienten zeigten die schwächere Expression des Gens im NZK-Tumormaterial verglichen mit dem normalen Nierenmaterial.

I	III	IV	M	All	Genbeschreibungen
					insulin-like growth factor binding protein 3 IGFBP 3
					Transforming growth factor, beta-induced, 68kD
					Annexin II (lipocortin II)
					Human tazarotene-induced gene 2 (TIG2) mRNA, complete cds
					"CSD1; CSD2; CSD3; transforming growth factor, beta-induced, 68kD; BIGH3;
					H.sapiens mRNA for skeletal muscle-specific calpain
					"type I cytoskeletal 19 keratin; cytokeratin 19 (K19; CK19)"
					"thymosin beta-10 (TMSB10; THYB10); PTMB10"
					"XPCC; xeroderma pigmentosum, complementation group C"
					interleukin 10 receptor (IL-10R)
					vimentin (VIM)
					Complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide
					glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
					lunatic fringe Human lunatic fringe mRNA, partial cds.
					procollagen 1 alpha 2 subunit precursor (COL1A2)
					ESTs, Weakly similar to G2/MITOTIC-SPECIFIC CYCLIN B1 [H.sapiens]
					"clusterin precursor (CLU)"
					HLA CLASS II HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, DP(1) ALPHA CHAIN PRECURSOR
					vimentin (VIM)
					"probable protein disulfide isomerase ER-60 precursor (ERP60); 58-kDa microsomal protein; phospholipase C alpha"
					G1/S-specific cyclin D2 (CCND2) + KIAK0002
					"MLP; MARCKS-like protein F52 MLP1 MacMARCKS"
					G1/S-specific cyclin D2 (CCND2) + KIAK0002
					"vascular cell adhesion protein 1 precursor (V-CAM 1); CD106 antigen"
					SRP72 signal recognition particle 72kD
					H.sapiens Wnt-13 mRNA
					Sodium/potassium ATPase, gamma subunit
					ESTs, Weakly similar to F32A7.4 [C.elegans]
					nck, ash & phospholipase C gamma-binding protein (NAP4)
					PIG10
					16062 3'
					"microsomal UDP-glucuronosyltransferase 1-6 precursor (UDPGT);
					"junction plakoglobin (JUP); desmoplakin III (DP3)"
					elongation factor 1-alpha-1
					ubiquitin

ANHANG

I	III	IV	M	All	Genbeschreibungen
					zyxin related protein ZRP-1 thyroid hormone receptor interactor 6
					16062 ORF
					plasminogen precursor (PLG)
					programmed cell death 2 PDCD2
					"FMO1; flavin containing monooxygenase 1" (EC 1.14.13.8);
					ESTs
					"T-cell-specific rantes protein precursor; sis delta; small inducible cytokine A5 (SCYA5);
					Tf 123C12 unrelated control clone
					cytoplasmic beta-actin (ACTB)
					"SOD1; ALS, ALS1"
					Tf 123C12 unrelated control clone
					cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1)
					"HBP44; A2MRAP; low density lipoprotein-related protein-associated protein 1 (alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein 1)"
					"protocadherin 43 precursor (PCDH43); cadherin-like protein" "CDH21 ; cadherin 21 (fibroblast cadherin FIB3)"
					elongation factor 1-alpha-1
					"MT2; metallothionein 2A"
					hkid3_4i7
					"glutathione S-transferase A2; H-A; GST2"
					cytoplasmic beta-actin (ACTB)
					Human hMSH6 mRNA, complete cds;G/T mismatch binding protein (GTMBP; GTBP)"
					elongation factor 2
					L7a
					"T-cell-specific rantes protein precursor; sis delta; small inducible cytokine A5 (SCYA5);
					"T-cell surface glycoprotein T4/leu-3; CD4 antigen"
					"XPCC; xeroderma pigmentosum, complementation group C"
					Human hMSH6 mRNA, complete cds; G/T mismatch binding protein (GTMBP; GTBP)"
					"ferritin, light polypeptide
					PIG11