

Biochemie

**Der Einfluss nutritiver Lipide auf die differentielle Genexpression in humanen
Monozyten und Zellkulturmodellen –
Untersuchungen mit DNA-Chips und quantitativer PCR**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Silke Flotho

aus
Münster

-2005-

Dekan:	Prof. Dr. B. Wunsch
Erster Gutachter:	Prof. Dr. F. Spener
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. K. H. Klempnauer
Tag der mündlichen Prüfung:	21. Juli 2005
Tag der Promotion:	21. Juli 2005

Inhalt

1	Abkürzungen	8
2	Zusammenfassung	10
3	Einleitung	13
3.1	DNA-Chip-Technologie	13
3.1.1	Hybridisierung	14
3.1.2	Zweifارben-Experimente zur Analyse der differentiellen Genexpression.....	15
3.2	Fettsäuren als Regulatoren der Genexpression	19
3.2.1	Konjugierte Linolsäuren.....	19
3.2.2	Verzweigkettige Fettsäuren.....	21
3.3	Peroxisomen Proliferator aktivierte Rezeptoren	22
3.4	Fettsäurebindungsproteine	24
3.5	Monozyten und Makrophagen	26
4	Ziele der Arbeit	28
5	Material und Methoden	29
5.1	Chemikalien und Geräte	29
5.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	29
5.1.2	Geräte und Materialien.....	31
5.1.3	Puffer und Lösungen	33
5.1.4	Primer und Sonden	35
5.2	Molekularbiologische Methoden	38
5.2.1	Isolierung der Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien	38
5.2.2	Qualitätskontrolle der RNA.....	39
5.2.3	Analyse der RNA mittels des „Agilent 2100 Bioanalyzers“.....	39
5.2.4	cDNA Erststrang-Synthese mittels reverser Transkription	42
5.2.5	Quantitative Echtzeit-RT-PCR.....	42
5.3	DNA-Chips	46
5.3.1	Aktivierung der Chipoberfläche	46
5.3.2	Immobilisierung der Fangsonden auf der aktivierten Chipoberfläche	47
5.3.3	Qualitätskontrolle des Immobilisierungsvorgangs	49
5.3.4	Markierung der Ziel-DNA.....	50
5.3.5	Hybridisierung	56
5.3.6	Analyse der Chips	57
5.3.7	Auswertung der Hybridisierungsbilder.....	57
5.4	Zellkultur und zellbiologische Methoden	59
5.4.1	Mediumwechsel und Passagieren der Zellen.....	59
5.4.2	Differenzierung der THP-1-Zellen	60
5.4.3	Fütterungsexperimente und Zellernte	60
5.4.4	Lagerung der Zellen	60

5.4.5	Durchführung der Interventionsstudie	60
5.4.6	Isolierung der humanen Monozyten aus Vollblut	62
6	Etablierung der DNA-Chip-Analytik mit Hilfe kommerzieller Mitteldichte- und Hochdichte-DNA-Chips	64
6.1	Untersuchungen mit Mitteldichte-DNA-Chips	65
6.1.1	Hybridisierung eines Mitteldichte-Chips mit Cy5-dUTP-markierter cDNA aus HepG2-Zellen	65
6.1.2	Einfluss der cDNA-Menge auf die Hybridisierung	70
6.1.3	Hybridisierung eines Mitteldichte-Chips mit Amino-allyl-dUTP-markierter cDNA aus HepG2-Zellen	72
6.1.4	Zweifarb-Experimente mit Mitteldichte-Chips	75
6.2	Untersuchungen mit den „PAN [®] Human 10k Array“ Hochdichte-DNA-Chips	78
7	Evaluierung der Niedrigdichte-DNA-Chips für die Expressions-Analytik	83
7.1	Optimierung der Sondenkonzentration	84
7.2	Auswahl geeigneter Sonden	85
7.3	Überprüfung der Immobilisierung	86
7.4	Optimierung der Hybridisierungsparameter	88
7.4.1	Hybridisierungspuffer	88
7.4.2	Formamidgehalt und Salzkonzentration	90
7.5	Vergleich der Hybridisierung unter dem Deckglas und mit einem Hybridisierungsrahmen	91
7.6	Niedrigdichte-Chips für die Analyse von cDNA aus Zellkulturproben	93
7.6.1	Test-Chips für die neuen Sonden	94
7.6.2	Erste Niedrigdichte-Chips zur weiteren Charakterisierung der Sonden	95
7.7	Erstellung von Expressionsprofilen mit Niedrigdichte-Chips	99
7.7.1	Expressionsprofil der HepG2-Zellen	99
7.7.2	Expressionsprofil der THP-1-Zellen	101
7.7.3	Zweifarb-Experimente auf Niedrigdichte-Chips	103
7.8	Etablierung kommerzieller Epoxy-aktivierter Objektträger	104
8	Untersuchungen des Einflusses der Fettsäureagonisten auf die differentielle Genexpression in Zellkulturen	107
8.1	Untersuchungen in HepG2-Zellen	107
8.1.1	Primervalidierung und Aufnahme des Expressionsprofils	107
8.1.2	Einfluss der Fettsäuren	109
8.2	Untersuchungen in THP-1-Zellen	112
8.2.1	Primervalidierung und Aufnahme des Expressionsprofils	113
8.2.2	Optimierung der Inkubationszeiten	115
8.3	Differenzierte THP-1-Zellen als Modell für humane Makrophagen	115
8.3.1	Expressionsprofil der unbehandelten THP-1-Makrophagen	115

8.3.2	Optimierung der Differenzierungs- und Inkubationszeiten	116
8.3.3	Einfluss der Fettsäuren	117
8.3.4	Untersuchungen mit Hochdichte-Chips	122
8.3.5	Identifizierung neuer Markergene.....	125
9	Identifizierung nutritiver Markergene für die Wirkung der 11<i>trans</i>-Vaccensäure in humanen Monozyten	128
9.1	Isolierung der Monozyten und Charakterisierung der Genexpression.....	128
9.1.1	Auswahl geeigneter Zielgene für die q-RT-PCR	129
9.2	Identifizierung der nutritiven Markergene.....	130
9.2.1	Expressionsprofil und differentiell regulierte Gene in den weiblichen Gruppen.....	132
9.2.2	Expressionsprofile und differentiell regulierte Gene in den männlichen Gruppen	137
10	Diskussion	142
10.1	Etablierung der DNA-Chip-Technologie mit kommerziellen DNA-Chips	142
10.1.1	Nachweisgrenze, Spezifität und Sondendesign	142
10.1.2	Variabilität und Reproduzierbarkeit	145
10.1.3	Zweifارben-Experimente	146
10.2	Evaluierung der Niedrigdichte-DNA-Chips	148
10.2.1	Sondenkonzentration, -struktur und Hybridisierungseffizienz	148
10.2.2	Hybridisierungsparameter Stringenz	149
10.2.3	Erstellung von Expressionsprofilen mit Niedrigdichte-DNA-Chips	151
10.3	Regulation der Gene des Lipid- und Glukosestoffwechsels in immortalisierten Zellkulturen.....	152
10.3.1	Wirkung der Fettsäuren in den HepG2-Zellen.....	153
10.3.2	Wirkung der Fettsäuren in THP-1-Makrophagen	156
10.3.3	Die Rolle des A-FABP in Makrophagen	160
10.3.4	Die Rolle des CD36/FAT in Makrophagen	161
10.3.5	Die Rolle der verzweigt-kettigen Fettsäuren in THP-1-Makrophagen	162
10.3.6	Identifizierung neuer Markergene mit Hilfe der Hochdichte-DNA-Chips	162
10.4	Identifizierung nutritiver Markergene für die Wirkung der 11 <i>trans</i> -Vaccensäure in humanen Monozyten	164
11	Literatur	166
12	Anhang	178
12.1	Zielgene.....	178
12.2	Reprimierte Gene, identifiziert mit Hilfe des Hochdichte-Chips	185

1 Abkürzungen

AA	Acrylamid
aa	Amino-allyl
Abb.	Abbildung
ACAA1	Acetyl-CoA Acyltransferase 1
ACBP	Acyl-CoA Bindungsprotein
ACOX	Acyl-CoA Oxidase
ApoE	Apolipoprotein E
ARA	Arabidopsis
β -ACT	β -Actin
BCFA	verzweigt-kettige Fettsäuren (<i>branched-chain fatty acids</i>)
BCL2	Onkogen B-Cell Leukämie 2
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CASP9	Caspase 9
CD14	CD14 Antigen
CD36/FAT	CD36 Antigen, Fettsäuretranslokase
CLA	konjugierte Linolsäure (<i>conjugated linoleic acid</i>)
COX2	Cyclooxygenase 2
CRABP	zelluläres Retinsäurebindungsprotein (<i>cellular retinoic acid binding protein</i>)
C_t	Schwellenwertzyklus (<i>threshold cycle</i>)
CYP4A11	Cytochrom P450, Subfamilie IV A, Polypeptid 11
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FABP	Fettsäurebindungsprotein (<i>fatty acid binding protein</i>)
FAS	Fettsäuresynthase (<i>fatty acid synthase</i>)
FATP	Fettsäuretransportprotein (<i>fatty acid transport protein</i>)
FKS	Fötales Kälberserum
GAL	β -Galaktosidase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GCK	Glukokinase
GLUT	Glukose Transporter
GSR	Glutathion Reduktase
h	human
HADHB	mitochondriales trifunktionelles Protein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HNF4 α	Hepatischer Kernfaktor 4 α (<i>hepatic nuclear factor</i>)
I-BABP	intestinales Gallensäurebindungsprotein (<i>intestinal bile acid binding protein</i>)
iLBP	intrazelluläres Fettsäurebindungsprotein (<i>intracellular fatty acid binding protein</i>)
invA	Invasionsgen A (<i>Salmonella</i>)
Kap.	Kapitel
kb	kilobasen
konz.	konzentriert
LPL	Lipoprotein Lipase
LUC	Luciferase
LXR	Leber-X-Rezeptor
ME3	mitochondriales Malat-Enzym

MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBE	peroxisomales bifunktionelles Protein
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCNA	engl. <i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PHY	Phytansäure
PM	Positionsmarker
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP	Polypropylen
PPAR	Peroxisomen Proliferator aktivierter Rezeptor
PRI	Pristansäure
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2 = COX2
q-RT-PCR	quantitative Echtzeit-RT-PCR
RAR	Retinsäure Rezeptor
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPS27A	Ribosomales Protein S27a
RT	Reverse Transkription
RXR	Retinsäure-X-Rezeptor
SCD	Stearoyl-CoA-Desaturase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Einzelbasen-Polymorphismus
SREB	engl. <i>sterol regulatory element binding proteins</i>
ss	einzelsträngig
SSC	Citratpuffer
TAE-Puffer	Tris-Acetat Puffer mit EDTA
TBE	Tris-Puffer mit EDTA
TIGR	The institute for genomic research
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminoethan
tVA	11 <i>trans</i> -Vaccensäure
UCP2	engl. <i>Uncoupling Protein 2</i>
(v/v)	Volumenanteil (<i>volume per volume</i>)
(w/v)	Massenanteil (<i>weight per volume</i>)

2 Zusammenfassung

Neben den Aufgaben als zelluläre Energiesubstrate und Bausteine für Membranlipide wirken Fettsäuren auch als Signalmoleküle innerhalb verschiedener Signaltransduktionswege. In vorangegangenen Arbeiten konnte ein Mechanismus aufgezeigt werden, nach welchem die Fettsäure durch ein Fettsäurebindungsprotein (FABP) zum Zellkern transportiert und dort über Protein-Protein Wechselwirkung auf die Peroxisomen Proliferatoren aktivierten Rezeptoren (PPARs) übertragen wird. Die PPARs treten dann als Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung mit spezifischen Erkennungselementen (PPAR *responsive elements*, PPREs) in den Promotoren der entsprechenden Zielgene und können so die Expression dieser Gene regulieren.

In Studien sowohl an Nagern und am Menschen zeigen die Isomeren der konjugierten Linolsäure (9*cis*,11*trans*-, 10*trans*,12*cis*-CLA), die Minorbestandteile der Nahrung sind, eine Vielzahl positiver Effekte (z.B. anticancerogen, antiatherogen, immunmodulierend). Es wird angenommen, dass die CLAs über den PPAR-Signalweg wirken, da sie als Aktivatoren der PPARs identifiziert wurden. In unserem Arbeitskreis konnte dies durch Bindungsstudien und Reporterassays bestätigt werden. Ebenso wurden die vom Chlorophyll abgeleiteten und ebenfalls in der Nahrung vorkommenden verzweigt-kettigen Fettsäuren, Phytan- und Pristansäure, als Aktivatoren der PPARs verifiziert, über ihre Wirkung auf die Genexpression *in vivo* ist wenig bekannt. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, welchen Einfluss die CLAs und deren Vorstufe 11*trans*-Vaccensäure (tVA) sowie die Phytan- und Pristansäure auf die Genexpression haben mit dem Ziel, hierfür nutritive Markergene zu identifizieren. Dazu wurde die Hepatoma-Zelllinie HepG2 und die monozytische und Makrophagen-Zelllinie THP-1 mit diesen Fettsäuren inkubiert und die Genexpression anhand der isolierten RNA analysiert. Anschließend wurde die Wirkung auf primäre Humanmonozyten untersucht.

Die Analyse der Proben sollte zum einen mit Hilfe der DNA-Chip-Analytik erfolgen. Diese Technik und die zugehörigen Markierungs- und Auswertungsmethoden wurden anhand kommerzieller Mitteldichte- (*medium*-) und Hochdichte- (*high-density*) DNA-Chips erfolgreich etabliert. Letztere wurden anschließend für die Identifizierung neuer nutritiver Markergene für die Pristansäure-vermittelte Genregulation im THP-1-Makrophagenmodell herangezogen. So konnten Adipozyten-Typ (A)-FABP, die Fettsäure Translokase (FAT), auch Scavenger-Rezeptor CD36, und der *platelet derived growth factor receptor* α als Markergene identifiziert werden.

Darüberhinaus erfolgte die Entwicklung und Evaluierung eines Niedrigdichte- (*low-density*) DNA-Chips zur Untersuchung ausgewählter Zielgene. Dazu wurden auf einer Isothiocyanat-aktivierten Oberfläche eines Glasobjektträgers aminomodifizierte DNA-Fangsonden für diese Gene immobilisiert. Nach umfangreichen Optimierungsarbeiten konnten mit diesen DNA-Chips erste Expressionsprofile ausgewählter Zielgene im HepG2- und THP-1-Modell erstellt werden, die mit Hilfe quantitativer Echtzeit-RT-PCR (q-RT-PCR) verifiziert wurden.

Zum anderen wurde die differentielle Regulation ausgewählter Zielgene der humanen Zelllinien nach Stimulierung mit den Fettsäuren mittels q-RT-PCR untersucht. Die induzierende Wirkung der CLAs in HepG2-Zellen war zwar schwach, aber vergleichbar hoch mit der des als Positivkontrolle eingesetzten PPAR-Panagonisten Bezafibrat war. Darüber hinaus wurde nach der Differenzierung der monozytischen THP-1-Zelllinie zu adherenten THP-1-Makrophagen eine induzierende Wirkung der CLAs auf Gene für Fettsäuretransporter nachgewiesen. Dies war jedoch verbunden mit einer Repression der Transkriptionsfaktoren PPAR α , β und γ . Gleiches wurde in diesem Zellkulturmodell für Pristansäure, jedoch nicht für Phytansäure, gefunden. Als Markergene für die Wirkung der Fettsäureagonisten in humanen THP-1-Makrophagen konnten, wie schon mit DNA-Chips gezeigt, A-FABP sowie CD36/FAT identifiziert werden, da für diese Zielgene die höchste Induktion nach Stimulierung mit Pristansäure beobachtet wurde.

Zur Untersuchung der Wirkung der CLAs *in vivo* wurde am Institut für Ernährung an der Universität Jena eine Interventionsstudie mit 24 Probanden durchgeführt. Den Probanden wurde tVA mit der Nahrung verabreicht, die *in vivo* durch die Stearoyl-CoA-Desaturase zu 9*cis*,11*trans*-CLA konvertiert werden kann. Die Kontrollgruppe erhielt ein Placeboöl bestehend aus Palmkern- und Rapsöl. Vor und nach der 6-wöchigen Interventionszeit wurde den Probanden eine Blutprobe entnommen, aus der die Monozyten isoliert wurden. Anhand der RNA aus diesen Monozyten wurde anschließend von mir die differentielle Genregulation ausgewählter Zielgene, getrennt nach Geschlecht der Probanden, mit Hilfe der q-RT-PCR untersucht. Die physiologische Antwort auf die Applikation der Fettsäure war bei Männern und Frauen unterschiedlich. So konnten in den weiblichen Monozyten die Zielgene CD36/FAT, das apoptotische Protein BCL2 und die Cyclooxygenase 2, in den männlichen Monozyten hingegen der Glukostettransporter GLUT4 und der Kernrezeptor PPAR γ als nutritive Markergene für die tVA-vermittelte Genregulation identifiziert werden. Darüberhinaus wurde gefunden, dass das Placeboöl in der weiblichen Kontrollgruppe einen drastischen Einfluss auf die Genexpression ausübte. Der Einfluss der tVA auf die Genexpression in humanen Monozyten ist durch oder nach der Konversion der tVA zu 9*cis*,11*trans*-CLA über den PPAR-Signalweg erklärbar. Die Analyse der Fettsäuren des Blutserums der Probanden

vor und nach der Interventionszeit unterstützt diese Annahme, da die Konversion anhand der Zunahme der *9cis,11trans*-CLA-Konzentration erklärbar war.

3 Einleitung

3.1 DNA-Chip-Technologie

Mit dem Voranschreiten der Sequenzierung ganzer Genome von Bakterien, Pflanzen und Tieren bis hin zum Menschen, konnte sich mit der DNA-Chip-Technologie eine Methode entwickeln, die eine gleichzeitige Identifizierung vieler DNA-Sequenzen in komplexen Nukleinsäuregemischen ermöglichte. Als DNA-Chips werden miniaturisierte Träger bezeichnet, auf deren Oberfläche DNA-Moleküle mit bekannter Sequenz als Fangsonden in einem geordneten Raster (*array*) und in hoher Dichte immobilisiert werden. Sie werden daher auch als DNA-Mikroarrays bezeichnet. Prinzipiell werden zwei Gruppen von Mikroarrays betrachtet, die sich durch die Art ihrer Herstellung unterscheiden. Die erste Gruppe bilden die Arrays, die durch photolithographische *in situ* Synthese von Oligonukleotiden direkt auf der Glasoberfläche entstehen. Diese Methode wird ausschließlich von der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) angewendet. Zur zweiten Gruppe gehören solche Mikroarrays, bei denen auf einer Nitrocellulose-, Nylon-, Plastik- oder Glasoberfläche PCR-Produkte oder Oligonukleotide mechanisch aufgetragen werden (viele Firmen wie MWG Biotech, Clontech). Mit beiden Methoden kann eine Sondendichte in der Größenordnung von 100000 Oligonukleotiden bzw. 10000 PCR-Produkten pro cm² erreicht werden. Solche Hochdichte- (*high-density*) DNA-Chips werden überwiegend zur Analyse von mRNA-Expressionsprofilen herangezogen, um Aussagen über die differentielle Genregulation zu erhalten [1] (Kap. 3.1.2). Darüber hinaus gibt es jedoch noch andere Anwendungsbereiche der DNA-Chiptechnologie, wie die Genotypisierung, die Tumor-, Tierarten- oder die Pathogendifferenzierung [2-5]. Sollen in gezielten Fragestellungen nur besonders aussagekräftige Sequenzen nachgewiesen werden, kommen sogenannte Mitteldichte- (*medium-*) oder Niedrigdichte- (*low-density*) Chips mit bis zu wenigen hundert bzw. unter hundert immobilisierten Sonden zum Einsatz.

Prinzipiell handelt es sich bei der DNA-Chip-Technik um eine Erweiterung der klassischen Hybridisierungsmethoden, wie *Southern-*, *Northern-* oder *Dot-blots*, die schon seit langer Zeit zur Identifizierung und Quantifizierung der Nukleinsäuren in biologischen Proben genutzt werden. Die zu untersuchende Probe wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Cy3 oder Cy5) oder radioaktiv markiert und auf den Mikroarray aufgetragen. Während einer längeren Inkubationsphase hybridisieren die Sonden mit der markierten, komplementären Ziel-DNA in der Probenlösung, und nach einem Waschschriff zur Entfernung ungebundener DNA-Moleküle werden die ange bundenen Fluorophore bzw. radioaktiven Markierungen mit einem Fluoreszenzscanner oder autoradiographisch detektiert (Abb. 3-1). Anhand des erhaltenen

Signalmusters können dann Aussagen über die in der Probe vorhandenen DNA-Sequenzen gemacht werden [1].

3.1.1 Hybridisierung

Die Grundlage der Hybridisierung bildet die Komplementarität der Basen A und T bzw. G und C der DNA, die über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Durch Erhitzen der doppelsträngigen DNA über ihren Schmelzpunkt (T_m), werden die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen aufgetrennt. Ein anschließendes Abkühlen eines solchen Gemisches aus Einzelsträngen führt zu einer Hybridisierung der Einzelstränge und erneuter Ausbildung der Doppelhelix. Die Spezifität der Hybridisierung hängt dabei von der Stabilität des gebildeten Hybrids ab, die direkt mit seinem Schmelzpunkt korreliert. Dieser ist definiert als die Temperatur, bei der die Helixstruktur zur Hälfte verloren gegangen ist [6]. Sie ist für jede doppelsträngige DNA-Sequenz charakteristisch und vom GC-Gehalt, der Sequenzlänge, der Salzkonzentration, dem pH-Wert und dem Formamidgehalt im Hybridisierungspuffer abhängig. Zur Berechnung des T_m -Wertes der DNA-DNA-Hybride gilt in erster Näherung die Formel

$$T_m = 81,5 \text{ °C} + 16,6 \log[c(\text{Na}^+)] + 0,41(\% \text{ GC}) - \frac{500}{n} \quad (\text{Gl.1})$$

Dabei ist $c(\text{Na}^+)$ die Salzkonzentration und n die Länge der hybridisierenden Sequenz in Basenpaaren. Für eine Sequenz mit einer Länge über 100 bp entfällt der Ausdruck $500/n$. Die Gleichung 1 ist ein Beispiel der zahlreichen in der Literatur beschriebenen Formeln zur Berechnung des T_m -Wertes doppelsträngiger DNA-Sequenzen [7].

Der Anteil der korrekt gepaarten Basen im gebildeten DNA-DNA-Hybrid und damit die Spezifität der Hybridisierung, ist von der Stringenz der Reaktionsbedingungen abhängig, denn nur unter stringenten Bedingungen werden perfekt basengepaarte Nukleinsäurestränge gebildet. Faktoren, durch die die Stringenz beeinflusst wird, sind zum einen die Ionenstärke und das Vorhandensein helixdestabilisierender Substanzen wie z.B. Formamid und zum anderen die Temperatur. Eine ansteigende Konzentration monovalenter Kationen (meistens Na^+) erniedrigt die Stringenz, wobei die Helixstruktur durch die Abschirmung der negativ geladenen Phosphate des Helixrückgrats stabilisiert und so die Schmelztemperatur erhöht wird [8, 9]. Dagegen erhöht ein steigender Formamidanteil in der Lösung die Stringenz, da Formamid die Ausbildung der Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen

hemmt. Dadurch wird die Helixstruktur des Doppelstrangs geschwächt und so der Schmelzpunkt erniedrigt [10]. Bei definierter Formamid- und Ionenstärke der Lösung ist die Temperatur für die Stringenz ausschlaggebend. Durch 1 % Basenfehlpaarungen innerhalb eines Doppelstrangs kann die Schmelztemperatur um 5 °C sinken. Daher wird durch die Wahl genügend hoher Temperaturen nur die Hybridisierung perfekt komplementärer Sequenzen zugelassen. Damit wird sogar die Unterscheidung einzelner Basenfehlpaarungen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) bei Hybridisierungen mit Oligonukleotidsonden möglich, was beispielsweise für den spezifischen Nachweis von Einzelbasen-Genmutationen (z.B. Sichelzell-Anämie) essentiell ist [7, 11, 12].

3.1.2 Zweifarben-Experimente zur Analyse der differentiellen Genexpression

Die Aufnahme von mRNA-Expressionsprofilen (*expression profiling*) ist eins der Haupteinsatzgebiete der DNA-Chip-Technologie, da mit ihr sehr viele Informationen über die Funktion der Gene in Zellen und Geweben erhalten werden können. Mit dieser Methode kann die Expression eines Satzes an Transkripten in einer Testprobe mit dem in einer Kontrollprobe verglichen werden. In der Regel sind dies Zellen gleichen Ursprungs, jedoch in zwei unterschiedlichen physiologischen Zuständen, z.B. Agonist-behandelte Zellen und Kontrolle oder zwei Stadien einer Krankheit. Dazu werden häufig sogenannte Zweifarben-Experimente durchgeführt, die nach Auswahl geeigneter Mikroarrays hinsichtlich der zu untersuchenden Fragestellung oder eventueller Herstellung „maßgeschneiderter“ Arrays in die Schritte Probenahme (Mikrodissektion, Zellernte), RNA-Isolierung und Markierung, Hybridisierung der Probe auf dem Array sowie anschließender Datenaufnahme und Interpretation unterteilt werden können (Abb. 3-1). Während der Markierung, z.B. in einer reversen Transkription, werden die zu vergleichenden Proben getrennt voneinander markiert, in der Regel mit den Fluorophoren Cy3 bzw. Cy5. Die markierten cDNAs werden gemeinsam in Hybridisierungspuffer aufgenommen und auf den selben DNA-Chip aufgetragen. Die unterschiedlich markierten cDNA-Fragmente aus den beiden Proben können nun mit den passenden Fangsonden hybridisieren. Durch Vergleich der beiden Fluoreszenzsignale an einer Sonde kann festgestellt werden, welches Gen in welchem Zustand höher exprimiert ist. In der Auswertungssoftware wird das Verhältnis der cDNAs durch das Übereinanderlegen der beiden Farben Rot, im Fall der Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5, oder Grün, im Fall von Cy3 veranschaulicht. *Spots*, an denen gleiche Mengen Cy3- und Cy5-markierter Ziel-DNA gebunden haben, erscheinen dadurch gelb (Abb 3-1).

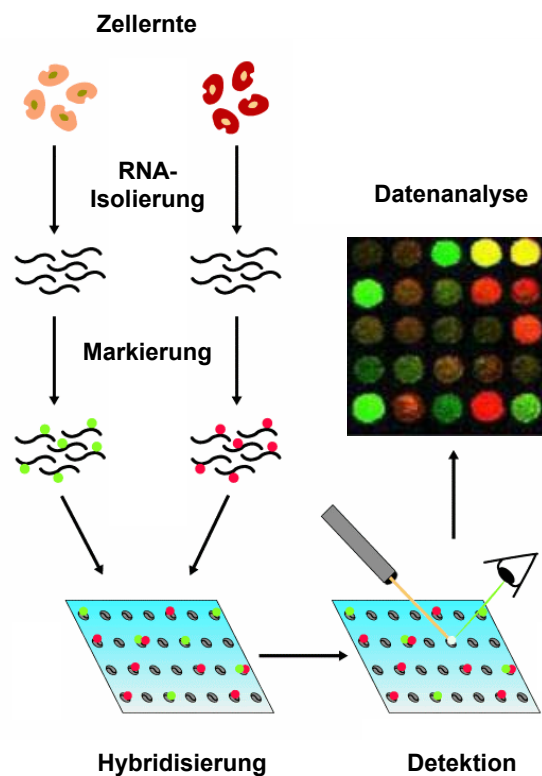


Abb. 3-1: Durchführung eines Zweifarben-Experiments zur Analyse eines RNA-Expressionsprofils (nach www.cs.wustl.edu/~jbuhler//research/array)

Die Auswertung der Signale erfolgt mit speziellen Software-Programmen, in denen ein Raster über die Fluoreszenzbilder gelegt wird, das die Position der Sondenspots spezifiziert (Kap. 5.3.7.2). Anschließend wird die Signal- und die Hintergrundfluoreszenz in einem definierten Bereich um jeden Spot berechnet und in einer Tabelle eines Datenverarbeitungsprogramms ausgegeben. Aus der Fluoreszenz der beiden eingesetzten Farbstoffe kann jedoch nicht direkt auf das Verhältnis der ursprünglichen mRNA-Konzentrationen geschlossen werden, da die eingesetzten Fluorophore unterschiedliche physikalische Eigenschaften besitzen, z.B. unterschiedliche Quantenausbeute oder Einbauraten von Cy3 und Cy5 während der Markierungsreaktion. Deshalb muss vor der weiteren Analyse eine Normierung der Signale durchgeführt werden.

In dieser Arbeit kam die *globale Normierung* zum Einsatz, bei der alle Gene des Array in die Normierung einbezogen werden, weil angenommen wird, dass auf einem Hochdichte-Chip mit einer großen Anzahl von Sonden nur ein kleiner Teil der Gene reguliert wird und die restlichen konstant exprimiert werden. Dazu wird nach der Hintergrundkorrektur aus den Summen der beiden Fluoreszenzsignale über alle Spots das Verhältnis gebildet, wobei hier

dem Cy3 Kanal die Bezeichnung F1 und dem Cy5-Kanal F2 zugeordnet wurde. Entsprechend stehen B1 und B2 für die lokale Hintergrundfluoreszenz des Cy3- bzw. des Cy5-Kanals um jeden Spot. Gleichung 2 verdeutlicht die Berechnung des Normierungsfaktors N.

$$N = \frac{\sum_{i=1}^n (F2Mean_i - B2_i)}{\sum_{i=1}^n (F1Mean_i - B1_i)} \quad (\text{Gl.2})$$

Mit diesem Wert N lässt sich das systematisch geringere Signal (aufgrund der unterschiedlichen Einbaurate) korrigieren. Die so normierten Cy5/Cy3-Verhältnisse $F2_i / F1_i^{\text{norm}}$ spiegeln dann direkt die Verhältnisse der ursprünglichen mRNA Konzentration der Gene in Agonist-behandelter Probe und Kontrolle wider.

Eine weitere Möglichkeit der Normierung bieten die Signale der *Housekeeping*-Gene, von denen angenommen wird, dass sie konstitutiv exprimiert und durch die Versuchsbedingungen nicht beeinflusst werden [13, 14]. Einen genauen Überblick über die verschiedenen Methoden gibt Yang [15]. Darüber hinaus muss ein Schwellenwert berechnet werden, der festlegt, ab welcher Signalthöhe ein Gen als exprimiert gilt. Dazu enthält ein Array Negativkontroll-Sonden. Die zu untersuchende Ziel-DNA sollte eigentlich nicht mit diesen Sonden hybridisieren, dennoch wird hier in der Regel ein Fluoreszenzsignal detektiert, das auf unspezifische Wechselwirkungen der Ziel-DNA-Moleküle mit den Fangsonden zurückzuführen ist [16, 17]. Dies Signal muss bei der Analyse der restlichen Signale eines Array berücksichtigt werden, da auch hier diese unspezifischen Wechselwirkungen zum Gesamtsignal an den Sonden beitragen. Zur Berechnung des Schwellenwerts wurde in dieser Arbeit aus den Signalen aller im Array vorhandenen Negativkontroll-Sonden nach der Hintergrundkorrektur der Mittelwert gebildet und dazu die dreifache Standardabweichung dieses Werts addiert. Nur die Gene, an deren korrespondierenden Sonden dieser berechnete Schwellenwert überschritten wurde, wurden als exprimiert angesehen.

Häufig werden die erhaltenen Daten zur Veranschaulichung und weiteren Analyse in Streudiagrammen (logarithmisch) gegeneinander aufgetragen (Abb. 3-2). Durch die Punktwolke wird eine Regressionsgerade gelegt, deren Steigung bei Verwendung normierter Fluoreszenzwerte nahe 1 liegen sollte. Parallel dazu werden ober- und unterhalb der Regressionsgeraden weitere Geraden so eingezeichnet, dass Gene innerhalb dieser Grenzen weniger als zweifach induziert bzw. reprimiert sind. Dies wird allgemein als die Auflösungsgrenze eines DNA-Chips hinsichtlich einer differentiellen Regulation angesehen,

wobei diese Grenzen in einigen Arbeiten noch höher als zweifach angesetzt werden [13]. *Spots*, die außerhalb der so definierten Bereiche liegen, entsprechen differentiell regulierten Genen. Wird RNA aus denselben Zellen mit beiden Fluorophoren markiert und auf einen Chip gegeben, sollte ein Diagramm erhalten werden, dessen Punkte um eine Regressionsgerade mit der Steigung 1 liegen, denn in diesem Fall hat keine Regulation stattgefunden. Die Steigung 1 ergibt sich jedoch nur nach Normierung der Daten.

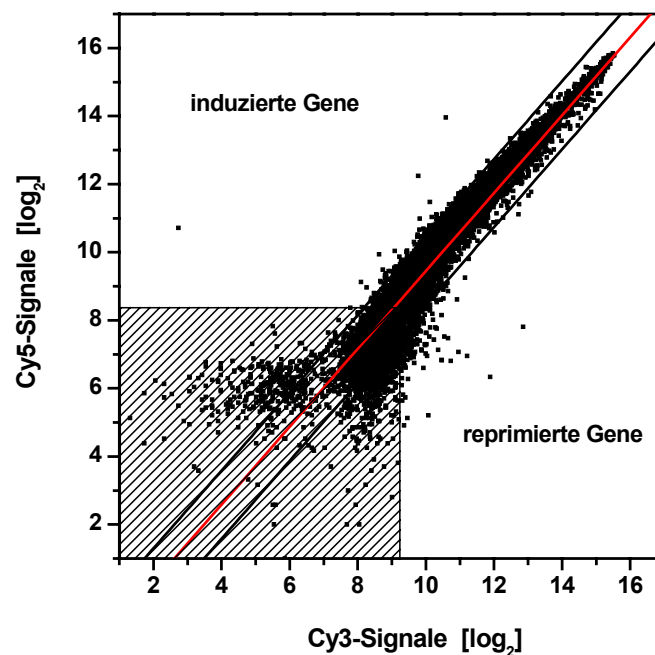


Abb. 3-2: Streudiagramm zur Auswertung eines Zweifarben-Experiments auf einem Hochdichte-DNA-Chip

Die rote Linie zeigt die lineare Regression, die beiden schwarzen Linien geben den Bereich der 2-fachen Induktion bzw. Repression an. Die schraffierte Fläche kennzeichnet den berechneten Schwellenwert für diesen Chip.

In dieser Arbeit sollte die DNA-Chip-Technologie zum einen eingesetzt werden, um neue nutritive Markergene für ausgewählte Lipide zu identifizieren, die als Minorbestandteile in der humanen Nahrung enthalten sind. Zum anderen sollte ein Niedrigdichte-Chip mit wenigen ausgesuchten Sonden etabliert werden, der das flexible *Screening* vieler Proben in hohem Durchsatz ermöglichen soll.

3.2 Fettsäuren als Regulatoren der Genexpression

Obwohl fetthaltige Nahrungsmittel in heutiger Zeit eher als unerwünscht gelten, sind die Fettsäuren doch ein wichtiger Bestandteil der humanen Ernährung, da sie wichtige physiologische Aufgaben innerhalb des Organismus erfüllen: (i) in Form von Triacylglycerinen stellen sie den wichtigsten Energiespeicher dar; (ii) als Bestandteil der Phospholipide sind sie eine Hauptkomponente biologischer Membranen und beeinflussen sowohl deren strukturelle als auch physikalisch-chemische Eigenschaften; (iii) als post-translationalen Modifikation an Proteinen dienen Fettsäuren als Signal für deren Transport innerhalb einer Zelle und ermöglichen die Verankerung der Membranproteine; (iv) nicht zuletzt wirken die Fettsäuren oder ihre Metabolite, ähnlich wie Hormone, als Mediatoren und *second Messenger* auf die Genexpression und beeinflussen so Metabolismus, Wachstum und Zelldifferenzierung.

In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass nicht nur die als Hauptbestandteile in der Nahrung enthaltenen gesättigten und einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Stearin-, Öl- oder Linolsäure, einen regulatorischen Einfluss auf die Genexpression ausüben [18, 19]. Auch, oder besonders, die in geringerer Menge auftretenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie z.B. die konjugierte Linolsäure (*conjugated linoleic acid*, CLA) oder die verzweigt-kettige Phytan- und Pristansäure zeigen modulierende Wirkungen im Organismus [20-22]. Ein Ziel dieser Arbeit lag darin, den Einfluss der konjugierten Linolsäure sowie der Phytan- und Pristansäure auf molekularer Ebene näher zu untersuchen. Deshalb wird im Folgenden näher auf diese Minorbestandteile der humanen Ernährung eingegangen.

3.2.1 Konjugierte Linolsäuren

Konjugierte Linolsäuren ist ein Sammelbegriff für Isomere der Octadecadiensäure (Linolsäure, Abb. 3-3 B), die konjugierte Doppelbindungen aufweisen. Sie entstehen als Zwischenstufe während der Biohydrogenierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren im Rumen der Wiederkäuer und sind ebenfalls in deren Fleisch- und Milchprodukten zu finden, wodurch die CLAs in die menschliche Nahrungskette gelangen. Das Hauptisomer *9cis,11trans*-Octadecadiensäure (9-CLA oder Rumensäure, Abb. 3-3 C) macht etwa 1 % des Milchfetts aus, allerdings ist heute bekannt, dass natürlich vorkommendes CLA in Wiederkäuerfett eine Mischung von Isomeren darstellt, die u.a. auch die *10trans,12cis*-Octadecadiensäure (10-CLA, Abb. 3-3 D) als größeren Anteil enthält. Ein alternativer Biosyntheseweg der 9-CLA in Säugetieren, einschließlich des Menschen, wurde in letzter

Zeit aufgedeckt. Dabei wird die ebenfalls im Rumen der Wiederkäuer gebildete 11*trans*-Vaccensäure (VA, Abb. 3-3 A) durch Δ^9 -Desaturierung durch die Stearoyl-CoA Desaturase (auch Δ^9 -Desaturase, SCD) in 9-CLA konvertiert [23, 24].

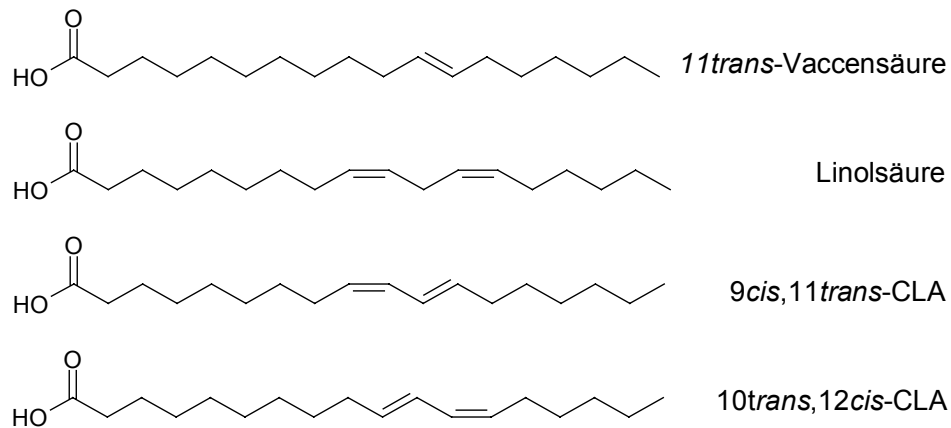


Abb. 3-3: Struktur der konjugierten Linolsäuren und ihrer Vorstufen 11*trans*-Vaccensäure und Linolsäure

Schon Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts beobachteten Pariza *et al.* einen anticancerogenen Effekt von Rinderhackfleisch, der schließlich auf die enthaltenen CLAs zurückzuführen war [25, 26]. Seitdem wurden in zahlreichen Studien, überwiegend an Tiermodellen, weitere Effekte der konjugierten Linolsäuren auf den Organismus untersucht, wobei außerdem immunmodulierende [27, 28] und antiatherogene Effekte [29] sowie Änderungen in der Körperfett- und Plasmazusammensetzung gefunden wurden [30, 31]. In letzter Zeit nimmt die Anzahl der Humanstudien zu, in denen eben diese Effekte bestätigt werden [32-34]

Die genauen molekularen Wirkungsmechanismen der CLAs wurden noch nicht hinreichend erforscht. Es wurde jedoch immer deutlicher, dass die CLAs Liganden der intrazellulären Fettsäurebindungsproteine (FABPs) und Aktivatoren einer Klasse der Ligand-aktivierten Kernrezeptoren sind. Diese Peroxisomen Proliferator aktivierten Rezeptoren (PPARs, Kap. 3.3) regulieren als Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener Gene der Fettsäureaufnahme (z.B. Fettsäure Translokase, CD36/FAT), des Fettsäure- und Glukosetransports (z.B. FABPs, Glukosetransporter GLUT) sowie -metabolismus (z.B. Acyl-CoA Oxidase, ACOX; Malat Enzym, ME) [18, 35-38].

3.2.2 Verzweigt-kettige Fettsäuren

Eine weitere Gruppe regulatorisch aktiver Ernährungsbestandteile sind die verzweigt-kettigen Fettsäuren (*branched-chain fatty acids*, BCFAs), die entsprechend ihrer Biogenese klassifiziert werden können [39]: (i) iso- oder anteiso-Fettsäuren, die durch eine Methylgruppe an der zweit- bzw. drittletzten Position der Kohlenstoffkette charakterisiert sind; (ii) mehrfach methylverzweigte BCFAs mit polyketider Struktur, sie weisen an jedem zweiten Kohlenstoffatom eine Methylgruppe auf und (iii) die BCFAs, die durch eine unveränderliche isoprenoide Struktur mit einer Methylgruppe an jedem viertem Kohlenstoff der Kette gekennzeichnet sind.

Die erste Gruppe der iso- und anteiso-Fettsäuren kommen überwiegend in mikrobiellen Zellmembranen als Bestandteile der Phospholipide vor [40, 41], während die Vertreter der zweiten Gruppe ausschließlich in der Bürzeldrüse (*Glandis urupygialis*) von *Anseriformen* (Gänse, Enten) zu finden sind [42]. Die häufigsten Vertreter der dritten Gruppe sind Phytan-(3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure) und Pristansäure (2,6,10,14-Tetramethylpentadecansäure) (Abb. 3-4), die in großer Menge in Wal- und Fischölen sowie in Rindfleisch und Milchprodukten zu finden sind (0,1-1 % w/w) [43, 44]. Phytansäure entsteht im Rumen der Wiederkäuer durch mikrobielle Abspaltung der Phytolseitenkette des Chlorophylls und anschließende Oxidation des Phytols zu Phytansäure. Aufgrund der Methylgruppe in β -Position kann diese BCFA nicht direkt β -oxidativ abgebaut werden, sondern wird in den Peroxisomen durch α -Oxidation zu Pristansäure abgebaut, die anschließend durch peroxisomale und mitochondriale β -Oxidation weiter abgebaut wird [45-47]. Da der Mensch nicht zur Abspaltung der Phytolseitenkette des Chlorophylls in der Lage ist, wird Phytansäure ausschließlich über die Nahrung aufgenommen.

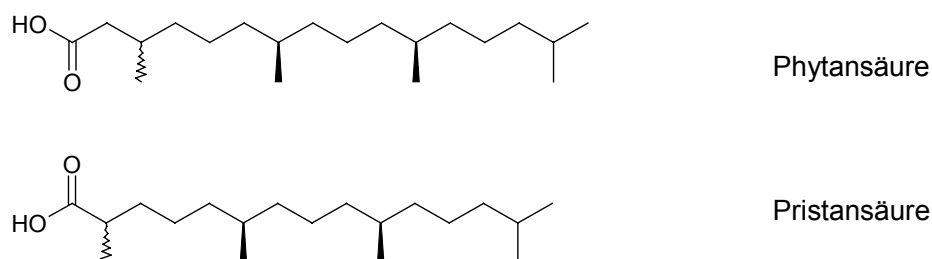


Abb. 3-4: Struktur der verzweigt-kettigen Fettsäuren Phytan- und Pristansäure

Die normale Konzentration der Phytansäure im menschlichen Blutplasma erreicht etwa 10 $\mu\text{mol/l}$. Liegen Defekte in der peroxisomalen α -Oxidation vor, z.B. eine genetische Inaktivierung der Phytanoyl-CoA Hydroxylase, führt dies zu einer Akkumulation der Phytansäure in Plasma (bis zu 1300 μM) und Gewebe, da die Oxidation zur Pristansäure nicht möglich ist. Typische Symptome dieses sog. Refsum Syndroms sind neurologische Störungen sowie Beeinträchtigung des Seh- und Hörvermögens [48]. Bei Störungen in der β -Oxidation, z.B. durch die Defizienz der peroxisomalen Thiolase, kommt es zu einer Erhöhung der Pristansäurekonzentration (Pseudo Zellweger Syndrom) [49, 50].

Sowohl in Bindungsstudien als auch in Transaktivierungsassays sowie anhand von Mausmodellen konnte kürzlich gezeigt werden, dass die verzweigt-kettigen Fettsäuren genau wie die CLAs potentielle Aktivatoren der PPARs und Liganden für FABPs sind und somit eine Rolle als Transaktivatoren der Genexpression spielen [43, 51-53]. Zu den Kernrezeptoren, die direkt oder indirekt durch die Fettsäuren beeinflusst werden, zählen außerdem der Retinsäure Rezeptor und der Retinsäure-X Rezeptor (*retinoic acid receptor*, RAR und *retinoic acid-X receptor*, RXR) sowie die *sterol regulatory element binding proteins* (SREBs), der Leber-X Rezeptor (LXR), der Hepatische Kernfaktor 4 α (HNF4 α) [22, 54] und die PPARs, die hier näher beschrieben werden sollen.

3.3 Peroxisomen Proliferator aktivierte Rezeptoren

Die PPARs gehören zu den ligandaktivierten Kernrezeptoren der Familie der nukleären Hormonrezeptoren, deren Liganden natürliche und synthetische Peroxisomen Proliferatoren sind. Isseman und Green entdeckten 1990 in der Leber von Nagetieren, dass ein bis dahin zu den *Orphan receptors* („Waisenrezeptoren“) gezählter Kernrezeptor durch synthetische Aktivatoren der Peroxisomen Proliferation aktiviert wurde, wodurch die PPARs ihren Namen erhielten [55]. Bis heute wurden drei Subtypen dieser Rezeptoren in Mensch, Nagern und Amphibien identifiziert: PPAR α , PPAR β (auch PPAR δ , NUC1 oder FAAR) und PPAR γ . Von letzterem sind vier Isoformen γ_1 , γ_2 , γ_3 und γ_4 bekannt, die sowohl durch verschiedenen Promotoren transkribiert werden als auch durch alternatives Spleissen entstehen [56-58]. Die verschiedenen PPAR-Isoformen werden sowohl durch natürliche (z.B. Fettsäuren und Eicosanoide, [59]) als auch durch synthetische Agonisten spezifisch aktiviert (Xenobiotika wie Fibrate und Thiazolidindione, [60]). Darüber hinaus ist auch die Lokalisation der PPARs gewebespezifisch. Hauptsächlich sind die PPARs in die Lipidhomöostase involviert, jeder Subtyp zeigt aber auch spezifische Funktionen (Tab. 3-1).

Die Expression von PPAR α ist in Zellen mit hohem Fettsäurekatabolismus am höchsten. Daher finden sich hohe Konzentrationen dieses Subtyps in der Leber, geringere Mengen auch in Niere, Herz und braunem Fettgewebe [61, 62]. PPAR α ist sowohl an der Regulation der mitochondrialen und peroxisomalen β -Oxidation, als auch der Glukoneogenese, dem Aminosäure-Metabolismus, der Harnstoffsynthese, Entzündungsreaktionen und dem Aufbau des Apolipoproteins beteiligt [63].

PPAR β wird ubiquitärer exprimiert und ist in einer Reihe von Geweben wie Herz, Fettgewebe, Gehirn, Lunge, Nebennieren, Muskel, Verdauungstrakt und Milz nachgewiesen worden. Die genaue Funktion dieses Subtyps ist noch unklar, Experimente mit *knock out* Mäusen lassen jedoch eine Rolle bei der Implantation des Embryos und der Wundheilung erkennen [63-66].

PPAR γ wird überwiegend in braunem und weißem Fettgewebe sowie im Darm und in Makrophagen exprimiert und ist essentiell für die Differenzierung der Adipocyten und für die Lipideinlagerung. Außerdem verbessert PPAR γ die Insulinsensitivität, induziert die Differenzierung der Monozyten und aktiviert den Efflux des Cholesterins [67, 68].

Tab. 3-1: Verteilung der PPARs im Gewebe und Ligandklassen (nach [69])

Subtyp	Gewebe	Liganden
PPAR α	Leber, Niere, Herz, Darm, Skelettmuskel, Testis	Fettsäuren verzweigtkettige Fettsäuren (Phytan-, Pristansäure) Eicosanoide (8(s) HETE, Leukotrien B4) Fibrate (hypolipidemischen Substanzen)
PPAR β	nahezu ubiquitär	Fettsäuren, all- <i>trans</i> Retinsäure verzweigtkettige Fettsäuren (Phytan-, Pristansäure) Carboprostacyclin
PPAR γ	weißes und braunes Fettgewebe Zellen des Immunsystems in geringen Mengen in vielen Gewebe	Fettsäuren verzweigtkettige Fettsäuren (Phytan-, Pristansäure) Eicosanoide (15-Deoxy- Δ 12,14-PGJ2) Thiazolidindione (Antidiabetika)

Zur Regulation der Transkription heterodimerisieren die PPARs mit einem der Retinsäure-X-Rezeptoren α , β oder γ (*retinoic acid-X receptor*, RXR), die wiederum durch 9*cis*-Retinsäure aktiviert werden. Die PPAR/RXR Heterodimere binden an spezifische DNA-Erkennungselemente, die PPREs (*peroxisome proliferator responsive elements*), die in den Promotoren oder Introns der betreffenden Zielgene lokalisiert sind. PPREs sind direkte Wiederholungen zweier Hexanukleotide mit der Konsensussequenz AGGTCA, die durch ein einzelnes Nukleotid voneinander getrennt werden (*direct repeats*, DR-1) und einer 5'-flankierenden Region [70-76]. Eine Übersicht über PPRE-tragende Gene findet sich bei Desvergne und Wahli [18].

Da die PPARs durch lipophile Liganden aktiviert werden, stellt sich die Frage, wie diese hydrophoben Substanzen durch das wässrige Milieu des Cytosols zu den kernständigen Rezeptoren gelangen. Die Aufnahme der Liganden erfolgt entweder durch passive Diffusion durch die Zellmembran oder mittels membranassoziierter Transportproteine wie der Fettsäure Translokase oder den Fettsäure-Transportproteinen. Innerhalb der Zelle binden die freien Fettsäuren reversibel an intrazelluläre Fettsäurebindungsproteine (FABPs) bzw. die aktivierte Form als CoA-Ester an Acyl-CoA Bindungsproteine (*acyl-CoA binding proteins*, ACBPs) und werden in gebundener Form zu den Kernrezeptoren transportiert [60].

3.4 Fettsäurebindungsproteine

Die Fettsäurebindungsproteine gehören zur Familie der intrazellulären Lipidbindungsproteine (iLBPs), die überwiegend nach dem Gewebe aus denen sie zuerst – allerdings nicht ausschließlich – isoliert wurden, benannt sind (z.B. Leber-Typ-FABP). In den Geweben, in denen sie exprimiert werden, sind sie für gewöhnlich in hoher Konzentration zu finden, die FABPs machen dann etwa 1-3 % der cytosolischen Proteine aus [77]. Basierend auf Sequenzhomologien und Bindungseigenschaften werden die iLBPs in vier Unterfamilien unterteilt (Tab. 3-2): (i) die Retinoid-Bindungsproteine mit den zellulären Retinsäurebindungsproteinen (CRABP I und II) sowie den Retinolbindungsproteinen (CRBP-I bis IV), die darauf spezialisiert sind Vitamin A und seine Derivate (Retinol, Retinal und Retinsäure) zu binden; (ii) das intestinale Gallensäurebindungsprotein (I-BABP) und das Leber-Typ Fettsäurebindungsprotein (L-FABP), die neben den Fettsäuren noch eine Anzahl größerer Liganden wie Gallensäuren, Acyl-CoAs, Eicosanoide, Cholesterin, Bilirubin und Häm binden können. L-FABP kann als einziger Vertreter dieser Proteinfamilie zwei Liganden gleichzeitig aufnehmen; (iii) das intestinale Fettsäurebindungsprotein (I-FABP), das Fettsäuren in einer nur leicht gebogenen Form bindet und (iv) alle anderen

Fettsäurebindungsproteine (A-, B-, E-, H-, M-FABP), die jeweils ein Fettsäuremolekül binden, das dabei eine U-förmige Konformation annimmt [78]. Tab. 3-2 fasst die Subfamilien der iLBP mit dazugehörigen Liganden und Gewebelokalisierung zusammen.

Tab. 3-2: Gewebeverteilung der iLBPs und ihre Ligandklassen (nach [69])

Familie	Typ	Gewebe	Liganden
I	CRBP-I	Ovarien, Nebennieren, Pituitary gland	Retinol, Retinal
	CRBP-II	Dünndarm	Retinol, Retinal
	CRBP-III	Leber, Niere	Retinol
	CRBP-IV	Niere, Herz, Darm	Retinol
	CRABP-I	Gehirn, Haut, Testis	Retinsäure
	CRABP-II	Epidermis, Nebenniere	Retinsäure
ii	L-FABP	Leber, Dünndarm, Niere	Fettsäuren, Häm, Eicosanoide, Lysophospholipide, Acyl-CoAs Peroxisomen Proliferatoren
	I-BABP	Dünndarm (distal), Ovarien, Nebenniere, Magen	Gallensäuren
iii	I-FABP	Dünndarm (proximal), Magen	gesättigte Fettsäuren
iv	A-FABP	weißes und braunes Fettgewebe Makrophagen	Fettsäuren, Eicosanoide
	E-FABP	Epidermis, Fett- und Brustgewebe, Zunge Epithelien, Testis	Fettsäuren, Eicosanoide
	B-FABP	Gehirn, Zentrales Nervensystem	sehr langkettige Fettsäuren Lysophosphatidsäure Acyl-CoA
	H-FABP	Herz- und Skelettmuskel, Gehirn, Brustdrüse, Niere, Nebenniere, Testis, Ovarien Placenta, Lunge, Magen	Fettsäuren, Acylcarnitin
	M-FABP	peripheres Nervensystem	Fettsäuren, Retinsäure, Retinol
	T-FABP	Testis	nicht bekannt

Die Aufgabe der FABPs besteht hauptsächlich im Transport der in die Zelle aufgenommenen Fettsäuren durch das Cytosol zu den zellulären Zielen, wie z.B. den Mitochondrien und Peroxisomen für den Abbau der Fettsäuren, wodurch der Fettsäuremetabolismus auf Proteinebene moduliert wird [79, 80]. Neben diesem modulierenden Effekt wurde gezeigt, dass die FABPs darüber hinaus auch in die Signaltransduktion involviert sind. Da die FABPs das gleiche Ligandenspektrum wie die PPARs aufweisen (Tab. 3-1 und 3-2), wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Transportproteine eine Rolle in der Fettsäure-vermittelten Signaltransduktion im Nukleus spielen könnten. Wolfrum *et al.* konnten eine Ko-Lokalisation des L-FABP und PPAR α im Nukleus zeigen und außerdem eine direkte Protein-Protein Interaktion des L-FABP mit sowohl PPAR α als auch PPAR γ nachweisen. In Transaktivierungsassays konnte festgestellt werden, dass L-FABP nicht nur in die Liganden-abhängige Aktivierung der PPARs involviert, sondern dafür essentiell ist [80, 81]. Der gleiche, auf PPAR/FABP-Interaktion basierende, Signalweg konnte von Tan *et al.* für die Paare A-FABP/PPAR γ sowie E-FABP/PPAR β gezeigt werden [19].

3.5 Monozyten und Makrophagen

Die Monozyten sind die größten mononukleären Zellen im Blut. Sie entwickeln sich im Knochenmark aus myeloischen Stammzellen, von denen sich auch Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten ableiten, über Monoblasten und Promonozyten zu reifen Monozyten. Diese werden in die Blutbahn abgegeben, wo sie 1-2 Tage zirkulieren. Durch unterschiedliche Signale chemotaktisch angelockt, wandern sie in verschiedenste Gewebe und Körperhöhlen ein und differenzieren dort zu gewebespezifischen Makrophagen oder dendritischen Zellen [82-84].

Bei den Makrophagen handelt es sich um amöboid bewegliche, mononukleäre Zellen des zellulären Immunsystems, die zur Phagozytose großer Fremdpartikel wie Mikroorganismen oder Zelltrümmer befähigt sind. Die aufgenommenen Fremdkörper werden mit Hilfe lysosomaler Enzyme intrazellulär abgebaut und so eliminiert („Fresszellen“). Darüber hinaus zeigen die Makrophagen eine ausgeprägte Zytotoxizität gegenüber Krebszellen. Eine weitere wichtige Aufgabe erfüllen die Makrophagen in der zellvermittelten Immunität, da sie als Antigen-verarbeitende und -präsentierende Zellen die Aktivierung der B- und T-Lymphozyten in der Anfangsphase der Immunantwort bewirken [85]. Zusätzlich dazu bilden Makrophagen eine Reihe von Sekretionsprodukten wie Proteasen, an Entzündungen beteiligte Immunmediatoren und chemotaktische Faktoren (z.B. Interleukin-1 und 6), parakrin wirkende Faktoren, die die Funktion anderer Zellen in unmittelbarer Umgebung beeinflussen (z.B.

Tumor Nekrose Faktor), Apolipoprotein E (ApoE), Proteine der extrazellulären Matrix oder Kollagene, um nur einige zu nennen [86-93].

Makrophagen weisen außerdem einen sehr aktiven Fettstoffwechsel auf. So sind sie in der Lage größere Mengen an Cholesterinestern zu speichern, die in Form von Lipidtröpfchen innerhalb der Zelle eingelagert werden, wodurch sich die Makrophagen zu Schaumzellen entwickeln [94-96]. Bei den meisten Zellen erfolgt die Aufnahme des Cholesterins über LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose des LDL, die einem negativem Rückkopplungsmechanismus unterliegt [97]. Nimmt der Cholesteringehalt in der Zelle zu, wird die LDL-Rezeptor-Expression inhibiert und dadurch die weitere Aufnahme von LDL unterbunden. Makrophagen können jedoch auch modifizierte Lipoproteine über sogenannte Scavenger-Rezeptoren aufnehmen, die keiner negativen Rückkopplung durch die Cholesterinaufnahme unterliegen. So kann es zu einem ungehemmten Cholesterineinstrom in die Zelle und deshalb zur Umwandlung zu Schaumzellen kommen. Dies spielt u.a. eine wichtige Rolle für Pathogenese der Arteriosklerose [86, 98, 99].

Interessanterweise konnten Makowski *et al.* sowie Layne *et al.* [100, 101] zeigen, dass murine Makrophagen nach Ausschalten des A-FABP- und ApoE-Gens eine reduzierte Fähigkeit der Cholesterinakkumulation aufwiesen, und ebenfalls ein Rückgang der arteriosklerotischen Läsionen zu beobachten war. Da A-FABP der Regulation durch PPAR γ -Agonisten unterliegt [102] und auch Schachtrup *et al.* [103] die Expression des A-, E- und H-FABP in einigen Gewebemakrophagen und die Expression des L-FABP ausschließlich in Alveolar-Makrophagen nachweisen konnten, werden die Makrophagen so zu einem für diese Arbeit interessanten Studienobjekt hinsichtlich der Wirkung der CLAs und BCFA's als PPAR-Agonisten und FABP-Liganden auf die differentielle Genexpression. Dazu wurden humane Zellen der monozytischen Zelllinie THP-1 durch Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu Makrophagen-ähnlichen Zellen differenziert [104, 105] und diese in Fütterungsstudien mit den Lipidagonisten eingesetzt.

4 Ziele der Arbeit

In vorangehenden Studien unserer Arbeitsgruppe konnten sowohl das *9cis,11trans*- und *10trans,12cis*-Isomer der konjugierten Linolsäure als auch die verzweigt-kettigen, von der Phytolseitenkette des Chlorophylls abgeleiteten, Fettsäuren Phytan- und Pristansäure mit Hilfe von Bindungsstudien und Reporterassays als Liganden und Aktivatoren der PPARs identifiziert werden. Dies bestätigte die Hypothese, dass diese als Minorbestandteile der Nahrung vorkommenden Fettsäuren ihre regulatorische Wirkung auf die Transkription vieler Zielgene über den PPAR-Signalweg ausüben.

Vor dem Hintergrund der Regulation der differentiellen Genexpression über den PPAR-Signalweg, war das Thema dieser Arbeit die Aufklärung des Einflusses der CLAs und deren Vorstufe *11trans*-Vaccensäure sowie der Phytan- und Pristansäure auf die Genexpression in humanen Zellkulturmodellen. Dazu sollte zum einen die DNA-Chip-Analytik eingesetzt werden, deren Etablierung anhand kommerziell erhältlicher Mitteldichte- und Hochdichte-DNA-Chips ein Ziel der Arbeit darstellte. Die Hochdichte-Chips sollten dabei für die Identifizierung nutritiver Markergene für die Wirkung der Fettsäuren in diesen Modellen eingesetzt werden. Desweiteren sollte, basierend auf bereits vorhandenen Techniken zur Herstellung von DNA-Chips im Labormaßstab, ein Niedrigdichte-DNA-Chip für die gezielte Untersuchung ausgewählter Zielgene mit höherem Durchsatz entwickelt werden. Dabei bestand eine Aufgabe in der Optimierung der Parameter der Hybridisierung unter dem Deckglas. Anschließend sollte die Evaluierung dieser Art DNA-Chips hinsichtlich der Anwendbarkeit für die Expressionsanalytik folgen.

Zum anderen sollte die bereits etablierte Methode der q-RT-PCR herangezogen werden, um *in vitro* den Effekt der Fettsäureagonisten auf die differentielle Expression ausgewählter Zielgene in der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 zu untersuchen. Ebenso sollte hinsichtlich der Kooperation mit dem Institut für Ernährung der Universität Jena (Prof. Jahreis) eine humane monozytische Zelllinie (THP-1) etabliert, mit den Fettsäuren behandelt und mittels der q-RT-PCR sowie der DNA-Chip-Technik untersucht werden. Parallel dazu sollte im Rahmen einer Interventionsstudie an der Universität Jena die Identifizierung neuer Markergene in humanen Monozyten für die Aufnahme der *11trans*-Vaccensäure erfolgen, die im Organismus durch die Stearoyl-CoA-Desaturase zu 9-CLA konvertiert wird.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien und Geräte

5.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn im Folgenden nicht besonders aufgeführt, von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Merck* und *Fluka* bezogen und waren von „p.a.“ Qualität. Die eingesetzten Enzyme wurden von *Genecraft* (Münster) und *Invitrogen* (Karlsruhe) bezogen. Die genauen Zusammensetzungen der hier der Vollständigkeit wegen aufgeführten Puffer und Lösungen findet sich in Kap. 5.1.3.

Molekularbiologie

RNA Isolierung

RNeasy Mini Kit	<i>Qiagen</i> (Hilden)
RNase free DNase Set	<i>Qiagen</i> (Hilden)
RNase und DNase freies Wasser	<i>Gibco</i> (Eggenstein)
70 % Ethanol	

Agarose Elektrophorese, Formamidgele

Ethidiumbromid	<i>Roche</i> (Basel)
Beladungspuffer	
100 bp – 1 kb Plus DNA Ladder	<i>MBI Fermentas</i> (St. Leon-Rot)
TAE-Puffer (0,5x)	
Formaldehydgel Laufpuffer	
Formaldehydgel Puffer (10x)	
DEPC-Wasser	

DNA-PAGE Gelelektrophorese

Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 37,5:1 (30% AA)) für PAGE	<i>Carl Roth</i> (Karlsruhe)
pUC19-DNA-Marker, <i>Msp</i> I geschnitten	<i>MBI Fermentas</i> (St. Leon-Rot)
TBE-Puffer (1x)	

PCR

Biotherm™ DNA-Polymerase	<i>Genecraft</i> (Münster)
dNTPs	<i>Genecraft</i> (Münster)
10x-PCR-Puffer (ohne MgCl ₂)	<i>Genecraft</i> (Münster)
50 mM MgCl ₂ -Lösung	<i>Genecraft</i> (Münster)
PCR-Purification Kit	<i>Qiagen</i> (Hilden)

Reverse Transkription

SUPERSCRIPT™ II Kit	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe)
Random Primer	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe)
RNase und DNase freies Wasser	<i>Gibco</i> (Eggenstein)

quantitative Echtzeit-RT-PCR

SYBRGreen PCR Mastermix (2x)

*Applied Biosystems (Darmstadt)***DNA-Chips**Aktivierung der Chipoberfläche

Rotiblock® 10x-Konzentrat
 Methanol
 konz. Salzsäure
 konz. Schwefelsäure
 Silanisierungslösung
 Aktivierungslösung
 Dimethylformamid
 Dichlormethan
 Deaktivierungspuffer

*Carl Roth (Karlsruhe)*Targetmarkierung

SUPERSCRIPT™ II Kit
 Oligo dT₍₁₈₎ Primer
 1 mM Cy5 und Cy3-dUTP-Lösung
 Amino-allyl-dUTPs
 Cy5- und Cy3-NHS
 QIAquick PCR Purification Kit
 1 M HCl
 1 M NaOH
 1 M TE-Puffer pH 7,5
 1 M HEPES pH 7,5
 4 M Hydroxylamin-Hydrochlorid
 3 M Natriumacetat pH 5,2
 0,1 M Natriumhydrogencarbonat pH 9,0

Invitrogen (Karlsruhe)
MBI Fermentas (St. Leon Rot)
Amersham Biosciences (Freiburg)
Ambion (Austin, TX, USA)
Amersham Biosciences (Freiburg)
Qiagen (Hilden)

Hybridisierung

Ultrahyb™
 MWG-Hybridisierungspuffer
 Perfect Hyb™ Plus
 GlasHyb™
 TIGR Hybridisierungspuffer

Ambion (Huntingdon, GB)
MWG Biotech (Ebersberg)
Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Clontech (Heidelberg)
The Institute for genomic research
 (<http://www.tigr.org>)

Waschpuffer 1, 2 und 3

Zellkultur

humane HepG2-Zellen (# ACC 180)
 humane THP-1 Zellen (# ACC 16)
 PBS, RPMI-Medium, FKS, SES (1000x)
 Trypsin,
 Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)
 Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin (100x)
 Kulturflaschen, Petrischalen
 DMSO
 Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)
 β-Mercaptoethanol

DSMZ (Braunschweig)
DSMZ (Braunschweig)
Biochrom (Berlin)
Biochrom (Berlin)
Biochrom (Berlin)
Biochrom (Berlin)
Nunc (Wiesbaden)

THP-1 RPMI-FKS-Medium
THP-1-Differenzierungsmedium
THP-1 RPMI-SES-Medium
HepG2 RPMI-FKS-Medium
HepG2 RPMI-SES-Medium
Ficoll-Paque Plus®
CD14-MicroBeads

Amersham Bioscience (Freiburg)
Miltenyi-Biotec
(Bergisch Gladbach)

5.1.2 Geräte und Materialien

Inkubatoren, Schüttler

Blockthermostat BT200
Schüttler Vortex Genie 2
Thermomixer 5437
Trio-thermoblock
Trockenschrank
Innova 2000

Kleinfeld (Gehrden)
Bender & Holbein (Zürich, CH)
Eppendorf (Hamburg)
Biometra (Göttingen)
WTC Binder (Tuttlingen)
New Brunswick Scientific
(Braunschweig)

PCR

Thermocycler Hybaid OmniGene
Mastercycler gradient
GeneAmp 5700 (TaqMan)

MWG Biotech (Ebersberg)
Eppendorf (Hamburg)
PE Biosystems (Foster City, USA)

Zentrifugen

Mikrozentrifuge
Tischzentrifuge 5415 C
Kühlzentrifuge 5417R
Kühlzentrifuge 5810R

Carl Roth (Karlsruhe)
Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf (Hamburg)

pH-Meter

Knick 510 pH-Meter
pH-Meter 763 Multi Calamatic
pH-Elektrode Inlab 423

Knick (Berlin)
Knick (Berlin)
Mettler (Toledo, USA)

Spektrometer

UV-VIS Photometer UV2100
UV-VIS-Spektrometer Lambda11

Shimadzu (Düsseldorf)
Perkin Elmer (Weiterstadt)

Elektrophorese

Elektrophoresis-Power Supply-EPS 600
Standard Power Pack P25
Minigel Twin-Kammer
Agarose Gelelektrophoresekammer

Pharmacia Biotech (Freiburg)
Biometra (Göttingen)
Biometra (Göttingen)
MWG Biotech (Ebersberg)

Ultrafiltration

Microcon YM-30 Konzentratoren
Zentrifugen-Filtereinheiten Ultrafree®-MC

Millipore (Schwalbach)
Millipore (Schwalbach)

Ultraschall

Ultraschallbad Sonorex Super RK103H

Bandelin (Berlin)

Zellkultur

Inkubator INCO2
Wasserbad
Phasenkontrast Mikroskop

Memmert (Schwalbach)
Memmert (Schwalbach)
Leitz (Los Angeles, USA)

DNA-Chips

Dispenser Nano-Plotter
Affimetrix®417™ Arrayer
GMS418 Mikroarray-Scanner
MWG Human Starter Kit
PAN® Human 30K Array (A)
Deckgläschen 20 mm x 20 mm
Objektträger, 25 mm x 75 mm x 1 mm, blank
Hybridisierungsrahmen

GeSiM (Großerkmannsdorf)
MWG Biotech (Ebersberg)
MWG Biotech (Ebersberg)
MWG Biotech (Ebersberg)
MWG Biotech (Ebersberg)
VWR (Darmstadt)
Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Abgene (Hamburg)

Sonstiges

Reinstwasseranlage Seralpur PRO 90 CN
Sterilgard Sicherheitswerkbank
Agilent 2100 Bioanalyzer
Mikrotiterplatten mit 384 Kavitäten (PP)
SpeedVac®

Seral (Ransbach-Baumbach)
Baker Company (Sanford, USA)
Agilent Technologies (Waldbronn)
Nunc (Wiesbaden)
Savant Instruments Inc.
(Farmingdale, USA)

5.1.3 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde Reinstwasser eingesetzt.

Aktivierungslösung	10 % (v/v) 10 mg/ml	Pyridin Phenyl-diisothiocyanat in Dimethylformamid
Beladungspuffer	0,125 % (w/v) 0,125 % (w/v) 30 % (v/v)	Bromphenolblau Xylencyanol FF Glycerin in 25 mM EDTA in RPMI-Basismedium
BSA-Lösung	2 mM	in RPMI-Basismedium
Deaktivierungspuffer	100 mM 1 % (w/v)	NaHCO ₂ 6-Aminohexansäure pH 8,5
DEPC-Wasser	0,1 % (v/v)	DEPC in H ₂ O
dNTP-Mastermix für die Markierung mit Cy3-/Cy5-dUTPs	5 mM 5 mM 5 mM 2 mM	dATP dGTP dCTP dTTP in RNase-freiem Wasser
dNTP-Mastermix für die Markierung mit aa-dUTPs	6 mM 6 mM 6 mM 0,8 mM 5 mM	dATP dGTP dCTP dTTP aa-dUTP in RNase-freiem Wasser
Formaldehydgel Puffer (10x)	200 mM 50 mM 10 mM	MOPS, pH 7,0 Na-Acetat EDTA
Formaldehydgel Laufpuffer (1x)	100 ml 20 ml 880 ml	10x Formaldehydgel Puffer 37 % Formaldehyd (12,3 M) DEPC-Wasser
HepG2 RPMI-FKS-Medium	3,78 g/l 10% 2 mM	NaHCO ₃ FKS L-Glutamin in RPMI-Basismedium
HepG2 RPMI-SES-Medium	3,78 g/l 2 mM 1x	NaHCO ₃ L-Glutamin SES A&B in RPMI-Basismedium

1x PBS	137 mM 2,7 mM 4,3 mM 1,4 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
Silanisierungslösung	3 % (v/v)	3-[2-(Aminoethylamino)ethylamino]propyltrimethoxysilan
TAE Puffer (50x)	10 M 10 M	Tris/HCl, pH 7,5 Essigsäure
TBE (10x)	889 mM 890 mM 20 mM	TRIS Base, pH 8,5 Borsäure EDTA
TE-Puffer	510 mM 0,5 mM	Tris-HCl, pH 7,5 EDTA
THP-1 RPMI-FKS-Medium	3,78 g/l 10% 1x 1x 1x	NaHCO ₃ FKS Natriumpyruvat (100x) Nicht-essentielle Aminosäuren (100x) PenicillinG/Streptomycin/ L-Glutamin (100x) in RPMI-Basismedium
THP1-Differenzierungsmedium	0,002 % (v/v) 100 ng/ml	β-Mercaptoethanol Phorbol-12-myristat-13-acetat in THP-1 RPMI-FKS-Medium
THP-1 RPMI-SES-Medium	3,78 g/l 1x 1x 1x 1x	NaHCO ₃ Natriumpyruvat (100x) Nicht-essentielle Aminosäuren (100x) PenicillinG/Streptomycin/ L-Glutamin (100x) SES A&B (1000x) in RPMI-Basismedium
20x SSC	3 M 0,3 M	NaCl Na-Citrat pH 7,0
TIGR Hybridisierungspuffer	5x 0,10% 50 % (v/v)	SSC SDS Formamid
Waschpuffer 1	2x 0,1 %	SSC SDS

Waschpuffer 2	1x	SSC
Waschpuffer 3	0,5x	SSC

5.1.4 Primer und Sonden

Alle Primer sind in 5'-3' Orientierung angegeben und wurden von den Firmen *MWG Biotech* (Ebersberg) und *Proligo* (Paris, Frankreich) bezogen. Eine kurze Beschreibung zur Funktion der korrespondierenden Gene findet sich im Anhang (Kap. 12).

Tab. 5-1: Primer für die q-RT-PCR, *forward* (F) und *reverse* (R)

Alle Primer wurden mit der Software *PrimerExpress 2.0* anhand der entsprechenden cDNA-Sequenz des Zielgens entworfen. Die Amplikonlänge sollte dabei 80 – 100 bp, die Primerlänge 18 – 24 bp nicht überschreiten. Der GC-Gehalt sollte zwischen 40 und 60 % liegen.

Zielgen	Primer	Genbankeintrag
<i>Housekeeper</i>		
hGAPDH	F-CGTCATGGGTGTGAACCATG R-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCAG	NM_002046
h β -ACT	F-CGTCCACCGCAAATGCTT R-GTTTTCTGCGCAAGTTAGGTTTTGT	NM_001101
<i>PPARs</i>		
hPPAR α	F-ATCCCAGGCTTCGCAAACCT R-CATGGCGAATATGGCCTCAT	NM_005036
hPPAR β	F-CGTACGATCCGCATGAAGCT R-CTGGCACTTGTTGCGGTTCT	NM_006238
hPPAR γ	F-CCAAGGCTTCATGACAAGGG R-GCAAACCTCAAACCTGGGCTCC	NM_138711
<i>Transporter</i>		
hGLUT1	F-GCCTGGATCTCCCCACTCTAG R-GAGTGGTTGGGTAGGA	NM_006516
hGLUT2	F-GAGTTGGCGCTGTAAACATGG R-GCACAAGTCCCACTGACATGAA	NM_000340
hGLUT4	F-CTGTGGCTGGTTTCTCC R-CATAGCCTCCGCAAC	NM_001042
hCD36/FAT	F-GGAAAATGTAACCCAGGACGC R-GATAGTGAAGTTTCAAGATGGCA	NM_000072
hFATP4	F-GACCCGGCTATTGTGAAG R-GGACGTAGCGGCCTTTCTC	NM_005094

Ziel Gen	Primer	Genbankeintrag
<i>FABPs</i>		
hA-FABP	F-GGGCCAGGAATTTGACGAAG R-TGTACCAGGACACCCCATC	NM_001442
hB-FABP	F-CTGGAAGCTGACCAACAGTCA R-TTTCCCACCTGCCTAGTGGC	NM_001446
hE-FABP	F-TTTGAAGAAACCACAGCTGAT R-CTCCTGATGCTGAACCAATGC	NM_001444
hH-FABP	F-CTTTCCTGGGCACCTGGAAG R-TGGTAGCAAACCCACACCG	NM_004102
hL-FABP	F-TGAAGGCAATCGGTCTGCC R-TCCCATTCTGCACGATTTCC	NM_001443
<i>Sonstige</i>		
hRXR α	F-GGGCTGGGACTGTTTCGTTT R-CATCGTCTGTCTGGCGTTT	NM_002957
hSCD	F-ACCGCTGGCACATCAACTTC R-CCTTGGAGACTTTCTTCCGGTC	NM_005063
hACO1	F-CCAAGCTTTCCTGCTCAGTGTT R-CCCCAGTCCCTTTTCTTCA	NM_007292
hCD14	F-GGGCTTTGCCTAAGATCCAAGA R-AAGGGTTGAATTGGTCGAAAAGTC	NM_000591
hCYP4A11	F-CACCACAGCCAGTGGGATC R-CCGGCACCTCTCCTGATG	NM_000778
hLPL	F-GTGAATGCCATGACAAGTC R-CACATGCCGTTCTTTGTTT	NM_000237
hPCNA	F-CCTGGTCCAGGGCTCCA R-CAGCAGGCCTCGTTGATG	NM_002592
hCOX2	F-CTGCAGAGTTGGAAGCACTC R-GCCGAGGCTTTTCTACCAG	NM_000963
hME3	F-GATCCGGCACATCCCAG R-GCTGCTCAGAGACTTCC	NM_006680
hPBE	F-GGGTAGGATTCACAAACC R-GGTACGTGGTTCAATGTG	NM_001966
hBCL2	F-GCTGGCTCAGGACTATCTGCA R-TGTAGCACTCTGGACGTTTTGC	NM_000633

Tab. 5-2: Primer für die Markierung der PCR-Produkte

Alle Primer wurden mit der Software *PrimerExpress 2.0* anhand der entsprechenden cDNA-Sequenz des Zielgens entworfen. Dabei sollte die Primerlänge 18 – 24 bp nicht überschreiten und der GC-Gehalt zwischen 40 und 60 % liegen.

Zielgen	Primer	Modifikation
hL-FABP	F-GTCCAAAGTGATCCAAAACG R-AAATTCTCTTGCTGATTCTCTTG	5'-Cy5
hPPAR α	F-ATGTGCTCAGACTCCACCTG R-TGTGGCTGATCTGAAGGAAC	5'-Cy5
h β -ACT	F-CGACAGGATGCAGAAGGAG R-AGTCCGCCTAGAAGCATTTG	5'-Cy5

Tab. 5-3: DNA-Chip Sonden mit NH₂-modifiziertem 5'-Ende

Die Sonden wurden aus dem Angebot der humanen Pan[®]-Oligo Set-Sonden von *MWG Biotech* (Ebersberg) bezogen. Nach Angaben des Herstellers wurden die 50mere im Bereich des 3'-Endes des jeweiligen Zielgens positioniert und tragen am 5'-Ende die NH₂-Modifizierung. Die Sequenzinformationen sind nicht zugänglich. Es handelt sich hierbei um die gleichen Sonden, die auch von MWG zur Herstellung der kommerziell erhältlichen MWG Human Starter Kits sowie den MWG Human 30k Arrays benutzt werden.

Sonde	Genbankeintrag	Sonde	Genbankeintrag
GAPDH	NM_002046	CD36	NM_000072
β -ACT	NM_001101	ACAA1	NM_001607
PPAR α	NM_005036	RPS27A	NM_002954
PPAR β/δ	NM_006238	GSR	NM_000637
PPAR γ	NM_015869	CASP9	NM_032996
L-FABP	NM_001443	HADHB	NM_000183
I-FABP	NM_000134	PTGS2	NM_000963
A-FABP	NM_001442	GCK	NM_000162
E-FABP	NM_001444	CYP4A11	NM_000778
H-FABP	NM_004102	FASN	NM_004104
RXR α	NM_002957	UCP2	NM_003355
RXR β	NM_021976	ACOX1	NM_004035
RXR γ	NM_006917	ACOX2	NM_003500
CD14	NM_000591		

Tab. 5-4: Negativkontrollsonden für die DNA-Chips mit NH₂-modifiziertem 5'-Ende

Die Sonden Gal, invA, ctx, Luc und ara wurden als Negativkontrollen auf den Chips immobilisiert. PM war eine am 3'-Ende mit Cy5 markierte Sonde, die als Positionsmarker aufgetragen wurde.

Sonde	Genbankeintrag	Sonde	Genbankeintrag
<u>Kontrollsonden mit Sequenz</u>			
Gal	5'-AATTACAGCTGAGCGCCGGTCGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAA-3'		
invA	5'-TTTTTTAAGATGCCGATTTAAGGCCGG-3'		
ctx	5'-TTTTTTTTAATAGGGGCTACAGAGATAGATATTACAGT-3'		
Luc	5'-ACTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCG-3'		
PM	5'-Cy5-ACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGA TTTTTTTTT-3'		
ara*			

* Sequenz vom Hersteller nicht angegeben

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryotischer Zellkultur wurde der „Qiagen RNeasy Mini Kit“ nach Anweisungen des Herstellers eingesetzt. Zusätzlich kam das „RNase free DNase Set“ zum Einsatz, um eine eventuelle Kontamination der RNA mit genomischer DNA zu eliminieren. Dazu wurde die DNase nach Angaben des Herstellers auf die Silicagel-Membran der RNeasy Säule pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In den nachfolgenden Waschschrritten wurde die DNase vollständig entfernt. Alle Arbeiten wurden, falls nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt, um eventuelle Restaktivität der RNasen zu minimieren. Außerdem wurde, falls nicht anders angegeben, steriles RNase- und DNase-freies Wasser eingesetzt.

Zur Quantifizierung der isolierten RNA wurde ein Aliquot in sterilem RNase- und DNase-freiem Wasser verdünnt und die Absorption der Lösung bei 260 nm bestimmt. Anhand der Faustregel für RNA ($1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$) wurde die Konzentration der vorliegenden Lösung berechnet. Aus 5×10^6 HepG2-Zellen sowie THP-1-Makrophagen konnten so ca. 50 μg Gesamt-RNA isoliert werden, aus THP-1-Zellen ca. 30 μg .

5.2.2 Qualitätskontrolle der RNA

Für die weiteren Arbeiten mit der isolierten RNA ist ihre Qualität wichtig, d.h. der Grad des Abbaus durch RNasen und die Kontamination mit Proteinen. Der Quotient der Absorption bei 260 und 280 nm sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen, um das Gelingen der nachfolgenden Schritte zu gewährleisten. Die Integrität und Größenverteilung der isolierten RNA wurde mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Als Denaturierungsmittel wurde Formaldehyd verwendet. Die denaturierende Wirkung des Formaldehyds beruht darauf, dass die Aldehydgruppe mit den Aminogruppen des Adenins, Guanins und Cytosins Schiffssche Basen bildet. Diese stehen dann nicht mehr zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung, sodass die Ausbildung von Sekundärstrukturen und Aggregaten verhindert wird. Da Formaldehyd auch mit den Aminogruppen des Tris-Puffers reagiert, wurde ein Gemisch aus 3-Morpholino-1-propansulfonsäure (MOPS) und Natriumacetat als Laufpuffer verwendet. Das 1,2 % Gel setzte sich zusammen aus 1,2 g Agarose, 10 ml 10x Formaldehyd-Gel Puffer und 90 ml RNase-freiem DEPC-Wasser. Nach dem Schmelzen der Agarose (Mikrowelle), wurde die Mischung auf 65°C abgekühlt, bevor 1,8 ml Formaldehyd (37 %) zugegeben wurden. Vor der Elektrophorese wurde das Gel in 1x Formaldehyd-Laufpuffer mindestens 30 min equilibriert. Nach Anfärben mit Ethidiumbromid sollten in einer nicht abgebauten RNA-Probe die Banden der 28S- und 18S-RNA in einem Größenverhältnis von etwa 2:1 zu erkennen sein. Ein Abbau der RNA durch RNase-Kontaminationen zeigt sich im Gel durch eine deutlich verschmierte Spur unterhalb der 18S-RNA-Bande, hervorgerufen durch viele kleinere RNA-Fragmente.

5.2.3 Analyse der RNA mittels des „Agilent 2100 Bioanalyzers“

Die Arbeiten mit dem „Agilent 2100 Bioanalyzer“ wurden im Institut für Integrierte funktionelle Genomik in Münster als Service durchgeführt. Das Prinzip des Agilent 2100 Bioanalyzers (*Agilent Technologies*, Waldbronn) beruht auf klassischer Gelelektrophorese, die auf ein Chipformat miniaturisiert wurde. Dadurch wird die Trennzeit und die Menge des einzusetzenden Probenmaterials (1 µl eines typischen RNA-Extrakts, bei Konzentrationen > 200 ng / µl entsprechend verdünnt) drastisch reduziert. Auf dem Chip befinden sich Kavitäten, in die Gel, Proben und ein externer Standard eingefüllt werden. Die einzelnen Öffnungen im Glaschip sind durch eingezähte Mikro-Kanäle mit dem eigentlichen Trennkanal verbunden (Abb. 5-1).

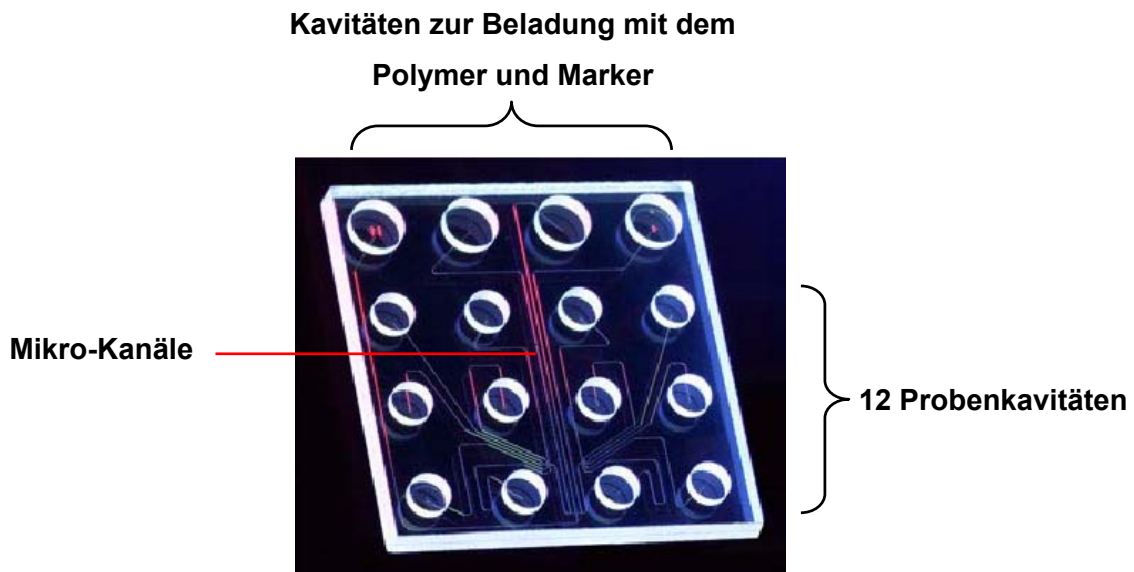


Abb. 5-1: Darstellung eines Caliper[®]-LabChips für die RNA-Analyse mittels des Agilent 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies, Waldbronn)

Für die Analyse der Gesamt-RNA wurde der *RNA 6000 Nano Assay*-Kit (Agilent Technologies, Waldbronn) eingesetzt. Die Kanäle des *RNA 6000 Nano* Chips wurden vor der Probenanalyse mit dem im Kit enthaltenen porenbildenden Polymer und Fluoreszenzfarbstoff (nicht näher spezifiziert) nach Angaben des Herstellers befüllt, so dass diese einen integrierten elektrischen Stromkreis darstellen. Anschließend wurden der externe Standard *RNA 6000 Nano Marker* und die zu untersuchenden Proben in die entsprechenden Kavitäten des Chips pipettiert. Der so vorbereitete Chip wurde in das Meßgerät eingelegt, in dem sich 16 Elektroden befinden, die nach Verschließen des Geräts exakt in die 16 Kavitäten des Chips eingepasst sind. Jede Elektrode ist mit einer unabhängigen Stromversorgung verbunden. In der Steuer-Software wurde in der Karteikarte „Assay“ das Menü „*Electrophoresis*“ und hier die Optionen „*RNA*“ und „*Eukaryote total RNA Nano*“ ausgewählt. Durch Anklicken des *Start*-Symbols wurde das Gerät gestartet.

Wie bei einer klassischen Gelelektrophorese werden nun geladene Moleküle, wie RNA oder DNA nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei sich kleine Fragmente schneller bewegen als große. Während der Elektrophorese interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff mit der RNA bzw. DNA. Am Ende der Migrationsstrecke werden diese Aggregate durch laserinduzierte Fluoreszenz detektiert und die erhaltenen Daten sowohl als Gelbild (Banden) als auch als Elektropherogramm (*Peaks*) ausgegeben (Abb. 5-2). Mit Hilfe des externen Standards mit

Fragmentgrößen von 0,2 bis 6 kb wird automatisch eine Standardkurve durch Auftragen der Migrationszeit gegen die Fragmentgröße erstellt. Anhand dieser Kurve werden die Konzentrationen und Fragmentgrößen der detektierten RNA-Spezies in der Probe bestimmt.

In einem Elektropherogramm einer Probe der Gesamt-RNA sind – genau wie in der Agarosegelelektrophorese – ein 18S und ein 28S RNA Peak zu erkennen. Das 28S / 18S Intensitätsverhältnis sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen, um in nachfolgenden Schritten gute Ergebnisse zu erzielen.

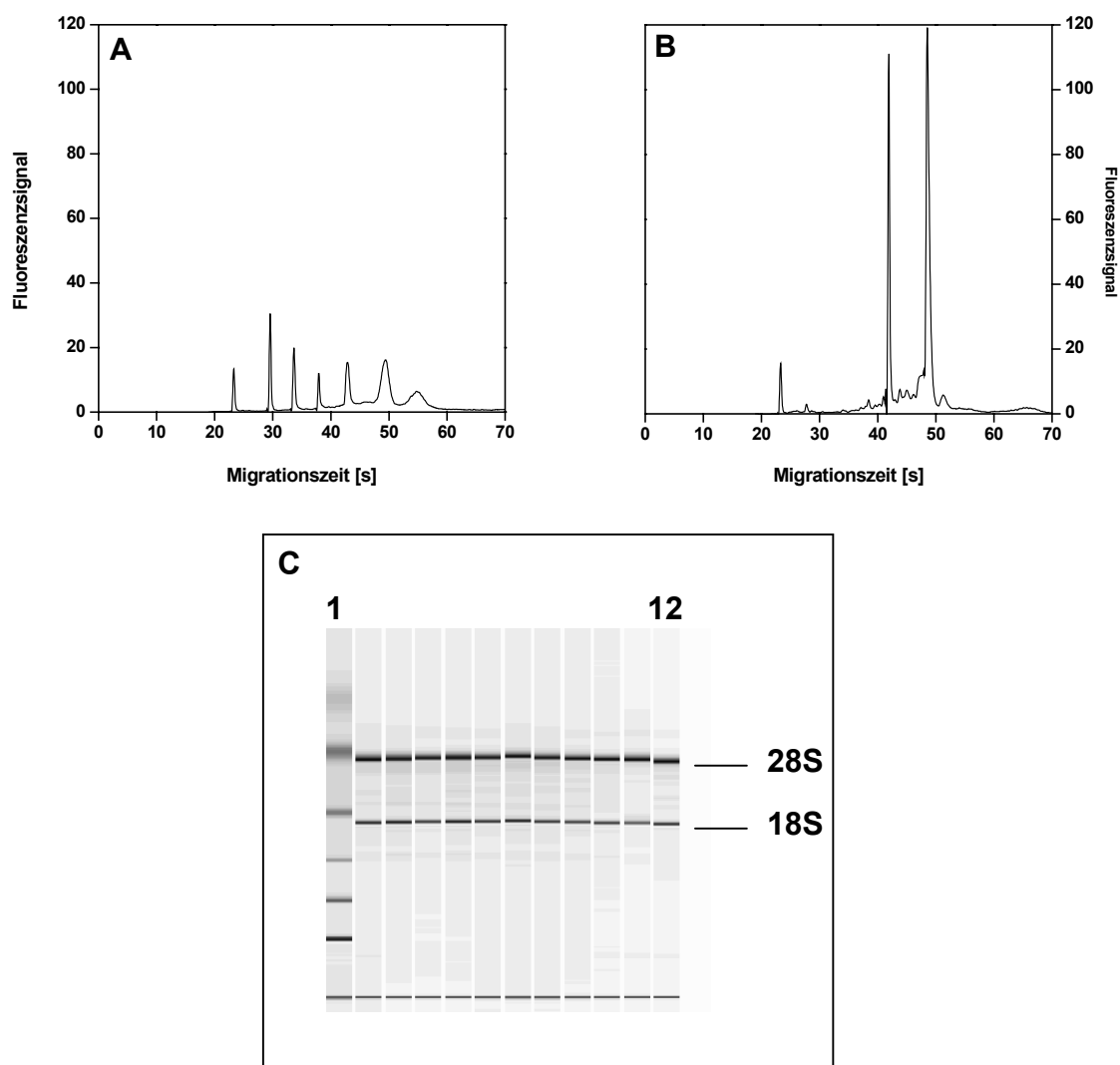


Abb. 5-2: Elektropherogramme und Gelbild nach der Analyse mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer

(A) Elektropherogramm des externen RNA-Standards mit den Fragmentgrößen 0,2, 0,5, 1, 2, 4, und 6 kb. **(B)** Elektropherogramm einer RNA-Probe. **(C)** Gelbild, das aus dem Elektropherogramm der 11 RNA-Proben generiert wurde. Spur 1: externer Standard, Spur 2 – 12: RNA-Proben

5.2.4 cDNA Erststrang-Synthese mittels reverser Transkription

cDNA wurde durch die reverse Transkription der Gesamt-RNA mittels der „SUPERSCRIPT™ II RNase H⁻ reversen Transkriptase“ synthetisiert und direkt in der q-RT-PCR eingesetzt oder bei -20 °C für den späteren Gebrauch gelagert.

Pipettierschema der reversen Transkription:

Komponente	Volumen
Gesamt-RNA	1-5 µg
10 mM dNTP Mix	1 µl
<i>random primer</i> (dN) ₆ , 250 ng/µl	1 µl
RNase-freies H ₂ O	ad 13 µl
10 min Inkubation bei 65 °C	
5 min Inkubation auf Eis	
Reaktionspuffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
15 min Inkubation bei 25 °C	
2 min Inkubation bei 42 °C	
Superscript II	1 µl
Reverse Transkriptase (200 u/µl)	
50 min Inkubation bei 42 °C	
15 min Inkubation bei 70 °C	

5.2.5 Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Für die Quantifizierung der Genexpression durch die *quantitative real time reverse transcription PCR* (q-RT-PCR) wurde aus einer RNA-Probe cDNA synthetisiert (5.2.4). Diese diente als Templat in der q-RT-PCR, in der spezifische Amplikone für die entsprechenden Zielgene gebildet werden. Da die Amplifizierung im Bereich des Plateaus nicht mehr allein von der eingesetzten Menge abhängt, tritt anstelle einer Endpunktbestimmung der Amplikone, wie sie bei der konventionellen PCR durchgeführt wird, die Echtzeitbestimmung der Amplikone mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green. Dieser interkaliert selektiv mit doppelsträngiger DNA und erzeugt dabei ein quantifizierbares Fluoreszenzsignal. Durch Messung der Fluoreszenzintensität am Ende eines jeden Elongationsschritts der PCR lässt


sich die Bildung der Amplikone direkt verfolgen. Der eingesetzte *SYBR-Green Universal PCR Mastermix* (Applied Biosystems) enthält Reaktionspuffer, dNTPs, MgCl₂, AmpliTaq Gold DNA-Polymerase und 2 Fluorophore (SYBRGreen und ROX, letzterer als passiven Referenzfluorophor). Die Primer wurden so ausgewählt, dass die resultierenden Amplikons eine Länge von 80 – 100 bp aufwiesen.

Pipettierschema q-RT-PCR:

Komponente	Volumen
2x SYBR-Green Universal PCR Master Mix	12,5 µl
RT-Templat (cDNA)	1 - 2,5 µl
5'-Primer (5 µM)	3 µl
3'-Primer (5 µM)	3 µl
RNase-freies H ₂ O	ad 25 µl

Die q-RT-PCR wurde mit untenstehendem Temperaturprogramm durchgeführt. Bei der Wahl der Primer mit einer Annealingtemperatur von 60 °C können dabei die Hybridisierung und Elongation in einem Schritt zusammengefasst werden (Vorschrift Applied Biosystems, Darmstadt). Der PCR schloss sich ein Dissoziations-Protokoll an, um sicherzustellen, dass keine Primer-Dimere detektiert wurden.

Temperaturprogramm q-RT-PCR:

Schritt	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95 °C	10 min
40 Zyklen 	Denaturierung	95 °C 15 s
	Hybridisierung/Elongation	60 °C 60 s
	finale Elongation	60 °C 15 min
	Dissoziations-Protokoll	95 °C 15 s
	60 °C	20 s
langsames Aufheizen	60-95 °C	

Die Intensität der SYBR Green Fluoreszenz, die proportional zur amplifizierten Produktmenge ist, wird gemessen und auf die passive Fluoreszenz des ROX-

Referenzfarbstoffs in jedem Zyklus normiert. Die normierte Reporterfluoreszenz R_n wird gegen die Zyklenzahl aufgetragen und der Bereich der PCR festgelegt, in dem die Menge an Amplikon signifikant detektierbar ist und exponentiell ansteigt (Abb. 5-3). An dieser Stelle wird der Schwellenwert bestimmt. Je mehr Template am Anfang der Reaktion in der Probe vorhanden sind, desto weniger Zyklen müssen ablaufen, damit das Signal den Schwellenwert erreicht. Der Zyklus, in dem genügend dsDNA amplifiziert wurde, um diesen Schwellenwert zu erreichen, ist der Schwellenwertzyklus C_t (*threshold cycle*, C_t) der jeweiligen Probe.

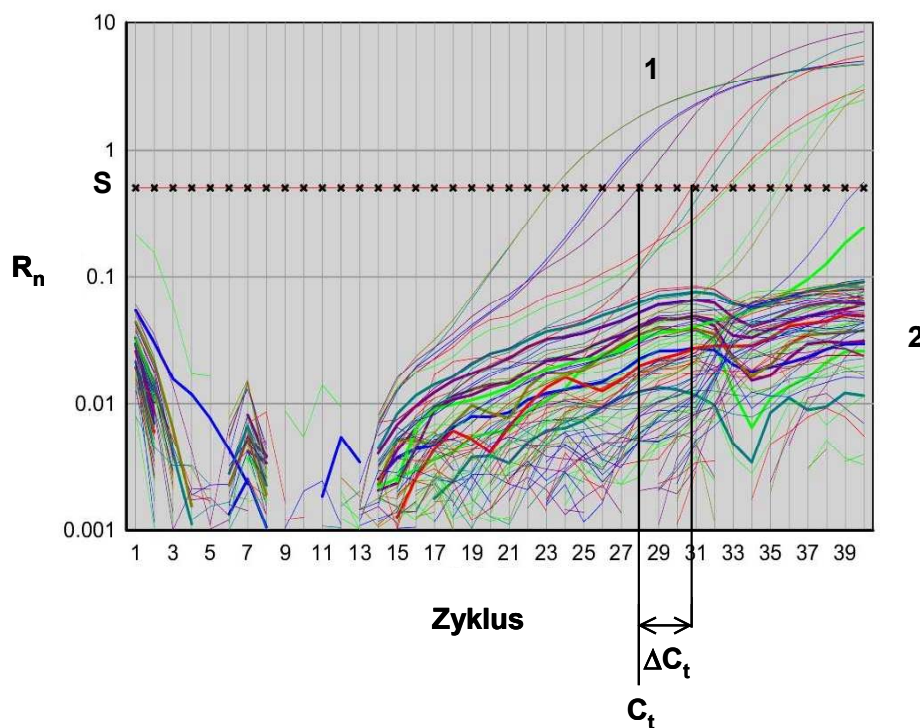


Abb. 5-3: Halblogarithmische Auftragung der Fluoreszenzsignale gegen die Zyklusnummer

Angepasst nach [106]. R_n : normierte Reporterfluoreszenz, S: Schwellenwert, an dem die Menge an Amplikon signifikant detektiert wird und das Fluoreszenzsignal exponentiell ansteigt. **(1)** Proben, deren Fluoreszenzsignale den Schwellenwert überschreiten und somit Amplikone signifikant detektiert werden können. **(2)** Proben, deren Fluoreszenzsignale den Schwellenwert nicht überschreiten und Amplikone nicht signifikant detektiert werden.

Die bei der Normierung der C_t -Werte der Zielgene auf die *Housekeeping* Gene erhaltenen ΔC_t -Werte ($\Delta C_t = C_t^{\text{Zielgen}} - C_t^{\beta\text{-ACT}}$) sind wie die C_t -Werte umgekehrt proportional zum Expressionsgrad des Zielgens. Damit in Darstellungen der Expressionsprofile nicht große Werte für ΔC_t eine geringe Expression des Zielgens widerspiegeln, wurden die $15 - \Delta C_t$ -Werte gebildet. Der Zahlenwert 15 entspricht dem Schwellenwertzyklus der in dieser Arbeit als

Referenz herangezogenem β -ACT. Hohe Werte von $15 - \Delta C_t$ spiegeln somit eine hohe Expression der Zielgene wider. Weiterhin entspricht ein $15 - \Delta C_t$ Wert von 0 einem C_t -Wert des Zielgens von 30. Im Allgemeinen wurden bei der SYBR-Green Detektion für die Negativkontrollen C_t -Werte von 34 bis 38 erhalten. Bei C_t -Werten größer als 30 (einem $15 - \Delta C_t$ Wert kleiner 0) lag also extrem wenig cDNA vor und es kann keine verlässliche Aussage über die Expression mehr gemacht werden. Das Expressionsniveau eines Gens mit einem $15 - \Delta C_t$ Wert bis 5 wurden als niedrig angesehen. Werte zwischen 5 und 10 sowie über 10 standen für eine mittlere bzw. hohe Expression des zugehörigen Gens.

Um die Expression eines Gens zwischen zwei physiologischen zellulären Zuständen (Kontrollzellen (A) und Agonist-behandelten Zellen (B)) zu vergleichen, wurde der $\Delta\Delta C_t$ -Wert ($\Delta C_{t, A} - \Delta C_{t, B}$) berechnet. Die relative Expression der Zielgene ergibt sich aus $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [106]. Ein $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert von 1,0 bedeutet hierbei, dass nicht reguliert wurde. Werte über 1,0 repräsentieren eine Induktion, wohingegen solche unter 1,0 eine Repression des jeweiligen Zielgens anzeigen.

5.2.5.1 Primerdesign und Validierung

Die Primer für die ausgewählten Zielgene wurden mit Hilfe der Primer Express 2.0-Software entworfen. Bevor die neuen Primerpaare jedoch in umfassenden q-RT-PCR Untersuchungen eingesetzt wurden, erfolgte eine Validierung der Primerpaare. Dazu wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Template in der q-RT-PCR eingesetzt und die erhaltenen C_t -Werte gegen die cDNA-Templateverdünnungen aufgetragen. Die so erhaltenen Standardkurven sind in Abb. 5-4 dargestellt. Aus der Auftragung C_t gegen die logarithmischen, seriell verdünnten Templatkonzentration ergibt sich eine Standardgerade. Aus dieser Standardgeraden lässt sich der lineare dynamische Bereich der Templatkonzentration für jedes Primerpaar ablesen, innerhalb dessen korrekte C_t -Werte erhalten werden (Applied Biosystems *user bulletin no. 5*). Durch den linearen Bereich wird eine Ausgleichsgerade gelegt, aus deren Steigung m darüber hinaus nach Gleichung (3) die Effizienz E eines jeden Primerpaares bestimmt werden kann [107].

$$E = 10^{(-1/m)} - 1 \quad (\text{Gl. 3})$$

Eine Effizienz von 100 % wird also bei Steigungen von $m = -3,322$ erhalten. Falls die berechnete Effizienz eines Primerpaares kleiner als 90 % oder größer als 110 % waren, wurde erneut ein Primerdesign durchgeführt.

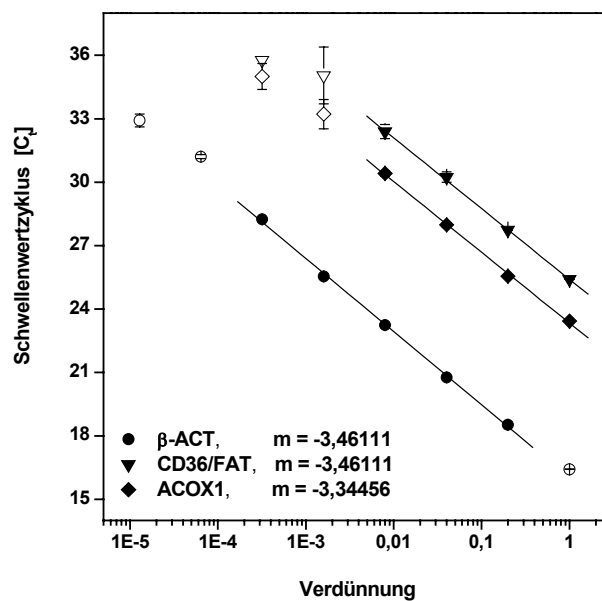


Abb. 5-4: Kalibrationsgeraden ausgewählter Primerpaare für die Validierung neu entworfener Primer

Standardkurven dreier ausgewählter Primerpaare nach einer q-RT-PCR mit serieller Verdünnung des cDNA-Templats. Durch den linearen Bereich wurde eine Ausgleichsgerade gelegt und deren Steigung berechnet, mit der sich die Effizienz der PCR mit Hilfe der Gleichung 3 berechnen lässt. β-ACT: ● linearer Bereich ○ nicht-linearer Bereich ; ACOX1: ■ linearer Bereich □ nicht-linearer Bereich; CD36/FAT: ▼ linearer Bereich ▽ nicht-linearer Bereich).

5.3 DNA-Chips

5.3.1 Aktivierung der Chipoberfläche

Die einzelsträngigen DNA-Fangsonden wurden auf aktivierten Glasobjektträgern im Standardformat von 25 mm x 75 mm x 1 mm immobilisiert. Dafür wurde eine in der Literatur beschriebene Standardmethode zur Herstellung von Oligonukleotid-Arrays für DNA-Chips [108, 109] in leicht veränderter Form angewendet. Die mit Ethanol vorgereinigten und mit einem Gravurgerät markierten Glasobjektträger wurden zunächst mit einer Mischung aus gleichen Teilen Methanol und konz. Salzsäure und anschließend in konz. Schwefelsäure chemisch gereinigt. Für alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden 15 cm x 6,5 cm x 4 cm große Glasschalen benutzt, die jeweils 4 Objektträger aufnehmen konnten. Nach Waschen mit H₂O und Methanol wurde die Oberfläche mit 3 % (v/v) 3-[2-(2-Aminoethylamino)-ethylamino]-propyl-trimethoxysilan in Methanol silanisiert. Es folgte das Waschen der

Objektträger in Methanol und Tempern bei 110°C. Anschließend wurde die Oberfläche mit dem bifunktionellen vernetzer Phenyl-diisothiocyanat (10 mg/ml in einer Lösung von 10 % (v/v) Pyridin in Dimethylformamid (DMF)) aktiviert (Abb. 5-5). Die Glasobjektträger wurden daraufhin mit DMF und Dichlorethan gewaschen, im Stickstoff- oder Druckluftstrom trocken geblasen und entweder unter Trockenmittel bei -20°C gelagert oder sofort weiter verwendet.

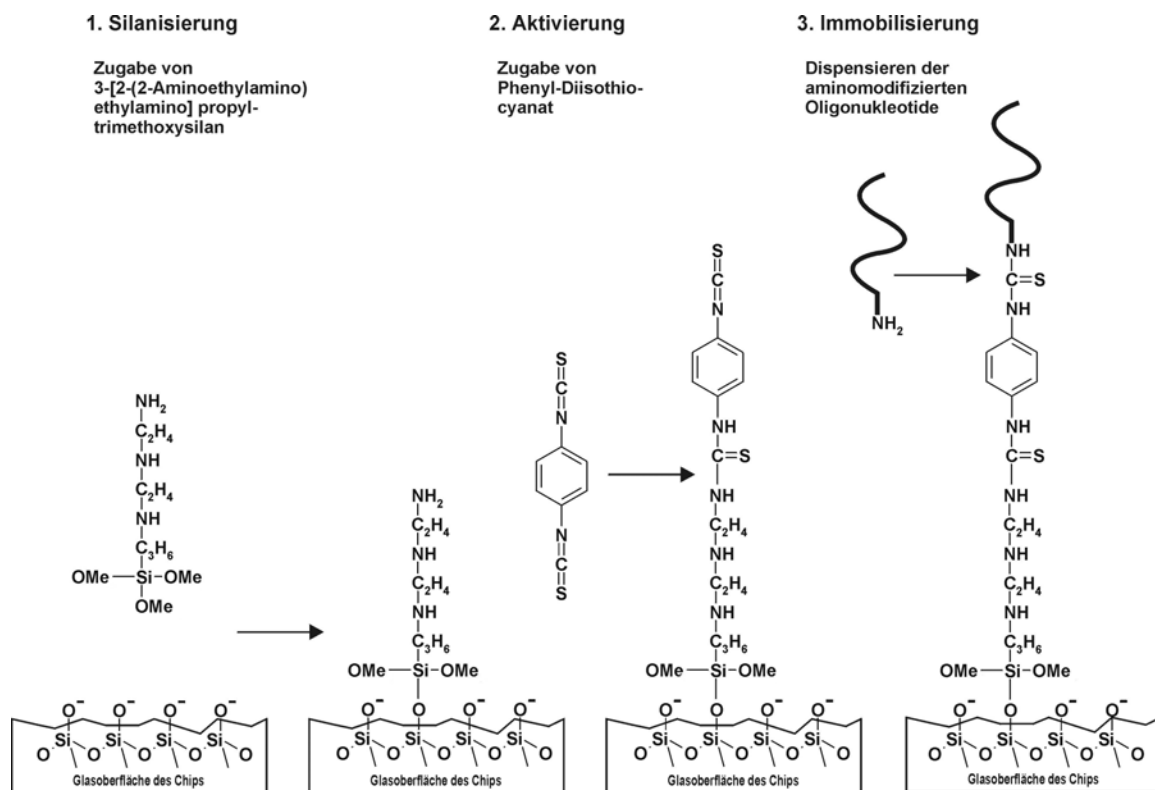


Abb. 5-5: Chemische Aktivierung der Glasoberfläche

Die Anbindung der DNA-Fangsondemoleküle erfolgte im nächsten Schritt durch Reaktion der Aminogruppe am 5'-Ende der Oligonukleotide mit der freien funktionellen Gruppe des Vernetzers unter Ausbildung einer kovalenten Bindung.

5.3.2 Immobilisierung der Fangsonden auf der aktivierten Chipoberfläche

5.3.2.1 Immobilisierung mit dem Nano-Plotter

Die DNA-Fangsonden lagen in der Regel in einer Konzentration von 5 µM in wässriger Lösung vor und wurden mittels eines Dispensers (Nano-Plotter, GeSiM, Großerkmannsdorf)

orts aufgelöst in definierten Arrays kontaktfrei auf der Glasoberfläche abgelegt. Ein Sonden $spot$ entstand dabei üblicherweise aus einem Volumen von ca. 2 nl Sondenlösung und hatte einen Durchmesser von 0,25 mm. Der Abstand zwischen den einzelnen $Spots$ des Array betrug 0,7 mm. Zusätzlich wurde in jedem Array ein 3'-Cy5-markiertes Oligonukleotid als Positionsmarker immobilisiert, wobei die Konzentration hier nur 2 μ M betrug. In der Regel wurden 2 Sondenarrays in solch einem Abstand auf einen Chip aufgetragen, dass bei der nachfolgenden Hybridisierung ein Vermischen der beiden Probenlösungen nicht möglich war (Abb. 5-6).

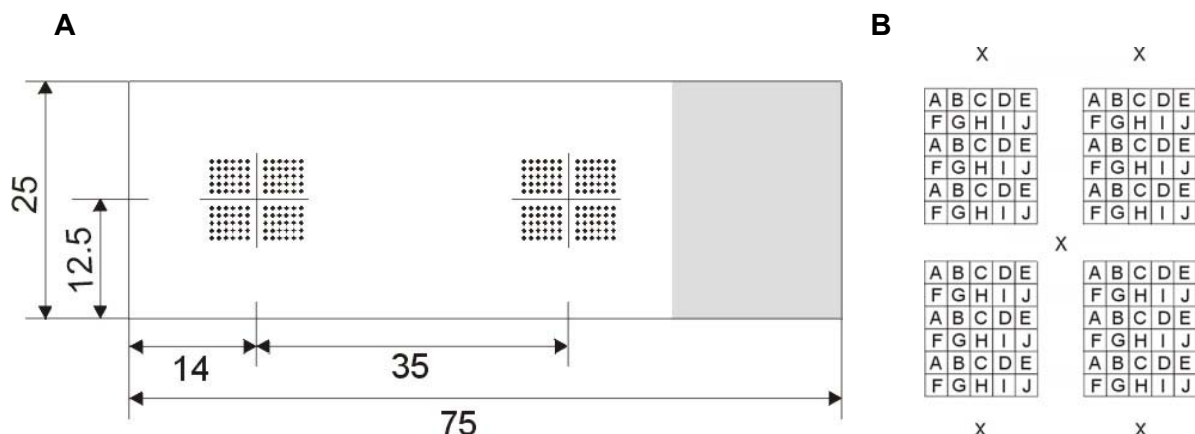


Abb. 5-6: Beispielhafte Darstellung zweier Arrays auf einem Chip

(A) Abmessungen eines Chips und Positionen der dargestellten Arrays auf dem Chip (in mm).

(B) Vergrößerung eines Array, die die Sondenbelegung der einzelnen Positionen im Array beschreibt. Die Buchstaben stehen für die verschiedenen Sonden. X steht für den Positionsmarker, der auch innerhalb des Array positioniert werden kann.

Nach der Immobilisierung erfolgte eine Inkubation der Chips über Nacht bei 37°C in einer Feuchtbox. Im Anschluss daran wurden die überschüssigen reaktiven Gruppen bei 37°C durch Reaktion mit 6-Aminohexansäure (1 % (w/v) in 100 mM Natriumcarbonat, pH 8.5) deaktiviert, bevor die Oberfläche zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen bei Raumtemperatur durch Inkubation in 1x Rotiblock geblockt wurde. Nach Waschen mit Reinst-Wasser und Trocknen im Stickstoffstrom wurden die Chips bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

5.3.2.2 Immobilisierung mit dem Affymetrix[®] 417[™] Arrayer

Um einen höheren Durchsatz bei der Herstellung der Arrays zu erreichen, wurden die Sonden mit dem Affymetrix[®] 417[™] Arrayer auf den aktivierten Glasobjektträgern abgelegt. Dieser Arrayer ermöglicht die Herstellung von bis zu 42 Chips in einem Arbeitsgang, wobei die Pin- und Ring-[™] Technologie angewendet wird. Oberflächenspannung und

Oberflächenenergie werden ausgenutzt, um ein Aliquot der Sondenlösung (typischerweise 5 μM in H_2O) aus der Mikrotiterplatte aufzunehmen und als Film in dem Ring zu halten. Die Sonde wird auf den Objektträger abgelegt, indem die Nadel durch die Flüssigkeit im Ring hindurchstößt, dabei einen Mikro-Tropfen mitreißt und auf der Oberfläche absetzt. Auch bei dieser Methode der Sondenimmobilisierung wurden in der Regel zwei Arrays pro Objektträger aufgetragen (Abb. 5-7) und die Chips wie beschrieben deaktiviert und geblockt.

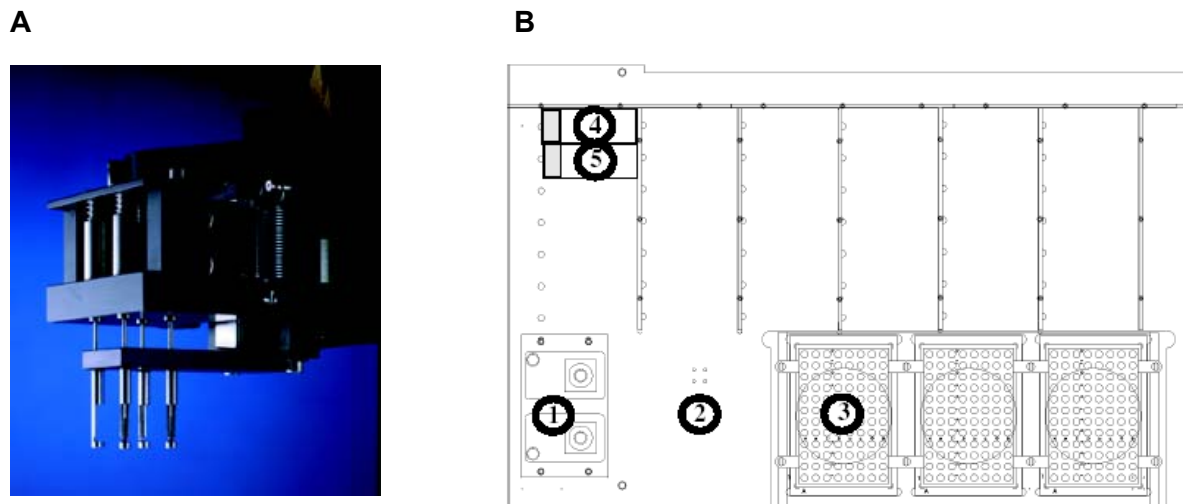


Abb. 5-7: Affymetrix@417™ Arrayer

(A) Ring-Pin-Konstruktion des Arrayers zum gezielten Auftragen der Sondenlösungen auf die aktivierten Chips. (B) Arbeitsweg des Spotters: An Position 1 werden die Nadeln mit H_2O gewaschen und anschließend bei 2 durch Absaugen getrocknet. In Position 3 befindet sich eine 96-Well Mikrotiterplatte, in die die Ringe eintauchen und Sondenlösungen aufnehmen, bevor die Positionen 4 und 5 angefahren werden, an denen sich die aktivierten Chips befinden. Bis zu 40 zusätzliche Chips können im Anschluss an die letzten beiden Positionen eingelegt werden .

5.3.3 Qualitätskontrolle des Immobilisierungsvorgangs

Der Vorgang der Immobilisierung, d.h. ob die Sonden tatsächlich auf der Chipoberfläche angebonden haben, wurde durch eine Kontrollhybridisierung mit Cy5-markierten *random nonameren* (Cy5-N_9) überprüft. Dazu wurde eine 0,5 μM Lösung der Cy5-N_9 in 5x SSC mit 0,01 % Tween auf einen Chip aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtbox inkubiert. Nach einem Waschschrift (5 min 2x SSC/0,1 % SDS, 5 min 0,5x SSC) erfolgte die Analyse der Hybridisierung im Arrayscanner. Zusätzlich diente der Positionsmarker zur Kontrolle für die Immobilisierung. Nach Anregung im Arrayscanner sollte also an der Stelle dieses Positionsmarkers auch vor der Hybridisierung mit Ziel-DNA ein Fluoreszenzsignal detektiert werden.

5.3.4 Markierung der Ziel-DNA

5.3.4.1 Polymerase Kettenreaktion

Die *polymerase chain reaction* (PCR) erlaubt die selektive Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen aus einer beliebigen DNA-Population [110]. Dabei wird die Selektivität durch zwei Oligonukleotide (Primer) erreicht, die komplementär zu den Enden der Zielsequenz sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR eingesetzt, um fluoreszenzmarkierte Ziel-DNA für Hybridisierungsoptimierungen auf den DNA-Chips herzustellen. Dazu war der *reverse*-Primer am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff, hier Cy5, markiert. Die Sequenz der zur Markierung eingesetzten Primer ist in Tab. 5-2 angegeben.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:

Lösung	Volumen [μ l]	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	2,5	
dNTP (2,5 mM)	2	0,2 mM
Primer 1 (5 μ M)	2	0,4 μ M
Primer 2 (5 μ M)	2	0,4 μ M
Taq-Polymerase	0,1	0,02 U/ μ l
DNA-Templat (cDNA)	1	ca. 2 ng/ μ l
H ₂ O		ad 25 μ l

Temperaturprogramm der PCR:

Schritt		
30-35 Zyklen	initiale Denaturierung	3 min 94 °C
	Denaturierung	30 s 94 °C
	Hybridisierung	30 s T _{Hyb}
	Elongation	60 s 72 °C
	finale Elongation	3 min 72 °C
	Aufbewahren	4 °C

Der Erfolg der PCR wurde in einer anschließenden Gelelektrophorese (Kap. 5.3.4.2) kontrolliert. Bei einer einzelnen Bande der erwarteten Größe im Gel wurden mehrere PCR-Ansätze vereinigt und für den Einsatz als Ziel-DNA mit dem „Nucleotide-Purification Kit“ aufgereinigt. Die Konzentration der Probe wurde anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt (1 OD_{260 nm} = 50 μ g / ml).

5.3.4.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch durch Trennung nach ihrer Größe mittels vertikaler PAGE analysiert. Für die Differenzierung zwischen Fragmentgrößen von ca. 30-500 bp wurde standardmäßig die folgende Zusammensetzung des Gels gewählt: 10 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisch (37,5:1), 0.2 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin, 0.08 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat, 1x TBE. Die Gele mit 10 Taschen wurden in Glaskassetten der Größe 8,5 cm x 7,5 cm x 0,1 cm hergestellt. Üblicherweise wurden 2 oder 3 µl PCR-Produkt mit 1 µl Beladungspuffer sowie der pUC19-DNA-Marker als Referenz im Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese in 1x TBE wurde das Gel ca. 2 min in einer Färbelösung (0,5 µg/ml Ethidiumbromid) und im Anschluss 10 min in einem Wasserbad inkubiert, bevor die DNA-Banden dann im UV-Licht (Transilluminator) sichtbar gemacht wurden.

5.3.4.3 Markierung der cDNA durch den Einbau Cy5- / Cy3-markierter dUTPs

Im Verlauf des Projektes sollten differentiell exprimierte Gene in unterschiedlichen Zellkulturmodellen identifiziert werden. Dies geschah über die Bildung der Verhältnisse der vorhandenen mRNA-Mengen in Kontroll- und behandelter Gruppe. Zur Detektion auf den DNA-Chips kann nicht direkt die mRNA eingesetzt werden, da eine fluoreszenzmarkierte Ziel-DNA benötigt wird. Dazu wurde aus den behandelten bzw. isolierten Zellen die Gesamt-RNA isoliert (Kap. 5.2.1). In der folgenden reversen Transkription mit Oligo-dT-Primern, die an das Poly-A-Ende eukaryotischer mRNA anbinden, wurde die mRNA in diesem Schritt in cDNA umgeschrieben. Durch den Einsatz Cy5- bzw. Cy3-markierter dUTPs im Reaktionsmix wurde die cDNA fluoreszenzmarkiert, da diese, wenn auch mit geringerer Effizienz, von der Reversen Transkriptase in die entstehende cDNA eingebaut wurden. Der letzte Schritt ist eine Aufreinigung des Reaktionsansatzes mittels des *QIAquick PCR-Purification Kits* (*Qiagen*, Hilden), um überschüssige Nukleotide, Enzym und Salze abzutrennen.

Pipettierschema der reversen Transkription mit Cy5- / Cy3-dUTPs:

Komponente	Volumen
Gesamt-RNA (50 µg)	17,5 µl
Oligo-dT-Primer (1µg/µl)	1 µl
10 min Inkubation bei 65 °C	
10 min Inkubation bei Raumtemperatur	
2 min Inkubation auf Eis	
Reaktionspuffer	8 µl
dNTP-Mastermix für RT mit Cy5-/Cy3-dUTPs	4 µl
Cy3- oder Cy5-dUTP (1 mM)	4 µl
DTT (0,1 M)	4 µl
Superscript II	
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1,5 µl
120 min Inkubation bei 39 °C	
NaOH (1 M)	10 µl
10 min Inkubation bei 65 °C	
HCl (1 M)	10 µl
TE-Puffer (1 M)	200 µl

Nach der Aufreinigung wurden Menge und Qualität (der Markierungsgrad der erhaltenen cDNA) mittels UV-VIS Spektroskopie ermittelt (ssDNA: $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 33 \text{ µg/ml}$, Cy3: $\epsilon_{550 \text{ nm}} = 150000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bzw. Cy5: $\epsilon_{649 \text{ nm}} = 250000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Die Ausbeute dieser Methode lag bei 1 – 1,5 µg markierter cDNA mit einer Einbaurrate von einem Farbstoffmolekül pro 60 bis 90 Nukleotiden. Ein Beispiel für die erhaltenen Spektren zeigt Abb. 5-8. Ein Nachteil dieser Methode ist die mit 50 µg große Menge an RNA, die eingesetzt werden muss. Sollen klinische Proben, wie Mikrodissektionen oder aus einem limitierten Volumen Blut isolierte Monozyten untersucht werden, ist es nahezu unmöglich solch hohe RNA-Mengen zu erhalten.

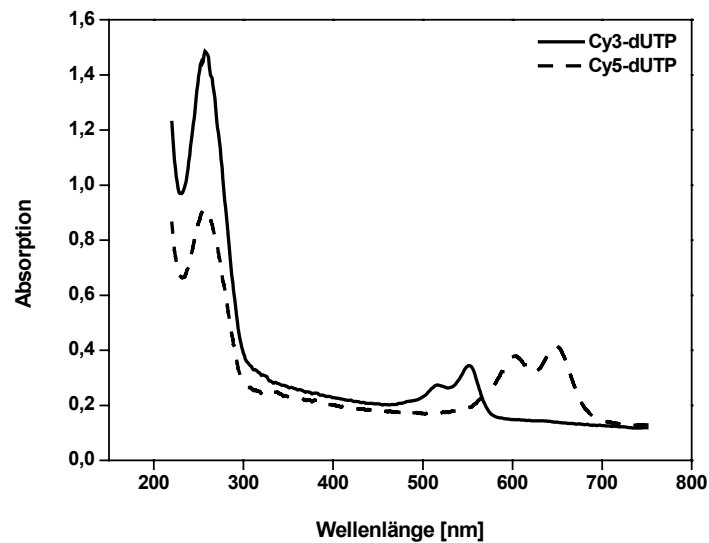


Abb. 5-8: Spektren der Cy5- und Cy3-markierten cDNAs

5.3.4.4 Markierung der cDNA durch den Einbau von Amino-allyl-dUTPs

Die in 5.3.3.3 beschriebene Methode der cDNA-Markierung benötigte mit 50 µg eine große Menge Ausgangsmaterial. Diese konnte auf 20 µg reduziert werden, indem Amino-allyl-dUTPs (aa-dUTPs) zum Reaktionsmix der reversen Transkription zugefügt wurden. Diese werden durch das Enzym aufgrund ihrer geringeren Größe besser in die cDNA eingebaut als fluoreszenzmarkierte Nukleotide. Nach einem Aufreinigungsschritt in Microcon-YM 30 Konzentratoren, in dem Salze und Nukleotide entfernt wurden, wurde die cDNA-Lösung in einer SpeedVac eingengt, um sie anschließend in einem geeigneten Volumen in der eigentlichen Markierungsreaktion einsetzen zu können. Während der Kopplungsreaktion reagieren die in die cDNA eingebauten Amino-allyl-Gruppen mit N-Hydroxysuccinimid-aktiviertem Cy5 oder Cy3 (Abb. 5-9). Nach erneuter Aufreinigung zur Entfernung überschüssiger Farbstoffmoleküle (*QIAquick PCR-Purification Kit*), erfolgte die Qualitätskontrolle der erhaltenen Ziel-DNA ebenfalls mittels UV-VIS-Spektroskopie. Hier wurden aufgrund der erhöhten Einbaurrate der aa-dUTPs Markierungsgrade von einem Farbstoffmolekül pro 25 – 60 Nukleotiden erhalten. Die Ausbeute lag ebenfalls bei 1 – 1,5 µg cDNA .

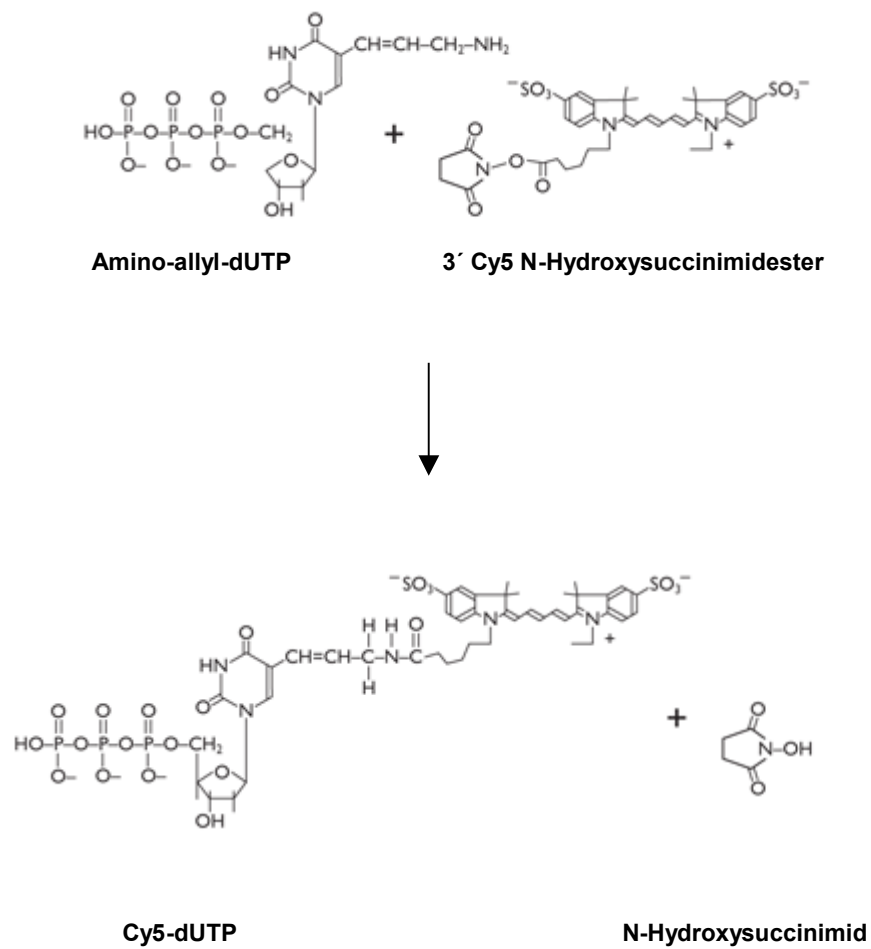


Abb.: 5-9: Kopplungsreaktion des Amino-allyl-dUTP mit dem aktivierten N-Hydroxysuccinimid-ester des Fluoreszenzfarbstoffs Cy5 (nach www.ambion.com/techlib/resources/microarray/basics4.html)

Pipettierschema der reversen Transkription mit aa-dUTPs:

Komponente	Volumen
Gesamt-RNA (20 µg)	10 µl
Oligo-dT-Primer (1µg/µl)	1 µl
10 min Inkubation bei 65 °C	
5 min Inkubation bei Raumtemperatur	
5 min Inkubation auf Eis	
Reaktionspuffer	4 µl
dNTP-Mastermix für RT mit aa-dUTPs	2 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
Superscript II	1 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	
120 min Inkubation bei 42 °C	
NaOH (1 M)	5 µl
10 min Inkubation bei 65 °C	
HCl (1 M)	10 µl
HEPES (1 M)	12 µl
Aufreinigung mittels Microcon-YM 30 Konzentratoren	

Pipettierschema der Farbstoffkopplung:

Komponente	Volumen
cDNA	7,5 µl
aktivierter Fluoreszenzfarbstoff (resuspendiert in 15 µl NaHCO ₃ , 0,1 M)	7,5 µl
60 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln	
Hydroxylamin-HCl (4 M)	5 µl
15 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln	
Aufreinigung mittels des <i>QIAquick PCR-Purification Kits</i>	

5.3.5 Hybridisierung

Die eigentliche Hybridisierung der markierten cDNA-Proben erfolgte klassisch unter einem Deckglas. Neuerdings werden jedoch verstärkt Hilfsmittel wie Hybridisierungsrahmen angeboten. In dieser Arbeit kamen beide Verfahren zur Anwendung.

5.3.5.1 Hybridisierung unter dem Deckglas

Für die Hybridisierung unter dem Deckglas wurden außer der markierten cDNA auch Oligonukleotid- und PCR-Produkt-Ziel-DNA eingesetzt, die entweder mit den Fluorophoren Cy3 oder Cy5 markiert waren. Dabei wurden PCR-Produkte vierfach in den jeweiligen Hybridisierungspuffern verdünnt. Bei Oligonukleotidlösungen erfolgte die Verdünnung entsprechend der gewünschten Endkonzentration. Die Lösungen aus den cDNA-Markierungsreaktionen wurden in der SpeedVac nahezu bis zur Trockenheit eingengt und in Hybridisierungspuffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf die Arrays wurden PCR-Produkte und cDNA 5 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis mindestens 1 min abgeschreckt. Zur genauen Positionierung der Lösung auf dem Array mit den immobilisierten Sonden wurde der Glasobjektträger auf eine entsprechende Schablone aufgelegt und 13 µl der Probenlösung mit einer Pipette mittig auf den Array aufgebracht. Die Probenlösung auf dem Array wurde dann mit einem zuvor mit Ethanol gereinigten 22 mm x 22 mm-Deckgläschen bedeckt und der Chip in einer Feuchtbox für 1 h bei 37 °C inkubiert, im Fall der Hybridisierung mit PCR-Produkten. Die Inkubationszeit betrug im Fall markierter cDNA in der Regel 18 bis 20 h bei 42 °C. Das Verhältnis Fläche des Deckgläschens/Volumen der aufzutragenden Probe musste sorgfältig optimiert werden, um einerseits (bei zu kleinem Volumen) das Austrocknen an den Rändern und andererseits (bei zu großem Volumen) das Verrutschen des Deckgläschens zu verhindern. Zur Entfernung der ungebundenen Ziel-DNA-Moleküle wurde der Chip anschließend in einer Schale bei Raumtemperatur jeweils 5 min dreimal unter Erhöhung der Stringenz gewaschen (2x SSC / 0.1 % SDS; 1x SSC / 0.1 % SDS; 0.5x SSC). Nach einem letzten Waschschrift unter fließendem Reinstwasser für ca. 10 s wurde der Chips im Stickstoff- oder Druckluftstrom getrocknet und bis zur Analyse mit dem Mikroarray-Scanner bei 4 °C in einer Objektträgerbox oder einer Plastik-Petrischale gelagert.

5.3.5.2 Hybridisierung mit einem Hybridisierungsrahmen

Eine weitere Möglichkeit der Hybridisierung ist die Anwendung eines doppelseitig klebenden Hybridisierungsrahmens, der um den Bereich des Array aufgeklebt wird. Dies gewährleistet ein konstantes Probenvolumen (z.B. 120 µl oder 240 µl) während der Inkubation, ein Verlaufen der Hybridisierungslösung wird verhindert. Vor dem Auftragen wurde die markierte cDNA wie oben beschrieben denaturiert und anschließend an einer Seite des Rahmens

aufpipettiert. Durch Auflegen und Fixieren einer Folie entstand eine dichte Hybridisierungskammer. Die Inkubation erfolgte wiederum in einer Feuchtbox, in der Regel über Nacht bei 42 °C in einem Inkubator mit integriertem Schüttler. Es wurde eine Schüttelgeschwindigkeit von 80 rpm eingestellt, um eine gleichmäßige Verteilung der Probenlösung auf dem Array zu unterstützen. Nach der Inkubation wurden die Hybridisierungsrahmen entfernt und die Chips wie beschrieben gewaschen und getrocknet.

5.3.6 Analyse der Chips

Die hybridisierten DNA-Chips wurden mit einem GMS418 Mikroarray-Scanner (MWG Biotech, Ebersberg) in der Serviceeinheit „Integrierte funktionelle Genomik“ des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung der Universität Münster analysiert. Das Gerät ermöglicht die Anregung der Fluorophore Cy3 und Cy5 durch zwei integrierte Laserquellen der Wellenlängen 532 bzw. 635 nm und detektiert die emittierte Fluoreszenzstrahlung mittels eines Photomultipliers (*photomultiplier tube*, PMT). In dieser Arbeit wurde sowohl mit dem grünen Laser bei 532 nm als auch mit dem roten Laser bei 635 nm gearbeitet. Mit Hilfe der Software *GMS418 ArrayScanner* wurden die Messungen gesteuert und die Fluoreszenzbilder aufgenommen. Für eine Messung wurde ein einzelner Chip in den Zufuhrschacht des Gerätes gelegt, automatisch eingezogen und mit den eingestellten Parametern durchmustert. Variabel waren dabei die Laserleistung (*laserpower*, LP), die Verstärkung (*gain*) des Photomultipliers sowie die Größe der durchmusterten Oberfläche zu wählen. Wenn nicht anders vermerkt, wurde mit 100 % LP durchmustert, während die prozentuale PMT-*gain*-Einstellung je nach Intensität der hybridisierten Sonden*spots* angepasst wurde, um eine Sättigung der intensiveren Signale zu vermeiden. Die erhaltenen Bilder wurden im 16Bit-Graustufenformat als *tif*-Dateien gespeichert.

5.3.7 Auswertung der Hybridisierungsbilder

5.3.7.1 Einfarbenexperimente mit kleineren Arrays

Die Auswertung der am Mikroarrayscanner erhaltenen Bilder kleinerer Arrays erfolgte mit der Software *GenePix Pro8™* (Axon Instruments, Foster City, USA), die als Demo-Version zur Verfügung stand. Sie gliedert sich in verschiedene Benutzeroberflächen und ist grundsätzlich für die Analyse der Mikroarrays, deren Fluoreszenzmuster auf Basis zweier Wellenlängen mit beliebigen Arrayscannern erhalten wurden, geeignet. In dieser Arbeit wurden die Bilder zunächst im Anwendungsfenster „*Image*“ geöffnet und durch Bildbearbeitung wie Helligkeit, Kontrast oder Falschfarbendarstellung optimal visualisiert. Anschließend wurde ein dem Format des Array auf dem Chip entsprechendes Raster über dem Bild positioniert und

automatisch vom Programm optimal an den tatsächlich leuchtenden Sondenspots ausgerichtet (*Align grid*). Mit der „Analyze“-Funktion wurden dann die Daten für jeden einzelnen *Spot* innerhalb des Rasters berechnet und im „Results“-Fenster dargestellt. Dabei wurden zum einen die Mittelwerte der *Spot*intensitäten innerhalb der angepassten Kreisfelder berechnet (z.B. *F2Mean* für Cy5). Zum anderen wurde als Hintergrundintensität eines *Spots* der Mittelwert über alle Pixel innerhalb der kreisförmigen Umgebung eines *Spots* gebildet (z.B. *B2Mean* für Cy5), wobei die Grenze dieses Umgebungsbereiches durch den dreifachen Durchmesser des jeweiligen Kreisfeldes bestimmt war und benachbarte *Spots* ausgeblendet wurden. Die ermittelten Werte wurden ebenso wie die hintergrundkorrigierten Werte ($F2Mean - B2Mean$) den jeweiligen Positionen im Raster zugeordnet und in einer Tabelle ausgegeben.

5.3.7.2 Zweifarben-Experimente

In Zweifarben-Experimenten wurde nach der Auswertung im Arrayscanner jeweils ein Bild für den Cy5- und Cy3-Kanal erhalten. Diese wurden wie beschrieben in einem Auswertungsprogramm (GenePixPro oder ScanAlyze 2.5, frei zugänglich unter <http://rana.ibl.gov/EisenSoftware.htm>) übereinander gelegt und die Fluoreszenzsignale sowie der lokale Hintergrund für jeden *Spot* berechnet (Abb. 5-10). Routinemäßig wurden die Cy3- und Cy5-Signale in dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel weiter verarbeitet. Die Hintergrundkorrektur sowie die beschriebene globale Normierung wurden durchgeführt und danach die Verhältnisse der beiden Fluoreszenzsignale für jede Sonde berechnet. Sonden, die nach der Normierung ein Verhältnis über 2 aufwiesen, repräsentieren induzierte, solche mit Verhältnissen unter 0,5 reprimierte Gene.

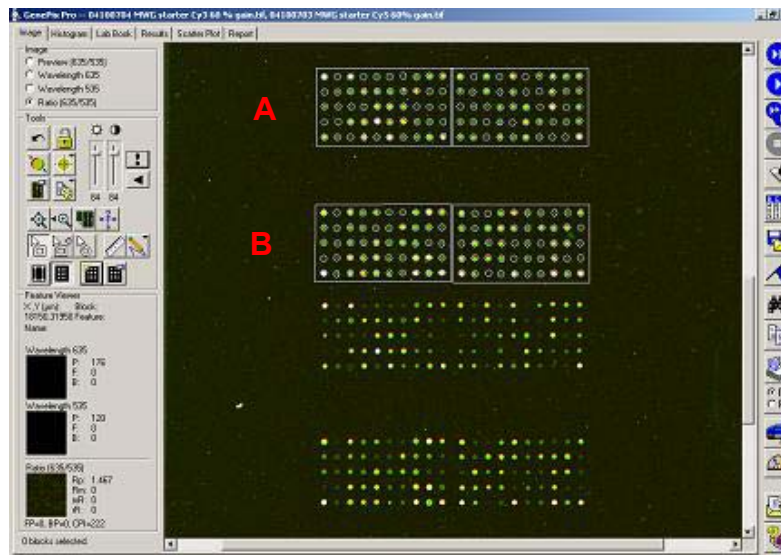


Abb. 5-10: Positionierung eines Rasters auf dem Fluoreszenzbild eines hybridisierten Array
Dargestellt sind die beiden im Auswertungsprogramm GenePixPro übereinandergelegten Fluoreszenzbilder der beiden Fluorophore eines Zweifarben-Experiments, die auf einem Mitteldichte-Chip durch die Hybridisierung der Fluorophor-markierten Ziel-DNAs mit den Fangsonden fixiert sind. Auf einem Teil des Bildes wurden Raster angepasst (A), die die Positionen der zu berechnenden Fluoreszenzsignale festlegen. Auf dem anderen Teil fehlt dieses Raster noch (B).

5.4 Zellkultur und zellbiologische Methoden

Die speziellen Arbeitsabläufe in der Zellkultur, wie die Handhabung und das Sterilisieren der Pipetten und Puffer, um das Risiko von Kontaminationen zu minimieren wurden, wie bei Rump [111]. beschrieben durchgeführt

5.4.1 Mediumwechsel und Passagieren der Zellen

Sowohl adherente (HepG2) als auch Suspensionszellen (THP-1) wurden in Kulturflaschen mit Filterdeckeln (75 cm², T75) kultiviert. Nach 3-4 Tagen wurde das verbrauchte Medium durch frisches ersetzt. Die THP-1 Zellsuspension wurde dazu in sterile 50 ml Greiner Röhrchen überführt und 5 min bei 1800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine neue Kulturflasche gefüllt. Für den Mediumwechsel bei den adherenten HepG2-Zellen und THP-1-Makrophagen wurde lediglich das verbrauchte Medium entfernt und durch frisches ersetzt.

Hatten die THP-1-Zellen eine Dichte von 4×10^6 Zellen/ml erreicht (Bestimmung mittels der Neubauer Zählkammer), wurden sie entweder für nachfolgende Experimente in kleinere Schalen (T25, 6-Well-Platten) ausgesät oder aber 1:5 bis 1:3 geteilt und in T75-Flaschen

weiterkultiviert. Konfluente HepG2-Zellen wurden durch Trypsinierung von der Kulturflasche abgelöst und wie bei Rump [111] beschrieben ausgesät oder in unterschiedlichen Verhältnissen weiterkultiviert.

5.4.2 Differenzierung der THP-1-Zellen

Für die Differenzierung der THP-1-Zellen zu Makrophagen, wurden $0,7 \times 10^6$ Zellen/ml in THP-1-Differenzierungsmedium in T75- (15 ml) oder T25-Flaschen (5 ml) ausgesät. Nach 4 Tagen wurden die adherenten THP-1-Makrophagen in den weiteren Experimenten eingesetzt.

5.4.3 Fütterungsexperimente und Zellernte

Für Fütterungsexperimente mit Makrophagen wurde zunächst das verbrauchte Differenzierungsmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Frisches FKS-freies Medium mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und β -Mercaptoethanol wurde zu den Zellen gegeben. Die in DMSO gelösten Agonisten wurden anschließend in den entsprechenden Konzentrationen ins Medium (DMSO-Konzentrationen 0,2 – 1 % (v/v)) gegeben. Um toxische Effekte durch höhere Konzentrationen einiger Fettsäuren zu vermeiden, wurde BSA im molaren Verhältnis von 1:5 zugefügt. Dadurch lagen die Fettsäuren überwiegend in gebundener Form als Komplexe mit BSA vor. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und mit RLT-Puffer (Qiagen, Hilden) lysiert. Das Zelllysat wurde bei -70°C gelagert oder die Gesamt-RNA, wie in Kap. 5.2.1 beschrieben, sofort isoliert.

5.4.4 Lagerung der Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden die kultivierten Zellen ($1 - 3 \times 10^6$) in einer Lösung von 70 % RPMI-Basismedium, 20 % FKS und 10 % DMSO resuspendiert, in einem Kryoröhrchen langsam in einem speziell isolierten Behälter bei -70°C abgekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

5.4.5 Durchführung der Interventionsstudie

Die Interventionsstudie wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Jahreis (Institut für Ernährung, Friedrich Schiller Universität Jena) geplant und durchgeführt. An der 8-wöchigen Interventionsstudie nahmen 24 gesunde Probanden mit einem mittleren Alter von 24 ± 2 Jahren und einem *body mass index* (BMI) von $21 \pm 2 \text{ kg/m}^2$ teil. Während der gesamten Zeit

mussten die Probanden eine Basisdiät einhalten, die arm an Wiederkäuer-Fett war, d.h. wenig bis kein Rind- oder Schaffleisch und deren Produkte, sowie Milch und Milchprodukte enthielt. Getestet wurde die Wirkung der 11*trans*-Vaccensäure (tVA). Diese Fettsäure wurde der Testgruppe (6 weibliche und 6 männliche Teilnehmer) als Testöl, bestehend aus einem Triacylglyceringemisch, dessen Fettsäuren 30 % 11*trans*-, 31 % 12*trans*-, 13 % 11*cis*- und 12 % 12*cis*-Isomer der Vaccensäure enthielt, verabreicht. Ebenso erhielt die Kontrollgruppe (6 weibliche und 6 männliche Teilnehmer) ein Placeboöl, bestehend aus einem Gemisch aus Raps- und Palmkernöl. Eine Analyse der Fettsäurezusammensetzung des Placeboöls ergab für die Hauptfettsäuren Ölsäure 50 %, Palmitinsäure 13 % sowie Linolsäure 12 %. Sowohl das Test- als auch das Placeboöl wurden in Nuss-Nougat-Crème als Träger verabreicht. Die Studie bestand aus zwei Perioden. In der Adaptions-Periode (Periode I, 2 Wochen) sollte sich während der Ernährung mit der Basisdiät der Stoffwechsel der Probanden adaptieren. In der zweiten Woche erhielten die Probanden eine standardisierte Basisdiät mit genauer Vorgabe der aufzunehmenden Nahrung. Am letzten Tag dieser Woche wurde den Studienteilnehmern Blut entnommen und daraus sofort vor Ort die Monozyten isoliert. Es folgte die Interventions-Periode (Periode II, 6 Wochen), in der der Testgruppe 10 g Testöl / d zusätzlich zur Basisdiät verabreicht wurde. Der Kontrollgruppe wurden 10 g des Placeboöls zusätzlich verabreicht. Auch in der letzten Woche der Periode II erhielten beide Probandengruppen wiederum eine standardisierte Basisdiät bevor am letzten Tag dieser Woche die Blutabnahme mit anschließender Isolierung der Monozyten erfolgte (Abb.5-11).

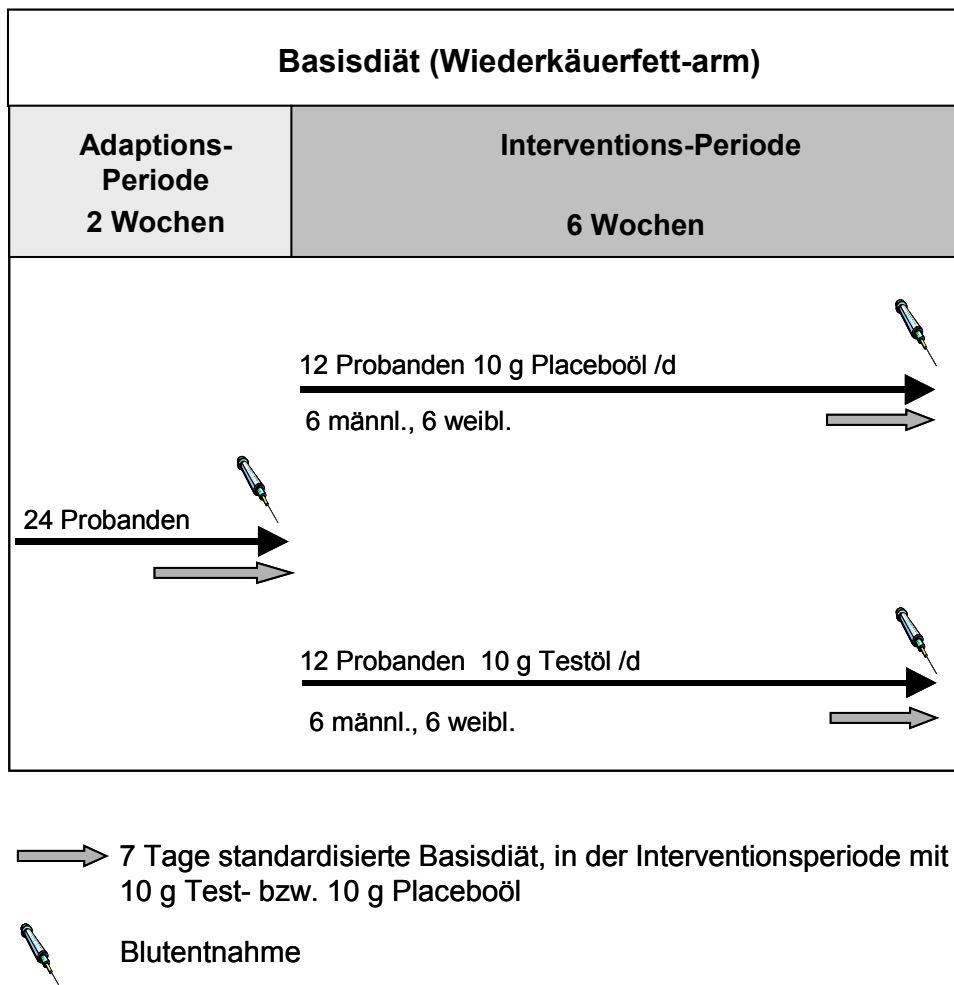


Abb. 5-11: Durchführung der Interventionsstudie mit tVA

5.4.6 Isolierung der humanen Monozyten aus Vollblut

In Jena wurden aus den Blutproben, die während der Interventionsstudie genommen wurden, die mononukleären Zellen durch Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation isoliert [112]. Da die erhaltene Zellsuspension neben den Monozyten auch Lymphozyten und Thrombozyten enthielt, wurden die Monozyten, basierend auf der Methode der „positiven Selektion“, mit Hilfe des für sie spezifischen Oberflächenantigens CD14 separiert. Dazu wurden CD14-MicroBeads (Miltenyi, Bergisch Gladbach) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Auf diesen magnetischen Mikropartikel sind CD14-Antikörper immobilisiert, die nach Zugabe der Partikel zur Zellsuspension spezifisch an das CD14 Oberflächenantigen anbinden. In dem anschließenden Aufreinigungsschritt wird ein Magnetfeld angelegt und nur die Bead-markierten Monozyten zurückgehalten. Im Anschluss an die Isolierung der Monozyten wurde die Gesamt-RNA isoliert und auf Trockeneis nach Münster geschickt, wo sie bei -70 °C bis zur weiteren Analyse mittels q-RT-PCR gelagert wurden. Für die Analyse

der Genexpression wurden nur die Blutproben der Placebogruppe und der mit 10 g TVA/d behandelten Probanden herangezogen.

Diese Methode wurde anhand von Blutproben freiwilliger Spender in Münster etabliert und während dieser Etablierungsphase die Reinheit der erhaltenen Monozytensuspension mit Hilfe der Durchfluss-Zytometrie bestimmt.

6 Etablierung der DNA-Chip-Analytik mit Hilfe kommerzieller Mitteldichte- und Hochdichte-DNA-Chips

In ersten Experimenten sollten Erfahrungen mit der DNA-Chiptechnologie gewonnen werden. Dabei sollten technische Probleme im praktischen Umgang mit den DNA-Chips wie z.B. das luftblasenfreie Auftragen der Probe und insbesondere die Vorbereitung der Probe etabliert werden.

Zur Probenvorbereitung, d.h. der Markierung der Ziel-DNA, wurde Gesamt-RNA in einer reversen Transkription umgeschrieben und dabei die Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 oder Cy5 in die entstehende cDNA eingefügt. Durch den Einsatz von Oligo dT₍₁₈₎ Primern in der reversen Transkription wurde gewährleistet, dass in jedem Fall das 3'-Ende der mRNA als cDNA vorlag und mit den komplementären Sonden für die jeweiligen Zielgene hybridisieren konnte. Der Einbau der Fluorophore konnte in einem Schritt durch die Zugabe der Cy3- bzw. Cy5-markierten dUTPs zum Reaktionsansatz der reversen Transkription erfolgen. Neben dieser Methode, die mit 50 µg gesamt RNA sehr viel Ausgangsmaterial benötigte und durch den Einsatz der markierten Nukleotide sehr kostspielig war, wurde ebenfalls die Markierung der cDNA in zwei Schritten etabliert. Hierbei erfolgte die reverse Transkription mit Amino-allyl-markiertem dUTP, das dadurch in die entstehende cDNA integriert wurde. Die aufgereinigte cDNA wurde im Anschluss mit aktivierten Fluorophoren (NHS-Cy3 bzw. -Cy5) inkubiert. Durch Reaktion der reaktiven NHS-Gruppen der Fluorophore mit den eingefügten Amino-allyl-Gruppen der cDNA wurden so die Farbstoffe an die Ziel-DNA gekoppelt. Für diese Methode wurde nur 20 µg Ausgangsmaterial benötigt und die Kosten für die Markierung betragen nur etwa 1/10 der Kosten für die Markierung in einem Schritt.

Der Erfolg dieser beiden Markierungsmethoden wurde photometrisch durch die Aufnahme eines Spektrums von 240 – 750 nm überprüft. Aus den Spektren wurde jeweils der Markierungsgrad (Nukleotide pro eingebautem Fluorophor) berechnet.

6.1 Untersuchungen mit Mitteldichte-DNA-Chips

Die Qualität der so erhaltenen fluoreszenzmarkierten cDNA sollte auf kommerziellen DNA-Chips bewertet werden. Dazu wurden Chips des sogenannten „*Human starter Kit-Arrays*“ der Firma *MWG Biotech* ausgewählt. Diese Chips sind vorgefertigte DNA-Chips, bestehend aus 50mer Oligonukleotid-Sonden, die auf der Chipoberfläche in einem bestimmten Muster, dem Array, immobilisiert wurden und 161 verschiedene humane Zielgene erfassen. Die *Housekeeping*-Gene β -ACT, GAPDH und Ubiquitin sind in insgesamt 32 Replika vorhanden. Anhand der Signale dieser Sonden lässt sich die Homogenität der Hybridisierung beurteilen. Zusätzlich sind 7 *Arabidopsis*-(ara)-Negativ-Kontrollsonden im Array zu finden, die zur Bestimmung des Schwellenwerts herangezogen werden. Daraus ergeben sich 200 Sondenpositionen, die insgesamt zweimal auf der Chipoberfläche aufgebracht wurden, sodass zusammen 400 *Spots* auf dem Chip zu finden sind, und dieser daher zu den Mitteldichte-DNA-Chips zu zählen ist. Zur besseren Übersichtlichkeit ist hier der Array eines Chips (Metaarray) in Subarrays mit jeweils 10x5 *Spots* unterteilt. Diese Subarrays sind wiederum in vier Reihen (Metareihen) mit jeweils zwei Spalten (Metaspalten) auf den Chip immobilisiert. (Abb. 6-1). Die genauen Sondenbelegung der Chips kann unter <http://www.mwg-biotech.com/services/array/download> eingesehen werden. Im weiteren werden diese Art der Chips auch als Kontrollchips bezeichnet, weil mit ihnen die Qualität der RNA, Markierung, Hybridisierung und Detektion im Hinblick auf die aufwendigeren und deutlich teureren Hochdichte-Chips des gleichen Herstellers bewertet werden können. Die Hybridisierungen erfolgten auf den Kontrollchips immer in einem Hybridisierungsrahmen (Kap. 5.3.5.2). Bei den gezeigten Signalhöhen handelt es sich, wenn nicht anders angegeben, um die Werte nach der Hintergrundkorrektur (Kap. 5.3.7.3).

6.1.1 Hybridisierung eines Mitteldichte-Chips mit Cy5-dUTP-markierter cDNA aus HepG2-Zellen

Die Inkubation des Chips mit 1000 ng Cy5-dUPT-markierter cDNA, erhalten aus 50 μ g RNA unbehandelter Zellen der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2, erfolgte für 18 h in einer Feuchtbox bei 42 °C. Nicht angebundene cDNA und der Hybridisierungspuffer wurde anschließend in drei Waschschrritten entfernt und der Chip im Druckluftstrom getrocknet. Das Muster eines solchen Kontrollchips nach der Hybridisierung weist idealerweise den gesamten dynamischen Signalbereich von *Spots* mit sehr hoher Fluoreszenz (in der invertierten Darstellung schwarz), bis hin zu Bereichen ohne Fluoreszenz (Flächen zwischen den *Spots* aber auch *Spots*, an denen keine markierte cDNA gebunden hat) auf (Abb.6-1). Anhand des Belegungsplans des Array ist zu erkennen, dass wie erwartet keine

Hybridisierung an den ara-Kontrollsonden stattgefunden hat. Qualitativ ist auch zu beobachten, dass die *Spots* der *Housekeeping*-Gene am intensivsten erscheinen, was mit einer hohen Expression dieser Gene gleichzusetzen ist.

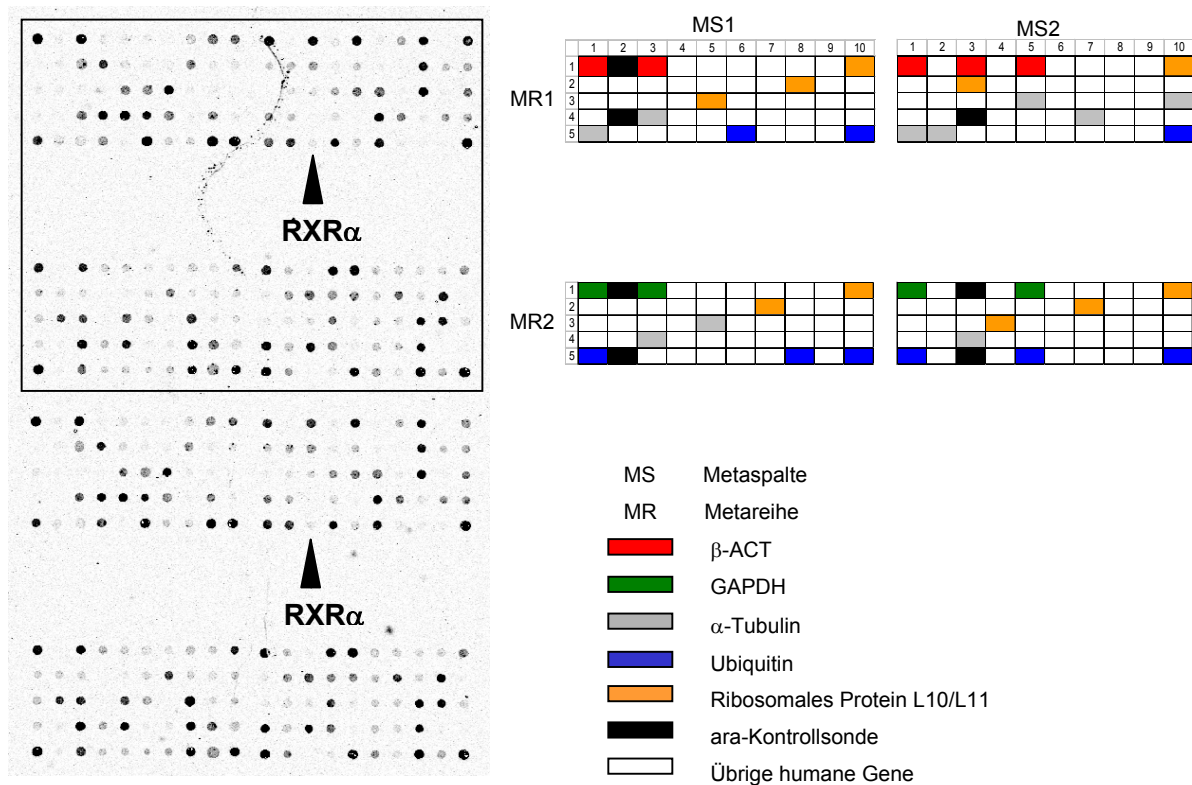


Abb. 6-1: Hybridisierungsmuster eines *Human starter Kit* Arrays nach Inkubation mit Cy5-dUTP markierter cDNA

Inkubation des Chips mit 1000 ng Cy5-dUTP markierter cDNA aus RNA unbehandelter HepG2-Zellen. Die Inkubation erfolgte 18 h bei 42°C in einer Feuchtbox. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 96 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Die Detektion erfolgte mit dem GMS Array Scanner. Die 200 zusammengehörigen *Spots* sind durch einen Rahmen gekennzeichnet. Eine genaue Zuordnung der *Spots* zu den Genen findet sich unter <http://www.mwg-biotech.com/services/array/download>.

Im Weiteren wurden die Signalhöhen auf dem in Abb. 6-1 dargestellten Chip mittels der Auswertungssoftware ScanAlyze ausgewertet. Abb. 6-2 A zeigt die mittleren Signalhöhen der *Housekeeping*-Gene β -ACT (8347 counts), GAPDH (5664 counts) und Ubiquitin (27781 counts) nach Hintergrundkorrektur. Zum Vergleich wurde die Intensität an dem *Spot* mit der $RXR\alpha$ Sonde (280 counts) dargestellt. Die niedrigen Standardabweichungen spiegeln eine geringe Variation der Signalhöhen über den Chip und damit eine homogene Hybridisierung bei der Verwendung eines Hybridisierungsrahmens wider. Der Schwellenwert, d.h. die Signalhöhe, die an einer Sondenposition nach der Hintergrundkorrektur überschritten werden

muss, damit das betreffende Gen als exprimiert angesehen werden kann, berechnet sich nach Kap. 3.1.2 zu 274 *counts* und wird von RXR α nur knapp überschritten.

Da die Fluoreszenzintensitäten als Maß für die Expression der zugehörigen Gene anzusehen sind, wurden in Abb. 6-2 B zum Vergleich die Ergebnisse einer Analyse der relativen Transkriptmengen durch q-RT-PCR für dieselben Gene in einer Probe aus unbehandelten HepG2-Zellen dargestellt. Die $15-\Delta C_t$ -Werte zeigten ebenfalls eine sehr hohe Expression der *Housekeeping*-Gene an. Allerdings wurde hier, im Gegensatz zur DNA-Chip Analyse, β -ACT als das am höchsten exprimierte Gen identifiziert, gefolgt von GAPDH und Ubiquitin. Mit einem $15-\Delta C_t$ -Wert von 7,1 ist jedoch die Expression des RXR α relativ zum *Housekeeper* β -ACT im Gegensatz zum Chipexperiment bereits dem mittleren Niveau zuzuordnen.

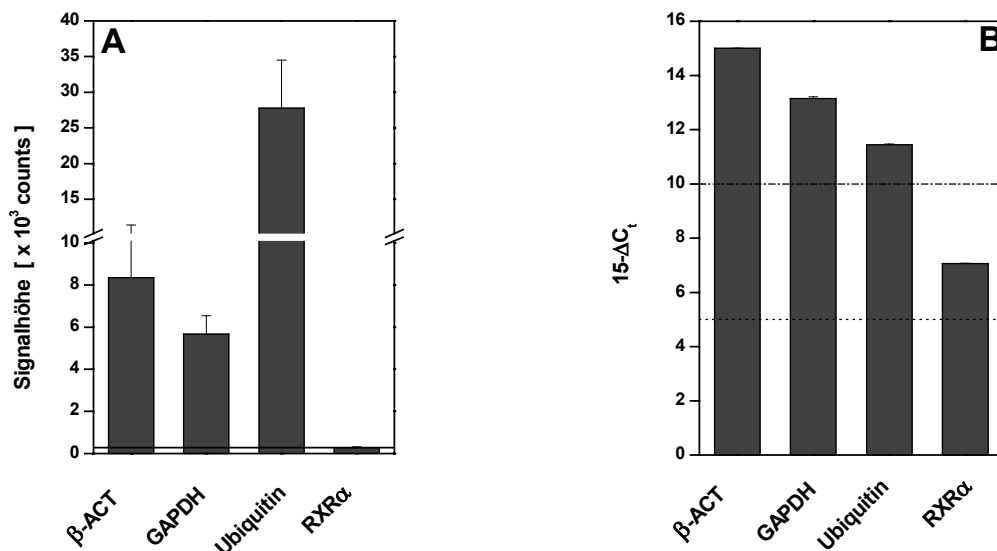


Abb. 6-2: Bestimmung der Expression ausgewählter Zielgene auf einem Mitteldichte-Chip (A) und durch q-RT-PCR (B)

(A) Signalhöhen der *Housekeeper* β -ACT ($n = 10$), GAPDH ($n = 10$), Ubiquitin ($n = 20$) und des Targetgens RXR α ($n = 2$) nach Hintergrundkorrektur, gemessen auf einem *Human Starter Kit* Chip nach Hybridisierung mit 1000 ng Cy5-dUTP markierter cDNA aus unbehandelten HepG2-Zellen. Die Inkubation erfolgte 18 h bei 42°C in einer Feuchtkbox. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 96 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Mittelwerte aus n Bestimmungen \pm SD.

—: Schwellenwert, 274 *counts*.

(B) Analyse der relativen Transkriptmengen durch q-RT-PCR nach der vergleichenden ΔC_t -Methode Auftragung der auf β -ACT normierten $15-\Delta C_t$ -Werte der *Housekeeper* β -ACT, GAPDH, Ubiquitin und des Zielgens RXR α . Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 2 unabhängigen Messungen \pm Abweichung.; : Grenze des niedrigen Expressionsniveaus; - - - - - : Grenze des mittleren Expressionsniveaus.

Die Höhe der Hintergrundfluoreszenz wurde als ein weiteres Qualitätskriterium herangezogen. Anhand des GMS-Scanner-Bildes konnten erste qualitative Aussagen gemacht werden. Je weniger graue Pixel im Bildhintergrund auftraten, desto niedriger war die Hintergrundfluoreszenz auf dem Chip. Außerdem konnten Störungen wie Schlieren direkt erkannt werden (Abb. 6-1, oberer Bereich, Mitte), die auf ein nicht vollständiges Abwaschen nicht-hybridisierter cDNA oder freier Farbstoffmoleküle hindeuteten. Mitunter konnten solche Artefakte die Auswertung der einzelnen Sondens*spots* erschweren oder unmöglich machen. Die quantitative Analyse des Hintergrunds erfolgte ebenfalls mittels der Software ScanAlyze, die die Intensität einer bestimmten Anzahl von Pixeln um die Sondens*spots* herum analysiert und als gesonderten Wert der Hintergrundfluoreszenz aufführt. Für die eigentliche Auswertung der Messergebnisse werden diese Werte von den Signalen an den einzelnen Sonden zur Hintergrundkorrektur abgezogen. Zur Beurteilung der Hybridisierungsqualität wird aus diesen Werten der Mittelwert gebildet, der einen Eindruck über die Höhe des Hintergrunds über den gesamten Chip vermittelt. Im Fall des in Abb. 6-1 dargestellten Chips lag die Hintergrundfluoreszenz bei 134 ± 12 *counts*, was einen sehr niedrigen Wert für die Hintergrundkorrektur darstellte.

Desweiteren sind im Bild keine Signale an den ara-Negativ-Kontrollsonden zu erkennen. Dies zeigt, dass keine oder nur sehr geringe unspezifischen Hybridisierungen stattgefunden hatten. Abb. 6-3 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt des Chips mit einer ara-Sonde. Die Sonden *it2* (unbekanntes Protein *it2*), *prkca* (Protein Kinase c, α), *csk* (c-src Tyrosin Kinase), *dp62* (Dynactin p62 Untereinheit), *shpk* (*similar to activator of s phase kinase (H. sapiens)*) und *rfc2* (Replikationsfaktor c (Aktivator 1) 2 (40 kDa)) hybridisierten ebenfalls nicht. Diese Gene wurden also in dieser Zellprobe nicht exprimiert.

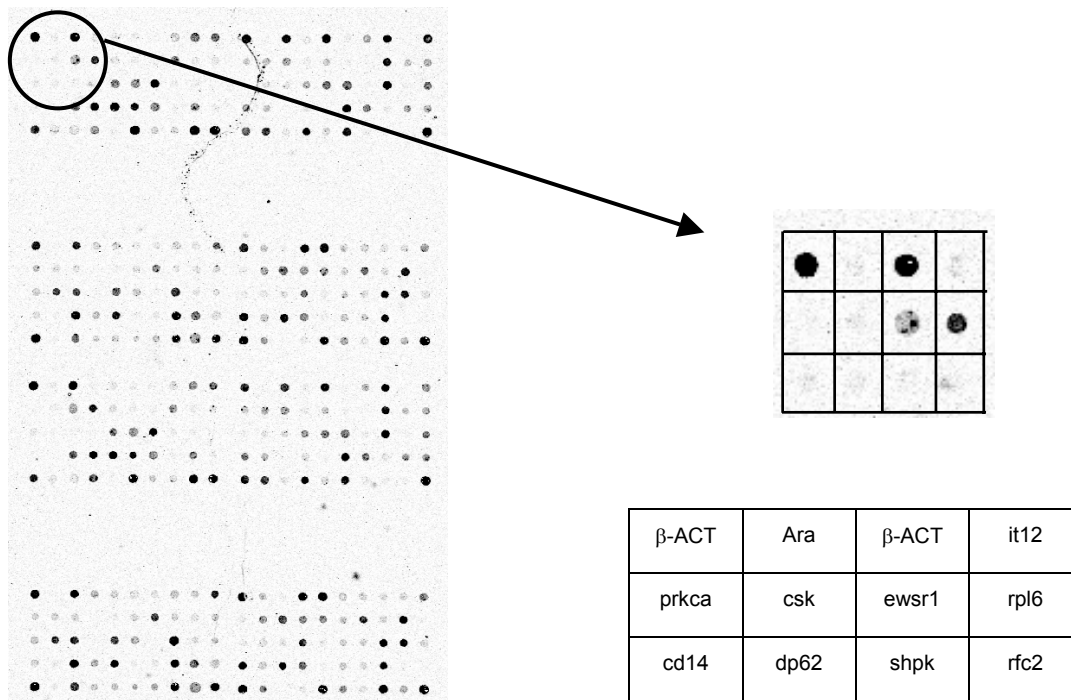


Abb. 6-3: Beispiele für die Hybridisierung und Nicht-Hybridisierung der Sonden auf dem Chip (Ausschnitt aus einem *Human Starter Kit Array*)

Inkubation des Chips mit 1000 ng Cy5-dUTP markierter cDNA aus RNA unbehandelter HepG2-Zellen. Die Inkubation erfolgte 18 h bei 42°C in einer Feuchtbox. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 96 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Die Detektion erfolgte mit dem GMS Array Scanner. *Spots*, an denen eine große Menge Fluoreszenz-markierter Ziel-DNA hybridisiert hat erscheinen in der invertierten Darstellung intensiv schwarz. Mit abnehmender Menge der angebotenen Ziel-DNA nimmt die Intensität der Schwarzfärbung an den *Spots* ab. Weiß bedeutet keine Hybridisierung.

Ein Beispiel für ein in HepG2-Zellen sehr niedrig bis kaum exprimiertes Gen stellt das Oberflächenantigen CD14 dar, das ein typischer Marker für Monozyten ist. In Abb. 6-3 ist klar zu erkennen, dass die entsprechende Sonden nicht hybridisiert. Die Signalhöhe lag hier mit 233 *counts* unter dem Schwellenwert.

Anhand dieser Versuche wurde festgestellt, dass die Markierung der cDNA in einem Schritt Ziel-DNAs ergibt, die mit kommerziellen DNA-Chips nachgewiesen werden können. Anhand der eingesetzten DNA-Mikroarrays konnten qualitative Aussagen über die Expressionshöhe der einzelnen Gene gemacht werden, die nur Teilweise durch q-RT-PCR bestätigt werden konnten.

6.1.2 Einfluss der cDNA-Menge auf die Hybridisierung

Nach Angaben des Herstellers der kommerziellen DNA-Chips (MWG Biotech) sollten mindestens 750 ng markierte cDNA auf einen Chip aufgetragen werden, um auch die Detektion der niedrig bis sehr niedrig exprimierten Gene zu gewährleisten. Diese Mengen an Probenmaterial können jedoch nur erreicht werden, wenn genügend Ausgangsmaterial für die Markierung zur Verfügung steht. Ist dies nicht der Fall, verringert sich die Ausbeute der cDNA entsprechend. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern die eingesetzte cDNA-Menge die Signalhöhe beeinflusst und ob die Möglichkeit besteht, weniger Probe einzusetzen zu können. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus unbehandelten HepG2-Zellen isoliert und die cDNA in einer reversen Transkription durch Zugabe von Cy5-dUTPs fluoreszenz-markiert. Anschließend wurden jeweils 150, 300 und 600 ng dieser cDNA auf einen Kontrollchip aufgegeben, und diese wie beschrieben inkubiert, gewaschen und ausgewertet (Kap. 5.3.5).

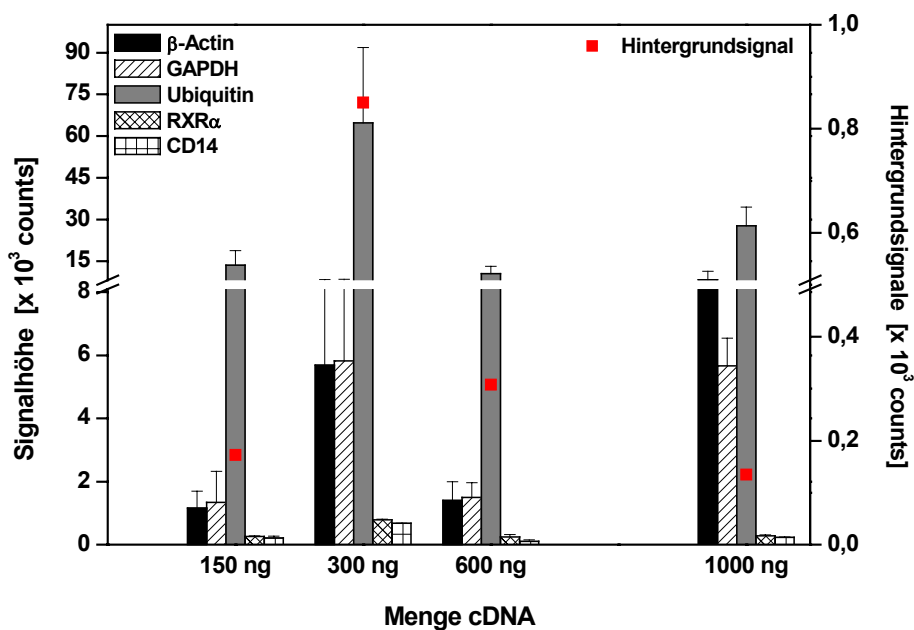


Abb. 6-4: Einfluss der eingesetzten Menge Cy5-markierter cDNA auf die Signalhöhe

Inkubation des Chips mit 150, 300 bzw. 600 ng Cy5-dUTP markierter cDNA aus unbehandelten HepG2-Zellen. Die Inkubation erfolgte 18 h bei 42°C in einer Feuchtbox. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 102 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Die Detektion erfolgte mit dem GMS Array Scanner. Linke Y-Achse: Mittelwerte aus n Bestimmungen \pm SD bzw. Abweichungen der *Housekeeper* β -ACT (n = 10), GAPDH (n = 10), Ubiquitin (n = 20) und der Zielgene RXR α und CD14 (n = 2). Separat sind die Signale eines gleichen Chips, inkubiert mit 1000 ng Cy5-dUTP-markierter cDNA aus einer anderen HepG2-Zellprobe, dargestellt (vgl. Abb. 6-3). Rechte Y-Achse: mittleres Hintergrundsignal der jeweiligen Chips.

Abb. 6-4 zeigt die erhaltenen Signalhöhen an den Sonden für β -ACT, GAPDH und Ubiquitin als Vertreter der *Housekeeping*-Gene. RXR α und CD14 wurden als Beispiele für sehr niedrig exprimierte Gene herangezogen. Zum Vergleich sind außerdem noch einmal separat die Signale des Chips dargestellt, der mit 1000 ng einer Cy5-dUTP-markierten cDNA hybridisiert wurde (vgl. Abb. 6-2).

Die Inkubation mit 150 ng cDNA führte an der β -ACT- und GAPDH-Sonde zu eindeutigen aber relativ niedrigen Signalen von 1160 bzw. 1350 *counts*. Die Hintergrundfluoreszenz lag bei 174 *counts*. Eine Erhöhung der cDNA-Menge auf 300 ng führte erwartungsgemäß zu einem Anstieg der beiden Signale auf 5700 bzw. 5800 *counts*, jedoch auch zu einem Anstieg des Hintergrunds auf 850 *counts*. Interessanterweise sanken die Signale nach Inkubation mit 600 ng Ziel-DNA wieder auf 1400 und 1500 *counts*, ebenso die Hintergrundfluoreszenz. Ein ähnlicher Verlauf der Signalhöhen zeigte sich an den Ubiquitin-Sonden (13570, 64720 und 10500 *counts*). Die Signale der RXR α - und CD14-Sonden wurde durch die Erhöhung der cDNA-Menge nicht wesentlich gesteigert. Die Werte überschritten den berechneten Schwellenwerte der jeweiligen Chips nicht (577, 1300 bzw. 304 *counts*). Hinsichtlich der Hintergrundfluoreszenz entstand zunächst der Eindruck, dass auch hier die Signale mit der cDNA-Menge anstiegen. Jedoch betrug die Hintergrundfluoreszenz nach Inkubation mit 1000 ng Cy5-markierter cDNA lediglich 134 *counts*.

Es kann festgehalten werden, dass eine Erhöhung der cDNA-Menge auf einem Chip generell zu höheren Signalen führte, obwohl die Inkubation mit 600 ng markierter cDNA unerwartet und untypisch niedrige Signale im Vergleich mit den hohen Signalen nach der Inkubation eines gleichen Chips mit 1000 ng Cy5-dUTP-markierter cDNA, zeigte. Dies Ergebnis deutete schon darauf hin, dass der Vergleich verschiedener Hybridisierungen quantitativ nicht ohne weiteres möglich war, obwohl die Versuchsbedingungen (dieselbe cDNA, Hybridisierungspuffer, Temperatur, Inkubationszeit und Waschschrte) gleich waren. Ähnliche Ergebnisse wurden nachfolgend in mehreren Experimenten erhalten (Daten nicht gezeigt). Ein Grund hierfür kann der Einfluss unbekannter Faktoren, wie das unvollständige Lösen der eingeeengten cDNA in Hybridisierungspuffer oder nicht vollständige Probenauftragung sein. Folglich ist die Betrachtung von „Einfarben-Experimenten“ auf unterschiedlichen Chips kritisch zu bewerten, sodass bei späteren Versuchen zur Expressionsanalytik auf die sogenannten Zweifarben-Technik zurückgegriffen wurde, in der lediglich die Verhältnisse der beiden eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe an einer Sonde betrachtet werden (Kap. 3.1.2).

6.1.3 Hybridisierung eines Mitteldichte-Chips mit Amino-allyl-dUTP-markierter cDNA aus HepG2-Zellen

Die in der Zweischnitt-Markierung *via* Amino-allyl-dUTP-Einbau erhaltene markierte cDNA wurde ebenfalls mit den Kontrollchips analysiert. Abb. 6-5 zeigt das Hybridisierungsmuster eines solchen Chips nach der Hybridisierung mit 810 ng Cy5-Amino-allyl-dUPT markierter cDNA, erhalten aus 20 μ g Gesamt-RNA aus unbehandelten HepG2-Zellen. Qualitativ ist auch bei diesem Chip zu erkennen, dass die *Spots* der *Housekeeping*-Gene am intensivsten erscheinen (Belegung s. Abb.6-1), sie also sehr hoch exprimiert wurden. An den Positionen der *ara*-Kontrollsonden hat hier ebenfalls keine Hybridisierung stattgefunden (Abb. 6-6).

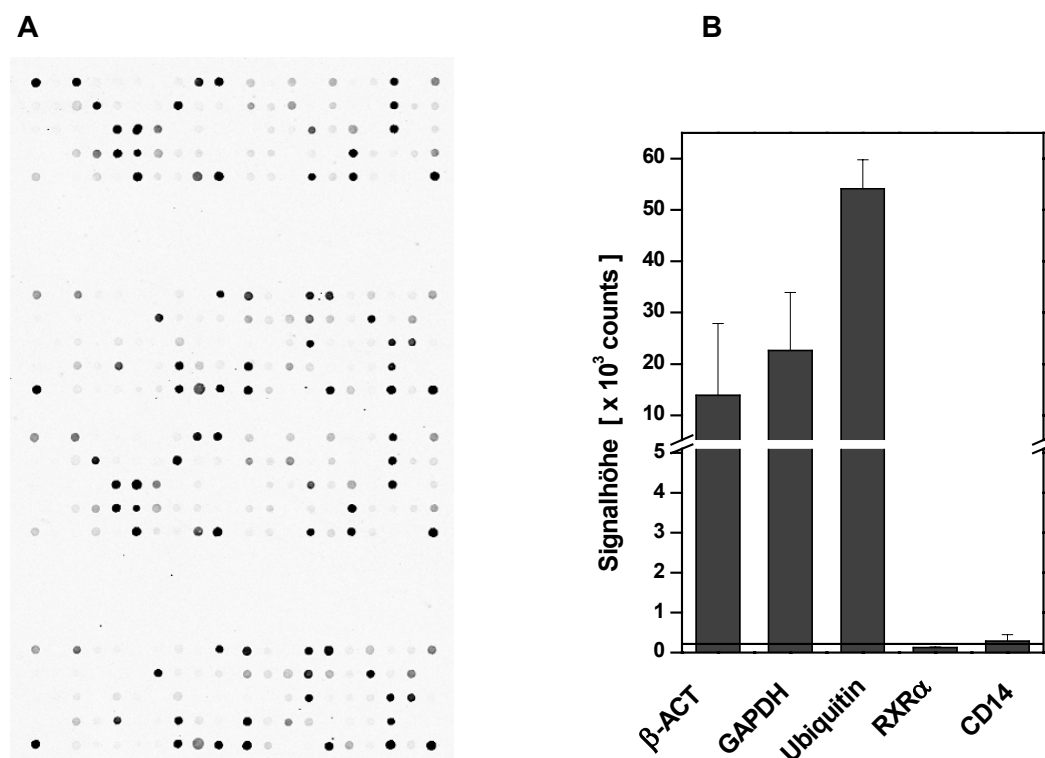


Abb. 6-5: Hybridisierungsmuster eines Kontrollchips (*Human Starter Kit-Array*, MWG Biotech) nach der Inkubation mit Cy5-Amino-allyl-dUTP- markierter cDNA

(A) Inkubation des Chips mit 810 ng Cy5-Amino-allyl-dUTP markierter cDNA aus RNA aus unbehandelten HepG2-Zellen. Die Inkubation erfolgte 18 h bei 42°C in einer Feuchtbox. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 58 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Die Detektion erfolgte mit dem GMS Array Scanner. **(B)** Mittelwerte aus *n* Bestimmungen \pm SD bzw. Abweichung der Housekeeper β -ACT (*n* = 10), GAPDH (*n* = 10), Ubiquitin (*n* = 20) und der Zielgene RXR α und CD14 (*n* = 2), gemessen auf dem in **(A)** abgebildeten Kontrollchip. — : Schwellenwert des Chips.

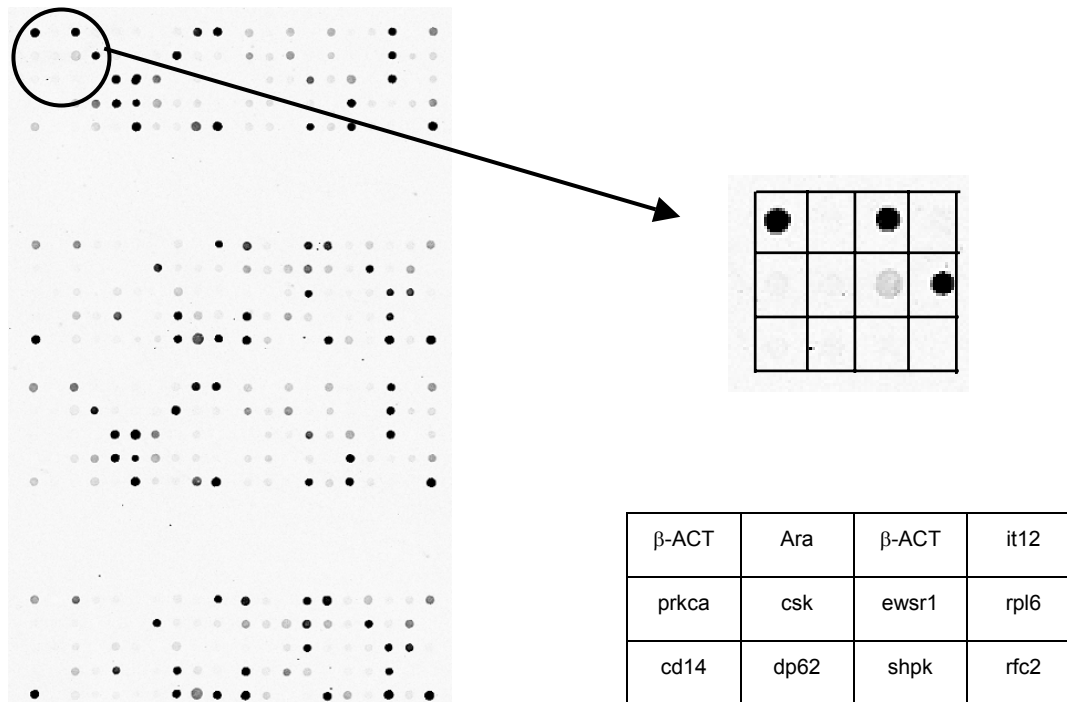


Abb. 6-6: Beispiele für die Hybridisierung und Nicht-Hybridisierung der Sonden auf dem Chip (Ausschnitt aus einem *Human Starter Kit Array*)

Inkubation des Chips mit 810 ng Cy5-Amino-allyl-dUTP markierter cDNA aus unbehandelten HepG2-Zellen. Die Inkubation erfolgte 18 h bei 42°C in einer Feuchtbox. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 58 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Detektion mit dem GMS Array Scanner. Spots, an denen eine große Menge Fluoreszenz-markierter Ziel-DNA hybridisiert hat erscheinen in der invertierten Darstellung intensiv schwarz. Mit abnehmender Menge der angebotenen Ziel-DNA nimmt die Intensität der Schwarzfärbung an den Spots ab. Weiß bedeutet keine Hybridisierung.

Die quantitative Auswertung der Signale mittels der Software *ScanAlyze* ergab eine mittlere Hintergrundfluoreszenz von 580 ± 38 counts. Die mittlere Fluoreszenz an den ara-Negativ-Kontrollsonden lag nach der Hintergrundkorrektur bei 0 ± 77 counts. Daraus ergab sich ein Schwellenwert von 216 counts. Die Signale der *Housekeeping*-Gene β -ACT, GAPDH und Ubiquitin sind in Abb. 6-5 B dargestellt. Da jede Sonde jeweils zweimal auf dem Chip vorhanden ist, werden immer die Mittelwerte der Signale dargestellt. Ubiquitin war hier wieder das am höchsten exprimierte Gen (54000 counts) gefolgt von GAPDH (22600 counts) und β -ACT (13900 counts). Das Signal des RXR α (125 counts) erreichte in diesem Versuch den Schwellenwert im Gegensatz zu den in Kap. 6.1.1 dargestellten Ergebnissen nicht, das Gen scheint in dieser Probe nicht exprimiert zu sein. Dies wurde für HepG2-Zellen nicht erwartet und konnte durch q-RT-PCR auch nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu überschreitet das Signal der CD14-Sonde unerwartet den Schwellenwert. Der Wert von 290 counts setzt sich aus den Werten 440 und 130 counts der beiden einzelnen CD14-Sonden zusammen. Dies verdeutlicht die Auswirkung einer nicht homogenen Hybridisierung auf die

Signale niedrig bzw. nicht exprimierter Gene, die zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Dieses Problem trat im Fall der *Housekeeping*-Gene nicht auf, da die Abweichungen der Signale über den gesamten Chip verglichen zur absoluten Signalehöhe nicht sehr groß waren (Abb. 6-5).

Der Vergleich dieser Ergebnisse mit denen der Hybridisierung mit Einschritt-markierter cDNA zeigt, dass die Signale hier deutlich höher waren, obwohl weniger cDNA auf den Chip aufgetragen wurde. Ein Grund für diesen Unterschied in der Signalehöhe kann der unterschiedliche Markierungsgrad der eingesetzten cDNAs von 96 vs. 58 Nukleotiden pro eingebautem Fluorophor sein. Werden die Signale zum Vergleich in einem Streudiagramm gegeneinander aufgetragen, streuen die einzelnen Punkte um eine Ausgleichsgerade mit einer Steigung, die dem mittleren Verhältnis der beiden zu vergleichenden Datensätzen entspricht und aus der Rückschlüsse über die Qualität der Markierung gezogen werden können.

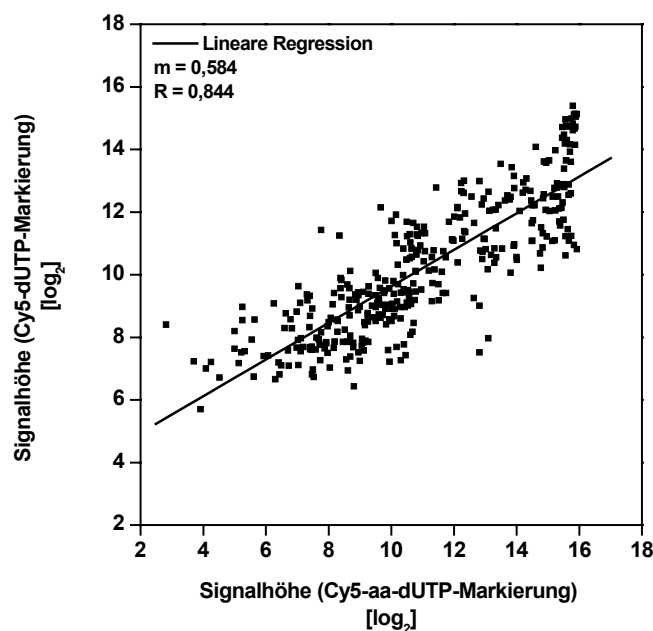


Abb. 6-7: Streudiagramm zum Vergleich zweier Hybridisierungen mit unterschiedlich markierter cDNA

Vergleich der Signale aus einer Inkubation eines Chips mit 810 ng Cy5-Amino-allyl-dUTP-markierter cDNA aus RNA (X-Achse) mit einer Inkubation eines Chips mit 1000 ng Cy5-dUPT-markierter cDNA (Y-Achse) aus unbehandelten HepG2-Zellen. Die Inkubation erfolgte jeweils 18 h bei 42°C in einer Feuchtbox. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 58 bzw. 96 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül.

Die Punkte streuten um eine Ausgleichsgerade mit der Steigung $m = 0,584$. Dies verdeutlicht, dass die Signalehöhen der Hybridisierung mit Cy5-dUTP-markierter cDNA (Y-

Achse) demnach nur etwa halb so hoch wie die Signale der Hybridisierung mit der in zwei Schritten mit aa-dUTP-markierten cDNA (X-Achse) waren.

Zusätzlich zu dem Problem der Vergleichbarkeit zweier Chipexperimente traten erste Unstimmigkeiten hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Hybridisierungsergebnisse mit Proben aus gleichen Zellsystemen auf. Außerdem wurde auch deutlich, dass die Nachweisgrenze, die im wesentlichen durch die Negativ-Kontrollsonden bestimmt wird, gerade im Hinblick auf niedrig exprimierte Gene kritisch betrachtet werden muss.

6.1.4 Zweifarben-Experimente mit Mitteldichte-Chips

Im Laufe der Arbeit stellte sich zunehmend heraus, dass es nahezu unmöglich war, zwei Hybridisierungen auf unterschiedlichen Chips zu vergleichen. Obwohl gleiche Mengen an cDNA eingesetzt wurden und gleiche Inkubationsbedingungen eingehalten wurden (42°C, Feuchtbox, 18 h Inkubation etc.) traten deutlich unterschiedliche Signale auf den Chips auf. Desweiteren konnte in einigen Versuchen beobachtet werden, dass die Signale z.B. im oberen Bereich des MetaArray deutlich höher waren als in den entsprechenden Replikasspots im unteren Teil. Das bedeutet, dass die Hybridisierung auf dem gesamten Chip nicht homogen verlaufen ist, obwohl dies durch die Nutzung von Hybridisierungsrahmen und leichtem Schütteln während der Inkubation gewährleistet sein sollte. Bei der Berechnung des Mittelwerts der Signale des ersten Array und der Replika kam es zu entsprechend hohen Fehlern.

Sinnvoller als der Vergleich zweier unabhängiger Hybridisierungen auf unterschiedlichen Chips ist daher der Vergleich zweier Proben auf einem Chip in nur einer Hybridisierung. Dies wird möglich durch den Einsatz von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, z.B. Cy3 und Cy5, in einem Zweifarben-Experiment. Für ein solches Zweifarben-Experiment werden die zu vergleichenden Proben (Kontroll- und behandelte Zellen) separat mit Cy5 bzw. Cy3 markiert, die cDNA anschließend gemischt und auf einem Chip aufgetragen. Die unterschiedlich markierten Ziel-DNAs aus den zu vergleichenden cDNAs hybridisieren nun entsprechend ihrer Häufigkeit an den komplementären Sonden. Für die Auswertung wird die Signalhöhe für beide Farbstoffe ermittelt. Aufgrund unterschiedlicher Einbauraten und physikalischer Eigenschaften der Fluorophore müssen die Rohdaten jedoch vor der weiteren Analyse normiert werden (Kap. 3.1.2), um die Signale beider Fluorophore quantitativ vergleichen zu können. Nach dieser Normierung wird das Verhältnis der beiden Fluoreszenzintensitäten an einer Sondenposition betrachtet. Ist das Verhältnis gleich 1, ist das zugehörige Gen in beiden Proben gleich hoch exprimiert. Eine Abweichung nach oben oder unten zeigt eine höhere bzw. niedrigere Expression des Gens in einer der Proben an.

Ein solches Zweifarben-Experiment wurde u.a. mit RNA aus unbehandelten THP-1-Makrophagen durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde in zwei Aliquots aufgeteilt, von denen das eine mit Cy5-aa-dUTPs, das andere mit Cy3-aa-dUTPs markiert wurde. Beide cDNAs wurden zusammengefügt, in Hybridisierungspuffer aufgenommen und auf einen Kontrollchip aufgegeben. Da es sich hierbei um die gleiche RNA handelte, sollten alle erhaltenen Fluorophor-Verhältnisse nach der Normierung der Signale einen Wert um 1 aufweisen. Zur Veranschaulichung wurden die normierten Signale der beiden Farbkanäle in einem Streudiagramm gegeneinander aufgetragen (Abb. 6-8). Der Normierungsfaktor mit dem die Cy3-Signale korrigiert wurden war hier $N = 0,431$. Aus dem Diagramm ist zu erkennen, dass nahezu alle Punkte um eine Ausgleichsgerade mit der Steigung $m = 1,098$ mit einem Regressionskoeffizienten von $R = 0,991$ streuen. Alle Punkte befinden sich innerhalb der gemeinhin akzeptierten Grenzen der Auflösung eines DNA-Chips von 2-facher Induktion bzw. Repression. Die Steigung dieser Geraden entspricht dem Mittelwert aller gebildeten Verhältnisse.

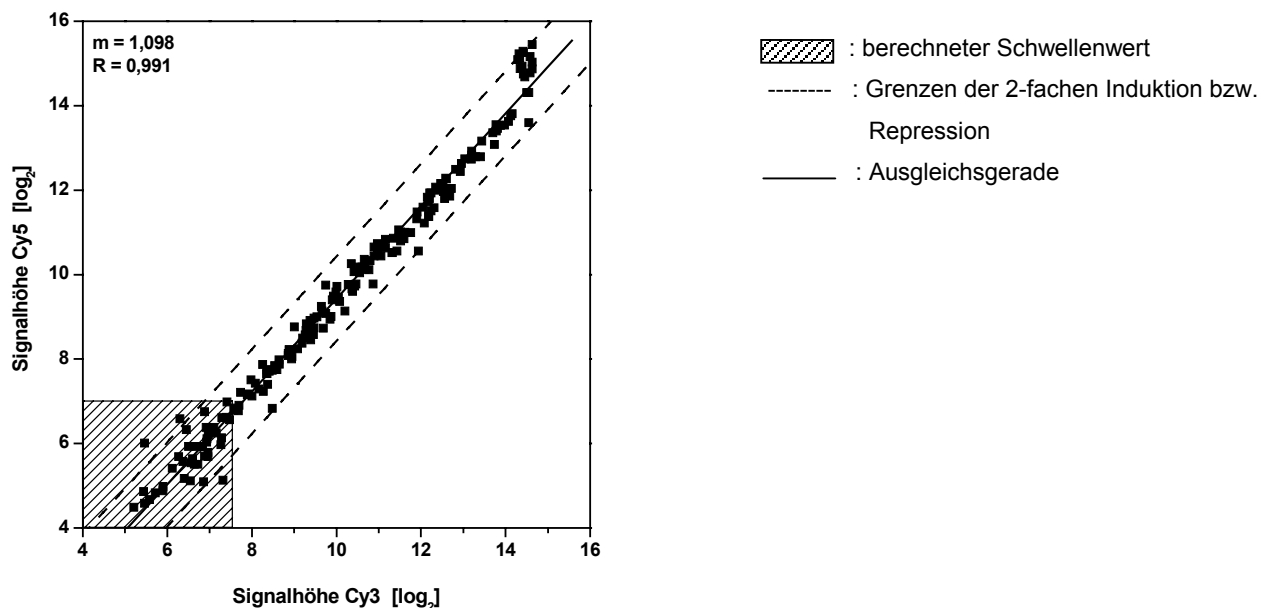


Abb. 6-8: Streudiagramm eines Zweifarben-Experiments mit RNA aus unbehandeltem THP-1-Makrophagen auf einem Kontrollchip (*Human Starter Kit-Array*, MWG Biotech)

Eingesetzt wurden jeweils 300 ng der in einer Zweischnitt-Markierung Cy5- und Cy3-markierter cDNA. Die Inkubation auf dem Chip erfolgte für 18 h bei 42°C in einer Feuchtbox. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 45 bzw. 62 Nukleotide pro eingebautem Fluorophor. Die schraffierte Fläche ergibt sich aus dem Schwellenwert der beiden Fluoreszenzkanäle. Gene innerhalb dieses Bereichs werden nicht signifikant expremiert. Normierungsfaktor $N = 0,431$.

Desweiteren wurde der Einfluss des Panagonisten Bezafibrat in HepG2-Zellen auf einem Kontrollchip untersucht. Dazu wurden HepG2-Zellen 24 h mit 100 μM Bezafibrat in Anwesenheit von 20 μM BSA in Serum-freiem Medium inkubiert. Da der Agonist in DMSO gelöst vorlag und sich so eine Endkonzentration von 0,5 % (v/v) ergab, wurden die Kontrollzellen ebenfalls mit 0,5 % (v/v) DMSO behandelt. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen und die Gesamt-RNA wurde isoliert. Die RNA aus den Kontrollzellen wurde in einer reversen Transkription in Cy3-markierte cDNA umgeschrieben, die der behandelten Zellen in Cy5-markierte cDNA. Es handelt sich hier also um ein Beispiel einer Einschrittmarkierung. Beide cDNAs wurden zusammen in Hybridisierungspuffer aufgenommen, auf einem Kontrollchip inkubiert und, wie beschrieben, ausgewertet (Abb.6-9).

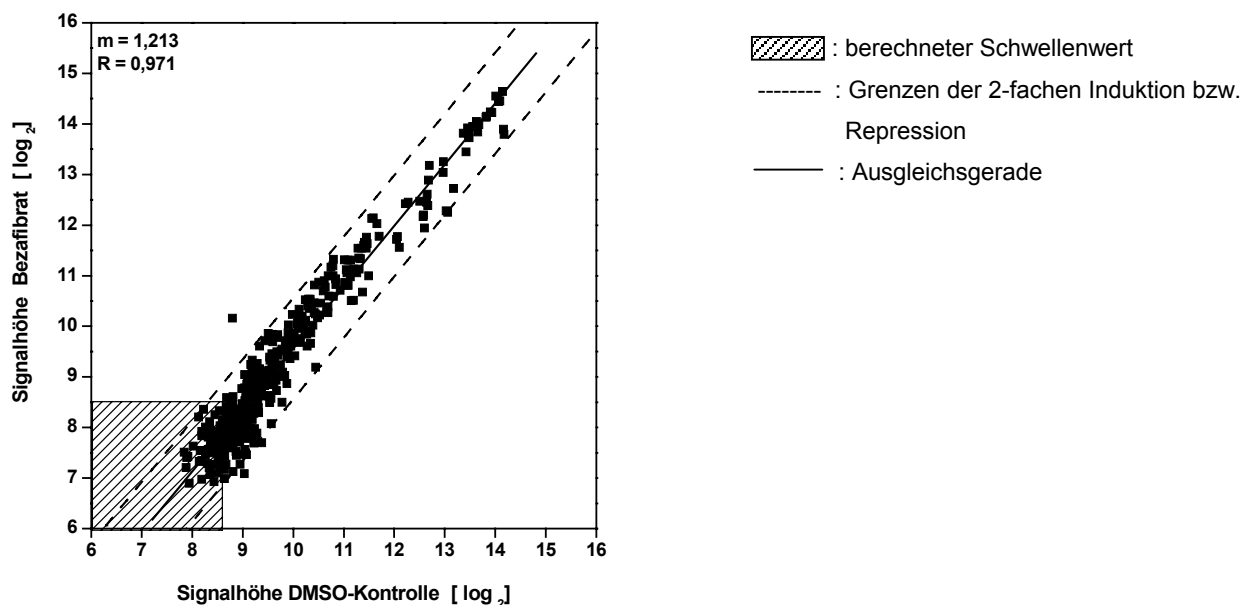


Abb. 6-9: Einfluss des Bezafibrats auf die Genexpression in HepG2-Zellen. Streudiagramm eines Zweifarben-Experiments auf einem Kontrollchip (*Human Starter Kit-Array*, MWG Biotech)

Eingesetzt wurden jeweils 900 ng Cy5-dUTP- und Cy3-dUTP-markierter cDNA aus HepG2-Zellen nach 24 h Behandlung mit 100 μM Bezafibrat bzw. aus DMSO-behandelten Kontrollzellen. Die Inkubation auf dem Chip erfolgte für 18 h bei 42°C in einer Feuchtbox. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 77 bzw. 69 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Normierungsfaktor $N = 1,983$.

Aus Abb. 6-9 geht hervor, dass in diesem Versuch nahezu alle der auf dem Chip vertretenen Gene unterhalb der Grenze der zweifachen Regulation lagen. Die Werte streuten um eine Ausgleichsgerade mit der Steigung 1,213 und dem Regressionskoeffizienten 0,971. In diesem Fall ergab sich auch nach der Normierung der hintergrundkorrigierten Signalhöhen eine Steigung von über 1. Ein Grund hierfür kann die Überlagerung des besseren Einbaus

der kleineren Cy3-dUTPs und die dadurch resultierenden höheren Signale durch andere Faktoren sein, z.B. eine deutlich höhere Menge an Cy5-dUTP-markierter cDNA in der Probe, die nicht durch die Normierung ausgeglichen wurde. Ein weiterer Grund kann in dem großen Einfluss der sehr hohen Signale auf die Berechnung der linearen Regression liegen. Wenn reguliert wurde, erkannte dies dieser Chip nicht. Lediglich das Fluoreszenz-Verhältnis eines Gens lag über der Grenze der zweifachen Regulation. Für das Gen *pou2f2* (*pou domain, class 2, transcription factor 2*) wurde das Verhältnis $Cy5/Cy3 = 3,4$ gefunden, es wurde also in den mit Bezafibrat behandelten Zellen höher exprimiert als in den Kontrollzellen. Dieses Experiment wurde wiederholt (Daten nicht gezeigt). Wieder lag die überwiegende Mehrheit der Gene unterhalb der Grenzen der zweifachen Regulation. Das im ersten Versuch erhaltene Ergebnis konnte hinsichtlich des scheinbar regulierten Gens *pou2f2* jedoch nicht reproduziert werden, da es diesmal ebenfalls innerhalb der Grenzen lag.

Der Einfluss von Bezafibrat bewirkte in diesen Zellen höchstens eine Regulation die kleiner als zweifach war. Dies Ergebnis wurde darauf zurückgeführt, dass die Expression des PPAR α in HepG2-Zellen gering ist. Die Aktivierung des Rezeptors durch Bezafibrat hatte somit über den PPAR-Signalweg nur einen geringen Einfluss auf die Expression der PPRE-tragenden Zielgene. Dieses Ergebnis ließ sich durch q-RT-PCR bestätigen und wird in Kap. 10.3.1 ausführlich besprochen.

6.2 Untersuchungen mit den „PAN[®] Human 10k Array“ Hochdichte-DNA-Chips

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass beide Methoden der cDNA-Markierung zu guten Ergebnissen auf den kommerziellen Mitteldichte-Chips führten. Die Signale waren deutlich und der Hintergrund niedrig genug, um eine sinnvolle Auswertung zu ermöglichen. Die Handhabung der DNA-Chips ebenso wie die Zweifarben-Experimente wurde anhand der Mitteldichte-Chips erfolgreich etabliert, wobei jedoch auch Schwierigkeiten bezüglich der Reproduzierbarkeit der Hybridisierungen sowie die große Bedeutung der Schwellenwertberechnung für niedrig exprimierte Gene deutlich wurden.

Der nächste Schritt bestand aus der Übertragung der Techniken von Mitteldichte- auf Hochdichte-Chips, auf denen 10000 verschiedene Sonden immobilisiert sind, die einen großen Teil des humanen Transkriptoms abdecken.

Aufgrund der geringen Expression des PPAR α in HepG2-Zellen wurden mit PPAR α transfizierte Zellen eingesetzt. Dadurch sollte die Expression des Rezeptors und somit die Wirkung des Bezafibrats über den PPAR-Signalweg verbessert werden. Diese Zellen wurden mit 50 μ M Bezafibrat (gelöst in DMSO) in serum-freiem Medium inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Die Markierung der behandelten Probe erfolgte mit Cy5-dUTPs, die der Kontrolle (nur DMSO) mit Cy3-dUTPs. Die vereinigten markierten cDNAs wurden mittels des „PAN[®] Human 10k Array“ Hochdichte-DNA-Chips (MWG Biotech) analysiert (Abb. 6-10).

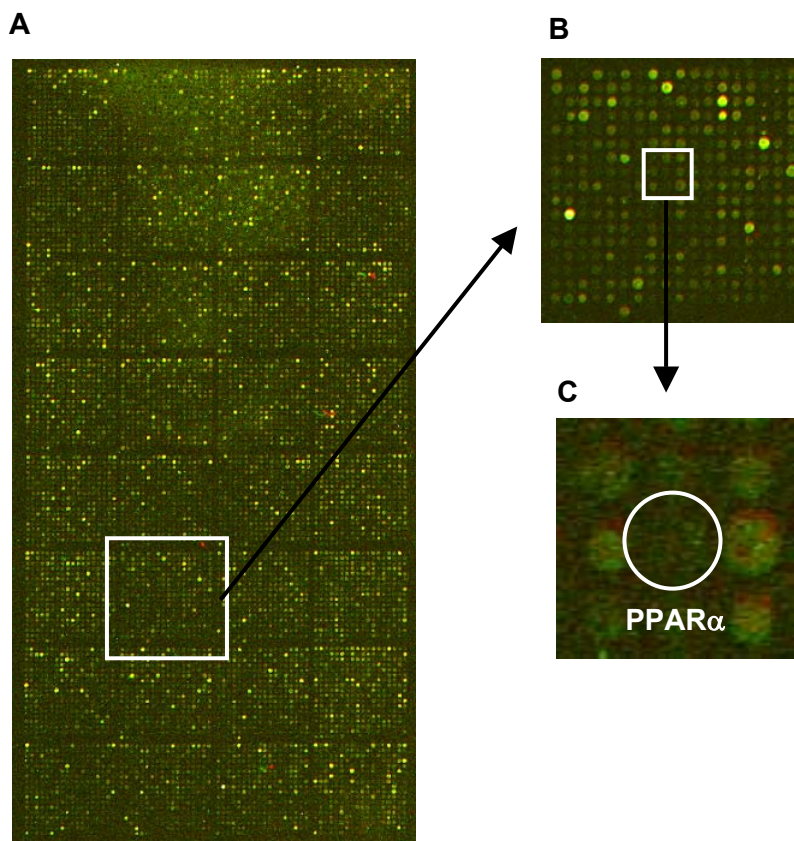


Abb. 6-10: Hybridisierungsmuster der PPAR α -transfizierten HepG2-Zellen nach Bezafibratbehandlung auf einem PAN[®] Human 10k Array

(A) Zweifarben-Experiment. Inkubation des Chips mit jeweils 1000 ng markierter cDNA aus PPAR α -transfizierten HepG2-Zellen nach Inkubation mit 50 μ M Bezafibrat (Cy5-dUTPs) bzw. DMSO zur Kontrolle (Cy3-dUTPs). Die Inkubation erfolgte 18 h bei 42°C in einer Feuchtbox. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 49 bzw. 71 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Detektion mit dem GMS Array Scanner. (B) Ausschnitt mit der Sonde für PPAR α . (C) Vergrößerter Ausschnitt aus B, die Position der PPAR α Sonde ist durch den weißen Kreis markiert.

Die Bilder des Cy3- und Cy5-Kanals wurden zunächst separat im Arrayscanner erhalten. Abb. 6-10 zeigt die übereinandergelegten Bilder der beiden Kanäle. Anhand der Abbildung wird die Aufteilung der 10000 Sonden in 32 Subarrays mit 18x18 Sondenspots deutlich, die eine Orientierung auf dem Chip erleichtert (Abb. 6-10 A). Der Ausschnitt aus dem Metaarray zeigt einen dieser Subarrays, in dem die PPAR α -Sonde positioniert ist (Abb. 6-10 B). Eine weitere Vergrößerung zeigt, dass an der PPAR α -Sonde keine Hybridisierung stattgefunden hatte (Abb. 6-10 C). Zur Veranschaulichung der Verhältnisse der Cy5-/Cy3-Signale zueinander wurde auch hier ein Streudiagramm erstellt (Abb. 6-11). Aus der Abbildung erkennt man, dass die Mehrheit der 10000 Spots innerhalb der gesetzten Grenze der zweifachen Regulation liegen und um eine Ausgleichsgerade mit der Steigung 1,02 und einem Regressionskoeffizienten von 0,90 streuen. Deutlich wird auch die Verbreiterung der Punktwolke im schraffierten Bereich unterhalb des berechneten Schwellenwerts. Hier sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sehr gering und mit einem hohen Fehler behaftet.

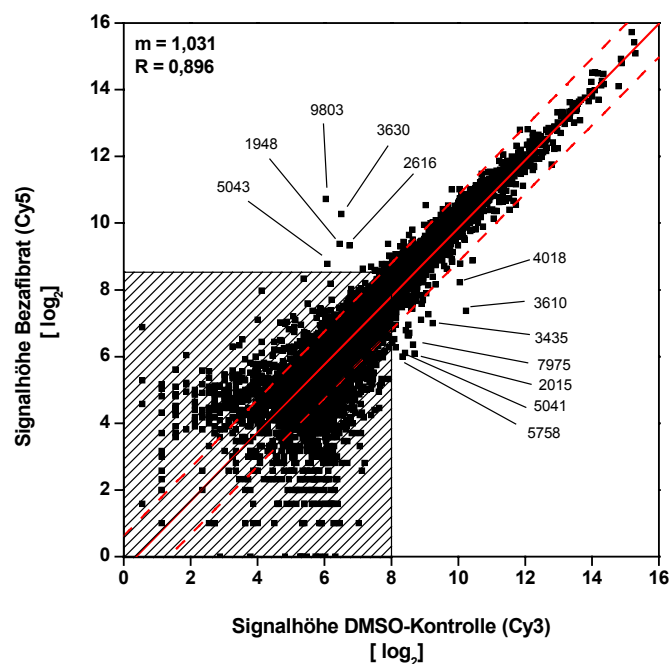


Abb. 6-11: Streudiagramm aller 10000 Spots eines Zweifarben-Experiments mit RNA aus Kontrollzellen und Bezafibrat-behandelten Zellen nach Transfektion mit PPAR α auf einem PAN[®] Human 10k Array

Inkubation des Chips mit jeweils 1000 ng markierter cDNA aus PPAR α -transfizierten HepG2-Zellen nach Inkubation mit 50 μ M Bezafibrat (Cy5-dUTPs) bzw. DMSO zur Kontrolle (Cy3-dUTPs). Die Inkubation erfolgte 18 h bei 42°C in einer Feuchtbox. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 49 bzw. 71 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Detektion mit dem GMS Array Scanner. Normierungsfaktor N = 0,73.

Am weitesten oberhalb der Punktwolke liegen die Punkte Nr. 1948, 2616, 3630, 5043 und 9803. Anhand der von MWG bereitgestellten Belegungsliste des Array, konnten die einzelnen Punkte den Genen zugeordnet werden (<http://www.mwg-biotech.com/services/array/download>). Dennoch kann für diese Gene nach Behandlung mit Bezafibrat eine Induktion angenommen werden. Gleichmaßen kann für die durch die Punkte 2015, 3435, 3610, 4018, 5041, 5758 und 7975 unterhalb der Punktwolke repräsentierten Gene eine Repression angenommen werden (Tab. 6-1).

Tab. 6-1: Regulierte Gene in PPAR α -transfizierten Zellen nach Inkubation mit Bezafibrat

Aufgelistet sind die am weitesten ober- und unterhalb der Ausgleichsgeraden der Punktwolke abweichenden Gene aus Abb. 1-11 und die dazugehörigen Genbankeinträge. Die Zuordnung der Punkte zu den jeweiligen Genen erfolgte anhand der von MWG bereitgestellten Belegliste (<http://www.mwg-biotech.com/services/array/download>).

Punkt	Gen	Genbankeintrag	Verhältnis Cy5 / Cy3
Induktion			
1948	Relaxin 1 (h1); rln1	NM_006911_1	7,6
2616	<i>butyrophilin-like 3</i> ; btnl3	NM_006707_1	6,0
3630	Hypothetisches Protein flj23311; flj23311	NM_024680_1	13,6
5043	pro1768 Protein; pro1768	NM_014099_1	6,5
9803	Hypothetisches Protein flj23022; flj23022	NM_025051_1	25,7
Repression			
2015	kiaa0741 Protein; kiaa0741	AB018284_1	0,16
3435	stat induzierter stat Inhibitor-2; stati2	NM_003877_1	0,21
3610	inaktiver Progesterone Rezeptor, 23 kd; p23	NM_006601_1	0,14
4018	Hypothetisches Protein flj20211; flj20211	NM_017713_1	0,28
5041	Furin, membranassoziertes Rezeptorprotein; pace <i>squamous cell carcinoma antigen recognized by t cell</i> ;	NM_002569_1	0,28
5758	sart-2	NM_013352_1	0,2
7975	<i>complement component 3a receptor 1</i> ; c3ar1	NM_004054_1	0,2

Die für die Arbeit interessanten Zielgene, für die eine Regulation durch bzw. eine Wechselwirkung mit Fettsäureagonisten beschrieben ist, wurden gesondert betrachtet und in Tab. 6-2 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass die Signale vieler der Zielgene weder im Cy3- noch im Cy5-Kanal die errechneten Schwellenwerte von 435 bzw. 310 *counts* überschritten. Sie scheinen nicht exprimiert zu sein, was jedoch den Ergebnissen aus der q-RT-PCR widerspricht. Möglicherweise ist die Expression dieser Gene auch zu niedrig, um

sie mit der DNA-Chip-Analytik zu erfassen. Unerwarteterweise gilt dies auch für PPAR α , dessen Expression durch die Transfektion der Zellen erhöht sein sollte. Die Signale liegen nach der Hintergrundkorrektur mit 68 (Cy3) und 40 *counts* (Cy5) deutlich unter den Schwellenwerten von 435 bzw. 310 *counts*.

Tab. 6-2: Signale und Cy5/Cy3-Verhältnisse ausgewählter Zielgene

Schwellenwert Cy5: 310 *counts*, Cy3 : 435 *counts*. Mit Stern gekennzeichnete Gene erreichen den Schwellenwert nicht.

Zielgen	Signal Cy5	Signal Cy3	Verhältnis	Zielgen	Signal Cy5	Signal Cy3	Verhältnis
	Bezafibrat	DMSO	Cy5 / Cy3		Bezafibrat	DMSO	Cy5 / Cy3
PPAR α *	40	67	0,60	FATP4*	120	132	0,91
PPAR β *	221	159	1,39	CD36/FAT*	82	81	1,00
PPAR γ *	94	126	0,74	GLUT1	673	575	1,17
RXR α *	257	235	1,09	GLUT2*	109	78	1,38
RXR β *	390	310	1,26	GLUT4*	64	97	0,65
RXR γ *	173	177	0,98				
A-FABP*	-15 ^a	27	-0,54	CYP4A11*	-18 ^a	41	-0,43
B-FABP*	27	37	0,73	ME3*	30	49	0,60
E-FABP*	224	256	0,87	ACOX1	484	542	0,89
H-FABP*	195	241	0,81	SCD	2556	1987	1,29
L-FABP	2142	2546	0,84				

^a Negative Werte werden erhalten, wenn der lokale Hintergrund höher ist als der Mittelwert des eigentlichen *Spots*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Regulation der in Tab. 6-1 aufgeführten Gene nicht weiterverfolgt, weil die erhöhte PPAR α -Expression aufgrund der Transfektion mit PPAR α auf dem Chip nicht nachweisbar war (Abb. 6-10 und Tab. 6-2). Darüber hinaus stellte sich in q-RT-PCR-Analysen heraus, dass Bezafibrat im HepG2-Zellmodell einen eher schlechten Induktor der Genexpression darstellt (Kap. 8). Zur Verifizierung der erhaltenen Daten hätten zusätzliche Chip-Experimente und die Kontrolle mit q-RT-PCR folgen müssen, um statistisch abgesicherte Aussagen über die Regulation der hier gefundenen Gene treffen zu können.

Trotz der aufgetretenen Schwierigkeiten im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Hybridisierungen wurde die DNA-Chiptechnologie wie geplant begleitend zur q-RT-PCR eingesetzt, mit dem Ziel der Identifizierung neuer nutritiver Markergene für die Wirkung der Lipidagonisten im Zellkulturmodell.

7 Evaluierung der Niedrigdichte-DNA-Chips für die Expressions-Analytik

Parallel zur Etablierung der DNA-Chip Analytik mit Hilfe kommerzieller Mitteldichte- und Hochdichte-DNA-Chips sollte ein Niedrigdichte-Chip zur gezielten Untersuchung ausgewählter Zielgene mit höherem Durchsatz entwickelt werden. Dazu konnte auf eine Technik der Oberflächenaktivierung von Glas-Objektträgern im Labormaßstab zurückgegriffen werden, die bereits in vorherigen Projekten etabliert wurde. Auf diesen aktivierten Oberflächen können aminomodifizierte Oligonukleotidsonden kovalent gebunden werden (Kap. 5.3.2). Die Herstellung solcher Niedrigdichte-Chips im eigenen Labor ermöglicht eine große Flexibilität hinsichtlich der zu untersuchenden Zielgene, die je nach Bedarf ausgetauscht oder hinzugefügt werden können. Ein weiterer Vorteil dieser selbst hergestellten Chips sind die im Vergleich geringen Kosten, die sich bei kommerziellen Chips auf mehrere hundert Euro pro Chip belaufen können und somit die Anzahl der Experimente einschränkt.

Die hier eingesetzten Oligonukleotidsonden (50mere) wurden ebenfalls von der Firma *MWG Biotech* bezogen. *MWG* bietet eine Auswahl an bereits validierter Sonden für humane Gene, deren Sequenz – nicht jedoch immer ihre Funktion – bekannt und in Genbanken eingetragen ist. Bei diesen Sonden handelt es sich um dieselben Sonden, die von der Firma für die Herstellung der kommerziellen Mitteldichte- und Hochdichte-Chips benutzt werden. Die bisherigen Erfahrungen mit dieser Art von DNA-Chips beruhten auf deren Verwendung in DNA-Biosensor-Chips für die schnelle Tierarten- und Bakterien-Differenzierung. Für diese Anwendung waren wichtige Hybridisierungsparameter wie die Sondenkonzentration, Art der Sonden und die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers bereits etabliert. Dennoch mussten für die konventionelle DNA-Chip Technik, der Hybridisierung unter dem Deckglas, die Handhabung und die optimalen Bedingungen bestimmt und etabliert werden. Aufgrund der Erfahrung mit dem Einsatz von Fluorophor-markierten Oligonukleotide als Ziel-DNA in der DNA-Chip Technik, wurde in der ersten Phase der Optimierung auf diese Art der Ziel-DNA zurückgegriffen. Es handelt sich hierbei um kurze (< 75 Nukleotide) DNA-Oligonukleotide, deren Sequenz in der Regel genau komplementär zu den eingesetzten Sonden ist. Eine genaue Voraussage des zu erhaltenden Hybridisierungsmusters ist somit möglich.

Im Hinblick auf die späteren Genexpressionsanalysen, die mit vielen unterschiedlich langen, fluoreszenzmarkierten cDNA-Fragmenten der zu untersuchenden Probe durchgeführt

werden sollten, wurde eine Ziel-DNA benötigt, die nicht mehr nur wenige Nukleotide lang ist, sondern einen größeren Bereich abdeckt, innerhalb dessen die zur Sonde komplementäre Sequenz liegt. Dazu wurden PCR-Produkte unterschiedlicher Länge herangezogen, die aufgrund ihrer komplexeren Eigenschaften bezüglich Länge, Struktur sowie Schmelztemperatur, und damit ihren Ansprüchen an die Stringenz während der Hybridisierung, als realere Modelle für die cDNA-Proben angesehen wurden.

7.1 Optimierung der Sondenkonzentration

Um einen ausreichenden Überschuss der immobilisierten Fangsondemoleküle im Verhältnis zu den Fluorophor-markierten Ziel-DNAs zu gewährleisten, wurde zunächst die Fangsondenkonzentration optimiert. Dazu wurde auf den aktivierten Objektträgern ein 9x6 Array mit einer β -Actinsonde (50mer) in Konzentrationen von 0,25 bis 6 μ M immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer zur Sonde komplementären β -Actin-Ziel-DNA. Für die Auswertung wurde der in Abb. 7-1 A dargestellte mittlere Bereich des Array herangezogen.

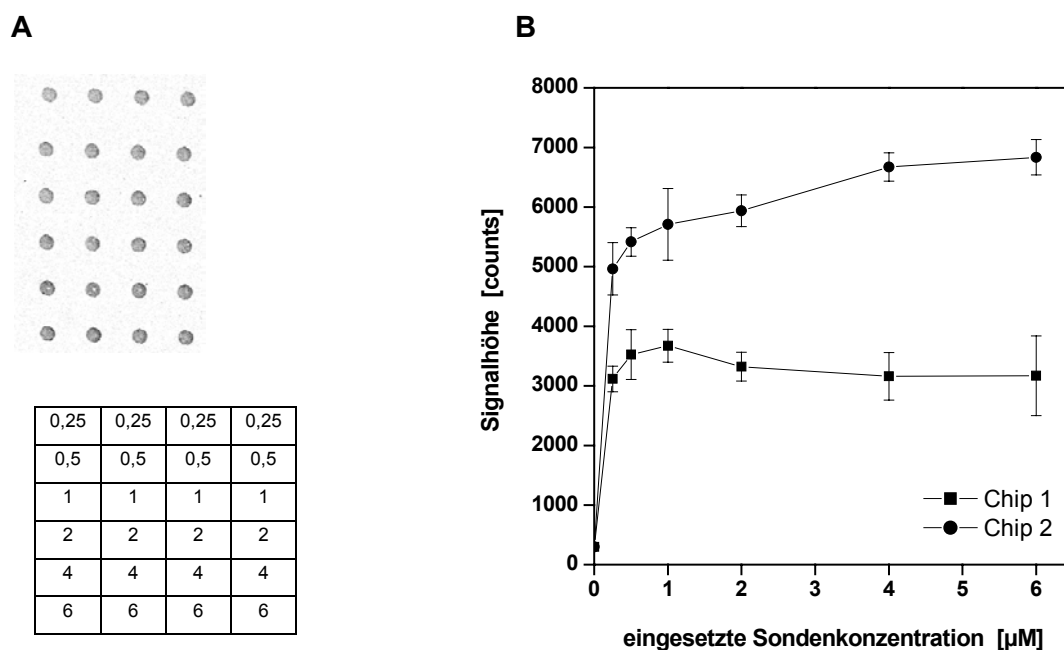


Abb. 7-1: Optimierung der Sondenkonzentration für die Immobilisierung

(A) Ausschnitt aus den auf silanisierten Objektträgern immobilisierten Array. Die 50mer- β Actin Sonde wurde in Reihen bestehend aus insgesamt 9 Spots aufgespottet, dabei wurde die Konzentration der Sondenlösung von oben nach unten erhöht: 0,25; 0,5; 1; 2; 4 und 6 μ M. Der gewählte Ausschnitt von 4 x 6 Spots entspricht dem ausgewerteten Bereich der Chips mit $n = 4$ pro Sondenkonzentration.

(B) Darstellung der Signalthöhen in Abhängigkeit von der Sondenkonzentration nach Hybridisierung der Arrays mit einer zur Sonde komplementären fluoreszenzmarkierten β -Actin-Ziel-DNA (0,5 nM in UltraHyb) unter einem Deckglas. Die Auswertung erfolgte mittels der Software *GenePixPro*. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten Mittelwerte aus 4 Bestimmungen \pm SD.

Zum einen zeigte sich, dass auch auf den Niedrigdichte-Chips die Hybridisierung zweier Arrays aus der gleichen Charge und mit der gleichen Menge markierter Ziel-DNA zu unterschiedlich hohen Signalen führte und so die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert wurden. Zum anderen zeigt Abb. 7-1 B, dass auf Chip 2 oberhalb von 0,5 μM eine Sättigung der Signale auftrat, auf Chip 1 jedoch die Signale auch darüber hinaus noch langsam ansteigen, bis ab etwa 4 μM Signalsättigung auftritt. In diesem Bereich der Sättigung kann davon ausgegangen werden, dass Unterschiede der gemessenen Signale alleine auf unterschiedlich hohe Ziel-DNA-Konzentrationen zurückzuführen sind. Da die Sondenkonzentration von 5 μM im Biosensorchip zu guten Ergebnissen führte, wurde diese aufgrund der Ergebnisse (Sättigung der Signale) auch für die konventionellen DNA-Chips übernommen.

7.2 Auswahl geeigneter Sonden

Die für Biosensorchip-Anwendungen entwickelten Sonden besitzen vor der eigentlichen, zum Zielgen komplementären Sequenz einen T_8 -Abstandshalter ($\text{NH}_2\text{-TTT TTT TT-N}_x$). Die angebotenen Sonden weisen jedoch keinen T_8 -Abstandshalter auf, deshalb musste vorab ein eventueller Einfluss eines solchen Abstandshalters auf die Hybridisierungseigenschaften anhand der Auswirkung auf die Signalhöhe überprüft werden. Dazu wurde ein 5 x 5 Array aus β -Actin-Sonden mit und ohne T_8 -Abstandshalter auf Glasobjektträgern immobilisiert. Es folgte die Hybridisierung auf 3 verschiedenen DNA-Chips mit einer zu beiden Sonden komplementären, markierten 50mer Ziel-DNA. Der Vergleich der hintergrundkorrigierten Signale ist in Abb. 7-2 dargestellt.

In diesem Experiment wurden jeweils geringe Unterschiede der Signalhöhen der Sonden mit und ohne T_8 -Abstandshalter innerhalb eines Chips beobachtet, die jedoch im Rahmen der Variabilität der Signale innerhalb eines Array lagen und nicht signifikant waren (Student-T-Test). Daher wurden für die beiden Sondentypen vergleichbare Hybridisierungseigenschaften angenommen und der Einsatz der Sonden ohne T_8 -Abstandshalter auf den silanisierten und aktivierten DNA-Chips als problemlos angesehen.

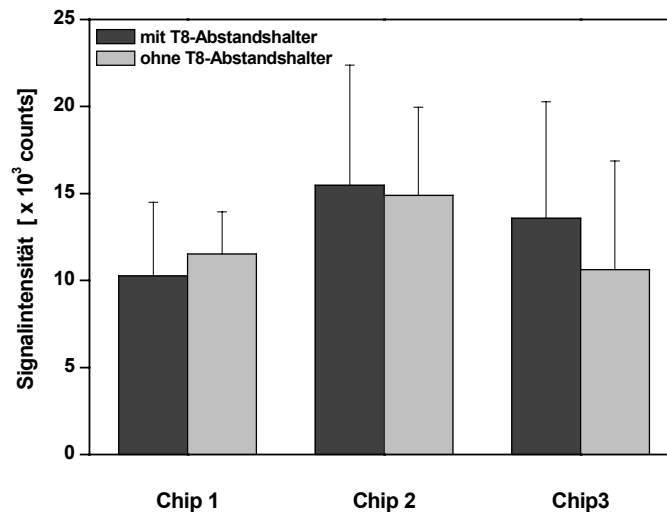


Abb. 7-2 : Vergleich der Hybridisierungen der Sonden mit und ohne T8-Abstandshalter mit markierter Ziel-DNA

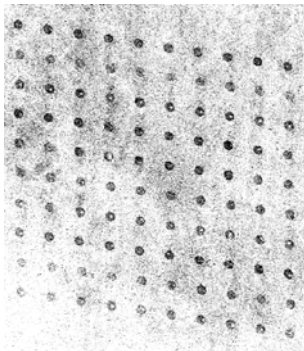
Eingesetzt wurden Arrays aus 50mer β -ACT-Sonden mit ($n = 13$) und ohne T8-Abstandshalter ($n = 12$). Hybridisiert wurde auf drei verschiedenen, silanisierten Chips mit einer Cy5-markierten Ziel-DNA (1 nM in GlasHyb-Puffer) unter einem Deckglas für 1 h bei 37°C in einer Feuchtbox. Die Detektion erfolgte mit dem GMS Arrayscanner. Signalthöhen \pm SD.

7.3 Überprüfung der Immobilisierung

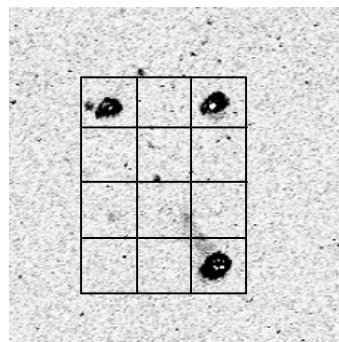
Um die Immobilisierung zu überprüfen, d.h. ob die Sonden tatsächlich auf der Chipoberfläche angebunden haben, wurde eine Kontrollhybridisierung mit Cy5-markierten *Random Nonameren* (Cy5-N₉) etabliert. Dazu wurde eine Lösung der Cy5-N₉ auf den zu prüfenden Arrays hybridisiert. Die Inkubation erfolgte hier nach einem Protokoll des *Institute for Genomic Research* (<http://www.tigr.org>) 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtbox. Als Beispiel ist die Hybridisierung der Cy5-N₉ auf einem 10x10 Array dargestellt, nach der an allen Sonden des Array deutliche Signale zu erkennen waren (Abb. 7-3 A), die Immobilisierung war in diesem Fall erfolgreich. Ein weiteres Verfahren der Kontrolle ist die Hybridisierung mit einer zu den Sonden direkt komplementären Ziel-DNA, wie Oligonukleotide oder PCR-Produkte mit einer Fluoreszenz-Markierung (Abb. 7-3 B). Routinemäßig wurden daher in allen Arrays Sonden immobilisiert, für die Kontrolloligonukleotide oder PCR-Produkte (invA, L-FABP) vorhanden waren, die entweder separat oder mit der Probe ko-hybridisiert werden konnten. Da diese Testhybridisierungen nicht reversibel sind, müssen diese Chips verworfen werden. Dennoch können auf diese Weise die Chips einer Produktions-Charge stichprobenartig überprüft werden (Abb. 7-3 B).

Eine weitere Möglichkeit der Kontrolle, die ebenfalls routinemäßig durchgeführt wurde, ist die Immobilisierung einer Sonde, die am 3'-Ende Cy5-modifiziert ist. Nach Anregung im Arrayscanner sollte also an der Stelle dieses Positionsmarkers auch vor der Hybridisierung mit Ziel-DNA ein Fluoreszenzsignal detektierbar sein (Abb. 7-3 B, Daten vor der Hybridisierung nicht gezeigt).

A



B



PM	CD14	L-FABP
A-FABP	ARA	H-FABP
RXR α	RXR β	RXR γ
PPAR β	PPAR γ	invA

Abb. 7-3: Überprüfung des Immobilisierungsvorgangs

(A) Die nach der deaktivierten und geblockten Chips (10x10 Array) wurden mit 0,5 μM Cy5-N₉ in 5x SSC mit 0,01 % Tween 20 für 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtbox hybridisiert. Vor der Hybridisierung wurde die Cy5-N₉-Lösung für 5 min bei 90°C im Thermoblock erhitzt, um Dimere zu denaturieren. **(B)** Der Array wurde mit einem fluoreszenzmarkierten PCR-Produkt (L-FABP) und einer Oligonukleotid-Ziel-DNA (invA) hybridisiert, komplementär zu jeweils einer Sonde auf dem Chip. 1h, 37 °C in einer Feuchtbox. Außerdem ist die Fluoreszenz des Positionsmarkers (PM, Cy5-modifizierte Sonde) zu erkennen.

7.4 Optimierung der Hybridisierungsparameter

Die Spezifität der Hybridisierung ist abhängig von der Stabilität des gebildeten Komplexes aus DNA-Sonde und Ziel-DNA sowie der Stringenz der Reaktionsbedingungen. Faktoren, die die Stringenz beeinflussen, sind u.a. die Ionenstärke und die Konzentration helixdestabilisierender Moleküle, wie z.B. Formamid (Kap. 3). Eben diese Parameter mussten für die Hybridisierung unter dem Deckglas optimiert werden. Dazu wurden unterschiedliche kommerzielle Hybridisierungspuffer eingesetzt und den Puffern auch unterschiedliche Formamidkonzentrationen zugesetzt. Die Zugabe von Formamid zu Hybridisierungspuffern setzt die Schmelztemperatur der Ziel-DNA herab und schafft so unter Umständen stringente Bedingungen für eine Hybridisierung sogar bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Salzkonzentration bei konstantem Formamidgehalt variiert. In den folgenden Experimenten wurde das Cy5-markierte L-FABP-PCR-Produkt als Ziel-DNA eingesetzt, das ein Modell für eine anspruchsvollere Hybridisierung hinsichtlich der späteren Analysen der cDNA darstellt. Auf den Chips befanden sich neben der zur Ziel-DNA komplementären L-FABP-Sonde auch Sonden für A-FABP und I-FABP. Da die Sequenzen der Sonden nicht vom Hersteller veröffentlicht wurden, können hier keine Aussagen über die Homologien der Sondensequenzen gemacht werden.

7.4.1 Hybridisierungspuffer

In ersten Versuchen wurde die Ziel-DNA mit dem Hybridisierungspuffer GlasHyb (Clontech) verdünnt und auf den Array aufgetragen. Vermehrt wurde schlechte Hintergrundqualität in Form von Schlieren und „körnigen“ Mustern festgestellt, die teilweise über den *Spots* lagen und so die Ergebnisse verfälschten bzw. die Auswertung in manchen Fällen unmöglich machten. Daraus resultierte auch eine im Mittel hohe Hintergrundfluoreszenz. Darüber hinaus traten Kreuzhybridisierungen an Sonden auf, die nicht komplementär zu den eingesetzten Ziel-DNAs waren. Teilweise waren diese Signale höher als die der zu Ziel-DNAs komplementären Sonden. Kreuzhybridisierungen an den Negativkontroll-Sonden und damit verbundenen höheren Signale an diesen Sonden würden zu einem hohen Schwellenwert des betreffenden Chips führen (Kap. 3.1.3). Um dies zu vermeiden, wurden zusätzliche Puffer in Hybridisierungen mit dem Cy5-markierten L-FABP-PCR-Produkt hinsichtlich der Hintergrundfluoreszenz und Kreuzhybridisierung getestet: UltraHyb (Ambion), GlasHyb (Clontech), PerfectHyb (Sigma), Formamidpuffer (MWG Biotech) und 5x SSC / 0,01 % Tween, 50 % Formamid (TIGR). Über die Zusammensetzung der Puffer machen die Hersteller keine genaueren Angaben. Es ist jedoch bekannt, dass UltraHyb einen

Formamidanteil von 50 % aufweist. Bei dem MWG-Formamidpuffer handelt es sich um den Standard-Puffer zur Hybridisierung der Mitteldichte- und Hochdichte-Chips von MWG.

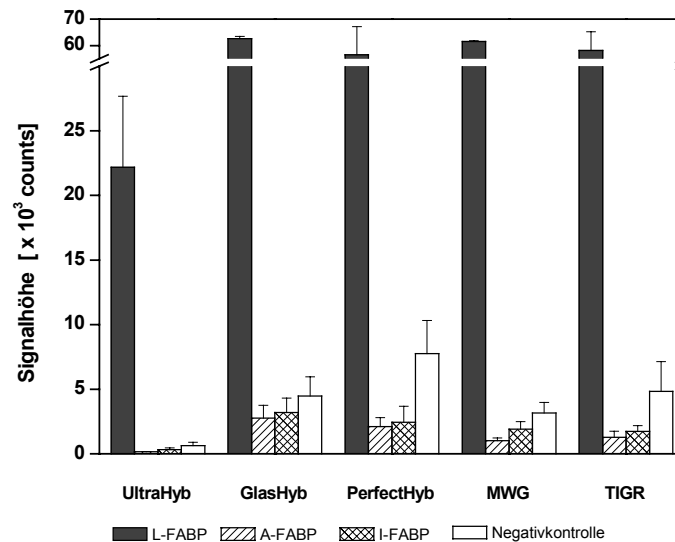


Abb. 7-4: Einfluss des Hybridisierungspuffers auf die Signalhöhe und die Kreuzhybridisierung

Das Cy5-markierte L-FABP-PCR-Produkt wurde 4-fach in den jeweiligen Puffern verdünnt. 13 µl der verschiedenen DNA-Lösungen wurden auf 2 Arrays aufgetragen, Deckgläser aufgelegt und 1 h bei 37°C in einer Feuchtbox inkubiert. Auf den Arrays waren neben der L-FABP-Sonde auch Sonden für A- und I-FABP sowie die Negativkontrolle (ara-Sonde) aufgebracht. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Signalhöhen und der Kreuzhybridisierungen (= Signale an anderen Sonden als L-FABP). Signalhöhen an den jeweiligen Sonden mit den verschiedenen Puffern, dargestellt sind die Mittelwerte der hintergrundkorrigierten Signale an den entsprechenden Sonden mit $n = 4$ aus 2 Arrays \pm SD.

UltraHyb zeigt in diesen Versuchen die höchste Stringenz, d.h. das L-FABP-PCR-Produkt hybridisierte nur mit der passenden Sonde. Dies erfolgte jedoch auf Kosten der Signalhöhe (22200 counts). Es trat lediglich eine geringe Kreuzhybridisierung von 3 ± 1 % an der ara-, sowie von $1 \pm 0,5$ % an den A- und I-FABP-Sonden auf. Die Qualität des Hintergrunds war gleichmäßig gut mit einer Höhe von 370 ± 14 counts. Die Hybridisierung mit GlasHyb war dagegen weniger stringent. Zwar war die Signalhöhe an der genau komplementären Sonde etwa dreimal so hoch wie nach der Hybridisierung mit UltraHyb, es kam jedoch zu höheren Kreuzhybridisierungen der Ziel-DNA mit allen anderen Sonden (ara: 7 ± 2 %, A-FABP: 4 ± 2 % und I-FABP: 5 ± 2 %). Wie schon in vorherigen Experimenten beobachtet, war auch hier die Qualität des Hintergrunds ungleichmäßig mit vielen Artefakten, und die Hintergrundfluoreszenz mit 700 ± 90 counts die höchste in dieser Versuchsreihe (Abb. 7-4).

Im Fall der Hybridisierung in PerfectHyb-Puffer war das L-FABP-Signal ebenfalls sehr hoch, jedoch ebenso die Kreuzhybridisierung an der ara-Sonde ($14 \pm 5 \%$). Sowohl an der A- als auch an der I-FABP-Sonde trat eine Kreuzhybridisierung von $4 \pm 2 \%$ auf. Allerdings war der Hintergrund gleichmäßig, und die Hintergrundfluoreszenz niedrig (400 *counts*). Die Hybridisierungen mit dem MWG- und dem TIGR-Puffer führten zu gleichmäßigem Hintergrund mit jeweils 400 *counts*. Auch die Kreuzhybridisierungen an den A- und I-FABP-Sonden ergaben Werte unter 3 %. Die Signalhöhe an der L-FABP-Sonde lag in beiden Fällen auf einem hohen Niveau. An der ara-Sonde kam es jedoch zu Kreuzhybridisierungen von 5 ± 1 bzw. $8 \pm 4 \%$ (Abb. 7-4).

Aufgrund der niedrigen Kreuzhybridisierungen und des qualitativ guten Hintergrunds wurde der UltraHyb-Puffer zunächst für die Charakterisierung der Chips mit Cy5-markierten PCR-Produkten eingesetzt.

7.4.2 Formamidgehalt und Salzkonzentration

Um die möglichst hohe Signale zu erreichen, wurde die Salzkonzentration des Hybridisierungspuffers für die Hybridisierung mit PCR-Produkten variiert. Durch Zugabe von Reinst-Wasser zur Stammlösung des UltraHyb-Puffers unter Beibehaltung der 50 % (v/v) Formamid, wurde die Salzkonzentration des Puffers erniedrigt. Genaue Ionenstärken können hierbei nicht angegeben werden, da die Zusammensetzung des Puffers nicht veröffentlicht wurde. L-FABP-PCR-Produkt wurde in diesen Puffern aufgenommen und auf einen Chip aufgetragen, auf den ein 5x5 Array bestehend aus der L-FABP-Sonde immobilisiert wurde. Entgegen der Erwartung wurden dabei bei der Verringerung der Ionenstärke, d.h. bei der Erhöhung der Stringenz eine Zunahme der Signalhöhe beobachtet. Mit einer Konzentration von 25 % (v/v) UltraHyb wurden die höchsten Signale erhalten (Abb. 7-5 A).

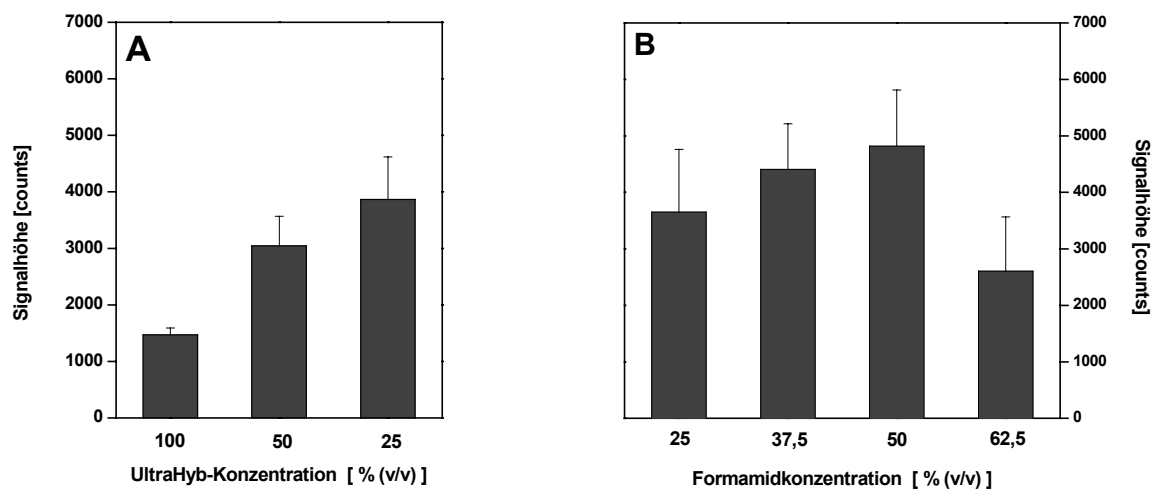


Abb. 7-5: Einfluss der UltraHyb und Formamid-Konzentration auf die Hybridisierung

(A) Inkubation eines L-FABP-Array mit 5 nM L-FABP-PCR-Produkt in 100, 50 und 25 % (v/v) UltraHyb-Puffer mit jeweils 50 % (v/v) Formamidgehalt (1h, 37°C in einer Feuchtbox). **(B)** Inkubation eines L-FABP-Array mit 5 nM L-FABP-PCR Produkt in 25 % UltraHyb mit 25, 37,5, 50 und 62,5 % (v/v) Formamidgehalt (1h, 37°C). Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten Mittelwerte \pm SD (n = 9).

Anschließend wurde die Hybridisierung des gleichen PCR-Produkts bei konstanter UltraHyb-Konzentration von 25 % (v/v) aber ansteigendem Formamidgehalt untersucht. Dem Puffer wurde eine entsprechende Menge Formamid zugefügt, sodass die Konzentration 25, 37,5, 50 und 62,5 % (v/v) betrug. Hier wurden die höchsten Signale bei 50 % Formamidkonzentration erhalten (Abb. 7-5 B). Zur weiteren Charakterisierung der Chips wurde eine UltraHyb-Konzentration von 25 % (v/v) sowie eine Formamidkonzentration von 50 % (v/v), wenn nicht anders aufgeführt, gewählt.

7.5 Vergleich der Hybridisierung unter dem Deckglas und mit einem Hybridisierungsrahmen

Bei der Hybridisierung unter dem Deckglas wurde bei einigen Chips eine inhomogene Signalverteilung über den Array beobachtet, die durch die Ausbildung eines ungleichmäßig „dicken“ Flüssigkeitsfilms zwischen Chip und Deckgläschen durch Verrutschen des Deckglases während der Inkubation verursacht werden könnte. Um das Verrutschen zu verhindern und eine definierte Schichtdicke zu gewährleisten, werden doppelseitig selbstklebende Hybridisierungsrahmen angeboten, die auf den Chips um den Array fixiert werden. Die Probe wird aufgetragen und der Rahmen anschließend mit einer Folie

verschlossen, sodass sich eine Kammer mit definierten Volumen bildet. Das Probenvolumen, das bei solch einem Chip eingesetzt werden kann, muss an den gewählten Hybridisierungsrahmen angepasst werden.

Zum Vergleich der Homogenität der Signale nach der Hybridisierung unter dem Deckglas und im Hybridisierungsrahmen wurden die schon in Kap. 7.1 beschriebenen β -Actin-Chips herangezogen. Die Inkubation erfolgte mit einer 1 nM Lösung eines zur Sonde komplementären β -Actin-Oligonukleotids (Cy5-markiert) in UltraHyb-Puffer, wobei drei Arrays mit einem Deckglas und drei mit einem Hybridisierungsrahmen bedeckt wurden. Abb. 7-6 zeigt die Signale auf den einzelnen Chips an den Sonden von links nach rechts. In vertikaler Richtung konnte in diesem Fall nicht ausgewertet werden, da hier Signalunterschiede aufgrund unterschiedlicher Sondenkonzentrationen erhalten werden.

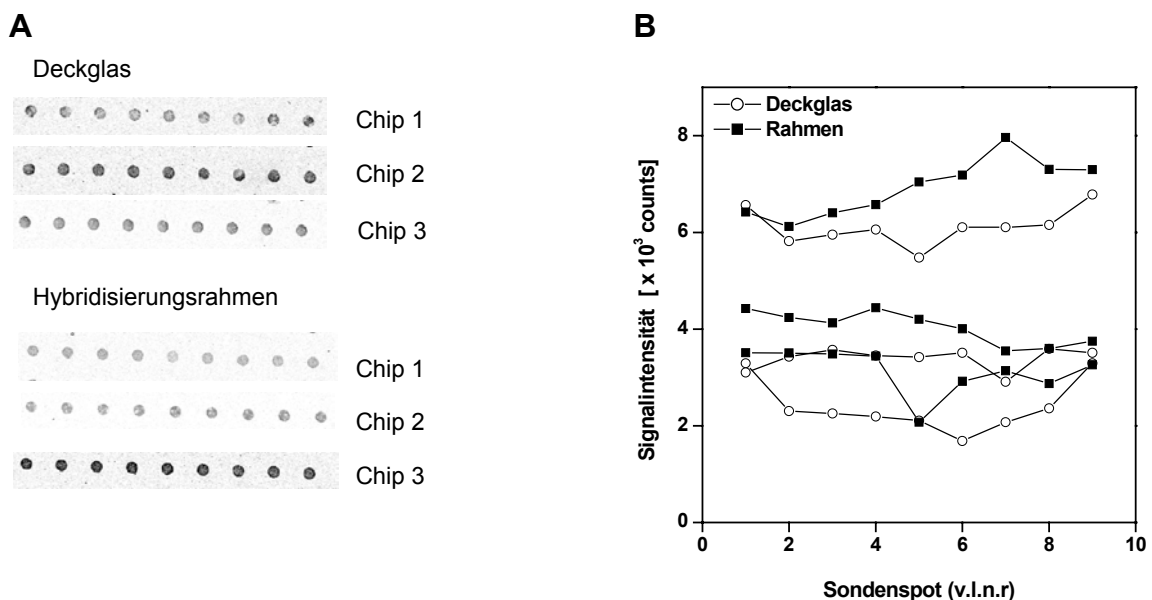


Abb. 7-6: Vergleich der Hybridisierung mit Deckglas und Hybridisierungsrahmen

Inkubation eines 9x6 β -Actin-Array für 1 h bei 37 °C in einer Feuchtbox mit einem zur Sonde komplementären 75mer Actin-Ziel-DNA (1nM in UltraHyb-Puffer (25 % UltraHyb / 50 % Formamid)) mit und ohne Hybridisierungsrahmen.

(A) Abbildungen der ausgewerteten Reihen aus der Mitte des 6x9 Arrays, bestehend aus 9 Spots der gleichen Sonde. (B) Signalthöhe an 9 benachbarten Sondensspots aus jeweils 3 Hybridisierungen unter dem Deckglas und im Hybridisierungsrahmen.

Aus Abb. 7-6 geht hervor, dass die Signale sowohl bei der Deckglas- als auch bei der Rahmenhybridisierung leicht über die Breite eines Array variieren. Der Einsatz eines Hybridisierungsrahmens gibt demnach keine Garantie für eine homogene Hybridisierung.

Dies wurde auch in weiteren Experimenten immer wieder beobachtet, bei denen ebenfalls deutliche Abnahmen der Signalhöhe in einer Richtung des Array auftraten.

Wie schon beschrieben, wird dieses bekannte Problem der DNA-Chip-Analytik durch Einführung der Zweifarben-Experimente gelöst. Dennoch wurden die weiteren Hybridisierungen mit den Hybridisierungsrahmen durchgeführt, da hier durch die Bildung einer geschlossenen Kammer der Kontakt der Proben mit der Umgebung vermieden wird. Außerdem wird ein konstantes Volumen beibehalten, es treten keine Volumenverluste durch z.B. Verdunstung auf. Die Zahl der nicht auswertbaren Experimente konnte dadurch verringert werden. Darüber hinaus ermöglichen die Hybridisierungsrahmen die Inkubation von zwei Arrays auf einem Chip gleichzeitig, da durch die klare Abgrenzung der Arrays und der aufgetragenen Proben eine versehentliche Vermischung verhindert wird. Letzteres gilt besonders bei der empfohlenen Inkubation auf einem Schüttler mit etwa 80 rpm.

7.6 Niedrigdichte-Chips für die Analyse von cDNA aus Zellkulturproben

Im Hinblick auf die vorgesehenen Analysen der differentiellen Expression ausgewählter Zielgene in höherem Durchsatz wurden aus dem PAN[®]-Oligo Set-Angebot der Firma *MWG Biotech* Sonden für 27 interessante Zielgene ausgesucht (Tab. 7-1). In Kap. 5.1.4 findet sich die Zuordnung des Genbankeintrags zu den Sonden.

Tab. 7-1: Sonden für die Niedrigdichte-Chips

Eine Zuordnung der Sonden zu den jeweiligen Genbankeinträgen findet sich in Tab. 5.1.4 (Kap. 5). Die Funktion der Gene ist im Anhang (Kap. 11) näher beschrieben. Die Bezeichnungen A-Z sowie a-e stellen Platzhalter der jeweiligen Sonde für spätere Belegpläne der Arrays dar.

Zielgen	Bezeichnung	Zielgen	Bezeichnung
ACAA1	A	PPAR α	S
ACOX1	B	PPAR β/δ	T
ACOX2	C	PPAR γ	U
β -ACT	D	PTGS2	V
CASP9	E	RPS27A	W
CD14	F	RXR α	X
CD36/FAT	G	RXR β	Y
CYP4A11	H	RXR γ	Z
A-FABP	I	UCP2	a
E-FABP	J		
I-FABP	K	<u>Kontrollsonden</u>	
H-FABP	L	ara	b
L-FABP	M	ctx	c
FAS	N	Gal	d
GAPDH	O	invA	e
GCK	P	Luc	f
GSR	Q	PM	PM
HADHB	R		

7.6.1 Test-Chips für die neuen Sonden

Auf ersten Chips zur Charakterisierung der neuen Sonden wurden die Sonden für PPAR α und L-FABP immobilisiert, da hierfür komplementäre Cy5-markierte PCR-Produkte zur Verfügung standen und so das Hybridisierungsmuster bekannt war. Als Positivkontrolle wurde die invA-Sonde, für die ein komplementäres invA-Zieloligonukleotid vorhanden war, zugefügt (Abb. 7-7). Die PCR-Produkte wurden jeweils in GlasHyb- und dem optimierten UltraHyb-Puffer verdünnt. Abb. 7-7 zeigt die Belegung der Chips mit den einzelnen Sonden und die nach der Hybridisierung erhaltenen Signale. Wieder wurden beim Einsatz des GlasHyb-Puffers Kreuzhybridisierungen beobachtet, die nicht mit UltraHyb auftraten (Abb. 7-7 B und D). Bei der Hybridisierung mit UltraHyb herrschten offensichtlich stringenteren Bedingungen, sodass nur Signale an den L-FABP bzw. PPAR α und invA-Sonden erhalten wurden.

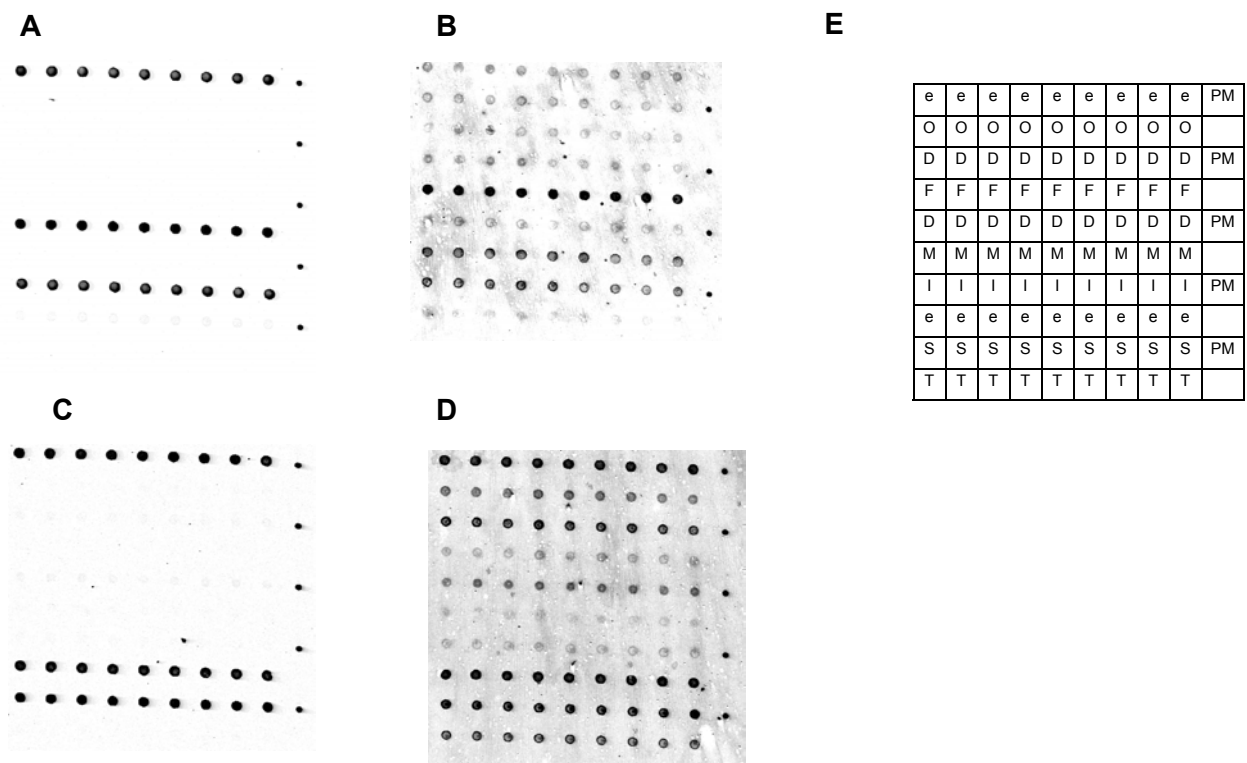


Abb. 7-7: Hybridisierung der „Test-Chips“ mit Cy5-markierten L-FABP- und PPAR α -PCR-Produkten

Inkubation der Test-Chips für 1 h bei 37 °C in einer Feuchtbox mit L-FABP-PCR Produkt in UltraHyb- (25 % UltraHyb / 50 % Formamid) **(A)** und GlasHyb-Puffer **(B)** bzw. PPAR α -PCR-Produkten in UltraHyb- (25 % UltraHyb / 50 % Formamid) **(C)** und GlasHyb-Puffer **(D)** unter einem Deckglas. Zur Kontrolle wurde der Probenlösung 1 nM invA-Oligonukleotid-Ziel-DNA zugefügt. Dargestellt sind die nach der Auswertung im GMS-Arrays Scanner erhaltenen Bilder der Arrays **(E)**. Die Zuordnung der Sonden findet sich in Tab. 7-1.

Die hier erfolgreich durchgeführte Cy5-Markierung der PCR-Produkte durch die Verwendung eines entsprechenden Primers und deren Hybridisierung an Oligonukleotid-Sonden ist die Grundlage vieler DNA-Chips für die Genotypanalyse [113-116]. Hier wurde gezeigt, dass die auf den Objektträger immobilisierten Sonden funktionsfähig waren und zudem bei der Wahl des UltraHyb-Hybridisierungspuffers gute Signalhöhen ohne offensichtliche Kreuzhybridisierungen erhalten wurden.

7.6.2 Erste Niedrigdichte-Chips zur weiteren Charakterisierung der Sonden

Unter Verwendung des gesamten SONDENSETS wurde nun ein Niedrigdichte-Chip mit einem Metaarray aus vier gleichen Subarrays auf den silanisierten und aktivierten Glaschips hergestellt (Abb. 7-8). Jede Sonde war also viermal auf einem Chip vorhanden. In ersten

Versuchen wurde cDNA aus HepG2-Zellen mit Cy5-dUTPs markiert und in UltraHyb-Puffer auf einen Niedrigdichte-Chip aufgetragen und in Anlehnung an die vorherigen Versuche für 2 h bei 37 °C unter dem Deckglas inkubiert.

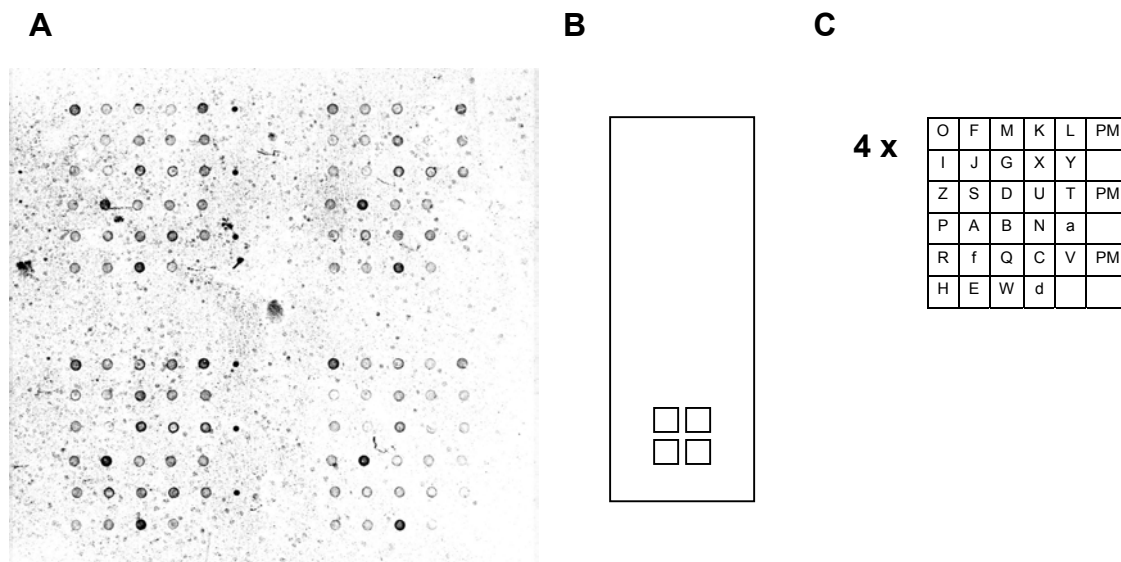


Abb. 7-8: Niedrigdichte-Array für die Analyse der Expression ausgewählter Zielgene in Zellkulturproben

Inkubation eines Niedrigdichte-Array für 2 h bei 37 °C in einer Feuchtbox mit 950 ng Cy5-dUTP markierter cDNA aus RNA unbehandelter HepG2-Zellen in UltraHyb-Puffer. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 43 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Detektion mit dem GMS Array Scanner.

(A) Hybridisierungsmuster des Niedrigdichte-Chips. **(B)** Position und Anordnung der Subarrays auf dem Glasobjektträger. **(C)** Sondenbelegung eines SubArray. Die Zuordnung der Sonden findet sich in Tab. 7-1. Die Belegung der anderen drei Subarrays ist identisch.

In Abb. 7-8 ist qualitativ zu erkennen, dass die Hintergrundfluoreszenz sehr ungleichmäßig hoch war und Artefakte sowie Schlieren auftraten. Darüber hinaus sind deutlich die *Spots* der Negativkontrollsonden zu erkennen. Die quantitative Analyse ergab für die Hintergrundfluoreszenz einen sehr hohen Wert von 3200 *counts* und für Luciferase (Luc) und β -Gal (Gal) als Negativkontrollsonden ein Signal von 11300 ± 2300 bzw. 5900 ± 1900 *counts*. Hier hat also eine Kreuzhybridisierung stattgefunden, die Bedingungen der Hybridisierung der cDNA waren nicht stringent genug. Es muss angenommen werden, dass die in diesem Versuch erhaltenen Signale überwiegend durch unspezifische Wechselwirkungen bzw. Kreuzhybridisierungen überlagert werden, da sich aus den Signalhöhen an den Negativkontrollen der sehr hohe Schwellenwert von 18700 *counts*

ergab, der nur an den Sonden RPS27A sowie ACAA1 überschritten wurde. Hier kann keine Aussage über die wirkliche Expressionshöhe der einzelnen Gene gemacht werden.

Hinsichtlich der Hintergrundqualität und der beobachteten Kreuzhybridisierungen waren die Ergebnisse der cDNA-Hybridisierung in UltraHyb-Puffer nicht zufriedenstellend. Desweiteren traten große Schwankungen der Signalhöhen innerhalb des Metaarray auf, d.h. die Hybridisierung unter dem Deckglas war inhomogen. Daraufhin sollte überprüft werden, ob die Benutzung eines anderen Puffers und eines Hybridisierungsrahmens das Ergebnis verbessern konnte. Dazu wurde die gleiche Ziel-DNA in Anlehnung an die Versuche mit den Kontrollchips (Kap. 6.1.1) in MWG-Formamidpuffer aufgenommen, auf den gleichen Chip aufgetragen und für 18 h bei 42 °C auf einem Schüttler inkubiert.

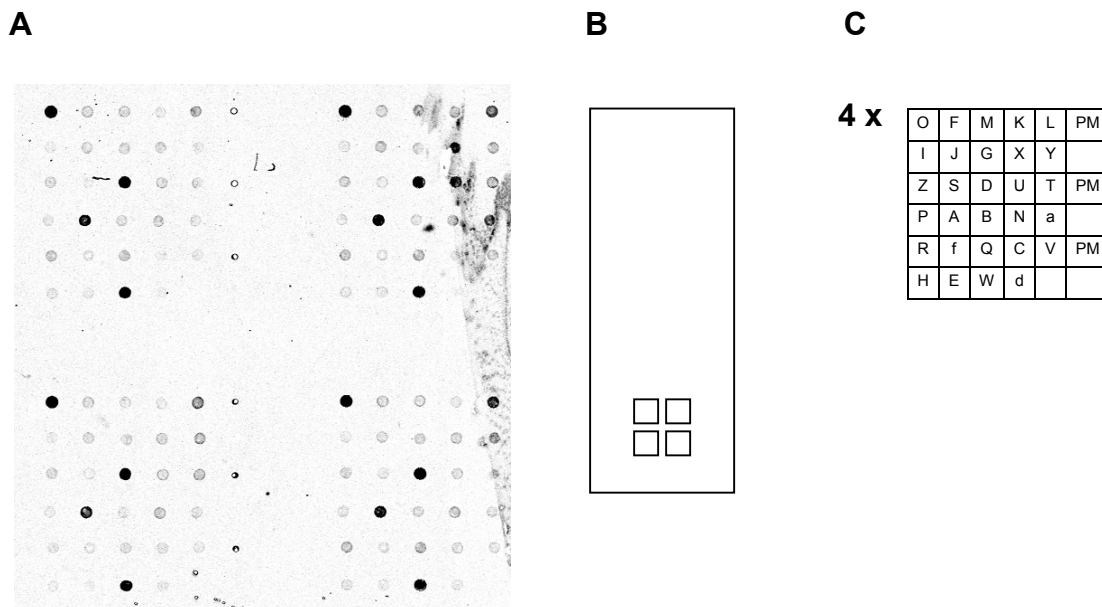


Abb. 7-9: Optimierung der Hybridisierung auf dem Niedrigdichte-Chip

Inkubation des Niedrigdichte-Array für 18 h bei 42 °C in einer Feuchtbox mit 750 ng Cy5-dUTP markierter cDNA aus RNA unbehandelter HepG2-Zellen in MWG-Formamidpuffer. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 76 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Detektion mit dem GMS Array Scanner.

(A) Hybridisierungsmuster des Niedrigdichte-Chips. **(B)** Position und Anordnung der Subarrays auf dem Glasobjektträger. **(C)** Sondenbelegung eines SubArray. Die Zuordnung der Sonden findet sich in Tab. 7-1. Die Belegung der anderen drei Subarrays ist identisch.

Mit dem MWG-Formamidpuffer konnte die Hintergrundfluoreszenz auf 790 counts gesenkt werden. Darüber hinaus trat eine deutlich schwächere Kreuzhybridisierung an den Negativkontrollsonden Gal und Luc auf (450 ± 140 bzw. 530 ± 40 counts), woraus sich ein Schwellenwert von 820 counts berechnen ließ. Die Hybridisierungsbedingungen waren

stringenter, daher wurden jedoch auch deutlich niedrigere Signalhöhen auf diesem Chip detektiert. Aus Tab. 7-2 geht hervor, dass unter diesen Bedingungen noch 19 der 26 Zielgene den Schwellenwert überschritten, also als exprimiert betrachtet werden können. Die höchsten Signale wurden erwartungsgemäß bei dem *Housekeeping*-Gen GAPDH (21130 counts) beobachtet, gefolgt von RPS27A (20287 counts), einem ribosomalen Protein und β -ACT (19992 counts), ebenfalls einem *Housekeeping*-Gen. Die Signalschwankungen innerhalb eines Array konnten durch den Einsatz eines Hybridisierungsrahmens in diesem Fall allerdings nicht gesenkt werden. Dies macht sich besonders bei den niedrig exprimierten Genen bemerkbar.

Tab. 7-2: Analyse der HepG2 cDNA auf dem Niedrigdichte-Chip (Abb. 7-9 A)

Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten Mittelwerte \pm SD der Zielgene ($n = 4$), deren Signale den Schwellenwert von 600 counts auf dem in Abb. 7-9 dargestellten Chip überschritten. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels des Software-Programms ScanAlyze. Die Funktion der Gene ist im Anhang (Kap. 11) näher beschrieben.

Zielgen	Signalhöhe [counts \pm SD]	Zielgen	Signalhöhe [counts \pm SD]
GAPDH	21130 \pm 5840	FAS	1290 \pm 160
RPS27A	20300 \pm 6380	GSR	1260 \pm 350
β-ACT	19990 \pm 4150	L-FABP	1190 \pm 470
ACAA1	7290 \pm 1190	UCP	1160 \pm 930
H-FABP	3530 \pm 1300	HADHB	1150 \pm 370
RXRα	2270 \pm 2130	CD14	1100 \pm 90
PPARγ	2030 \pm 1920	E-FABP	970 \pm 230
RXRβ	1430 \pm 560	RXRγ	890 \pm 80
PPARβ	1320 \pm 440	CD36/FAT	880 \pm 100
		I-FABP	782 \pm 390

Der MWG-Formamidpuffer schaffte für die Hybridisierung mit Hybridisierungsrahmen stringenter Bedingungen, sodass die Kreuzhybridisierungen an den Negativkontrollen unterbunden wurden. Darüber hinaus konnte das Ausmaß der Hintergrundfluoreszenz deutlich gesenkt werden. Aufgrund dieser Verbesserungen kam in weiteren Experimenten nur noch der MWG-Formamidpuffer zum Einsatz.

7.7 Erstellung von Expressionsprofilen mit Niedrigdichte-Chips

Nach der ersten Charakterisierung der Niedrigdichte-Chips in den im vorherigen Kapitel beschriebenen Vorversuchen sollte nun festgestellt werden, inwieweit sich die Chips zur Erstellung von Expressionsprofilen eignen. Dazu wurden die Signale der Chips, die mit cDNA aus HepG2- und THP-1-Zellen hybridisiert worden waren, mit Daten aus der q-RT-PCR verglichen.

7.7.1 Expressionsprofil der HepG2-Zellen

Zur Überprüfung wurden die mit dem DNA-Chip erhaltenen Ergebnisse (Kap. 7.6) mit den Daten aus der q-RT-PCR verglichen. Aus Abb. 7-10 A geht hervor, dass die sehr hohen Signale der beiden *Housekeeping*-Gene GAPDH und β -ACT auch durch q-RT-PCR erhalten wurden. Bei letzterer wies β -ACT einen für sehr hohe Expression stehenden $15-\Delta C_t$ -Wert von 15 auf, GAPDH von 13,2 (Abb. 7-10 B). PPAR α , β und γ (4660, 1320 und 2030 *counts*) sowie RXR α , CD36/FAT, E-FABP, L-FABP und ACOX1 (2274, 875, 969, 1187 und 695 *counts*) zeigten im Vergleich zu den *Housekeeping*-Genen deutlich geringere Signale, die auf eine eher niedrige Expression hindeuten, ACOX1 erreichte jedoch den Schwellenwert von 840 *counts* nicht. In der q-RT-PCR konnte jedoch für diese Zielgene eine mittlere, für L-FABP ($\Delta C_t = 12$) sogar eine sehr hohe, für Leberzellen typische, Expression bestimmt werden (Abb. 7-10 B). Interessanterweise war die Expression des H-FABP mit 3500 *counts* auf dem Chip etwas höher als die gerade beschriebenen Gene, in der q-RT-PCR wurde jedoch dieses Zielgen mit einem sehr niedrigem $15-\Delta C_t$ -Wert von lediglich 1,42 gerade noch detektiert.

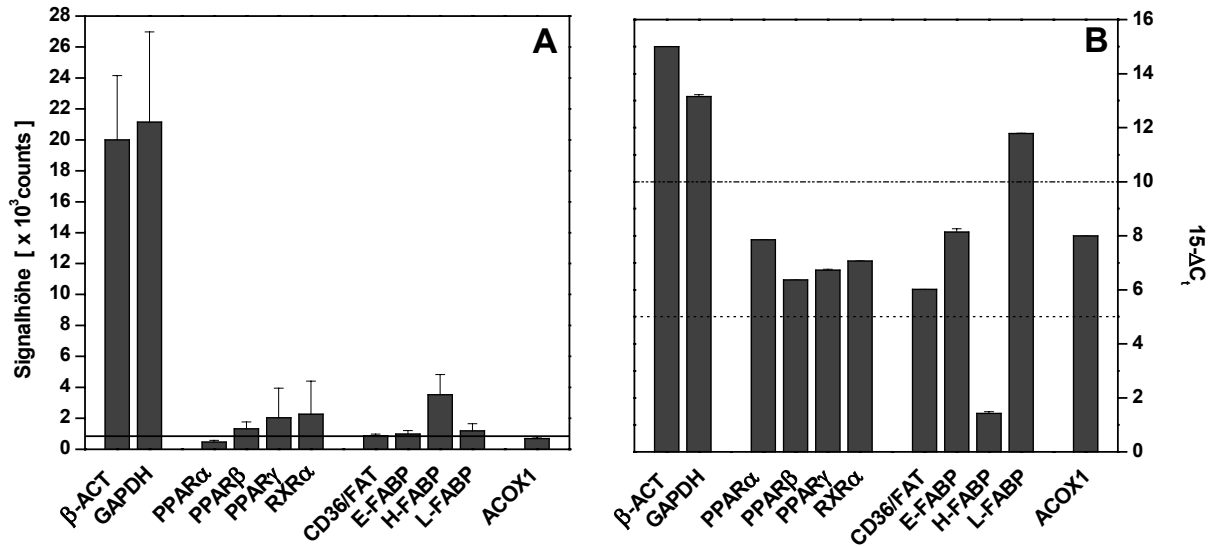


Abb. 7-10: Vergleich der Expressionsprofile der HepG2-Zellen, bestimmt mit Niedrigdichte-Chip und q-RT-PCR

(A) Inkubation eines Niedrigdichte-Chips mit 750 ng Cy5-dUTP markierter cDNA aus unbehandelten HepG2-Zellen (vgl. Abb 7-9) für 18 h bei 42°C in einer Feuchtbox. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 76 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Signalhöhen \pm SD (n = 4), — : Schwellenwert, 840 counts.

(B) Analyse der relativen Transkriptmengen durch q-RT-PCR nach der vergleichenden ΔC_t -Methode. Auftragung der auf β -ACT normierten 15- ΔC_t -Werte. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 2 unabhängigen Messungen \pm Abweichungen. : Grenze des niedrigen Expressionsniveaus; - - - - - : Grenze des mittleren Expressionsniveaus.

Die Ergebnisse aus dem Chipexperiment stimmten also nur zum Teil mit den als zuverlässiger anzusehenden Daten der q-RT-PCR überein.

7.7.2 Expressionsprofil der THP-1-Zellen

Auch für die monozytische THP-1-Zelllinie wurde ein Expressionsprofil im Niedrigdichte-Chip und durch q-RT-PCR erstellt (Abb. 7-12). Die cDNA wurde hierbei allerdings in zwei Schritten mit Cy3-aa-dUTP markiert, wobei der Markierungsgrad 65 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül betrug. Insgesamt wurden 450 ng cDNA in MWG-Formamidpuffer auf den Array aufgetragen und für 18 h bei 42 °C inkubiert. Die Hybridisierung mit der Cy3-markierten cDNA ergab deutliche Signale und es traten geringe Kreuzhybridisierungen mit der Negativkontrollsonde, hier *invA* (280 ± 280 counts) auf (Abb. 7-11). Daraus berechnete sich ein Schwellenwert von 1120 counts, der jedoch von allen Sonden überschritten wurde. Die Hintergrundfluoreszenz war dennoch sehr hoch (5900 counts).

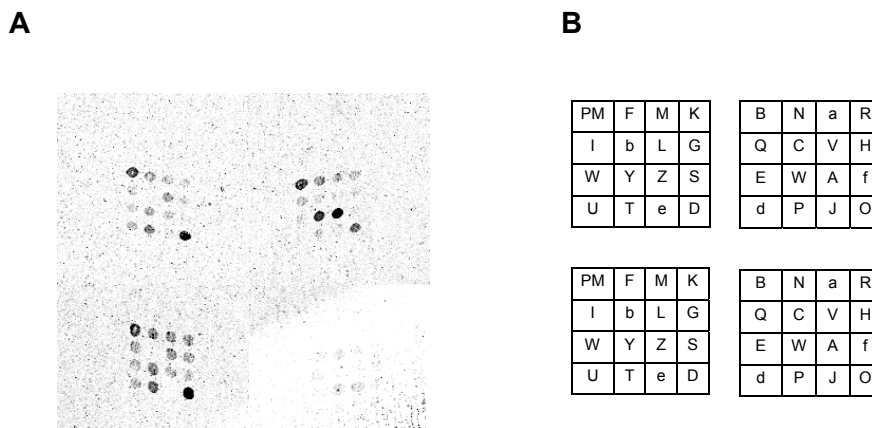


Abb. 7-11: Niedrigdichte-Array für die Analyse der Expression ausgewählter Zielgene in THP-1-Zellen

Inkubation des Niedrigdichte-Array für 18 h bei 42 °C in einer Feuchtbox mit 450 ng Cy3-aa-dUTP-markierter cDNA aus RNA unbehandelter THP-1-Zellen in MWG-Formamidpuffer. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 65 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Immobilisierung der Sonden mittels des Affymetrix® 417™ Arrayers. Detektion mit dem GMS Array Scanner.

(A) Hybridisierungsmuster des Niedrigdichte-Chips. Links unten befand sich während der Hybridisierung eine Luftblase, sodass die Sonden nicht hybridisierten. **(B)** Sondenbelegung der Subarrays. Die Zuordnung der Sonden findet sich in Tab. 7-1. Die Belegung der anderen drei Subarrays ist identisch.

In diesen q-RT-PCR-Untersuchungen wurden einige Gene, die in THP-1-Zellen nicht exprimiert wurden (z.B. H-FABP, L-FABP), nicht näher einbezogen, dagegen jedoch CD14 als typisches Markergen für Monozyten.

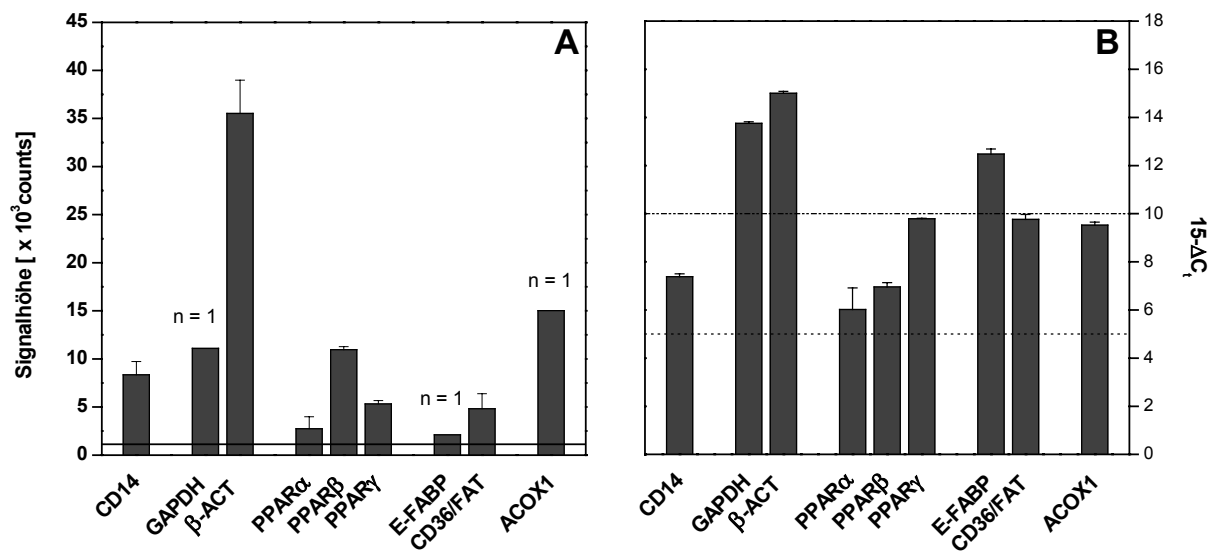


Abb. 7-12: Vergleich der Expressionsprofile der THP-1-Zellen, bestimmt mit Niedrigdichte-Chip und q-RT-PCR

(A) Inkubation des Niedrigdichte-Chips mit 450 ng Cy3-amino-allyl-dUTP markierter cDNA aus unbehandelten THP-1-Zellen für 18 h bei 42 °C in einer Feuchtbox. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 65 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. — : Schwellenwert, 1120 counts. **(B)** Analyse der relativen Transkriptmengen durch q-RT-PCR nach der vergleichenden ΔC_t -Methode anhand der auf β -ACT normierten $15-\Delta C_t$ -Werte. ····· : Grenze des niedrigen Expressionsniveaus; - - - - - : Grenze des mittleren Expressionsniveaus. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert der 2 unabhängigen Messungen \pm Abweichungen.

Die Messungen mit dem DNA-Chip ergaben für β -ACT wiederum ein sehr hohes Signal von 35530 counts (Abb. 7-12 A), was mit einem sehr hohen $15-\Delta C_t$ -Wert von 15 in der q-RT-PCR korrelierte (Abb. 7-12 B). Die Expression der PPAR Isoformen war in allen Fällen signifikant (2742, 10946 und 5320 counts) wobei PPAR β den höchsten Wert aufwies. In der q-RT-PCR zeigten sich PPAR α und β im mittleren Expressionsniveau, PPAR γ wies hier die höchste Expression mit einem $15-\Delta C_t$ -Wert von 9,8 auf. Anhand der PCR-Daten ist zu erkennen, dass E-FABP sehr hoch exprimiert wird ($15-\Delta C_t$ -Wert 12,5). Aus den Chipdaten ging jedoch mit 2100 counts eine deutlich geringere Expression hervor. Die Menge an CD36/FAT mRNA wird anhand des Chipexperiments ebenfalls eher als wenig eingestuft, wohingegen die q-RT-PCR eine im Vergleich zum *Housekeeping*-Gen Expression im mittleren Niveau ergab. CD14 und ACOX1 zeigten mit 8360 und 15040 counts eine Expression auf mittlerem Niveau, die auch durch die q-RT-PCR in etwa bestätigt werden konnte ($15-\Delta C_t$ -Wert 7,4 und 9,5).

Der direkte Vergleich der Daten der DNA-Chips mit jenen der q-RT-PCR erwies sich wiederum als schwierig, die Ergebnisse korrelierten nicht in jedem Fall (z.B. E-FABP). Darüber hinaus zeigte sich, dass der Vergleich der Signalhöhen und damit die Expression

zweier Gene auf einem Chip, wie z.B. CD14 und CD36/FAT, ebenfalls kritisch zu betrachten ist, da die Hybridisierung innerhalb des Array nicht immer homogen ist. Mit der q-RT-PCR wird ein direkter Vergleich zweier Gene durch die Wahl geeigneter Primer möglich, durch die jede PCR-Reaktion vergleichbar effizient abläuft.

Wird jedoch die Zweifarben-Technik in DNA-Chip-Experimenten eingesetzt, wird der Vergleich zweier unterschiedlicher Expressionszustände eines betreffenden Gens möglich (Kap. 3.1.2).

7.7.3 Zweifarben Experimente auf Niedrigdichte-Chips

Hinsichtlich der Analyse der differentiellen Expression der ausgewählten Zielgene in den verschiedenen Zelltypen nach der Behandlung mit Fettsäureagonisten, wurde auch auf den Niedrigdichte-Chips Zweifarben-Experimente durchgeführt. Die Markierung der cDNA erfolgte ausschließlich durch den Einbau der Amino-allyl-dUTP mit anschließender Markierung mit den jeweiligen Farbstoffen. Dabei stellte sich heraus, dass die auf diesem Weg mit Cy5 markierten cDNAs nicht für die Hybridisierung auf den silanisierten und aktivierten Glaschips geeignet waren. Nach der Hybridisierung ergab sich trotz intensiver Waschschriffe immer ein Hintergrundsignal, das zur Sättigung des Photomultipliers des Chip-Scanners führte (> 65000 counts) erreichte und so die Signale des Array völlig überlagerte. Eine Auswertung war damit unmöglich. Einen solchen überlagerten Array zeigt Abb. 7-13. Dargestellt ist die Falschfarbendarstellung aus der Auswertungssoftware *GenePixPro*, in der die Farbe Weiß eine Signalsättigung darstellt. Sehr hohe Signale sind durch Rot repräsentiert.

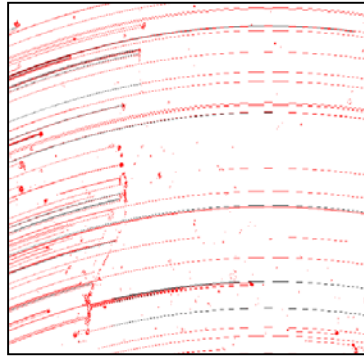


Abb. 7-13: Falschfarbendarstellung eines Niedrigdichte-Chips nach Hybridisierung mit Cy5-amino-allyl-dUTP markierter cDNA

Inkubation eines silanisierten Chips mit 150 ng Cy5-amino-allyl-dUTP markierter cDNA aus RNA aus unbehandelten HepG2-Zellen für 18 h bei 42°C in einer Feuchtbox. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 32 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Detektion mit dem GMS Array Scanner.

Diese Sättigung des Hintergrundsignals wurde nicht nur mit cDNA aus HepG2-Zellen beobachtet, sondern auch nach Hybridisierungen mit markierter cDNA aus THP-1-Zellen (Daten nicht gezeigt).

7.8 Etablierung kommerzieller Epoxy-aktivierter Objektträger

Aufgrund dieser Ergebnisse konnten die im eigenen Labor aktivierten und anschließend flexibel mit Sonden bestückten Chips nicht wie geplant für eine Hochdurchsatzmessung der differentiellen Regulation der ausgewählten Zielgene eingesetzt werden. Deshalb wurde auf kommerziell erhältliche voraktivierte Chips (MWG Biotech) zurückgegriffen, die im Prinzip den zuvor erfolgreich getesteten Mittel- und Hochdichte-Chips entsprechen (Kap. 6). Auf diese wurden dann die entsprechenden Sonden, die ebenfalls mit den Sonden der Kontroll- und Hochdichte-Chips identisch sind, mittels des Arrayspotters nach Angaben des Herstellers immobilisiert. Die aminomodifizierten Sonden werden durch die Reaktion der Aminogruppe mit den reaktiven Epoxy-Gruppen auf der Glasoberfläche kovalent gebunden. Der Erfolg der Immobilisierung wurde auch hier anhand der Hybridisierung mit Cy5-Nonameren bestätigt. Auf diesen Chips trat das Problem der Hintergrund sättigung bei Hybridisierung mit Cy5-amino-allyl-dUTP markierter cDNA nicht auf (Abb. 7-14).

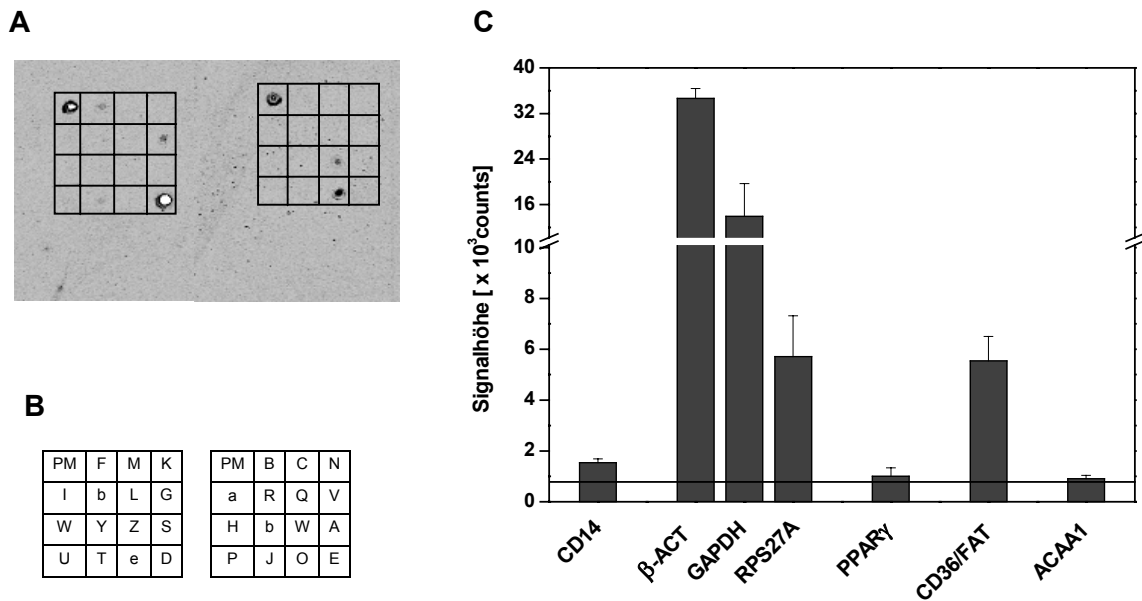


Abb. 7-14: Signale des Niedrigdichte- Array auf Epoxy-aktivierten Glasobjektträgern

Inkubation des Niedrigdichte-Array auf kommerziellen voraktivierten Objektträgern für 18 h bei 42 °C in einer Feuchtbox mit 550 ng Cy5-aa-dUTP- markierter cDNA aus RNA unbehandelter THP-1-Makrophagen in MWG-Formamidpuffer. Der Markierungsgrad der cDNA betrug 45 Nukleotide pro eingebautem Farbstoffmolekül. Immobilisierung der Sonden mittels des Affymetrix®417™ Arrayers. Detektion mit dem GMS Array Scanner.

(A) Hybridisierungsmuster des Epoxy-aktivierten Niedrigdichte-Chips. **(B)** Sondenbelegung der Subarrays. Die Zuordnung der Sonden findet sich in Tab. 7-1. **(C)** Sonden an denen die Signalintensitäten den Schwellenwert von 780 counts (—) überschritten. Mittelwerte (n = 2) \pm Abweichung.

Es stellte sich jedoch heraus, dass bei der Hybridisierung mit Cy5-aa-dUTP markierter cDNA aus THP-1-Makrophagen lediglich an den *Housekeeping*-Gensonden β -ACT und GAPDH eindeutige Signale detektiert werden konnten (Abb. 7-14 A). Die *Spots* der CD14-, CD36/FAT- und RPS27A-Sonde sind dagegen nur schwach zu erkennen. An allen anderen Positionen können keine *Spots* identifiziert werden. Die quantitative Auswertung der Hybridisierung ergab eine Signalthöhe von 282 ± 165 counts an der ara-Negativkontrollsonde, womit sich der Schwellenwert von 780 counts berechnen ließ. Dieser Wert wurde nur an 7 der 29 verschiedenen Sonden nach der Hintergrundkorrektur der Signale überschritten (Abb: 7-14 C). Mit den Niedrigdichte-Chips konnte die Expression von A-FABP, PPAR α und β sowie RXR α in THP-1-Makrophagen nicht nachgewiesen werden, diese Signale überschritten in diesem Experiment den Schwellenwert nicht (600, 200, 580 und 200 counts). durch die q-RT-PCR konnte jedoch eine deutliche Expression dieser Gene nachgewiesen werden, wie in Kap. 8 noch näher beschrieben wird.

Ähnliche Ergebnisse – ausschließlich Signale an den *Housekeeping*-Genen – wurden ebenfalls mit Cy3-aa-dUTP markierter cDNA sowie mit cDNA aus unbehandelten THP-1-Zellen erhalten. Auch die Hybridisierungen mit einer deutlich größeren cDNA-Menge von 1000 ng konnte die Signale nicht erhöhen. Die hier interessanten Zielgene, die im Vergleich zu den *Housekeeping*-Genen niedrig exprimiert waren, konnten mit der Methode der Niedrigdichte-Chips nicht eindeutig als exprimiert identifiziert werden. Daher wurden im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch die Hochdichte-Chips zur Identifizierung neuer nutritiver Markergene für die Wirkung der Fettsäureagonisten im Zellkulturmodell herangezogen. Quantitative Analysen der fettsäure-vermittelten Genregulation erfolgten mit Hilfe der q-RT-PCR.

8 Untersuchungen des Einflusses der Fettsäureagonisten auf die differentielle Genexpression in Zellkulturen

Ein aktueller Aspekt der Nutrigenomik ist die differentielle Genexpression durch Wechselwirkungen verschiedener Fettsäuren mit den PPAR Isoformen α , β oder γ . Die Fettsäuren als Bestandteile der Nahrung beeinflussen auf diese Weise Zielgene, die ein PPPE aufweisen. Im Rahmen eines DFG-Verbundprojekts (Lipide und Phytosterole in der Nahrung) wurde die Wirkung der 9*cis*,11*trans*- und 10*trans*,12*cis*-Isomere der konjugierten Linolsäure (9-CLA und 10-CLA) und deren Vorstufen Linol- und 11*trans*-Vaccensäure sowie der verzweigt-kettigen Fettsäuren Phytan- und Pristansäure auf die Regulation solcher PPPE tragender Zielgene untersucht. Ölsäure wurde als Vertreter der Hauptfettsäurebestandteile der Nahrung gewählt. Als *in vitro* Modellsysteme kamen hier die humanen Zelllinien HepG2, THP-1 und die aus der Differenzierung von THP-1-Zellen durch Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat erhaltenen THP-1-Makrophagen zum Einsatz (Kap. 3.5). Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Fettsäureagonisten inkubiert und anschließend die Änderungen der mRNA Mengen und somit die Änderungen der Expressionsniveaus der betreffenden Gene mittels q-RT-PCR bestimmt. Zur Identifizierung möglicher differentiell regulierter Gene wurde die RNA der mit Pristansäure behandelten THP-1-Makrophagen im Vergleich mit Kontrollzellen zusätzlich mit Hochdichte-Chips (PAN[®] Human 10k Array, MWG Biotech, im weiteren auch als 10k-Chips bezeichnet) untersucht.

8.1 Untersuchungen in HepG2-Zellen

In der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 sollte die Expression der ligandaktivierten Transkriptionsfaktoren PPAR α , β und γ , sowie der weiteren Zielgene CD36/FAT, GLUT2, L-FABP, ACOX1 und PBE unter dem Einfluss von Öl-, Linol- und *trans*-Vaccensäure sowie der Linolsäureisomere 9- und 10-CLA untersucht werden. Als Positivkontrolle wurde Bezafibrat eingesetzt, dessen aktivierende Wirkung auf alle PPAR Isoformen bekannt ist [117].

8.1.1 Primervalidierung und Aufnahme des Expressionsprofils

Die Primer für die Zielgene wurden unter Berücksichtigung der Kriterien GC-Gehalt, T_m -Wert und Amplikonlänge ausgewählt. Vor Beginn der eigentlichen Messungen wurde als Voraussetzung für den Einsatz der vergleichenden Expressionsanalytik (ΔC_t -Methode) die

Effizienz der neuen Primerpaare in der PCR untersucht. Außerdem wurde der lineare Bereich der einzusetzenden cDNA-Templatmenge für jedes Primerpaar ermittelt (Kap.5.2.5.1). Die berechneten Effizienzen und der lineare Bereich der Templatmenge wurden in Tab. 3-1 zusammengefasst. GLUT2, PPAR β , L-FABP, PPAR γ und β -ACT zeigten noch akzeptable Effizienzen zwischen 90 und 95 %. Die Effizienzen der Primer für CD36/FAT, PBE, ACOX1 und PPAR α lagen zwischen 99 und 101 %. Anhand der in diesen Versuchen ermittelten linearen Bereiche wurden jeweils die aus 25 ng in der reversen Transkription eingesetzten Gesamt-RNA erhaltene cDNA als Templat pro PCR-Reaktion eingesetzt.

Tab. 8-1: Effizienzen und lineare Bereiche der Primerpaare für Untersuchungen in HepG2-Zellen.

Alle Primer wurden mit der Software *PrimerExpress 2.0* anhand der entsprechenden cDNA-Sequenz des Zielgens entworfen. Der lineare Bereich wurde aus den erhaltenen Standardgerade abgelesen und die Effizienz aus der Steigung der durch diesen Bereich gelegten Ausgleichsgerade berechnet ($n = 1$). Eine Beschreibung der Genfunktionen findet sich im Anhang (Kap.11).

Zielgen	Effizienz [%]	linearer Bereich [ng]
β -ACT	105	62,5 – 0,02
PPAR α	101	62,5 – 0,1
PPAR β	92	62,5 – 0,1
PPAR γ	95	62,5 – 0,5
CD36/FAT	99	62,5 – 0,5
GLUT2	90	31,25 – 0,05 ^a
L-FABP	94	62,5 – 0,02
ACOX1	100	62,5 – 0,5
PBE	99	31,25 – 0,25 ^a

^a Standardkurven mit cDNA aus THP-1-Zellen aufgenommen

Einen Überblick über die Expressionshöhe der einzelnen Zielgene in lediglich mit DMSO-behandelten Zellen (Kontrollzustand) gibt Abb. 8-1 anhand der $15\text{-}\Delta C_T$ -Werte. Dargestellt ist die relative Expression zu β -ACT. Die PPARs wurden mit Werten von 6 bis 8 auf mittlerem Niveau exprimiert, ebenso die Transportproteine CD36/FAT und GLUT2. L-FABP war mit einem $15\text{-}\Delta C_T$ -Wert von 13, wie in Leberzellen erwartet, hoch exprimiert. Die Expression des

peroxisomalen Enzyms ACOX1 lag ebenfalls im mittleren Niveau, die des peroxisomalen bifunktionellen Enzyms (PBE) war annähernd so hoch wie die des β -ACTs.

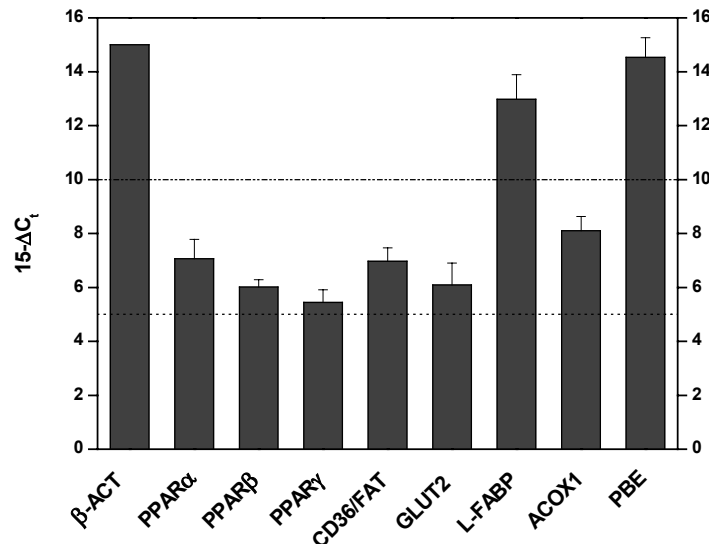


Abb. 8-1: Expressionsprofil ausgewählter Zielgene in HepG2-Zellen

Analyse der relativen Transkriptmengen durch q-RT-PCR nach der vergleichenden ΔC_t -Methode in DMSO-behandelten HepG2-Kontrollzellen. Auftragung der auf β -ACT normierten $15-\Delta C_t$ -Werte. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 3 unabhängigen Messungen \pm SD. ----- : Grenze des niedrigen Expressionsniveaus; - - - - - : Grenze des mittleren Expressionsniveaus.

8.1.2 Einfluss der Fettsäuren

Mit den so charakterisierten Primerpaaren erfolgten anschließend die Untersuchungen der Effekte der beiden konjugierten Linolsäuren sowie ihrer Vorstufen in HepG2-Zellen. Dazu wurden die Zellen für 24 h mit jeweils 100 μ M Ölsäure (OA) Linolsäure (LA), 11*trans*-Vaccensäure (tVA), 9-CLA, 10-CLA und Bezafibrat (BZF) inkubiert. Da die Fettsäuren in DMSO gelöst vorlagen (Endkonzentration im Medium 1 % (v/v)), wurden mit der entsprechenden Menge DMSO behandelte Zellen zur Kontrolle herangezogen. Durch die Zugabe von 20 μ M Fettsäure-freiem Bovinen Serum Albumin (BSA) zum Medium lagen die Fettsäuren als „physiologischer Komplex“ mit Albumin vor. So wurden mögliche toxische Wirkungen der hohen Fettsäurekonzentrationen unterbunden. Die Zellen wurden nach 24 h geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Von der erhaltenen RNA wurden 1 μ g in cDNA umgeschrieben und davon 25 ng für die q-RT-PCR als Templat eingesetzt. Die folgenden Abbildungen zeigen die auf β -ACT normierten und auf die DMSO-Kontrollen bezogenen Änderungen in der Expression als Antwort auf die Behandlung mit den Fettsäuren. Weder 9- noch 10-CLA induzierten PPAR α und wiesen nur eine schwache Induktion des PPAR β und

PPAR γ auf. Dabei war nur die 1,5-fache Induktion von PPAR γ signifikant gegenüber der DMSO-Kontrolle (Abb. 8-2 C). Die höchste Induktion der PPAR-Isoformen wurden für die Linolsäure als CLA-Vorstufe beobachtet. Sie erreichte für die Isoformen β und γ Signifikanz (Abb. 8-2 B, C). Diese Effekte waren bei OA und tVA nicht zu beobachten.

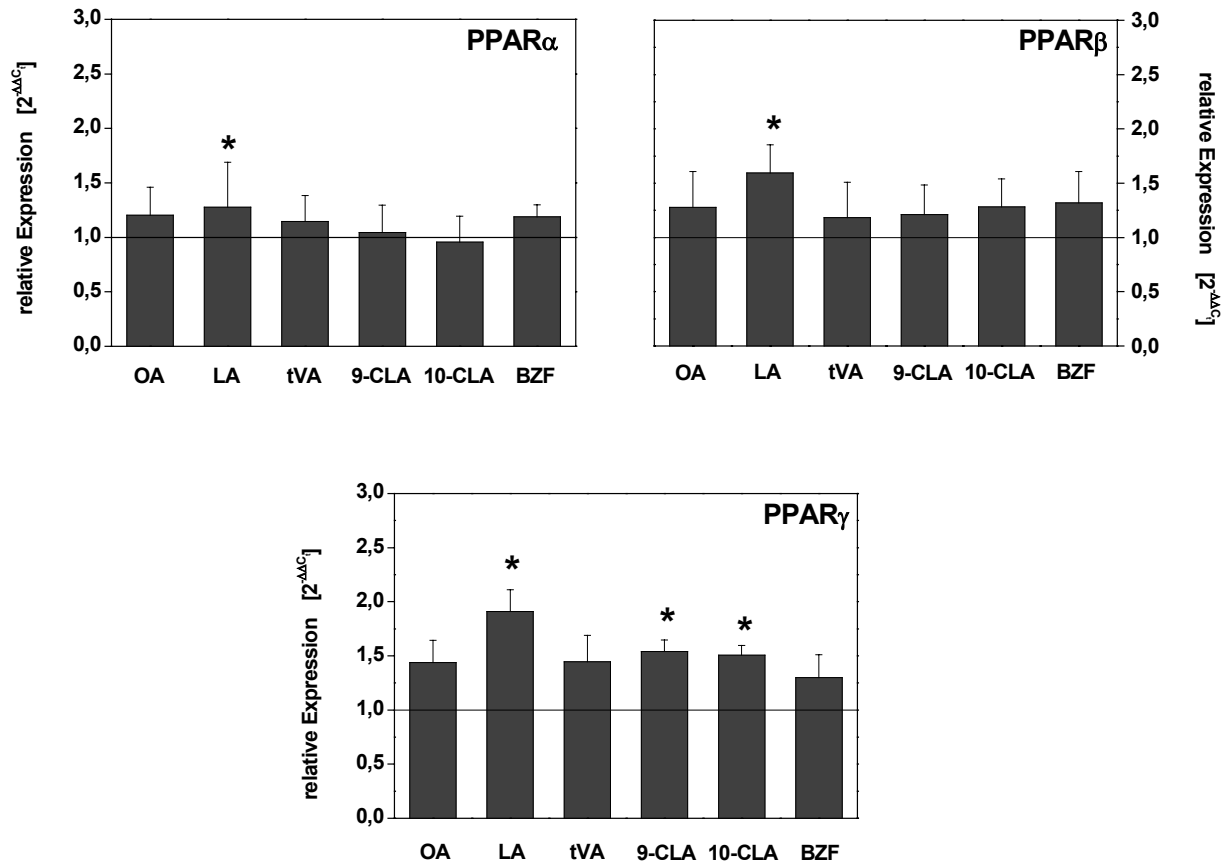


Abb. 8-2: Induktion der PPARs in HepG2-Zellen durch Fettsäuren

Induktion der Transkriptionsfaktoren durch Ölsäure (OA), Linolsäure (LA), 11*trans*-Vaccensäure (VA), 9*cis*, 11*trans*- (9-CLA), 10*trans*, *cis*12- (10-CLA) Isomeren der konjugierten Linolsäure und Bezafibrat (BZF). Die Inkubation der HepG2-Zellen erfolgte mit jeweils 100 μ M der Agonisten in 1 % DMSO und mit 20 μ M BSA als Komplexbildner. Berechnung der relativen Expression mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ nach Normierung auf β -ACT. Darstellung der Mittelwerte von 3 unabhängigen Zellproben \pm SD. * $p < 0,05$
 ———— : $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1,0$ = keine Regulation.

Interessanterweise trat nach der Inkubation mit beiden CLA-Isomeren eine deutliche Induktion der untersuchten Transporter CD36/FAT, GLUT2 und L-FABP auf (Abb. 8-3), wobei 9-CLA einen signifikant größeren Effekt ausübte als 10-CLA. Der Effekt war allerdings nicht CLA-spezifisch, da die Behandlung mit OA, LA und tVA bei diesen Zielgenen ebenfalls zu einer Erhöhung der Expression führte.

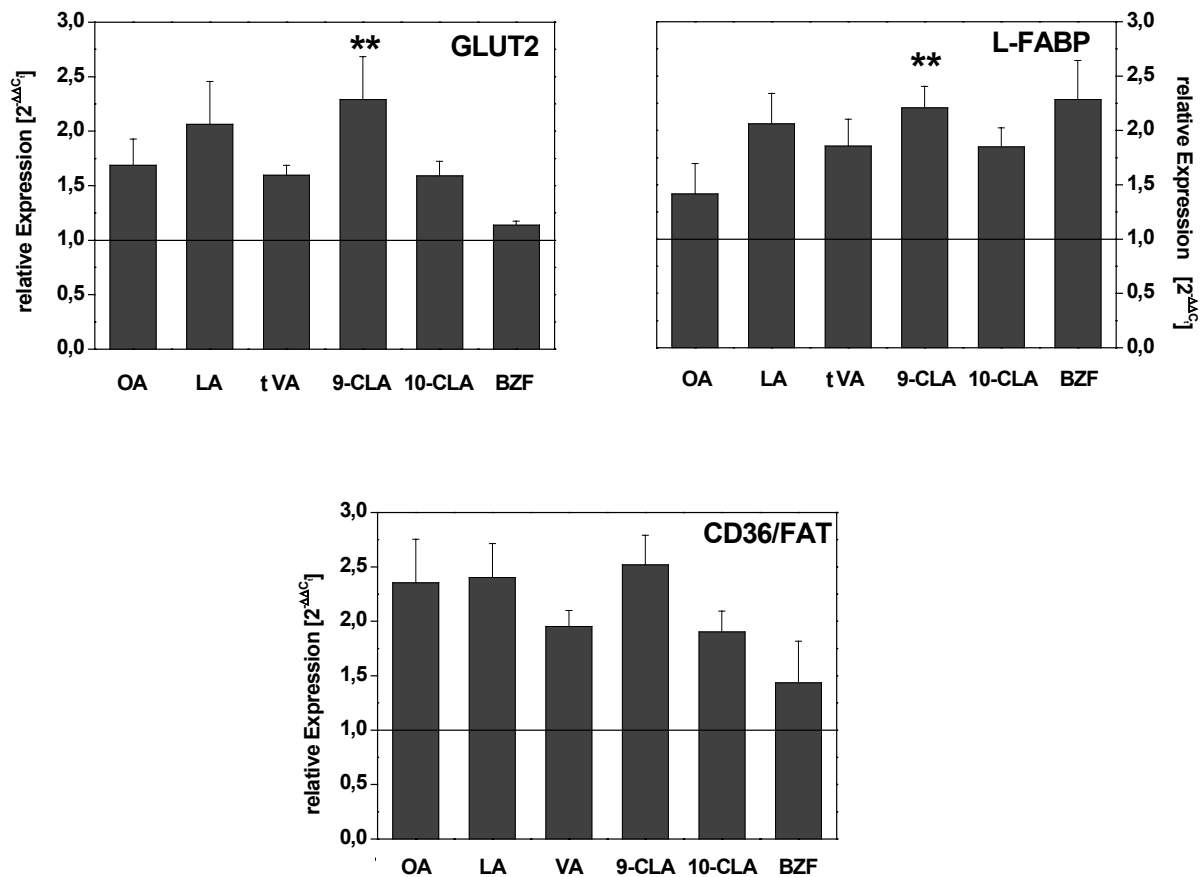


Abb. 8-3: Induktion der Transporterzielgene in HepG2-Zellen durch Fettsäuren

Induktion der Transporterzielgene durch Ölsäure (OA), Linolsäure (LA), 11*trans*-Vaccensäure (VA), 9*cis*, 11*trans*- (9-CLA), 10*trans*, *cis*12- (10-CLA)- Isomeren der konjugierten Linolsäure und Bezafibrat (BZF). Die Inkubation der HepG2-Zellen erfolgte mit jeweils 100 µM der Agonisten in 1 % DMSO und mit 20 µM BSA als Komplexbildner. Berechnung der relativen Expression mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ nach Normierung auf β -ACT. Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Zellproben \pm SD. ** signifikant höher als 10-CLA ($p < 0,05$). — : $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1,0$ = keine Regulation.

Im Fall der in der peroxisomalen β -Oxidation involvierten Enzyme ACOX1 und PBE zeigten die konjugierten Linolsäuren untereinander ein gegensätzliches Verhalten. 9-CLA führte bei ACOX1 zu geringerer Induktion (1,4-fach, Abb. 8-4 A) als im Fall des PBE (1,9-fach, Abb.8-4 B), mit 10-CLA wurde genau der umgekehrte Effekt beobachtet (1,8- vs. 1,3-fach). LA erhöhte die Expression beider Gene mit über 2-fach am meisten, wohingegen tVA nur zu einem leichten Anstieg führte. Lediglich PBE wurde von der OA ebenso effektiv induziert (2,4-fach) wie durch LA.

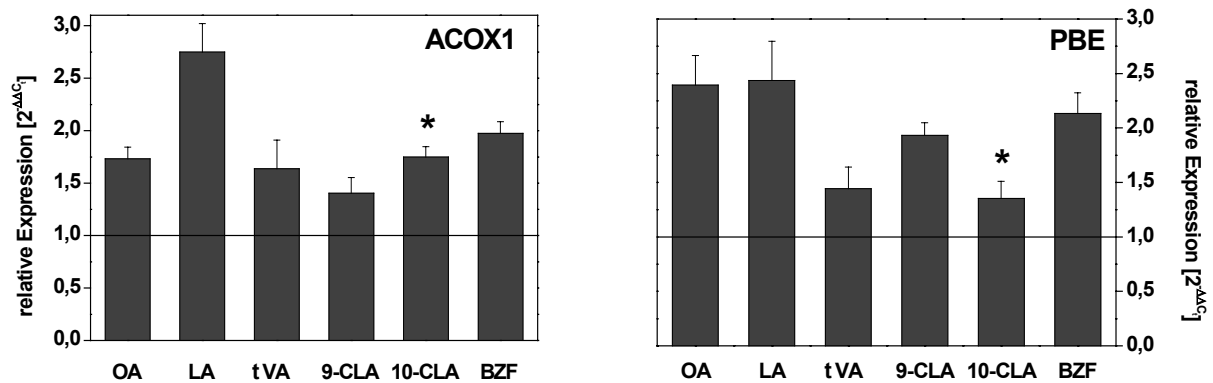


Abb. 8-4: Induktion von Genen der peroxisomalen β -Oxidation in HepG2-Zellen durch Fettsäuren

Induktion von Genen der peroxisomalen β -Oxidation durch Ölsäure (OA), Linolsäure (LA), 11*trans*-Vaccensäure (VA), 9*cis*,11*trans*-(9-CLA), 10*trans*,*cis*12- (10-CLA)- Isomeren der konjugierten Linolsäure und Bezafibrat (BZF). Die Inkubation der HepG2-Zellen erfolgte mit jeweils 100 μ M der Agonisten in 1 % DMSO und mit 20 μ M BSA als Komplexbildner. Berechnung der relativen Expression mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ nach Normierung auf β -ACT. Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Zellproben \pm SD. * $p < 0,05$. — : $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1,0$ = keine Regulation.

Im Vergleich zu dem als Positivkontrolle eingesetztem BZF war die Induktion durch die Fettsäureagonisten durchaus beachtlich. Den höchsten Einfluss übte der Panagonist auf die bekannten PPAR-Zielgene L-FABP (2,3-fach Abb. 8-3 B), ACOX1 und PBE aus (Abb. 8-4).

8.2 Untersuchungen in THP-1-Zellen

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte im Hinblick auf die Arbeiten mit Monozyten aus Human-Blut (Kap. 9) die Wirkung der Fettsäuren auf die monozytische Zelllinie THP-1 untersucht werden. Dazu wurde die Kultivierung dieser Suspensionszellen etabliert und weitere Zielgene ausgesucht, die entweder ein funktionelles PPRE aufweisen oder für die bereits eine Regulation im Zusammenhang mit dem PPAR-Signalweg gezeigt werden konnte. Neben der schon in HepG2-Zellen betrachteten Genen, wurden hier zusätzlich das Fettsäurebindungsprotein E-FABP sowie der Glukose-Transporter GLUT1 in Anlehnung an die in der Leber exprimierten und regulierten Isotypen L-FABP bzw. GLUT2, untersucht. Darüber hinaus wurden neue PCR-Systeme für den Monozytenmarker CD14, die Enzyme Cyclooxygenase (COX2, ohne PPRE), ω -Hydroxylase CYP4A11 (PPRE), Lipoprotein Lipase (LPL, PPRE), Malat-Enzym (ME3, PPRE) und Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD, PPRE) sowie die an der Apoptose beteiligten Proteine PCNA und BCL2 etabliert (letztere ohne PPRE).

8.2.1 Primervalidierung und Aufnahme des Expressionsprofils

Für die neuen Zielgene wurden ebenfalls Primer ausgewählt und validiert. Die berechneten Effizienzen und der lineare Bereich für jedes neue PCR-System sind in Tab. 8-2 zusammengefasst. Die Effizienzen der Primerpaare für COX2, GLUT1, CYP4A11 und ME3 lagen bei 117, 97, 101 bzw. 100 %. Eine deutlich höhere Effizienz als 100 % deutet auf die Bildung von Primerdimeren hin. Im Fall von COX2 konnte dies jedoch für die Verdünnungsstufen aus denen die Effizienz berechnet wurde (1:5 bis 1:625) ausgeschlossen werden. Bei der Überprüfung der im Anschluss an die PCR aufgenommenen Dissoziationskurven traten keine für Primerdimere typischen Nebenpeaks mit einer geringeren Schmelztemperatur als der des gewünschten Amplikons (81°C) auf.

Tab. 8-2: Effizienzen und linearer Bereich der ausgewählten Primerpaare für Untersuchungen in THP-1-Zellen

Alle Primer wurden mit der Software *PrimerExpress 2.0* anhand der entsprechenden cDNA-Sequenz des Zielgens entworfen (Kap. 5.2.5). Der lineare Bereich wurde aus den erhaltenen Standardgerade abgelesen und die Effizienz aus der Steigung der durch diesen Bereich gelegten Ausgleichsgerade berechnet. Eine Beschreibung der Genfunktionen findet sich im Anhang (Kap.11).

Zielgen	Effizienz [%]	linearer Bereich [ng]
COX2	117	31,25 – 1,25
GLUT1	97	62,5 – 0,02 ^a
Cyp4A11	101	156,25 – 6,25
ME3	100	156,25 – 1,25
PBE	99	31,25 – 0,25
PCNA	99	31,25 – 0,01
BCL2	93	31,25 – 1,25
LPL	93	31,25 – 0,25

^a Standardkurven mit cDNA aus HepG2-Zellen aufgenommen

Einen Überblick über die Expressionshöhe der einzelnen Zielgene in lediglich mit DMSO-behandelten Zellen (Kontrollzustand) gibt Abb. 8-5 anhand der $15-\Delta C_t$ -Werte. Dargestellt ist die relative Expression zu β -ACT.

Wie in den HepG2-Zellen lag das Expressionsniveau des PPAR α und β (7,3 bzw. 8,2) im mittleren Bereich, wohingegen PPAR γ mit einem $15\text{-}\Delta C_t$ -Wert von 11,1 deutlich höher exprimiert wurde. Im Fall der Transportproteine war die Expression des E-FABP (13,7) und CD36/FAT (11,0) sowie GLUT1 (13,1) hoch. Interessanterweise war hier E-FABP das vorherrschende Fettsäurebindungsprotein, wohingegen in den HepG2-Zellen L-FABP dominierte.

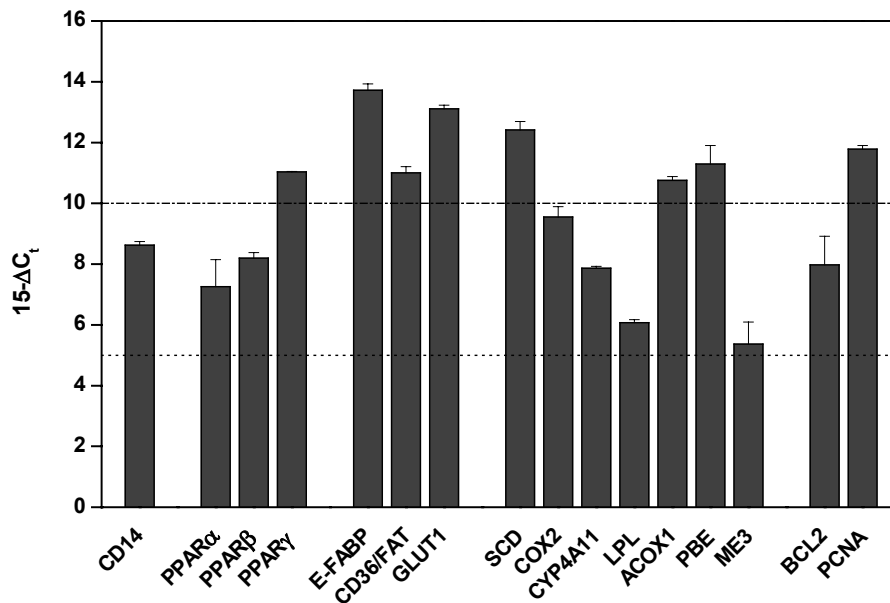


Abb. 8-5: Expressionsprofil ausgewählter Zielgene in THP-1-Zellen

Analyse der relativen Transkriptmengen durch q-RT-PCR nach der vergleichenden ΔC_t -Methode in DMSO-behandelten THP-1-Kontrollzellen. Auftragung der auf β -ACT normierten $15\text{-}\Delta C_t$ -Werte.

..... : Grenze des niedrigen Expressionsniveaus; - - - - - : Grenze des mittleren Expressionsniveaus. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 3 unabhängigen Messungen \pm SD.

Das Enzym PBE, das nukleäre Protein PCNA und die am endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) gehörten mit $15\text{-}\Delta C_t$ -Werten zwischen 11 und 12 zu den hoch exprimierten Genen. Das Expressionsniveau des ACOX1, der induzierbaren Cyclooxygenase (COX2), des CD14-Oberflächenantigens, des apoptotischen Proteins BCL2 und der ω -Hydroxylase CYP11A4 lag mit $15\text{-}\Delta C_t$ -Werten zwischen 8 und 10 auf mittlerem Niveau, das der Lipoproteine Lipase (LPL) und des mitochondrialen Malat-Enzyms (ME3) war mit Werten von 6,1 und 5,4 etwas niedriger.

8.2.2 Optimierung der Inkubationszeiten

Bevor endgültige Fütterungsversuche mit den THP-1-Zellen begonnen wurden, sollte der Zeitpunkt bestimmt werden, an dem der Effekt der Fettsäuren am deutlichsten zu sehen wäre. Dazu wurden die THP-1-Zellen mit ausgewählten Agonisten inkubiert und nach 0, 3, 6 und 12 h geerntet. Nach zweimaligen Waschen des Zellpellets mit PBS-Puffer wurden die Zellen lysiert und die gesamte RNA isoliert. Nach einer reversen Transkription wurden die Proben mittels der q-RT-PCR untersucht. Diese Versuche wurden mehrmals wiederholt und dabei festgestellt, dass sich die Ergebnisse aus verschiedenen Fütterungsversuchen erheblich unterscheiden und so keine eindeutigen Aussagen über die Wirkung der Agonisten gemacht werden konnten. Als Ausweg bot sich an, die THP-1-Suspensionszellen in einen besser definierten Zustand zu überführen und durch Zugabe von PMA zu adherenten Makrophagen-ähnlichen Zellen zu differenzieren, um in diesem Modell den Einfluss der Fettsäureagonisten auf die differentielle Genregulation zu studieren.

8.3 Differenzierte THP-1-Zellen als Modell für humane Makrophagen

PMA ist ein Phorbolster und bewirkt bei Zugabe zum Medium die Differenzierung der THP-1-Suspensionszellen in adherente Makrophagen-ähnliche Zellen. Diese THP-1-Makrophagen sollten hinsichtlich ihrer Genexpression nach Inkubation mit den Fettsäuren untersucht werden. Zum Einsatz kamen wiederum die beiden Isomere der konjugierten Linolsäure, 9-CLA und 10-CLA und deren Vorstufen LA und tVA sowie zusätzlich die verzweigt-kettigen Fettsäuren Phytan- und Pristansäure. Als Repräsentant der Hauptfettsäurebestandteile der Nahrung wurde Ölsäure eingesetzt. Die zu untersuchenden Zielgene wurden aus der Liste der für sie bereits vorhandenen Primerpaare ausgewählt.

8.3.1 Expressionsprofil der unbehandelten THP-1-Makrophagen

Einen Überblick über die Expressionsniveaus der untersuchten Zielgene gibt das Expressionsprofil anhand der $15\text{-}\Delta C_t$ -Werte (Abb. 8-6). Die hier am höchsten exprimierte Isoform der Transkriptionsfaktoren war PPAR β mit einem $15\text{-}\Delta C_t$ -Wert von 10,4 gefolgt von PPAR γ und PPAR α mit Werten von 8,7 bzw. 5,8. Auch RXR α wurde in diesen Zellen auf mittlerem Niveau exprimiert. Die Menge an mRNA für die Transportproteine CD36/FAT (8,9), E-FABP (8,4) und GLUT1 (8,1) lagen im mittleren Bereich, wohingegen die Expression von L-FABP und GLUT4 mit sehr niedrigen $15\text{-}\Delta C_t$ -Werten von unter 1 an der Nachweisgrenze lagen. Daher wurden letztere nicht in die weiteren Untersuchungen einbezogen. Das gleiche

gilt für die ebenfalls schwach exprimierte ω -Hydroxylase CYP4A11 (0,5). Die Expression des A-FABP konnte in den monozytischen THP-1-Zellen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt) wohingegen sie in den differenzierten THP-1-Makrophagen im niedrigen Bereich, hier jedoch eindeutig, detektierbar war (3,1). Dies stimmt mit den Arbeiten von Pelton *et al.* [102] überein, die ebenfalls eine Induktion des A-FABP während der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen zeigen konnten.

Bei den Enzymen zeigten SCD und LPL mit $15\text{-}\Delta C_t$ -Werten von 13,2 bzw. 10,3 eine hohe Expression. Die in den THP-1-Suspensionszellen hoch exprimierten peroxisomalen Enzyme ACOX1 und PBE wurden in den THP-1-Makrophagen jedoch nur auf mittlerem Niveau exprimiert (7,8 bzw. 5,6). COX2 und ME3 wurden niedrig exprimiert (4,1 bzw. 4,3).

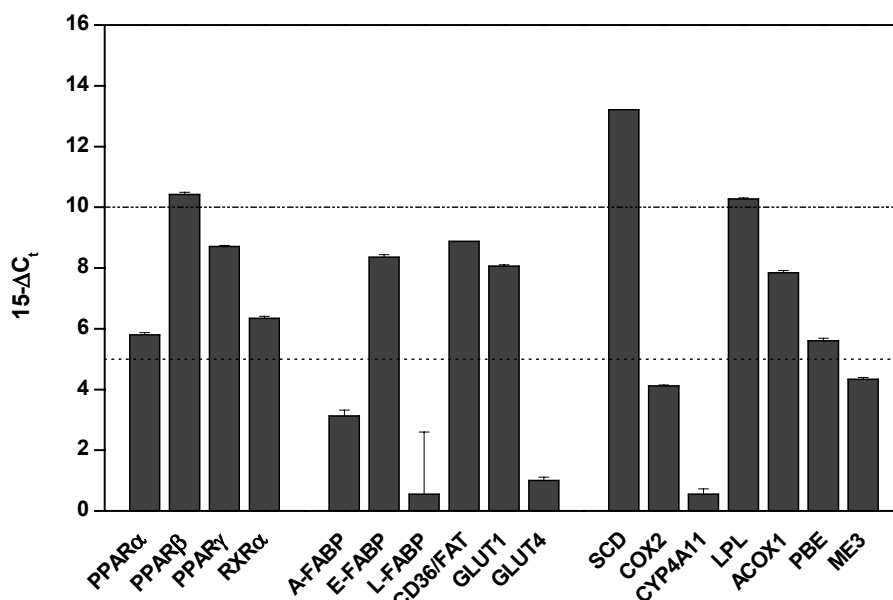


Abb. 8-6: Expressionsprofil ausgewählter Zielgene in THP-1-Makrophagen

Analyse der relativen Transkriptmengen durch q-RT-PCR nach der vergleichenden ΔC_t -Methode in DMSO-behandelten THP-1-Makrophagen. Auftragung der auf β -ACT normierten $15\text{-}\Delta C_t$ -Werte. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert der 2 unabhängigen Messungen \pm Abweichung. ----- : Grenze des niedrigen Expressionsniveaus; - - - - - : Grenze des mittleren Expressionsniveaus.

8.3.2 Optimierung der Differenzierungs- und Inkubationszeiten

Um den Zeitpunkt zu ermitteln, an dem die Effekte der Agonisten am deutlichsten zu erkennen sind, wurden zum einen die Zellen sowohl nach 4 als auch nach 5 Tagen der Differenzierung nach zweimaligem Waschen mit PBS in Serum-freies Medium überführt und 200 μ M der jeweiligen Fettsäuren in DMSO zugefügt. Die Endkonzentration des DMSO im

Medium wurde im Laufe der Arbeit deutlich von 1 % auf hier 0,2 % (v/v) gesenkt, um Effekte des Lösungsmittels auf die Zellen zu minimieren, da es im Verdacht steht ebenfalls eine Wirkung auf die differentielle Regulation einiger Gene auszuüben [118]. Als Kontrolle dienten wiederum die nur mit 0,2% DMSO behandelten Zellen. Auch in diesen Experimenten wurden die Fettsäuren durch Zugabe von Fettsäure-freiem BSA gebunden, um eine mögliche toxische Wirkung der hohen Fettsäurekonzentrationen zu unterbinden.

Zum anderen erfolgte die Inkubation in beiden Fällen für 12, 24 und 48 h, bevor die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA isoliert wurde. Von der erhaltenen RNA wurden wieder 1 µg in cDNA umgeschrieben und davon 25 ng in der q-RT-PCR als Templat eingesetzt. Bei einer Differenzierungszeit von 4 Tagen und einer anschließenden Inkubation der THP-1-Makrophagen mit den Agonisten für 24 h ergaben sich die größten Unterschiede in den Expressionsniveaus der Kontroll- und Testzellen (Daten nicht gezeigt). Diese Bedingungen wurden auch für nachfolgende Experimente gewählt.

8.3.3 Einfluss der Fettsäuren

Für weitere Fütterungsexperimente wurden jeweils $1,3 \times 10^5$ Zellen pro cm² Kulturflasche ausgesät und differenziert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit jeweils 200 µM Bezafibrat (BZF, Positivkontrolle), den unverzweigtkettigen Fettsäuren 9- und 10 CLA, OA, LA und tVA sowie mit den verzweigtkettigen Fettsäuren Phytan- (PHY) und Pristansäure (PRI). Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander in T25-Flaschen und für 9- und 10-CLA sowie für PRI zusätzlich einmal in T75-Flaschen durchgeführt, um genügend RNA für ebenfalls geplante DNA-Chip-Experimente zu erhalten. Die Änderung der mRNA-Menge der oben beschriebenen Zielgene (Kap.8.3.1) unter dem Einfluss der eingesetzten Agonisten wurde mittels q-RT-PCR bestimmt (Abb. 8-7).

PPAR α zeigte unter dem Einfluss der eingesetzten Fettsäuren eine leichte Abnahme der Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, die jedoch nur im Fall der 9-CLA mit einer Repression um 32 % signifikant war (Abb. 8-7A). Ein ähnliches Ergebnis wurde im Fall des PPAR β erhalten. Diese Rezeptorisoform wurde durch OA, 9-CLA, LA sowie 10-CLA und PRI signifikant um 10 bis 39 % herabreguliert (Abb. 8-7 B). Lediglich BZF bewirkte eine Induktion von 50 % gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Interessanterweise zeigte PPAR γ die größte Veränderung nach Inkubation mit den Fettsäuren. Unter dem Einfluss der LA und PHY sowie des 10-CLA und der OA wurde die mRNA-Expression der γ -Isoform signifikant herabreguliert (50, 45, 49 bzw. 38 % (Abb. 8-7 C)). Die Expressionsniveaus von RXR α änderten sich während der Inkubation nicht (8-7 D).

Insgesamt zeigten also die Rezeptorzielgene nur geringe Änderungen in ihrer Expression, dazu in den meisten Fällen eher eine Repression als eine Induktion.

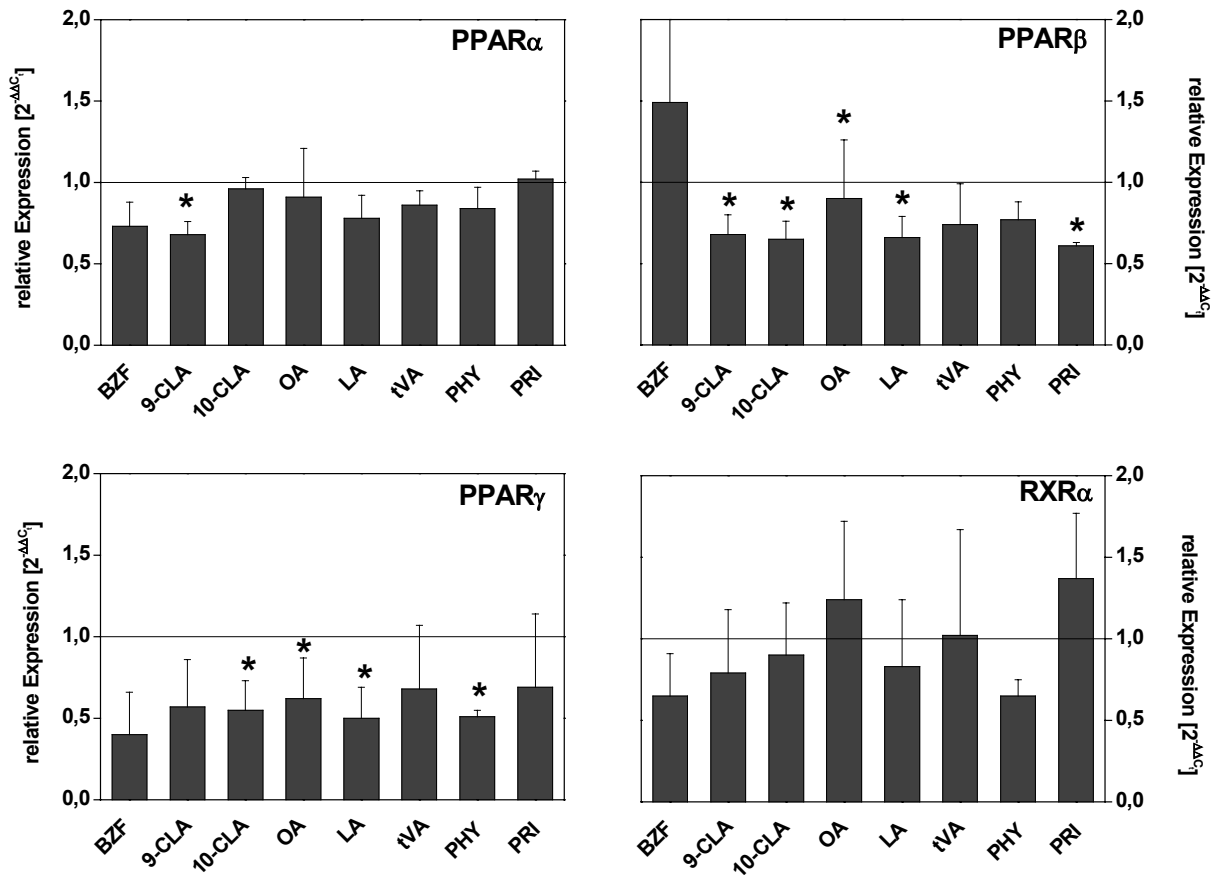


Abb. 8-7: Regulation der Expression der Rezeptorgene in THP-1-Makrophagen durch Fettsäuren

Eingesetzt wurden Bezafibrat (BZF), *9cis,11trans*-(9-CLA), *10trans,cis12*- (10-CLA)-Isomeren der konjugierten Linolsäure Ölsäure (OA), Linolsäure (LA), *11trans*-Vaccensäure (VA), Phytan- (PHY) und Pristansäure (PRI). Die Inkubation der Makrophagen erfolgte mit jeweils 200 μ M Fettsäuren in 0,2 % DMSO und mit 40 μ M BSA als Komplexbildner. Berechnung der der relativen Expression mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ nach Normierung auf β -ACT. Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Zellproben \pm SD. (* $p < 0,05$). ——— : $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1,0 =$ keine Regulation.

Mit Blick auf die Transportergene wurden teilweise deutlich stärkere Effekte der Fettsäuren beobachtet. So geht aus Abb. 8-8 A und B hervor, dass nahezu alle Fettsäuren stark auf die Expression des A-FABP und CD36/FAT wirken. Nach Inkubation mit BZF wurde die mRNA-Menge des A-FABP signifikant auf das 69-fache, die des CD36/FAT auf das 5-fache im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gesteigert. Vergleichbar stark wurde die Expression unter dem Einfluss der PRI heraufreguliert (42- bzw. 8-fach). Im Gegensatz dazu führte die

Inkubation mit der Vorstufe PHY bei beiden Transportern zu einer Repression von 31 bzw. 45 %.

Die Applikation der CLA-Isomere bewirkte hier ebenfalls eine Induktion des A-FABP und CD36/FAT, wobei jedoch nur im Fall des 10-CLA eine signifikante Erhöhung auf das 5,4-fache bzw. 2,9-fache beobachtet wurde. OA und LA hatten lediglich eine induzierende Wirkung auf A-FABP. Die mRNA-Mengen des Fettsäurebindungsproteins E-FABP und des Glukosetransporters GLUT1 blieben von den Agonisten nahezu unbeeinflusst (Abb. 8-8 C und D). Allein die PRI bewirkte eine signifikante Induktion des E-FABP auf das 1,9-fache bezogen auf die Kontrolle.

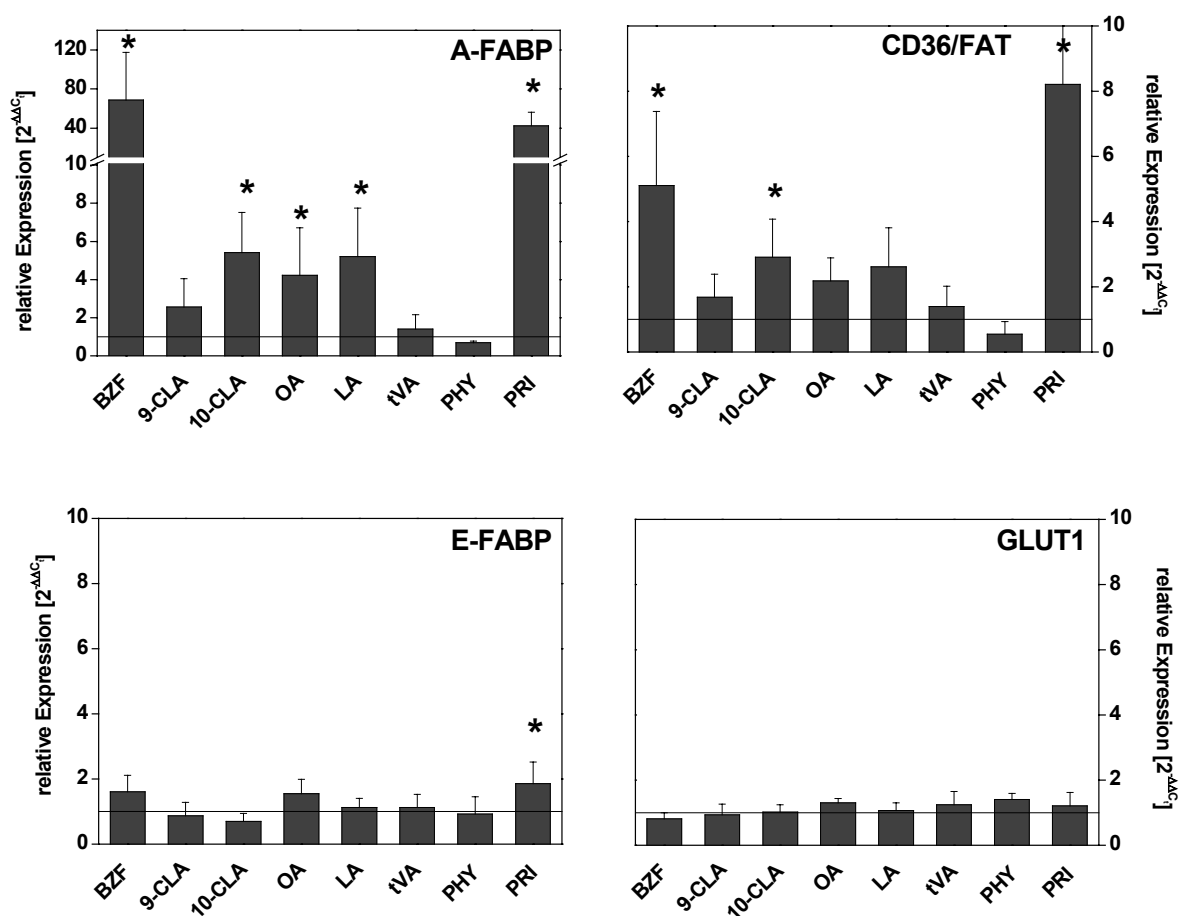


Abb. 8-8: Regulation der Expression der Transportergene in THP-1-Makrophagen durch die Fettsäuren

Eingesetzt wurden Bezafibrat (BZF), *9cis,11trans*-(9-CLA), *10trans,cis12*- (10-CLA)-Isomeren der konjugierten Linolsäure Ölsäure (OA), Linolsäure (LA), *11trans*-Vaccensäure (VA), Phytan- (PHY) und Pristansäure (PRI). Die Inkubation der Makrophagen erfolgte mit jeweils 200 μ M Fettsäuren in 0,2 % DMSO und mit 40 μ M BSA als Komplexbildner. Berechnung der relativen Expression mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ nach Normierung auf β -ACT. Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Zellproben \pm SD. (* $p < 0,05$). —: $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$ = keine Regulation.

Die Wirkung der Fettsäuren auf die untersuchten Enzyme ist dagegen wieder deutlich geringer (Abb. 8-9). Weder die peroxisomale Acyl-CoA Oxidase 1 (Abb. 8-9 A) noch die Lipoprotein Lipase (Abb.8-9 C) zeigten signifikante Änderungen der mRNA-Expression nach Applikation der Fettsäuren. Die Expression der induzierbaren Cyclooxygenase COX2 wurde lediglich durch BZF signifikant um 39 % herabreguliert. Der Einfluss der übrigen Fettsäuren erreichte hier keine Signifikanz (Ab.8-9 B). Ähnlich verhielt sich PBE, das durch BZF um 37 % reprimiert wurde. Dies ist auch das einzige Gen, auf das die tVA einen schwachen, aber signifikant reprimierenden Einfluss um 17 % aufwies. Im Gegensatz dazu wurde sowohl das Malat-Enzym (ME3, Abb.8-9 D) als auch die Δ^9 -Desaturase (SCD, Abb.8-9 F) durch BZF signifikant auf das 1,2- bzw. 1,4-fache heraufreguliert. Den größten Einfluss übten die Fettsäuren auf SCD aus. Die Behandlung mit OA und LA sowie 10-CLA führten hier zu einer Repression von 34 % , 53 % und 51% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Effekte der anderen Fettsäuren waren dagegen nicht signifikant.

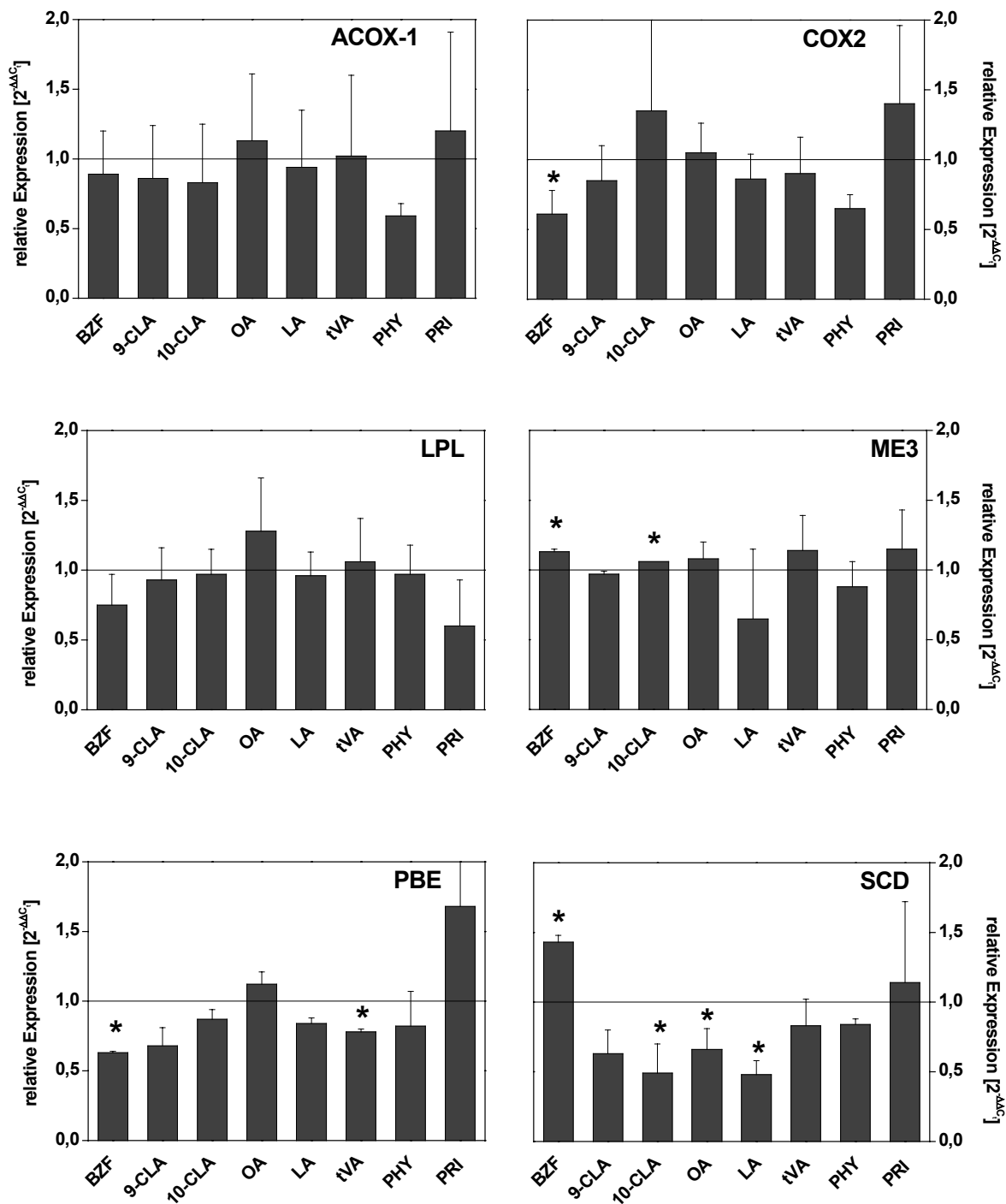


Abb. 8-9: Regulation der Expression der Enzymegene in THP-1-Makrophagen durch Fettsäuren

Eingesetzt wurden Bezafibrat (BZF), *9cis,11trans*-(9-CLA), *10trans,cis12*- (10-CLA)-Isomeren der konjugierten Linolsäure Ölsäure (OA), Linolsäure (LA), *11trans*-Vaccensäure (VA), Phytan- (PHY) und Pristansäure (PRI). Die Inkubation der Makrophagen erfolgte mit jeweils 200 μ M Fettsäuren in 0,2 % DMSO und mit 40 μ M BSA als Komplexbildner. Berechnung der der relativen Expression mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ nach Normierung auf β -ACT. Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Zellproben \pm SD. (* $p < 0,05$). —: $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1,0 =$ keine Regulation.

8.3.4 Untersuchungen mit Hochdichte-Chips

Die Untersuchungen mit der q-RT-PCR zeigten, dass Pristansäure in diesem Zellkulturmodell den größten Effekt auf die differentielle Genexpression ausübte. Daher wurden nur die mit Pristansäure behandelten Proben für weitere Analysen mit Hochdichte-Chips (*PAN[®]Human 10k Array*, MWG Biotech, im weiteren als 10k-Chips bezeichnet) ausgewählt, da nur eine begrenzte Anzahl dieser Chips zur Verfügung stand. Ziel der Chip-Experimente war die Identifizierung neuer nutritiver Markergene für die pristansäure-vermittelte Genregulation in den THP-1-Makrophagen.

Aus THP-1-Makrophagen, die in drei unabhängigen Experimenten mit PRI bzw. DMSO behandelt wurden, wurde jeweils die Gesamt-RNA isoliert und separat in cDNA umgeschrieben. Dabei wurde die RNA aus den behandelten Zellen mit Cy5, die aus den Kontrollzellen (DMSO) mit Cy3 markiert. Die zusammengehörigen cDNAs wurden in Hybridisierungspuffer aufgenommen und auf den Array aufgegeben. Insgesamt wurden drei 10k-Chips analysiert (Abb. 8-10).

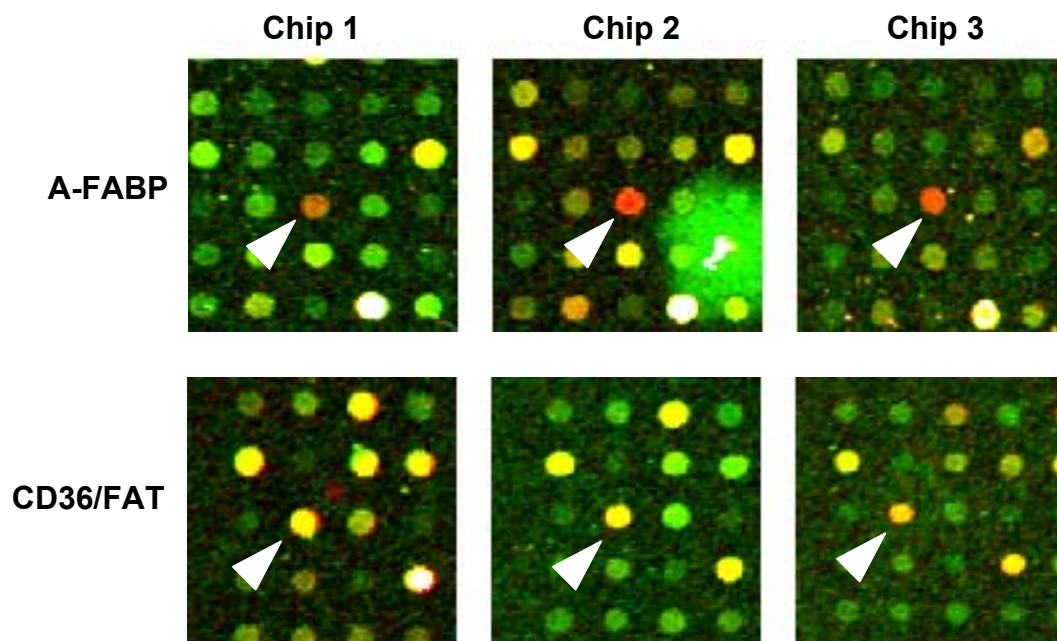


Abb. 8-10: Zweifarben-Experiment zum Nachweis der Pristansäure-vermittelten Induktion des A-FABP und CD36/FAT auf dem Chip

Vergrößerung der Positionen der A-FABP- und CD36/FAT-Sonden (weisse Pfeile) auf den drei analysierten 10k-Chips nach Inkubation der Chips mit jeweils 730 ng Amino-allyl-dUTP markierter cDNA aus RNA Pristansäure-behandelter THP-1-Makrophagen (Cy5) und aus Kontrollzellen (Cy3). Die Inkubation erfolgte 18 h bei 42°C in einer Feuchtbox. Detektion mit dem GMS Array-Scanner. Roter (Cy5) und grüner (Cy3) Kanal sind übereinandergelegt dargestellt.

Qualitativ war schon auf den übereinandergelegten Bildern des Array-Scanners aller drei Chips eine deutliche Rotfärbung der Sonden für A-FABP zu erkennen. Hier hatte deutlich mehr Cy5-markierte cDNA (behandelte Zellen) angebunden, woraus auf eine deutliche Induktion dieses Gens nach Applikation der PRI in allen drei Experimenten geschlossen werden konnte. Die CD36/FAT-Sonden erscheinen eher gelb und indizieren daher keine Regulation. Die weitere quantitative Analyse der einzelnen Chips erfolgte mittels des Tabellenkalkulationsprogramms Excel (Tab. 8-3).

Tab. 8-3: Regulation ausgewählter Zielgene in THP-1-Makrophagen nach Inkubation mit Pristansäure, gemäß Analyse der 10k-Chips

Hintergrundkorrigierte und normierte Cy5- und Cy3-Signale. Die Schwellenwerte (Cy5 und Cy3) für die Chips sind für Chip 1 : 1040 und 570 *counts*, für Chip 2 : 340 und 440 *counts* und für Chip 3 : 1100 und 235 *counts*. Die Analyse der Chips erfolgte mit der Auswertungs-Software ScanAlyze.

Zielgen	Chip 1			Chip 2			Chip 3		
	Cy5	Cy3	Cy5/Cy3	Cy5	Cy3	Cy5/Cy3	Cy5	Cy3	Cy5/Cy3
PPAR α	1237	951	1,30	294*	454	0,65	358	531*	0,67
PPAR β	7662	5463	1,40	1482	4069	0,36	1692	1987	0,85
PPAR γ	3811	6602	0,58	1347	1912	0,70	1639	2018	0,81
RXR α	1847	1323	1,40	468	569	0,82	493	807*	0,61
RXR β	1362	1751	0,78	646	684	0,94	558	498*	1,12
A-FABP	12620	530*	23,82	2095	271*	7,73	4054	371*	10,92
B-FABP	290*	408*	0,71	117*	151*	0,77	107*	320*	0,33
E-FABP	21470	7481	2,87	5068	3646	1,39	3389	2174	1,56
H-FABP	7664	5632	1,36	1748	1966	0,89	1750	1070*	1,64
I-FABP	119*	664	0,18	157*	88*	1,78	89*	525*	0,17
L-FABP	148*	510*	0,29	89*	195*	0,46	44*	460*	0,10
CD36/FAT	23886	3813	6,26	5840	1359	4,30	5303	1467	3,62
GLUT-1	1434	1120	1,28	370*	343*	1,08	296	296*	1,00
GLUT-2	193*	451*	0,43	138 *	165*	0,84	84*	233*	0,36
GLUT-4	107*	583*	0,18	119 *	265*	0,45	90*	543*	0,17
FATP-4	2291	966	2,37	509	703	0,72	951	780*	1,22
CYP4A11	211*	757	0,28	138 *	340*	0,41	100*	642*	0,16
ME-3	596*	586	1,02	116 *	159*	0,73	1387	1016*	1,37
ACOX-1	1876	2030	1,08	656	1028	0,64	666	1178	0,57
SCD	30908	28572	1,08	5850	10412	0,56	6933	2890	2,40

* Erreicht den Schwellenwert nicht

Anhand der Tab. 8-3 wird wieder die Variabilität der Hybridisierungen auf verschiedenen DNA-Chips deutlich wie z.B. im Fall der hochexprimierten Δ^9 -Desaturase (SCD), die mit dem ersten Chip als nicht reguliert ($Cy5/Cy3 = 1,1$), mit dem zweiten Chip dagegen als herunterreguliert identifiziert wurde ($Cy5/Cy3 = 0,56$). Mit dem dritten Chip wurde sogar eine Induktion identifiziert ($Cy5/Cy3 = 2,4$). Diese Schwankungen betreffen also nicht ausschließlich niedrig exprimierte Gene mit niedrigen Fluoreszenzsignalen. Dennoch stimmen die Ergebnisse der Hybridisierungen in den meisten Fällen überein. Wie erwartet wurden B-FABP und I-FABP auf keinem Chip als signifikant exprimiert detektiert. Auch die extrem niedrige Fluoreszenz für L-FABP stehen im Einklang mit den q-RT-PCR-Daten (Tab. 8-4). Dies gilt auch für die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4.

Für die weitere Auswertung und den Vergleich mit den Daten der q-RT-PCR wurden die $Cy5/Cy3$ -Verhältnisse ausgewählter Zielgene, für die auch PCR-Daten vorlagen in Tab. 8-4 zusammengefasst. Daraus geht hervor, dass mit Hilfe der DNA-Chips lediglich die Gene für A-FABP und CD36/FAT nach Pristansäure-Behandlung der THP-1-Makrophagen als reguliert identifiziert werden konnten, da nur in diesen beiden Fällen die $Cy5/Cy3$ -Verhältnisse hier die Grenze der zweifachen Induktion deutlich überschritten. Im Vergleich dazu zeigten die mit der q-RT-PCR erhaltenen Daten neben der Induktion des A-FABP und CD36/FAT ebenfalls eine signifikante Regulation der Gene des PPAR β und E-FABP. Darüber hinaus wird deutlich, dass mit Hilfe der q-RT-PCR, im Gegensatz zur DNA-Chip-Analyse, auch Änderungen der Expression unterhalb der zweifachen Regulationsgrenze signifikant detektiert werden konnten.

Tab. 8-4: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Zweifarben-Experimente auf den 10k Chips und jenen der q-RT-PCR für ausgewählte Zielgene der Pristansäure-behandelten THP-1-Makrophagen

Cy5/Cy3-Verhältnisse ausgewählter Zielgene der 10k Chips im Vergleich zu den korrespondierenden Ergebnissen der q-RT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte der Cy5/Cy3-Verhältnisse der drei 10k-Chips \pm SD sowie die relative Expression nach Normierung auf β -ACT. Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Zellproben \pm SD, (* $p < 0,05$ zur DMSO-Kontrolle).

Zielgen	relative Expression	
	[Cy5/Cy3-Verhältnis]	$[2^{-\Delta\Delta Ct}]$
PPAR α	0,9 \pm 0,3	1,02 \pm 0,05
PPAR β	0,9 \pm 0,4	0,61 \pm 0,02 *
PPAR γ	0,7 \pm 0,1	0,69 \pm 0,45
RXR α	1,2 \pm 0,2	1,37 \pm 0,4
A-FABP	14,2 \pm 7,0	42,47 \pm 13,87 *
E-FABP	1,9 \pm 0,7	1,86 \pm 0,66 *
GLUT1	1,1 \pm 0,1	1,21 \pm 0,41
CD36/FAT	4,7 \pm 1,1	8,21 \pm 3,91 *
ME3	1,0 \pm 0,3	1,15 \pm 0,28
ACOX1	0,8 \pm 0,2	1,2 \pm 0,71
SCD	1,4 \pm 0,8	1,14 \pm 0,58

8.3.5 Identifizierung neuer Markergene

Zusätzlich zu den schon bekannten Zielgenen sollten mit der DNA-Chip-Technik neue, noch unbekannte Markergene für die Wirkung der Fettsäuren – hier Pristansäure – im Zellkulturmodell THP-1-Makrophagen identifiziert werden. Als Kandidaten für Markergene kamen all diejenigen in Frage, deren Cy5/Cy3-Verhältnisse auf allen untersuchten 10k-Chips über 2 bzw. unter 0,5 lagen, d.h. die Grenzen der zweifachen Regulation überschritten. Da die Zahl der mehr als zweifach herabregulierten Gene sehr hoch war (65) werden hier nur die sieben am deutlichsten reprimierten Gene gezeigt. Im Anhang (Kap.11) befindet sich eine vollständige Liste der Gene mit Cy5/Cy3-Verhältnissen unter 0,5. Lediglich sieben Zielgene wiesen ein Cy5/Cy3-Verhältnis von über 2 auf (Tab. 8-5).

Tab 8-5: Kandidaten für nutritive Markergene für die Wirkung der Pristansäure

Zielgene mit Cy5/Cy3-Verhältnissen über 2 bzw. unter 0,5 . Eine vollständige Liste weiterer Gene mit einem Verhältnis unter 0,5 findet sich im Anhang (Kap. 11), ebenso eine Beschreibung der Genfunktion, falls bekannt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Cy5/Cy3-Verhältnisse der drei 10k-Chips \pm SD.

Zielgen	Cy5/Cy3-Verhältnis
Reprimiert (7 aus 65)	
Zona Pellucida Glycoprotein 2 (sperm receptor); zp2	0,05 \pm 0,04
Fibrillin 1; fbn1	0,05 \pm 0,01
Epidermaler Wachstumsfaktor ; egfr	0,07 \pm 0,06
Thyroid stimulierender Hormonrezeptor; tshr	0,11 \pm 0,01
kiaa0101 Genprodukt; kiaa0101	0,12 \pm 0,1
<i>hyaluronan-mediated motility receptor (rhamm) isoform a</i> ; hmmr	0,16 \pm 0,11
<i>checkpoint suppressor 1</i> ; ches1	0,16 \pm 0,08
Induziert (7 aus 7)	
<i>platelet-derived growth factor receptor α precursor</i> ; pdgfra	21,9 \pm 8,3
A-FABP	14,2 \pm 7,0
<i>stromal cell-derived factor 2-like 1</i> ; sdf2l1	5,7 \pm 2,6
<i>tumor suppressor deleted in oral cancer-related 1</i> ; doc-1r	5,2 \pm 1,4
<i>protein disulfide isomerase related protein</i> ; erp70	5,1 \pm 0,6
CD36/FAT	4,7 \pm 1,1
<i>transketolase-like 1</i> ; tktl1	4,4 \pm 0,4

Unter den herabregulierten Genen befanden sich auch solche, deren Sequenz im Rahmen des humanen Genom-Projekts identifiziert wurde, die Funktion der Gene jedoch noch nicht näher bestimmt wurde wie z.B. hier das kiaa0101 Genprodukt. Weitere Analysen im Hinblick auf die Funktion dieses Genprodukts sind notwendig, um eine Rolle innerhalb der fettsäurevermittelten Genregulation zuordnen zu können. Das gleiche gilt für die übrigen, als reprimiert erkannten Gene.

Stärker noch als A-FABP wurde der *platelet-derived growth factor receptor α precursor* (PDGFRA) durch die Applikation der Pristansäure induziert (21,9-fach). Dieses Gen kodiert für einen Tyrosin-Kinase Rezeptor an der Zelloberfläche von Zellen mesenchymalen Ursprungs. In Mäusen konnte eine essentielle Rolle in der Entwicklung der Nieren

nachgewiesen werden [119, 120]. Die Rolle des PDGRFA in humanen Makrophagen-ähnlichen Zellen bleibt zu klären.

Mit den Hochdichte-Chips konnten sieben Gene identifiziert werden, die durch die Wirkung der Pristansäure in THP-1-Makrophagen induziert wurden und somit als Kandidaten für nutritive Markergene in diesem System angesehen werden. Im Gegensatz dazu erschienen sehr viele Gene mehr als zweifach herabreguliert, sodass hier keine eindeutigen Aussagen über Kandidatengene gemacht werden können. Eine höhere Anzahl der Experimente wären hier für eine Klärung notwendig.

9 Identifizierung nutritiver Markergene für die Wirkung der 11*trans*-Vaccensäure in humanen Monozyten

Die 11*trans*-Vaccensäure ist die am häufigsten vorkommende *trans*-Fettsäure in Wiederkäuer-Fetten. Sie entsteht im Rumen der Wiederkäuer und wird im Gewebe zu 9*cis*, 11*trans*-CLA konvertiert. Neuere Studien bestätigten die Vermutung, dass tVA auch im menschlichen Organismus durch die Δ^9 - Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) zu 9-CLA umgewandelt wird. Um diese Erkenntnisse zu vertiefen, wurde von der Arbeitsgruppe Jahreis (Institut für Ernährung, Friedrich Schiller Universität Jena) im Rahmen des DFG-Verbundprojektes „Lipide und Phytosterole in der Ernährung“ eine 8 wöchige Interventionsstudie geplant und durchgeführt. Probanden erhielten entweder eine mit einem Placeboöl oder mit tVA angereicherte Diät, anschließend wurden Blutproben genommen und diese hinsichtlich der Konversion der tVA zu 9-CLA untersucht. Genaue Angaben zur Durchführung der Studie finden sich in Kap. 5.4.5.

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte 9-CLA als wirkungsvoller Aktivator der Kernrezeptorfamilie der Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) identifiziert werden. Die Aktivierung dieser Rezeptoren beeinflusst die Transkription einiger Zielgene, die sowohl in den Lipidstoffwechsel als auch in den Kohlenhydratstoffwechsel und involviert sind.

Im Rahmen des Verbundprojektes war ein Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der differentiellen Genexpression in humanen Monozyten nach Intervention mit tVA mittels q-RT-PCR. Dabei sollten nutritive Markergene für die Wirkung der tVA nach Aufnahme mit der Nahrung identifiziert werden.

9.1 Isolierung der Monozyten und Charakterisierung der Genexpression

Aus Blut freiwilliger Spender wurden die Monozyten isoliert. Die erhaltenen Monozytensuspensionen wurden in der Etablierungsphase mittels FACS-Analyse auf ihre Reinheit hin untersucht. Anhand der Daten ließ sich eine Reinheit der Monozyten von 90-95 % ermitteln. Die Ausbeute der Isolierung lag bei $0,05 - 0,15 \times 10^6$ Zellen/ml Blut. Aus den erhaltenen Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert, wobei aus 1×10^6 Zellen 1-2 μg erhalten wurden. Die ausgearbeitete Methode wurde als geeignet angesehen und als *know-*

how nach Jena transferiert. Dies ermöglichte im Rahmen der Interventionsstudie die Isolierung der Monozyten direkt nach der Probennahme vor Ort.

9.1.1 Auswahl geeigneter Zielgene für die q-RT-PCR

Um das Potential relevanter Gene auszuloten, wurde die isolierte Gesamt-RNA aus Monozyten freiwilliger Spender revers transkribiert und zusammen mit verfügbarer Primern für Zielgene für die q-RT-PCR herangezogen. Desweiteren wurde *a priori* untersucht, ob geschlechtsspezifische Unterschiede in der Genexpression der Monozyten erkennbar sind. (Abb. 9-2).

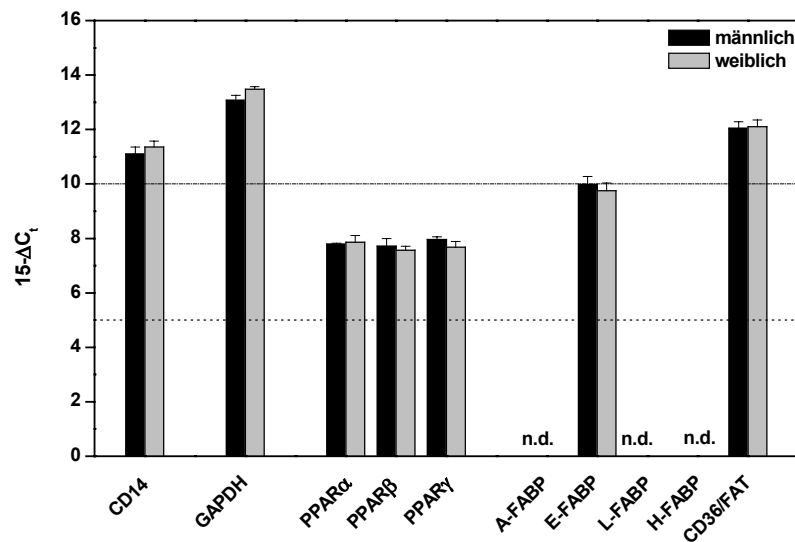


Abb. 9-2: Expressionsprofil ausgewählter Gene in isolierten humanen Monozyten

Analyse der relativen Transkriptmengen durch q-RT-PCR nach der vergleichenden ΔC_T -Methode anhand der auf β -ACT normierten $15-\Delta C_T$ -Werte. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 2 unabhängigen Messungen \pm Abweichung. \cdots : Grenze des niedrigen Expressionsniveaus; $-\cdots-$: Grenze des mittleren Expressionsniveaus. n.d. : nicht detektiert.

Die Untersuchungen ergaben eine hohe mRNA Expression des für Monozyten spezifischen Oberflächenantigens CD14 und des Fettsäure-Transporters CD36/FAT. Zur Veranschaulichung wurde ebenfalls die Expression des konstitutiv exprimierten GAPDH gemessen. Dieses Gen gehört wie β -ACT zu den *Housekeeping*-Genen, deren Transkripte immer in hoher Kopienzahl in den Zellen vorliegen. Dies konnte hier bestätigt werden ($15-\Delta C_T$ -Wert 13,1 bzw. 13,5). Die Kernrezeptoren PPAR α , β und γ wurden in mittlerer Höhe exprimiert. Die mRNA des E-FABP lag mit einem $15-\Delta C_T$ -Wert von 9,9 bzw. 9,7 knapp

unterhalb der Grenze zur hohen, wohingegen für die mRNA für A-, L- und H-FABP keine Expression nachgewiesen wurde. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression in den männlichen und weiblichen Monozyten wurde nicht beobachtet.

Zusätzlich zu den in diesen Vorversuchen als exprimiert gefundenen Genen, wurden in der Studie weitere Zielgene der PPARs unter dem Einfluss der tVA untersucht, die literaturbekannt in Monozyten bzw. THP-1 Zellen exprimiert werden.

9.2 Identifizierung der nutritiven Markergene

Aus den Blutproben der Probanden der Interventionsstudie wurden die Monozyten in Jena isoliert und daraus die Gesamt-RNA gewonnen. Die Genexpression in den einzelnen Proben sollten ursprünglich mittels q-RT-PCR und DNA-Chip-Technologie analysiert werden. Die Ausbeute an RNA in den einzelnen Proben war mit lediglich 2 bis 4 µg (photometrisch bestimmt) deutlich geringer als die erwarteten 10 µg. Da die DNA-Chip-Analyse jedoch mindestens 20 µg Gesamt-RNA für eine Analyse (ohne Statistik) benötigt, wurden die Proben nur mittels q-RT-PCR analysiert.

Die biologische Variabilität sollte durch Zusammenfassen von jeweils 6 zusammengehörenden Proben gemittelt werden (Abb. 9-2). Zusammengefasst wurde nach Geschlecht, Placebo- und Versuchsgruppe, sowie nach Zeitpunkt der Blutabnahme. Dadurch konnten nach der PCR-Analyse Aussagen über die differentielle Genexpression in der jeweiligen Gruppe der Männer und Frauen im Vergleich getroffen werden. Die Variabilität in der Genexpression zwischen den einzelnen Individuen in den acht Sammelproben wird bei dieser Vorgehensweise nicht erfasst. Die Konzentration der RNA-Lösungen wurde durch Einengen mit einer SpeedVac erhöht und ermöglichte in der folgenden reversen Transkription den Einsatz geeigneter Volumina.

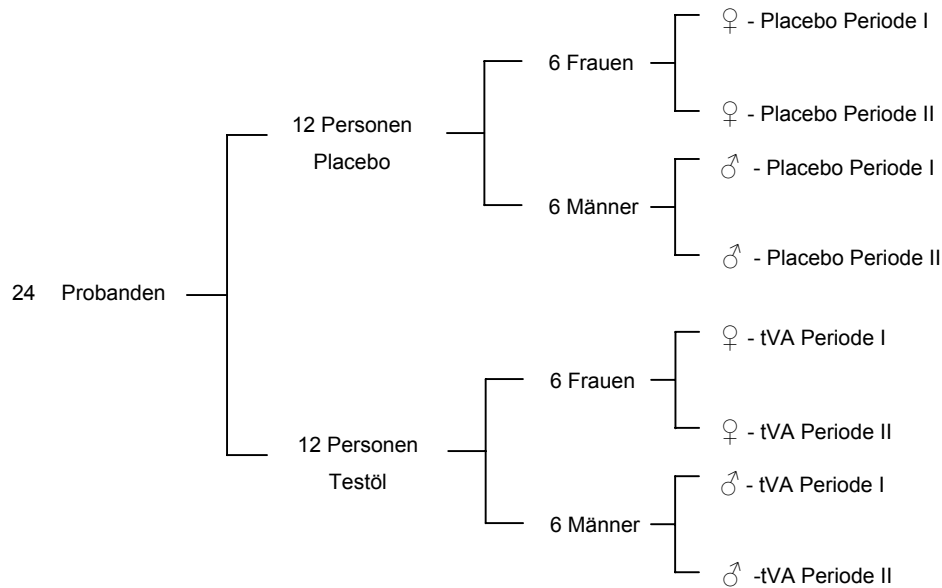


Abb. 9-2: Zusammenfassen der einzelnen RNA-Proben zu Sammelproben

Von den einzelnen Sammelproben wurde anschließend ein Aliquot abgenommen und mittels des Agilent Bioanalyzers sowohl die Qualität als auch die Konzentration bestimmt (Tab. 9-2). Alle Proben überschritten das für weitere Arbeiten empfohlenen 18S/28S-RNA Verhältnis von mindestens 1,8, somit hatte noch kein Abbau der RNA durch RNasen stattgefunden. Die Konzentrationen der Lösungen waren für den Einsatz in der reversen Transkription geeignet.

Tab. 9-2: Charakterisierung der RNA-Sammelproben der Probanden

Untersuchung von 1 µl der eingeeengten RNA-Lösung mittels des Agilent Bioanalyzers.

Sammelprobe	Verhältnis 18S / 28S RNA	Konzentration [ng/µl]
♀ - Placebo Periode I	2,13	110,4
♀ - Placebo Periode II	2,30	362,3
♀ - tVA Periode I	1,95	305,4
♀ -tVA Periode II	2,17	378,5
♂ - Placebo Periode I	1,81	270,4
♂ - Placebo Periode II	2,28	113,1
♂ - tVA Periode I	2,37	103,4
♂ - tVA Periode II	2,10	246,5

In der ersten reversen Transkription wurden 2 µg der Gesamt-RNA umgeschrieben und anschließend 25 ng dieser cDNA als Templat in der q-RT-PCR eingesetzt (Dreifachbestimmung). Zur Absicherung der erhaltenen Ergebnisse, wurde die reverse Transkription und die PCR wiederholt (Doppelbestimmung). Die erhaltenen Werte der beiden unabhängigen Messungen unterschieden sich nicht voneinander und wurden daher zur Auswertung zusammengefasst.

9.2.1 Expressionsprofil und differentiell regulierte Gene in den weiblichen Gruppen

Abb. 9-6 zeigt das Expressionsprofil der untersuchten Zielgene in der $15-\Delta C_t$ -Darstellung in der weiblichen Placebo-Gruppe nach der 2-wöchigen Adaptions-Periode (Periode I) und, im Vergleich dazu, nach der 6-wöchigen Interventionszeit (Periode II). Es handelt sich also hierbei um dieselben Probandinnen, denen während der Interventionszeit das Gemisch aus Palmkern- und Rapsöl (Placeboöl) verabreicht wurde. Dadurch sollten diese Probandinnen als Kontrollgruppe für die Probandinnen in tVA-Applikation dienen.

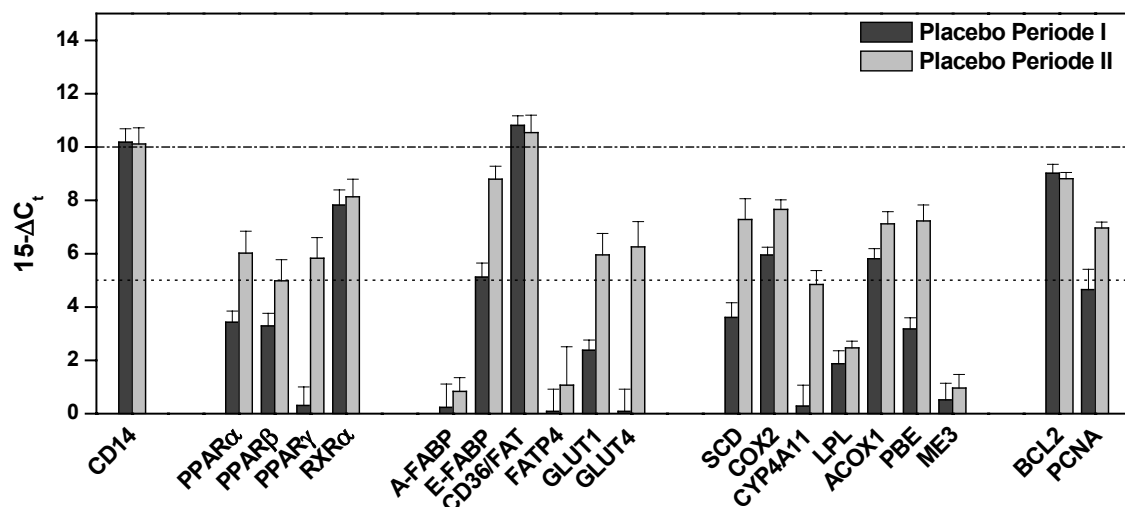


Abb. 9-6: Expressionsprofil in Monozyten der weiblichen Placebo-Gruppe vor (Periode I) und nach (Periode II) der Interventionszeit

Analyse der relativen Transkriptmengen durch q-RT-PCR nach der vergleichenden ΔC_t -Methode. Auftragung der auf β -ACT normierten $15-\Delta C_t$ -Werte. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 5 unabhängigen Messungen \pm SD. ----- : Grenze des niedrigen Expressionsniveaus; - - - - - : Grenze des mittleren Expressionsniveaus.

Unerwarteterweise blieb die Expression der Mehrheit der Gene in der weiblichen Placebogruppe während der Interventionszeit nicht konstant. Schon anhand des

Expressionsprofils ist zu erkennen, dass nach der Einnahme des Placeboöls die Expression der meisten Gene deutlich anstieg. Beispielsweise stiegen die mRNA-Menge des PPAR γ , GLUT4 und CYP4A11 von einem sehr niedrigen Expressionsniveau auf ein mittleres Niveau an. Lediglich der Monozytenmarker CD14 sowie der Transporter CD36/FAT und das apoptotische Protein BCL2 wurden durch die Applikation des Placeboöls nicht beeinflusst.

Die starke Induktion einiger Gene wird besonders deutlich in der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Darstellung des Vergleichs der Expressionsniveaus der Placebo-Proben der Perioden I und II (Abb. 9-7). Während die Expression der Gene CD14, RXR α , A-FABP, CD36/FAT, LPL, ME3, und BCL2 sich nicht wesentlich änderte, stiegen die mRNA-Mengen von PPAR α und β , FATP4, COX2, ACOX1 und PCNA jedoch nach der 6-wöchigen Interventionszeit signifikant auf das bis zu 6,5-fache an. Bei PPAR γ , E-FABP, GLUT1, SCD, CYP4A11 und PBE war sogar eine Erhöhung der Expression auf das 13-46-fache und im Fall von GLUT4 sogar auf das 76-fache zu beobachten.

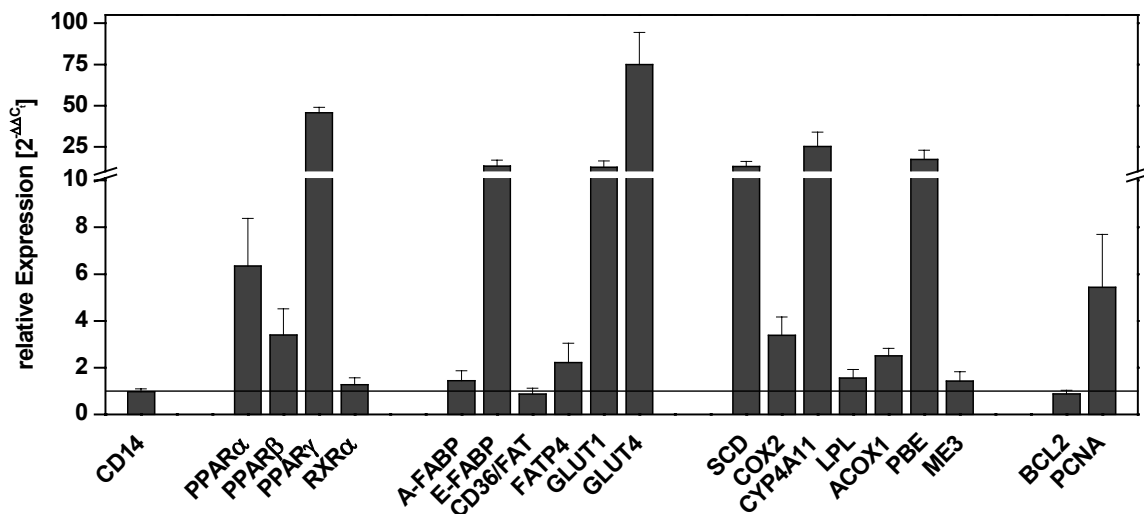


Abb. 9-7: Regulation der Zielgene in der weiblichen Placebogruppe nach der Interventionszeit (Placebo Periode II)

Berechnung der relativen Expression mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ nach Normierung auf β -ACT. Darstellung der Mittelwerte von 5 unabhängigen Messungen \pm SD. — : $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1 =$ keine Regulation.

Das Ergebnis der eigentlichen Intervention (tVA-Applikation) bei der weiblichen Testgruppe ist ebenfalls als Vergleich der $15-\Delta C_t$ -Werte nach der zweiwöchigen Adaptions-Periode (Periode I) und der 6-wöchigen Interventionszeit (Periode II) gezeigt (Abb. 9-8). Zwischen den Expressionsprofilen der weiblichen Kontroll- und Testgruppen waren nur geringe

Unterschiede in der Expressionshöhe der untersuchten Gene festzustellen, d.h. die Expressionsniveaus der Zielgene waren in beiden Gruppen nahezu gleich (Abb. 9-7 vs. Abb. 9-8). A-FABP und FATP4 konnten in der Testgruppe jedoch nicht detektiert werden. Im Gegensatz zur Wirkung des Placeboöls in der Kontrollgruppe beeinflusste die Intervention mit der *trans*-Vaccensäure die Expression der meisten Zielgene jedoch nicht signifikant. Lediglich die mRNA-Mengen von CD14, PPAR α , CD36/FAT, SCD, ACOX1, COX2 und BCL2 waren nach der Applikation des Agonisten signifikant erhöht.

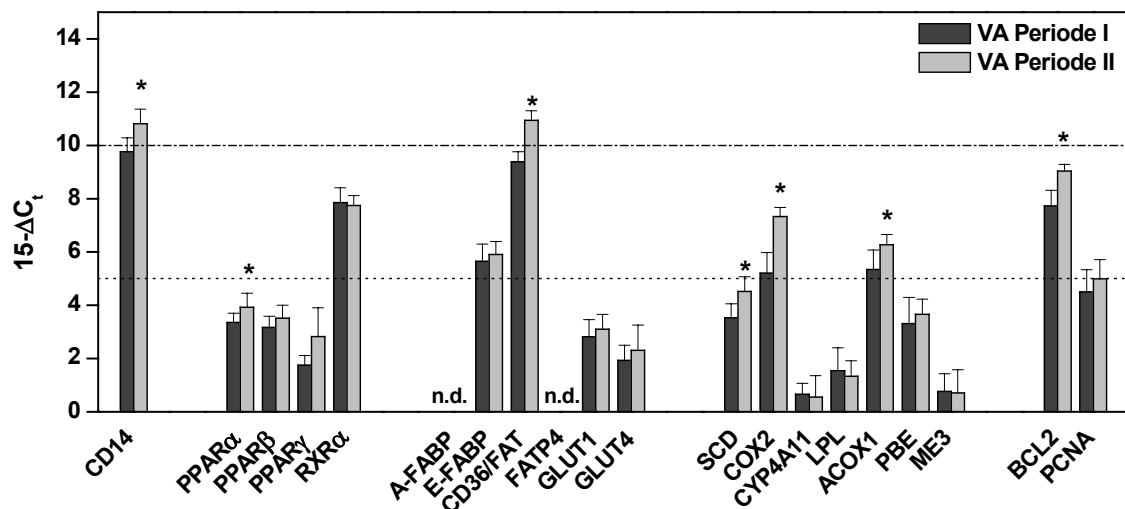


Abb.9-8: Expressionsprofil in Monozyten der weiblichen Testgruppe vor (Periode I) und nach (Periode II) der Interventionszeit

Analyse der relativen Transkriptmengen durch q-RT-PCR nach der vergleichenden ΔC_t -Methode. Auftragung der auf β -ACT normierten $15-\Delta C_t$ -Werte. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 5 unabhängigen Messungen \pm SD. (* $p < 0,05$). : Grenze des niedrigen Expressionsniveaus; - - - - - : Grenze des mittleren Expressionsniveaus. n.d. : nicht detektiert.

Deutlich wird die differentielle Expression einiger Gene zwischen Periode I und II in der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Darstellung (Abb. 9-9). Lediglich CD36/FAT, COX2 und BCL2 sind nach der tVA-haltigen Diät mehr als zweifach induziert worden, und können daher als nutritive Markergene in den weiblichen Monozyten angesehen werden. Etwas weniger aber dennoch signifikant wurden CD14, PPAR α , SCD und ACOX1 heraufreguliert. Die Regulation der übrigen Zielgene erreichte keine Signifikanz.

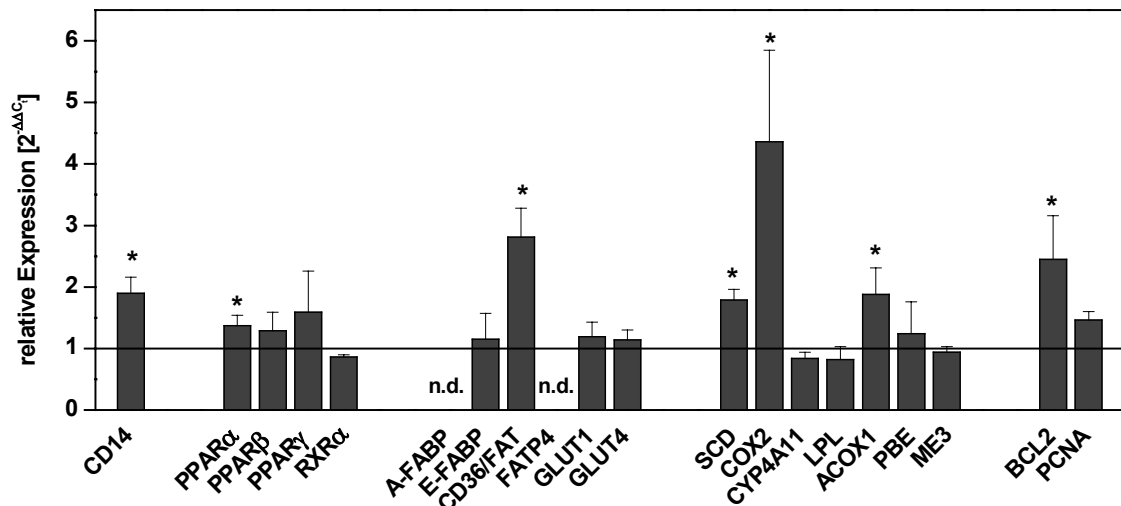


Abb. 9-9: Regulation der Zielgene in der weiblichen Testgruppe nach der Interventionszeit (tVA Periode II)

Berechnung der relativen Expression mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ nach Normierung auf β -ACT. Darstellung der Mittelwerte von 5 unabhängigen Messungen \pm SD. (* $p < 0,05$). —: $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$ = keine Regulation. n.d. : nicht detektiert.

Durch Vergleich der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte der Zielgene der weiblichen Placebo- und Testgruppe vor der Intervention kann die Variabilität der Genexpression zwischen den unterschiedlichen Probandengruppen abgeschätzt werden, da diese beiden Gruppen sich nur in den Probandinnen, nicht aber der Diät unterscheiden. Tatsächlich wurde für die meisten der untersuchten Zielgene $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Bereich von etwa 1 gefunden, die Expressionsniveaus waren in den beiden Gruppen also sehr ähnlich. Allerdings wurden PPAR γ und GLUT4 am Ende der Adaption-Periode in der späteren weiblichen Testgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe exprimiert. CD36/FAT und BCL2 hingegen waren deutlich niedriger exprimiert ($p < 0,05$). Die Expression einiger Zielgene war also trotz gleicher Diät vor Beginn der Intervention mit Placeboöl oder tVA in den beiden Probandengruppen nicht genau gleich. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass diese Gene aufgrund unkontrollierbarer äußerer Einflüsse Streuungen in der Expression aufwiesen. Eine deutlich größere Anzahl der Probanden würde diese Streuung nivellieren.

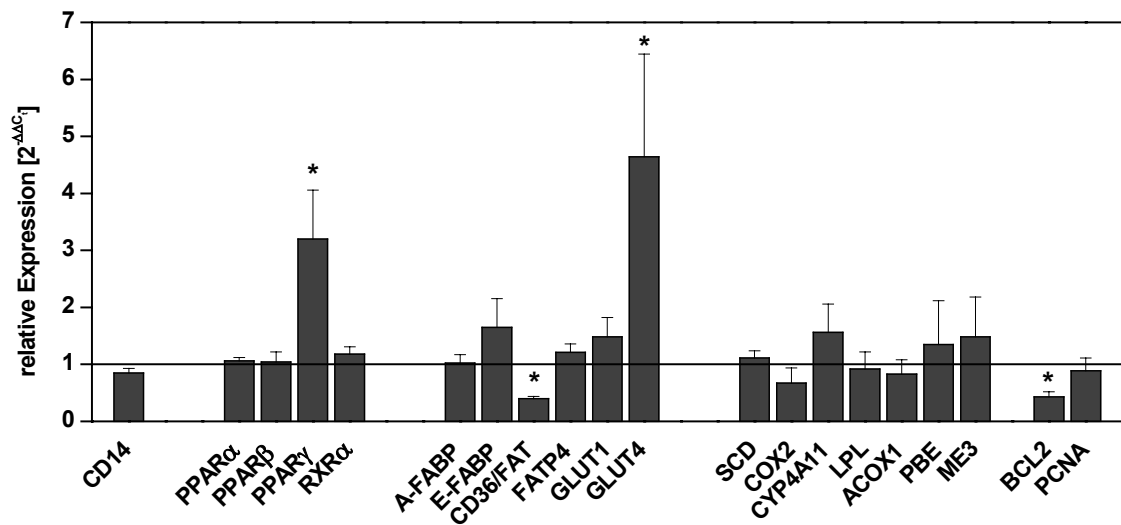


Abb. 9-10: Vergleich der Expression der untersuchten Zielgene in der weiblichen Test- und Kontrollgruppe vor Beginn der Interventionszeit (Periode I)

Berechnung der relativen Expression mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ nach Normierung auf β -ACT. Darstellung der Mittelwerte von 5 unabhängigen Messungen \pm SD. (* $p < 0,05$). —: $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$ = keine Regulation.

9.2.2 Expressionsprofile und differentiell regulierte Gene in den männlichen Gruppen

Wie bei den weiblichen Proben wurden zuerst die Expressionsprofile der untersuchten Zielgene in der Placebo-Gruppe nach der 2-wöchigen Adaptions-Periode und nach der 6-wöchigen Interventionszeit betrachtet (Abb. 9-11). Auch in der männlichen Kontrollgruppe gehörten der Monozytenmarker CD14 sowie der Transporter CD36/FAT mit $15-\Delta C_t$ -Werten über 10 zu den hoch exprimierten Zielgenen. Dem mittleren Expressionsniveau konnten $RXR\alpha$, E-FABP, COX2, ACOX1, PBE, BCL2 und PCNA zugeordnet werden ($15-\Delta C_t$ -Werte 4 – 10). Die Kernrezeptoren $PPAR\alpha$, β und γ , die Glukosetransporter 1 und 4 sowie das Malat-Enzym (ME3) wurden auf niedrigem Niveau exprimiert. Lediglich sehr wenig mRNA konnte für A-FABP, FATP4 und CYP4A11 nachgewiesen werden ($15-\Delta C_t$ -Werte <1). Die Expressionsniveaus stimmten mit denen der weiblichen Kontrollgruppe im Wesentlichen überein.

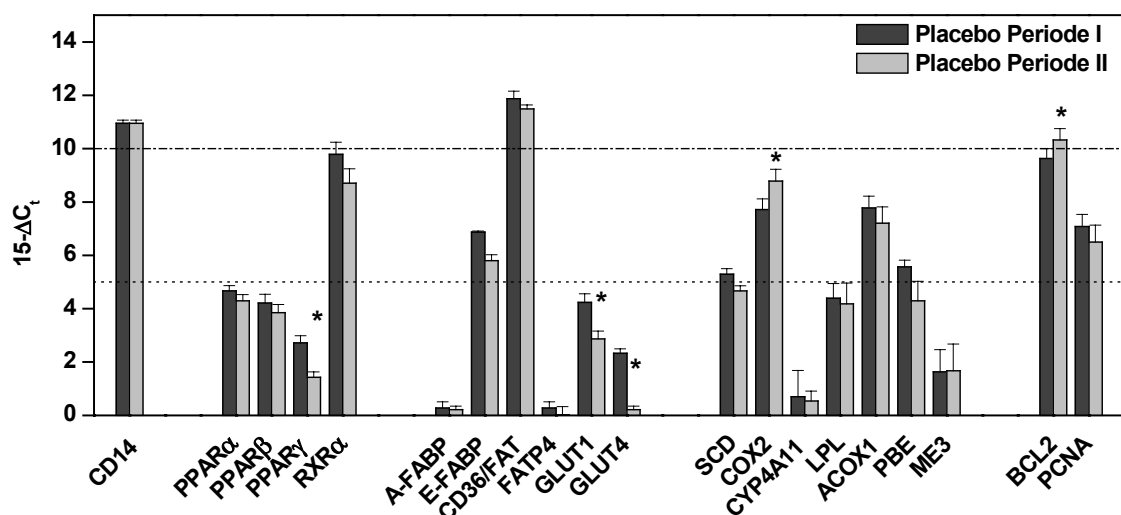


Abb. 9-11: Expressionsprofil in Monozyten der männlichen Placebo-Gruppe vor (Periode I) und nach (Periode II) der Interventionszeit

Analyse der relativen Transkriptmengen durch q-RT-PCR nach der vergleichenden ΔC_t -Methode. Auftragung der auf β -ACT normierten $15-\Delta C_t$ -Werte. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 5 unabhängigen Messungen \pm SD, (* $p < 0,05$). : Grenze des niedrigen Expressionsniveaus; - - - - - : Grenze des mittleren Expressionsniveaus.

Im Gegensatz zu der weiblichen Kontrollgruppe blieb die Expression der untersuchte Gene in der männlichen Kontrollgruppe nach Einnahme des Placeboöls jedoch relativ konstant. Lediglich die mRNA-Mengen von GLUT1 und 4 sowie $PPAR\gamma$ und PBE nahmen signifikant mehr als 50 % ab. COX2 und BCL2 wurden signifikant auf das 2,1 bzw. 1,6-fache erhöht. Genauer ist dies in der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Darstellung zum Vergleich der Placebogruppe Periode I und

Periode II zu erkennen (Abb. 9-12). Das Ergebnis unterscheidet sich enorm von dem der weiblichen Gruppe.

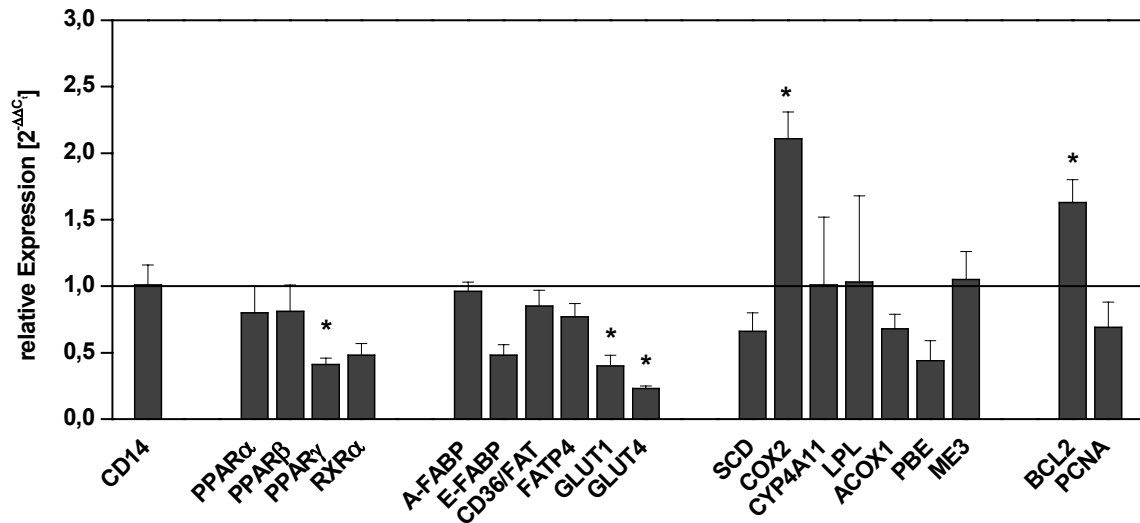


Abb. 9-12: Regulation der Zielgene in der männlichen Placebogruppe nach der Interventionszeit (Placebo Periode II)

Berechnung der relativen Expression mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ nach Normierung auf β -ACT. Darstellung der Mittelwerte aus 5 unabhängigen Messungen \pm SD, (* $p < 0,05$). — : $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1,0 =$ keine Regulation.

Das Expressionsprofil der untersuchten Zielgene in der männlichen Testgruppe nach der eigentlichen Intervention (tVA-Applikation) ist ebenfalls als Vergleich der $15-\Delta C_t$ -Werte nach der zweiwöchigen Adaptions-Zeit (Periode I) und der 6-wöchigen Interventionszeit (Periode II) gezeigt (Abb. 9-13). Genau wie in der weiblichen Testgruppe wurden nur wenige Zielgene durch die Intervention mit der tVA stark beeinflusst. Anhand der $15-\Delta C_t$ -Darstellung war lediglich ein sehr starker Anstieg der Expression im Fall des GLUT4 zu erkennen. Die differentiell regulierten Gene gehen deutlicher aus der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Darstellung hervor (Abb. 9-14).

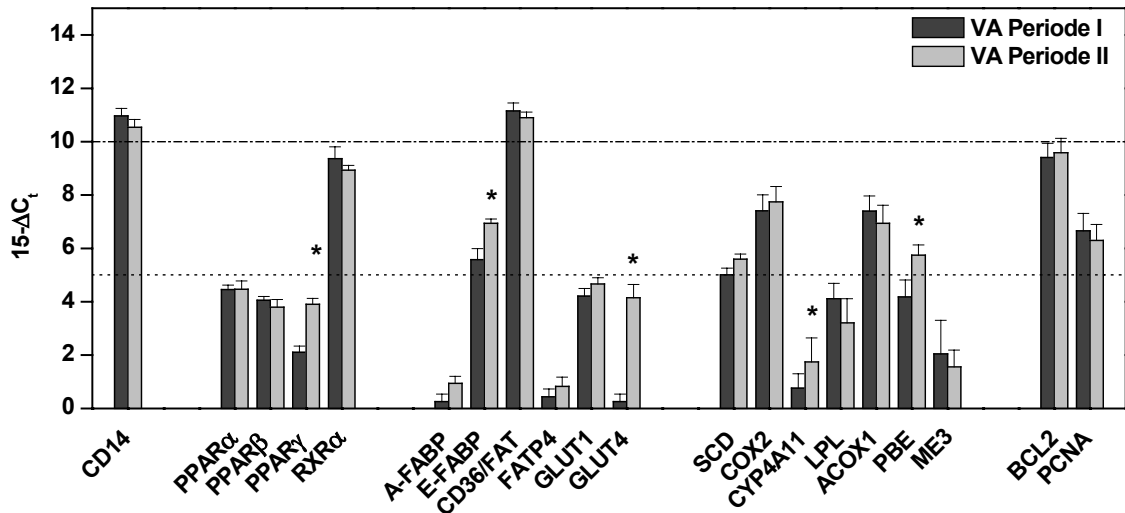


Abb. 9-13: Expressionsprofil in Monozyten der männlichen Testgruppe vor (Periode I) und nach (Periode II) der Interventionszeit

Analyse der relativen Transkriptmengen durch q-RT-PCR nach der vergleichenden ΔC_t -Methode. Auftragung der auf β -ACT normierten $15-\Delta C_t$ -Werte. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 5 unabhängigen Messungen \pm SD, (* $p < 0,05$). -----: Grenze des niedrigen Expressionsniveaus; -----: Grenze des mittleren Expressionsniveaus.

Von den 21 untersuchten Genen wurden PPAR γ , E-FABP, CYP4A11 und PBE während der Interventionszeit signifikant über zweifach induziert. Am auffälligsten war hier GLUT4, das mit einer 16-fachen Induktion am stärksten auf die Applikation des Agonisten reagierte, woraufhin dieser Glukosetransporter als nutritives Markergen für die Wirkung der 11*trans*-Vaccensäure in männlichen Monozyten angesehen wird. Dies wurde in der weiblichen Testgruppe nicht beobachtet.

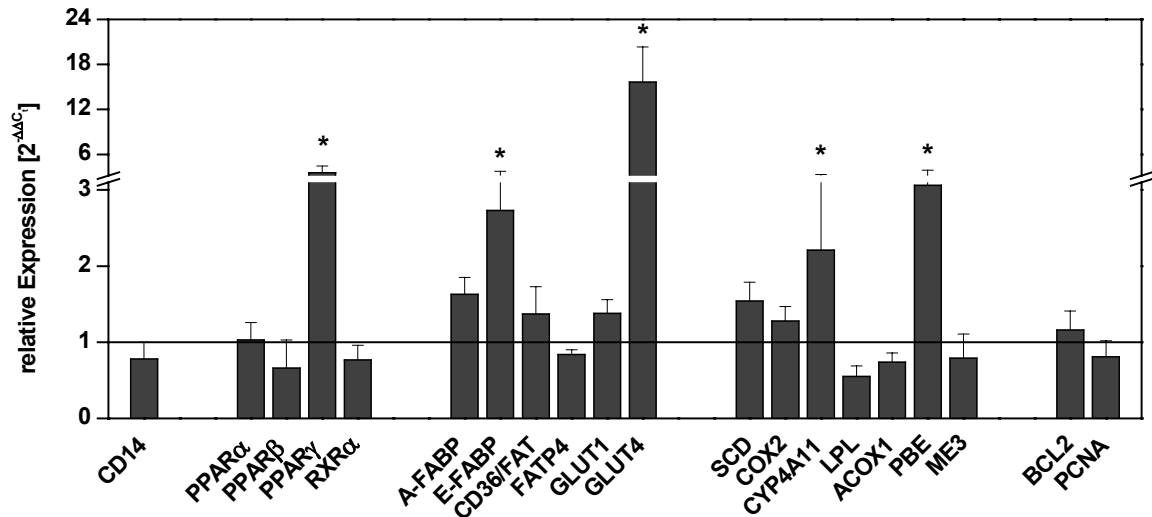


Abb. 9-14: Regulation der Zielgene in der männlichen Testgruppe nach der Interventionszeit (tVA Periode II)

Berechnung der relativen Expression mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ nach Normierung auf β -ACT. Darstellung der Mittelwerte aus 5 unabhängigen Messungen \pm SD, (* $p < 0,05$). — : $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1 =$ keine Regulation.

Auch bei den männlichen Proben wurde zur Kontrolle die Variabilität zwischen den Probandengruppen untersucht. Aus Abb. 9-15 geht hervor, dass in der Tat die Expression der meisten Gene vor Beginn der Intervention mit Placebo oder tVA kaum schwankte. Lediglich die mRNA-Menge von E-FABP, GLUT4 und PBE in der Gruppe ♂ - VA Periode I war signifikant unter 50 % geringer als in der Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt. Genau wie in den weiblichen Gruppen war die Expression der Zielgene also trotz gleicher Diät nicht von Beginn an in beiden Probandengruppen gleich, wobei die Variabilität hier jedoch nicht so hoch war, wie zwischen den weiblichen Gruppen beobachtet.

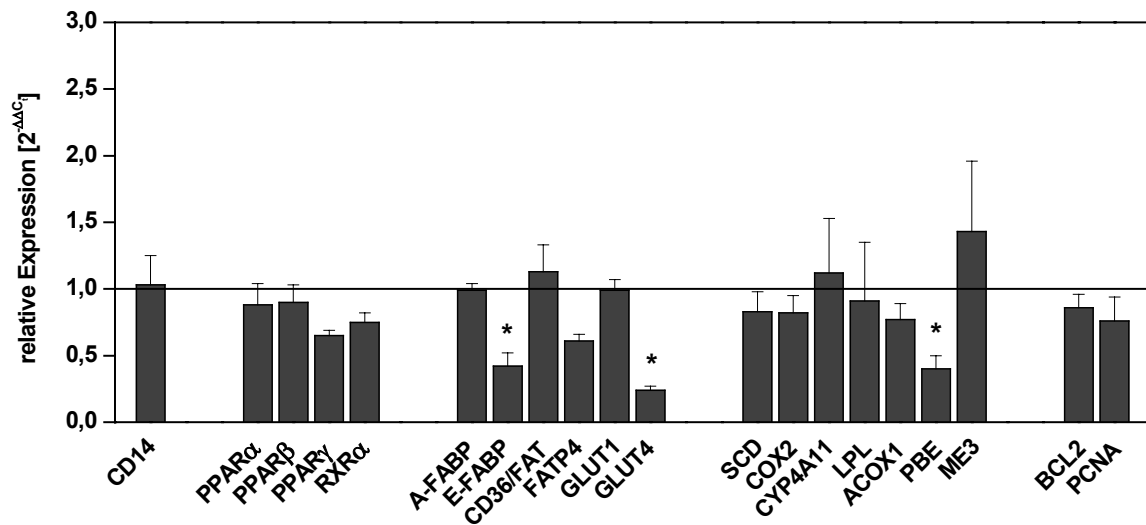


Abb. 9-15: Vergleich der Expression der untersuchten Zielgene in der männlichen Test- und Kontrollgruppe vor Beginn der Interventionszeit (Periode I)

Berechnung der relativen Expression mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ nach Normierung auf β -ACT. Darstellung der Mittelwerte von 5 unabhängigen Messungen \pm SD, (* $p < 0,05$). — : $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1,0 =$ keine Regulation.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Placeboöl unerwarteterweise die Genexpression in den Monozyten der weiblichen Kontrollgruppe erheblich beeinflusste, was in der männlichen Kontrollgruppe nicht beobachtet wurde. Darüber hinaus wurden deutliche Unterschiede in der Genexpression in den Monozyten männlicher und weiblicher Probanden in der Antwort auf die Intervention mit tVA beobachtet. So wurde in der männlichen Testgruppe GLUT4 als Markergen für die tVA-vermittelte differentielle Genexpression identifiziert, wohingegen in der weiblichen Testgruppe CD36/FAT und COX2 als Marker angesehen werden können.

10 Diskussion

10.1 Etablierung der DNA-Chip-Technologie mit kommerziellen DNA-Chips

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigte sich im Rahmen des DFG-Verbundprojektes „Lipide und Phytosterole in der Nahrung“ mit der Identifizierung neuer nutritiver Markergene für die Wirkung der Fettsäuren auf die differentielle Genregulation in verschiedenen Zellkulturmodellen. Dabei sollte u.a. die Methode der DNA-Chip-Analytik zum Einsatz kommen, die eine parallele Identifizierung vieler spezifischer DNA-Sequenzen in komplexen Nukleinsäuregemischen auf der Transkriptomebene ermöglicht. Für diese in der Arbeitsgruppe neu eingeführte Technik wurden zwei Ziel-DNA-Markierungs-Methoden basierend auf einer reversen Transkription erfolgreich etabliert. Sowohl die Einschritt-Markierung durch den direkten Einbau von Fluorophor-markierten dUTPs in die entstehende cDNA, als auch die Markierung in zwei Schritten durch den Einbau von Amino-allyl-dUTPs und anschließender Kopplung mit aktivierten Fluorophoren führte auf kommerziell erhältlichen Mitteldichte- (Human Starter Kit Arrays = Kontrollchips) und Hochdichte-Chips (PAN[®] Human 10k Array, MWG) zu deutlichen, gut aufgelösten Signalen, die vergleichende Aussagen über die Expressionshöhe der einzelnen Gene erlaubten, die durch Messungen mit der q-RT-PCR bestätigt werden konnten. Anhand der mit den kommerziellen Chips erhaltenen Ergebnisse und der aufgetretenen Probleme sollen hier die Grundlagen und Möglichkeiten aber auch die Grenzen der DNA-Chip-Technologie diskutiert werden.

10.1.1 Nachweisgrenze, Spezifität und Sondendesign

Ein wichtiger Punkt in der DNA-Chip-Analytik ist das Sondendesign, bei dem vor dem Hintergrund der jeweiligen Fragestellung immer ein Kompromiss zwischen der Spezifität und der Fähigkeit auch geringe Mengen an Ziel-DNA noch signifikant zu detektieren, gefunden werden muss. Letzteres bedingt die untere Nachweisgrenze des DNA-Chips und wird eher durch längere Sonden (z.B. cDNA-Sonden) erreicht, wohingegen eine hohe Spezifität durch kurze Sonden (Oligonukleotide) erreicht wird [4, 121]. Die hohe Spezifität kurzer Oligonukleotid-Sonden (< 25 nt) wird besonders im Bereich Speziesdifferenzierung (z.B. Tierarten oder Bakterien) sowie in der SNP- (*single nucleotide polymorphism*)-Analyse ausgenutzt [12, 122, 123]. Auf dem Gebiet der mRNA-Expressionsanalysen, wie sie auch in dieser Arbeit durchgeführt wurden, haben sich in jüngster Zeit Oligonukleotidsonden mit 50 bis 70 nt Länge durchgesetzt. Kane *et al.* [121] konnten zeigen, dass sich deren Nachweisgrenze kaum von der längerer cDNA-Sonden unterscheidet, darüber hinaus wurde eine im Vergleich zu langen Sonden verbesserte Datenqualität beobachtet [124, 125].

Die ideale Oligonukleotidsonde muss in der Lage sein, zwischen ihrer speziellen Ziel-DNA und allen anderen DNA-Sequenzen in der Probe unterscheiden zu können. Außerdem muss sie unter den gegebenen Hybridisierungsbedingungen möglichst geringe Konzentrationsunterschiede ihrer Ziel-DNA detektieren können. In den letzten Jahren wurden viele Programme zum Sondendesign veröffentlicht, die auf zwei Grundannahmen basieren. Zum einen werden die Sonden spezifisch zu ihren Ziel-DNAs ermittelt, sodass Kreuzhybridisierungen mit anderen Transkripten ausgeschlossen werden können, wobei Übereinstimmungen zwischen Sonde und „nicht-Ziel-DNA“ von >75 % zu Kreuzhybridisierungen führen können. Zum anderen wird das GC-Gleichgewicht bei gleicher Länge der Sonden über den gesamten Chip berücksichtigt, um ein uniformes Schmelzpunkt-Profil zu realisieren, das eine vergleichbare Hybridisierung an allen Sonden unter den gegebenen Bedingungen erlaubt. Desweiteren beeinflusst der GC-Gehalt die Signalhöhe, die mit dem GC-Gehalt ansteigt und ein Maximum bei GC = 44-46 % erreicht. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Lage der Sonde innerhalb der kodierenden Sequenz (*coding sequence*, CDS) des zu detektierenden Zielgens. Für eukaryontische Organismen wird die Sondensequenz in der Regel nahe des 3'-Endes der CDS des Zielgens positioniert, die Detektion der Transkripte wird durch den Einsatz von Oligo-d(T)-Primern in der Markierungsreaktion (reverse Transkription) gewährleistet [121, 126-130].

Nach diesen Kriterien wurden auch die Sonden der von der Firma MWG Biotech bezogenen DNA-Mikroarrays ausgewählt. Dabei wird die Nachweisgrenze für diese Art der Sonden exemplarisch mit 11,4 pM (0,46 fmol) mRNA angegeben und ein Unterschied im Expressionsniveau von 5 pM wurde als ausreichend gefunden, um signifikante Cy5/Cy3-Verhältnisse zu erhalten [131]. Genaue Angaben über die Sequenz und die genaue Lage der Sonden werden nicht gemacht.

Nachdem die Methode der DNA-Chip-Technik etabliert wurde, konnte in dieser Arbeit so mit den kommerziellen Mitteldichte-DNA-Arrays, bestehend aus den beschriebenen Sonden, u.a. die Expression des vergleichsweise niedrig exprimierten Gens RXR α in HepG2-Zellen bestimmt werden. Dies konnte ebenfalls mit der allgemein als Validierungsmethode der DNA-Chips anerkannten q-RT-PCR bestätigt werden [132]. Unerwarteterweise konnte jedoch mit dem Hochdichte-Chip nach Inkubation mit cDNA aus PPAR α -transfizierten HepG2-Zellen kein Signal an der PPAR α -Sonde detektiert werden. Dies steht im Widerspruch zu Daten, die mit der q-RT-PCR ermittelt wurden. Hier wurde die mRNA dieses Rezeptors schon in nicht transfizierten Zellen als auf mittlerem Niveau exprimiert identifiziert. Das gleiche galt in diesem Versuch für PPAR β und γ , sowie für die Transporter CD36/FAT

und GLUT2, deren Signale auf dem Chip die Nachweisgrenzen ebenfalls nicht überschritten (Abb.6-11 und Tab. 6-2).

Ein anderes Zellkultursystem das sowohl mittels DNA-Chip als auch q-RT-PCR untersucht wurde, stellten neben den HepG2-Zellen die THP-1-Makrophagen dar. Ebenso wie in den HepG2-Zellen konnte in diesem System die Expression der PPARs mit Hilfe der q-RT-PCR auf mittlerem Niveau detektiert werden. Auch die Werte des CD36/FAT lag hier deutlich detektierbar auf mittlerem Niveau (Abb.8-1 bzw. 8-6). Hier konnte jedoch sowohl die Expression des PPAR α als auch des CD36/FAT in den THP-1-Makrophagen mit Hilfe der Hochdichte-Chips übereinstimmend mit den Ergebnissen der Validierungsmethode detektiert werden (Kap. 8.3.4). Das gleiche gilt für PPAR β und γ sowie für GLUT1, SCD und ACOX1. Als Beispiel für ein Gen, dass nur auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert wird, erwies sich in der q-RT-PCR das CYP4A11 (Kap. 8.3.1) Dieser Befund konnte in der DNA-Chip-Analyse bestätigt werden.

In der Probe der PPAR α -transfizierten HepG2-Zellen wurde offensichtlich die zum sicheren Nachweis notwendige mRNA-Menge der beschriebenen Zielgene auf dem Chip nicht erreicht. Da im Rahmen dieser Arbeit mit einem kommerziellen, validierten SONDENSATZ gearbeitet wurde, wurde auf eine mögliche Optimierung der Sonden (Position, Länge) verzichtet.

Die untere Nachweisgrenze eines Array hängt neben der Eigenschaften der Sonden auch von den Eigenschaften der eingesetzten Markierungs- und Detektionsmethoden ab. So konnten Alexandre *et al.* [133] mit einer Methode, basierend auf der – aus der Photographie entlehnten – Silberpräzipitation auf Goldpartikeln, die über Biotin-Streptavidin-Wechselwirkungen an die Ziel-DNA gebunden wurden, die Nachweisgrenze der eingesetzten Mikroarrays auf 2,5 pM Ziel-DNA senken. In verschiedenen Biosensorsystemen konnten, allerdings mit kurzen Oligonukleotid-Ziel-DNAs, Nachweisgrenzen von nur 50 fM für eine Cy5-markierte Ziel-DNA erreicht werden [134]. Kleinjung *et al.* [135] konnten sogar noch 70 fM eines 13mer Oligonukleotids durch Interkalation von PicoGreen detektieren. Die in dieser Arbeit mit Cy5 markierte cDNA aus unbehandelten HepG2-Zellen wurde mit dem im Institut für Chemo- und Biosensorik GmbH (Münster) zur Verfügung stehenden DNA-Biosensorchip analysiert, der die Detektion der DNA-DNA-Hybridisierung in Realzeit ermöglicht. Die an diesem Gerät ermittelten Nachweisgrenzen liegen in Abhängigkeit der eingesetzten Glasobjektträger etwa bei 13 pM für 377 bp große PCR-Produkte bzw. 15 pM für 45mer Oligonukleotide [4]. Für die durch reverse Transkription markierten cDNA-Proben konnten jedoch keine Signale erhalten werden. Die eingesetzten Mengen (500 ng) reichten

nicht aus, um die in vergleichsweise niedriger Kopienzahl vorliegenden cDNA-Moleküle zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Für diese Analysemöglichkeit wird ein Amplifizierungsschritt der RNA (In vitro Transkription) unverzichtbar [136].

10.1.2 Variabilität und Reproduzierbarkeit

In vielen Hybridisierungen traten Unterschiede der Signalhöhen innerhalb eines Array auf, d.h die Hybridisierung der Ziel-DNA an die Sonden war nicht homogen. Deutlich wurde diese *intra-Array-Variabilität* an unterschiedlich hohen Signalen an *Spots* identischer Sonden an verschiedenen Positionen im Array. So wurden beispielsweise nach der Hybridisierung eines Kontrollchips Variationskoeffizienten von 40 bis 50 % für die *Housekeeping*-Gene β -ACT, GAPDH und Ubiquitin gefunden (300 ng cDNA, Abb. 6-4). Unter günstigen Umständen wurden lediglich Variationskoeffizienten zwischen 15 % und 30 % beobachtet (1000 ng cDNA Abb. 6-4), hier verlief die Hybridisierung homogener. Aufgrund der hohen Kosten sowohl für die Chips als auch für die Markierung konnten die Variabilitätsparameter in dieser Arbeit nicht statistisch abgesichert werden.

Zusätzlich zur *intra-Array-Variabilität* wurde auch eine *inter-Array-Variabilität* beobachtet. Im THP-1-Makrophagen-Modell konnten mit der DNA-Chip Technik zwar Zielgene detektiert werden, die im HepG2-Modell keine signifikanten Signale zeigten. Trotzdem traten auf den insgesamt drei Hochdichte-Chips mit denen die Genexpression der THP-1-Makrophagen untersucht wurden, trotz gleicher Menge und vergleichbaren Markierungsgrad der aufgetragenen cDNA große Variabilitäten der Signale auf. So wurde beispielsweise für SCD auf einem Chip ein Cy5-Signal von 31000 *counts*, auf dem zweiten Chip hingegen nur von 6000 *counts* gemessen (Tab. 8-3). Ähnliche Beobachtungen großer Variabilität der Signale wurden bei den Hybridisierungen der Kontrollchips gemacht. Bei den hochexprimierten *Housekeeping*-Genen β -ACT und GAPDH wurden Signalunterschiede von 50 bis 300 % in zwei vergleichbaren Hybridisierungen mit Proben aus dem gleichen Modellsystem beobachtet (Abb. 6-1 und 6-5). Für diese Gene mit allgemein hohen Signalen ist dies nicht weiter kritisch, ihre Expression wird in beiden Fällen weiterhin sicher detektiert. Für niedrig exprimierte Gene wie z.B. RXR α können diese Schwankungen jedoch zu einer unter Umständen falsch negativen Aussage führen. So überstieg die Signalthöhe dieses Transkriptionsfaktors im Fall der Hybridisierung mit cDNA aus HepG2-Zellen den Schwellenwert einmal knapp (Kap. 6.1.1), wohingegen in der in Kap. 6.1.3 dargestellten Hybridisierung mit einer Probe aus dem gleichen Zellsystem der Schwellenwert nicht erreicht wurde und die durch q-RT-PCR gezeigte Expression nicht bestätigt wurde.

Die *inter-Array-Variabilität* wurde auch anhand der Hybridisierung ansteigender cDNA-Mengen deutlich, die keineswegs einen proportionalen Anstieg der Signale zeigte (Abb. 6-4). Zwar konnten die Signale durch die Erhöhung der Probenmenge von 150 auf 300 ng gesteigert werden. Die Hybridisierung mit 600 ng zeigte jedoch wieder eine geringere Signalthöhe. Offensichtlich beeinflussen neben den von außen regulierbaren Faktoren wie Inkubationstemperatur- und -dauer oder die Pufferzusammensetzung, andere Faktoren die Hybridisierung, auf die kein direkter Einfluss genommen werden kann. So konnte z.B. nicht kontrolliert werden, ob die markierte cDNA nach dem Einengen in der SpeedVac und der Wiederaufnahme in Hybridisierungspuffer vollständig resuspendierte und somit die berechnete mit der tatsächlichen Probenkonzentration übereinstimmte.

Cho und Tiedje [137] berichteten von ähnlichen Abweichungen. Sie erhielten über mehrere *Spots* innerhalb eines Array einen Variationskoeffizienten von 25 % und zwischen den Mittelwerten verschiedener Arrays eine Abweichung von ca. 50 %. Mit 10-15 % *intra-* bzw. 30 % *inter-Array-Variabilität* erhielten sowohl Meneses-Lorente *et al.* [138] als auch Bodrossy *et al.* [139] etwas bessere Werte, die auch in den meisten Fällen mit den Kontrollchips in dieser Arbeit erreicht wurden. Die eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Sondenhybridisierung beruht auf der Ausbildung einer inhomogenen Ziel-DNA-Verteilung unter einem Deckglas oder in einem Hybridisierungsrahmen innerhalb der stehenden Lösung. Dies stellt einen grundsätzlichen Nachteil dieser Methode dar, allerdings kommen heute zunehmend Geräte auf den Markt, die eine Durchmischung der Probenlösung bei automatisierter und so reproduzierbarer Durchführung der Hybridisierung ermöglichen [140]. Im Rahmen der Möglichkeiten wurde eine Durchmischung der Proben in dieser Arbeit durch die Inkubation der Arrays in einem Inkubator mit integrierten Schüttler bei einer Geschwindigkeit von 80 rpm realisiert.

10.1.3 Zweifarben-Experimente

Um die Probleme der *inter-Array-Variabilität* der Oligonukleotid-Chips zu vermeiden, werden Zweifarben-Experimente durchgeführt, in denen die zwei zu vergleichenden Proben mit Fluorophoren unterschiedlicher spektraler Eigenschaften (hier Cy5 und Cy3) markiert und zusammen auf einem Chip inkubiert werden. Anhand der Signalverhältnisse der beiden Fluorophore können dann Aussagen über die Expressionsstärke des jeweiligen Gens in den Proben gemacht werden. Eine genaue Übersicht über diese Methode geben Clarke *et al.* sowie Eisen und Brown [1, 13]. Bevor differentiell regulierte Gene mit dieser Methode identifiziert werden können, müssen die Signale der beiden Fluorophore normiert werden. Das ist nötig, um die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften des Cy5 und Cy3 sowie die Unterschiede in der Markierung (d.h. Einbau in die cDNA) und der

Ausgangsmenge der in der Markierung eingesetzten RNA auszugleichen. Diese Faktoren können eine Verschiebung der durchschnittlichen Cy5 zu Cy3 Verhältnisse bewirken, die reskaliert werden müssen, bevor eine korrekte Analyse möglich ist.

Allerdings waren auch in Zweifarben-Experimenten Schwankungen zu beobachten. Die Bildung der Cy5/Cy3-Verhältnisse nach Hybridisierung mit Proben aus THP-1-Makrophagen auf den drei Hochdichte-Chips (Kap. 8.3.4) ergaben beispielsweise auf einem der Chips eine Repression für das Enzym SCD um 50 %, auf einem anderem hingegen eine Induktion um 140 %. Nach der dritten Hybridisierung konnte wiederum keine Regulation festgestellt werden. Aus dem Mittelwert dieser Ergebnisse deutete sich lediglich der Trend einer Induktion an, eine große Anzahl an Wiederholungen könnte das Ergebnis statistisch absichern [141, 142]. In Genexpressionsstudien mit Zweifarben-Mikroarray Versuchen wird im allgemeinen bei einem zweifachen Unterschied im Expressionsniveau eines Gens der zwei zu untersuchenden Proben eine differentielle Regulation des Gens angenommen [143].

In Zweifarben-Experimenten mit Bezafibrat-behandelten HepG2-Zellen auf einem Mitteldichte-DNA-Chip (Kap. 6.1.4) lag keins der Gene außerhalb dieser Grenze. Mit dieser Methode konnte hier keine Regulation nachgewiesen werden. Dies korrelierte jedoch mit der Analyse der HepG2-Zellen mittels der q-RT-PCR, mit der eine Regulation nach der Behandlung mit dem Panagonisten gemessen wurde, die ebenfalls deutlich unter zweifach lag. Anhand dieser Beispiele ist die Grenze der Detektion der DNA-Chips zu erkennen, die zum einen durch die *inter-Array* Schwankungen und zum anderen auch durch die Nachweisgrenze sowie das Signal/Rausch Verhältnis bedingt wird [142]. DNA-Mikroarray-Experimente, für die in der Regel nur sehr wenige Wiederholungen realisierbar sind, können einen Überblick über die Tendenz der Regulation geben oder extrem regulierte Gene wie das in Kap. 8.3.3 beschriebene, in THP-1-Makrophagen durch Pristansäure stark induzierte A-FABP aufdecken. Daher sollten die mit DNA-Chips erhaltene Ergebnisse immer durch die empfindliche und verlässliche Methode der q-RT-PCR validiert werden, wie es beispielsweise von Rajeevan [132] empfohlen wird.

Interessanterweise hält die Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) dennoch an dem Vergleich der Hybridisierungen auf zwei Chips fest (Kontrollchip vs. Testchip). Die Markierung erfolgt hier durch eine Biotinylierung der Ziel-DNA und der Anfärbung mit Streptavidin-Phycoerythrin in einem separaten Schritt nach der Hybridisierung. Die Analyse erfolgt ebenfalls mit einem ArraysScanner, der das bei 570 nm emittierte Licht detektiert. Alle Arbeitsschritte erfolgen hier automatisiert an Wasch- und Hybridisierungsstationen, um mögliche Fehler der Anwender im Umgang mit den Chips auszuschließen und so die Hybridisierungen

vergleichbarer zu machen. Durch die Auswahl mehrerer verschiedener kurzer Oligonukleotid-Sonden (25 nt) pro Zielgen, die photolithographisch direkt auf der Chipoberfläche synthetisiert werden, und der parallelen Detektion falsch positiver Signale wird darüber hinaus eine hohe Spezifität der Arrays erreicht. Dadurch konnte Affymetrix die Marktführung im Bereich der DNA-Chips übernehmen.

10.2 Evaluierung der Niedrigdichte-DNA-Chips

Während die Hochdichte-DNA-Chips überwiegend zur umfassenderen Analyse der Genexpressionsprofile ausgewählter Gewebe oder Zellen bzw. hier zur Identifizierung neuer nutritiver Markergene herangezogen werden, finden die Niedrigdichte-Chips Anwendung bei der Untersuchung gezielter Fragestellungen durch die Analyse einer begrenzten Anzahl von Genen. Mit Niedrigdichte-DNA-Chips, die in unserem Labor nach einer Standardmethode zur kovalenten Anbindung aminomodifizierter Sondenoligonukleotide auf eine Isothiocyanat-aktivierte Glasoberfläche hergestellt wurden, sollten ausgewählte Zielgene in hohem Durchsatz unter dem Einfluss der Fettsäureagonisten untersucht werden. Da für diese Art der Chips bisher nur Daten aus der Anwendung im DNA-Biosensor vorlagen [4, 136], mussten die optimalen Bedingungen sowie die Handhabung dieser Chips für die konventionelle Hybridisierung der DNA-Chips unter dem Deckglas bzw. im Hybridisierungsrahmen etabliert und bestimmt werden. Anhand der mit den Niedrigdichte-Chips erhaltenen Ergebnisse sollen hier die speziellen Anforderungen an die Hybridisierung der Ziel-DNA mit der komplementären Sonde diskutiert werden.

10.2.1 Sondenkonzentration, -struktur und Hybridisierungseffizienz

Die Fangsonde sollte im Vergleich zu den Ziel-DNA-Molekülen in einem großen Überschuss auf der Chipoberfläche immobilisiert werden, damit Änderungen in der Signalhöhe lediglich von der Konzentration der eingesetzten Ziel-DNA abhängt. Durch das Dispensieren weniger Nanoliter der Sondenlösungen mit steigender Konzentration wurden Arrays mit ebenso ansteigender Belegungsdichte der Fangsonden-Moleküle an den verschiedenen Sondenspots realisiert. Die Hybridisierung dieser Arrays mit markierter Ziel-DNA in konstanter Konzentration zeigte eine Erhöhung der Fluoreszenzsignale bis zur Sättigung bei einer Sondenkonzentration von ca. 4 μM . Aufgrund dieser Ergebnisse und vorheriger Erfahrungen aus der Arbeit mit den DNA-Biosensor-Chips genügte für die DNA-Mikroarrayanwendungen die relativ geringe Konzentration der Fangsondenlösungen von 5 μM , um einen deutlichen Überschuss der Fangsondenmoleküle zu gewährleisten. Grundsätzlich kann die Konzentration der Sondenlösung bei der Immobilisierung im Arrayformat nicht beliebig groß

gewählt werden, da die Hybridisierungseffizienz abnimmt, wenn die Belegungsdichte der immobilisierten Fangsondenmoleküle zu groß wird [144, 145].

Darüber hinaus bringt die Hybridisierung der Fangsonde mit der Ziel-DNA an der Grenzfläche zwischen der festen Glasoberfläche und der Probenlösung Probleme mit sich, die während einer Hybridisierung in einer Lösung nicht auftreten. Zum einen kann die Fangsonde nicht frei diffundieren, wodurch die Hybridisierungsrate vermindert wird. Zum anderen wird die Anbindung durch sterische Faktoren gehindert. Schließlich wird die Hybridisierung der DNA-Einzelstränge durch die Natur der Glasoberfläche selber beeinflusst. Dabei üben Parameter wie ihre Ladung, Hydrophobizität oder Grad der Solvatisierung großen Einfluss auf die DNA-DNA-Wechselwirkung aus.

Im Rahmen der Optimierung der Isothiocyanat-aktivierten DNA-Chips für die Anwendung im Biosensor wurde ein T_8 -Abstandshalter zwischen der Aminomodifizierung der Sonde am 5'-Ende und der Sequenz eingeführt, der die Zugänglichkeit der Sondenoligonukleotide verstärkte und einen positiven Einfluss auf die Signalhöhe ausübte [136]. Auch Peplies *et al.* [146] beobachteten einen Anstieg der Signale nach Einfügen eines A_6 - bzw. A_{12} -Abstandshalters vor die Sequenz der Sonden konventioneller DNA-Mikroarrays. Ebenso konnten Shchepinov *et al.* [145] zeigen, dass die Einführung polymerer Abstandshalter zwischen der Sondensequenz und Glasoberfläche die Zugänglichkeit der Sonden für die Ziel-DNA-Moleküle verbessert und so die Hybridisierungseffizienz und damit die Signalhöhe positiv beeinflusst. Da die in dieser Arbeit aus Gründen der Kompatibilität zu den Mittel- und Hochdichte-DNA-Chips zum Einsatz kommenden 50mer Sonden (Pan[®]-Oligo Set-Sonden, MWG Biotech) keinen Abstandshalter besaßen, wurde dieser Aspekt noch einmal gesondert betrachtet. Dazu wurden die Hybridisierungen an zwei 50mer β -Actinsonden analysiert, von denen bei gleicher Sequenz lediglich die eine Sonde einen T_8 -Abstandshalter trug. Die Signalthöhen unterschieden sich an der Sonde mit Abstandshalter nicht von der ohne T_8 -Abstandshalter. In diesem Fall wurden die Unterschiede wahrscheinlich durch eine längere Inkubationszeit unter dem Deckglas ausgeglichen, wie auch schon von Peterson *et al.* [144] beobachtet wurde.

10.2.2 Hybridisierungsparameter Stringenz

Als weiterer essentieller Parameter der Hybridisierung, wurde die Stringenz anhand der Hybridisierung fluoreszenz-markierten L-FABP-PCR-Produkts in verschiedenen kommerziell erhältliche Hybridisierungspuffern untersucht (Kap. 7.4.1). In diesen Versuchen zeigte der UltraHyb-Puffer von Ambion die geringste Kreuzhybridisierung an den Negativkontrollen bei bester Hintergrundqualität, d.h. niedrige Hintergrundfluoreszenz und gleichmäßige Struktur

ohne Schlieren oder „Körnung“. Mit diesem Puffer lagen stringente Bedingungen für die Hybridisierung vor und es konnte die hohe Spezifität der Sonden gezeigt werden, mit denen zwischen den drei Typen A-, I-, und H-FABP unterschieden werden konnte. Allerdings wurde diese Spezifität auf Kosten der Signalthöhe erreicht, die in diesem Fall nur etwa 30 % der mit GlasHyb, PerfectHyb, MWG- und TIGR-Puffer erhaltenen Signale erreichte. Da die Zusammensetzung der Puffer nicht veröffentlicht wurde, kann über die Gründe der offensichtlich unterschiedlichen Stringenzen nur spekuliert werden. In der Regel führt eine Erhöhung der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer ebenfalls auf Kosten der Signalthöhe zu einem Anstieg der Stringenz [147]. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit genau das Gegenteil beobachtet (Kap. 7.4.2). Die Erhöhung des Formamidgehalts des UltraHyb-Puffers von 25 auf 50 % führte zu einem Anstieg der Signalthöhe. Dies wurde auf die niedrigere Viskosität des Hybridisierungspuffers zurückgeführt, die die Hybridisierungseffizienz der Ziel-DNA erhöhte und den Effekt der Stringenz auf die Signale überlagerte. Bei einer Formamidkonzentration von 62,5 % machte sich dann die erhöhte Stringenz in Form sinkender Signalthöhe bemerkbar. Diesen Anstieg der Fluoreszenzsignale nach Verringerung der Viskosität des Hybridisierungspuffers beobachteten auch Du *et al.* sowie Simard *et al.* [148, 149]. Da Formamid eine gesundheitsgefährdende Chemikalie darstellt, ist es sinnvoll, wenn möglich auf andere Reagenzien zurückzugreifen, die ebenfalls ein Absenken der Schmelztemperatur der Hybridisierung bewirken. Alternativ können daher Guanidin-Hydrochlorid, Betain oder Harnstoff zum Hybridisierungspuffer zugesetzt werden. So kann beispielsweise der Zusatz von 6 M Harnstoff zum Hybridisierungspuffer eine ebenso hohe Reduktion des T_m -Werts wie 50 % Formamid bewirken [147, 149, 150].

Der Einfluss der Viskosität machte sich auch in den Hybridisierungen mit sinkender UltraHyb-, d.h. abnehmender Salzkonzentration bemerkbar (Kap. 7.4.1). Durch die Verdünnung des Original-Puffers auf 50 bzw. 25 % der Ausgangslösung wurde gleichzeitig die Salzkonzentration gesenkt und wiederum, entgegen der Erwartungen, ein Anstieg der Signalthöhe beobachtet. Eine niedrige Salzkonzentration entspricht eigentlich einer hohen Stringenz, die zu niedrigeren Fluoreszenzsignalen führen sollte. Da aber durch die Verdünnung ebenso die Viskosität des Puffers herabgesetzt wurde, wurde dieser Effekt wiederum überlagert.

Die Erhöhung der Signale kann neben der Verringerung der Stringenz oder Viskosität auch erreicht werden, indem volumenverbrauchende Substanzen wie Dextransulfat oder Polyethylenglykol zum Hybridisierungspuffer hinzugefügt werden. Diese Polymere liegen in wässriger Lösung stark hydratisiert vor, wodurch in der Lösung effektiv eine höhere Ziel-DNA-Konzentration vorliegt, die dadurch zu größeren Signalen führt [147]. Ku *et al.* [151]

konnten allerdings auch zeigen, dass die Viskosität des Hybridisierungspuffers mit Dextransulfatkonzentrationen über 10 % anstieg, was wiederum in einer Reduktion der Signalhöhe resultierte.

Für weitere Versuche wurde in dieser Arbeit ein Hybridisierungspuffer bestehend aus 25 % UltraHyb mit einer Formamidkonzentration von 50 % (v/v) eingesetzt, der zu deutlichen Signalen bei geringer Hintergrundfluoreszenz führte. Beim Vergleich dieses Puffers im Vergleich mit dem GlasHyb-Puffer (Clontech) durch Hybridisierung der Cy5-markierten L-FABP- und PPAR α -PCR-Produkte traten Kreuzhybridisierungen und hohe Hintergrundfluoreszenz nur in den Hybridisierungen mit GlasHyb auf. Mit dem modifizierten UltraHyb-Puffer wurde somit ein Puffer gefunden, der durch seine Zusammensetzung sowohl Stringenz als auch Viskosität positiv miteinander kombinierte.

10.2.3 Erstellung von Expressionsprofilen mit Niedrigdichte-DNA-Chips

Leider ließen sich die positiven Eigenschaften des Puffers für die Hybridisierungen der PCR-Produkte nicht ohne weiteres auf die Deckglas-Hybridisierung der markierten cDNAs auf den Niedrigdichte-Chips übertragen, denn hier wurden Kreuzhybridisierungen an den Negativkontrollen und hohe Hintergrundfluoreszenz beobachtet. Dieses Problem konnte durch den Einsatz des MWG-Puffers in Anlehnung an das Protokoll der cDNA-Hybridisierung auf Mitteldichte-Chips gelöst werden (Kap. 6). Desweiteren erfolgten die Hybridisierungen nur noch unter Zuhilfenahme eines Hybridisierungsrahmens, da der MWG-Puffer für diese Anwendung optimiert wurde. Mit diesen Hybridisierungsbedingungen wurden mit den Niedrigdichte-Chips erste Expressionsprofile ausgewählter Zielgene in HepG2- und THP-1-Zellen erhalten. Die *Housekeeping*-Gene β -ACT und GAPDH konnten so immer als die am höchsten exprimierten Gene identifiziert werden. Dies korrelierte mit den Messungen der q-RT-PCR. Im Fall der niedrig exprimierten Gene traten allerdings Unstimmigkeiten zwischen beiden Methoden auf. Auf die Expression der Zielgene in den einzelnen Zellkultursystemen wird in Kap. 10.3 näher eingegangen.

Inzwischen hat sich die q-RT-PCR aufgrund ihrer relativ hohen Reproduzierbarkeit als die geeignetste Validierungsmethode der DNA-Chip-Ergebnisse etabliert [132, 152]. Die extrem niedrige Erfassungsgrenze ermöglicht es, auch die geringen mRNA-Mengen niedrig exprimierter Gene sicher zu erfassen. Ein Nachteil der Methode gegenüber der DNA-Chip-Technik stellt jedoch die deutlich geringere Anzahl der parallel analysierbaren Zielgene dar, daher werden in der Regel nur die Kandidaten für regulierte Gene validiert. Für diesen speziellen Einsatzbereich bietet sich die q-RT-PCR mit SYBR-Green an. Der Einsatz dieses interkalierenden Fluorophors anstelle der Taqman-Sonde [153, 154] gewährleistet eine

große Flexibilität in der Auswahl der Zielgene, da bei bekannter cDNA-Sequenz lediglich die Primer der zu validierenden Gene entworfen werden müssen wohingegen die anderen Parameter der PCR konstant bleiben. Hinzu kommt der Kostenfaktor, da nicht für jedes zu bestätigende Gen eine neue, doppelt markierte Sonde beschafft werden muss. Wird jedoch eine sehr hohe Spezifität der Analyse benötigt, z.B. zur Identifizierung einzelner Spleißvarianten eines Gens, kann anstelle des SYBR-Green-Assays ein Taqman-Assay eingesetzt werden.

Weitere Methoden zur Validierung der Chip-Ergebnisse, ebenfalls auf Hybridierungsbasis, sind beispielsweise Northern-Blot-Analysen, die jedoch im Vergleich zur q-RT-PCR nur einen geringen Durchsatz erlauben, sehr zeitaufwändig sind und viel RNA benötigen (> 5 µg vs. 20 – 40 ng) [152]. Einen interessanten, jedoch sehr aufwendigen, Ansatz der Validierung stellt die Kontrolle der mit einem Oligonukleotid-Array erhaltenen Ergebnisse mit einem cDNA-Array dar, wie es von Lee *et al.* [155] vorgeschlagen wurde.

10.3 Regulation der Gene des Lipid- und Glukosestoffwechsels in immortalisierten Zellkulturen

Die Lipide in der Nahrung sind wichtige Makronährstoffe für das Wachstum und die Entwicklung aller Organismen. Zusätzlich zu ihrer Funktion als Energiequelle und ihrer Effekte auf die Zusammensetzung der Membranlipide, üben die in der Nahrung enthaltenen Fettsäuren tiefgreifenden Einfluss auf die Genexpression aus, der zu Veränderungen im Metabolismus, Wachstum und Zelldifferenzierung führen kann. Der Effekt der Nahrungslipide spiegelt eine adaptive Antwort auf Änderungen in der Quantität und Qualität der aufgenommenen Fette wider, wobei einerseits die Enzymaktivität durch direkte Ligand-Protein-Interaktion beeinflusst wird. Andererseits wirken die Fettsäuren auch über nukleäre Rezeptoren, wie den PPARs, auf die Transkription der Zielgene [60, 156]. Die in dieser Arbeit untersuchten Zielgene des Lipid- bzw. Glukosemetabolismus tragen entweder ein funktionelles PPRE in ihrer Promotorregion oder es wurde eine Regulation dieser Gene durch spezifische PPAR-Aktivatoren wie den Fibraten (PPAR α), GW501516 (PPAR β) oder Thiazolidindionen (PPAR γ) beobachtet [38, 102, 157, 158]. Da in letzter Zeit die Isomere der konjugierten Linolsäure sowie die verzweigtkettigen Fettsäuren Phytan- und Pristansäure ebenfalls als potentielle Liganden und Aktivatoren der PPARs identifiziert wurden [21, 35, 53, 159], kann daher bei Vorliegen erhöhter Konzentrationen dieser Fettsäuren eine Regulation der Zielgene über den PPAR-Signalweg erwartet werden.

Die Verwendung der CLAs bzw. der Phytan- und Pristansäure als Liganden der PPARs in sogenanntem *Functional Food* zur Prävention von Herz-Kreislaufkrankungen oder anderen Symptomen des Metabolischen Syndroms stellt daher einen interessanten Aspekt dar. Allerdings wurden in bisherigen Human-Studien fast nur phänotypische Veränderungen, wie die Triglyceridwerte des Plasmas oder die Körperfettakkumulation nach der Applikation der CLAs betrachtet [28, 30, 32, 160]. Über eine Beteiligung der PPAR-Zielgene ist dabei eher wenig bekannt. Dies sollte in dieser Arbeit, neben der Identifizierung neuer nutritiver Markergene mit Hilfe der DNA-Chip-Technologie, anhand der verschiedenen humanen Zellkulturmodelle mittels der q-RT-PCR näher untersucht werden.

Die Untersuchungen zur Regulierung ausgewählter Zielgene des Lipid- und Glukosestoffwechsels wurden in immortalisierten humanen Zellkulturen als Modellsysteme für Hepatozyten (HepG2-Zellen) und Makrophagen (differenzierte THP-1-Zellen) durchgeführt. Als erstes wurden die PCR-Systeme für die ausgewählten Zielgene etabliert und anschließend die Zellkulturen dahingehend untersucht, ob und in welcher Höhe die mRNA dieser Gene exprimiert wurde.

10.3.1 Wirkung der Fettsäuren in den HepG2-Zellen

Hinsichtlich der Kernrezeptoren wurde in HepG2-Zellen festgestellt, dass die Expression aller PPAR-Isoformen auf mittlerem Niveau lag, PPAR α jedoch die dominierende Form darstellte. Diese Ergebnisse korrelieren mit Berichten der Literatur, in denen die Expression der PPARs in hepatozytischen Zelllinien entweder mittels q-RT-PCR, Northern- oder Western-Blot Analysen auf mRNA- bzw. Proteinebene gezeigt werden konnten [71, 157, 161]. Auch *in vivo* konnten die Kernrezeptoren sowohl in Nager- als auch in der humanen Leber nachgewiesen werden [18], wobei in menschlichen Leberlysaten im Vergleich zur Mausleber eine zehnmal geringere mRNA-Menge des PPAR α sowie eine zusätzliche RNA-Spleissvariante gefunden wurde, die für ein nicht funktionales Protein kodiert und daher die PPAR α -vermittelte Transkriptionskontrolle beim Menschen wahrscheinlich eingeschränkt ist [18, 162]. Im Fall der betrachteten Transportproteine für Fettsäuren war die mRNA-Menge des L-FABP erwartungsgemäß am höchsten, dies stimmt ebenfalls mit den Berichten von Glatz sowie Wolfrum *et al.* [79, 163] überein und korreliert mit der Expression *in vivo* [164]. Da PPAR α und L-FABP das gleiche Expressionsmuster und Ligandenspektrum aufweisen und beide im Nukleus nachgewiesen werden konnten, wurde vermutet, dass die beiden Proteine zusammen in die Signaltransduktion involviert sind. Dieses Zusammenspiel wurde von Wolfrum *et al.* [81] bestätigt und konnte auch für A-FABP und PPAR γ bzw. E-FABP und PPAR β gezeigt werden [19].

PPAR α und PPAR γ wurden aufgrund ihrer essentiellen Rolle in der Lipidhomöostase mit einigen Stoffwechselkrankheiten in Verbindung gebracht, die vermehrt in den entwickelten, westlichen Gesellschaften beobachtet werden und zunehmend zu einem Problem der Gesundheitssysteme werden. Dies sind Krankheiten wie Atherosklerose, Hyperlipidämie, Diabetes oder Übergewicht, die auch unter dem Begriff „Metabolisches Syndrom“ zusammengefasst werden. Per Definition ist das Metabolische Syndrom durch die Symptome abdominales Übergewicht, erhöhte Triglycerid- und Glukosekonzentrationen im Blut im nüchternen Zustand, niedrige HDL-(high density lipoprotein)-Cholesterinkonzentrationen sowie Bluthochdruck gekennzeichnet [165, 166]. Die Verabreichung von PPAR α -Liganden (besonders Fibrate) kann dem zum einen durch die Stimulation der hepatischen Fettsäureoxidation sowie durch reduzierte ApoCIII-Expression entgegenwirken, wodurch eine Absenkung der Triglyceridkonzentrationen im Plasma erreicht wird. Zum anderen kommt es zu einer Induktion des Apolipoproteins AI und AII und damit zu einem Anstieg des HDL-Niveaus [38, 167]. In HepG2-Zellen ist die Expression des PPAR α jedoch vergleichsweise gering und daher wird die Wirkung der Agonisten eher kontrovers diskutiert [80, 162].

Auch in dieser Arbeit wurde hinsichtlich der betrachteten Transporterzielgene GLUT2, L-FABP und CD36/FAT eine zwar geringe, aber doch signifikant gegenüber der DMSO-Kontrolle, Wirkung aller eingesetzter Agonisten in Wildtyp-HepG2-Zellen beobachtet, wobei die Induktion durch 9-CLA signifikant höher war als die des 10-CLAs.

Diese Einflüsse lassen sich jedoch nur begrenzt auf die Situation in der menschlichen Leber extrapolieren. Die meisten Studien am Menschen beschränken sich auf die Aufnahme von leichter zugänglichen Daten wie der Plasmazusammensetzung oder der Körperfettanalyse, einen Überblick über die Literatur gibt Terpstra [33].

Für die Situation in der Leber von Ratten und Mäusen, die mit einer CLA-haltigen (sowohl 9- als auch 10-CLA) Diät behandelt wurden, sind jedoch Daten verfügbar, die mit den hier vorgestellten Ergebnissen in den HepG2-Zellen korrelieren. So konnten Belury und Moya-Camarena *et al.* [35, 168] eine 16- bzw. 2-fache Induktion des L-FABP in Mäusen und Ratten beobachten. In Zellkultursystemen wie der aus Ratten stammenden Hepatoma-Zelllinie FaO konnte ebenfalls eine 11-fache Induktion des L-FABP nach Behandlung mit 9-CLA nachgewiesen werden [169].

Im Falle der Kernrezeptoren wurde nach Applikation der CLAs lediglich die Expression des PPAR γ signifikant erhöht (ca. 50 %). *In vivo* wurde diese Beobachtung auch von Meadus

[170] in porcinem Muskelgewebe gemacht. Nach einer 45-tägigen Diät, zu 2 % angereichert mit einer CLA-Mischung, die sowohl 9- als auch 10-CLA enthielt, wurde eine Induktion des PPAR γ von 26 % gegenüber der Kontrollgruppe gemessen. Außerdem berichten Clément *et al.* [171] in Übereinstimmung mit den hier gezeigten Ergebnissen, dass eine mit 10-CLA angereicherte Diät die Expression des PPAR γ vervierfachte, begleitet von einer Induktion des PPAR γ -Zielgens CD36/FAT. Dagegen zeigte 9-CLA, anders als in dieser Arbeit, keinen signifikanten Einfluss.

Interessanterweise bewirkten die CLAs eine vergleichbar hohe bzw. sogar höhere Induktion wie das als Positivkontrolle eingesetzte Bezafibrat, für das in Reporterassays ein hohes Transaktivierungspotential für PPAR α festgestellt wurde und daher auch eine hohe Induktion der PPAR α -Zielgene erwartet wird [37]. In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine induzierende Wirkung der Linolsäure für die PPARs und deren Zielgene beobachtet werden, die jedoch für letztere keine Signifikanz gegenüber der DMSO-Kontrolle erreichte und in den oben genannten Studien nicht bestätigt werden konnte. Linolsäure zeigte dort keinen Einfluss auf die Expressionshöhe der betrachteten Transporter.

Die beobachteten Induktionen der Gene für die peroxisomalen Enzyme ACOX1 und PBE in den HepG2-Zellen korrelieren jedoch wieder mit den Beobachtungen *in vivo*, wobei erst kürzlich nach Fütterung einer CLA-haltigen Diät eine 2-fache bzw. 3-fache Induktion der murinen ACOX1 und PBE mit der q-RT-PCR gezeigt werden konnte [172]. In einer vergleichbaren Studie wurde sogar eine 9-fache Induktion der ACOX1 nachgewiesen [168].

Eine unterschiedliche Wirkung der CLA-Isomere wurde ebenfalls in vielen Studien an Nagern beobachtet und kontrovers diskutiert. In früheren Studien wurde oftmals ein CLA-Gemisch, bestehend aus 9- und 10-CLA in etwa gleichen Anteilen appliziert. Als später Verfahren zur Isomerentrennung bzw. zur Synthese der spezifischen Isomere etabliert wurden, stellte sich das 10-CLA als das wirksamere Isomer heraus. Es wird dabei als Auslöser für eine Veränderungen in der Zusammensetzung der Lipide im Körper und im Blutplasma angesehen, die mit einer Gewichtsabnahme und häufig mit einer Vergrößerung der Leber einhergeht, wobei diese Effekte mit der Änderung der Energiehomöostase und Insulinwirkung in Zusammenhang gebracht werden [171, 173, 174]. In Studien am Mensch ergab sich zwar bei übergewichtigen Probanden eine Gewichtsreduktion, die aber durch Erhöhung der Proinsulinwerte im Blut (Hyperproinsulinämie) begleitet wurde. Dies beeinträchtigt die Insulinsensitivität und kann die Entwicklung von Diabetes sowie kardiovaskuläre Erkrankungen begünstigen [175]. Die Applikation der 9-CLA wird dagegen

mit einer wachstumshemmenden Wirkung auf chemisch induzierte Tumore in Mäusen und Ratten in Verbindung gebracht [176-178].

Da für die hier betrachteten Gene der Transportproteine GLUT2, L-FABP und CD36/FAT sowie für die Enzyme der peroxisomalen β -Oxidation ACOX1 und PBE ein funktionales PPRE in ihrer Promotorregion nachgewiesen wurde [18], liegt nahe, dass die Transkription dieser Gene in der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 durch die CLAs genauso wie durch bekannte PPAR-Panagonisten (z.B. Bezafibrat) über den PPAR-Signalweg reguliert werden. Diese Gene können daher als nutritive Markergene für die Wirkung dieser in der Nahrung enthaltenen Lipidkomponenten in HepG2-Zellen angesehen werden.

10.3.2 Wirkung der Fettsäuren in THP-1-Makrophagen

Aufgrund der eher niedrigen Effekte, die in HepG2-Zellen beobachtet wurden, sollte ein weiteres Zellkultursystem etabliert werden, das als Modell für die Monozyten dienen könnte, die ja im Fokus der Kooperation mit der Arbeitsgruppe Jahreis standen (Kap. 5.4.5). Zu diesem Zweck wurde die THP-1-Zelllinie ausgewählt und in Kultur genommen. Diese Zellen ließen sich zu adherenten THP-1-Makrophagen differenzieren, in denen die Wirkung der Agonisten untersucht werden konnte. Zunächst wurde auch in den THP-1-Makrophagen die Expression der ausgewählten Zielgene bestimmt. Wiederum wurden alle Isoformen der PPAR-Kernrezeptoren detektiert, dabei war PPAR β die dominierende Form gefolgt von PPAR γ , während in den undifferenzierten THP-1-Zellen das Gegenteil der Fall war. PPAR γ wird allgemein eine Rolle während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen zugeschrieben und wurde in beiden Zelltypen nachgewiesen [179]. Darüber hinaus ist dieser Rezeptor, ähnlich wie in Adipozyten, bedeutend für die Lipidhomöostase sowie für die Regulation der Entzündungsantwort der Makrophagen [180]. Auch die Expression des PPAR α sowohl in differenzierten als auch in undifferenzierten THP-1-Zellen stimmt mit den Berichten von Chinetti *et al.* [181] überein, die ebenfalls in den gleichen Zellsystemen sowie *in vivo* in primären Monozyten und Makrophagen die Expression des PPAR α mittels der q-RT-PCR nachweisen konnten. Die Rolle des PPAR β in Makrophagen hinsichtlich der Differenzierung zu Schaumzellen wird kontrovers diskutiert, da die Behandlung mit Liganden dieses Rezeptors sowohl zu einer Förderung als auch zu einer Reduktion der Lipideinlagerung in Makrophagen führte [182]. Aufgrund der Expression der PPAR-Transkriptionsfaktoren sind die THP-1-Makrophagen also ein geeignetes Studienobjekt für die PPAR-vermittelte Wirkung der CLAs sowie der Phytan- und Pristansäure.

Die Ergebnisse der Expressionsstudien der Fettsäurebindungsproteine korrelieren ebenfalls mit den Berichten der Literatur, wonach die mRNA des A-FABP in undifferenzierten THP-1-Zellen bzw. *in vivo* in Monozyten nicht sicher nachweisbar war [102]. Während der Differenzierung zu Makrophagen tritt jedoch eine Induktion des A-FABP auf. E-FABP wurde in beiden Differenzierungsstadien auf hohem bzw. mittleren Niveau exprimiert, während die Expression des L-FABP in diesen Zellkulturmodellen nicht sicher nachweisbar war. Unerwarteterweise konnte im Rahmen eines anderen Projekts in unserem Arbeitskreis jedoch die Expression dieses Fettsäurebindungsproteins in Lungenmakrophagen nachgewiesen werden, was bestätigt, dass sich die verschiedenen Makrophagen-Typen hinsichtlich ihres Transkriptoms unterscheiden können [183, 184]. Dies korreliert offensichtlich mit ihrer individuellen Funktion nach der Differenzierung aus den Monozytenvorläufern (z.B. Gewebe- oder Alveolarmakrophagen und Schaumzellen) [87, 185].

Das am höchsten exprimierte, untersuchte Stoffwechsellzym in den THP-1-Makrophagen war die Stearoyl-CoA Desaturase. Diese ist am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und katalysiert die Biosynthese von einfach ungesättigten aus gesättigten Fettsäuren, die entweder *de novo* synthetisiert oder mit der Nahrung aufgenommen werden. Die bevorzugten Substrate der SCD sind Palmitoyl- und Stearoyl-CoA, die zu Palmitoleoyl- bzw. Oleoyl-CoA konvertiert werden. Darüber hinaus ist die Konversion der tVA zu 9-CLA durch SCD sowohl in Mensch als auch im Tier bekannt [23, 178, 186]. Die Produkte der SCD sind die am häufigsten vorkommenden einfach ungesättigten Fettsäuren, die in den verschiedenen Lipidklassen, wie Phospholipide, Triacylglycerinen, Cholesterinester oder Wachse zu finden sind. Außerdem dienen diese Fettsäuren als Mediatoren der Signaltransduktion und der Zelldifferenzierung. Einfach ungesättigte Fettsäuren beeinflussen Apoptose und spielen wahrscheinlich auch eine signifikante Rolle in der Mutagenese einiger Tumore [187]. In Anbetracht der vielfältigen Eigenschaften der einfach ungesättigten Fettsäuren liegt die Vermutung nah, dass die Regulation der SCD-Aktivität einen Einfluss auf physiologische Schlüsselfunktionen innerhalb der Zelldifferenzierung, Insulin-Sensitivität, Stoffwechselrate, Adipositas, Krebs oder, im Fall der Makrophagen, auch in der Arteriosklerose sowie der Regulation von Entzündungsreaktionen ausüben würde.

Ähnlich wie in den HepG2-Zellen sollte die Expression der PPARs auf mRNA-Ebene durch die Applikation der CLA-Isomere in den THP-1-Makrophagen nicht gesteigert werden. Unerwarteterweise wurde beobachtet, dass durch die Behandlung der Zellen mit 9-CLA die mRNA-Menge des PPAR α , β und γ reprimiert wurde, wobei die ersteren Signifikanz gegenüber der DMSO-Kontrolle erreichten. 10-CLA bewirkte ebenfalls eine, im Fall von

PPAR β und γ , signifikante Repression. Das gleiche wurde für Öl- und Linolsäure als Vertreter der Hauptlipide der Nahrung bzw. der CLA-Vorstufe beobachtet (Abb. 8-7). Im Unterschied hierzu fanden Weldon *et al.* [188] im gleichen Modellsystem keinen Einfluss der CLAs auf die Expression der Kernrezeptoren.

In den THP-1-Makrophagen wurde hier erstmals auch der Einfluss der verzweigt-kettigen, aus Chlorophyll abgeleiteten Phytan- und Pristansäure untersucht. Genau wie die CLAs führte die Applikation dieser PPAR-Agonisten zu einer Abnahme der mRNA-Expression der Kernrezeptoren, die für PPAR β (Pristansäure) sowie für PPAR γ (Phytansäure) Signifikanz gegenüber der DMSO-Kontrolle erreichte.

Der genaue Mechanismus der Repression der PPARs bleibt zu klären. Es könnte sich hierbei um eine *Feedback*-Hemmung durch die Lipidagonisten handeln, durch die die zuerst stimulierte Transkription der PPAR-Zielgene wieder reduziert wird, um weiteren Lipidtransport in die Zelle zu unterbinden. Dies würde mit der signifikanten Induktion der PPAR-Zielgene CD36/FAT (2,5- bzw. 8-fach) und A-FABP (6- bzw. 42-fach) durch 10-CLA bzw. Pristansäure und daraus resultierender erhöhter Lipidaufnahme und erhöhtem zellulären Lipidtransport übereinstimmen. Die Induktion durch die Pristansäure konnte hier ebenfalls erstmals gezeigt werden. Die Agonisten würden so ihren eigenen Transport und Metabolismus regulieren, wie auch schon von Wolfrum [189] vermutet. Der Effekt des 9-CLA war dagegen deutlich geringer und erreichte keine Signifikanz. Hier lag somit ebenfalls, wie schon in den HepG2-Zellen beobachtet, ein isomerspezifischer Unterschied in der Induktion vor, der so von Weldon *et al.* [188] in diesen Zellen nicht gefunden worden war. Aufgrund des starken Effekts der Fettsäureagonisten auf die beiden Transporter, der unabhängig auch mit den Hochdichte-DNA-Chip nachgewiesen werden konnte, wird in Abschnitt 10.3.3 und 10.3.4 näher auf die Rolle des A-FABP und CD36/FAT in den Makrophagen eingegangen werden. Die Expression des E-FABP und GLUT1 wurde durch die Applikation mit den Fettsäureagonisten nicht wesentlich beeinflusst, ebenso nicht die betrachteten Stoffwechsellenzyme ACOX1, COX2, LPL und ME3 trotz der nachgewiesenen funktionellen PPRES.

PBE wurde durch CLAs sowie Phytansäure im Unterschied zu früheren Studien in anderen Zellsystemen nicht induziert. In Leberzellen aus Ratten wurde eine Heraufregulation der mRNA dieses peroxisomalen Enzyms gefunden und aufgrund des vorhandenen PPRES in der Promotorregion dem PPAR-Signalweg zugeschrieben [18, 190, 191]. Eine Induktion wurde hier nach der Applikation der Pristansäure erstmals beobachtet, wodurch gezeigt werden konnte, dass Pristansäure, wahrscheinlich über die Aktivierung des PPAR α , als dessen

Ligand sie identifiziert wurde [53], die peroxisomale β -Oxidation in THP-1-Makrophagen und damit ihren eigenen Abbau beeinflusst.

Deutlich größer als bei PBE war hingegen die 2-fache Repression der SCD (10-CLA erreicht Signifikanz gegenüber der DMSO-Kontrolle), die auch nach Behandlung der Zellen mit Öl- und Linosäure beobachtet wurde, nicht jedoch mit der Kontrolle Bezafibrat, wodurch eine Induktion hervorgerufen wurde. Weder Phytan- noch Pristansäure hatten eine induzierende oder reprimierende Wirkung. Eine Herabregulierung der SCD auf mRNA-Ebene nach Applikation der CLAs wurde ebenso in murinem Milchdrüsengewebe und Leber nachgewiesen, wobei nur das 10*trans*,12*cis*-Isomer wirksam war [192, 193]. Choi *et al.* [194, 195] konnten jedoch nach der gleichen Behandlung der humanen HepG2-Zelllinie sowie zwei humaner Brustkrebszelllinien lediglich eine Reduktion der Enzymaktivität nachweisen und schlossen daher auf einen posttranslationalen Regulationsmechanismus. Auch hier war jeweils nur das 10-CLA das wirksame Isomer. Über den Mechanismus der Repression der SCD durch die CLAs sowohl auf mRNA als auch auf Enzymebene ist bislang nichts bekannt. In den THP-1-Makrophagen könnte sie ein Resultat der Repression der Kernrezeptoren darstellen, wodurch eine indirekte Wirkung der CLAs über den PPAR-Signalweg und das im SCD-Promotor lokalisierte PPRE bestätigt würde.

Wie schon vorher beschrieben, hat die Regulation der SCD Auswirkungen auf die verschiedensten Stoffwechselfunktionen. In SCD-defizienten Mäusen wurde eine deutlich geringere Akkumulation von Körperfett festgestellt, wodurch diese Tiere dünner als ihre Wildtyp-Verwandten waren. Hinweise deuten auf einen direkten antisteatotischen Effekt der SCD-Defizienz hin, der in einer erhöhten Lipidoxidation sowie einer Blockierung der Lipogenese resultiert. Darüber hinaus bewirkte der Verlust an SCD-Aktivität eine erhöhte Insulinsensitivität und eine höhere Stoffwechselrate. Durch all diese Faktoren ergab sich eine Resistenz der Mäuse gegenüber einer Gewichtszunahme auch bei einer sehr fetthaltigen Diät [187]. All diese Beobachtungen zeigen, dass SCD einen wichtigen metabolischen Kontrollpunkt in der Gewichtsregulation darstellt, daher wird dieses Enzym als ein vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Behandlung von Übergewicht, Diabetes und anderen Stoffwechselkrankheiten angesehen. Eine Repression der SCD-Aktivität auf Protein oder mRNA-Ebene z.B. durch die Anreicherung der Nahrung mit den CLAs wäre daher denkbar.

Die Induktion des A-FABP und CD36/FAT führt zu einer Akkumulation von Cholesterin in die Makrophagen und damit zu einer Entwicklung zu Schaumzellen, die an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt sind [95, 101, 182, 196, 197]. Eine Fleisch- und Milchprodukt-lastige

Ernährung, wie sie in der westlichen Welt üblich ist, könnte also in einer erhöhten Konzentration der CLAs und der BCFAs im Organismus führen und somit über die Induktion dieser beiden Zielgene das Risiko der Ausbildung kardiovaskulärer Krankheiten erhöhen. A-FABP und CD36/FAT könnten daher als Markergene für die gesteigerte Arteriosklerosedisposition herangezogen werden, ähnlich wie auch schon H-FABP oder B-FABP als Serummarker für Schädigungen des Gehirns herangezogen werden [198].

10.3.3 Die Rolle des A-FABP in Makrophagen

A-FABP wurde als das Fettsäurebindungsprotein des Fettgewebes entdeckt, in dem es auch als Marker für die Differenzierung der Adipozyten angesehen wird und ihm eine Funktion bei der Mobilisierung sowie dem intrazellulären Fettsäuretransport zugeschrieben wird. Studien zeigten, dass die Ausschaltung des A-FABP-Gens in Mäusen einen signifikanten Anstieg des zellulären Fettsäureniveaus im Fettgewebe nach sich zieht, begleitet von einer Abnahme der Lipolyse. Darüber hinaus waren Doppel-*knock-out* Mäuse sowohl für A-FABP als auch für Apolipoprotein E vor der Bildung arteriosklerotischer Plaques geschützt und die Akkumulation von Cholesterinestern in den Makrophagen dieser Mäuse war reduziert. Diese Beobachtungen deuten auf eine wichtige Rolle der A-FABP-Expression im Lipidmetabolismus nicht nur in Adipozyten sondern auch in Makrophagen hin [199]. Die Induktion des A-FABP-Gens in THP-1-Makrophagen wurde ebenfalls von Fu *et al.* [200] nach der Behandlung muriner Primärmakrophagen mit oxidiertem *low-density-lipoprotein* (oxLDL), einem PPAR γ -Aktivator, gezeigt. Die Stimulation Makrophagen-ähnlicher Zellen mit oxLDL *in vitro* bewirkte darüber hinaus eine Aktivierung des *Nuclear Faktor*- κ B- sowie des Proteinkinase C (PKC)-Signalwegs [201, 202]. Durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit oxLDL und einem PKC Inhibitor bzw. einem Inhibitor des NF- κ B-Signalwegs wurde jedoch ebenfalls die A-FABP-Expression inhibiert. Neben der Aktivierung des PPAR γ ist demnach auch die Aktivierung sowohl des NF- κ B- als auch des PKC-Signalwegs für die oxLDL-vermittelte Induktion der A-FABP Genexpression notwendig.

Da in unserer Arbeitsgruppe die CLAs in Bindungsstudien und in Transaktivierungsassays ebenfalls als Agonisten des PPAR γ identifiziert wurden und ihr Transaktivierungspotential über den PPAR γ -Signalweg bestätigt werden konnte [37], liegt die Vermutung nah, dass die CLA-vermittelte Induktion des A-FABP-Gens auch in humanen THP-1-Makrophagen über den PPAR γ -Signalweg reguliert wird. Inwieweit die anderen beschriebenen Signalwege ebenfalls in die Wirkung der CLAs und Pristansäure involviert sind, müsste durch die Inkubation der THP-1-Makrophagen mit den Agonisten sowie den entsprechenden Inhibitoren geklärt werden. Interessant ist auch die Frage, ob die Behandlung der Zellen mit

einem PPAR γ -Aktivator wie CLA oder oxLDL nach dem gezielten Ausschalten des PPAR γ noch immer eine Aktivierung der PCK und NF- κ B-Signalwegs und damit eine PPAR γ -unabhängige Induktion des A-FABP auslösen könnte. Die beiden alternativen Signalwege könnten ebenfalls eine Bedeutung für die Pristansäure-vermittelte differentielle Genregulation haben, worauf in Kap. 10.3.5 noch genauer eingegangen wird.

10.3.4 Die Rolle des CD36/FAT in Makrophagen

CD36/FAT ist ein integrales Membran-Glykoprotein, das in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird. Dies geht mit einer großen Flexibilität der Funktionen und Ligandenspezifität einher. In Abhängigkeit des zellulären Kontextes, wirkt CD36/FAT als Mediator der Fettsäureaufnahme (Fettsäure Translokase-Funktion), als Zelladhäsionsmolekül oder als Scavenger Rezeptor. In Makrophagen wirkt CD36/FAT zum einen als Scavenger Rezeptor und ist verantwortlich für die Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen. Darüber hinaus ist es der Hauptrezeptor für die Aufnahme von oxLDL, anionischen Phospholipiden und Lipiden. Die gesteigerte Expression dieses Scavenger Rezeptors führt zu einer erhöhten Aufnahme von Lipiden, besonders oxLDL in die Makrophagen, die keiner Rückkopplungs-Kontrolle unterliegt, wie sie im Fall der LDL-Aufnahme über den LDL-Rezeptor-Signalweg beobachtet wird. Die Makrophagen akkumulieren auf diese Weise oxLDL und differenzieren so in den Arterienwänden zu Schaumzellen, die zur Entstehung und Fortschreiten der Arteriosklerose und damit zusammenhängenden (kardio-)vaskulären Krankheiten wie Herzinfarkt oder Schlaganfall beitragen [203] und [204].

Die in dieser Arbeit beobachtete Induktion des CD36/FAT-Gens nach Behandlung der THP-1-Makrophagen mit CLA bestätigt aktuelle Experimente von Weldon *et al.* [188] im gleichen Zellsystem. Bereits früher konnten Tontonoz *et al.* in Northern-Blot-Analysen und mittels Durchfluss-Zytometrie eine Induktion dieses Gens in Makrophagen nach Applikation des PPAR γ -Agonisten Troglitazone sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachweisen [179]. Daraufhin wurde im 5'-Bereich des CD36/FAT-Gens u.a. ein PPRE als *cis*-regulatorisches Element identifiziert. Daher liegt die Vermutung nah, dass die Expression des CD36/FAT durch die PPARs, in den Makrophagen durch PPAR γ , auf Transkriptionsebene reguliert wird. Damit konsistent ist die gleichzeitige Expression der Kernrezeptoren und des Transporters in denselben Zelltypen. So konnte sowohl durch die Inkubation von Kardiomyozyten mit einem PPAR α -spezifischen Liganden als auch durch die Behandlung von Präadipozyten mit dem PPAR γ -spezifischen Liganden Glitazon die Expression des CD36/FAT-Gens heraufreguliert werden [179, 205]

10.3.5 Die Rolle der verzweigt-kettigen Fettsäuren in THP-1-Makrophagen

Im Gegensatz zu den CLAs ist über die Wirkung der verzweigt-kettigen Phytan- und Pristansäure in Makrophagen bisher nichts bekannt. Die Induktion der Transporter A-FABP und CD36/FAT sowie des Enzyms PBE durch verzweigt-kettige Fettsäuren konnte in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden. Die Regulation des A-FABP und CD36/FAT in Makrophagen erfolgt über PPAR γ [102, 179, 206]. Die Vermutung liegt nahe, dass die Pristansäure über die Interaktion mit A-FABP und PPAR γ den Lipidmetabolismus in diesem Zellsystem reguliert, ähnlich wie dies in unserer Arbeitsgruppe bereits in muriner Leber über den L-FABP/PPAR α -Weg gezeigt werden konnte [21]. Andererseits konnten Zomer *et al.* in Reporterassays keine Transaktivierung des PPAR γ durch diese Fettsäuren nachweisen [43]. Sie identifizierten PPAR α als Rezeptor. Bestätigt wurde dies durch weitere Reporterassays in unserer Arbeitsgruppe. Allerdings zeigte die Ligandbindungsdomäne des PPAR γ in Bindungsstudien eine vergleichsweise hohe Affinität sowohl zur Phytan- als auch zur Pristansäure [159]. Einerseits könnte in den THP-1-Makrophagen daher die beobachtete Regulation der Zielgene nicht wie bisher beschrieben durch PPAR γ , sondern ebenso durch PPAR α vermittelt werden. Auf der anderen Seite könnte dies auch ein Hinweis sein, dass sich die Fettsäureliganden bzw. die nativen Proteine *in vivo* anders verhalten als *in vitro*, dieser Effekt bleibt jedoch zu klären. Zusätzlich zu den bekannten Signalwegen, in die die verzweigt-kettigen Fettsäuren involviert sind, können auch alternative Wege wie sie schon in Abschnitt 10.3.3 für die Wirkung der CLAs beschrieben wurden für die Phytan- bzw. Pristansäure-vermittelte differentielle Genregulation in Frage kommen, denn erst kürzlich wurde von Gloerich *et al.* [207] wieder eine PPAR α -unabhängige Veränderung des Fettsäuremetabolismus in PPAR α -defizienten Mäusen nach einer Phytol-angereicherten Diät beobachtet.

10.3.6 Identifizierung neuer Markergene mit Hilfe der Hochdichte-DNA-Chips

Mit Hilfe der Hochdichte-DNA-Chips konnten sieben Gene nach der Behandlung der THP-1-Makrophagen mit Pristansäure als über 2-fach heraufreguliert identifiziert werden. Die höchste Induktion zeigte hier der *platelet derived growthfactor receptor α precursor* (PDGFRA, 21,9-fach). Ebenso wurde mit den DNA-Chips die Induktion der beiden Fettsäuretransporter A-FABP (14,2-fach) und CD36/FAT (4,7-fach) nachgewiesen, die schon bei den Untersuchungen durch q-RT-PCR beobachtet wurden. Hodgkinson und Ye [208] konnten ebenso eine Zunahme der CD36/FAT mRNA in einer Makrophagen-Zelllinie (RAW264.3-Zellen) nach Applikation der spezifischen PPAR γ -Liganden Rosiglitazon, Ciglitazon und WY14643 mit Hilfe der DNA-Chip-Technik nachweisen, die in diesem Fall durch *Northern-Blot* Analysen bestätigt wurden. Eine Induktion des CD36/FAT-Gens (2,4-

fach) wurde auch in muriner Leber nach einer mit Fischöl angereicherten Diät von Berger *et al.* [209] gefunden, die in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wahrscheinlich auf die Wirkung der im Fischöl enthaltenen verzweigt-kettigen Fettsäuren wie der Phytan- und Pristansäure über den PPAR-Signalweg zurückzuführen ist. Rajeevan *et al.* beobachteten, dass solche Gene, die anhand der DNA-Chip-Experimenten als zwei- bis vierfach reguliert gefunden wurden, ohne die Validierung durch die q-RT-PCR nicht eindeutig als differentiell reguliert angesehen werden können. Lediglich in 71 % der Fälle wurden die gefundenen Gene als reguliert verifiziert. Mutch *et al.* sowie Berger *et al.* [209, 210] konnten eine Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden in 86 % der untersuchten Gene feststellen. Da der in dieser Arbeit als reguliert identifizierte *platelet derived growth factor receptor α precursor* über 20-fach heraufreguliert wurde, kann dieses Ergebnis auch ohne Kontrolle durch q-RT-PCR als richtig angesehen werden.

Wachstumsfaktoren, z.B. von Blutplättchen sezerniert, sind Liganden für den *platelet derived growth factor receptor* und vermitteln das Anbinden der Monozyten und Makrophagen an die glatten Muskelzellen der Gefäßwände [211, 212]. Interessanterweise wurde während der Ko-Kultur der monozytischen THP-1-Zellen mit humanen vaskulären Muskelzellen und dem *platelet derived growth factor B* eine Induktion der CD36/FAT mRNA in den THP-1-Zellen beobachtet [211]. *In vivo* würde dies bedeuten, dass die Monozyten, nachdem sie durch die Wachstumsfaktoren aktiviert wurden, an die Gefäßwände anbinden und durch die Induktion des Scavenger Rezeptors CD36/FAT vermehrt Lipide aufnehmen und sich über das Makrophagenstadium zu Schaumzellen entwickeln. Schaumzellen wiederum sind an der Entwicklung der Arteriosklerose beteiligt. Die Induktion des PDGFRA-Gens durch die Pristansäure deutet auf eine Wachstumsfaktor-ähnliche Wirkung hin und somit auf eine mögliche Rolle der Pristansäure in der Arteriosklerose-Entstehung. Dies würde die schon in Abschnitt 10.3.2 diskutierten Aspekte der Ernährungsgewohnheiten in westlichen Gesellschaften bestätigen. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Effekte der verzweigt-kettigen Fettsäuren auf die differentielle Genregulation und ihrem möglichen Einsatz als Nahrungsergänzungsmittel hinsichtlich ihrer Wirkung als PPAR-Agonisten, vergleichbar zu den konjugierten Linolsäuren, sollten daher folgen.

10.4 Identifizierung nutritiver Markergene für die Wirkung der 11*trans*-Vaccensäure in humanen Monozyten

Wie schon in Kap. 3.2.1 diskutiert, gibt es Hinweise, dass die tVA im menschlichen Organismus durch die Δ^9 -Stearoyl-CoA Desaturase zum 9*cis*,11*trans* Isomer der konjugierten Linolsäure konvertiert wird und diese dann über den PPAR-Signalweg die Expression der PPRE-tragenden Zielgene reguliert [178, 186].

Die Analyse des Blutserums der weiblichen und männlichen Testgruppe zeigte, dass in den meisten Probanden die 9-CLA-Konzentration während der Interventionszeit anstieg. Dies wurde auf die Konversion der tVA zu 9-CLA zurückgeführt. Dabei wurde auch festgestellt, dass diese Konversion nicht in allen Fällen gleich effektiv ablief, sondern sowohl *high*- als auch *low-responder* unter den Probanden waren, die eine hohe bzw. niedrige Konversionsrate aufwiesen (Kuhnt und Jahreis, unveröffentlichte Daten). Über diese Unterschiede im Metabolismus der einzelnen Testpersonen kann in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden, da die Einzelproben für die Analyse zu Sammelproben zusammengefasst wurden. Die Mehrheit der 21 untersuchten Gene wurde weniger als zweifach reguliert, daher sollen hier nur diejenigen Zielgene diskutiert werden, die eine deutliche Regulation aufwiesen.

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit ein unerwarteter geschlechtsbezogener Unterschied in der Antwort auf die Aufnahme des Placeboöls festgestellt werden. Die mRNA-Niveaus von neun der 21 Zielgene waren in der weiblichen Kontrollgruppe nach der Intervention mit dem Placeboöl deutlich erhöht. Eine oder mehrere Komponenten des Placeboöls (Hauptbestandteile: 50 % Ölsäure, 13 % Palmitinsäure, 12 % Linolsäure) übten offensichtlich eine regulatorische Wirkung auf die Zielgene aus. Diese regulatorische Wirkung stimmt mit unseren Ergebnissen sowohl in HepG2-Zellen als auch in den THP-1-Makrophagen hinsichtlich der Wirkung sowohl der Ölsäure als auch der Linolsäure überein. Die Eignung des für die klinische Studie ausgewählten Placeboöls als geeignete Kontrolle ist daher eher fraglich.

Ferner konnten im Rahmen der Studie nutritive Markergene in weiblichen bzw. männlichen Monozyten identifiziert werden, deren Induktion ein Hinweis für die SCD-vermittelte Konversion der tVA zu 9-CLA darstellt. Darüber hinaus spiegelten die erhaltenen Ergebnisse wiederum einen auffallenden geschlechtsspezifischen Unterschied in der Antwort der Genexpression hinsichtlich der Aufnahme der tVA wider.

Innerhalb der weiblichen Testgruppe wurden die Fettsäuretranslokase, COX2 sowie BCL2 als die am meisten von der erhöhten CLA-Konzentration im Blutserum beeinflussten Gene identifiziert. Da frühere Studien, wie schon diskutiert, die Aktivierung des PPAR γ durch 9-CLA zeigen konnten und ebenso die Induktion des CD36/FAT über den PPAR γ -Signalweg [20, 208], korrespondieren die Ergebnisse der weiblichen Monozyten mit der Hypothese der CLA-vermittelten Genregulation über den PPAR-Signalweg. Darüber hinaus konnten Glinghammar *et al.* [157] kürzlich eine Heraufregulation der COX2 mRNA sowie des Proteins in der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 und in der monocytischen THP-1-Zelllinie nach der Behandlung der Zellen mit dem selektiven PPAR β Agonisten GW501516 zeigen. Als Resultat daraus wurde die Proliferation dieser Zellen erhöht. Dies deutet darauf hin, dass 9-CLA darüber hinaus einen Aktivator des PPAR β darstellt, was in unserer Arbeitsgruppe durch Transaktivierungassays bestätigt werden konnte [37]. Dazu im Widerspruch steht der Bericht von Yu *et al.* [213], nachdem in Reporterassays in einer murinen Makrophagenzelllinie (RAW) die COX2-Aktivität durch die Applikation der CLA über den PPAR γ -Signalweg herabreguliert wurde. Dies lässt auf eine entzündungshemmende Aktivität der CLAs schließen, da die induzierbare Cyclooxygenase in die Synthese von Arachidonsäure-abgeleiteten Entzündungsmediatoren involviert ist. Einen Überblick über die entzündungshemmenden Eigenschaften der CLAs gibt Gelman [214]. Im Fall der weiblichen Monozyten scheint die Aktivierung des PPAR β den Effekt des PPAR γ auf COX2 zu übertreffen. Deshalb sind weitere Studien notwendig, um diese Ergebnisse *in vivo* zu verifizieren.

Im Gegensatz dazu zeigten GLUT4 und PPAR γ die höchste Induktion in den Monozyten der männlichen Testgruppe. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Berichten über die Induktion dieser Zielgene in Mausleber und Fett- sowie Aortengewebe der Ratte entweder direkt durch die CLAs oder, im Fall des GLUT4, synthetische oder endogene PPAR γ -Aktivatoren [36, 215, 216]. Daher werden diese Gene als nutritive Markergene in männlichen Monozyten angesehen.

Die Identifizierung unterschiedlicher Markergene innerhalb der weiblichen und männlichen Testgruppe reflektieren den Unterschied des Fettsäurestoffwechsel zwischen Frauen und Männern, wie auch schon von Blaak und Williams beschrieben wurde [217, 218]. Unterstützt wird dies durch die unterschiedlichen Konversionsraten der tVA zu CLA in den weiblichen und männlichen Probanden (Kuhnt und Jahreis, unveröffentlichte Daten).

11 Literatur

1. Eisen, M.B., Brown, P.O. (1999) DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods. Enzymol.* **303**: 179-205.
2. Stoughton, R.B. (2004) Applications of DNA microarrays in biology. *Annu. Rev. Biochem.* **74**: 53-82.
3. Shih le, M., Wang, T.L. (2005) Apply innovative technologies to explore cancer genome. *Curr. Opin. Oncol.* **17**: 33-8.
4. Peter, C. (2003) Evaneszent-Feld-DNA-Biosensor zur schnellen, zeitaufgelösten Detektion multipler Hybridisierungsereignisse – Einsatz zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln und für die Identifizierung von Mikroorganismen. *Dissertation.* Universität Münster.
5. Podsadlowski, V. (2004) Neue Fluorophore für die Bioanalytik – Verwendung in der Tierartendifferenzierung mittels DNA-Biosensor und DNA-Chiptechnologie. *Dissertation.* Universität Münster.
6. Stryer, L. (1996) *Biochemie.* Spektrum Lehrbuch. Heidelberg-Berlin-Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
7. Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998) *Bioanalytik.* Spektrum Lehrbuch. Heidelberg - Berlin-Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
8. Schildkraut, C. (1965) Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration. *Biopolymers* **3**: 195-208.
9. Anderson, M.L.M., Young, B.D. (1985) *Nucleic acid hybridization: a practical approach.* Ed. Hames B.D., Higgins, S.J.. Oxford: IRL Press.
10. McConaughy, B.L., Laird, C.D., McCarthy, B.J. (1969) Nucleic acid reassociation in formamide. *Biochemistry* **8**: 3289-95.
11. Healey, B.G., Matson, R.S., Walt, D.R. (1997) Fiberoptic DNA sensor array capable of detecting point mutations. *Anal. Biochem.* **251**: 270-9.
12. Dong, S., Wang, E., Hsie, L., Cao, Y., Chen, X., Gingeras, T.R. (2001) Flexible use of high-density oligonucleotide arrays for single-nucleotide polymorphism discovery and validation. *Genome. Res.* **11**: 1418-24.
13. Clarke, P.A., te Poele, R., Workman, P. (2004) Gene expression microarray technologies in the development of new therapeutic agents. *Eur. J. Cancer* **40**: 2560-91.
14. Hegde, P., Qi, R., Abernathy, K., Gay, C., Dharap, S., Gaspard, R., Hughes, J.E., Snesrud, E., Lee, N., Quackenbush, J. (2000) A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques* **29**: 548-54.
15. Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J. *et al.* (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* **30**: e15.
16. Korkola, J.E., Estep, A.L., Pejavar, S., DeVries, S., Jensen, R., Waldman, F.M. (2003) Optimizing stringency for expression microarrays. *Biotechniques* **35**: 828-35.
17. Freeman, W.M., Robertson, D.J., Vrana, K.E. (2000) Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques* **29**: 1042-55.
18. Desvergne, B., Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* **20**: 649-88.
19. Tan, N.S., Shaw, N.S., Vinckenbosch, N., Liu, P., Yasmin, R., Desvergne, B. *et al.* (2002) Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 5114-27.
20. Belury, M.A. (2002) Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu. Rev. Nutr.* **22**: 505-31.
21. Wolfrum, C., Spener, F. (2001) Chlorophyll-derived fatty acids regulate expression of lipid metabolizing enzymes in liver - a nutritional opportunity. *OCL* **8**: 39-44.
22. Pegorier, J.P., Le May, C., Girard, J. (2004) Control of gene expression by fatty acids. *J. Nutr.* **134**: 2444S-2449S.

23. Turpeinen, A.M., Mutanen, M., Aro, A., Salminen, I., Basu, S., Palmquist, D.L. *et al.* (2002) Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**: 504-10.
24. Griinari, J.M., Corl, B.A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V., Bauman, D.E. (2000) Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase. *J. Nutr.* **130**: 2285-91.
25. Pariza, M.W., Ashoor, S.H., Chu, F.S. (1979) Mutagens in heat-processed meat, bakery and cereal products. *Food Cosmet. Toxicol.* **17**: 429-30.
26. Pariza, M.W., Hargraves, W.A. (1985) A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* **6**: 591-3.
27. Sugano, M., Tsujita, A., Yamasaki, M., Noguchi, M., Yamada, K. (1998) Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids* **33**: 521-7.
28. O'Shea, M., Bassaganya-Riera, J., Mohede, I.C. (2004) Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**: 1199S-1206S.
29. Lee, K.N., Kritchevsky, D., Pariza, M.W. (1994) Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* **108**: 19-25.
30. Wang, Y., Jones, P.J. (2004) Dietary conjugated linoleic acid and body composition. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**: 1153S-1158S.
31. Ostrowska, E., Cross, R.F., Muralitharan, M., Bauman, D.E., Dunshea, F.R. (2002) Effects of dietary fat and conjugated linoleic acid on plasma metabolite concentrations and metabolic responses to homeostatic signals in pigs. *Br. J. Nutr.* **88**: 625-34.
32. Whigham, L.D., Cook, M.E., Atkinson, R.L. (2000) Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharmacol. Res.* **42**: 503-10.
33. Terpstra, A.H. (2004) Effect of conjugated linoleic acid on body composition and plasma lipids in humans: an overview of the literature. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**: 352-61.
34. Kelley D.S., Erickson, K.L. (2003) Modulation of Body Composition and Immune Cell Functions by Conjugated Linoleic Acid in Humans and Animal Models: Benefits vs. Risks. *Lipids* **38**: 377-386.
35. Moya-Camarena, S.Y., van den Heuvel, J.P., Belury, M.A. (1999) Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor α and β subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferation in Sprague-Dawley rats. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**: 331-42.
36. Belury, M.A., Moya-Camarena, S.Y., Lu, M., Shi, L., Leesnitzer, L.M., Blanchard, S.G. (2002) Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR). *Nutr. Res.* **22**: 817-824.
37. Benjamin, S., Hanhoff, T., Borchers, T., Spener, F. (2004) A molecular test system for the screening of human PPAR transactivation by conjugated linoleic acid isomers and their precursor fatty acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, in Druck
38. Schoonjans, K., Staels, B., Auwerx, J. (1996) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J. Lipid Res.* **37**: 907-25.
39. Hanhoff, T. (2004) Role of branched-chain fatty acids on gene regulation of lipid metabolism via fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator activated receptors. *Dissertation*. Universität Münster.
40. Kaneda, T. (1991) Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* **55**: 288-302.
41. Suutari, M., Laakso, S. (1994) Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**: 285-328.
42. Jacob, J. (1977) Uropygial gland lipids. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **34**: 373-438.
43. Zomer, A.W., van Der Burg, B., Jansen, G.A., Wanders, R.J., Poll-The, B.T., van der Saag, P.T. (2000) Pristanic acid and phytanic acid: naturally occurring ligands for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α . *J. Lipid Res.* **41**: 1801-7.

44. Peters, H., Wieske, T. (1966) Detection of traces of polybranched fatty acids. *Fette Seifen Anstrichm.* **68**: 947-950.
45. Jansen, G.A., Mihalik, S.J., Watkins, P.A., Moser, H.W., Jakobs, C., Denis, S. *et al.* (1996) Phytanoyl-CoA hydroxylase is present in human liver, located in peroxisomes, and deficient in Zellweger syndrome: direct, unequivocal evidence for the new, revised pathway of phytanic acid α -oxidation in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**: 205-10.
46. Croes, K., Casteels, M., De Hoffmann, E., Mannaerts, G.P., van Veldhoven, P.P. (1996) α -Oxidation of 3-methyl-substituted fatty acids in rat liver. Production of formic acid instead of CO₂, cofactor requirements, subcellular localization and formation of a 2-hydroxy-3-methylacyl-CoA intermediate. *Eur. J. Biochem.* **240**: 674-83.
47. Pahan, K., Singh, I. (1995) Phytanic acid oxidation: topographical localization of phytanoyl-CoA ligase and transport of phytanic acid into human peroxisomes. *J. Lipid Res.* **36**: 986-97.
48. Mihalik, S.J., Morrell, J.C., Kim, D., Sacksteder, K.A., Watkins, P.A., Gould, S.J. (1997) Identification of PAHX, a Refsum disease gene. *Nat. Genet.* **17**: 185-9.
49. Goldfischer, S., Collins, J., Rapin, I., Neumann, P., Neglia, W., Spiro, A.J. *et al.* (1986) Pseudo-Zellweger syndrome: deficiencies in several peroxisomal oxidative activities. *J. Pediatr.* **108**: 25-32.
50. Schram, A.W., Goldfischer, S., van Roermund, C.W., Brouwer-Kelder, E.M., Collins, J., Hashimoto, T. *et al.* (1987) Human peroxisomal 3-oxoacyl-coenzyme A thiolase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2494-6.
51. Ellinghaus, P., Wolfrum, C., Assmann, G., Spener, F., Seedorf, U. (1999) Phytanic acid activates the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in sterol carrier protein 2- / sterol carrier protein x-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **274**: 2766-72.
52. Wolfrum, C., Ellinghaus, P., Fobker, M., Seedorf, U., Assmann, G., Borchers, T. *et al.* (1999) Phytanic acid is ligand and transcriptional activator of murine liver fatty acid binding protein. *J. Lipid. Res.* **40**: 708-14.
53. Hanhoff, T., Wolfrum, C., Ellinghaus, P., Seedorf, U., Spener, F. (2001) Pristanic acid is activator of peroxisome proliferator activated receptor α . *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* **103**: 75-80.
54. Wahle, K.W., Rotondo, D., Heys, S.D. (2003) Polyunsaturated fatty acids and gene expression in mammalian systems. *Proc. Nutr. Soc.* **62**: 349-60.
55. Issemann, I., Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**: 645-50.
56. Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., Spiegelman, B.M. (1994) mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* **8**: 1224-34.
57. Fajas, L., Fruchart, J.C., Auwerx, J. (1998) PPAR γ 3 mRNA: a distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* **438**: 55-60.
58. Sundvold, H., Lien, S. (2001) Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ promoter in man and transactivation by the nuclear receptor ROR α 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**: 383-90.
59. Gottlicher, M., Widmark, E., Li, Q., Gustafsson, J.A. (1992) Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4653-7.
60. Wolfrum, C., Spener, F. (2000) Fatty Acids as regulators of lipid metabolism. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **102**: 746-762.
61. Braissant, O., Wahli, W. (1998) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α , - β , and - γ during rat embryonic development. *Endocrinology* **139**: 2748-54.
62. Kliewer, S.A., Forman, B.M., Blumberg, B., Ong, E.S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D.J. *et al.* (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7355-9.

63. Michalik L., Desvergne, B., Wahli W. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors β/δ : emerging roles for a previously neglected third family member. *Current opinion in Lipidology* **14**: 129-135.
64. Basu-Modak, S., Braissant, O., Escher, P., Desvergne, B., Honegger, P., Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor β regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures. *J. Biol. Chem.* **274**: 35881-8.
65. Michalik, L., Desvergne, B., Tan, N.S., Basu-Modak, S., Escher, P., Rieusset, J. *et al.* (2001) Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and PPAR β mutant mice. *J. Cell. Biol.* **154**: 799-814.
66. Lee, C.H., Olson, P., Evans, R.M. (2003) Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* **144**: 2201-7.
67. Michalik, L., Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 564-70.
68. Hihi, A.K., Michalik, L., Wahli, W. (2002) PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 790-8.
69. Adida, A. (2004) Adipocyte-type fatty acid-binding protein as shuttle for peroxisome proliferator activated receptor γ agonists. *Dissertation*. Universität Münster.
70. Mangelsdorf, D.J., Evans, R.M. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**: 841-50.
71. Lemberger, T., Desvergne, B., Wahli, W. (1996) Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **12**: 335-63.
72. Schoonjans, K., Staels, B., Auwerx, J. (1996) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* **1302**: 93-109.
73. Tontonoz, P., Graves, R.A., Budavari, A.I., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Hu, E. *et al.* (1994) Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR γ and RXR α . *Nucleic Acids Res.* **22**: 5628-34.
74. Helledie, T., Grontved, L., Jensen, S.S., Kiilerich, P., Rietveld, L., Albrektsen, T. *et al.* (2002) The gene encoding the Acyl-CoA-binding protein is activated by peroxisome proliferator-activated receptor γ through an intronic response element functionally conserved between humans and rodents. *J. Biol. Chem.* **277**: 26821-30.
75. Juge-Aubry, C., Pernin, A., Favez, T., Burger, A.G., Wahli, W., Meier, C.A. *et al.* (1997) DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J. Biol. Chem.* **272**: 25252-9.
76. Palmer, C.N., Hsu, M.H., Griffin, H.J., Johnson, E.F. (1995) Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *J. Biol. Chem.* **270**: 16114-21.
77. Glatz, J.F., Borchers, T., Spener, F., van der Vusse, G.J. (1995) Fatty acids in cell signalling: modulation by lipid binding proteins. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **52**: 121-7.
78. Lücke, C., Gutiérrez-González, J.H., Hamilton, J.A. (2003) Intracellular lipid binding proteins: evolution, structure and ligand binding. In *Cellular Proteins and their Fatty Acids in Health and Disease*. Ed. Duttaroy, A.K., Spener, F.. Weinheim: Wiley-VCH. pp 95-118.
79. Glatz, J.F., van der Vusse, G.J. (1996) Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog. Lipid. Res.* **35**: 243-82
80. Wolfrum, C., Buhlmann, C., Rolf, B., Borchers, T., Spener, F. (1999) Variation of liver-type fatty acid binding protein content in the human hepatoma cell line HepG2 by peroxisome proliferators and antisense RNA affects the rate of fatty acid uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **1437**: 194-201.
81. Wolfrum, C., Borrmann, C.M., Borchers, T., Spener, F. (2001) Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors α - and γ -mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 2323-8.

82. Van Furth, R., Willemze, R. (1979) Phagocytic cells during an acute inflammatory reaction. *Curr. Top. Pathol.* **68**: 179-212.
83. Van Furth, R. (1982) Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiology* **161**: 178-85.
84. Van Furth, R. (1992) Mononuclear Phagocytes. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers Dordrecht.
85. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Korting, M. (2001) Lipidstoffwechselstörungen. In *Arzneimittelwirkung. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Ed. Mutschler, E.. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
86. Schwartz, C.J., Valente, A.J., Sprague, E.A., Kelley, J.L., Nerem, R.M. (1991) The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin. Cardiol.* **14**: 11-16.
87. Lewis, C.E., McGee, J.O. (1992) The macrophage. New York: Oxford University Press.
88. Ross, R. (1995) Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 791-804.
89. Ross, R. (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**: 115-26.
90. Alitalo, K., Hovi, T., Vaheri, A. (1980) Fibronectin is produced by human macrophages. *J. Exp. Med.* **151**: 602-13.
91. Hirota, S., Imakita, M., Kohri, K., Ito, A., Morii, E., Adachi, S. *et al.* (1993) Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification. *Am. J. Pathol.* **143**: 1003-8.
92. Weitkamp, B., Cullen, P., Plenz, G., Robenek, H., Rauterberg, J. (1999) Human macrophages synthesize type VIII collagen *in vitro* and in the atherosclerotic plaque. *Faseb J.* **13**: 1445-57.
93. Schnoor, M., Voss, P., Cullen, P., Boking, T., Galla, H.J., Galinski, E.A. *et al.* (2004) Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**: 867-72.
94. Schaffner, T., Taylor, K., Bartucci, E.J., Fischer-Dzoga, K., Beeson, J.H., Glagov, S. *et al.* (1980) Arterial foam cells with distinctive immunomorphologic and histochemical features of macrophages. *Am. J. Pathol.* **100**: 57-80.
95. Aqel, N.M., Ball, R.Y., Waldmann, H., Mitchinson, M.J. (1984) Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **53**: 265-71.
96. Aqel, N.M., Ball, R.Y., Waldmann, H., Mitchinson, M.J. (1985) Identification of macrophages and smooth muscle cells in human atherosclerosis using monoclonal antibodies. *J. Pathol.* **146**: 197-204.
97. Brown, M.S., Kovanen, P.T., Goldstein, J.L. (1981) Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* **212**: 628-35.
98. Ross, R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**: 801-9.
99. Krieger, M., Herz, J. (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 601-37.
100. Makowski, L., Boord, J.B., Maeda, K., Babaev, V.R., Uysal, K.T., Morgan, M.A. *et al.* (2001) Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat. Med.* **7**: 699-705.
101. Layne, M.D., Patel, A., Chen, Y.H., Rebel, V.I., Carvajal, I.M., Pellacani, A. *et al.* (2001) Role of macrophage-expressed adipocyte fatty acid binding protein in the development of accelerated atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Faseb J.* **15**: 2733-5.
102. Pelton, P.D., Zhou, L., Demarest, K.T., Burris, T.P. (1999) PPAR γ activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**: 456-8.
103. Schachtrup, C., Scholzen, T.E., Grau, V., Luger, T.A., Sorg, C., Spener, F. *et al.* (2004) L-FABP is exclusively expressed in alveolar macrophages within the myeloid lineage: evidence for a PPAR α -independent expression. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **36**: 2042-53.

104. Li, C., Wang, Y., Gao, L., Zhang, J., Shao, J., Wang, S. *et al.* (2002) Expression of toll-like receptors 2 and 4 and CD14 during differentiation of HL-60 cells induced by phorbol 12-myristate 13-acetate and $1\alpha, 25$ -dihydroxy-vitamin D(3). *Cell Growth Differ.* **13**: 27-38.
105. Azuma, Y., Ohura, K. (2002) Endomorphins 1 and 2 inhibit IL-10 and IL-12 production and innate immune functions, and potentiate NF- κ B DNA binding in THP-1 differentiated to macrophage-like cells. *Scand. J. Immunol.* **56**: 260-9.
106. Bleck, B. (2001) Funktionelle Analyse von Fettsäurebindungsproteinen in Zellkulturmodellen. *Dissertation*. Universität Münster.
107. Lekanke Deprez, R.H., Fijnvandraat, A.C., Ruijter, J.M., Moorman, A.F. (2002) Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal. Biochem.* **307**: 63-9.
108. Cras, J.J., Rowe-Taitt, C.A., Nivens, D.A., Ligler, F.S. (1999) Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization. *Biosens. Bioelectron.* **14**: 683 - 688.
109. Beier, M., Hoheisel, J.D. (1999) Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. *Nucleic Acids Res.* **27**: 1970-7.
110. Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-50.
111. Rump, R. (1995) Differenzierungsunabhängige Expression- und Promotoranalyse des Herztyp-Fettsäurebindungsproteins im Muskel-Zellkulturmodell. *Dissertation*. Universität Münster.
112. De Almeida, M.C., Silva, A.C., Barral, A., Barral Netto, M. (2000) A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **95**: 221-3.
113. Bianchi, N., Rutigliano, C., Tomassetti, M., Feriotto, G., Zorzato, F., Gambari, R. (1997) Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of HIV-1 genomic sequences amplified by polymerase chain reaction. *Clin. Diagn. Virol.* **8**: 199-208.
114. Nilsson, P., Larsson, A., Lundeberg, J., Uhlen, M., Nygren, P.A. (1999) Mutational scanning of PCR products by subtractive oligonucleotide hybridization analysis. *Biotechniques* **26**: 308-16.
115. Kai, E., Sawata, S., Ikebukuro, K., Iida, T., Honda, T., Karube, I. (1999) Detection of PCR products in solution using surface plasmon resonance. *Anal. Chem.* **71**: 796-800.
116. Feriotto, G., Borgatti, M., Mischiati, C., Bianchi, N., Gambari, R. (2002) Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of genetically modified Roundup Ready soybean gene sequences. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 955-62.
117. Berger, J., Moller, D.E. (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* **53**: 409-35.
118. Zhang W., Needham, D.L., Coffin M., Rooker A., Hurban P., Tanzer M.M. *et al.* (2003) Microarray analysis of the metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae* to organic solvent dimethyl sulfoxide. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 57-69.
119. Taneda, S., Hudkins, K.L., Topouzis, S., Gilbertson, D.G., Ophascharoensuk, V., Truong, L. *et al.* (2003) Obstructive uropathy in mice and humans: potential role for PDGF-D in the progression of tubulointerstitial injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**: 2544-2555.
120. Betsholtz, C. (2004) Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**: 215-28.
121. Kane, M.D., Jatkoe, T.A., Stumpf, C.R., Lu, J., Thomas, J.D., Madore, S.J. (2000) Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res.* **28**: 4552-7.
122. Cummings, C.A., Brinig, M.M., Lepp, P.W., van de Pas, S., Relman, D.A. (2004) *Bordetella* species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation. *J. Bacteriol.* **186**: 1484-92.

123. Volokhov, D., Chizhikov, V., Chumakov, K., Rasooly, A. (2003) Microarray-based identification of thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 4071-80.
124. Shi, S.J., Scheffer, A., Bjeldanes, E., Reynolds, M.A., Arnold, L.J. (2001) DNA exhibits multi-stranded binding recognition on glass microarrays. *Nucleic Acids Res.* **29**: 4251-6.
125. Yue, H., Eastman, P.S., Wang, B.B., Minor, J., Doctolero, M.H., Nuttall, R.L. *et al.* (2001) An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res.* **29**: E41-1.
126. Nielsen, H.B., Wernersson, R., Knudsen, S. (2003) Design of oligonucleotides for microarrays and perspectives for design of multi-transcriptome arrays. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3491-6.
127. Talla, E., Tekaiia, F., Brino, L., Dujon, B. (2003) A novel design of whole-genome microarray probes for *Saccharomyces cerevisiae* which minimizes cross-hybridization. *BMC Genomics* **4**: 38.
128. Ratushna, V.G., Weller, J.W., Gibas, C.J. (2005) Secondary structure in the target as a confounding factor in synthetic oligomer microarray design. *BMC Genomics* **6**: 31.
129. Rouillard, J.M., Zuker, M., Gulari, E. (2003) OligoArray 2.0: design of oligonucleotide probes for DNA microarrays using a thermodynamic approach. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3057-62.
130. Chou, H.H., Hsia, A.P., Mooney, D.L., Schnable, P.S. (2004) Picky: oligo microarray design for large genomes. *Bioinformatics* **20**: 2893-902.
131. Preuß, D., Paul, H., Schröder, S. (2002) The sensitivity of MWG Arrays. *Application note*.
132. Rajeevan, M.S., Ranamukhaarachchi, D.G., Vernon, S.D., Unger, E.R. (2001) Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* **25**: 443-51.
133. Alexandre, I., Hamels, S., Dufour, S., Collet, J., Zammatteo, N., De Longueville, F. *et al.* (2001) Colorimetric silver detection of DNA microarrays. *Anal. Biochem.* **295**: 1-8.
134. Budach, W., Abel, A.P., Bruno, A.E., Neuschäfer, D. (1999) Planar waveguides as highperformance sensing platforms for fluorescence-based multiplexed oligonucleotide hybridization assays. *Anal. Chem.* **71**: 3347-3355.
135. Kleinjung, F., Bier, F.F., Warsinke, A., Scheller, F.W. (1997) Fiber-optic genosensor for specific determination of femtomolar DNA oligomers. *Anal. Chim. Acta* **350**: 51-58.
136. Schult, C. (2000) Entwicklung von fluoreszenzoptischen Evaneszent-Feld-Biosensoren zur Immun- und Nukleinsäure-Analytik in Realzeit. *Dissertation*. Universität Münster.
137. Cho, J.C., Tiedje, J.M. (2002) Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1425-30.
138. Meneses-Lorente, G., de Longueville, F., Dos Santos-Mendes, S., Bonnert, T.P., Jack, A., Evrard, S. *et al.* (2003) An evaluation of a low-density DNA microarray using cytochrome P450 inducers. *Chem. Res. Toxicol.* **16**: 1070-7.
139. Bodrossy, L., Stralis-Pavese, N., Murrell, J.C., Radajewski, S., Weilharter, A., Sessitsch, A. (2003) Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs. *Environ. Microbiol.* **5**: 566-82.
140. Holloway, A.J., van Laar, R.K., Tothill, R.W., Bowtell, D.D. (2002) Options available--from start to finish--for obtaining data from DNA microarrays II. *Nat. Genet.* **32 Suppl**: 481-9.
141. Yeung, K.Y., Medvedovic, M., Bumgarner, R.E. (2004) From co-expression to co-regulation: how many microarray experiments do we need? *Genome Biol* **5**: R48.
142. Mariani, T.J., Budhraj, V., Mecham, B.H., Gu, C.C., Watson, M.A., Sadovsky, Y. (2003) A variable fold change threshold determines significance for expression microarrays. *Faseb J.* **17**: 321-3.
143. Genicon Science Corporation San Diego (2003) Two-Color differential gene expression profiling on microarrays using ultra-sensitive resonance light scattering (RLS) particles. *Application note*.

144. Peterson, A.W., Heaton, R.J., Georgiadis, R.M. (2001) The effect of surface probe density on DNA hybridization. *Nucleic Acids Res.* **29**: 5163-8.
145. Shchepinov, M.S., Case-Green, S.C., Southern, E.M. (1997) Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res.* **25**: 1155-61.
146. Peplies, J., Glockner, F.O., Amann, R. (2003) Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1397-407.
147. Preuß, D., Gördes, M., Seidl, G., Siebert, J., Bergmann, M., Huber, A. (2002) The development of a hybridization buffer for large-volume hybridizations. *MWG Application Note*.
148. Du, J.J., Dou, K.F., Peng, S.Y., Qian, B.Z., Xiao, H.S., Liu, F. *et al.* (2003) Expression of NGF family and their receptors in gastric carcinoma: a cDNA microarray study. *World J. Gastroenterol.* **9**: 1431-4.
149. Simard, C., Lemieux, R., Cote, S. (2001) Urea substitutes toxic formamide as destabilizing agent in nucleic acid hybridizations with RNA probes. *Electrophoresis* **22**: 2679-83.
150. Rees, W.A., Yager, T.D., Korte, J., von Hippel, P.H. (1993) Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry* **32**: 137-44.
151. Ku, W.C., Lau, W.K., Tseng, Y.T., Tzeng, C.M., Chiu, S.K. (2004) Dextran sulfate provides a quantitative and quick microarray hybridization reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**: 30-7.
152. Rajeevan, M.S., Vernon, S.D., Taysavang, N., Unger, E.R. (2001) Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J. Mol. Diagn.* **3**: 26-31.
153. Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E., Wagner, M. (2001) Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3122-6.
154. Bustin, S.A. (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**: 23-39.
155. Lee, J.K., Bussey, K.J., Gwadry, F.G., Reinhold, W., Riddick, G., Pelletier, S.L. *et al.* (2003) Comparing cDNA and oligonucleotide array data: concordance of gene expression across platforms for the NCI-60 cancer cells. *Genome Biol.* **4**: R82.
156. Jump, D.B., Clarke, S.D. (1999) Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu. Rev. Nutr.* **19**: 63-90.
157. Glinghammar, B., Skogsberg, J., Hamsten, A., Ehrenborg, E. (2003) PPAR δ activation induces COX-2 gene expression and cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**: 361-8.
158. Dressel, U., Allen, T.L., Pippal, J.B., Rohde, P.R., Lau, P., Muscat, G.E. (2003) The peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol. Endocrinol.* **17**: 2477-93.
159. Hanhoff, T., Benjamin, S., Spener, F. Highly branched-chain fatty acids from avian uropygial glands show differential activation on peroxisome proliferator activated receptors. *in preparation*.
160. Petridou, A., Mougios, V., Sagredos, A. (2003) Supplementation with CLA: isomer incorporation into serum lipids and effect on body fat of women. *Lipids* **38**: 805-11.
161. Sharma, C., Pradeep, A., Pestell, R.G., Rana, B. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor γ activation modulates Cyclin D1 transcription via β -Catenin-independent and cAMP-response element-binding protein-dependent pathways in mouse hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **279**: 16927-16938.
162. Palmer, C.N., Hsu, M.H., Griffin, K.J., Raucy, J.L., Johnson, E.F. (1998) Peroxisome proliferator activated receptor- α expression in human liver. *Mol. Pharmacol.* **53**: 14-22.

163. Wolfrum, C., Borchers, T., Sacchettini, J.C., Spener, F. (2000) Binding of fatty acids and peroxisome proliferators to orthologous fatty acid binding proteins from human, murine, and bovine liver. *Biochemistry* **39**: 14363.
164. Storch, J., McDermott, L. (2003) *Fatty acid binding proteins and fatty acid transport*, in *Cellular proteins and their fatty acids in health and disease*. Ed. Duttaroy, A.K., Spener, F.. Weinheim: Wiley-VCH. pp 119-133.
165. Kersten, S., Desvergne, B., Wahli, W. (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature* **405**: 421-4.
166. Seedorf, U., Assmann, G. (2001) The role of PPAR α in obesity. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **11**: 189-94.
167. Frederiksen, K.S., Wulff, E.M., Sauerberg, P., Mogensen, J.P., Jeppesen, L., Fleckner, J. (2004) Prediction of PPAR- α ligand-mediated physiological changes using gene expression profiles. *J. Lipid Res.* **45**: 592-601.
168. Belury, M., Moya-Camarena, S.Y., Liu, K.-L., Vanden Heuvel, J. P. (1997) Dietary conjugated linoleic acid induces peroxisome-specific enzyme accumulation and ornithine decarboxylase activity in mouse liver. *Nutritional Biochemistry* **8**: 579-584.
169. Moya-Camarena, S.Y., Vanden Heuvel, J.P., Blanchard, S.G., Leesnitzer, L.A., Belury, M.A. (1999) Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . *J. Lipid Res.* **40**: 1426-33.
170. Meadus, W.J. (2003) A semi-quantitative RT-PCR method to measure the in vivo effect of dietary conjugated linoleic acid on porcine muscle PPAR gene expression. *Biol. Proced. Online* **5**: 20-28.
171. Clement, L., Poirier, H., Niot, I., Bocher, V., Guerre-Millo, M., Krief, S. *et al.* (2002) Dietary *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J. Lipid Res.* **43**: 1400-9.
172. Ide, T. (2005) Interaction of fish oil and conjugated linoleic acid in affecting hepatic activity of lipogenic enzymes and gene expression in liver and adipose tissue. *Diabetes* **54**: 412-423.
173. Nagao, K., Wang, Y.M., Inoue, N., Han, S.Y., Buang, Y., Noda, T. *et al.* (2003) The 10*trans*, 12*cis* isomer of conjugated linoleic acid promotes energy metabolism in OLETF rats. *Nutrition* **19**: 652-6.
174. Park, Y., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W., Pariza, M.W. (1999) Evidence that the *trans*-10,*cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* **34**: 235-41.
175. Riserus, U., Vessby, B., Arner, P., Zethelius, B. (2004) Supplementation with *trans*10*cis*12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: close association with impaired insulin sensitivity. *Diabetologia* **47**: 1016-9.
176. Kohno, H., Suzuki, R., Yasui, Y., Hosokawa, M., Miyashita, K., Tanaka, T. (2004) Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Sci.* **95**: 481-6.
177. Kohno, H., Yasui, Y., Suzuki, R., Hosokawa, M., Miyashita, K., Tanaka, T. (2004) Dietary seed oil rich in conjugated linolenic acid from bitter melon inhibits azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis through elevation of colonic PPAR γ expression and alteration of lipid composition. *Int. J. Cancer* **110**: 896-901.
178. Corl, B.A., Barbano, D.M., Bauman, D.E., Ip, C. (2003) *cis*-9, *trans*-11 CLA derived endogenously from *trans*-11 18:1 reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.* **133**: 2893-900.
179. Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A., Evans, R.M. (1998) PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **93**: 241-52.
180. Klappacher, G.W., Glass, C.K. (2002) Roles of peroxisome proliferator-activated receptor γ in lipid homeostasis and inflammatory responses of macrophages. *Curr. Opin. Lipidol.* **13**: 305-12.
181. Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Torra, I.P., Delerive, P., Majd, Z. *et al.* (1998) Activation of Proliferator-activated Receptors α and γ Induces Apoptosis of Human Monocyte-derived Macrophages. *J. Biol. Chem.* **273**: 25573-25580.

182. Cabrero, A., Cubero, M., Llaverias, G., Jove, M., Planavila, A., Alegret, M. *et al.* (2003) Differential effects of peroxisome proliferator-activated receptor activators on the mRNA levels of genes involved in lipid metabolism in primary human monocyte-derived macrophages. *Metabolism* **52**: 652-7.
183. Laskin, D.L., Weinberger, B., Laskin, J.D. (2001) Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **70**: 163-70.
184. Gordon, S., Keshav, S., Chung, L.P. (1988) Mononuclear phagocytes: tissue distribution and functional heterogeneity. *Curr. Opin. Immunol.* **1**: 26-35.
185. Linton, M.F., Fazio, S. (2003) Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **27 Suppl 3**: S35-40.
186. Santora, J.E., Palmquist, D.L., Roehrig, K.L. (2000) *Trans*-vaccenic acid is desaturated to conjugated linoleic acid in mice. *J. Nutr.* **130**: 208-15.
187. Dobrzyn, A., Ntambi, J.M. (2004) The role of stearoyl-CoA desaturase in body weight regulation. *Trends Cardiovasc. Med.* **14**: 77-81.
188. Weldon, S., Mitchell, S., Kelleher, D., Gibney, M.J., Roche, H.M. (2004) Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: no effect on molecular markers of cholesterol homeostasis in THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* **174**: 261-73.
189. Wolfrum, C. (2000) The role of liver-type fatty acid binding protein in gene regulation. *Dissertation*. Universität Münster.
190. Reddy, J.K., Goel, S.K., Nemali, M.R., Carrino, J.J., Laffler, T.G., Reddy, M.K. *et al.* (1986) Transcription regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 1747-51.
191. Takeda, T., Ichikawa, K., Miyamoto, T., Kobayashi, M., Nishii, Y., Suzuki, S. *et al.* (1992) Regulation of rat hepatic peroxisomal enoyl-CoA hydratase-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional enzyme by thyroid hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**: 211-6.
192. Lin, X., Loor, J.J., Herbein, J.H. (2004) *Trans*10,*cis*12-18:2 is a more potent inhibitor of de novo fatty acid synthesis and desaturation than *cis*9,*trans*11-18:2 in the mammary gland of lactating mice. *J. Nutr.* **134**: 1362-8.
193. Lee, K.N., Pariza, M.W., Ntambi, J.M. (1998) Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**: 817-21.
194. Choi, Y., Park, Y., Storkson, J.M., Pariza, M.W., Ntambi, J.M. (2002) Inhibition of stearoyl-CoA desaturase activity by the *cis*-9,*trans*-11 isomer and the *trans*-10,*cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**: 785-90.
195. Choi, Y., Park, Y., Pariza, M.W., Ntambi, J.M. (2001) Regulation of stearoyl-CoA desaturase activity by the *trans*-10,*cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**: 689-93.
196. Andersson, T., Borang, S., Larsson, M., Wirta, V., Wennborg, A., Lundeberg, J. *et al.* (2001) Novel candidate genes for atherosclerosis are identified by representational difference analysis-based transcript profiling of cholesterol-loaded macrophages. *Pathobiology* **69**: 304-14.
197. Boord, J.B., Maeda, K., Makowski, L., Babaev, V.R., Fazio, S., Linton, M.F. *et al.* (2002) Adipocyte fatty acid-binding protein, aP2, alters late atherosclerotic lesion formation in severe hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**: 1686-91.
198. Pelsers, M.M., Hanhoff, T., van der Voort, D., Arts, B., Peters, M., Ponds, R. *et al.* (2004) Brain- and heart-type fatty acid-binding proteins in the brain: tissue distribution and clinical utility. *Clin. Chem.* **50**: 1568-75.
199. Fu, Y., Luo, N., Lopes-Virella, M.F., Garvey, W.T. (2002) The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* **165**: 259-69.

200. Fu, Y., Luo, N., Lopes-Virella, M.F. (2000) Oxidized LDL induces the expression of ALBP/aP2 mRNA and protein in human THP-1 macrophages. *J. Lipid Res.* **41**: 2017-23.
201. Claus, R., Fyrynys, B., Deigner, H.P., Wolf, G. (1996) Oxidized low-density lipoprotein stimulates protein kinase C (PKC) and induces expression of PKC-isotypes via prostaglandin-H-synthase in P388D1 macrophage-like cells. *Biochemistry* **35**: 4911-22.
202. Brand, K., Eisele, T., Kreusel, U., Page, M., Page, S., Haas, M. *et al.* (1997) Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 1901-9.
203. Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H., Evans, R.M. (1998) Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell* **93**: 229-40.
204. Coburn, C., Abumrad, N.A. (2003) Structure-function of CD36 and evidence for its role in facilitating membrane fatty acid transport. In *Cellular proteins and their fatty acids in health and disease*. Ed. Duttaroy, A.K., Spener, F.. Wiley-VCH: Weinheim. pp 3-27.
205. Greenwalt, D.E., Scheck, S.H., Rhinehart-Jones, T. (1995) Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet. *J. Clin. Invest.* **96**: 1382-8.
206. Jostarndt, K., Rubic, T., Kuhn, H., Anthosen, M.W., Andera, L., Gellert, N. *et al.* (2004) Enzymatically modified low-density lipoprotein upregulates CD36 in low-differentiated monocytic cells in a peroxisome proliferator-activated receptor- γ -dependent way. *Biochem. Pharmacol.* **67**: 841-54.
207. Gloerich, J., van Vlies, N., Jansen, G.A., Denis, S., Ruiten, J.P., van Werkhoven, M.A. *et al.* (2005) A phytol-enriched diet induces changes in fatty acid metabolism in mice both via PPAR α -dependent and independent pathways. *J. Lipid Res.* **46**: 716-26.
208. Hodgkinson, C.P., Ye, S. (2003) Microarray analysis of peroxisome proliferator-activated receptor- γ induced changes in gene expression in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**: 505-10.
209. Berger, A., Mutch, D.M., Bruce German, J., Roberts, M.A. (2002) Dietary effects of arachidonate-rich fungal oil and fish oil on murine hepatic and hippocampal gene expression. *Lipids Health Dis.* **1**: 2.
210. Mutch, D.M., Berger, A., Mansourian, R., Rytz, A., Roberts, M.A. (2002) The limit fold change model: a practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data. *BMC Bioinformatics* **3**: 17.
211. Cai, Q., Lanting, L., Natarajan, R. (2004) Growth factors induce monocyte binding to vascular smooth muscle cells: implications for monocyte retention in atherosclerosis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **287**: C707-14.
212. Uutela, M., Wirzenius, M., Paavonen, K., Rajantie, I., He, Y., Karpanen, T. *et al.* (2004) PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood* **104**: 3198-204.
213. Yu, Y., Correll, P.H., Vanden Heuvel, J.P. (2002) Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR γ -dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1581**: 89-99.
214. Gelman, L., Fruchart, J.C., Auwerx, J. (1999) An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 932-43.
215. Houseknecht, K.L., Vanden Heuvel, J.P., Moya-Camarena, S.Y., Portocarrero, C.P., Peck, L.W., Nickel, K.P. *et al.* (1998) Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**: 678-82.
216. Atkins, K.B., Northcott, C.A., Watts, S.W., Brosius, F.C. (2004) Effect of PPAR γ ligands on vascular smooth muscle marker expression in hypertensive and normal arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**: H235-43.

-
217. Blaak, E. (2001) Gender differences in fat metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **4**: 499-502.
218. Williams, C.M. (2004) Lipid metabolism in women. *Proc. Nutr. Soc.* **63**: 153-60.

12 Anhang

12.1 Zielgene

Im Folgenden werden die zu den in dieser Arbeit vorkommenden Sonden korrespondierenden Zielgene hinsichtlich ihrer Funktion, soweit in der Literatur bekannt, kurz beschrieben. Alle Angaben wurden, soweit vorhanden, der Datenbank OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sowie aus [6] entnommen.

Acetyl-CoA Acyltransferase 1 (peroxisomal 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase, ACAA1)

Acetyl-CoA Acyltransferase 1 ist ein peroxisomales Enzym der β -Oxidation. Defekte dieses Enzyms führen zum Pseudo-Zellweger Syndrom.

β -Actin

β -ACT ist eine von sechs identifizierten Actin-Isoformen. Es gehört neben γ -Actin zu den zwei nichtmuskulären Actinen des Cytoskeletts. Actine sind hochkonservierte Proteine, die eine wichtige Rolle bei der Zellmotilität und -struktur spielen. Auch β -Actin wird konstitutiv exprimiert und wird als Housekeeping-Gen zur Normierung herangezogen.

Acyl-CoA Oxidase (ACOX1, ACOX2)

ACOX1 ist das erste Enzyme der peroxisomalen β -Oxidation. Es katalysiert die Desaturierung der Acyl-CoA zu 2-*trans*-enoyl-CoAs. Dabei werden Elektronen direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch H_2O_2 entsteht. Defekte dieses Gens resultieren in Pseudoneonataler Adrenoleukodistrophie, einer Krankheit, die durch die Akkumulation langkettiger Fettsäuren gekennzeichnet ist. ACOX2 (verzweigt-kettige Acyl-CoA-Oxidase) ist am peroxisomalen Abbau langer, verzweigt-kettiger Fettsäuren und Intermediaten der Gallensäuren beteiligt. Defekte dieses Gens führen zur Akkumulation dieser Substanzen, die das zum Zellweger Syndrom mit schwewiegenden geistigen Schäden und früher Sterblichkeit auslösen.

Butryphilin-ähnliches Protein 3 (BTNL3)

Butrophilin wird vom Epithel der Milchdrüsen abgegeben und ist eins der häufigsten Immunglobulin-ähnlichen Proteine, die in der Membran der Milchfett-Tropfen zu finden sind. BTNL3 mRNA konnte mittels der q-RT-PCR in Dünndarm, Dickdarm, Testis und Leukozyten nachgewiesen werden, eine Detektion mit Northern Blots war nicht möglich.

Caspase 9, Apoptosis-related Cystein Protease (CASP9)

Die Caspase 9 ist ein Mitglied der Cystein-Asparaginsäure-Proteasefamilie und ihre Aktivierung spielt eine zentrale Rolle in der Zell-Apoptose. Die Caspase liegt als inaktives Proenzym vor, das durch Proteolyse in eine kleine und eine große Untereinheit gespalten werden, die zum aktiven Enzym dimerisieren.

CD14 Antigen (CD14)

CD14 ist ein Oberflächenprotein, das überwiegend in Monozyten/Makrophagen exprimiert wird und LPS (lipopolysaccharide binding protein), Peptidoglykan sowie apoptotische Zellen bindet. Dies führt zu einer Zellaktivierung und zu Entzündungsreaktionen.

Complement component 3a receptor 1 (C3AR1)

C3AR1-Transkripte finden sich hauptsächlich in der Lunge, Milz, Ovarien, Placenta, Dünndarm, Gehirn sowie Herz und peripheren Leukozyten. Der zugehörige Rezeptor bindet das Anaphylatoxin C3a, das während der Aktivierung des Komplementsystems (einer anaphylaktischen Reaktion) freigesetzt wird und ein wirksamer Mediator von Entzündungsreaktionen ist. C3a beeinflusst zelluläre Degranulation, Kontraktion glatter Muskelzellen, Arachidonsäuremetabolismus, Cytokin-Ausschüttung sowie zelluläre Chemotaxis.

c-SRC Tyrosinkinase (CSK)

Diese cytoplasmatische Tyrosinkinase reprimiert die Tyrosinkinaseaktivität der C-SRC Oncoproteine durch Phosphorylierung des C-SRC Carboxyterminus. Da die Zelltransformation durch SRC-Oncogene durch zahlreiche Mechanismen herbeigeführt wird, die mit dieser Phosphorylierung interferieren, könnte die CSK als Antioncogen fungieren. Das CSK-Gen wird in humanen Geweben ubiquitär exprimiert.

Cytochrom P450, Subfamilie IV A, Polypeptid 11 (CYP4A11)

Cyp4A11 oder ω -Hydroxylase gehört zur Enzym-Superfamilie der Cytochrome P450, die als Monooxygenasen viele Reaktionen im Stoffwechsel der Medikamente und in der Cholesterin- sowie Steroid- und Fettsäuresynthese katalysieren. CYP4A11 ist am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und hydroxyliert Fettsäuren mittlerer Kettenlänge wie Laurat (C₁₂) und Myristat (C₁₄).

Dynactin p62 Untereinheit (DP62)

Dynactin ist ein großer makromolekularer Komplex, der für die Dynein-vermittelte intrazelluläre Bewegung der Organelle entlang der Mikrotubuli benötigt wird. Dieser 10⁶ Da große Komplex besteht aus 10 einzelnen Polypeptidketten unterschiedlicher Größe, wobei

p62 eine 62 Da große Untereinheit darstellt. Die größte Untereinheit des Dynactinkomplexes p150 bindet direkt an die Mikrotubuli und cytoplasmatisches Dynein. Diese Interaktion stellt wahrscheinlich die Schlüsselfunktion des axonalen Transports von Vesikeln und Organellen dar. Nullmutationen in *Drosophila* sind letal.

Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR)

Der EGF-Rezeptor ist eine Tyrosin-Protein-Kinase und ist identisch mit dem spezifischen Zelloberflächen-Antigen SA7. EGFR spielt eine essentielle Rolle in der Entwicklung der Haut und wird mit der Entstehung epithelialer Tumore in Verbindung gebracht.

Ewing sarcoma breakpoint region 1 (EWSR1)

Das EWSR1-Gen kodiert für ein vermeintliches RNA-Bindungsprotein mit unbekannter Funktion. Mutationen dieses Gens können in einem Ewing-Sarkom, neuroektodermalen oder anderen Tumoren resultieren.

Fettsäurebindungsproteine (FABPs)

Fettsäurebindungsproteine sind eine Familie kleiner, hoch konservierter, cytoplasmatischer Proteine, die langkettige Fettsäuren und andere hydrophobe Liganden binden. Ihnen werden Funktionen innerhalb der Aufnahme von Fettsäuren, deren Transport und Metabolismus zugeschrieben. Sie wurden nach dem Ort der ersten Isolierung benannt:

Leber-Typ- (L-), Intestinales- (I-), Adipozyten-Typ- (A-), Epidermales- (E-) und Herz-Typ- (H-) FABP. Primer und Sonden für diese FABPs kamen in dieser Arbeit zur Anwendung.

Fettsäuresynthase (FAS)

Die Fettsäure-Synthase ist ein Multienzymkomplex, der die Synthese langkettiger gesättigter Fettsäuren aus Acetyl-CoA, Malonyl-CoA und NADPH im Cytosol von Säugerzellen katalysiert. Die FAS der Säuger ist ein Dimer aus identischen 260-kD-Untereinheiten, jede Kette ist in drei Domänen gefaltet, die die insgesamt sieben verschiedenen katalytischen Zentren und ein Trägerprotein beeinhalteten.

Fettsäuretranslokase (FAT) oder CD36 Antigen (CD36)

CD36/FAT ist das vierthäufigste Glykoprotein der Thrombocytenoberfläche und dient als Rezeptor für Thrombospondin in Blutplättchen und verschiedenen Zelllinien, was auf eine wichtige Funktion als Zelladhäsionsmolekül hindeutet. Es bindet außerdem an Kollagen, anionische Phospholipide, oxidiertes LDL (*low density lipoprotein*) und langkettige Fettsäuren. Es konnte gezeigt werden, dass CD36/FAT als Fettsäure Translokase am Import der Fettsäuren in die Zelle involviert ist und regulierend auf diesen wirkt.

Fibrillin 1 (FBN1)

FBN1 stellt eine bedeutende Komponente der extrazellulären Mikrofibrillen dar. Eine Mutation dieses Proteins führt zum Marfan Syndrom.

Furin, membranassoziertes Rezeptorprotein (PACE)

Furin gehört zur Familie der Subtilisin-ähnlichen Protein-Konvertasen, die als Proprotein-Konvertasen latente Vorläuferproteine in ihre aktive Form konvertieren. PACE ist eine Serin-Endoprotease, deren Substrate beispielsweise das Parathyroid-Hormon, Proalbumin oder die Pro- β -Secretase sind.

Glukokinase (GCK)

Die Glukokinase oder auch Hexokinase 4 ist an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und katalysiert den ersten Schritt der Glykolyse, die Phosphorylierung der Glukose zu Glukose-6-phosphat. Durch alternatives Spleißen entstehen drei Isoformen, von denen eine in den pankreatischen β -Inselzellen, und zwei in der Leber vorkommen. Mutationen in diesem Gen wurden mit Insulin-unabhängigem Typ 2-Diabetes in Verbindung gebracht.

Glutathion Reduktase (GSR)

Die Glutathion Reduktase reduziert oxidiertes Glutathion und ist das zentrale Enzym des Thiol-Disulfid-Metabolismus. Ihre physiologisches Aufgabe besteht darin, eine hohe intrazelluläre Konzentration von reduziertem Glutathion bei niedriger Konzentration an oxidiertem Glutathion aufrecht zu erhalten.

Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH)

Die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase katalysiert die reversible oxidative Phosphorylierung des Glycerinaldehyd-3-phosphats in Anwesenheit von anorganischem Phosphat und NAD^+ . Dies ist ein wichtiger energieliefernder Schritt im Kohlenhydratstoffwechsel. Da GAPDH konstitutiv exprimiert wird, kann es als sog. Housekeeping-Gen zur Normierung herangezogen werden.

***Hyaluronan-mediated motility receptor isoform α* (HMMR)**

Der Rezeptor für die Hyaluronan-vermittelten Motilität ist in Migration, Transformation und Streuung von Metastasen in murinen Fibroblasten involviert. Im Menschen wird er als ein intrazelluläres Protein bei Brustkrebs exprimiert.

Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase/3-Ketoacyl-CoA Thiolase/Enoyl-CoA Hydratase, β -Untereinheit oder mitochondriales trifunktionelles Protein, β - Untereinheit (HADHB)

HADHB oder das mitochondriale trifunktionelle Protein katalysiert den zweiten bis vierten Schritt der mitochondrialen β -Oxidation.

Peroxisomen Proliferator aktivierte Rezeptoren (PPARs)

PPARs gehören zur Superfamilie der Steroidhormon-Rezeptoren, die im Zellkern lokalisiert sind. Sie werden durch sog. natürliche oder synthetische Peroxisomen Proliferatoren aktiviert und beeinflussen so die Expression von Zielgenen, die in Zellproliferation und -differenzierung sowie in die Lipidhomöostase, Immun- und Entzündungsreaktionen involviert sind. Drei Isoformen (α , β und γ), sowie verschiedenen Spleiss-Varianten wurden identifiziert, die sich durch den Ort ihrer Expression sowie durch ihre Ligandspezifität unterscheiden.

Platelet-derived growth factor receptor α precursor (PDGFR α precursor)

PDGFR α *precursor* ist der Vorläufer eines Tyrosin-Kinase Rezeptors an der Zelloberfläche, dessen Liganden zu der Familie der *Platelet derived growth factors* zählen. Diese Wachstumsfaktoren sind Mitogene der Zellen mesenchymalen Ursprungs. Abhängig von den Liganden, ist der Rezeptor entweder ein Homo- oder ein Heterodimer bestehend aus einem α - und β -Polypeptid. Studien anhand von *knock-out* Mäusen weisen auf eine wichtige Rolle des PDGFR α in der Entwicklung der Niere hin.

Proteinkinase C α (PKC α)

PKC α gehört zu einer Familie der Serin- und Threonin-spezifischen Proteinkinasen, die durch Calcium und dem Second-messenger Diacylglycerol aktiviert werden. Mitglieder dieser Familie phosphorylieren eine große Anzahl von Proteinen und sind in diverse Signaltransduktionswege involviert. PKC α spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen wie Zelladhäsion, -transformation, -zyklus oder Volumenkontrolle.

Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2 (PTGS2) oder Cyclooxygenase (COX2)

PTGS2 oder COX2 ist das Schlüsselenzym der Prostaglandinbiosynthese und wirkt einerseits als Dioxigenase und andererseits als Peroxidase und ist involviert in Entzündungsreaktionen und Mitogenese. Es handelt sich hierbei um die induzierbare Form der Cyclooxygenase im Gegensatz zum konstitutiv exprimierten PTGS1 bzw. COX1.

Protein disulfide isomerase related protein (ERP70)

Protein im Lumen des ER mit Elektronentransport-, Isomerase und Protein Disulfid-Isomerase-Aktivität.

Relaxin 1 (RLN1)

Relaxine sind als endo- sowie als auto- und parakrine Hormone der Insulingen-Superfamilie bekannt. RLN1 wird in den Ovarien produziert und ist in die Reifung der Zervix involviert. Darüber hinaus ist es an der Kontrolle des Blutdrucks und der Herzfrequenz sowie der Ausschüttung von Oxitocin und Vasopression beteiligt.

Retinsäure-X-Rezeptoren (RXRs)

Retinsäure-X-Rezeptoren sind Kernrezeptoren der Superfamilie der Steroid- und Thyroidhormon-Rezeptoren, ihre Liganden sind Retinoide. Nach ihrer Aktivierung durch die Liganden bilden sie einerseits Homodimere oder andererseits Heterodimere mit den PPARs und wirken so als Transkriptionsfaktoren der Zielgene der Glukose- und Lipidhomöostase. Es wurden drei Isoformen (α , β , und γ) identifiziert.

Replikationsfaktor C (RFC2)

RFC2 kodiert für die 40 kDa Untereinheit des Replikationsfaktors C, der für die Elongation der DNA durch die DNA-Polymerase δ und ϵ notwendig ist. Diese Untereinheit ist verantwortlich für die Bindung des ATP.

Ribosomales Protein L10 (RPL10)

RPL10 gehört zur L10E-Familie der Ribosomalen Proteine, ist im Cytoplasma lokalisiert und ist Bestandteil der 60S-Untereinheit der Ribosomen.

Ribosomales Protein S27a (RPS27A)

Dieses Gen kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus Ubiquitin am N-Terminus und dem ribosomalen Protein S27a am C-Terminus. Das Fusionsprotein wird nach der Translation in ein freies Ubiquitin und das Ribosomale Protein S27a gespalten. Letzteres ist ein Bestandteil der 40S Untereinheit der Ribosomen und gehört zur Familie S27AE der ribosomalen Proteine und ist im Cytoplasma lokalisiert.

Ribosomales Protein 6 (RPL6)

RPL6 gehört zur L6E-Familie der Ribosomalen Proteine, ist im Cytoplasma lokalisiert und ist Bestandteil der 60S-Untereinheit der Ribosomen.

Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 2 (SART2)

SART2 ist ein tumorunterdrückendes Antigen, das Epitope gegen Tumore besitzt, wodurch es cytotoxische tumorspezifische T-Lymphozyten in Krebspatienten aktivieren kann und für spezifische Immuntherapie eingesetzt werden kann.

Stromal cell-derived factor 2-like (SDF2L1)

SDF2L1 ist ein am endoplasmatischen Retikulum lokalisiertes Stressprotein, dessen Expression z.B. durch Hitze oder Applikation des Tunicamycins (Glykolyseinhibitor) oder Cycloheximids (Proteinsyntheseinhibitor) induziert wird.

Suppressor des Cytokin-Signalwegs 2 oder Stat induzierter stat Inhibitor 2 (STAT2)

STAT Inhibitoren supprimieren den Cytokinsignalweg und werden durch Cytokine selber aktiviert. STAT2 wird durch eine Reihe Cytokine aktiviert, u.a. durch Erythropoetin, IL10 oder Interferon γ . Das Protein interagiert mit dem Insulin-like-growth-factor-1-receptor und wird daher mit der Regulation des IGF1R-vermitteltem Signalweg in Verbindung gebracht.

 α -Tubulin

α -Tubulin bildet zusammen mit β -Tubulin die Heterodimere der Mikrotubuli des Zytoskeletts, die essentielle und vielfältige Funktionen erfüllen.

Uncoupling Protein (UCP2)

Dieses *Uncoupling Protein* wird auch als Thermogenin bezeichnet und ist in größerer Menge in der inneren Membran der Mitochondrien des braunen Fettgewebes zu finden. UCP2 bildet einen Nebenweg für den Protonenfluss vom Cytosol zur Mitochondrienmatrix und entkoppelt so die oxidative Phosphorylierung zur Erzeugung von Wärme. Dieser energiefreisetzende Seitenweg für die Protonen wird durch freie Fettsäuren aktiviert, die auf ein Hormonsignal hin aus Triacylglycerinen freigesetzt werden.

Zona pellucida Glykoprotein 2 (ZP2)

Die Zona pellucida ist eine extrazelluläre Matrix, die die Oozyte und den frühen Embryo umgibt und hauptsächlich aus drei bis vier Glykoproteinen verschiedener Funktionen besteht, die Funktionen während der Befruchtung und Entwicklung vor der Präimplantation ausüben. ZP2 ist eine Komponente der Zona pellucida und stellt einen sekundären Rezeptor dar, der Spermien erst nach der Spermien-Akrosom-Interaktion binden kann und so eine Polyspermie verhindert.

12.2 Reprimierte Gene, identifiziert mit Hilfe des Hochdichte-Chips

Im Folgenden wurden diejenigen Zielgene des in Kap. 8.3.4 beschriebenen Hochdichte-Chips mit einem Cy5/Cy3-Verhältnis kleiner als 0,5 aufgeführt.

Zielgen	Cy5/Cy3	SD
a kinase (prka) anchor protein 1; akap1	0,30	0,21
actin-like 7b; actl7b	0,33	0,12
α -aminoadipic semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase	0,48	0,01
antigen identified by monoclonal antibody ki-67; mki67	0,23	0,03
baculoviral iap repeat-containing protein 3; birc3	0,27	0,03
bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1b; baz1b	0,34	0,08
carbonic anhydrase i; ca1	0,35	0,12
cd83 antigen (activated b lymphocytes, immunoglobulin superfamily); cd83	0,33	0,08
cd84 antigen (leukocyte antigen); cd84	0,24	0,17
cdc45-like; cdc45l	0,19	0,10
cell division cycle 2 protein, isoform 1; cdc2	0,23	0,12
centromere protein c 1; cenpc1	0,23	0,19
checkpoint suppressor 1; ches1	0,17	0,08
corticosteroid binding globulin precursor; serpina6	0,18	0,05
cyclin-dependent kinase 2, isoform 2; cdk2	0,44	0,03
cyclin-dependent kinase-like 3; cdkl3	0,17	0,04
cytoskeleton associated protein 2; ckap2	0,33	0,08
dihydrofolate reductase; dhfr	0,28	0,09
e2f transcription factor 1; e2f1	0,39	0,01
e2f transcription factor 6; e2f6	0,41	0,10
epidermal growth factor receptor ; egfr	0,07	0,06
eukaryotic translation initiation factor 4 γ , 3; eif4g3	0,42	0,05
fibrillin 1; fbn1	0,05	0,01
fibroblast growth factor receptor 1, isoform 8 precursor; fgfr1	0,38	0,08
fructose-1,6-bisphosphatase 1; fbp1	0,26	0,20
ga-binding protein transcription factor, β subunit 1 (53kd), isoform β 2	0,41	0,05
hairy/enhancer-of-split related with yrpw motif 1; hey1	0,37	0,08
histamine n-methyltransferase; hnmt	0,40	0,07
homeo box a2; hoxa2	0,47	0,02
hskin17 protein; kin	0,35	0,10
hyaluronan-mediated motility receptor (rhamm) isoform a; hmmr	0,17	0,12

Zielgen	Cy5/Cy3	SD
kiaa0101 gene product; kiaa0101	0,12	0,09
kiaa0247 gene product; kiaa0247	0,29	0,10
kiaa0670 protein/acinus; kiaa0670	0,38	0,05
kiaa0721 protein; kiaa0721	0,27	0,06
kiaa0831 protein; kiaa0831	0,32	0,11
mad, mothers against decapentaplegic homolog 3 (drosophila); madh3	0,35	0,12
mad2-like 1; mad2l1	0,39	0,09
nucleoporin 153kd; nup153	0,31	0,17
phosphotriesterase related; pter	0,37	0,11
pituitary tumor-transforming protein 1; pttg1	0,34	0,08
proliferating cell nuclear antigen; pcna	0,15	0,10
rad51-interacting protein; pir51	0,25	0,01
ran binding protein 8; ranbp8	0,38	0,09
ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1; rasgrf1	0,30	0,07
rbp1-like protein, isoform 1; bcaa	0,38	0,03
receptor interacting protein 140; nrip1	0,39	0,13
replication factor c (activator 1) 3 (38kd); rfc3	0,29	0,17
retinoblastoma-binding protein 8; rbbp8	0,28	0,09
retinoblastoma-like 1 (p107); rbl1	0,35	0,12
ribonuclease, rnase a family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin); rnase2	0,21	0,06
ribonucleotide reductase m1 polypeptide; rrm1	0,31	0,07
rnb6	0,32	0,09
similar to matrin 3; kiaa0723 gene product (h. sapiens); loc126984	0,46	0,01
similar to mitotic spindle coiled-coil related protein (h. sapiens); loc124922	0,30	0,14
similar to potassium voltage-gated channel, shab-related subfamily, member 2	0,35	0,11
ski-like; skil	0,31	0,11
solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3; slc5a3	0,30	0,10
sp110 nuclear body protein, isoform c; sp110	0,26	0,15
sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan precursor; spock	0,34	0,12
src-like-adaptor; sla	0,20	0,03
thymidylate synthetase; tyms	0,30	0,12
thyroid stimulating hormone receptor; tshr	0,11	0,01
ubiquitin-like, containing phd and ring finger domains, 1; uhrf1	0,30	0,10
v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2; mybl2	0,19	0,05
zona pellucida glycoprotein 2 (sperm receptor); zp2	0,05	0,04

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. F. Spener für die Möglichkeit, eine interessante Fragestellung in seinem Arbeitskreis bearbeiten zu können.

Dr. Torsten Borchers danke ich für die ausgezeichnete Betreuung auch während und nach der ICB-Zeit, die stete Diskussionsbereitschaft und die vielen Anregungen, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich mich herzlich beim gesamten Arbeitskreis Cammann und allen Mitarbeitern des ICB für das selbst in schwierigen Zeiten noch gute Arbeitsklima bedanken. Für die geduldige Einführung in die Tücken des Dispensers und die Chipaktivierung danke ich Carolin Peter. Viola Podsadlowski danke ich für das schöne Zeit im Biotechnikum und die vielen hilfreichen Diskussionen, nicht nur die Arbeit betreffend. Außerdem möchte ich mich bei Eric Frauendorfer für die geduldige Hilfe bei der DNA-Chip Analyse und die vielen Kekse bedanken. Shiela Srivastav danke ich für die netten 4 Uhr Tees und das immer gute Arbeitsklima im Labor und darüber hinaus.

Ein besonderer Dank gilt dem gesamten Institut für Biochemie für die freundliche Aufnahme nach dem Umzug. Tanja Emmeler, Anne Adida, Maret Böhm, Holger Gundelach, Poonam Balani, Kristina Beck und Annette Plachetka danke ich besonders für das gute Arbeitsklima, die hilfreichen Diskussionen und geduldigen Antworten auf all meine Fragen.

Bedanken möchte ich mich auch beim Institut für funktionelle Genomik für die Möglichkeit den Array-Scanner und Spotter nutzen zu können, bei Dr. Stefan Lorkowski bedanke ich mich für die hilfreichen Diskussionen zur Real time PCR und THP-1-Zellkultur sowie die Möglichkeit den PCR-Cycler im Zentrallabor nutzen zu können. Bei Katrin Stolle und Michael Schnoor bedanke ich mich für die Tips und Tricks in der THP-1 Kultivierung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für die materielle und ideelle Unterstützung während der gesamten Studienzeit.

Bei meinem Freund Joe bedanke ich mich für den starken Rückhalt und die Aufmunterung zu Hause, ohne die ich nicht soweit gekommen wäre und für die immerwährende Gelassenheit, die sich manchmal auch auf mich übertragen hat.

