1. Zusammenfassung

Humane Intersectine sind Mitglieder einer konservierten Gruppe von Proteinen, die Teil der Clathrin-mediierten Endozytose sind. Man bezeichnet sie auch als Gerüst- oder „scaffolding“ Proteine, da sie in der Lage sind, mehrere Proteine, die an der Endozytose beteiligt sind, zu binden. Beide Intersectine weisen entsprechend einer gemeinsamen Abstammung hohe Homologien auf und werden in zwei Hauptformen exprimiert, welche bislang nur in Säugerzellen gefunden wurden. Da die Clathrin-vermittelte Endozytose am Austausch von Rezeptor-Liganden-Komplexen und Nährstoffen beteiligt ist und dieser Prozess darüber hinaus in Neuronen eine essentielle Rolle bei der Wiederaufbereitung synaptischer Vesikel spielt, kann man auf eine besondere Bedeutung der Intersectine vor allem in neuronalen Geweben schliessen.

Durch Expressionsstudien am Mausmodell konnte im adulten Gehirn eine differentielle Expression sowohl der langen als auch der kurzen Isoform von Intersectin 1 und 2 festgestellt werden. Es zeigen sich spezifische Unterschiede, die auf eine spezielle Bedeutung von Intersectin 1 beziehungsweise 2 in zum Teil verschiedenen Hirnregionen hinweisen. Desweiteren lassen Entwicklungsstudien in noch unreifem Cerebellum eine präferentielle Bedeutung von Intersectin 2 bei der Zelldifferenzierung vermuten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mittels PCR-Analyse verschiedene Regionen des Intersectin 2-Gens untersucht, um zusätzliche so genannte Minor-Spleissvarianten zu erfassen. Dazu wurden unterschiedliche normale und tumoröse Gewebeproben entsprechend aufgearbeitet und untersucht.

Dabei konnten verschiedene, zum Teil bereits bekannte, aber auch noch bislang unbekannte Spleissvarianten des Intersectin 2-Gens detektiert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass in allen untersuchten Geweben ein das Exon 16 aussparendes cDNA-Transkript vorkommt, während die das Exon 16 umfassende „komplette Variante“ einzig in der cDNA aus normalem Hirngewebe, neben dem verkürzten Transkript, verstärkt exprimiert wird. In Analysen einer kleinen Anzahl von Oligodendrogliomgeweben konnte lediglich die Variante ohne Exon 16, nicht jedoch die komplette Variante detektiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten dafür sprechen, dass Intersectin2 eine zelltypspezifische Expression in bestimmten Hirnarealen zeigt. Auch könnte sich das Expressionsmuster der Intersectin 2-Varianten in gesundem und tumorösem Gewebe unterscheiden und somit eine Rolle bei der Entstehung oder Differenzierung von Oligodendrogliomen spielen.

1. Summary

Human intersectins are members of a conserved group of proteins which take part in clathrin-mediated endocytosis. They are also called scaffolding proteins, while they are in a position to bind several proteins which take part in the endocytosis. Both intersectins show according to a common descent high homologies and are produced in two major forms, which so far are found only in mammalian cells. Since the clathrin-mediated endocytosis pathway take part in internalisation of receptor-ligand complexes and nutriens and above all this process plays an essential part in the recycling of synaptic vesicles in neurons, one can deduce a special importance of intersectins particularly in neuronal tissues.

Through expression analysis in adult mouse brain a differential can be established in the long as well as in the short isoform of intersectin 1 and 2. It shows a specific difference that points to a special importance of intersectin 1 and 2 respectively in different regions of the brain. Furthermore, studies in immature cerebellum allow one to suppose a preferential importance of intersectin 2 in the differentiation of a cell.

In this work different regions of the intersectin 2 gene were examined by PCR analysis in order to cover additionally the so called minor splice variants. For that purpose various normal and tumorous tissue specimens were utilized and screened.

Thereby diverse splice variants of intersectin 2, partly already unknown, could be detected. In addition to that, in all examined tissues an exon 16 empty cDNA transcript is found, while those, the exon 16 enclosed “complete” variant only in the cDNA of normal brain tissue, next to the shortened transcript, was intensively squeezed out. Analysing a small quantity of oligodendroglioma tissues, only the variant without exon 16, but not the complete form, could be detected.

The results of this work can support the fact, that intersectin 2 shows a cell specific expression in certain brain areas. Also the expression model of the intersectin 2 variants can differentiate itself in healthy and tumorous tissues and so play a part in the formation and differentiation of oligendrogliomas.

2. Einleitung

2.1 Genetische Information

2.1.1 Transskription

Die genetische Information eukaryoter Zellen ist in Form von DNA auf den Chromosomen in codierenden und nicht codierenden Abschnitten auf den Genen niedergelegt. Diese Information wird mit Hilfe eines umfangreichen, synthetisierenden Systems über zwei Wege in Genprodukte (rRNA, tRNA, snRNA, mRNA) und Proteine umgesetzt. Diese Wege bezeichnet man als Transskription und Translation.
Bei der Transskription in eukaryotischen Zellen wird die genetische Information der DNA über komplexe Mechanismen (siehe 2.2) in verschiedene RNA-Moleküle überführt. Die Regulation der Transkription erfolgt mit Hilfe sogenannter Transkriptionsfaktoren. Diese sind Proteine, die direkt mit spezifischen DNA-Sequenzen interagieren und dabei einen fördernden oder hemmenden Einfluss auf die Transkriptionsvorgänge ausüben.
Bei der Transskription können bestimmte Abschnitte festgelegt werden, welche in den darauf folgenden Schritten in Proteine übersetzt werden, andere Bereiche wiederum können herausgeschnitten werden. Seit langem ist bekannt, dass die grosse Mehrheit der für ein Protein codierenden Sequenzen (Gene) in Introns (nicht codierender Teil eines Gens) und in Exons (codierender Teil eines Gens) aufgeteilt ist. Die bei der Transskription entstehende prä-mRNA enthält auch die transskribierten, nicht codierenden Intronabschnitte. Ihre Entfernung erfolgt bei dem Vorgang des Spleissens.

2.1.2 Spleissen

Als Spleissen wird das Herausschneiden nicht codierender Bereiche aus der mRNA-Vorstufe, der Prä-mRNA, und das Zusammenschweissen der verbleibenden Abschnitte zur endgültigen mRNA bezeichnet. Katalysiert und gesteuert wird der

Vorgang durch einen multifaktoriellen Komplex, genannt Spleissosom. Das Herausschneiden erfolgt spezifisch an bestimmten Sequenzstellen, die von einem speziellen Komplex, dem Spleissosom, erkannt werden. Es gibt mehrere Arten dieser sogenannten Erkennungssequenzen. Je nachdem, von welchen Spaltstellen bei einem Spleissvorgang Gebrauch gemacht wird, können beim Zusammenschweissen bestimmte abgelesene, d.h. codierende Abschnitte oder Exons, ausgelassen werden. Es kann aber auch ein im Normalfall nicht codierender Teil, ein Intron, durchgelesen und ebenfalls in eine Proteinsequenz übersetzt werden. Bei vielen Organismen, auch beim Menschen, werden bestimmte Gene alternativ gespleisst, d.h. es wird jeweils in Abhängigkeit von Organ oder ontogenetischer Entwicklungsstufe, eine unterschiedliche Anzahl von Exons zur Konstruktion des endgültigen mRNA-Moleküls aus demselben RNA-Vorläufermolekül herangezogen. Dies führt zur Synthese unterschiedlich langer mRNA-Moleküle. Aus den mRNA-Molekülen entstehen schliesslich in einem weiteren komplexen Prozess, der Translation, an den Ribosomen die Proteine. Über diese Vorgänge können schliesslich aus einem Gen verschiedene Proteine entstehen.

2.2 Posttranskriptionale Modifikationen

Eine Reihe enzymatischer Mechanismen verändern das primäre RNA-Transkript, bevor es als reife mRNA den Zellkern verlassen und die genetische Information zu den Ribosomen ins Cytoplasma tragen kann. Dazu zählen

1. Chemische Veränderungen an den Enden des mRNA-Moleküls
2. RNA-Editing
3. RNA-Spleissen

2.2.1 Chemische Veränderungen des mRNA-Moleküls

2.2.1.1 Modifikation des 5´-Endes: Cap-Struktur

An das 5´-Triphosphat-Ende des entstehenden mRNA-Vorläufers wird ein 7-Methylguanosintriphosphat als Kopfgruppe (Cap) angehängt. Die Reaktion wird durch das Enzym Guanyltransferase katalysiert. Häufig werden auch weitere

Methylgruppen an die beiden anschliessenden Nukleotide angefügt. Eine wichtige Funktion der Cap-Struktur ist der Schutz der entstehenden RNA vor dem Abbau durch Phosphatasen und Nukleasen. Sie ist ein Signal für den Transport der mRNA durch die Kernporen und wird auch für die Anlagerung an das entstehende Ribosom benötigt, wo sie dem Auffinden des Startpunktes der Translation dient. Schliesslich kann die Cap-Struktur auch eine Rolle bei den Spleissprozessen spielen (HENNIG, 1998).

2.2.1.2 Modifikation des 3´-Endes: Polyadenylierung

Das 3´-Ende der mRNA wird durch das Anfügen einer langen Reihe von bis zu 250 Adenylresten abgewandelt, das Poly(A)-Ende bzw. der Poly(A)-Schwanz. Die Polyadenylierung erfolgt an einem spezifischen Signal, einer Konsensussequenz AAUAAA, welche nicht am 3´-Ende des Primärtranskripts, sondern 10-30 Nukleotide weiter in 5´-Richtung liegt. Hier werden einige der letzten Nukleotide durch einen Spaltungsvorgang entfernt und die Adenylatreste durch das Enzym Polyadenylatpolymerase angeheftet. Hinweise sprechen dafür, dass der Poly(A)-Schwanz die mRNA und die Cap-Struktur vor enzymatischem Abbau bewahrt und eine wichtige Funktion bei der Bestimmung der Halbwertszeit der RNA spielt (HENNIG, 1998).

2.2.2 RNA-Editing

Beim RNA-Editing („Redigieren“ von RNA) wird die Nukleotidsequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion verändert. Ein anschauliches Beispiel hierfür ist das Einfügen mehrerer U-Nukleotide in verschiedene Positionen des mRNA-Moleküls oder die Umwandlung eines C in ein U in der mRNA für das humane Apolipoprotein B. Im Genom gibt es für dieses Protein nur ein Gen, dessen Sequenz in allen Geweben identisch ist. In der Leber wird dieses Protein in seiner vollen Grösse translatiert, im Darm entsteht eine kürzere Proteinform. Findet ein Editing dieses Proteins im Darmgewebe statt, hat das neue, veränderte Protein eine andere Funktion als das Apolipoprotein B, welches in der Leber synthetisiert wird.

2.2.3 RNA-Spleissen

Bevor bei der Translation die genetische Information zu einem Protein verarbeitet werden kann, müssen die im Gen vorhandenen, nicht codierenden Bereiche aus dem Primärtranskript entfernt und die codierenden Sequenzen zu einem intakten Ganzen zusammengesetzt werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als RNA-Spleissen. Während das Genom niedriger Eukaryoten nur einen geringen Anteil an Introns besitzt, bilden diese bei höheren Lebewesen überwiegend die Mehrheit der genetischen Information. Im Durchschnitt beträgt die Zahl von Introns bei Säugergenen 7 bis 8. Ein Gen besteht im Mittel aus 8 Exons, in Extremfällen können es aber auch über 20 sein. Die meisten codierenden Bereiche sind relativ kurz (100-200 bp), die Introns relativ lang (um 1000 bp) (CACERAS, April 2002).
Es existieren verschiedene Spleisssysteme, die sich auf unterschiedliche Klassen von Introns zurückführen lassen. Von Bedeutung für diese Arbeit ist das Spleisssystem der Introns der Klasse 3, welches nach der GT-AG-Regel abläuft. Zu dieser Gruppe gehören alle Introns in den Genen des Zellkerns höherer Eukaryoten, die zu mRNA transkribiert werden. Die anderen Klassen beinhalten Introns, die sich durch enzymatische Fähigkeiten selbstständig aus der RNA herausschneiden können (Klasse 1 und 2). Das spezielle Spleisssystem von tRNA-Vorläufern, bei welchem ähnliche Enzymaktivitäten zur Wirkung kommen, wird eigens in Klasse 4 zusammengefasst.
Grundsätzlich kommen zwei Mechanismen für das Spleissen zum Einsatz: Introns der Klassen 1, 2 und 3 werden durch Umesterungsreaktionen gespleisst. Introns der Vorläufer der tRNA-Moleküle werden durch Strangspaltung und Ligation gespleisst (SEYFFERT, 1998).

2.2.3.1 GT-AG-Introns

GT-AG-Introns besitzen am 5´- und am 3´-Ende eine Dinukleotidsequenz, die oftmals Teil einer längeren Konsensussequenz ist. Da am Anfang des Introns immer die GT-Sequenz und am Ende immer die AG-Sequenz zu finden ist, bezeichnet man sie auch als linke 5´- bzw. rechte 3´- Spleissstelle, oder auch als Spleiss-Donor, bzw. Spleiss-Akzeptor. Die Konsensussequenzen dienen der Erkennung der

Spleissstellen. Dies geht aus Versuchen mit Punktmutationen hervor, welche eine Spleissreaktion in vitro und in vivo hemmen (KNIPPERS 1997, LOTTSPEICH 1998).
Die Spleissreaktion der Introns der Klasse 3 lässt sich in folgende Schritte gliedern:

1. Spaltung an der 5´-Spleissstelle:
   Eine Umesterungsreaktion führt dazu, dass das linke Exon als freies, lineares RNA-Fragment vorliegt.
2. Bildung der Lariatform (Lassoform):
   Das freie 5´-Ende des Introns wird über eine 5´-2´-Bindung mit einer Base im Intron verknüpft. Diese Base ist ein Adenin innerhalb der Intronsequenz, die man *branch site* („Verzweigungsstelle“) nennt.
3. Spaltung der 3´-Spleissstelle und Verknüpfung der Exons:
   Das Lariat wird durch einen Schnitt an der rechten Spleissstelle freigesetzt und rasch abgebaut. Linkes und rechtes Exon werden kovalent miteinander verbunden.

Am korrekten Ablauf des Spleissvorgangs ist ein grosser Komplex aus Proteinen und spezifischen RNAs beteiligt, den man als Spleissosom bezeichnet. Das Spleissosom bildet sich schrittweise über mehrere Präspleisskomplexe, und die Reaktion kann erst ablaufen, wenn alle Komponenten zusammengelagert sind. Der fertige Komplex umfasst 50 bis 60 s und ist damit von ähnlicher Grösse wie eine ribosomale Untereinheit. Wie das Ribosom wird auch das Spleissosom gleichermassen durch Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen untereinander zusammengehalten.
Die spezifischen RNAs sind relativ klein und liegen als Ribonukleoproteinpartikel vor, deren Grösse von 100 bis 300 Basen reicht. Man bezeichnet die RNAs als snRNAs (small nuclear RNAs), eingebunden in Riboproteinpartikel nennt man sie snRNPs.
In den Zellkernen von Wirbeltieren findet man diverse snRNAs, wobei U1, U2, U5 und U4/U6 die für das Spleissen relevanten RNAs darstellen. Die Proteine der snRNPs sind entweder unmittelbar am Spleissvorgang beteiligt oder sie übernehmen strukturbildende Aufgaben. Zusätzlich werden einige weitere Proteine ins Spleissosom aufgenommen. Man bezeichnet sie als allgemeine Spleissfaktoren.
Die snRNAs binden über Basenpaarungen an verschiedene Stellen des Introns der prä-mRNA. Die U1-snRNA bindet an die 5´-Spleissstelle, wobei sich etwa 4 bis 6 bp ausbilden können. Lagern sich weitere Spleissfaktoren und Proteine an, liegt der sogenannte E-Komplex (early presplicing complex, früher Präspleisskomplex) vor. Er

hat die Aufgabe, die prä-mRNA für die Formierung des späteren Spleisskomplexes zu markieren. Mit der Anlagerung des U2-snRNP an die *branch site* geht der E-Komplex in den A-Komplex über. Die Anlagerung erfolgt unter Hydrolyse von ATP und kennzeichnet die prä-mRNA für den Spleissvorgang. Das eigentliche Spleissosom entsteht, wenn sich U5- und U4/U6-snRNPs an den Komplex binden. Dieses auch B-Komplex genannte Gebilde enthält alle für die Spleissreaktion notwendigen Komponenten. Löst sich U1 aus dem Verband, entsteht der B2-Komplex. Der C-Komplex bildet schliesslich das Lariat aus, nachdem U4 aus dem Komplex entlassen wird und so die 5´-Stelle gespalten werden kann. In einem weiteren Schritt werden nun die 3´-Stelle mit Hilfe von U2, U5 und U6 gespalten und die Exons miteinander verknüpft. Nach Beendigung des Vorgangs dissoziiert der Komplex in seine Bestandteile und die gespleisste RNA wird freigesetzt.
Die Spleissvorgänge erfolgen in der Regel intramolekular, was man als *cis* bezeichnet. Somit werden zumeist Sequenzen zusammengespleisst, die auf demselben RNA-Molekül liegen. Intermolekulares Spleissen oder trans-Spleissen hingegen bezeichnet das Zusammenschweissen von Exons aus verschiedenen RNA-Molekülen. *Trans*-Spleissen findet im Gegensatz zum *cis*-Spleissen seltener statt. Beim *trans*-Spleissen bildet sich das Spleissosom wahrscheinlich unter Einbeziehung der entsprechenden Sequenzstelle beider Moleküle aus.

2.3 Alternatives Spleissen

Aus der Gensequenz der doppelsträngigen DNA entsteht zunächst die komplette mRNA. Aus ihr werden die Introns entfernt, so dass die gespleisste mRNA nur noch aus Exons besteht. Sie codiert im Rahmen der Translation für die entsprechende Aminosäurekette umgewandelt. Beim Zusammenfügen der Exons können auch Umorientierungen und Umlagerungen vorkommen, wodurch sich die Zahl der möglichen codierten Proteine erhöht. Man bezeichnet dies als alternatives Spleissen.
Durch alternatives Spleissen können aus dem Transkript eines einzelnen Gens verschiedene Proteinprodukte entstehen, beispielsweise wenn bestimmte Proteinfaktoren die Auswahl einer bestimmten, neuen Spleissstelle begünstigen oder die Verwendung der üblichen Stelle blockieren. Je nach Größe des Gens, nach

Anzahl von Introns und Exons stehen enorm viele Möglichkeiten offen, ein Gen alternativ zu spleissen. Darüber hinaus existieren gewebsspezifische Spleissmuster und entwicklungsabhängige Varianten. Äusserst seltene Spleissvarianten werden in manchen Zellen nur zu bestimmten Zeiten gebildet.
Nach heutigem Wissenstand kommt Alternatives Spleissen am häufigsten bei Genen für Membranrezeptoren, Immunglobulinen und Genen für Proteine des Nervensystems vor. Dies spricht für die Vorstellung, dass alternatives Spleissen eine Hauptrolle in hochkomplexen Prozessen spielt (LEE, 2001, ORBAN, 2001).

2.4 Medizinische Bedeutung von Spleissvarianten

Spleissvarianten spielen in der Medizin einiger Krankheiten und Funktionsstörungen eine wichtige Rolle. Man schätzt, dass ungefähr 15% der Mutationen, die Auslöser einer Erkrankung sind, durch Spleissmutationen verursacht werden (CACERAS, 2002). Dadurch kommt der Erforschung von Spleissvarianten in Diagnostik und Therapie bestimmter Krankheiten eine enorme Bedeutung zu. Ein Beispiel für eine Krankheit, die durch abnorme Spleissvarianten verursacht wird, ist die Myotone Dystrophie. Dabei werden im Skelettmuskel gleich von zwei Genen abnorme Proteine gebildet, die die typischen Symptome der Krankheit bedingen. Bei einem Gen wird durch die Auswahl einer falschen Spleissstelle ein zusätzliches Exon mit abgelesen, welches aus einem normalerweise voll funktionsfähigen Chloridkanal einen Kanal mit verminderter Aktivität entstehen lässt (ALFRED, 2001). Durch den abgeschwächten Ionenfluss kann der Muskel nach der Kontraktion nur verzögert erschlaffen, was zu dem Symptom der Myotonie führt (RIEDE, 1999).
Auch In der Genese von Tumorentstehung und Krebsgeschehen gibt es interessante Zusammenhänge zwischen Spleissvarianten und Tumoren, denen klinische Bedeutung zukommt. So wird beim Mammakarzinom das Gen für Cyclin E (Regulator der Zellteilung) überexprimiert, mit der Folge, dass Cyclin E in vielen niedermolekularen Varianten vorliegt, die eine verstärkt aktivierende Wirkung auf die Tumorentwicklung haben (PORTER, 2000).
Ein weiteres Beispiel ist das Matrix-Molekül Tenascin, welches in Gliomen in verschiedenen Isoformen vermehrt gebildet wird und die Wanderung der Tumorzellen beeinflusst (HEROLD-MENDE, 2002).

Aufgrund der vielfältigen medizinischen Bedeutung von Spleissvarianten wurden Datenbanken eingerichtet, die so viele alternative Spleissvarianten wie möglich beinhalten und ständig neu ergänzt werden. Somit ist es möglich, nicht nur schnell verschiedene Formen eines Genes ausfindig zu machen, sondern auch deren Unterschiede zu nutzen. So wäre es z.B. denkbar, Medikamente zu entwickeln, die nur gegen eine Spleissvariante wirksam sind und nicht betroffenes Gewebe schonen. Verschiedene Spleissvarianten eines Gens könnten ebenfalls für individuelle Nebenwirkungen eines Medikaments verantwortlich sein und damit einen Angriffspunkt bieten bei der Entwicklung verträglicherer Arzneimittel.

2.5 Humane Intersectine

Die menschlichen Intersectine (ITSN) sind Mitglieder einer stark konservierten Familie von Proteinen, welche als ITSN1 und ITSN2 mit jeweils einer kurzen und einer langen Isoform exprimiert werden. Aufgrund der hohen Homologie zwischen beiden Proteinen wurden Funktionen und Proteinbindungen, wie sie bereits für ITSN1 gezeigt werden konnten, auch für ITSN2 vermutet. Für beide Proteine konnte gezeigt werden, dass sie an endozytotischen Vorgängen in der Zelle teilhaben (PUCHARCOS 2000). Vor allem die kurze Isoform von ITSN1 (ITSN1s) wurde als wichtiger Bestandteil der Clathrin-vermittelten Endozytose identifiziert, die lange Form (ITSN1l) wird hauptsächlich in neuronalen Geweben exprimiert (MA, 2003). Für ITSN2, über dessen physiologische Wirkung bis heute immer noch recht wenig bekannt ist, konnte bislang eine Verbindung zur T-Tell-Rezeptor-Endozytose nachgewiesen werden (MCGAVIN, 2001).

Aus den bisher gewonnenen Daten erscheinen jedoch nicht nur ähnliche, sondern auch gänzlich unterschiedliche Funktionen möglich. Durch Expressionsstudien am Mausmodell konnte im adulten Gehirn eine differentielle Expression sowohl der sog. langen als auch der kurzen Isoform von ITSN1 und ITSN2 festgestellt werden. Trotz grosser Ähnlichkeiten des Expressionsmusters zeigen sich hier spezifische Unterschiede, die auf eine spezielle funktionelle Bedeutung von ITSN1 bzw. 2 in z. T. verschiedenen Hirnregionen hinweisen (MCGAVIN, 2001, PUCHARCOS, 2001).

2.5.1 Aufbau , Bindungspartner und Funktionen

2.5.1.1 Aufbau

Die beiden ITSN werden in zwei Isoformen exprimiert, die durch alternatives Spleissen entstehen und entsprechend ihrer Länge in eine kurze und eine lange Isoform unterteilt werden. Die vollständige cDNA des menschlichen ITSN2 Gens wurde 2000 von Pucharcos et al. erstmals veröffentlicht. Das Gen ist auf Chromosom 2 lokalisiert, besteht aus 41 Exons und umfasst einen Bereich von 157 kB und 1696 Aminosäuren. Es wird in drei Haupttranskripten von je 10, 8 und 6,5kb exprimiert. Die cDNA von ITSN2l entspricht einem Transkript von 8 kb (PUCHARCOS, 2000). Im Gegensatz zu ITSN1 kommen die Haupttranskripte von ITSN2 ubiquitär vor.

Die kurze Isoform entspricht dem 6,5 bzw. 10 kB grossen Transkript. Das 10 kB grosse Transkript unterscheidet sich lediglich am 3`-Ende um 5- 10 Aminosäuren. Der grösste Unterschied liegt in der 3`-nichttranslatierten Region, welche im 10kB-Transkript sehr gross ist und wahrscheinlich regulatorische Funktionen übernimmt. Die kurze Isoform besteht aus zwei N-terminalen EH-Domänen, deren Homologie zu ITSN1 in diesem Bereich zwischen 70-80% beträgt und in der Lage ist, Epsin und SCAMP1 zu binden, ein Protein der Clathrin-vermittelten Endozytose. Darauf folgt eine coiled-coil Region mit geringer Homologie zu ITSN1. Der zentrale Bereich des Proteins besteht aus fünf SH3-Domänen, deren Homologie zu ITSN1 mit über 80% ebenfalls sehr hoch ist. Das Leseraster der kurzen Isoform endet hier nach.

Die lange Isoform besitzt ein verlängertes Carboxy-Ende, welches aus 3 Domänen besteht. Die DH-Domäne (Dbl-Homologie) wirkt üblicherweise als katalytische Region für Rho-like GTPasen. Wie bei vielen anderen Proteinen mit DH-Domänen folgt auch bei ITSN2 eine PH-Domäne (Pleckstrin-Homologie). Die letzte Domäne am Carboxyterminus ist die C2-Domäne, ein Calcium-bindendes Motiv, das in Proteinen häufig vorkommt und wahrscheinlich an der Interaktion mit Membranen beteiligt ist (PUCHARCOS, 2001, SKRIPKINA 2002). Abbildung 1a zeigt die Lage und Abbildung 1b zeigt schematisch den Aufbau von ITSN2.

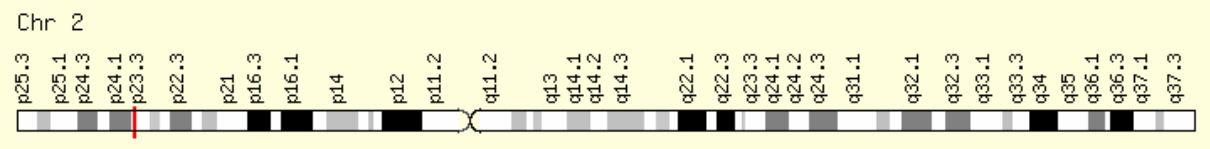


Abb. 1a (aus GeneCards, XenneX Inc.)

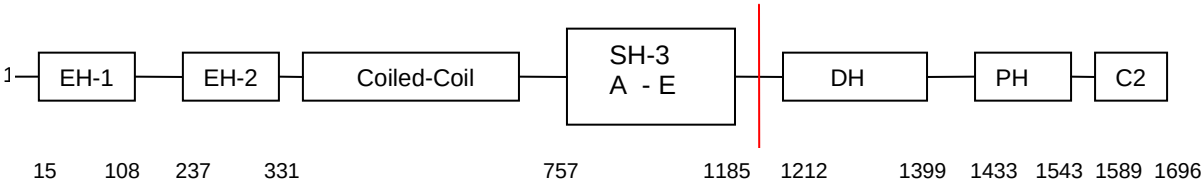


Abb. 1b

Abb. 1a und1b: In Abb. 1a ist die genaue Lage von ITSN 2 auf Chromosom 2 gezeigt. Abb. 1 b zeigt den Aufbau der kurzen und der langen Isoform von ITSN2. Die Proteindomänen sind als Kästchen dargestellt, die Nummer gibt die Position in der Aminosäuresequenz an. Die kurze Form endet an der roten Markierung nach 1249 bp.

2.5.1.2 Bindungspartner

Für ITSN1 konnte gezeigt werden, dass es ein interagierender Bindungspartner der Clathrin-vermittelten Endozytose ist (TONG, 2000). Bislang wurde ITSN1 in Mensch, Maus (ESE1), Ratte (EHSH1), Xenopus laevis und Drosophila melanogaster (DAP106) identifiziert. Man bezeichnet die ITSN auch als Adapterproteine oder „scaffolding“ Proteine, was bedeutet, dass ITSN in Art eines „Gerüstes“ in der Lage ist, mehrere Proteine zu binden, die an der Endozytose beteiligt sind. Als Bindungspartner wurden bisher Epsin, SCAMP1, Eps15R und die an der Exozytose beteiligten Proteine SNAP23, SNAP25, Dynamin, Synaptojanin sowie mSos1 (Ras exchange factor) identifiziert (ZAMANIAN, 2003). Damit könnte ITSN auch an der Signalübertragung und nicht nur an der Endozytose beteiligt sein.

2.5.1.3 Funktionen

Die Clathrin-vermittelte Endozytose spielt sich an der Plasmamembran eukaryoter Zellen ab und ist ein spezieller Mechanismus, der ubiquitär in Zellen am Austausch

von Nährstoffen und Rezeptor-Liganden-Komplexen beteiligt ist. In Neuronen spielt dieser Prozess darüber hinaus eine essentielle Rolle bei der Wiederverwertung synaptischer Vesikel. Dies lässt auf eine besondere Bedeutung v. a. in neuronalen Geweben schliessen (KOH, 2004).

Bisher wurden mehr als zwanzig Proteine identifiziert, die an diesem Prozess teilnehmen. Diese Moleküle interagieren miteinander durch eine begrenzte Anzahl an Proteindomänen. Die Endozytose beginnt mit der Rekrutierung des Adapterproteins AP2, welches Clathrin an die Plasmamembran befördert. Mit Hilfe weiterer Proteine wie Eps15, Epsin und AP180 entstehen so wachsende Vesikel, sog. Clathrin-coated pits, die die zu transportierenden Stoffe nach Abtrennung von der Plasmamembran ins Zytoplasma befördern. Letztendlich nimmt man an, dass die Spaltung der Vesikel von Dynamin vermittelt wird (PUCHARCOS, 2001, MARIE, 2004) Dynamin reagiert mit den SH3-Domänen verschiedener Proteine, einschliesslich Amphiphysin1 und 2, Endophilin, Syndapin/PACSIN und ITSN (MCPHERSON, 2002, EVERGREN, 2007).

Allein für ITSN2 konnte gezeigt werden, dass es mit WASp und CDc42 interagiert, wo es die Clathrin-Endozytose mit der WASp-vermittelten Aktinpolymerisation verbindet und somit letztendlich auch die T-Zellrezeptor-Endozytose. ITSN2 hemmt die Aktivität von GEF, einem wichtigen Austauschfaktor des Endozytoseablaufs, aktiviert Cdc42 und interagiert mit Wasp in T-Zellen (MCGAVIN, 2001).

Ein neuerer, kürzlich nachgewiesener Bindungspartner ist das Protein FCHo, welches mit ITSN und Eps 15 im Rahmen der Clathrin-Endozytose reagiert (HENNE, 2010).

2.6 Hirntumoren

2.6.1. Epidemiologie, Inzidenz und Ätiologie

Der Begriff Hirntumoren ist eine klinische Bezeichnung für alle intrakraniellen Tumoren. Man unterscheidet hierbei primäre Hirntumore, die von Neuroepithel, Ektoderm oder Mesoderm ausgehen, von sekundären Hirntumoren, die als Metastasen eines primär extrazerebral gelegenen Tumors das Gehirn befallen und ca. fünfmal häufiger auftreten als primäre zerebrale Neoplasien. Insgesamt machen sie ca. 2-3% aller Krebserkrankungen aus, die Inzidenz beträgt 10 pro 100.000

Einwohner. Intrakranielle Metastasen eines extrakraniellen Tumors machen ca. 25% der zerebralen Raumforderungen aus. Diese gehen grösstenteils von Bronchialkarzinomen (30-60%), Mammakarzinomen (30-40%), malignen Hautmelanomen (15%) und Nierenkarzinomen (20%) aus. Das Kolonkarzinom metastasiert in ca. 5% der Fälle nach intrazerebral. Seltener finden sich tumorähnliche Raumforderungen durch Teratome, Lipome oder neuronale Hamartome. Primäre oder sekundäre ZNS-Lymphome findet man v. a. bei Patienten mit Immundefizienz (z.B. AIDS).

In der Regel sind Männer etwas häufiger von Hirntumoren betroffen, es gibt jedoch auch Tumore, die häufiger beim weiblichen Geschlecht auftreten, wie z.B. Meningeome. Das Haupterkrankungsalter liegt bei beiden Geschlechtern zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr, ein kleinerer, zweiter Häufigkeitsgipfel, findet sich im Kindesalter. Hier dominieren v. a. die benignen Gliome und malignen Medulloblastome. Im Erwachsenenalter finden sich hingegen häufig benigne Meningeome und maligne Gliome.

Tabelle 1 zeigt die prozentuale Verteilung der häufigsten Tumorentitäten primärer Hirntumoren.

Tumorentität	**Häufigkeit (%)**
Gliom	40
Glioblastom	20
Astrozytom	10
Oligodendrogliom	6
Ependymom	4
Meningeom	15
Neurinom	7
Medulloblastom	4

Tab. 1: Häufigkeit hirneigener Tumoren (Deutsche Krebsgesellschaft)

Über die Ursache und Entstehung menschlicher Hirntumoren ist bis heute noch wenig bekannt. Lebens- und Ernährungsgewohnheiten, wie sie für das Auftreten anderer Krebsarten typisch sind, spielen im Fall der Hirntumore nur eine untergeordnete Rolle. Auch ein Zusammenhang mit Schädelhirnverletzungen ist nicht gesichert.

Als Auslöser diskutiert werden v. a. genetische und hormonale Faktoren, onkogene Viren und exogene Karzinogene. Im Tierexperiment lassen sich Hirntumoren durch RNS-Viren oder durch topische Applikation von systemisch wirkenden Alkylantien hervorrufen (RIEDE, 1999). Dabei handelt es sich bei den chemisch induzierten Tumoren hauptsächlich um Gliome und Neurinome, während Viren vorwiegend Sarkome und nur selten Gliome hervorbringen. Für einige Hirntumoren beim Menschen sind genetische Läsionen gesichert. Hierbei spielt im Wesentlichen der Verlust von wichtigen Differenzierungsgenen bzw. Tumorsuppressorgenen eine Rolle, z.B. der von RB-1 (Retinoblastom), NF-1 und 2 (Neurofibromatose), das von-Hippel-Lindau-Tumorsupressorgen bei dem gleichnamigen Syndrom oder p-53 (Astrozytom und Glioblastom), (RIEDE, 1999, HSU, 2006).

2.6.2. Symptomatik

Die klinische Symptomatik ist abhängig von Lokalisation, Dignität und Grösse des Tumors. Am Anfang stehen oftmals Wesensveränderung und Vergesslichkeit, gefolgt von Kopfschmerz und im fortgeschrittenen Stadium Bewusstseinsstörungen. Bei erstmalig auftretenden fokalen oder generalisierten Krampfanfällen sowie neurologischen Herdsymptomen müssen intrazerebrale Neoplasien ebenfalls ausgeschlossen werden. Aufgrund der begrenzten Raumreserve führt jede intrazerebrale Neoplasie ab einer kritischen Grösse zur lebensbedrohlichen Hirndrucksteigerung. Die in der allgemeinen Tumorpathologie gültigen Malignitätskriterien lassen sich bei Hirntumoren nur beschränkt anwenden. Hirntumoren metastasieren extrem selten. Die klinische Symptomatik ist nicht nur durch die Histologie, sondern massgeblich durch die Topographie bestimmt.
Die histologische Einteilung richtet sich nach der Klassifikation der Tumoren des Zentralnervensystems der WHO und umfasst 4 Schweregrade (Tab. 2).

Biologische Wertigkeit von ZNS-Tumoren nach WHO (nach Kleihues und Cavenee, 2000)

Grad I	hochdifferenzierter, benigner Tumor, langsames Wachstum; geringe bis mittlere Zelldichte, kaum Polymorphie, kaum Mitosen
Grad II	semimaligner Tumor, geringe Wachstumsendenz; erhöhte Zelldichte, geringe Polymorphie, wenige Mitosen
Grad III	anaplastischer Tumor; erhöhte Mitoserate und Zelldichte, Zellpolymorphie, pathologische Gefässe
Grad IV	gering differenzierter, hochmaligner Tumor, schnelles Wachstum; zahlreiche Mitosen und Nekrosen

Tab. 2: Biologische Wertigkeit von ZNS-Tumoren

Dieses Schema der WHO ist wichtig für Therapie und Prognose.
Die Einteilung der Tumoren des Nervensystems wird ebenfalls von der WHO vorgenommen und besteht aus folgenden Gruppen:

- neuroepitheliale Tumoren
- Tumoren der kranialen und spinalen Nerven
- Tumoren der Meningen
- ZNS-Lymphome
- ZNS-Keimzelltumoren
- Metastasen

Das Oligodendrogliom gehört der Gruppe der neuroepithelialen Neoplasien an, welche auch Glioblastome, Astrozytome, Ependymome, Plexuspapillome und gemischte neuronale Tumore wie z.B. die Gangliozytome umfasst.

2.6.3 Diagnostik und Therapie

Zur Diagnosesicherung werden verschiedene Verfahren angewandt. Im Bereich der Bildgebung sind das kraniale Computertomogramm sowie die Magnetresonanztomographie unerlässlich, letztere bietet zudem die Möglichkeit der Beurteilung der Umgebungsreaktion bei besserer anatomischer Darstellung. Ist die Diagnose mit konventionellen Verfahren weiterhin unklar, finden verschiedene

nuklearmedizinsche Verfahren wie z.B. PET (Positronen-Emissions-Tomographie) ihre Anwendung.
Eine Reihe von Hirntumoren führen zu einer spinalen Aussaat (Glioblastome, Ependymome, ZNS-Lymphome), sodass eine Liquorpunktion und deren zytologische Aufarbeitung ebenfalls zur Diagnosesicherung beitragen können.
Tumormarker sind in der Diagnostik der primären Hirntumoren ausser beim primären ZNS-Lymphom und bei embryonalen Tumoren bisher nicht etabliert. Sie können jedoch in der Abgrenzung zu Hirnmetastasen gelegentlich sinnvoll eingesetzt werden.
Stereotaktische Biopsieentnahmen dienen der histologischen Diagnosesicherung und sind in ca. 90% der Fälle verlässlich.
Therapeutisch ist als primärer Bestandteil bei fast allen Entitäten ausser den Hypophysenadenomen und den ZNS-Lymphomen die möglichst vollständige Resektion des Tumors anzustreben. An zweiter Stelle steht die Radiotherpaie, welche nach chirurgischer Resektion die lokal wirksamste Behandlungsmodalität darstellt. Bei einigen primären Hirntumoren, insbesondere dem Oligodendrogliom, trägt die Chemotherapie im Rahmen einer multimodalen Behandlung inzwischen zu einer teils deutlichen Lebensverlängerung bei (Bogdahn U, 1983).

2.6.4 Oligodendrogliome

Oligidendrogliome kommen fast ausschliesslich im Grosshirn vor. Sie sind neuroepithelialen Ursprungs und machen ca. 6% aller Gliome aus. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr, Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen.
Die Tumorzellen dieser Tumore leiten sich von den Oligodendrozyten ab, welche beim gesunden Menschen die Markscheiden der Nervenzellfortsätze im zentralen Nervensystem bilden. Hauptlokalisation ist der vordere Hirnlappen des Grosshirns.
Gemäss WHO-Einteilung (siehe Tab. 2) unterscheidet man langsam wachsende (Grad II) von schneller wachsenden anaplastischen Oligodendrogliomen (Grad III).
Molekulargenetische Untersuchungen konnten zeigen, dass bei Oligodendrogliomen oftmals ein Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 sowie des langen Arms von

Chromosom 19 vorliegt. Es hat sich gezeigt, dass Patienten mit dieser molekulargenetischen Veränderung aus bislang unklarer Ursache eine bessere Prognose aufweisen, da sie eher auf eine Chemo- und Strahlentherapie ansprechen (Pytel, 2009).

Klinisch manifestieren sie sich klassischerweise durch epileptische Anfälle. Andere Symptome sind Wesensveränderungen oder neurologische Ausfallserscheinungen entsprechend der topographischen Lage.

Zur Diagnosesicherung kommen die bereits oben erwähnten Verfahren zum Einsatz, die Magnetresonanztomographie ist derzeit der Goldstandard. Zudem kann nach operativer Gewebeentnahme der 1p/19q – Status zur Beurteilung der Prognose analysiert werden.

Therapeutisch werden Oligodendrogliome wenn möglich chirurgisch angegangen, Chemo- und in Einzelfällen auch Strahlentherapie sind ebenfalls möglich. Sie werden bei Tumoren des WHO-Grad II dann eingesetzt, wenn sich nach primärer Operation ein Rezidiv zeigt. Bei WHO-Grad III-Tumoren erfolgt nach der Operation fast immer eine Chemo- oder Strahlentherapie.

Die Prognose ist im Vergleich mit anderen malignen Hirntumoren relativ günstig. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 40 -70% (WWW.KREBGESELLSCHAFT.DE).

2.7 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Regionen des ITSN2-Gens zu untersuchen und verschiedene Spleissvarianten des Gens in diversen Geweben zu finden. Die bisher erlangten Erkenntnisse und bereits detektierten Spleissvarianten von ITSN 1 und 2 lassen vermuten, dass noch längst nicht alle Formen dieser beiden Gene gefunden worden sind. Weiterhin eröffnet das differentielle Vorkommen von ITSN 2 in verschiedenen Geweben wiederum die Frage nach spezifischen, gewebstypischen Funktionen.

Für diese Arbeit wurden verschiedene Gewebeproben aufgearbeitet und mittels PCR-Analyse untersucht. Dabei sollten sowohl die bereits bekannten als auch neue Spleissvarianten des ITSN2-Gens detektiert werden. Ausgehend von diesen Befunden sollten die Varianten dann genauer auf ein gewebetypisches Vorkommen hinsichtlich Normal- bzw. Tumorgewebe gleicher Organsysteme untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Reagentien und Medien

3.1.1 Puffer und Stammlösungen

$CaCl_2$ 1 M:

110,9 g $CaCl_2$ in 1 l H_2O dest. lösen, sterilfiltrieren

$CaCl_2$ 2 M:

87,6 g $CaCl_2.6H_2O$ in 200 ml H_2O dest. lösen, sterilfiltrieren

EDTA 0,5 M, pH 8:

186,1 g/l H_2O dest., mit 10 N NaOH pH 8 einstellen

Ethanol 70 %:

700 ml Ethanol in 1 l H_2O dest.

Ethidiumbromid-Stammlösung:

10 mg/ml H_2O dest.

Ethidiumbromid-Färbelösung:

100 µl Ethidiumbromid- Stammlösung in 1 l H_20 dest.

GITC- Lösung:

50 g GITC (Roth) in 50 ml H_2O dest., 5,3 ml 1 M Tris (pH 7,6), 5,3 ml 0,2 M EDTA lösen; 7,065 ml 30 % Sarkosyl, 1 ml Mercaptoethanol und 525 µl Antifoam (Sigma) zugeben

Glycerol 10 %:

100 g Glycerol in 1 l H_2O dest.

HBS 2x:

8 g NaCl, 0,2 g $Na_2HPO_4.7H_2O$, 6,5 g HEPES, in 500 ml H_2O dest. lösen, pH mit 1 M NaOH einstellen, sterilfiltrieren

MOPS-Puffer 10x:

41,85 g 200 mM MOPS, 6,81 g 50 mM NaAc, 3,7 g 10 mM EDTA in 1 l H_2O dest. lösen, mit NaOH pH 7 einstellen, sterilfiltrieren und lichtgeschützt aufbewahren

MOPS-Puffer 1x:

100 ml 10x MOPS mit 1 l H_20 dest. auf 1 l auffüllen

3 M NaAc:

40,8 g Natriumacetat in 70 ml H_2O dest. lösen, mit Essigsäure pH einstellen

SDS 10 %:

100 g SDS in 1 l H_2O dest. lösen

TAE-Puffer 50x, pH 8,5:

242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA mit H_2O dest. auf 1 l auffüllen, pH 8,5 einstellen mit Essigsäure

TE- Puffer 10x:

100 mM Tris, pH 7,4, 10 mM EDTA

Tris-HCL (1M):

121,1 g/l H_2O dest., gewünschten pH mit HCl einstellen

X-Gal-Stammlösung:

20 mg in 1 ml Dimethylformamid lösen, sterilfiltrieren, Aliquots bei -20 ℃ lagern

3.1.2 Antibiotikastammlösungen

Ampicillin-Stammlösung:
50 mg/ml Ampicillin in H_20 dest. lösen. Sterilfiltrieren, Aliquots bei –20 °C lichtgeschützt lagern

3.1.3 Bakterienagars und Bakterienmedien

LB-Medium:
10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt mit H_2O dest. auf 1 l auffüllen, mit 5 N NaOH pH 7 einstellen, autoklavieren

LB-Ampicillin-Medium:
1 l LB-Medium autoklavieren, auf 55 ℃ abkühlen, 1 ml Ampicillin-Stammlösung hinzugeben

LB-Agar:
10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 20 g Agar mit H_2O dest. auf 1 l auffüllen, mit 5 N NaOH pH 7 einstellen, autoklavieren

LB-Ampicillin-Agar:
1 l LB-Agar autoklavieren, auf 55 ℃ abkühlen, 1 ml Ampicillin-Stammlösung hinzugeben

LB-Agar für Blau-Weiß-Selektion:
Siehe Ampicillin-Agar, zusätzlich 2 ml X-Gal /l zugeben

Agarplatten:
25 ml/100 mm sterile Petrischale mit dem entsprechenden, ungefähr auf 55 ℃ abgekühlten Agar unter der Sterilbank befüllen und anschließend mindestens 30 min lufttrocknen.

3.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.2.1 RNA- Isolierung

Prinzip

Für die Isolierung oder Konznetrationsbestimmung des DNA- bzw. RNA-Gehaltes einer Zelle stehen seit langer Zeit mehrere Methoden zur Verfügung.

Da die Nukleinsäuren immer in Form von Komplexen mit Proteinen vorliegen, muss nach der Lyse der Zellen die DNA oder RNA von ihren Proteinen getrennt werden. Dies geschieht im Allgemeinen durch die Behandlung mit einer Phenollösung und anschließender Zentrifugation. Kontaminationen mit der nicht gewünschten Nukleinsäurefraktion können dann durch DNAsen, bzw. RNAsen beseitigt werden.

3.2.1.1 Guanidium-Thiocyanat-Extraktion nach Chomzynski et al.

Material

GITC-Lösung	3 ml
NaAc, 2M, pH 4,0	300 µl
Phenol-Lösung, pH 4,0	3 ml
Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (49:1)	600 µl
Isopropanol-Lösung	1 Vol.
Ethanol-Lösung (70%)	1 ml
H_2O dest.	50 µl
Gewebeprobe, schockgefroren in flüssigem Stickstoff	1- 3 g

Gewebehomogenisator, Eppendorfgefäße, 15 ml Röhrchen, sterile Pinzette, steriles Skalpell, Kühlzentrifuge (Kontron), Tischzentrifuge, Rotationsverdampfer (SpeedVac).

Um einer Kontamination mit RNAsen vorzubeugen, wurde die Isolation unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Methode

Zuerst wird das Gewebe mit einer sterilen Pinzette und einem sterilen Skalpell zerkleinert und in der eiskalten GITC- Lösung homogenisiert. Um die Lyse zu

erleichtern, kann das Gewebe in der Lösung mit Hilfe des Gewebehomogenisators weiter zerkleinert werden, bis keine groben Gewebereste mehr sichtbar sind. Anschließend werden NaOAc, Phenol und das Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch hinzugefügt, 30 sec vermischt und die Probe 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wird das Gemisch 20 min bei 9000 rpm und 4 ℃ zentrifugiert, was zur Auftrennung in eine obere (RNA-haltig) und untere Phase (organisch, Phenol-haltig) führt. Die obere, wässrige Phase wird dann in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, ihr Volumen bestimmt und über Nacht bei –20 ℃ mit 1 Vol. Isopropanol gefällt. Danach wird erneut abzentrifugiert (20 min, 9000rpm) und der Überstand vorsichtig verworfen. Das Pellet wird nun mit 70 %igem Ethanol gewaschen, wieder abzenrtifugiert (20 min, 12000 rpm) und nach vorsichtigem Abnehmen des Ethanols in der SpeedVac getrocknet, um letzte Ethanolreste zu entfernen. Zum Schluss wird das Pellet in RNAse freiem H_2O gelöst. Die Konzentration der RNA wird im Photometer vermessen, die Güte der Isolation über ein 1 %iges RNA-Gel kontrolliert. Die RNA-Lösung kann kurzfristig bei –80 ℃ aufbewah rt werden.

3.2.1.2 Isolierung mit RNeasy (Quiagen)

Material

RNeasy Mini Kit (Quiagen)
QIAshredder Homogenizers
PBS-Lösung
Trypsin-Lösung
Sterile Pasteurpipetten
Zentrifuge, Eppendorfgefäße, sterile Werkbank
Zellmaterial: 1. Amnionzellen einer Monolayer-Kultur
2. mit Stickstoff schockgefrorene Gewebeproben

Methode

Das Material der gefrorenen Gewebeprobe kann direkt mit dem Puffer RLT aufgeschlossen werden, die Zellen der Monolayer-Kultur müssen vorbehandelt werden. Zunächst werden die Zellen dem Brutschrank entnommen und unter dem Mikroskop auf Beschaffenheit und Wachstum untersucht. Danach wird das Medium

abgenommen, die Zellen mit 2-3 ml der eiskalten PBS- Lösung 3 mal gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin für 5 min inkubiert. Um den Trypsinverdau zu stoppen, gibt man erneut 1 ml Medium hinzu, entfernt die Zellen mit einem cell scraper von ihrer Unterlage, überführt den Inhalt in ein steriles Zentrifugenröhrchen und zentrifugiert das Gemisch bei 1800 rpm für 5 min ab. Ist der Überstand abgenommen kann man die Zellen mit dem Puffer RLT aufschließen. Hierbei wurden sowohl für die Zellen der Zellkultur als auch für 20 mg Gewebeprobe 350 µl RLT verwendet und das Lysat mit Hilfe von QIAshredder-Säulen homogenisiert. Für das weitere Vorgehen siehe Rneasy Mini Handbook (Juni 2001).
Eluiert wurde mit 50 µl RNAse- freiem H_2O und die Isolation mit einem RNA- Gel überprüft.

3.2.2 RNA- Gelelektrophorese

Prinzip

Mit der Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäuren aufgetrennt werden. Hierbei wandern die DNA- oder RNA-Fragmente gemäss ihrer Ladung und Konformation im elektrischen Feld von Kathode zu Anode. Als Träger der Fragmente dient das pflanzliche Polysaccharid Agarose, welches im Gel netzähnliche Strukturen ausbildet (LÖFFLER, PETRIDES, 1998).
Einzelstrangige RNA-Moleküle werden unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt, weil sie durch intra- bzw. intermolekulare Basenpaarungen Sekundärstrukturen ausbilden können. Als Denaturierungsmittel kommt z. B. Formaldehyd zum Einsatz, das sowohl dem Gel wie auch dem Ladepuffer zugesetzt wird. Seine denaturierende Wirkung beruht auf der Bildung Schiff´scher Basen von den Basen Guanin, Cytosin und Adenin (Abb. 2). Dadurch wird die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen effektiv unterbunden, so dass sich keine Sekundärstrukturen entwickeln können. Die aufgetrennten RNA-Banden können dann mittels interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden, indem sie mit UV-Licht angeregt werden.

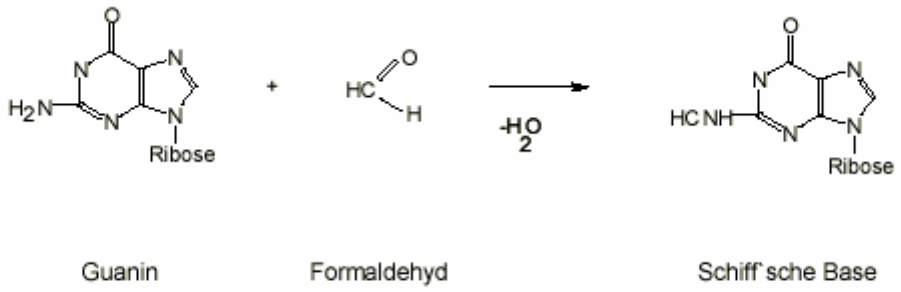


Abb. 2 : Denaturierende Wirkung von Formaldehyd (aus Lottspeich, 1998)

Material

Gel (1 %):

Agarose (Seakam)	0,5 g
Formaldehyd	3 ml
1x MOPS-Puffer	50 ml

Ladepuffer:

Formamid	10 µl
Formaldehyd	3,5 µl
10x MOPS	2 µl
Ethidiumbromid (1 mg/ ml)	1µl
Bromphenolblau	2 µl
RNA- Probe	2 µl

Wasserbad 65 ℃, Eis, Erlenmeyerkolben, Mikrowelle, Elektrophoresekammer, UV-Transilluminator

Methode

Der Ladepuffer wird wie oben beschrieben zusammen pipettiert und als letztes die RNA-Probe zugegeben. Das Gemisch wird nun im 65 ℃ heissen Wasserbad für 5 min denaturiert. Danach wird die Probe auf Eis gestellt.

Die Bestandteile des Gels werden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben zusammengefügt, in der Mikrowelle aufgekocht, bis das Gel schlierenfrei ist. Nachdem das Gel auf ungefähr 60 ℃ abgekühlt ist, wird unter einem Abzug das Formaldehyd zugefügt, gemischt und zügig in einen mit einem Kamm bestückten Gelträger gegossen. Luftblasen werden mit einer Pipettenspitze entfernt. Das Gel

bleibt bei RT so lange stehen, bis es ausgehärtet ist. Dann wird der Kamm entfernt, die Gelkammer mit 1x MOPS als Laufpuffer befüllt, und die Proben vorsichtig in die Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese wird mit einer Spannung von 100 V durchgeführt, bis die blaue Bromphenol-Bande die Hälfte der Gellänge erreicht hat.
Anschließend wird das Gel mit H_2O dest. gespült und unter dem UV-Transilluminator ausgewertet.

3.2.3 Reverse Transkription

Prinzip

Die Reverse Transkription, das Umschreiben von RNA in cDNA, stellt einen wichtigen Schritt dar, um Transkripte klonieren und sequenzieren zu können. Für die Herstellung dieser sogenannten cDNA (= komplementäre DNA) benötigt man neben wenigen µg der RNA-Präparation einen geeigneten Puffer, die Desoxynukleotide, einen Primer zum Start der Synthese und eine Reverse Transkriptase, die in 5´- 3´-Richtung die cDNA synthetisieren kann. Diese stammt aus verschiedenen Virustypen, wobei am häufigsten die MMLV-RTAse (Moloney-Leukämie-Virus), die AMV-RTase (Affen-Myeloblastosis-Virus) oder die Tth-Polymerase (Thermus thermophilus, speziell für RT-PCR) verwendet werden.
Anschliessend kann die Amplifikation der cDNA mittels PCR in einem relativ kleinen Volumen durchgeführt werden, womit sich die Reaktionsbedingungen optimal auf das verwendete Enzym einstellen lassen.

Material

RNA	5-10 µg
Primer T30	10 pmol
Puffer	4 µl
Reverse Transkriptase (M-MLV)	1 µl
H_2O dest.	1 µl

Wasserbad 72 ℃, Wasserbad 40 ℃, Eis, Eppendorfgef äße
Die Reverse Transkription wurde mit Produkten der Firma Promega durchgeführt.

Methode

Für einen 20 µl-Ansatz werden RNA und Primer zusammenpipettiert und 2 min bei 72 ℃ inkubiert. Anschließend kommt die Probe für 2 min auf Eis. Danach werden Puffer und Enzym dazugegeben und der Ansatz mit H_2O dest. auf 20 µl aufgefüllt. Das Gemisch wird für 60 min bei 40°C inkubiert.

Die cDNA kann nun in einer anschliessenden genspezifischen PCR eingesetzt oder bei –20°C gelagert werden.

3.2.4 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. PCR, polymerase chain reaction) ist ein molekulargenetisches Verfahren, bei dem bestimmte DNA-Abschnitte in vitro selektiv amplifiziert werden können. Die Neusynthese basiert auf enzymatischer Vermehrung der DNA-Sequenzen mittels DNA-Polymerasen, 2 synthetischen Oligonukleotiden (Primer) und findet in Anwesenheit freier desoxy-Nukleotid-Triphosphate (dNTP´s) statt. Durch die exponentielle Anreicherung, ausgehend von geringsten Mengen an DNA, können nach mehrmaliger Wiederholung die DNA-Abschnitte in ausreichender Menge für weitere Analysen oder gentechnische Zwecke vorliegen.

Die Methode der PCR wurde 1984 von Kary B. Mullis erstmals veröffentlicht und stellt inzwischen eine der am meisten genutzten Standardmethoden der Molekularbiologie dar. Ein typischer PCR- Ablauf umfasst in der Regel 3 Phasen: Denaturierung, Annealing und Extension.

Bei der Denaturierung wird durch eine Temperaturerhöhung auf circa 92 bis 94 ℃ der DNA-Strang in seine Einzelstränge aufgetrennt. Danach wird der Reaktionsansatz abgekühlt, damit sich die beiden Primer anlagern können (Annealing). Dieser Reaktionsschritt ist für die Optimierung der Spezifität einer PCR entscheidend, weswegen die errechnete Hybridisierungstemperatur aufgrund der experimentellen Daten eventuell korrigiert werden muss. Zumeist wird hierbei eine Temperatur von circa 60 ℃ angestrebt. Die Basenabf olge der Primer muss komplementär zu dem 5´-Ende des jeweiligen DNA-Stranges sein und sollte eine Länge von 20-30 bp nicht überschreiten. Um unspezifische Bindungen der

Primersequenzen zu vermeiden, sollten Haarnadelstrukturen, Poly-T-Bereiche und 3´-Komplementarität vermieden werden und die Primer einen ausgeglichenen G/C- und A/T-Gehalt aufweisen.

Nach dem Annealing wird durch eine Temperaturerhöhung auf 72 °C die Verlängerung der Primer eingeleitet (Extension). Bei dieser Temperatur hat die verwendete Taq-Polymerase ihr Aktivitätsoptimum und synthetisiert DNA mit einer Geschwindigkeit von 35 bis 100 Nukleotiden pro Sekunde (NEWTON, 1994). Mit Hilfe von im Reaktionsmix vorhandener dNTP`s entstehen aus den DNA-Einzelsträngen Doppelstränge. Die Taq-Polymerase ist ein heute vielfach verwendetes Enzym aus dem Organismus Thermus aquaticus. Diese thermophilen Bakterien leben in heissen Quellen und produzieren Enzyme, die auch bei Temperaturen von 90-95 °C stabil bleiben. Andere Polymerasen, die diese Bedingungen ebenfalls erfüllen, sind beispielsweise Tth-, Pwo- und Pfu-Polymerasen.

Für die beiden Schritte Annealing und Extension reichen in der Regel Zeiten von jeweils weniger als einer Minute aus. Bei sehr grossen PCR-Produkten (über 1 kb) allerdings verlängert man die Extensionszeit, um sicher zu stellen, dass der ganze Strang synthetisiert wird. Danach wird der Reaktionsansatz wieder auf 94 °C erhitzt und der Ablauf beginnt von neuem.

Insgesamt wird der Reaktionszyklus 20- 40mal durchlaufen und lässt die DNA-Menge somit exponentiell auf das 2^n-fache wachsen, da auch die neu gebildeten Stränge als Matrize zur Verfügung stehen. In der Theorie können noch weitaus höhere Werte (10^6-fach) errechnet werden, was sich aber in der Praxis deshalb nicht erreichen lässt, weil die Bedingungen für eine PCR weder am Anfang noch am Ende der Reaktion optimal sind. So verläuft die typische Kurve einer PCR (Abb. 3) aufgrund der sehr geringen Menge an DNA-Matrize (Template) zu Anfang linear, wächst dann exponentiell weiter und erreicht schliesslich ein Plateau, welches das Aktivitätsoptimum des Enzyms widerspiegelt (LOTTSPEICH, 1998). Hier kann die Aktivität des Enzyms sogar nachlassen, da sich nun auch die zu amplifizierenden DNA- Stränge untereinander anlagern.

Heutzutage wird die PCR in modernen Thermocyclern durchgeführt, bei welchen der periodische Temperaturwechsel automatisiert abläuft.

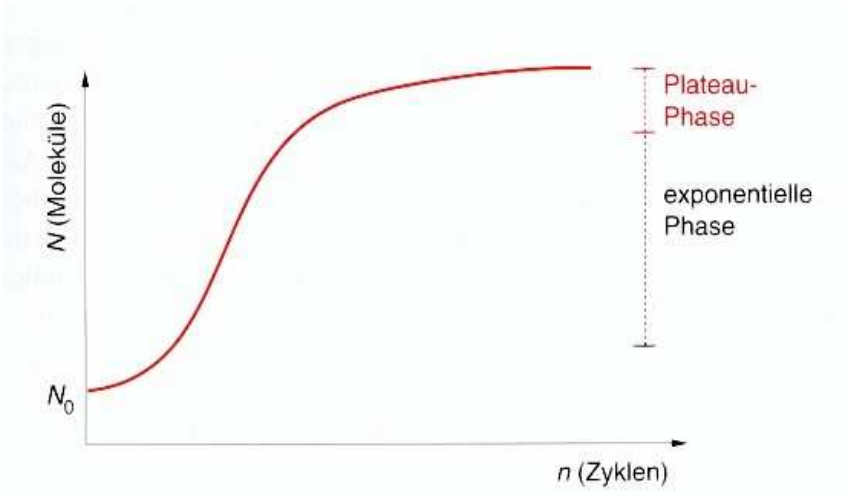


Abb. 3: Typische Verlaufskurve einer PCR, nach Lottspeich, 1998

Material

Taq-Polymerase (5 U/ml, Amersham Pharmacia)	0,5 µl
Taq-Polymerase-Puffer (1,5M $MgCl_2$, Amersham Pharmacia)	5 µl
Primer forward (15 pmol)	1 µl
Primer reverse (15 pmol)	1 µl
Template-cDNA	2 µl
$dNTP_4$- Mix, 100mM/Nucleotid	0,5 µl

H_2O dest., PCR-Gefäße

Durchgeführt wurden die PCRs auf einem Thermocylcer der Firma Perkin Elmer (GeneAmp PCR-System 9600).

Methode

Alle Reaktionsansätze wurden als Mastermix unter einer sterilen Werkbank nach vorangegangenem Pipettierschema zusammengefügt und mit H_2O dest. auf 50 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde dann in die auf circa 80 ℃ vorgeheizte PCR-Apparatur gestellt und nach einem jeweils speziellen Programm (siehe Ergebnisteil) amplifiziert. Anschliessend wurde ein 20 µl Aliquot des PCR-Produktes in einem Agarosegel ausgewertet.

3.2.5 Primer

Die für die vorliegende Arbeit angewandten Primer wurden von der Firma Thermo Hybaid GmbH (Ulm) hergestellt und weisen die in Tab. 3 dargestellten Sequenzen auf.

IT2A-F	5`-GAGTCGCGCTGTGACGAG-3`
IT2A-R	5`-GATGACCCATGAGGCAATGT-3`
IT2B-F	5´-TTCAGCCTTTACCCATTCCTT-3`
IT2B-R	5`-GTTCCCTCGCTCATAGTTGG-3`
IT2C-F	5`-GAAGCACTGAATGGCAAACA-3`
IT2C-R	5`-TTTCCTTGCACCTCATCTT-3`
IT2D-F	5`-AGGAAAGCAAAGCAAGGAAA-3`
IT2D-R	5`-TAAAGCCAACCAGGTTCTCC-3`
ß2MFor	5`-CCAGCAGAGAATGGAAAGTC-3`
ß2MRev	5`-GATGCTGCTTACATGTCTC-3`

Tab. 3: Sequenzen der verwendeten Primer

3.2.6 DNA-Gelelektrophorese

Prinzip

Die DNA-Gelelektrphorese beruht auf demselben Prinzip wie die RNA-Gelelektrophorese (siehe Kap. 3.2.2). Jedoch kann im Unterschied dazu die amplifizierte DNA unter nativen, nicht denaturierenden Bedingungen aufgetrennt werden.

Der Agarosegehalt des Gels bestimmt die Konzentration und damit die Trennschärfe der Fragmente. Fragmente bis 300 bp lassen sich besser mit höher prozentigen Agarosegelen mit Konzentrationen von 2–2,5 % auftrennen, wohingegen grössere Fragmente von über 5000 bp am besten mit 0,5 %igen Gelen zu unterscheiden sind.

Material

1x Acetat-Puffer	100 ml
Agarose (Seakem)	2 g
PCR-Produkt	18 µl
Auftragspuffer	2 µl
DNA-Molekulargewichtsmarker Nr. 8 (Roche)	1 µl

Elektrophoresekammer, Netzgerät, Erlenmeyerkolben, Mikrowelle, Eppendorfgefäße

Methode

Zur Herstellung eines 2 %igen Agarosegels werden 2 g Agarose in 100 ml 1x Acetatpuffer in der Mikrowelle unter mehrmaligem Schwenken aufgekocht. Ist die Lösung klar und ohne Schlieren, kann das Gel nach Abkühlen auf ungefähr 60 ℃ in die Gelkammer gegossen werden.

Für die Probe werden 18 µl DNA und 2 µl Auftragspuffer zusammengegeben. Das im Auftragspuffer enthaltene Bromphenolblau dient der Markierung der Lauffront und das Glycerin sorgt dafür, dass die Probe in die Geltasche absinkt. Der Molekulargewichtsmarker wird ebenfalls mit 1 µl Auftragspuffer gemischt.

Ist das Gel bei Raumtemperatur ausgehärtet, wird der Kamm vorsichtig entfernt und die Kammer mit 1x Acetat-Puffer als Laufpuffer, bis das Gel vollständig bedeckt ist, gefüllt. Anschliessend werden die Proben in die Taschen pipettiert und bei 100 V in einer Zeit von ungefähr 45 min aufgetrennt.

3.2.7 Färbung und Auswertung von DNA-Agarosegelen

Prinzip

Die aufgetrennten DNA-Fragmente können mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden (siehe Kap. 3.2.2).

Material

Ethidiumbromid-Färbelösung

UV-Transilluminator

Polaroid-Sofortbildkamera und –film (ISO 3000/36°)
H_20 dest.

Methode

Nach der Elektrophorese wird das Gel mit H_20 dest. gewaschen und danach für 20 min lichtgeschützt in die Ethidiumbromid-Färbelösung gelegt. Nach erneutem Waschen mit H_2o dest. kann das Gel nun unter UV-Licht betrachtet werden. Zur Dokumentation können die Ergebnisse mit der Sofortbildkamera fotografiert werden (Belichtungszeit: 1 sec, Blende 8).

3.2.8 Reinigung von DNA-Fragmenten

Prinzip

DNA, sowohl in Form eines PCR-Produkts in Lösung als auch in Form einer Bande eines Agarosegels, kann mittels Säulenchromatographie aufgereinigt werden. Dabei wird die DNA auf eine Säule gegeben, in der sie an eine Glasfibermatrix bindet. Mit speziellen Puffern können Nukleotide, Polymerasen, Primer und Salzionen aus dem PCR-Reaktionsansatz ausgewaschen werden. Die DNA kann dann in reiner und konzentrierter Form eluiert werden.

3.2.8.1 DNA-Isolierung aus Agarosegelbanden

Material

Spezialagarose (Nusieve), Wasserbad 60 °C, Eppendorfgefässe, steriles Skalpell Tischzentrifuge, UV-Transilluminator (302 nm), 50 µl H_2O dest., GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Pharmacia Amersham)

Methode

Die DNA-Probe wird wie in Kap. 3.2.5 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei wird jedoch ein 4 %iges Gel aus Spezialagarose verwendet, die einen niedrigeren Schmelzpunkt besitzt und für eine höhere Auflösung der Banden sorgt. Nach 15 minütigem Färben in Ethidiumbromid wird das Gel unter den UV-

Transilluminator gelegt und die entsprechende Bande mit dem Skalpell ausgeschnitten. Sie wird in ein Reaktionsgefäss überführt und abgewogen. Nun werden pro 10 mg Gel 10 µl Capture Buffer dazu gegeben und das Gemisch für 5-15 min im Wasserbad inkubiert, bis sich die Agarose komplett gelöst hat. Nach kurzem Abzentrifugieren wird die Probe auf eine GFX-Säule gegeben und für 1 min inkubiert. Dann wird für 60 sec bei 12000 rpm zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Nach einmaligem Waschen wird die DNA mit 50 µl H_2O dest. eluiert.

3.2.8.2 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten verläuft ähnlich der Reinigung von Gelbanden. Nachdem 500 µl Capture Buffer auf die Säule gegeben wurden, werden 50 µl des PCR-Ansatzes dazu gegeben, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und abzentrifugiert. Nach dem Waschen wird die DNA ebenfalls mit 50 µl H_2O eluiert.

3.2.9 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt durch die Messung eines Absorptionsspektrums zwischen 260 und 280 nm (Abb. 4).

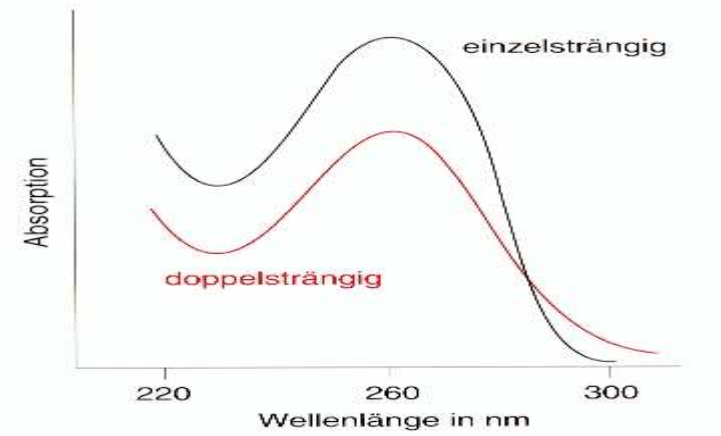


Abb. 4: Absorptionskurve doppel- und einzelsträngiger DNA.
Nach Lottspeich, 1998

Eine OD von 1 entspricht folgenden Nukleinsäuremengen, gezeigt in Tab. 4:

Doppelsträngige DNA	50 µg/ml
Einzelsträngige DNA	33 µg/ml
Einzelsträngige RNA	40 µg/ml

Tab. 4: Nukleinsäuremengen mit einer OD von 1

Alle Messungen wurden an einem Photometer der Firma Pharmacia und in 1 cm Quarzküvetten durchgeführt.

3.2.10 DNA-Sequenzierung

Prinzip

Zur Analyse der Basenabfolge verschiedener DNA-Abschnitte wird die enzymatische Kettenabbruchmethode nach Frederick Sanger angewandt.

Hierbei verlängert eine DNA-Polymerase einen DNA-Einzelstrang mittels Primer und dNTPs. Gibt man zu dem Ansatz ausserdem die entsprechenden Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs), kommt es zu einem Abbruch der Sequenzierreaktion, weil bei diesem Nukleotid keine freie 3´-OH-Gruppe mehr für die Polymerisierung vorhanden ist. So entstehen unterschiedlich lange DNA-Ketten, die mit dem jeweiligen ddNTP enden. Sind die ddNTPs an einen für jede Base spezifischen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, kann man die Ansätze auftrennen und die Basenabfolge anhand der Fluoreszenz identifizieren.

Die Sequenzierungen der DNA-Fragmente der vorliegenden Arbeit wurden mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyser der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Dieses Gerät arbeitet mit einer Vierfarbfluoreszenzmarkierung und bestimmt durch eine Kapillarelektrophorese mit einem Trennmedium (Genscan Polymer) automatisch die Sequenz der Nukleinsäure.

Material

Ready-reagent-Mix der Firma ABI	2 µl
DNA-Template	10 ng
Primer M13	3,2 pmol
H_20 dest.	ad 20 µl

PCR-Gefäße, Thermocycler (Perkin Elmer 9600)

Präzipitation:

NaOAc (pH 4,6)	2 µl
EtOH absolut	50 µl
EtOH 70 %	250 µl

Eppendorfgefäße, Tischzentrifuge, SpeedVac

Methode

1. RR-Mix, DNA, Primer und H_20 dest. werden in ein PCR-Gefäss pipettiert.
2. Durchführung einer PCR-Reaktion von 25 Zyklen im PCR-Gerät unter folgenden Bedingungen :

	96℃	10 sec
	50℃	5 sec
	60℃	4 min

3. Präzipitation:
   Der Reaktionsansatz wird in ein Reaktionsgefäss überführt, NaOAc und absolutes EtOH werden dazu gegeben, vermischt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschliessend wird die Probe bei 12000 rpm 20 min zentrifugiert, der Überstand dann vorsichtig verworfen. Das Pellet wird mit 70 %igem EtOH gewaschen, vermischt und anschliessend für 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird für 10-15 min unter Vakuum (Speedvac) getrocknet und kann nun bis zur Sequenzierung bei –20 ℃ gelagert werden.

4. Einbringen der Probe ins Sequenziergerät

3.2.11 Bearbeiten der Sequenzen am Computer

Die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte an einem MacIntosh Computer (Powermac) mit Hilfe der Programme SeqEdit (ABI, England) und Sequencher (GeneCodes Corp., USA).
Die Sequenzen wurden mit folgenden Sequenzen amplifizierter cDNA von ITSN2 verglichen: NM_006277, NM_019595 und NM_147152 (OriGene Technologies).

3.3 Arbeiten mit Bakterien

3.3.1 Klonierung und Transformation

Prinzip
Für viele molekularbiologische Verfahren werden DNA-Fragmente in grosser Menge benötigt. Zu deren Herstellung eignen sich Bakterienzellen bestens, da diese sich nicht nur enorm vermehren, sondern auch relativ leicht fremde DNA aufnehmen können.
Folgende Schritte werden dabei durchlaufen:

1. Klonierung:
Die isolierte DNA-Sequenz muss in einen geeigneten Vektor eingebaut werden. Als Vektoren verwendet man ringförmige, bakterielle DNA-Moleküle, sogenannte Plasmide. Diese werden an einer bestimmten Stelle (Polyklonierungsstelle) durch Restriktionsendonukleasen aufgeschnitten, so dass ein lineares Molekül entsteht. Trägt nun die einzubringende, fremde DNA die für diese Restriktionsendonuklease typischen Basensequenzen am 5´- bzw. 3´-Ende, so fügt sie sich unter entsprechenden Inkubationsbedingungen in die Lücken ein und kann danach mit Hilfe der DNA-Ligase fest in das Plasmid eingebaut werden (LÖFFLER, 1998). Das Konstrukt aus fremder DNA und Vektor wird auch als rekombinante DNA bezeichnet.

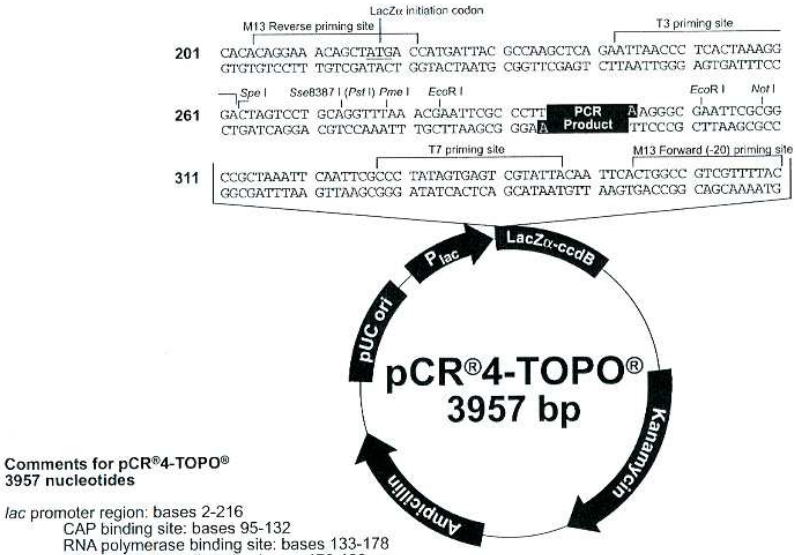
2. Transformation:
Die rekombinante DNA wird in die Empfängerzelle eingeschleust. Die Bakterienzelle ist durch entsprechende Vorbehandlung, z. B. in einer $CaCl_2$-Lösung und unter

Temperaturerhöhung, in der Lage, die Plasmide aufzunehmen. Auch mit dem Verfahren der Elektroporation kann über elektrische Entladungen die Zellmembran kurzzeitig geöffnet und DNA aufgenommen werden. Zellen, die dazu befähigt sind, bezeichnet man als kompetente Zellen. Sind die Zellen transformiert, können sie sich unter geeigneten Bedingungen vermehren.

3. Identifikation und Selektion:

Um zu überprüfen, ob das Plasmid wirklich von der Bakterienzelle aufgenommen worden ist, bedient man sich verschiedener Marker. Häufig verwendet wird ein Resistenzgen, welches für eine Antibiotikaresistenz kodiert, z. B. die Ampicillinresistenz des Vektors PCR 4.0-TOPO der Firma Invitrogen (Abb. 5). Bakterien, die mit diesem Plasmid erfolgreich transfiziert wurden, können auf Ampicillin-haltigen Nährböden wachsen.

Um diejenigen Plasmide mit eingebauter Fremd-DNA von denjenigen ohne Fremd-DNA zu unterscheiden, enthält der Vektor das lacZ- Gen in der Polyklonierungsstelle von E. coli., welches für das Enzym b-Galaktosidase kodiert. Da die Polyklonierungsstelle allein die Expression des lacZ-Gens nicht stört, exprimieren die Zellen, die ein Plasmid ohne eingebaute Fremd-DNA enthalten, das Enzym in voller Stärke. Zu erkennen ist dies daran, dass diese Bakterienzellen das in den Agarplatten vorhandene X-Gal unter Bildung eines blauen Farbstoffs spalten. Wurde die Fremd- DNA dagegen richtig integriert, ist das lacZ-Gen zerstört und die Kolonien wachsen weiss bzw. farblos.



Comments for pCR®4-TOPO®
3957 nucleotides

lac promoter region: bases 2-216
CAP binding site: bases 95-132
RNA polymerase binding site: bases 133-178
Lac repressor binding site: bases 179-199
Start of transcription: base 179
M13 Reverse priming site: bases 205-221
LacZα-*ccdB* gene fusion: bases 217-810
LacZα portion of fusion: bases 217-497
ccdB portion of fusion: bases 508-810
T3 priming site: bases 243-262
Polylinker: bases 262-312
TOPO® Cloning site: bases 294-295
T7 priming site: bases 328-347
M13 Forward (-20) priming site: bases 355-370
neo (kanamycin) promoter region: bases 1021-1070
neo (kanamycin) resistance gene (ORF): bases 1159-1953
bla promoter region: bases 2062-2156
RNA polymerase binding site: bases 2062-2143
-35 region: bases 2087-2093
bla promoter (P3): bases 2116-2122
Start of transcription: base 2122
Ribosome binding site: bases 2145-2149
bla (ampicillin) resistance gene (ORF): bases 2157-3017
pUC origin: bases 3162-3835

Abb. 5: Vektor pCR 4-TOPO (Invitrogen)

Material

Topo-Kloning-Kit (Invitrogen)

One ShotTop10 Competent Cells (Invitrogen)

PCR-Produkt

RT-warmes SOC-Medium

steriles H_2O dest., Wasserbad 42 ℃, Eis, Schüttler, Agarplatten mit Ampicillin und X- Gal, Brutschrank 37 ℃

Methode

2 µl PCR- Produkt, 1µl Salzlösung (Kit), 1 µl Vektor (Kit) und 1µl steriles H_2O dest. werden auf Eis zusammen pipettiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und wieder auf Eis gestellt. Dann werden 2µl des Ansatzes zu den Bakterien gegeben und alles für 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgen 30 sec Hitzeschock bei 42 ℃, im Anschluss die Proben wieder auf Eis stellen. Nun werden 250 µl RT-warmes SOC-Medium zu den Bakterien gegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 ℃ und 200 rpm

auf dem Schüttler inkubiert. Danach werden je 50 und 200 µl auf jeweils einer Agarplatte mit dem Trigalsky-Spatel gleichmässig ausgestrichen und über Nacht bei 37 ℃ in den Brutschrank gestellt.

3.3.2 Kultur in Füssigmedium

5 ml LB-Ampicillin-Flüssigmedium werden in ein 15 ml Röhrchen überführt und mit einer Einzelkolonie der über Nacht gewachsenen Bakterien mittels sterilem Zahnstocher beimpft. Wiederum wird dann über Nacht bei 225 rpm und 37 ℃ auf dem Schüttler inkubiert.

3.3.3 Anlegen einer E. coli-Glyzerinkultur

500 µl einer E. coli-Übernachtkultur werden in einem 1,5 ml sterilen Eppendorfgefäß mit 500 µl 50% Glyzerin (in LB-Medium) vermischt und anschliessend bei –70 ℃ gelagert.

3.3.4 Plasmidisolierung

Prinzip

Um die in den Bakterien vermehrte DNA in hoher Reinheit zu erhalten, bedient man sich des Verfahrens der Ionenaustauschchromatographie. Hierbei müssen die Bakterienzellen zunächst mit SDS lysiert werden, die bakteriellen Proteine denaturiert und die genomische DNA der Zelle präzipiert werden. Die relativ kleine Plasmid-DNA bleibt unter diesen Bedingungen in Lösung und wird zur weiteren Aufreinigung der Säulenchromatographie unterzogen. Dabei wird die Plasmid-DNA durch elektrische Wechselwirkungen am Trägermaterial der Säule gebunden, in verschiedenen Waschungsschritten gereinigt und schliesslich durch den erhöhten pH- Wert des Elutionspuffers von der Säule gelöst und eluiert. Im Anschluss daran wird die DNA in einem Konzentrierungsschritt mit Isopropanol präzipiert, zentrifugiert

und nachfolgend in einem geeigneten Volumen H_2O dest. aufgenommen. Die Konzentration wird mittels Photometer bestimmt (siehe Kap. 3.2.8).

Material

Plasmid-Mini-Kit (Qiagen)	
Bakterien-Übernachtkultur	3 ml
Isopropanol	0,56 ml
70 %iges Ethanol	1 ml
H_2O dest.	20 µl
Eis, Eppendorfgefäße, SpeedVac	

Methode

siehe Plasmid-Mini-Kit (Qiagen), Handbuch Oktober 2001

3.3.5 Analyse der Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen

Prinzip

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA-Moleküle sequenzspezifisch spalten können. Diese Enzyme erkennen sogenannte palindromische Sequenzen (Palindrom = Buchstabenfolge, die sowohl von rechts als auch von links gelesen werden kann) in der DNA und spalten diese dort. Bei Nukleinsäuren meint Palindrom eine aus wenigstens 4 Basen bestehende Sequenz, die in komplementären Strängen, jeweils von 5´- nach 3´-Richtung gelesen, dieselbe Basenabfolge aufweist.

Bis heute sind mehrere hundert solcher Enzyme bekannt. Durch die Spaltungsspezifität entstehen Bruchstücke, die an den Fragmentenden Basensequenzen tragen, die durch die verwendete Restriktionsendonuklease genau definiert sind und sich deshalb besonders gut zur Analyse eignen. Die Grösse der entstandenen Fragmente kann mittels Agarosegelelektrophorese abgeschätzt werden.

Material

Pipettierschema für 20 µl Ansatz:

Plasmid- DNA	600 ng
Eco R1(10 U/ml, Roche)	1 µl
Eco R1- Puffer 10x (Roche)	2 µl
H_2O dest., Wasserbad 37 °C, Eis	

Methode

Plasmid, Enzym und Puffer auf Eis zusammen pipettieren und mit H_2O dest. auf 20 µl auffüllen. Den Ansatz im Wasserbad für 1 h inkubieren.

Nun kann die Probe gemäss der Vorgehensweise der Agarosegelelektrophorese (siehe Kap. 3.2.5) mittels einem 1 %igen Gel ausgewertet werden.

4. Ergebnisse

4.1 Minor-Spleissvarianten unterschiedlicher Gewebe

In einem ersten Schritt wurde in gesundem Gewebe unterschiedlicher Organe (Lunge, Magen, Leber, Gehirn, Niere, Milz, Kolon, Ösophagus, Thymus sowie eine Melanomzelllinie) nach Spleissvarianten gesucht. Um eventuelle Unterschiede zwischen Tumorgewebe und gesundem Geweben zu finden, wurde gesundes Lungengewebe mit Lungentumorgewebe verglichen sowie Hirngewebe mit Gewebeproben von Oligodendrogliomen. Alle Gewebeproben wurden freundlicherweise durch das pathologische Institut der Universitätsklinik Homburg zur Verfügung gestellt.

Bei der Suche nach Spleissvarianten wurden für die unterschiedlichen Regionen des Intersectin 2 Gens abschnittsweise Primer hergestellt, die bereits in Tab. 3 aufgeführt wurden. Anschliessend wurde die gewonnene cDNA vervielfältigt und sequenziert. Dabei konnten insgesamt zwei neue, bislang unbekannte Spleissvarianten entdeckt werden. Hierbei handelt es sich um Varianten von Exon 7 und Exon 26. Gemäss dem Aufbau, welcher in Abb. 6 schematisch dargestellt ist, bedingt die Spleissvariante Exon 7 betreffend einen Teilverlust der zweiten EH-Domäne. EH-Domänen sind Mitglieder einer hochkonservierten eukaryotischen Proteinfamilie, welche bei Säugetieren insgesamt vier Vertreter aufweisen. Im menschlichen ITSN2 kommen zwei EH-Domänen vor. Sie binden im Allgemeinen lineare Peptide und regulieren so Lipidtransportwege, wie z.B. den Austritt von Rezeptorproteinen aus dem endozytotischen Recycling-Kompartiment. Im Speziellen können EH-Domänen Proteine der Clathrin-vermittelten Endozytose binden, z.B. Epsin und SCAMP1. Die zweite bislang unbekannte Variante zeigt einen Verlust von Exon 26, welcher bisher nur in modifizierter Form, nämlich in Kombination mit einem Verlust von Exon 27, von Pucharcos et al. 2001 beschrieben wurde. Das Spleissen von Exon 26 führt zu einem Verlust der gesamten vierten SH3- Domäne.

Eine weitere, von uns detektierte Spleissvariante betrifft Exon 18 und wurde bereits 2001 von Pucharcos et al. beschrieben. Exon 18 ist Teil der ersten SH3-Domäne.

Eine weitere, bereits bekannte Speissvariante betrifft Exon 16, welche ebenfalls in verschiedenen Gewebeproben nachgewiesen werden konnte.

Bei den Minorspleissvarianten von Exon 7, 18 und 26 konnten Unterschiede hinsichtlich des Auftretens in Tumorgewebe von Lunge und dem entsprechenden gesunden Gewebe bislang nicht festgestellt werden, die Variante Exon 16 zeigt jedoch ein unterschiedliches Verteilungsmuster in Hirntumorgewebe und Normalgewebe.
Alle vier Spleissvarianten weisen ein intaktes Leseraster ohne zusätzliche Stoppcodons auf, woraus sich auf eine funktionelle Bedeutung schliessen lässt.

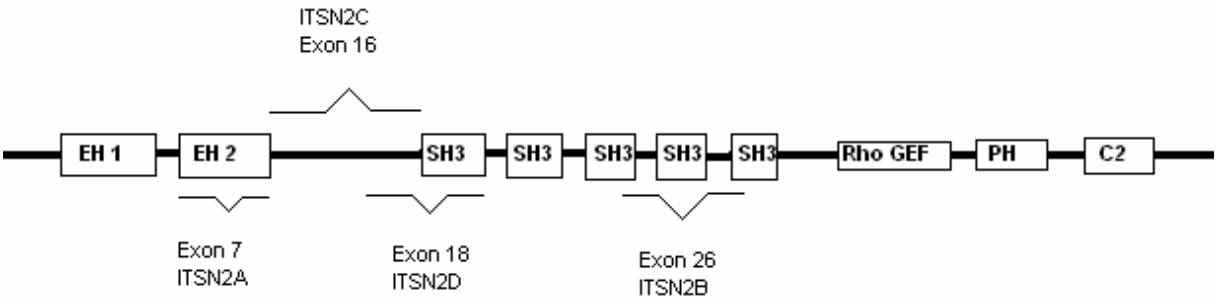


Abb. 6 zeigt schematisch den Aufbau von ITSN2 mit seinen Proteindomänen. Die Lage der jeweiligen Primer und dem zugehörigen Exon ist unterhalb bzw. oberhalb angegeben.

4.1.1 Exon 7

Die erste gefundene Minorspleissvariante betrifft Exon 7. Exon 7 umfasst einen Bereich ca. 600 bp und codiert für die zweite EH-2-Domäne. EH-Domänen weisen eine hohe Homologie zu Eps 15 auf, sie sind in der Lage, Epsin und SCAMP1 zu binden, welche seit langem als Proteine der Clathrin-mediierten Endozytose bekannt sind.
Wird Exon 7 gespleisst, zeigt die Sequenzanalyse des daraus resultierenden Proteins (SMART, http://smart.embl-heidelberg.de), dass es lediglich zu einem Teilverlust der EH-Domäne kommt. Die komplette Domäne ist nicht betroffen. Abb. 7a zeigt die amplifizierte cDNA von gesundem Lungengewebe und Lungentumorgewebe unter Verwendung der Primer IT2A-F und IT2A-R. Es entsteht

eine kräftige Bande von 602 bp, welche die komplette Form darstellt. Darunter verläuft eine schwächere Bande von 458 bp, welche in der Sequenzanalyse die Spleissvariante von Exon 7 zeigt. Es besteht kein Unterschied zwischen Lungentumor und gesundem Lungengewebe.
Dieselbe Spleissvariante findet sich auch in diversen Gewebeproben, welche in 7b dargestellt sind.

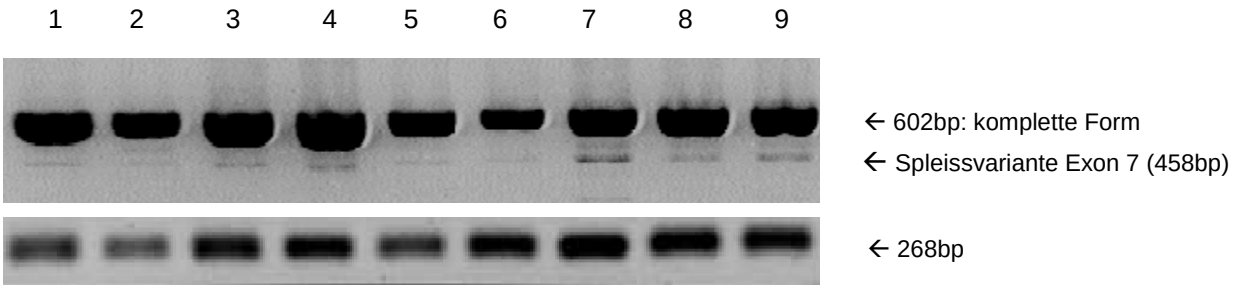


Abb. 7a zeigt gesundes Lungengewebe und Lungentumorgewebe amplifiziert mit den Primern IT2A-R und IT2A-F zum Nachweis von Exon 7. Erläuterungen siehe Text. (Agarose-Gel, 1%). Spur 1: 2223 Lunge normal. Spur 2: 2223 Lungentumor. Spur 3: 2224 Lunge normal. Spur 4: 2224 Lungentumor. Spur 5: 2226 Lunge normal 1. Spur 6: 2226 Lunge normal 2. Spur 7: 2226 Lungentumor. Spur 8: 2227 Lunge normal. Spur 9: 2227 Lungentumor. Zur Kontrolle der Genexpression dient das Housekeeping-Gen ß2M. Verwendete Primer: IT2A-F und IT2A-R.

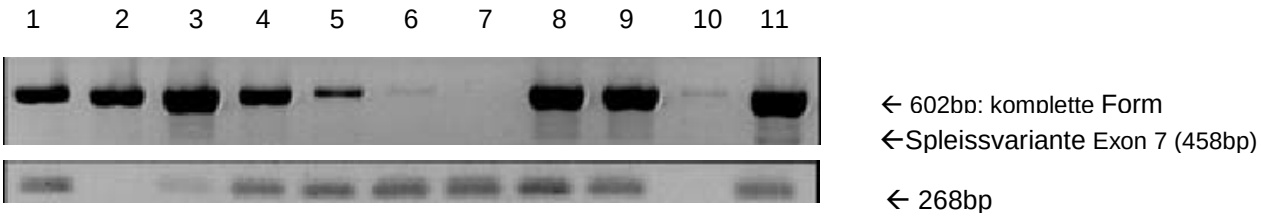


Abb. 7b: Gezeigt ist die Gelelektrophorese der unterschiedlichen Gewebeproben nach Amplifikation mit den Primern IT2A-F und IT2A-R. Die komplette Form mit 602 bp ist als kräftige Bande sichtbar, darunter verläuft die Spleissvariante mit 485 bp. (Agarose-Gel, 1%). Spur 1: Kolon. Spur 2: Hirn 1. Spur 3: Hirn 2. Spur 4: Hirn 3. Spur 5: Leber. Spur 6: Lunge. Spur 7: Magen. Spur 8: Milz. Spur 9: Niere. Spur 10: Ösophagus. Spur 11: Thymus. Verwendete Primer: IT2A-F sowie IT2A-R. Zur Kontrolle der Genexpression dient das Housekeeping-Gen ß2M.

4.1.2 Exon 18

Eine weitere Spleissvariante von ITSN2 betrifft Exon 18. Diese Variante wurde bereits 2001 von Pucharcos et. al beschrieben. Exon 18 umfasst einen Teil der ersten SH3-Domäne, zusätzlich einen Teil der coiled-coil-Region. Das Exon umfasst 314 bp, beim Spleissen kommt es zu einem Verlust eines kurzen Fragmentes von 13 Aminosäuren, die resultierende Variante umfasst dann noch 275 bp. Diese Variante konnte in allen untersuchten Gewebeproben nachgewiesen werden, eine gewebsspezifische Verteilung zeigte sich nicht (Abb. 8a und b).

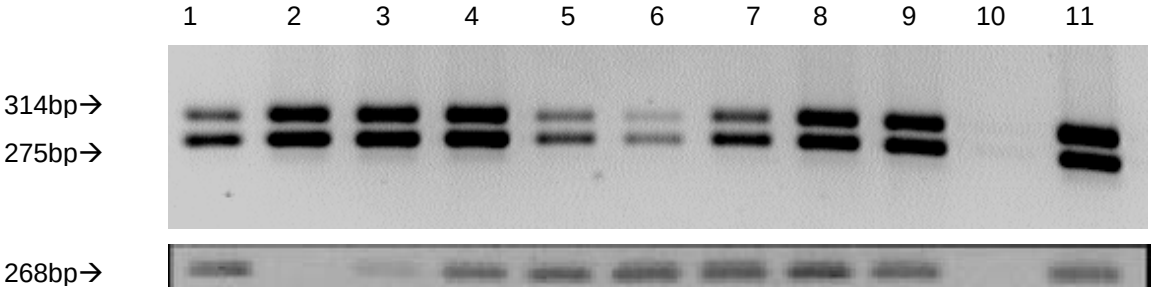


Abb. 8a: Gezeigt ist die Gelelektrophorese der unterschiedlichen Gewebeproben nach Amplifikation mit den Primern IT2D-F und ITD2-R. Es zeigt sich einmal die normale, komplette Form mit Exon 18 als kräftige Bande (314 bp), bei 275 bp zeigt sich die Spleissvariante ohne Exon 18, (Agarose-Gel, 1%). Spur 1: Kolon. Spur 2: Hirn 1. Spur 3: Hirn 2. Spur 4: Hirn 3. Spur 5: Leber. Spur 6: Lunge. Spur 7: Magen. Spur 8: Milz. Spur 9: Niere. Spur 10: Ösophagus. Spur 11: Thymus. Verwendete Primer: IT2D-F sowie IT2D-R. Zur Kontrolle der Genexpression dient das Housekeeping-Gen ß2M.

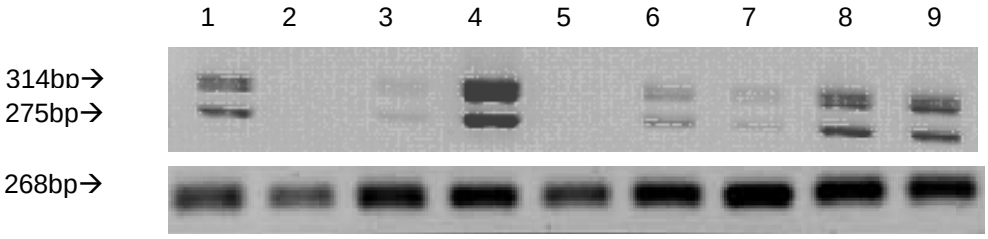


Abb. 8b: Gesundes Lungengewebe und Lungentumorgewebe amplifiziert mit den Primern IT2D-R und IT2D-F zum Nachweis von Exon 18. Bande bei 314 bp: Komplette Form. Bande bei 275 bp: Variante ohne Exon 18. (Agarose-Gel, 1%). Spur 1: 2223 Lunge normal. Spur 2: 2223 Lungentumor. Spur 3: 2224 Lunge normal. Spur 4: 2224 Lungentumor. Spur 5: 2226 Lunge normal 1. Spur 6: 2226 Lunge normal 2. Spur 7: 2226 Lungentumor. Spur 8: 2227 Lunge normal. Spur 9: 2227 Lungentumor. Zur Kontrolle der Genexpression dient das Housekeeping-Gen ß2M. Verwendete Primer: IT2A-F und IT2A-R.

4.1.3 Exon 26

Mit der Spleissvariante Exon 26 betreffend konnte eine zweite, bislang nicht beschriebene Variante gefunden werden (Abb. 9a und b). Dabei kommt es zu einem Verlust der vierten SH3-Domäne. Diese Variante weicht von einer bislang von Pucharcos beschriebenen Form ab, bei welcher Exon 26 und Exon 27 zusammen herausgespleisst werden. Bezüglich des Auftretens in normalem Lungengewebe und Lungentumorgewebe konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

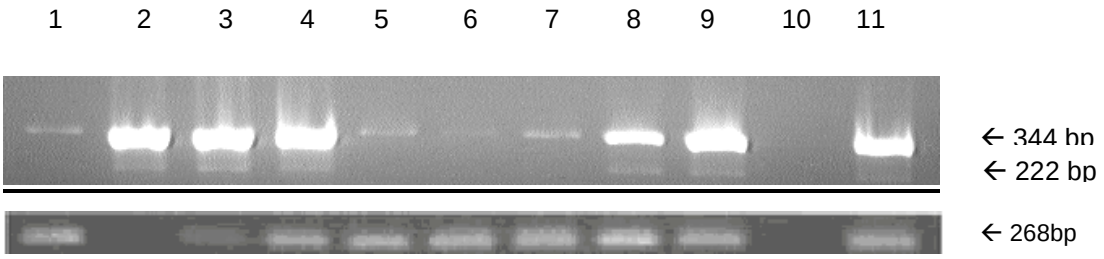


Abb. 9a: Gezeigt ist die Gelelektrophorese unterschiedlicher Gewebeproben nach Amplifikation mit den Primern IT2B-F und IT2B-R. Die komplette Variante mit Exon 26 und 27 ist bei 344 bp zu sehen. Die schwächere Bande darunter (222 bp) ist die gespleisste Form ohne die vierte SH3-Domäne, (Agarose-Gel, 1%). Spur 1: Kolon. Spur 2: Hirn 1. Spur 3: Hirn 2. Spur 4: Hirn 3. Spur 5: Leber. Spur 6: Lunge. Spur 7: Magen. Spur 8: Milz. Spur 9: Niere. Spur 10: Ösophagus. Spur 11: Thymus. Verwendete Primer: IT2B-F und IT2B-R. Genkontrolle mittels Housekeeping-Gen ß2M (268 bp).

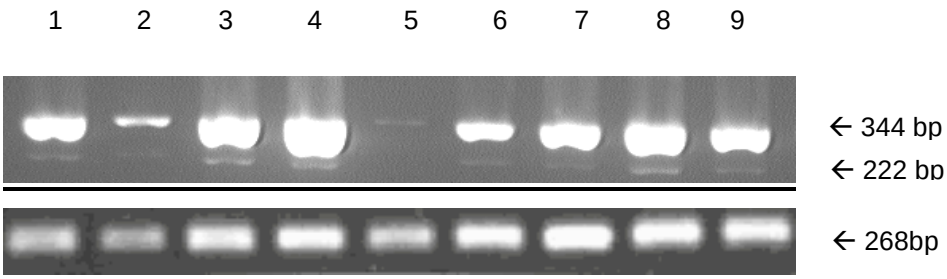


Abb. 9b: Gesundes Lungengewebe und Lungentumorgewebe amplifiziert mit den Primern IT2B-R und IT2B. Komplette Form als Bande bei 344 bp, Spleissvariante als Bande mit 222 bp. (Agarose-Gel, 1%). Spur 1: 2223 Lunge normal. Spur 2: 2223 Lungentumor. Spur 3: 2224 Lunge normal. Spur 4: 2224 Lungentumor. Spur 5: 2226 Lunge normal 1. Spur 6: 2226 Lunge normal 2. Spur 7: 2226 Lungentumor. Spur 8: 2227 Lunge normal. Spur 9: 2227 Lungentumor.
Zur Kontrolle der Genexpression dient das Housekeeping-Gen ß2M. Verwendete Primer: IT2B-F und IT2B-R.

4.1.4 Exon 16

Eine weitere, bereits bekannte und von Pucharcos erstmals 2000 veröffentlichte Spleissvariante betrifft Exon 16. Exon 16 codiert für die coiled-coil-Region des Proteins und umfasst 600bp. Das gespleisste Transkript weist einen Verlust von 90bp auf, entsprechend entstehen Fragmente einer Grösse von 529 bp. Unterschiedliche Gewebe wurden gescreent, dabei konnte eine starke Expression des gespleissten Transkripts nachgewiesen werden. Die komplette Variante zeigte in Lungengewebe und Lungentumorgewebe eine deutlich schwächere Expression (Abb. 10).
Ein stärkeres Signal der kompletten Variante konnte dagegen in gesundem Hirngewebe detektiert werden (Kap. 4.2, Abb. 11).

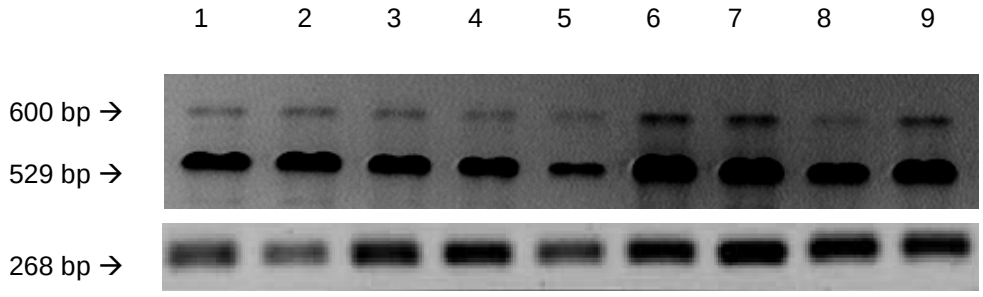


Abb.10: In der Abbildung zeigt die schwache Bande bei 600 bp die komplette Variante mit Exon 16 an. Die stärkere Bande darunter bei 529 bp ist das Spleissprodukt (Erläuterungen siehe Text, Agarose-Gel, 1%),
Spur 1: 2223 Lunge normal. Spur 2: 2223 Lungentumor, Spur 3: 2224 Lunge normal, Spur 4: 2224 Lungentumor. Spur 5: 2226 Lunge 1 normal. Spur 6: 2226 Lunge 2 normal, Spur 7: 2226 Lungentumor, Spur 8: 2227 Lunge normal, Spur 9: 2227 Lungentumor. Verwendete Primer: IT2C-F und IT2C-R

4.2 Gewebsspezifische Expression von Exon 16

4.2.1 Exon 16 in gesundem Hirngewebe

Die Expression von Exon 16 und seiner Minorspleissvariante ist in Abb. 11 dargestellt. Es zeigt sich, dass die Expression des vollen Transkriptes neben der

Spleissvariante in gesundem Hirngewebe relativ stärker ausfällt (Spur 2 bis 4) als in den übrigen gescreenten Proben (Colon, Magen, Niere, Milz, Thymus und Ösophagus), wo allenfalls eine schwache Bande zu sehen ist.
Die Variante mit dem gespleissten Produkt von Exon 16 zeigt hingegen in allen untersuchten Geweben ein deutliches Signal. Dies spricht für eine stärkere Expression der Spleissvariante als der kompletten, vollständigen Form. Somit scheint die Spleissvariante von Exon 16 die eigentliche Hauptexpressionsform zu sein.

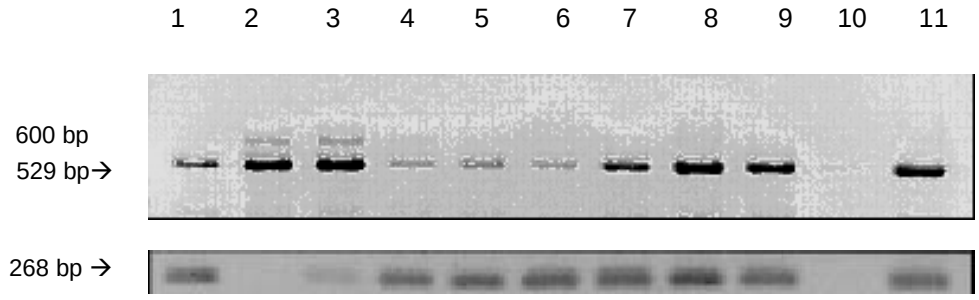


Abb. 11: Gelelektrophorese (Agarose-Gel, 1%) diverser Gewebe mit den Primern IT2C-F und IT2C-R zum Nachweis der Spleissvarianten von Exon 16. Erläuterungen siehe Text.
Spur 1: Colon. Spur 2: Hirn-1. Spur: 3 Hirn- 2. Spur 4: Hirn-3 . Spur 5: Leber. Spur 6: Lunge. Spur 7: Magen. Spur 8: Milz. Spur 9: Niere. Spur 10: Ösophagus. Spur 11: Thymus. Zur Kontrolle der Genexpression dient das Housekeeping-Gen ß2M. Verwendete Primer: IT2C-F und IT2C-R

4.2.2 Exon 16 im Oligodendrogliom

Aufgrund der relativ stärkeren Expression des kompletten Transkripts von Exon 16 in gesundem Hirngewebe wurden entsprechend Gewebeproben von Tumorgewebe von Oligodendrogliomen, sowie Oligodendrogliomzelllinien, auf das Vorkommen von Exon 16 und seiner Spleissvariante untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die komplette, vollständige Variante weder in Tumorgewebe noch in den Tumorzelllinien nachgewiesen werden konnte. Es konnte lediglich die gespleisste Form detektiert werden (Abb. 12).
Bei gesundem Lungengewebe im Vergleich mit Proben von Lungentumorgewebe konnte dieser Unterschied nicht festgestellt werden (siehe Abb. 10).

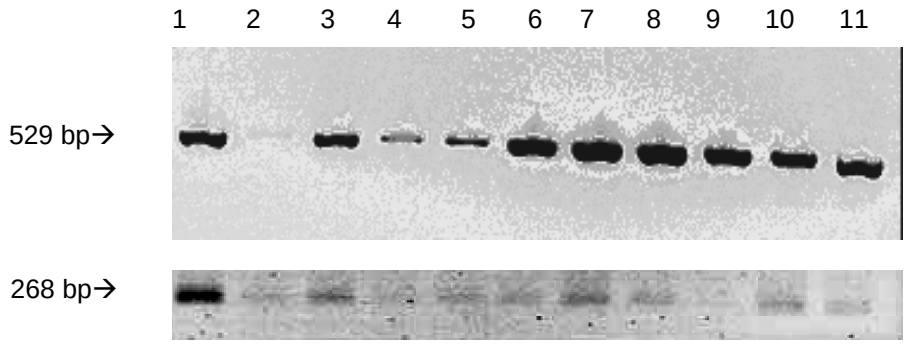


Abb. 12: Gezeigt ist die Expression von Exon 16 in Hirntumorgewebe. Dabei kann die komplette Form mit Exon 16 (siehe 4. 2.1) nicht nachgewiesen werden. Es lässt sich in allen Fällen nur die Spleissvariante mit einer Grösse von 529 bp detektieren. (Agarose Gel 1%). Spur 1-5: Oligodendrigliomgewebe (Spur 2: Artefakt), Spur 6-11 Oligodendrogliom-Primär-Zelllinien nach SCID mouse Passage (TX-Zelllinien): Spur 1 H246, Spur 2 H346, Spur 3 H366, Spur 4 H545, Spur 5 H556, Spur 6 T3095, Spur 7 T3868, Spur 8 T3868 +VitD, Spur 9 TX3095, Spur 10 TX3868, Spur 11 TX3868 2%FCS. Primer: IT2C-F und IT2C-R. Zur Kontrolle der Genexpression dient das Housekeeping-Gen ß2M.

4.3 Exon 16 als Transmembrandomäne

Die Analyse des von Exon 16 codierten Proteins zeigt eine hohe Rate an hydrophoben Aminosäureresten, wie sie häufig in membranbindenden Motiven vorkommen, daher liegt die Vermutung nahe, dass Exon 16 für eine Transmembrandomäne codiert. Mit dem Programm TN-Pred II wurde eine Sequenzanalyse von Exon 16 vorgenommen, welche bei den Aminosäuren 621-647 (NP_006268) des codierten Proteins eine eindeutige Hydrophobizität zeigt und in Abb. 14 dargestellt ist.

Im Gegensatz dazu kann für die verkürzte, gepleisste Form im Analyser kein Hinweis auf eine Funktion als Transmembrandomäne gefunden werden (NP_062541). Es finden sich keine hydrophoben Aminosäurereste, es lässt sich kein Peak in der Sequenzanalyse nachweisen (Abb.13).

Die Aminosäuren 621-647 stellen die einzige Sequenz des Intersectin2-Gens dar, welche als Transmembrandomäne fungieren könnte. Diese Sequenz liegt auf Exon 16 und wird beim Herausspleissen der 90bp funktionslos.

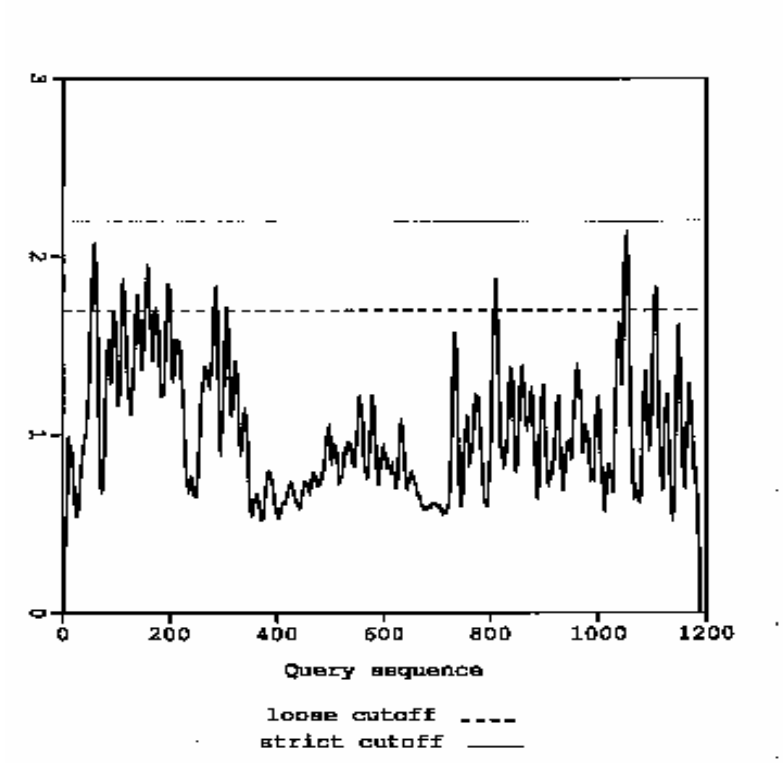


Abb.13: Proteinsequenz der Spleissvariante von Exon 16: X-Achse: Aminosäuren, Y-Achse: Hydrophobizität. Hyrophobe Aminosäurereste, welche in einem Peak über dem Cut-Off liegen, könnten für eine Funktion als Transmembrandomäne sprechen. Diese Variante ohne Exon 16 enthält keinen Peak.

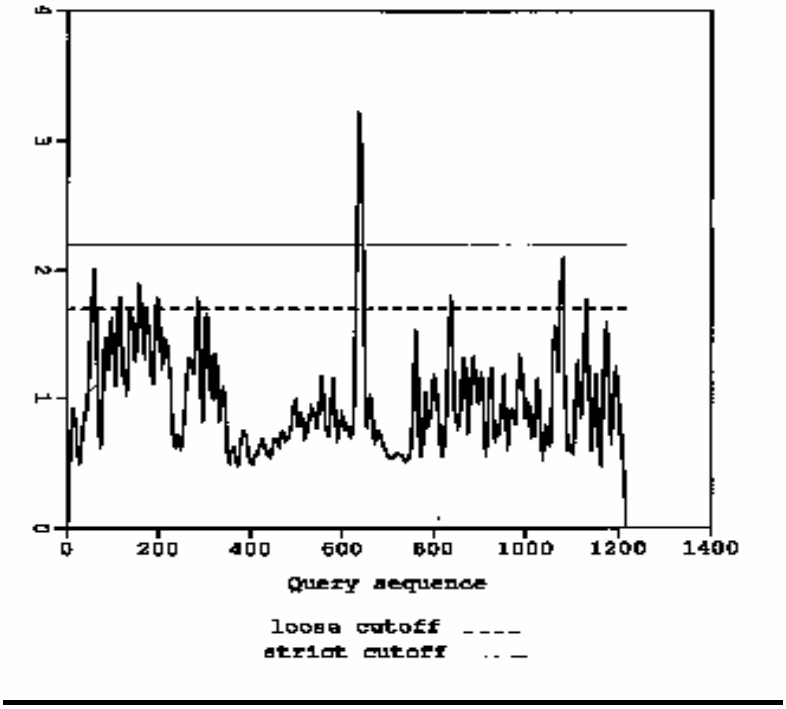


Abb. 14: Proteinsequenz von Exon 16, X-Achse: Aminosäuresequenz , Y-Achse: Hydrophobizität. Die Aminosäuren 628 bis 641 zeigen einen Peak über dem cut-off. Dies spricht für das Vorliegen einer Transmembrandomäne. Ist Exon 16 gespleisst (vgl. Abb.13), fehlt der Peak und somit die Funktion als Transmembrandomäne.

5. Diskussion

5.1 Allgemeine Bedeutung von Spleissvarianten

Das menschliche Genom umfasst ca. 25000 Gene. Diese Zahl ist viel geringer, als zunächst vermutet wurde. Ursächlich für die anfänglich hohen Schätzungen, die von einer Anzahl von bis zu 100000 menschlichen Genen ausgingen, könnte zum einen das miterfassen von sogenannten Pseudogenen sein. Dies sind Gene, die zwar eine mRNA ausbilden, welche aber keine Funktion besitzt. Zum anderen können verschiedene mRNAs mitgezählt worden sein, die durch alternatives Spleissen entstehen und somit von ein und demselben Gen ausgehen.
Auch über die Gesamtzahl der menschlichen Proteine lassen sich nur Vermutungen anstellen. Die Schätzungen reichen hier von 100000 bis zu einer Millionen (DONOVAN, 2001).
Alternatives Spleissen stellt einen massgeblichen Faktor für die genetische Vielfalt dar. Besitzt ein Gen mehrere alternative Spleissstellen, so kann theoretisch eine grosse Zahl an unterschiedlichen Proteinen von ein und demselben Gen codiert werden. Für einige Gene wurde die Zahl möglicher Spleissvarianten auf bis zu mehrere Tausend geschätzt. Oftmals sind mehrere Varianten in einer Zelle gleichzeitig anzutreffen, andere Varianten zeichnen sich durch eine Gewebs- oder Entwicklungsspezifität aus (GRAVELY, 2001) Wie viele Gene letztendlich alternativ gespleisst werden, lässt sich nur annäherungsweise schätzen. Die Angaben reichen hier von 35 bis zu 50% (CACERAS, 2002).
Viele Spleissvarianten unterscheiden sich nur in einem kleinen Anteil ihrer Sequenz, sodass sie oftmals eine ähnliche Funktion besitzen oder sich überhaupt nicht in ihrer Wirkungsweise unterscheiden. Diese Minivarianten bezeichnet man auch als „noise“, eine Art statistisches Rauschen, von dem man lange Zeit vermutete, es handle sich um Irrtümer der Zelle (MICHEL, 1999). Inzwischen hat sich herausgestellt, dass viele dieser sogenannten Minivarianten konservierte Motive sind, die entwicklungsgeschichtlich beibehalten wurden und somit auf eine wichtige Bedeutung schliessen lassen.
Der Erforschung der verschiedenen Spleissvarianten eines Gens kommt somit eine wichtige Bedeutung zu, da sie Auslöser unterschiedlichster Zellfunktionen sein

können und bei pathologischen Funktionen als Angriffspunkt verschiedenster Therapien dienen können.
Ob die Natur von all den theoretischen Möglichkeiten auch Gebrauch macht, ist nach wie vor unklar, ebenso wie und warum eine Auswahl getroffen wird. Schätzungen gehen davon aus, dass ungefähr 35-40% der Gene alternativ gespleisst werden, doch sind noch längst nicht alle menschlichen Gene in ihrer vollständigen Sequenz bekannt, so dass man letztendlich eine genaue Zahl der Spleissvarianten nur vermuten kann. Erschwerend kommt hinzu, dass verschiedene Spleissvarianten Proteine mit ähnlicher Funktion, aber auch solche mit völlig anderer Funktion hervor bringen können (LEE, 2001).

5.2 Medizinische Bedeutung von Spleissvarianten

Viele Erkrankungen manifestieren sich auf der Ebene der Proteine. Daher ist es wichtig, Strukturen, Aufgaben, Wechselwirkungen und Bindungspartner verschiedener Proteine zu untersuchen. Durch das finden von Markerproteinen lassen sich Krankheiten diagnostizieren, Prognosen über Krankheitsverlauf und Heilung können getätigt werden und nicht zuletzt können wichtige Angriffspunkte für die Therapie gefunden werden.
Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gehen Schätzungen davon aus, dass ca. 15% der krankheitsverursachenden Mutationen das Spleissen betreffen (CACERAS, 2002).

5.3 Spleissvarianten von ITSN2

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die bislang noch wenig bekannte Expression von ITSN2 gefunden werden. Insgesamt wurden vier Spleissvarianten von ITSN2 detektiert, wovon zwei bisher noch nicht bekannt waren. Hierbei handelt es sich um Formen, bei welchen jeweils Exon 7 und Exon 26 herausgespleisst werden. Diese und die zwei bereits bekannten Spleissvarianten von Exon 18 und Exon 16 wurden hinsichtlich ihrer Expression und Gewebsspezifität untersucht (www.genecards.org). Gesucht wurde dabei in sowohl unauffälligen,

gesunden Organgeweben von Magen, Niere, Milz, Ösophagus, Thymus und Lunge, sowie in Lungentumorgewebe.
Für die Varianten, die Exon 7 und 26 betreffen, konnte gezeigt werden, dass Spleissvarianten vorkommen, die jedes Mal das komplette Exon betreffen. Bei Exon 18 wird lediglich ein Teil herausgespleisst. In allen untersuchten Geweben, sowohl in gesundem als auch in Tumorgewebe, konnten sowohl die Haupt- als auch die Minorvariante nachgewiesen werden. Bezüglich der Expression konnte bisher bei Exon 7, 18 und 26 kein Unterschied festgestellt werden, welcher für eine besondere Rolle der einzelnen Spleissvarianten in der Tumorgenese sprechen könnte. Alle vier Varianten weisen ein intaktes Leserater auf und beinhalten kein zusätzliches Stoppcodon, sodass auf eine funktionelle Bedeutung dieser Varianten geschlossen werden kann. Daher könnte eine erneute Überprüfung dieser These in anderen Geweben eine funktionelle Bedeutung dieser Minorspleissvarianten zeigen.
Weiterhin ist es denkbar, dass diese verschiedenen Varianten an unterschiedlichen Orten der Zelle vorkommen und dort unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Diese intrazelluläre Verteilung wird aktuell mittels molekulargenetischer Methoden überprüft und ist Thema einer Forschungsgruppe der Humangenetischen Abteilung der Universitätsklinik Homburg/ Saar.

5.3.1 Exon 7

Eine bislang unbekannte Spleissvarinate stellt das Transskript ohne Exon 7 dar. Exon 7 ist Teil der zweiten EH-Domäne von ITSN2, welche nachweislich verschiedene Proteine der Clathrin-vermittelten Endozytose bindet, wie z.B. Epsin und SCAMP1 (ADAMS, 2000). Beim Spleissen von Exon 7 zeigte die Sequenzanalyse, dass nicht die gesamte EH-Domäne gespleisst wird, sondern lediglich ein Teil davon. Ob dies letztlich Auswirkungen auf die Funktion der Proteindomäne hat, ist aktuell noch unklar.

5.3.2 Exon 26

Eine weitere neue Spleissvariante betrifft Exon 26. Bislang konnte lediglich eine Spleissform gefunden werden, bei welcher Exon 26 und Exon 27 zusammen gespleisst werden. Exon 26 codiert für die vierte von insgesamt fünf SH3-Domänen, welche nach dem Spleissvorgang komplett eliminiert ist. Für die SH3-Domänen von ITSN1 konnte bislang gezeigt werden, dass die mit Dynamin und Synaptojanin interagieren, beide ebenfalls als Proteine der Clathrin-vermittelten Endozytose bekannt (EVERGREN, 2006). Weiterhin konnte für ITSN1 gezeigt werden, das eine seiner SH3-Domänen mit dem Ras-Austauschfaktor mSos1 interagiert und somit einen wichtigen Teil des Signaltransduktionsweges der Mitogenese darstellt (MOHNEY, 2003).
Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Humane Herpesvirus 8, welches mit verschiedenen Tumoren assoziiert ist, u. a. dem Kaposi-Sarkom, mit seinem Protein K15 über die SH3-Domäne mit ITSN2 agiert (LIM, 2007). Dies konnte in vivo bestätigt werden. Ob hier die Spleissvarianten von Exon 26 oder Exon 18 eine Rolle spielen, muss weiter untersucht werden.
Aufgrund der hohen Homologie zwischen ITSN1 und 2 sind ähnliche Funktionen denkbar, nach weiteren Bindungspartnern, ähnlich, wie sie bereits für ITSN1 gefunden wurden, bleibt also zu suchen.

5.3.3 Exon 18

Eine bereits bekannte Spleissvariante, Exon 18 betreffend und bereits von Pucharcos et al. 2001 beschrieben, konnte von uns ebenfalls detektiert werden. Exon 18 erstreckt sich über die erste SH3-Domäne, sowie über einen Teil der coiled-coil-Region. In der Expressionsanalyse zeigte sich kein Unterschied in der Verbreitung zwischen den unterschiedlichen Gewebetypen noch in normalem Lungengewebe sowie in Lungentumorgewebe. Da auch hier ebenso wie bei Exon 26, wenn auch nur teilweise, eine SH3-Domäne betroffen ist, könnte aus dem Spleissen dieses Exons ebenfalls eine Funktionsänderung resultieren. Dies könnte auch im Hinblick auf eine Änderung im Bereich der coiled-coil-Region der Fall sein. Für diese Domäne konnte eine Interaktion mit SNAP23 und SNAP25 bei ITSN1

nachgewiesen werden, ebenfalls Endozytose-assoziierte Proteine (JENNA 2002, WANG, 2005).

5.3.4 Exon 16

Interessante Ergebnisse im Unterschied zu den Varianten 7, 18 und 26 konnten für die Spleissvariante des Exon 16 gezeigt werden. Bemerkenswert ist, dass das komplette ITSN2- Transkript, welches alle Exons beinhaltet, nicht die hauptsächlich exprimierte Isoform darstellt. In Expressionanalysen zeigt sich, dass fast ausnahmslos die das Exon 16 aussparende Variante als Hauptform von ITSN2 gebildet wird. ITSN2C mit Exon 16 kann somit als Minorspleissvariante bezeichnet werden.

Auffallend ist im Hinblick auf oben Genanntes die verhältnissmässig starke Expression von ITSN2C in gesundem Hirngewebe. Diese „eigentliche“ Minorspleissvariante scheint somit die Hauptexpressionsform in gesundem Hirngewebe darzustellen, wohingegen sie in den anderen Organen lediglich als Minorspleissvariante auftritt. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Minorspleissvariante eine hirnspezifische Funktion trägt (GUIPPONI M, 1998).
In isolierter RNA von Hirntumoren konnte im Unterschied zu gesundem Hirngewebe ITSN2C nicht detektiert werden. Das Fehlen dieser Variante konnte in weiteren Untersuchungen ebenfalls in primären Hirntumorzelllinien sowie Zelllinien nach SCID-Maus-Passage als auch in unkultiviertem Hirngewebe nachgewiesen werden.
Oligodendrogliome zählen zu den Hirntumoren, bei welchen die Gliazellen entarten. Diese Zellen sind Verbindungszellen zwischen den einzelnen Neuronen, sie bilden das sogenannte „Stützgewebe“ des Gehirns. Somit sind sie primär nicht neuronalen Ursprungs. Die gewebespezifische Überexprimierung dieser Minorspleissvariante könnte also für eine spezifische neuronale Expression von ITSN2C sprechen. Dies konnte bereits in Expressionsmodellen am unreifen Mausgehirn durch Pucharcos 2001 gezeigt werden. In seiner Arbeit zeigte sich, dass ITSN 2 nur in differenzierten Zellen exprimiert, ITSN 1 hingegen in proliferierenden und differenzierten Zellen exprimiert wird.

Ebenfalls ist denkbar, dass es in Oligodendrogliomen im Rahmen der Tumorgenese zu einem Verlust der ITSN2C-Expression im Gegensatz zu gesunden Gliazellen kommt.
Weiterhin könnte die Überexpression von ITSN2C in neuronalen Zellen und insbesondere Gliazellen auf eine physiologische Rolle dieser Minorspleissvariante hinweisen.
In zukünftigen Arbeiten könnte z. B. mit Hilfe der in-situ-Hybridisierung an Gewebeschnitten an Mausgehirn gezeigt werden, ob die Expression dieser Minorspleissvariante wirklich neuronenspezifisch ist, was aufgrund der aktuellen Datenlage sehr wahrscheinlich ist. Allerdings beinhalten fast alle Gewebe in geringem Masse auch Neuronen, was erklären könnte, warum die Variante bislang in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden konnte. Interessant im Hinblick darauf wäre z.B. eine Überprüfung an Blutzellen, welche keine Neuronen enthalten. Molekularbiologische Untersuchungen könnten folgen, in welchen man die zelluläre Lokalisation der überexprimierten Variante untersucht, um zu zeigen, ob es sich tatsächlich um eine Transmembrandomäne handelt. Eine andere Alternative wäre es, unterschiedliche Fraktionen der Zelle zu isolieren und anschliessend zu überprüfen, ob die Membranfraktion eine überdurchschnittlich grosse Menge der überexprimierten Form enthält.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit dafür, dass mit ITSN2 und insbesondere ITSN2C ein vielleicht wichtiger Faktor der Proteininteraktion und/ oder Tumorgenese in neuronalem Gewebe gefunden werden konnte. In weiteren Arbeiten sollte nun die physiologische Rolle dieser Spleissvarianten überprüft werden. Beispielsweise könnten diese Spleissvarianten Proteindomänen betreffen, die funktionelle Aufgaben im Rahmen der Protein-Protein-Interaktion übernehmen und somit Zellfunktionen beeinflussen. Dies konnte bereits für viele andere Endozytoseproteine, wie z.B. Dynamin, gezeigt werden (MC NIVEN, 2000).

5.4 Interectin 2 und Signaltransduktion in T-Zellen

Im Rahmen der Erforschung der Signaltransduktion bei T-Zellen konnte ITSN 2 ebenfalls in Zusammenhang mit den endozytotischen Vorgängen bei der Internalisierung des aktivierten T-Zell-Rezeptors gebracht werden (MCGAVIN, 2001, NISHIMURA, 2006).
Dem an diesem Vorgang in T-Zellen massgeblich beteiligten WASp-Protein (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein), welches mit Rho-GTPasen interagiert, konnte ebenfalls eine Verbindung mit ITSN2 nachgewiesen werden. Eine Überexpression von ITSN2 in Cos-7 Zellen führte zu einer Anreicherung von WASp-Proteinen in endozytotischen Vesikeln. Weiterhin konnte für ITSN2 eine Aktivierung der cdc42-Rho-GTPase gezeigt werden. Hieran massgeblich beteiligt scheint die DH-Dömäne zu dein, da Formen von ITSN2 ohne DH-Dömäne diese Funktion nicht zeigen (HUSSAIN, 2001).
Eine neuere Arbeit konnte die regulierende Rolle der langen Isoform von ITSN2 als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für die cdc42-Rho-GTPasen bestätigen (KLEIN, 2009). Mittels Immunpräzipitation wurde eine Beteiligung von ITSN2 bei der Aktinpolymerisation endothelialer Zellen des Cdc42-WASp-Arp2/3-Signaltransduktionsweges nachgewiesen, massgeblich beteiligt war hier wie bereits von HUSSAIN gezeigt die DH-PH-Domäne.

5.5 Intersectine und M. Alzheimer

Eine neue interessante Verbindung der Intersectine wurde in einer Arbeit von Keating et al. postuliert. Für die Entstehung des M. Alzheimer, über welche bis dato nur wenig bekannt ist, wurde eine Verbindung mit dem Down-Syndrom postuliert, da Individuen mit dieser Erkrankung häufig im Alter von ca. 40 Jahren an einem M. Alzheimer erkranken. Eine Verbindung zwischen beide Erkrankungen könnte der Genlocus auf Chromosom 21 darstellen, wo gestörte endosomale oder endozytotische Vorgänge zu den typischen Amyloidplaques-Ablagerungen führen. Verschiedentlich konnte bereits eine Überexpression von ITSN1 beim Down-Syndrom gezeigt werden (KELLY, 2005, KEATING 2006). Eine direkte Verbindung zwischen ITSN und M. Alzheimer in Verbindung mit gestörten endozytotischen

Vorgängen gerade in neuronale Zellen ist durchaus denkbar und derzeit Gegenstand einiger Forschungsprojekte.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams A, Thorn JM, Yamabhai M, Kay BK, O´Bryan JP (2000) Intersectin, an adaptor protein involved in clathrin-mediated endocytosis, activates mitogenic signalling pathways. J Biol Chem 275: 27414-20

2. Alfred Jane (Okt. 2001) Myotonic dystrophy comes into focus, Nature Reviews Genetics Bd. 2, S. 736

3. Bogdahn U (1983) Chemosensitivity of malignant human brain tumors. Preliminary results. Neurooncol. 2: S. 149- 166.

4. Caceras JF, Kornblihtt AR, (Apr. 2002) Alternative splicing: Multiple control mechanisms and involvement in human disease. Trends in Genetics Vol. 18, S. 186 - 192

5. Dierssen M, Marti E, Pucharcos C, Fotaki V, Altafaj X, Casas K, Solans A, Arbones ML, Fillat C, Estivill X (2001) Funtional genomics of Down syndrome: a multidisciplinary approach. J Neural Transm Suppl. 61: 131-148

6. Elhamdani A, Azizi F, Solohmaha E, Palfrey HC, Artalejo CR (2006) Two mechanistically distinct forms of endocytosis in adrenal chromaffin cells: Differential effects of SH3 domains and amphiphysin antagonism. FEBS Letters 580: 3263-3269

7. Evergren E, Zotova E, Brodin L, Shupliakov O (2006) Differential efficiency of the endocytic machinery in tonic and phasic synapses. Neuroscience 141: 123-131

8. Evergren E, Gad H, Walther K, Sundborger A, Tomilin N, Shupliakov O (2007) Intersectin is a negative regulator of dynamin recruitment to the synaptic endocytic zone in the central synapse. Neuroscience 27 (2): 379-390

9. Fuentes JJ, Dierssen M, Pucharcós C, Fillat C, Casas C, Estivill X, Pritchard M (1999) Application of Alu-splice PCR on chromosome 21: DSCR1 and Intersectin. J Neural Transm Suppl. 57:337-52.

10. Graveley BR (2001) Alternative splicing: increasing diversity in the proteom.ic world. Trends in Genetics. Bd. 17 S.100-107

11. Guipponi M, Scott HS, Chen H, Schebesta A, Rossier C, Antonarakis SE (1998) Two isoforms of a human intersectin (ITSN) protein are produced by brain-specific alternative splicing in a stop codon. Genomics 53: 369-376

12. Henne WM, Boucrot E, Meinecke M, Evergren E, Vallis Y, Mittal R, McMahon HT (2010) FCHo Proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. Science (Epub ahead of print)

13. Hennig W (1998) Genetik. Springer, Berlin Heidelberg New York

14. Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH (2002) Clinical impact and functional aspects of tenascin C-expression during glioma progression. Int J Cancer 98:362-3699

15. Hussain NK, Jenna S, Glogauer M, Quinn CC, Wasiak S, Guipponi M, Antonarakis SE, Kay BK, Stossel TP, Lamarche-Vane N, McPherson PS (2001) Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. Nat Cell Biol 3:927-932

16. Hsu T (2006) Endocytic function of Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates surface localization of FGF receptor 1 and cell motility. Journal of Bio Chem

17. Irie F, Yamaguchi Y (2002) EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. Nat. Neurosci 5: 1117-8

18. Jenna S, Hussain NK, Danek EI, Triki I, Wasiak S, McPherson PS, Lamarche-Vane N (2002) The activity of the GTPase–activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein intersectin. J Biol Chem 277: 6366-6373

19. Keating DJ, Chen C, Pritchard MA (2006) Alzheimer´s disease and endocytic dysfunction: Clues from the Down syndrome-related proteins, DSCR1 and ITSN1. Ageing Res Rev. 25

20. Kelly LE, Phillips AM (2005) Molecular and genetic characterization of the interactions between the Drosophila stoned-B protein and DAP-160 (intersectin). Biochem J. 388: 195-204

21. Klein IK, Predescu DN, Sharma T, Knezevic I, Malik AB, Predescu S (2009) Intersectin -2L regulates caveola endocytosis secondary to Cdc42-mediated actin polymerization. J Biol Chem 284 (38): 25953-61

22. Knippers R (1997) Molekulare Genetik. Thieme, Stuttgart

23. Koh TW, Verstreken P, Bellen HJ (2004) DAP160/ intersectin acts as a stabilizing scaffold required for synaptic development and vesicle endocytosis. Neuron 43: 193-205

24. Lee C (2001), The incredible shrinking human genome, Trends in Genetics, Bd.17, S. 187-188

25. Lim CS, Seet BT, Ingham RJ, Gish G, Matskova L, Winberg G, Ernberg I, Pawson T (2007) The K15 protein of Kaposi´s sarcoma-associated herpesvirus recruits the endocytic regulator intersectin 2 through a selective SH3 domain interaction. Biochemistry 46 (35): 9874-85

26. Löffler G, Petrides PE (1998) Biochemie und Pathobiochemie. Springer, Berlin Heidelberg New York

27. Lottspeich F, Zorbas H (1998) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin

28. Ma YJ, Okamoto M, Gu F, Obata K, Matsuyama T, Desaki J, Tanaka J, Sakanaka M (2003) Neuronal distribution of EHSH1/ intersectin: molecular linker between clathrin-mediated endocytosis and signalling pathways. J Neurosci Res 71: 468-477

29. Marie B, Sweeney ST, Poskanzer ST, Roos J, Kelly RB, Davis GW (2004) DAP160/ intersectin scaffolds the periactive zone to achieve high-fidelity endocytosis and normal synaptic growth. Neuron 43: 207-219

30. McGavin M, Badour K, Hardy LA, Kubiseski TJ, Zhang J, Siminovitch KA (2001) The Intersectin 2 Adaptor Links Wiskott Aldrich Syndrome Protein (WASp)-mediated actin polymerization to T Cell Antigen Receptor Endocytosis. J. Exp. Med.194: 1777-1787

31. McNiven The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places.
MA, Cao H, Pitts KR, Yoon Y (2000). Trends Biochem Sci, 25(3):115-20

32. McPherson PS (2002) The endocytic machinery at an interface with the actin cytoskeleton: a dynamic, hip intersection. Trends Cell Biol 12: 312-315

33. Michel H (1999) Die Sequenzierung des Humangenoms – aufs falsche Pferd gesetzt? Biospektrum 1/99: 4-5

34. Mohney RP, Das M, Bivona TG, Hanes R, Adams AG, Philips MR, O´Bryan JP (2003) Intersectin activates Ras but stimulates transcription through an independent pathway involving JNK. J Biol Chem. 278: 47038-47045

35. Montesinos ML, Castellano-Munoz M, Garcia-Junco-Clemente P, Fernandez-Chacon R (2005) Recycling and EH domain proteins at the synapse. Brain Res Rev.49: 416-428

36. Newton CR, Graham A (1994) PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford

37. Nishimura T, Yamaguchi T, Tokunaga A, Hara A, Hamaguchi T, Kato K, Iwamatsu A, Okano H, Kaibuchi K (2006) Role of numb in dendritic spine development with a Cdc42 GEF intersectin and EphB2. Mol Biol Cell.17: 1273-1285

38. O`Bryan JP, Mohney RP, Oldham CE (2001) Mitogenesis and endocytosis: What´s at the INTERSECTIoN. Oncogene 20: 6300-6308

39. O´Donovan C, Apweiler R, Bairoch A (2001) The human proteomics initiative (HPI). Trends in Biotechnology. 19: 178-18

40. Orban TI, Olah E (2001), Purifying selection on silent sites – a constraint from splicing regulation?, Trends in Genetics, Bd. 17, S. 252-253

41. Porter DC, Keyomarsi K (2000), Novel splice variants of cyclin E with altered substrate specificity, Nucl. Ac. Res. Vol. 28 No. 23

42. Predescu SA, Predescu DN, Timblin BK, Stan RV, Malik AB (2003) Intersectin regulates fission and internalization of caveolae in endothelial cells. Mol Biol Cell.14: 4997-5010

43. Pruitt WM, Karnoub AE, Rakauskas AC, Guipponi M, Antonarakis SE, Kurakin A, Kay BK, Sondek J, Siderovski DP, Der CJ (2003) Role of pleckstrin homology domain in intersectin-L Dbl homology domain activation of Cdc42 and signalling. Biochem Biophys Acta 1640: 61-68

44. Pucharcos C, Estivill X, De La Luna S (2000) Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis. FEBS Letters 478: 43-51

45. Pucharcos C, Casas C, Nadal M, Estivill X, De La Luna S (2001) The human intersectin genes and their spliced variants are differentially expressed. Biochemica et Biophysica Acta 1521: 1-11

46. Pytel P, Lukas RV (2009) Update on diagnostic practice: tumors of the nervous system. Arch Pathol Lab Med, 133 (7):1062-1077

47. Riede U, Schaefer H. Allgemeine und spezielle Pathologie (1999). Thieme, Stuttgart

48. Seyffert W, Gassen HG, Hess O, Jäckle H, Fischbach KF (eds) (1998) Lehrbuch der Genetik. Fischer, Stuttgart Jena Lübeck Ulm

49. Skripkina IA, Tsyba LA, Slavov D, Gardiner K, Rynditch AV (2002) New forms of gene transcripts in human and mouse intersectin. Ukr Biokhim Zh. 74: 33-43

50. Smith WJ, Hamel B, Yohe ME, Sondek J, Cerione RA, Snyder JT (2005) A Cdc42 mutant specifically activated by intersectin. Biochemistry 44: 13282-13290

51. Tong XK, Hussain NK, Adams AG, O´Bryan JP, McPherson PS (2000) Intersectin can regulate the Ras/MAP kinase pathway independent of its role in endocytosis. J Biol Chem 275: 29894-29899

52. Tong XK, Hussain NK, de Heuvel E, Kurakin A, Abi-Jaoude E, Quinn CC Olson MF, Marais R, Baranes D, Kay BK, McPherson PS (2000) The endocytic protein intersectin is a major binding partner for the Ras exchange factor mSos1 in rat brain. EMBO J 19: 1263-1271

53. Tsyba L, Skrypkina I, Rynditch A, Nikolaienko O, Ferenets G, Fortna A, Gardiner K (2004) Alternative splicing of mammalian Intersectin 1: domain associations and tissue specificities. Genomics 84: 106-113

54. Wang JB, Wu WJ, Cerione RA (2005) Cdc42 and Ras cooperate to mediate cellular transformation by intersectin-L. J Biol Chem 280: 22883-22891

55. Zamanian JL, Kelly RB (2003) Intersectin 1L guanine nucleotide exchange activity is regulated by adjacent src homology 3 domains that are also involved in endocytosis. Mol Biol Cell.14: 1624-1637

56. www. Krebsgesellschaft.de
57. www.genecards.org

7. Publikationen

Seifert M, Ampofo C, Mehraein Y, Reichrath J, Welter C (2007) Expression analysis of human intersectin 2 gene (ITSN2) minor splice variants showing differential expression in normal human brain. Oncology reports 17: 1207-1211

8. Danksagung

Danken möchte ich an dieser Stelle allen denjenigen, die mich während meines Studiums und dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.
Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Cornelius Welter und Dr. rer. nat. Markus Seifert für die Ermöglichung dieser Arbeit, für die Durchführung der Experimente, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die wissenschaftliche Unterstützung und nicht zuletzt für das angenehme Klima im Labor. Mit all dem haben sie mir die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht.

Mein aufrichtiger Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie, die mich immer wieder in allen Bereichen motiviert und unterstützt hat, dieses Studium durchzuführen, als Ärztin tätig zu sein und meine Doktorarbeit zu vollenden.

8. Curriculum vitae

Geburtsdatum/- ort	08.11.1978 in Quierschied
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch
Adresse	Lehenstrasse 64
	8037 Zürich / Schweiz

Schullaufbahn

1985 - 1989	Grundschule Niederbexbach
1989 - 1998	Gymnasium Johanneum Homburg

Studium

10/1998 - 05/2005	Medizinstudium an der Universität des Saarlandes
09/2000	Physikum
04/2002	1. Staatsexamen
03/2004	2. Staatsexamen
05/2005	3. Staatsexamen

Famulaturen

Allgemeinmedizin	Praxis Dr. med. J. Ampofo, Oberbexbach (2001)
Chirurgie	Henry Ford Hospital, Detroit, USA (2002)
Gynäkologie/Geburtshilfe	Universitätsklinikum Homburg (2002)
Humangenetische Ambulanz	Universitätsklinikum Homburg (2003)

Praktisches Jahr

Innere Medizin	Klinikum Winterberg, Saarbrücken
Gynäkologie	Spital Lachen, Schweiz
Chirurgie	Klinikum Winterberg, Saarbrücken

Beruf

06/2005 – 11/2009	Assistenzärztin der Chirurgischen Klinik Kantonsspital Münsterlingen / Schweiz
12/2009 – 03/2010	Assistenzärztin der Chirurgischen Klinik Spital Limmattal, 8952 Schlieren / Schweiz
04/2010	Facharztprüfung Allgemeine Chirurgie
seit 6/2010	Oberärztin der Chirurgischen Klinik Kantonsspital Münsterlingen / Schweiz