

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität

Marburg am 19.01.2006

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. Andrej Hasilik

Correferent: Prof. Dr. Roland Lill

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Biologische Aktivität von Kathepsin D	1
1.2	Struktur und Regulation des Kathepsin D-Gens	2
1.2.1	Stuktur der Promotorregion des Kathepsin D-Gens	7
1.3	Fragestellung	10
1.4	Medizinische Relevanz	10
2	Materialien und Methoden	12
2.1	Materialien	12
2.1.1	Geräte	12
2.1.2	Materialien für die Kultur eukaryoter Zellen	14
2.1.3	Materialien zur Anzucht von Bakterien	14
2.1.4	Chemikalien	15
2.1.5	Radiochemikalien	17
2.1.6	Enzyme	17
2.1.7	Standardlösungen	17
2.1.8	Medien für Bakterien	18
2.1.9	Medien für eukaryote Zellen	19
2.1.10	Bakterienstämme	19
2.1.11	Eukaryote Zelllinien	19
2.1.12	Vektoren	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	Kultur eukaryoter Zellen	20
2.2.2	Methoden zur Analyse von DNA und RNA	20
2.2.2.1	<i>Spaltung mit Restriktionsendonukleasen</i>	20
2.2.2.2	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	21
2.2.2.3	<i>Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. RNA</i>	22
2.2.3	Präparation von RNA	23
2.2.3.1	<i>Präparation von Gesamt-RNA aus U937-Zellen</i>	23

2.2.3.2	<i>Präparation von mRNA aus gesamt-RNA</i>	23
2.2.3.3	<i>Ethanol-fällung von RNA</i>	25
2.2.4	Präparation von DNA	25
2.2.4.1	<i>Herstellung kompetenter Zellen</i>	25
2.2.4.2	<i>Transformation</i>	26
2.2.4.3	<i>Plasmid-DNA-Mini-Präparation</i>	27
2.2.4.4	<i>Plasmid-DNA-Maxi-Präparation</i>	27
2.2.4.5	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	29
2.2.4.6	<i>Aufreinigen von DNA über Säulen</i>	29
2.2.4.7	<i>Ethanol-fällung von DNA</i>	30
2.2.5	Reverse Transkription	30
2.2.6	Umklonierung von DNA-Fragmenten	31
2.2.7	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.8	In-vitro-Mutagenese	33
2.2.9	Kompetitive PCR	33
2.2.10	Sequenzierung von einzelsträngiger DNA	36
2.2.11	Kathepsin-D-Assay	37

3 Ergebnisse **39**

3.1	Entwicklung eines Kompetitors mittels In-vitro-Mutagenese	39
3.2	Untersuchung der Verteilung der Transkriptionsstartpunkte	46
3.2.1	U937-Zellen ohne Calcitriol-Stimulierung	53
3.2.2	U937-Zellen mit Calcitriol-Stimulierung	57
3.2.3	Berechnung in Mol Transkript pro Zelle	62

4 Diskussion **64**

4.1	Herstellung des Kompetitors mittels In-vitro-Mutagenese	64
4.2	Vergleich der Transkriptionsstartpunktverteilung	64
4.3	Ausblick	66

5 Literatur **67**

Zusammenfassung	72
Lebenslauf	73
Verzeichnis der akademischen Lehrer	75
Danksagung	76
Ehrenwörtliche Erklärung	77

1 Einleitung

1.1 Biologische Aktivität von Kathepsin D

Kathepsin D ist ein Enzym aus der Familie der Aspartatproteinasen. Kathepsine sind in Lysosomen sowie allgemein intrazellulär weit verbreitete und auch im Magensaft nachgewiesene Proteasen („Endopeptidasen“, „Proteinasen“), die - neben Pepsin - an der Eiweißverdauung beteiligt sind (Proteolyse). Ihre pH-Optima liegen bei pH 5-7.

Kathepsin D, eine lösliche lysosomale Proteinase, besteht aus zwei Polypeptiden (Barrett, 1979). Es wird als höhermolekulares Präproenzym synthetisiert (Hasilik und Neufeld, 1980) und auf dem Weg vom Endoplasmatischen Retikulum ins Lysosom mehreren Schritten der Aktivierung und proteolytischen Reifung unterzogen (von Figura und Hasilik, 1986).

Neben der Beteiligung an der intralysosomalen Proteolyse ist Kathepsin D vermutlich auch an der extrazellulären Proteolyse sowie dem Antigen-Processing (van Noort und van der Drift, 1989; Tsukuba et al., 2000) beteiligt. Auch spielt es eine Rolle bei der Generation bioaktiver Proteine sowie bei der Apoptose; eine Beteiligung am alterungsbedingten Nervenzelluntergang wurde ebenfalls beschrieben. Es konnte auch gezeigt werden, daß Kathepsin-D-Moleküle von der menschlichen Prostata sezerniert werden (zur Übersicht: Tsukuba et al., 2000). Weiterhin übt es einen mitogenen Effekt in der Mausleber aus (Humphries und Ayad, 1983; Morioka und Terayama, 1984). Solche Vorgänge können unter anderem durch Änderung der Syntheserate von Kathepsin D moduliert werden. So ist beispielsweise die Kathepsin-D-Synthese in MCF7 - Zellen durch Östrogene reguliert (Cavaillès et al., 1989). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sowohl die Synthese von Kathepsin-D-Protein (Stein et al., 1987) als auch von Kathepsin-D-mRNA (Redecker et al., 1989) durch Calcitriol (1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃) in U937-Promonozyten reguliert wird. Calcitriol verursacht dabei eine Synthesesteigerung. Die genauen molekularen Mechanismen dieser Regulation sind nicht bekannt.

1.2 Struktur und Regulation des Kathepsin-D-Gens

Das Kathepsin-D-Gen wurde 1991 von Redecker et al. charakterisiert. Der transkribierte Anteil des Gens ist etwa 11000 bp lang und besteht aus 9 Exons sowie 8 Introns. Dabei weist das 5'-Ende bis einschließlich dem dritten Exon folgende Struktur auf:

```

1  gtcgacgtga  gtggacaaaa  ggtgcccgac  ctctaaggg  aaggagcttc  tctagaaaac
61  gcgaatttcg  ccccctcaag  agacagctgt  gcagtgccat  atcaaaacat  gtgaaaggaa
121  tgtatttttag  ggtggaatac  tttgcctgcc  ttcgggcctg  ctgtctgcca  cgtgaggctg
181  tgccagtgtg  aggctggaat  ttgggatctg  gaggctagag  ccacggtga  ggcctgagtc
241  tctaagcaca  gcgcccagag  ggagagggcg  gacgggtccg  accccctttg  cggcagggcc
301  tgagctggtt  ttccaggttt  ctctggaagc  cctgtagagg  agcggagggg  ccattcgggtg
361  ggctggggac  tttgaattta  accttggttt  gcaagaggct  tccagagagg  atgtctggga
421  gcgtctggag  ggggacgagg  gggcgccggg  aggagcaggt  gcaggagccc  acggcgcagg
481  ccccgcgcag  gcctggacgc  ggggacggcc  gcggcggccg  ggacaggggt  caccgcgcg
541  ggccctccag  ggtgggcccg  cccacgacct  caggccaggc  cgaaacggga  atcctccaga
601  ccccagaagc  tgggcccggc  tgaccccgcg  ggcgcgagcg  gggggaactg  taggcgcggc
661  aggccaccac  caccgccc  cccgcccggg  cgtgtgctg  gcccgaggtt  gcccgcacca
721  ggccaggccc  cgctccgccc  cgcccgcgc  acgcccggcg  cgccacgtg  accggtccgg
781  gtgcaaacac  gcgggtcagc  tgatccggcc  cAACTGCGGC GTCATCCCGG CTATAAGCGC
841  ACGGCCTCGG CGACCCTCTC CGACCCGGCC GCCGCCGCCA TGCAGCCCTC CAGCCTTCTG
901  CCGCTCGCCC TCTGCCTGCT GGCTGCACCC GCCTCCGCGC TCGTCAGgtg  aagcctcagg
961  ggccggggct  cagggacggg  caggggtcgc  ggcgccgagg  tcccggggcc  tgtggtgact
1021  ttcgcgctcc  cctgtggccc  ccacgagccc  cttgcgcccc  ccgcgctgga  atgcacctgt
1081  gccgccctgc  gcggcctcct  gcacggacca  cccgcctacg  gggcgccggg  ctccggaggt
1141  gcaggggacc  cggggcagag  gcgccagatg  cctctcccc  atatgccacc  ctgggttgta
1201  ccttgaggac  tgcagactga  ccgcagctc  cctggagacg  gggcgggggc  gggggaggta
1261  gtgctcattc  ggggcaggtg  gaattgggg  ctgtactgag  cgcccttgtt  gctggagacc
1321  taggtcaggc  ctacagagccc  ccgagtctgg  gcgagtccat  ttccttaggg  acccctttac
1381  cacctgtgaa  ctgggggctt  taaaagtgtg  ctccagcggc  tcttatcaca  ggccctgggc
1441  tgggagaccc  ctcgagaccc  taggagttcc  catgtccctg  agagaggagg  aggcattggg
1501  agtgggtcgg  ctacaccacc  ccgggcctgg  ggttgtgctg  tagtgaggcc  cacagctcc
1561  tcaggccgat  cccctgtgcc  aggtgaggcc  accgattggg  cctggatggg  atggggcccg
1621  gccatgcctg  accagctggg  cagaggaggg  ccatgctgca  gtctgctttc  ttgacccct
1681  cccagaccct  tgcaaggcag  cccgattcc  caggaggggt  atgctgacct  atcccattgg
1741  gcacctgcc  cacccttget  ctgggccttt  gtgggagacc  tgggatctgc  gatgggtcca
1801  ctgccttttg  gcagggtggg  gaggtcagaa  ggctgcaggg  gctggagctg  gctgggccag
1861  ctgggttagga  ctgagcctca  ccaaaggctg  tggggaatgg  cccggggcg  ggtagcccca
1921  attaaagtcg  ttgtggggga  gtagccacaa  gcctgagcct  gccttgacct  tgccagccta

```

```

1981 tccacaggcc tcccctctcc aaggaggaca gacacagcag aggggaaacg atcctggggc
2041 ttcttgaggg gaagggtagc tgaatccaag ccctcacccg attccagctc ttgtgcgact
2101 gatactatta cacctgcttc catggtccct ggagggcgtg tccctcccca gacaaacctg
2161 gagctcttcc agcccaccag ctcttaggca ataatctcat ctccgggat cagccctg
2221 acaagccagg aaaagccagc tatgacctg tactctcaag tccctggggc agggagagg
2281 ttttatttaa gtgattaaaa gcccagggga gcttccttg aacaaggagt gggttcacac
2341 caaggggaag gccagtggcc ctgggggagg agcagggacc cctctctctc ttactcgctt
2401 cctgggttta gaactcagga ccccgatctc agtctggagc tccctctgc accctggctg
2461 gcggtgtgct gggtgacagg actctggagg ggtaccctga gtgcagctgt cggaggaggc
2521 agggcggtgg ggggggcagc tcagaagcct ctaaggcccc aggtgcagtc ctggacctcg
2581 tggagccgca tggagtgagg agaggtgagg atgccagaa acagatgtgg gatgagggca
2641 ctgggcagcc acaggtcca tgtggaggag gacaggtagt caaggaggc ttctggaggt
2701 ggtgtggagg gccatctga tggccagagg aggccaggca gagctgccag tgccagcctg
2761 gaggtggggc caccttcgtg caggtgtctg ggggtggaga gcaggtgtga tgggggctgg
2821 gtacagtggg ctgcctcaga ggactttggg caggagtgc aggtaccgc cagcacctg
2881 agcagccatg ctggccacca tcctggaaga gaccagacgc aggtgcagag gaggacggga
2941 gacccttggg ggctttggag cctccagaat ggctgaggag aggagggttg ggcacactgg
3001 ccccagggtt ggggtgtgtg ggctgagggt ggtggcgggt gaccacttct taggactgtg
3061 gcctgtgcaa cctggcgggg ggcaatgggt tgccattcac tgacttgggg ggactgggccc
3121 agcagtttcc aggtgacagg caggagtttg gttttggctg tggcactct gagattcccc
3181 aggggcctcc aggtggatgt gcagcattgg cagcgtcggc cggcaggcgg gagggcctcc
3241 ctgatatgcc ccgaccctg GTTGACAGGA TCCCGCTGCA CAAGTTCACG TCCATCCGCC
3301 GGACCATGTC GGAGGTTGGG GGCTCTGTGG AGGACCTGAT TGCCAAAGGC CCCGTCTCAA
3361 AGTACTCCCA GCGGGTGCCA GCCGTGACCG AGGGGCCCAT TCCCGAGGTG CTCAAGAACT
3421 ACATGGACgt gagtatgagg tcttagccct gctgcaagcg gagccactgt caggagagct
3481 ccgtggcaga tggggaacat tcccacctcc tgttct----- ≈ 1.4 kb ----- gggc
4921 tgggacctgg cccatcttcc ctgcaggctg agcagggtgg agtgggtggc tgttggcagc
4981 tgtgggcccc gtgatgcccc tccctccagt atgggccttg gctctgggga cagccgggccc
5041 ttctgaggcc cagtggggag atggggcccc ctctcccac cctgacggac cctgtcccct
5101 gccagGCCCA GTACTACGGG GAGATTGGCA TCGGGACGCC CCCCAGTGC TTCACAGTCG
5161 TCTTCGACAC GGGCTCCTCC AACCTGTGGG TCCCCTCCAT CCACTGCAAA CTGCTGGACA
5221 TCGCTTGCT

```

Abb. 1: 5'-Ende des Kathepsin-D-Gens

Die Exons sind dabei in Großbuchstaben und fett dargestellt.

▼ = Translationsstart

Die gesamte Sequenz findet sich z.B. in folgender Datenbank:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=179947>

Daraus ergibt sich für die mRNA von humanem Kathepsin D die folgende cDNA-Sequenz (nach Redecker et al., 1991):

```

-72                                     |v x
                                     gcccaactgc

      |iv      |iii      |ii                                     |i
-62 ggcgtcatcc cggctataag cgcacggcct cggcgaccct ctccgacccg gccgcccgcg

-2 ccatgcagcc ctccagcctt ctgccgctcg ccctctgcct gctggctgca cccgcctccg

      |1|2
59 cgctcgtcag gatccccgctg cacaagttca cgtccatccg ccggaccatg tcggaggttg

119 ggggctctgt ggaggacctg attgccaaag gccccgtctc aaagtactcc caggcgggtgc

                                     |2|3
179 cagccgtgac cgaggggccc attcccgagg tgctcaagaa ctacatggac gcccagtact

239 acggggagat tggcatcggg acgccccccc agtgcttcac agtcgtcttc gacacgggct

                                     |3|4
299 cctccaacct gtgggtcccc tccatccact gcaaactgct ggacatcgct tgctggatcc

359 accacaagta caacagcgac aagtccagca cctacgttaa gaatggtagc tcgtttgaca

                                     |4|5
419 tccactatgg ctcgggcagc ctctccgggt acctgagcca ggacactgtg tcggtgcct

479 gccagtcagc gtcgtcagcc tctgccctgg gcggtgtcaa agtggagagg caggtctttg

539 gggaggccac caagcagcca ggcatcacct tcatcgcagc caagttcgat ggcatcctgg

```

599 gcatggccta cccccgcatc tccgtcaaca acgtgctgcc cgtcttcgac aacctgatgc

5|6

659 agcagaagct ggtggaccag aacatcttct cttctacct gagcaggac ccagatgcgc

719 agcctggggg tgagctgatg ctgggtggca cagactccaa gtattacaag gtttctctgt

6|7

779 cctacctgaa tgtcaccgcg aaggcctact ggcaggtcca cctggaccag gtggaggtgg

839 ccagcgggct gaccctgtgc aaggagggct gtgaggccat tgtggacaca ggcacttccc

899 tcatggtggg cccggtggat gaggtgcgcg agctgcagaa ggccatcggg gccgtgccgc

7|8

959 tgattcaggg cgagtacatg atcccctgtg agaaggtgtc caccctgccg gcgatcacac

8|9

1019 tgaagctggg aggcaaaggc tacaagctgt cccagagga ctacacgctc aaggtgtcgc

1079 aggccgggaa gaccctctgc ctgagcggct tcatgggcat ggacatcccg ccaccagcg

1139 ggccactctg gatcctgggc gacgtcttca tcggccgcta ctacactgtg tttgaccgtg

1199 acaacaacag ggtgggcttc gccgaggctg cccgcctcta gttccaagc cgtccgcgcg

1259 ccagcacaga aacagaggag agtcccagag caggaggccc ctggcccagc ggcccctccc

1319 acacacacc acacactcgc ccgcccactg tcctgggccc cctggaagcc ggcggcccaa

1379 gcccgacttg ctgttttgtt ctgtggtttt ccctccctg ggttcagaaa tgctgctgc

1439 ctgtctgtct ctccatctgt ttggtggggg tagagctgat ccagagcaca gatctgtttc

 1499 gtgcattgga agaccccacc caagcttggc agccgagctc gtgtatcctg gggctccctt

 1559 catctccagg gagtcccctc cccggcccta ccagcgcccg ctggctgagc ccctacccca

 1619 caccaggccg tcctcccggg ccctcccttg gaaacctgcc ctgcctgagg gccctctgc

 1679 ccagcttggg ccagctggg ctctgccacc ctacctgttc agtgtcccgg gcccgttgag

 1739 gatgaggccg ctagaggcct gaggatgagc tggaggagt gagaggggac aaaaccacc

 1799 ttgttgagc ctgcaggggtg gtgctgggac tgagccagtc ccaggggcat gtattggcct

 1859 ggaggtgggg ttgggattgg gggctggtgc cagccttcct ctgcagctga cctctgttgt

 1919 cctccccttg ggcggctgag agccccagct gacatggaaa tacagttggt ggctccggc

 1979 ctcccctct

Abb. 2: cDNA-Sequenz der mRNA von humanem Katepsin D

Die Nummerierung der Basenpaare beginnt am Triplet des Startcodons (ATG) mit +1. Auf diese Nummerierung beziehen sich alle im Folgenden genannten Sequenzen. Die hier dargestellte cDNA entspricht in ihrer Länge der längsten bekannten transkribierten mRNA für humanes Katepsin D (nach Cavallès, Augereau und Rochefort, 1993). Sie stimmt zu 55,7 % mit der cDNA von humanem Pepsinogen A überein (Sogawa et al., 1982). Die Übergänge zwischen den Exons sind kursiv und unterstrichen dargestellt.

Die im Folgenden beschriebenen Transkriptionsstartstellen sind von I-V nummeriert, der von Redecker et al. 1991 beschriebene Startpunkt ist mit X gekennzeichnet.

1.2.1 Struktur der Promotorregion des Kathepsin-D-Gens

Man unterscheidet in Hinblick auf ihre Promotorregion prinzipiell Haushalts-Gene (housekeeping genes) von fakultativen Genen.

Haushalts-Gene werden in den meisten Zellen exprimiert. Sie zeichnen sich in der Regel durch einen relativ hohen G+C-Gehalt sowie durch potentielle Sp1-Bindungsstellen in ihrer Promotorregion aus.

Fakultative Gene werden eher zelltypisch-spezifisch exprimiert. In ihrer Promotorregion findet man typischerweise eine TATA-Box oder eine CCAAT-Box.

Für Kathepsin D konnten von Redecker et al. 1991 5 potentielle Sp1-Bindungsstellen (eine davon im ersten Intron) sowie 4 potentielle AP-2-Bindungsstellen (davon zwei in ersten Intron) beschrieben werden. Der dargestellte Transkriptionsstartpunkt lag innerhalb einer CpG-Insel mit einem C+G-Gehalt, der 5,8-fach über dem Durchschnitt lag. Ein Response-Element für Vitamin D, wie es Kerner et al. 1989 beschrieben, konnte nicht identifiziert werden. Diese Ergebnisse ließen eine Klassifizierung als Haushalts-Gen zu.

Weiterhin konnte bei Promotorstudien an transfizierten COS-1-Zellen die größte Promotoraktivität in einem Bereich zwischen -124 und +59 Bp um den beschriebenen Transkriptionsstartpunkt festgestellt werden. Dieser Bereich enthält drei der vier Sp1-Bindungsstellen und endet im nicht translatierten Bereich von Exon 1.

Cavaillès, Augereau und Rochefort konnten 1993 anhand von RNase-Protection-Assays und Primer-Extension-Assays an RNA aus MCF7-Zellen - einer humanen, Estradiol-Rezeptor-positiven Brustkrebszelllinie - 5 Haupttranskriptionsstartpunkte für Kathepsin D ermitteln, die mit TSS I-V bezeichnet wurden und sich innerhalb eines Bereichs von 52 Bp befinden. Die genauen Positionen wurden mit -20, -44, -51, -60 und -72 Bp angegeben. Dabei waren die beiden hauptsächlich genutzten Startpunkte TSS I und TSS V, sie machten etwa 70 % des gesamten Transkripts aus. Je nachdem, ob die

MCF7-Zellen in östrogenfreiem Medium oder in Gegenwart von 10 nM Estradiol kultiviert wurden, ergaben sich signifikante Unterschiede: Während sich in Abwesenheit von Estradiol der Transkriptionsstart annähernd gleich auf die Punkte TSS I und TSS V verteilte, war unter Estradiol-Stimulierung der Transkriptionsstart an TSS I um das 6 bis 10-fache gesteigert. Es konnte gezeigt werden, daß die 4-fache Steigerung der Kathepsin-D-mRNA-Menge unter Estradiol-Stimulierung ausschließlich auf die gesteigerte Nutzung von TSS I zurückzuführen ist. Weiterhin konnte für diesen Startpunkt eine alternative TATA-Box identifiziert werden.

In weiteren Untersuchungen konnte die gesteigerte Nutzung von TSS I unter Estradiolstimulierung an mehreren Östrogenrezeptor-positiven Zelllinien gezeigt werden, ebenso bei Zelllinien, die mit dem Östrogenrezeptor transfiziert wurden. In Östrogenrezeptor-negativen Zelllinien war die Verteilung zwischen den Punkten TSS I und TSS V annähernd gleich.

Durch Promotorstudien an transfizierten MCF7-Zellen konnte schließlich gezeigt werden, daß eine defekte TATA-Box zu einer deutlichen Verminderung der Transkription an TSS I führt.

Die Autoren folgern daraus, daß Cathepsin D durch einen "mixed promotor" kontrolliert wird, der sowohl Eigenschaften eines Haushaltsgenes (hoher G+C-Gehalt und potentielle Sp1-Bindungsstellen) als auch eines fakultativen Genes (TATA-Box) besitzt. Dabei stimuliert Estradiol lediglich die TATA-abhängige Transkription an TSS I und steigert so nicht nur die Transkription, sondern verändert auch das Verteilungsmuster der Transkriptionsstartpunkte. Diese Stimulierung wird durch den Östrogenrezeptor vermittelt.

Cavaney-Brooker und Rakoczy konnten 1999 zeigen, daß Kathepsin D die vorherrschende Aspartatproteinase in humanen Retina-Pigmentepithelzellen (RPE) ist, welche auf einem sehr hohen Niveau – ähnlich dem der MCF7-Zellen - exprimiert wird. Mittels RNase-Protection-Assay konnten sie in RPE-Zellen genau zwei Transkriptionsstartpunkte für Kathepsin D nachweisen, welche exakt den von Cavallès, Augereau und Rochefort 1993 beschriebenen Transkriptionsstartpunkten I und V entsprachen, also den beiden hauptsächlich genutzten. Dabei wurde der TATA-Box-kontrollierte TSS I für die hohe basale Expression von Kathepsin D verantwortlich gemacht, ein eventueller induzierender Faktor konnte nicht beschrieben werden.

Nachfolgend ist die 5'-Region des Kathepsin-D-Gens mit der Lokalisierung der TSS I bis V abgebildet:

```

-198                                     ccgccc gggcgctgtg

-182 cgtgcccgag gttgccccgc ccaggccagg ccccgctccg ccccgccccg cgcacgcccg

                                     |v  x
-122 ccgcgcccac gtgaccggtc cgggtgcaaa cacgcgggtc agctgatccg gcccaactgc

      |iv      |iii  |ii                                     |i
-62 ggcgtcatcc cggctataag cgcacggcct cggcgaccct ctcgacccg gccgcccgcg

-2 ccATGCAGCC CTCCAGCCTT CTGCCGCTCG CCCTCTGCCT GCTGGCTGCA CCCGCCTCCG

59 CGCTCGTCAG GATCCCGCTG CACAAGTTCA CGTCCATCCG CCGGACCATG TCGGAGGTTG

119 GGGGCTCTGT GGAGGACCTG ATTGCCAAAG GCCCCGTCTC AAAGTACTCC CAGGCGGTGC

```

Abb. 3: 5'-Region des Kathepsin-D-Gens mit der Lokalisierung der TSS I bis V

Die vier GC-Boxen sind dabei unterstrichen. Von den fünf beschriebenen Transkriptionsstartpunkten TSS I bis TSS V ist jeweils das erste Nukleotid zusätzlich zur Markierung fett und kursiv gedruckt, die TATA-Box ist umrahmt und der proteincodierende Bereich ist in Großbuchstaben dargestellt. Der von Redecker et al. 1991 beschriebene Transkriptionsstartpunkt für Kathepsin D ist mit X gekennzeichnet und ebenfalls fett und kursiv gedruckt.

1.3 Fragestellung

Der von Redecker et al. 1991 bestimmte Transkriptionsstartpunkt für Kathepsin D wurde anhand von mRNA aus mit Calcitriol-stimulierten U937-Zellen beschrieben. Er befindet sich nur 4 Bp downstream des bei Cavallès, Augereau und Rochefort 1993 beschriebenen TSS V. Möglicherweise handelt es sich in beiden Fällen um den gleichen Startpunkt. Es stellt sich die Frage, ob bei Calcitriol-behandelten und unbehandelten U937-Zellen der gleiche Transkriptionsstartpunkt benutzt wird oder ob mehrere Startpunkte unterschiedlich stark genutzt werden.

Calcitriol (1,25-(OH)₂-Cholecalciferol), auch D-Hormon oder Vitamin D genannt, ist ein lipophiles, den Steroidhormonen in seiner Struktur und Wirkungsweise eng verwandtes Hormon. Kerner et al. beschreiben beispielsweise 1989 ein Response-Element für Calcitriol in der Promotorregion des Osteocalcin-Gens, dessen Basensequenz Strukturgleichheit mit der des Response-Elements für Estradiol aufweist. Ein solches Response-Element konnte zwar nicht in der Promotor-Region von Kathepsin D nachgewiesen werden, dennoch wäre es möglich, daß sowohl Estradiol als auch Calcitriol ähnlichen Einfluß auf die unterschiedliche Nutzung der Transkriptionsstartpunkte von Kathepsin D haben.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher die Verteilungsmuster der Transkriptionsstartpunkte für Kathepsin D sowohl an mRNA aus calcitriolfrei kultivierten U937-Zellen als auch an mRNA aus Calcitriol-stimulierten U937-Zellen bestimmt werden. Weiterhin soll die 1989 von Redecker, Horst und Hasilik mittels Northern-Blot gezeigte Steigerung der Transkriptionsrate für Kathepsin-D-mRNA unter Calcitriol-Stimulierung mit einer weiteren Methode nachgewiesen werden.

Als Methode erscheint hier die Entwicklung einer kompetitiven RT-PCR sinnvoll, welche den Vorteil bietet, auch geringste Mengen an mRNA nachweisen und gleichzeitig quantifizieren zu können.

1.4 Medizinische Relevanz

Als ubiquitär vorkommendes Enzym spielt Kathepsin D in vielen physiologischen und pathologischen Reaktionen des menschlichen Körpers eine Rolle. An dieser Stelle können nur einige dieser Beobachtungen aufgeführt werden.

So wurde das Kathepsin D in vielen Veröffentlichungen als Metastasierungsmarker von Brustkrebs und anderen Karzinomen diskutiert, eventuell ist hier sogar ein therapeutischer Ansatz möglich (Rocheffort und Liaudet-Coopman, 1999; Glondu et al. 2002).

In der bronchoalveolären Lavage fanden sich bei Rauchern erhöhte Kathepsin-D-Aktivitäten, was in Verbindung mit den Strukturveränderungen der Lunge bei Rauchern gebracht wurde (Chang, Yoo und Lesser, 1989).

Eine genetische Variation von Kathepsin D (C → T / Ala → Val -Transposition in Position 224) ist mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung der Alzheimerschen Erkrankung vergesellschaftet (Papassotiropoulos et al., 2000 und 2002). Eine direkte Beteiligung von Kathepsin D an der Neurodegeneration durch Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins in amyloidogene Komponenten ist allerdings unwahrscheinlich. Die entsprechenden Enzyme, β - und γ -Sekretasen, sind mittlerweile beschrieben. Interessanterweise gehören diese Enzyme, wie auch das Kathepsin D, zur Familie der Aspartatproteinasen (Gruninger-Leitch et al., 2002).

In diesem Kontext kann auch erwähnt werden, daß Cavaillès et al. 1993 bei Prionen-infizierten Zellen aus Mäusehirn einen Transkriptionsstartpunkt für Kathepsin D fanden, der ungefähr dem TATA-Box-kontrollierten TSS I beim Menschen entsprach.

Weiterhin wurde von van Noort et al. 1989 eine Beteiligung von Kathepsin D an der Bildung von T-Zell Epitopen diskutiert.

Cavaney-Brooker et al. identifizierten Kathepsin D 1999 als die vorherrschende Aspartatproteinase in humanen Retina-Pigmentepithelzellen (RPE), einem der stoffwechselaktivsten Gewebe des menschlichen Körpers, welches unter anderem physiologischerweise für Phagozytose und Verdau der äußeren Segmente der Photorezeptoren zuständig ist.

Schließlich konnten Kunz et al. 1996 zeigen, daß die Aktivität von Kathepsin D im posttraumatischen Kniegelenkserguß mit dem klinischen Schweregrad der Verletzung korreliert.

Eine genauere Kenntnis der Regulation des Kathepsin-D-Gens ist also auch in Hinblick auf das oben Gesagte wünschenswert und kann zu weiteren Erkenntnissen in diesen Bereichen führen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Es wurden folgende Geräte benutzt:

Auswertungssoftware „ImageQuaNT Version 4.2“	Fa. Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
CO ₂ -Brutschrank „Function Line“	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
Dampfsterilisator „VST 40/60 S“	Fa. Zirbus, Osterode
Drehrad	Eigenbau der Institutswerkstatt, Physiol. Chemie Uni Münster
Elektrophoresekammern	Eigenbau der Institutswerkstatt, Physiol. Chemie Uni Münster
Feinwaage „SBA 33“	Fa. Scaltec, Heiligenstadt
Flüssigkeitsszintillationszähler „Tri-Carb 1500 TR“	Fa. Packard, Frankfurt / Main
Heißluftsterilisator „UT 12“	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
Heiz-Magnetrührer „MR 2002“	Fa. Heidolph, Kehlheim
Heizblöcke	Eigenbau der Institutswerkstatt, Physiol. Chemie Uni Münster
HPLC-H ₂ O-Anlage „Milli Q UF plus“	Fa. Millipore, Eschborn

Mikropipettierhilfen	Fa. Abimed, Langenfeld
Mikroskop „Telaval 31“	Fa. Zeiss, Oberkochen
Mikrowellenherd „MG 810“	Fa. Bosch, Hannover
Netzgerät	Fa. Biometra, Göttingen
PH-Meter „Delta 350“	Fa. Mettler, Giessen
Photometer „Gene Quant“	Fa. Pharmacia, Freiburg i. Br.
Pipettor „Pipetboy acu“	Integra Biosciences, Fernwald
Schüttelmaschine „Unimax 2010“	Fa. Heidolph, Kehlheim
Sequenzierungsgerät „ABI PRISM® 377 DNA- Sequencer“	Fa. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Sterilwerkbank „ET 130 N“	Fa. W. Ehret, Emmendingen
Sterilwerkbank „Hera Safe“	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
Thermocycler „Progene“	Fa. Techne, Cambridge, UK
Tiefstkuhlenschrank, -70°C, „Herafreeze“	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
Tischzentrifuge „Biofuge 15“	Fa. Heraeus Sepatech, Hanau
Transilluminator „UVT - 20 M/W“	Fa. Herolab, Wiesloch
Videodokumentationssystem	Fa. Intas, Göttingen

Vortexer „Vortex Genie 2“	Scientific Industries, New York, USA
Waage „BP 410“	Fa. Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Fa. GFL, Burgwedel
Wasserbad „Thermomix BU“	Fa. Braun, Melsungen
Zellzählgerät „Casi 1 DT“	Fa. Schärfe, Reutlingen
Zentrifuge „Labofuge 400 e“	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge „Sorvall RC 5B plus“	Fa. Dupont, Bad Homburg v.d.H.

2.1.2 Materialien für die Kultur eukaryoter Zellen

Kulturflaschen 50 ml und 250 ml	Fa. Greiner, Nürtingen,
Sterile Einwegpipetten	Fa. Falcon, Oxnard, USA

2.1.3 Materialien zur Anzucht von Bakterien

Petrischalen Ø 9 cm	Fa. Greiner, Nürtingen
Anzuchtkolben 100 ml, 300 ml, 1000 ml	Fa. Schott, Mainz
Kunststoffröhrchen 10ml, 50 ml	Fa. Greiner, Nürtingen

2.1.4 Chemikalien

Agarose „NuSieve“	Fa. FMC, Rockland, USA
Ampicillin	Fa. Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Fa. Merck, Darmstadt
Calcitriol (1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol)	freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Dr. M. R. Uscovic, Fa. Hoffmann - La Roche, Nutley, NJ, USA
2'-Deoxynukleosid-5'-Triphosphat (dNTP)	Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, SE
Dimethylformamid	Fa. Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Fa. Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Fa. Sigma - Aldrich, Deisenhofen
Essigsäure	Fa. Roth, Karlsruhe
Ethanol	Fa. Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fa. Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fa. Merck, Darmstadt
Isopropanol	Fa. Merck, Darmstadt

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fa. Bachem Biochemica, Heidelberg
Kaliumacetat	Fa. Fluka, Deisenhofen
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Fa. Merck, Darmstadt
Low-melting-Agarose „SeaKem“	Fa. FMC, Rockland, USA
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Fa. Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Fa. Sigma - Aldrich, Deisenhofen
3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Fa. Sigma - Aldrich, Deisenhofen
Phenol	Fa. Merck, Darmstadt
Rubidiumchlorid (RbCl)	Fa. Fluka, Deisenhofen
Saccharose	Fa. Merck, Darmstadt
Streptomycin	Fa. Gibco - BRL, Eggenstein
Trichloressigsäure (TCA)	Fa. Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Fa. Merck, Darmstadt
X-GAL (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid)	Fa. MBI - Fermentas, St. Leon - Rot

2.1.5 Radiochemikalien

[¹⁴ C] KCNO (2,2 GBq / mmol)	Fa. NEN, Bad Homburg v. d. H.
------------------------------------------	----------------------------------

2.1.6 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Fa. Boehringer - Mannheim, Fa. MBI - Fermentas, St. Leon - Rot
RNase-Inhibitor (38 U/μl)	Fa. Promega, Madison, USA
T4-DNA-Ligase (10 U/μl)	Fa. Epicentre Technologies, Madison, USA
Cloned Pfu-DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	Fa. Stratagene, La Jolla, USA
Taq-DNA-Polymerase (4 U/μl)	Fa. AGS, Heidelberg
MMLV Reverse Transcriptase (10 U/μl)	Epicentre Technologies, Madison, USA

2.1.7 Standardlösungen

(Alle Lösungen zur Arbeit mit RNA wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt)

10 x TE	100 mM Tris pH 7,6 10 mM EDTA pH 8,0 autoklaviert
10 x TAE	400 mM Tris 10 mM EDTA pH 8,0 eingestellt mit CH ₃ COOH

Ethidiumbromid	5	mg/ml in dest. H ₂ O gelöst
Probenpuffer LIV	0,25	% (w/v) Bromphenolblau
	40	% (w/v) Saccharose
Sequenzierungspuffer	25	mM EDTA
	50	mg/ml Dextranblau
		Formamid / EDTA 5:1
Ampicillin	100	mg/ml in dest. H ₂ O gelöst, pH auf 7,5 eingestellt, sterilfiltriert
X-GAL-Lösung	4	% X-GAL in Dimethyl- formamid

2.1.8 Medien für Bakterien

LB (Luria-Bertani-Medium)	10	g Bactotrypton
	5	g Bacto-Hefeextrakt
	5	g NaCl
		in 1 l dest. H ₂ O gelöst und autoklaviert

Agarplatten: Zur Bakterienanzucht wurde den oben aufgeführten Medien Agar in einer Endkonzentration von 1,5 % zugesetzt. Nach dem Autoklavieren wurde der Agar in Petrischalen gegossen, abgekühlt und bei 4°C aufbewahrt.

2.1.9 Medien für eukaryote Zellen

RPMI-Medium für U937-Zellen: 500 ml RPMI 1640 Medium (Moore et al., 1967)
 50 ml FKS
 5 ml Penicillin/Streptomycin, je 10000 I.E./ml

2.1.10 Bakterienstämme

E. coli DH5 α Glycerinkultur des Arbeitskreises
 (Genotyp: F-, endA1, hsdR, r_k-, m_k-, supE#4,
 thi-1, -recA1, pyrA96, recA1, Φ 80d, lacZ, Δ M15)

2.1.11 Eukaryote Zelllinien

U937 (Humane histiocytische Lymphomzellen)

Die Promonocytenzelllinie U937 (Sundström und Nilsson, 1976) entstammt malignen Zellen eines 37jährigen Kaukasiers mit diffusem histiocytem Lymphom, welche mittels pleuraler Effusion gewonnen wurden. Sie wurden freundlicherweise von Dr. C. Sorg, Universitäts-Hautklinik Münster, zur Verfügung gestellt.

2.1.12 Vektoren

pUC18:

Dies ist ein 2686 bp langer Vektor für *E. coli*. Er enthält den N-terminalen Anteil des *E. coli lacZ*-Gens, welches das α -Peptid der β -Galactosidase exprimiert. Das α -Peptid ist in der Lage, eine *lac*-Mutation im Wirtstamm auszugleichen und so die Expression

einer funktionstüchtigen β -Galactosidase zu ermöglichen. Wird ein DNA-Fragment in die Polylinker-Region kloniert, geht die β -Galactosidase-Aktivität verloren. Kolonien, die durch solch einen rekombinanten Vektor hervorgebracht werden, erscheinen bei X-GAL haltigem Substrat weiß. Kolonien, die unter gleichen Bedingungen mit nicht rekombinanten Vektoren generiert werden, erscheinen blau. Da der Vector ferner ein Ampicillinresistenzgen besitzt, welches durch die Klonierung nicht beeinträchtigt wird, finden sich auf dem ampicillinhaltigen Platten nur transformierte Bakterienklone.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultur eukaryoter Zellen

U937-Zellen wurden in RPMI-Medium mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum sowie 1 % Penicillin / Streptomycin (10000 I.E. / ml) gehalten, mit einem Gemisch aus 5 % CO₂ und Luft begast und im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Um eine Zellzahl von etwa 5×10^7 Zellen zu erlangen, mußten 3 Tage zuvor 6×10^6 Zellen in 100 ml Medium eingesetzt werden.

Die Calcitriolstimulierung der Zellen erfolgte durch 3-tägige Kultivierung in obigem Medium in Gegenwart von 10^{-7} M Calcitriol. Dabei wurden jedoch $1,2 \times 10^7$ Zellen eingesetzt. Die Zellzahl wurde mittels Zellzählgerät bestimmt.

2.2.2 Methoden zur Analyse von DNA und RNA

2.2.2.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Puffer:

Die Zusammensetzung der Puffer entsprach den Angaben im Boehringer Manual von 1995.

Ansatz für eine Spaltung:

1	μl	10 x Puffer
x	μl	DNA (0,2-3,0 μg)
y	μl	H ₂ O
z	μl	Endonuklease
(1 U Enzym spaltet 1 μg dsDNA		
_____ in einer Stunde)		
Σ	10	μl

Der Ansatz wurde 1-10 Stunden bei der angegebenen Temperatur inkubiert und anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

2.2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Agarosegel: Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst und nach dem Abkühlen auf 55°C mit Ethidiumbromid versetzt (5 mg/ml Stammlösung auf eine Endkonzentration von 0,5 μg/ml) und bei 55°C aufbewahrt.

Agarosekonzentration im Gel: (w/v)	Effiziente Auftrennung von Fragmenten folgender Größe:
0,9 %	7 - 0,5 kbp
1,2 %	6 - 0,4 kbp
3,5 %	0,6 - 0,06 kbp

(modifiziert nach Sambrook et al., 1989)

Verwendet wurde hauptsächlich NuSieve-Agarose einer Konzentration von 3,5 %. Die gelöste Agarose wurde in einen Träger gegossen und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nach dem Erstarren des Gels auf einer horizontalen Fläche wurde der Kamm entfernt. Das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer mit 1 x TAE-Puffer überschichtet, die mit 1/5 Vol. Probenpuffer LIV versetzten Proben wurden aufgetragen und bei 80 Volt (6 V/cm²) elektrophoretisch aufgetrennt.

Die DNA-Banden ließen sich auf Grund der Einlagerung von Ethidiumbromid in die DNA bei UV-Licht betrachten und dokumentieren.

Als Größenstandard wurde in Agarosegelen ein mit HaeIII geschnittenes Plasmid pBR322 verwendet. Es wurden pro Gel ca. 0,3-0,4 µg Standard aufgetragen. Der Standard bestand aus folgenden Fragmenten:

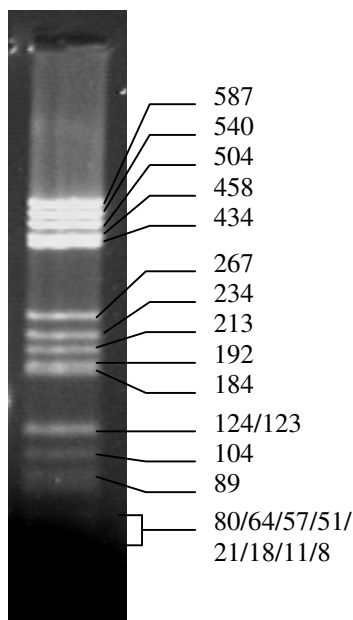


Abb. 4: Größenstandard pBR322 geschnitten mit HaeIII

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. RNA

Spektrophotometrische Bestimmung:

Hierzu wurde die optische Dichte der Probe bei 260 nm Wellenlänge gegen den jeweiligen Leerwert bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei einzelsträngiger DNA einer Konzentration von 37 µg/ml und bei RNA einer Konzentration von 40 µg/ml.

Zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäuren wurde zusätzlich die OD_{280} bestimmt. Ein Quotient OD_{260}/OD_{280} von 1,8 entspricht reiner DNA, ein Wert von 2,0 entspricht reiner RNA.

Bestimmung mittels Gelelektrophorese:

Eine Bewertung der Nukleinsäurenkonzentration erfolgte durch Auftrennung auf einem Agarosegel und Vergleich der Probenintensität mit dokumentierten Gelen, auf denen Proben bekannter Konzentration unter Standardbedingungen aufgetrennt worden waren.

2.2.3 Präparation von RNA

2.2.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus U937-Zellen

(Nach Vorschrift der Firma Qiagen für RNeasy™ Mini Kit, 1994)

Die Zellsuspension wurde zu je $1,5 \times 10^7$ Zellen aliquotiert und anschließend durch Zentrifugation bei 1000 rpm (300 x g) für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Dem Zellpellet wurden 600 µl Lysis Puffer RLT zugegeben. Nach kurzem Vortexen wurde das Lysat zum Homogenisieren direkt auf eine „Qiashredder“-Säule gegeben. Nach 2-minütiger Zentrifugation der Säule bei maximaler Geschwindigkeit wurde das Homogenisat mit 600 µl 70 % Ethanol versetzt und kurz gevortext. Mit dem Gemisch wurde eine RNeasy-Säule beschickt und anschließend für 1 min bei 10000 rpm (8000 x g) zentrifugiert. Der Durchbruch wurde verworfen. Die Säule wurde durch 700 µl Waschpuffer RW1 und anschließendes Zentrifugieren gewaschen. Dann wurde sie in einem neuen Sammelgefäß durch 500 µl Waschpuffer RPE und anschließendes Zentrifugieren erneut gewaschen. Nach Wiederholung des Waschschrtes wurde zum Trocknen der Membran für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Gefäß verbracht und anschließend die RNA mit 30 µl DEPC-behandeltem Wasser durch Zentrifugation bei 10000 rpm eluiert. Der Elutionsschritt wurde einmal wiederholt.

2.2.3.2 Präparation von mRNA aus Gesamt-RNA

(nach Vorschrift der Firma Qiagen für Oligotex™ mRNA-Kit, 1994)

Die Gesamt-RNA-Probe wurde mit DEPC-behandeltem Wasser auf 250 µl aufgefüllt und mit 250 µl Bindungspuffer OBB gemischt. Daraufhin wurden 15 µl auf 37°C er-

wärmte Oligotex-Suspension zugegeben, gevortext und für 3 min bei 70°C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Der Ansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 400 µl Waschpuffer OW2 resuspendiert, auf die Oligotex-Säule gegeben und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und erneut wie zuvor mit Waschpuffer OW2 gewaschen. Der Durchbruch wurde beide Male verworfen. Die Säule wurde erneut in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt. Das Pellet auf der Säulenmembran wurde mit 100µl erwärmtem Elutionspuffer (70°C) resuspendiert, die mRNA durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min eluiert. Es folgte ein zweiter Elutionsschritt mit dem ersten Eluat in das selbe Gefäß, um die Ausbeute zu erhöhen.

Benötigte Lösungen:

Oligotex Suspension	10 % (w/v) Suspension (=1 mg/10 µl) Oligotex-Partikel in:
	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
	500 mM NaCl
	1 mM EDTA
	0,1 % SDS
	0,1 % NaN ₃
2 x Bindungspuffer OBB	20 mM Tris-HCl, pH 7,5
	1000 mM NaCl
	2 mM EDTA
	0,2 % SDS
Waschpuffer OW2	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
Elutionspuffer	5 mM Tris-HCl, pH 7,5

2.2.3.3 Ethanolfällung von RNA

Dem Ansatz wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben und kurz gevortext. Dann wurden 2,5-3 Volumen (nach der Salzzugabe berechnet) eiskaltes Ethanol (96 %) zugegeben und erneut gevortext. Der Ansatz wurde für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert und anschließend bei maximaler Drehzahl 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Zum Waschen wurde dem Pellet 1ml 70 % Ethanol (bei Nukleinsäuren <200 Bp 96 % Ethanol) zugegeben, das Gefäß mehrmals invertiert und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet vakuumgetrocknet und dann in DEPC-behandeltem Wasser oder 1/10 TE-Puffer (angesetzt mit DEPC-behandeltem Wasser) aufgenommen.

2.2.4 Präparation von DNA

2.2.4.1 Herstellung kompetenter Zellen

(nach Hanahan, 1983)

Von einer Stammpolte DH5 α wurde eine Kolonie mit einer Impföse abgenommen und in 5 ml Medium über Nacht bei 37°C auf dem Drehrad inkubiert. Dann wurden 100 ml LB-Medium mit 750 μ l dieser Kultur angeimpft und auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert, bis die optische Dichte der Bakteriensuspension (bei 560 nm) den Wert 0,35 erreicht hatte. Dieser Wert entspricht dem Beginn der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien und sollte nach ca. 2 h erreicht sein. Daraufhin wurde der Ansatz zu zweimal 50 ml aliquotiert, 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4°C und 2500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml Puffer Tfb1 aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert, erneut bei 4°C und 2500 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Im Anschluß wurden die Bakterienpellets in 2 ml Puffer Tfb2 resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Es wurden je 150 μ l der Suspension in Eppendorfgefäße

aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -70°C gelagert.

Benötigte Lösungen:

Puffer TfB1

- 100 mM RbCl
- 50 mM MnCl_2
- 30 mM Kaliumacetat
- 10 mM CaCl_2
- 15 % (v/v) Glycerin

mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt.

Puffer TfB2

- 75 mM CaCl_2
- 10 mM MOPS, pH 7,0
- 10 mM RbCl
- 15 % (v/v) Glycerin

mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und sterilfiltriert

2.2.4.2 Transformation

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und zu je 200 μl aliquotiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA (5-15 ng DNA in max. 10 μl Volumen) zugegeben und der Ansatz eine Stunde auf Eis inkubiert. Dann wurde im Wasserbad für 90 sec auf 42°C erwärmt. Nach dem Hitzeschock kam der Ansatz sofort wieder auf Eis. Dem Transformationsansatz wurden 800 μl LB-Medium zugegeben und er wurde für eine halbe Stunde bei 37°C auf dem Drehrad inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz - jeweils mit 40 μl 0,1 M IPTG und 25 μl X-GAL - auf LB/Ampicillin-Platten gegossen: a) 100 μl mit 400 μl LB und b) die restlichen 900 μl unverdünnt. Durch Schwenken wurde der Ansatz gleichmäßig verteilt, eine halbe Stunde trocknen gelassen und über Nacht (max. 16 h) bei 37°C inkubiert.

2.2.4.3 Plasmid-DNA-Mini-Präparation

(nach Vorschrift der Firma Qiagen für Qiagen Plasmid Mini Kit, 1995)

Plasmid - Vorkultur: Kompetente DH5 α -Zellen wurden mit Plasmid-DNA transformiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden mit einer sterilen Impföse Einzelklone gepickt, in 5 ml LB-Medium mit 5 μ l Ampicillin (5 mg/ml) gegeben und über Nacht bei 37°C gedreht.

Die Bakterienzellen wurden bei 10000 x g pelletiert und in 250 μ l Puffer P1 resuspendiert sowie in ein Eppendorfgefäß überführt. Dann wurden 250 μ l Puffer P2 zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Im Anschluß wurden 350 μ l Puffer N3 zugegeben und erneut gemischt, wobei die Lösung trüb und viskös wurde. Daraufhin wurde 10 min bei 10000 x g zentrifugiert, der Überstand auf eine QIAprep Spin-Säule in einem 2 ml-Sammelgefäß aufgetragen und diese für 1 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Durchbruch wurde verworfen und die Säule mit 0,5 ml Puffer PB und anschließender Zentrifugation gewaschen. Zum erneuten Waschen wurden 0,75 ml Puffer PE zugegeben und bei 10000 x g für 1 min zentrifugiert, der Durchbruch wurde verworfen. Die Säule wurde dann zum Entfernen von Pufferresten für 1 min bei 10000 x g zentrifugiert und in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt. Zum Eluieren der DNA wurden 50 μ l H₂O oder 1/10 TE-Puffer auf die Säulenmembran gegeben. Nach einer Wartezeit von 1 min ließ sich die Plasmid-DNA durch Zentrifugation auslösen. Alle benötigten Puffer waren im Kit enthalten.

2.2.4.4 Plasmid-DNA-Maxi-Präparation

(nach Vorschrift der Firma Qiagen für Qiagen Plasmid Maxi Kit, 1995)

Plasmid-Vorkultur: Kompetente DH5 α -Zellen wurden mit Plasmid-DNA transformiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden 150 ml Medium mit 1,5 ml der Vorkultur beimpft und über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurde diese Bakteriensuspension 15 min bei 4°C und 6000 x g (6000 rpm im Sorvall GSA-Rotor) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Es wurden 10 ml Puffer

P2 zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 10 ml vorgekühlter Puffer P3 zugegeben, vorsichtig geschüttelt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 20000 x g (13000 rpm im Sorvall SS-34-Rotor) für 30 min und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut unter gleichen Bedingungen für 15 min zentrifugiert. Zwischenzeitlich wurde eine Qiagen-tip 500-Säule mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Diese wurde mit dem Überstand des letzten Zentrifugationsschrittes beschickt und anschließend mit 2 x 30 ml Puffer QC gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Schließlich wurde die DNA durch Zugabe von 0,7 Teilen Isopropanol präzipitiert und nach 30 min bei 4°C und 15000 x g für 30 min zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 70 % Ethanol und erneutem Zentrifugieren wurde das DNA-Pellet in 100 µl 1/10 TE-Puffer aufgenommen.

Benötigte Lösungen:

Puffer P1:	50	mM Tris-HCl, pH 8,0
	10	mM EDTA
	100	µg/ml RNase A
Puffer P2:	200	mM NaOH
	1	% SDS
Puffer P3:	3,0	M Kaliumacetat, pH 5,5
Puffer QBT:	750	mM NaCl
	50	mM MOPS, pH 7,0
	15	% Ethanol
	0,15	% Triton X-100
Puffer QC:	1,0	M NaCl
	50	mM MOPS, pH 7,0
	15	% Ethanol
Puffer QF:	1,25	M NaCl
	50	mM Tris-HCl, pH 8,5
	15	% Ethanol

2.2.4.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

(nach Vorschrift der Firma Qiagen für QIAquick Gel Extraction Kit, 1997)

Nach Durchführung der in 2.2.2.2 beschriebenen Gelelektrophorese wurde das DNA-Fragment mit einem sauberen, scharfen Skalpel aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die maximal einsetzbare Menge betrug 400 mg, unabhängig von der Agarosequalität. Nach dem Wiegen des Gelfragmentes wurden 3 Teile Puffer QX1 zu einem Teil Gel gegeben (bei Gelen über 2 % 6 Teile QX1), wobei man davon ausging, daß 100 mg Gel 100 µl QX1 entsprachen. Dann wurde der Ansatz für mindestens 10 min bei 50°C inkubiert und gelegentlich gevortext, bis die Gelscheibe komplett gelöst war. Im Anschluß wurde 1 Gelvolumen Isopropanol zugegeben und gevortext. Nachdem man eine QIAquick Säule in ein 2 ml-Sammelgefäß verbracht hatte, wurde der Ansatz auf die Säule gegeben und 1 min bei 10000 x g zentrifugiert, der Durchbruch wurde verworfen. Zum Waschen wurden 0,5 ml Puffer QX1 auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Dann wurden 0,75 ml Puffer PE zum Waschen auf die Säule gegeben und nochmals zentrifugiert. Die Durchbrüche wurden jeweils verworfen. Schließlich wurde die Säule abermals 1 min bei 10000 x g zentrifugiert und im Anschluß daran in ein neues 1,5 ml-Sammelgefäß verbracht. Zur Elution wurden 30 µl H₂O auf die Säule gegeben, nach 1 min wurde die Säule bei 10000 x g für 1 min zentrifugiert.

Alle benötigten Puffer waren im Kit enthalten.

2.2.4.6 Aufreinigen von DNA über Säulen

(nach Vorschrift der Firma Qiagen für QIAquick PCR Purification Kit, 1997)

Zum Aufreinigen von DNA nach enzymatischen Reaktionen wurde zum aufzureinigenden DNA-Ansatz die 5-fache Menge an Puffer PB zugefügt und gevortext. Eine QIAquick Spin Säule wurde in ein 2 ml-Sammelgefäß gegeben und mit dem DNA-Ansatz beschickt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 10000 x g für 1 min wurde der Durchbruch verworfen und die Säule mit 0,75 ml Puffer PE und erneuter Zentrifugation für 1 min gewaschen. Der Durchbruch wurde verworfen und die Säule nochmals für

1 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Daraufhin wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-Sammelgefäß überführt. Zum Eluieren der DNA wurde auf die Säule 30 µl steriles Wasser oder 1/10 TE-Puffer gegeben, nach 1 min wurde die Säule bei 10000 x g für 1 min zentrifugiert.

Alle benötigten Puffer waren im Kit enthalten.

2.2.4.7 Ethanolfällung von DNA

Dem Ansatz wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben und kurz gevortext. Dann wurden 2 Volumen (nach der Salzzugabe berechnet) eiskaltes Ethanol (96 %) zugegeben und erneut gevortext. Der Ansatz wurde für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert und anschließend bei maximaler Drehzahl 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Zum Waschen wurde dem Pellet 1ml 70 % Ethanol (bei Nukleinsäuren <200 Bp 96 % Ethanol) zugegeben, das Gefäß mehrmals invertiert und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet vakuumgetrocknet und dann in sterilem Wasser oder 1/10 TE-Puffer aufgenommen.

2.2.5 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von mRNA wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

x	µl	mRNA (0,5-5 µg)
1,5	µl	RNasin (60 U)
5	µl	10 x MMLV-RT-Puffer
5	µl	0,1 M DTT
10	µl	dNTP (je 2,5 mM)
1	µl	Reverse-Primer (10 pmol/µl)
y	µl	DEPC-behandeltes H ₂ O
0,5	µl	MMLV-Reverse Transkriptase
<hr/>		
Σ	50	µl

Der Ansatz wurde 1 bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend zur Denaturierung für 10 min auf 94°C erwärmt. Danach wurde der Ansatz auf Eis gekühlt und an zentrifugiert.

2.2.6 Umklonierung von DNA-Fragmenten

Zunächst wurde die Vektor-DNA mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert. Sowohl die linearisierte Vektor-DNA als auch das Insert wurden mit Hilfe einer QIAquick™ Spin Säule aufgereinigt und mit sterilem Wasser eluiert, anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung mittels optischer Dichte vorgenommen. Zur Ligation („blunt-end“-Ligation, modifiziert nach Perbal, 1988) wurde eine deutlich größere Menge an Insert im Vergleich zur Vektor-DNA eingesetzt (4- bis 50-fach höhere Molarität). Die Ligation wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

x	μl	Vektor-DNA
y	μl	Insert-DNA
2	μl	10 x T4-DNA-Ligase-Puffer
2	μl	10 mM ATP
1	μl	T4-DNA-Ligase (10 U)
z	μl	H ₂ O
<hr/>		
Σ	20	μl

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. Der ligierte Vektor konnte anschließend direkt für die Transformation eingesetzt werden.

2.2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurden folgende Ansätze hergestellt:

1. Primeransatz:

x	μl	zu amplifizierende DNA
2	μl	sense-Primer
2	μl	reverse-Primer
y	μl	H ₂ O
<hr/>		
Σ	10	μl

2. Premix:

1	μl	bzw	2	μl	DMSO
5	μl	bzw	10	μl	10 x Polymerasepuffer
30,68	μl	bzw	73,5	μl	H ₂ O
2	μl	bzw	2	μl	dNTP (je 2,5 mM)
1	μl	bzw	2	μl	25 mM MgCl ₂
0,32	μl	bzw	0,5	μl	DNA-Polymerase (1,25 U)
<hr/>					
Σ	40	μl	bzw	90	μl

Der Primeransatz wurde mit dem Premix gemischt und in dünnwandigen 0,5 ml-Gefäßen in den Thermocycler gegeben. Dort wurden bis zu 35 Zyklen mit in der Regel 3 Temperatursegmenten (Denaturierungsschritt, Primer-Annealingschritt und Primerextensionsschritt) durchgeführt. Temperatur und Dauer der Segmente wurden jeweils auf die zu amplifizierende DNA und die entsprechenden Primer optimiert.

2.2.8 In-vitro-Mutagenese

Mit Hilfe der In-vitro-Mutagenese wurde in einer bekannten DNA-Sequenz eine Deletionsmutation erzeugt. Dazu wurden 4 Primer benötigt: zwei flankierende Primer an den Enden der Sequenz, einer in sense-Orientierung, der andere in anti-sense-Orientierung; sowie zwei Deletionsprimer, welche den vorgesehenen Deletionsbereich abdeckten und zu einander komplementär waren. Beim Binden der Deletionsprimer an die zu mutierende DNA-Sequenz bildete sich in dieser eine DNA-Schleife, zu welcher keine komplementäre Primer-Sequenz existierte. Zu den Bereichen links und rechts der Schleife war die Deletionsprimer-Sequenz komplementär. Durch PCR-Amplifikation der zu mutierenden DNA mit jeweils einem flankierenden Primer und dem entsprechenden Deletionsprimer entstanden DNA-Sequenzen, welche beide jeweils endständig die Deletionsmutation trugen und in diesem Bereich aufgrund der Komplementarität der Deletionsprimer überlappten. Diese beiden DNA-Sequenzen wurden zusammen ohne Primer mit DNA-Polymerase an den überlappenden Enden verlängert. Auf diese Art entstand eine DNA-Sequenz, welche der ursprünglichen bis auf die Deletionsmutation entsprach und mit Hilfe der beiden flankierenden Primer beliebig oft amplifiziert werden konnte. Man beachte hierzu auch das Schema im Ergebnisteil 3.1. (Abb. 8).

2.2.9 Kompetitive PCR

Die Methode der kompetitiven PCR basiert auf der kompetitiven Co-Amplifikation einer spezifischen Target-Sequenz (DNA bzw. revers transkribierte RNA), also der zu bestimmenden Ziel-DNA-Menge, zusammen mit bekannten Mengen eines internen Standards (Kompetitor, Standard-DNA) im selben Reaktionsgefäß. Der Kompetitor hatte mit der zu bestimmenden Target-Sequenz die Primer-Bindungsstellen gemeinsam und wurde mit gleicher Effizienz amplifiziert. Die amplifizierten Produkte von Kompetitor und Target konnten aufgrund unterschiedlicher Länge auf dem Agarosegel getrennt und analysiert werden. Die Mengenbestimmung erfolgte mittels densitometrischer Auswertung.

Durch mehrere Ansätze jeweils konstanter Target-Menge, jedoch in geometrischer Reihe abnehmender Kompetitor-Menge konnte ein Äquivalenzpunkt bestimmt werden, an welchem Kompetitor und Target in gleicher Menge vorlagen und so die Menge an Target-DNA bestimmt werden.

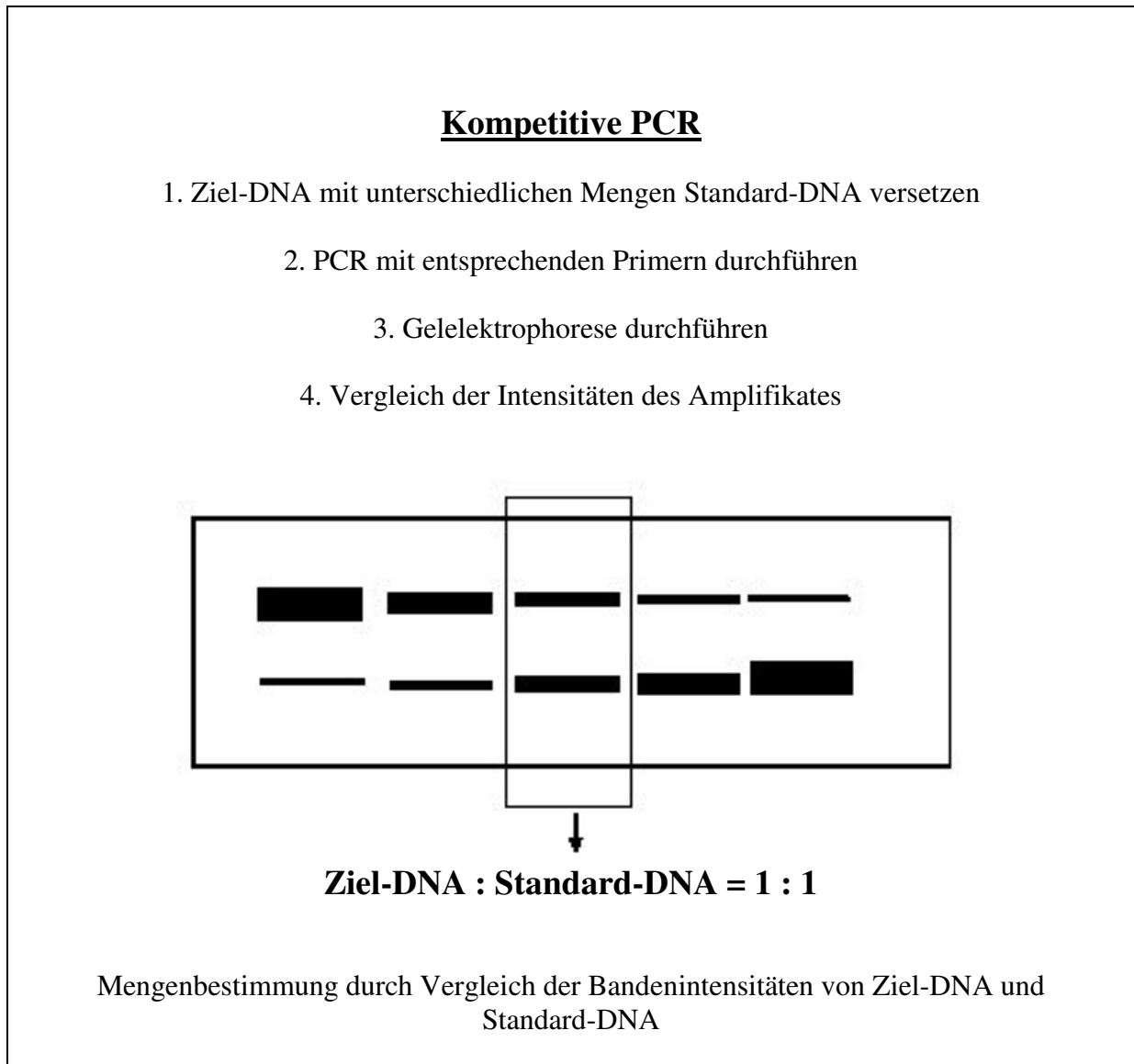


Abb. 5: Schema der kompetitiven PCR

Ein typischer Ansatz der kompetitiven PCR entsprach dem im Folgenden gezeigten Pipettierschema:

1. Primeransatz:

x	μl	Target-DNA
y	μl	Kompetitor
2	μl	sense-Primer
2	μl	reverse-Primer
z	μl	H ₂ O

Σ 10 μl

2. Premix:

1	μl	bzw	2	μl	DMSO
5	μl	bzw	10	μl	10 x Polymerasepuffer
30,68	μl	bzw	73,5	μl	H ₂ O
2	μl	bzw	2	μl	dNTP (je 2,5 mM)
1	μl	bzw	2	μl	25 mM MgCl ₂
0,32	μl	bzw	0,5	μl	DNA-Polymerase (1,25 U)

Σ 40 μl bzw 90 μl

Der Primeransatz wurde mit dem Premix gemischt und in dünnwandigen 0,5 ml-Gefäßen in den Thermocycler gegeben. Dort wurden bis zu 35 Zyklen mit in der Regel 3 Temperatursegmenten (Denaturierungsschritt, Primer-Annealingschritt und Primer-Extensionsschritt) durchgeführt. Überschritt der Primeransatz ein Volumen von 10 μl, so wurde das H₂O-Volumen im Premix entsprechend verringert. Temperatur und Dauer der Segmente wurden jeweils auf die zu amplifizierende DNA und die entsprechenden Primer optimiert.

2.2.10 Sequenzierung einzelsträngiger DNA

(nach Protokoll der Firma PE Applied Biosystems)

Einzelsträngige DNA wurde mit Hilfe des ABI PRISMTM-Systems der Fa. PE Applied Biosystems sequenziert. Der Methode liegt das Prinzip des Kettenabbruchs in der PCR durch Dideoxynukleotide zugrunde, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Im Einzelnen waren die Stopnukleotide folgendermaßen markiert:

Dideoxyadenosin mit R6G (N,N'-Diethyl-2',7'-dimethyl-6-carboxyrhodamin)

Dideoxycytidin mit ROX (6-Carboxy-X-rhodamin)

Dideoxyguanosin mit R110 (6-Carboxyrhodamin 110)

Dideoxythymidin mit TAMRA (N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxyrhodamin)

Zur Sequenzierung wurde der zuvor ethanolgefällten DNA nach dem folgenden Pipettierschema der Sequenzierungsprimer sowie ein Premix mit fluoreszierenden Dideoxynukleotiden, dNTP's, AmpliTaq[®] FS-Polymerasepuffer sowie AmpliTaq[®] FS-Polymerase zugegeben:

dsDNA (PCR-Produkt)	125	ng
Premix	8,0	µl
Primer	6,5	pmol
<hr/>		
H ₂ O ad	20	µl

Es wurden 25 Zyklen im Thermocycler bei folgenden Werten durchgeführt:

Denaturierungsschritt 30 sec bei 90°C

Annealingschritt 30 sec bei 50°C

Extensionsschritt 2 min bei 60°C

Im Anschluß wurden die Proben ethanolgefällt und mit je 4 µl Sequenzierungs-Probenpuffer versetzt, daraufhin wurden sie in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzen der Stopnukleotide an den Kettenenden automatisch analysiert.

2.2.11 Kathepsin-D-Assay

Die Aktivität von Kathepsin D wurde nach der Methode von Hasilik et al. (1982) mit Modifikationen von Horst und Hasilik (1991) unter Verwendung von [^{14}C] Hämoglobin ([^{14}C] Hb) bestimmt.

Herstellung von [^{14}C] Hämoglobin:

37 MBq (1 mCi) [^{14}C] KCNO (2,2 GBq/mmol) wurden in 430 μl 35 mM Tris/HCl (pH 8,5) in Gegenwart von 10 mg Hämoglobin (Typ I, Fa. Sigma, Deisenhofen) 24 h bei 37°C inkubiert. Das so präparierte radioaktive Substrat wurde anschließend zweimal 24 h gegen 10 mM Tris/HCl pH 7,4 dialysiert. Die Radioaktivitätskonzentration wurde auf 50000 cpm/ μl eingestellt.

Reagenzien und Lösungen:

[^{14}C]-Hb-Konzentrat:	[^{14}C] Hämoglobin (50000 cpm/ μl)
[^{14}C]-Hb-Vorverdünnung:	8 mg Hämoglobin Typ I 8 μl 1 M Tris/HCl pH 7,4 2 x 10 ⁶ cpm [^{14}C] Hämoglobin mit H ₂ O ad 800 μl
Substratlösung:	1 Teil [^{14}C]-Hb-Vorverdünnung 9 Teile 0,2 M Na-Acetat pH 3,65
Stopplösungen:	1 % (w/v) Casein 25 % (w/v) TCA

Durchführung:

Die Enzymprobe wurde auf 100 µl mit H₂O aufgefüllt, mit 100 µl Substratlösung versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Das im Ansatz vorhandene Kathepsin D baute nun das radioaktiv markierte und das unmarkierte Hämoglobin ab. Anschließend wurden 500 µl Caseinlösung und 500 µl TCA-Lösung zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und für 5 min in der Eppendorfzentrifuge bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert, um das nicht abgebaute Hämoglobin von den unter diesen Bedingungen nicht präzipitierbaren Bruchstücken abzutrennen. Dann wurde 1 ml des Überstandes mit den markierten und nichtmarkierten Fragmenten mit 2 ml Szintillationscocktail (Rotiszint, Fa. Roth, Karlsruhe) vermischt und im Flüssigkeitszintillationszähler analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung eines Kompetitors mittels In-vitro-Mutagenese

Zur Herstellung des Kompetitors für die kompetitive PCR wurde zunächst mRNA von Kathepsin D aus Gesamt-RNA von U937-Zellen präpariert, diese aufwärts von der Base Nr. 239 revers transkribiert und anschließend mittels PCR amplifiziert. Dieser Schritt ist im folgenden Schema dargestellt:

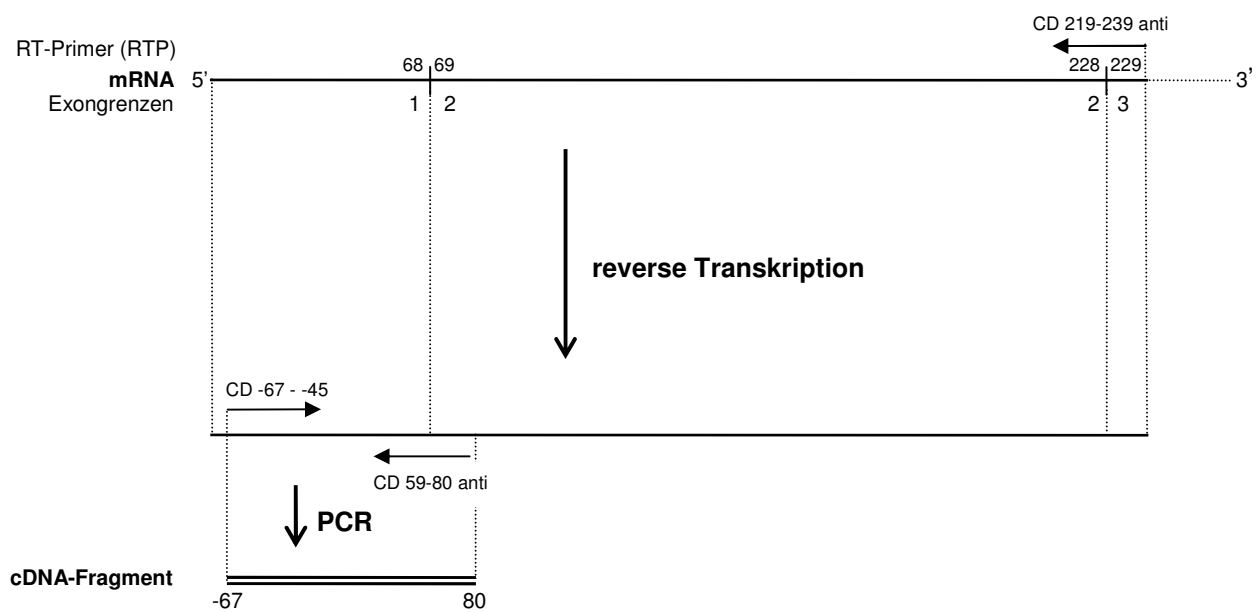


Abb. 6: Schema der reversen Transkription und der PCR

Es wurden folgende Oligonukleotide als Primer verwendet:

Reverser Transkriptionsprimer (RTP) CD 219-239 anti:

5' TAG TAC TGG GCG TCC ATG TAG 3'

Dieser Primer wurde so gewählt, daß er den Übergang vom zweiten zum dritten Exon abdeckt und auf diese Weise nicht an genomische DNA von Kathepsin D binden kann.

PCR-Primer V (sense-Primer) CD -67 - -45:

5' ACT GCG GCG TCA TCC CGG CTA TA 3'

Dieser Primer wurde so gewählt, daß er 5 Basen downstream von dem bei Rochefort et. al. (1993) beschriebenen Transkriptionsstartpunkt V (TSP V) bzw. 1 Base downstream von dem von Redecker et. al. (1991) beschriebenen Transkriptionsstartpunkt an die antisense-DNA binden konnte. So wurde mit diesem Primer die cDNA der längsten (am weitesten nach 5' reichenden) beschriebenen mRNA amplifiziert.

PCR-Primer CD 59-80 anti:

5' TGC AGC GGG ATC CTG ACG AGC G 3'

Dieser Primer wurde so gewählt, daß er den Übergang vom erstem zum zweiten Exon abdeckt und auf diese Weise nicht an genomische DNA von Kathepsin D binden kann.

Die PCR wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

35 Zyklen mit je 3 Segmenten: 30 sec bei 96°C, 30 sec bei 65°C, 45 sec bei 72°C.

Es wurde Taq-Polymerase verwendet.

Das so gewonnene cDNA-Fragment (ein 147mer) mit folgender Sequenz:

-67
 5' ACTGCGGCGT CATCCCGGCT ATAAGCGCAC GGCCTCGGCG ACCCTCTCCG
 ACCCGGCCGC CGCCGCCATG CAGCCCTCCA GCCTTCTGCC GCTCGCCCTC
 TGCCTGCTGG CTGCACCCGC CTCCGCGCTC GTCAGGATCC CGCTGCA 3'

80

wurde in einen pUC18-Vektor inkloniert. Hierzu wurde ein pUC18-Vektor mit *smal* linearisiert, mit dem PCR-Purification-Kit aufgereinigt und in H₂O aufgenommen. Das Fragment wurde mit T4-DNA-Ligase nach Protokoll in den Vektor ligiert. Im Anschluß wurden kompetente *E. coli*-Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert und auf LB/Ampicillinplatten ausplattiert. Ein positiver Klon wurde in LB/Ampicillin-Medium kultiviert und es wurde eine Plasmid-DNA-Mini-Präparation durchgeführt. Mit Hilfe der Primer V und CD 59-80 anti und den beiden flankierenden Primern pUC18 sense und pUC18 anti wurde mittels PCR die Orientierung des 147 bp-Fragmentes im

Plasmid festgestellt und eine neue Kultur angeimpft. Nach einer Plasmid-DNA-Maxi-Präparation des Vektors wurde die Mutagenese durchgeführt. Im Folgenden ist der sense-Strang des Vektors im Bereich zwischen den flankierenden Primern dargestellt:

```

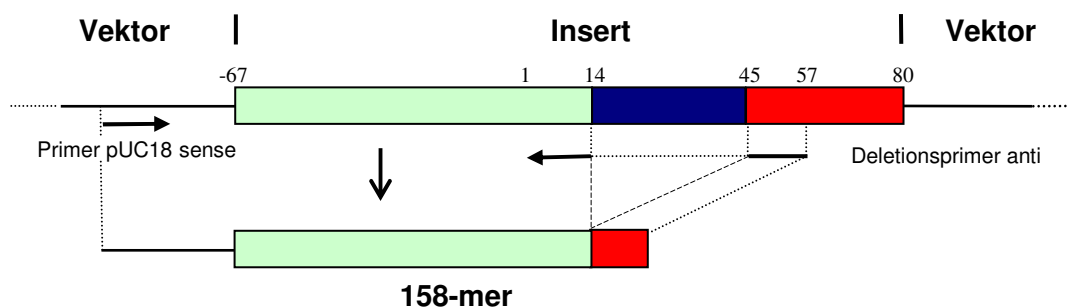
5' AGCGGATAAC AATTTACAC AGGAAACAGC TATGACCATG ATTACGAATT
   CGAGCTCGGT ACCCACTGCG GCGTCATCCC GGCTATAAGC GCACGGCCTC
   GGCGACCCTC TCCGACCCGG CCGCCGCCGC CATGCAGCCC TCCAGCCTTC
   TGCCGCTCGC CCTCTGCCTG CTGGCTGCAC CCGCCTCCGC GCTCGTCAGG
   ATCCCGCTGC AGGGGATCCT CTAGAGTCGA CCTGCAGGCA TGCAAGCTTG
   GCACTGGCCG TCGTTTTACA ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCG 3'

```

Abb. 7: Das 147 Bp lange Insert ist fett dargestellt. Die Primerbindungsstellen für die beiden flankierenden pUC18-Primer sind unterstrichen, der Bindungsbereich für den Deletionsprimer ist fett unterstrichen, der dazwischenliegende Bereich entspricht der zu erzeugenden Deletion.

Nun wurde die Mutagenese nach folgendem Schema durchgeführt:

PCR 1:



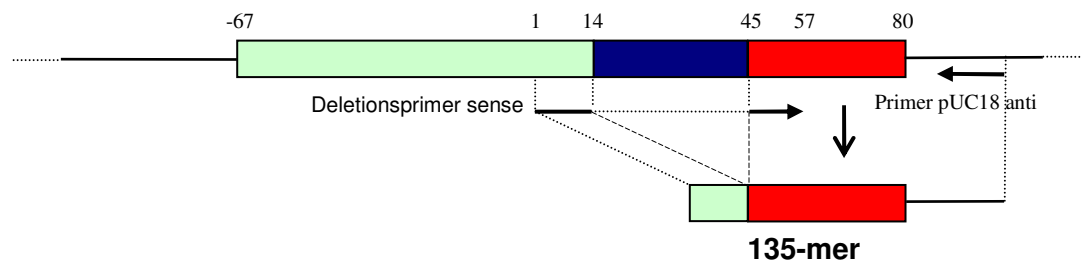
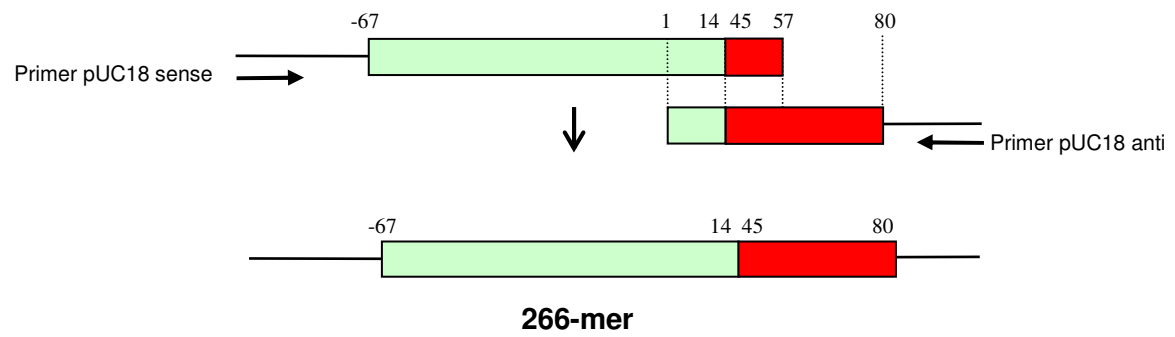
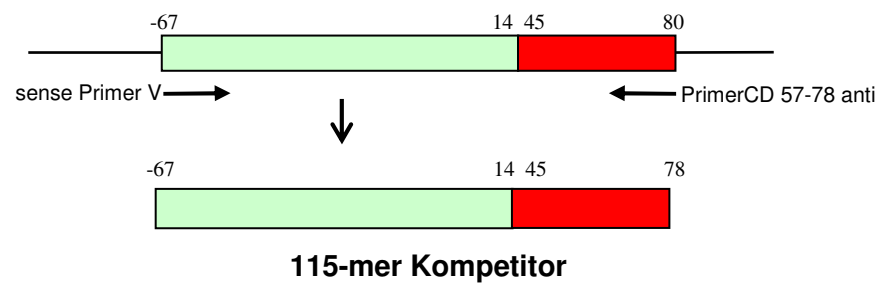
PCR 2:**PCR 3:****PCR 4:**

Abb. 8: Schema der Mutagenese

Mit Hilfe der In-vitro-Mutagenese wurde ein DNA-Strang erzeugt, der dem oben gezeigten bis auf eine Deletion von exakt 30 Bp entsprach. Die Mutagenese wurde mit folgenden Primern durchgeführt:

Primer pUC18 sense:

5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA 3'

Primer pUC18 anti:

5' CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3'

Deletionsprimer sense:

5' ¹ ATG CAG CCC TCC ^{14 45} AG | T ⁵⁷ GCA CCC GCC TCC 3'

Deletionsprimer anti:

5' ⁵⁷ GGA GGC GGG TGC ^{45 14} AC | T ¹ GGA GGG CTG CAT 3'

Es wurden mit Primer pUC18 sense und Deletionsprimer anti bzw. Primer pUC18 anti und Deletionsprimer sense zwei Halbstränge unter folgenden PCR-Bedingungen erzeugt (PCR 1 und PCR 2):

2 Zyklen mit: 1 min bei 95°C
 1 min bei 40°C
 1 min bei 72°C (für dieses Segment wurde mit 30°C/min
 aufgeheizt)

30 Zyklen mit: 1 min bei 95°C
 1 min bei 50°C
 1 min bei 72°C

Die beiden 158 Bp bzw. 135 Bp langen Halbstränge wurden nach elektrophoretischer Auftrennung im 3,5 % Agarosegel aus selbigem ausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurde eine PCR mit den beiden Halbsträngen und den beiden Primern pUC18 sense und pUC18 anti unter folgenden Bedingungen durchgeführt (PCR 3):

35 Zyklen mit: 1min bei 95°C
 1min bei 50°C
 1min bei 72°C

Dabei entstand ein 266 Bp langer Strang, welcher dem in Abb. 7 gezeigten bis auf die Deletion von 30 Bp entsprach. Sämtliche Schritte der In-vitro-Mutagenese wurden mit Pfu-DNA-Polymerase durchgeführt.

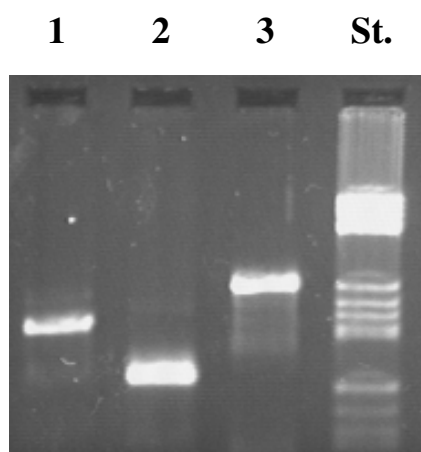


Abb. 9: Agarosegel der Mutagenese: Spur 1 zeigt den 158 Bp langen Halbstrang, Spur 2 den 135 Bp langen Halbstrang, Spur 3 den deletionsmutierten 266 Bp langen Strang, welcher aus der Überlappung der beiden Halbstränge entsteht. Spur 4 zeigt den Größenstandard (pBR322 geschnitten mit HaeIII, s. 2.2.2.2).

Der mutierte Strang (Kompetitor) wurde in beiden Richtungen sequenziert, die Sequenzierung ergab eine exakte Deletion von 30 Bp bei ansonsten 100 %iger Übereinstimmung mit dem in Abb. 7 gezeigten Mutterstrang.

Auf der folgenden Seite ist in Abb. 10 das Ergebnis der Sequenzierung dargestellt. Das dabei in Position 60 nicht identifizierte Nukleotid konnte durch Sequenzierung des Gegenstranges eindeutig als Guanodin identifiziert werden.

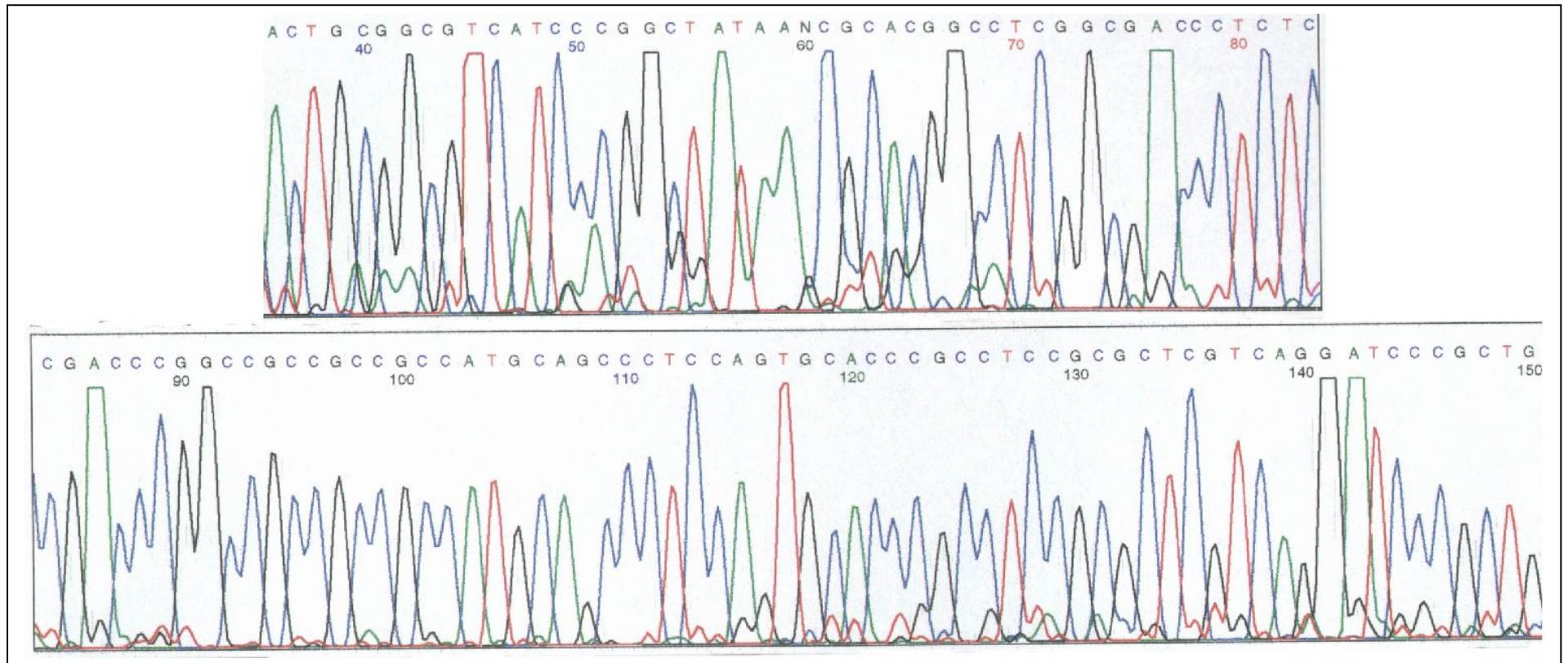


Abb. 10: Ergebnis der Sequenzierung des Sense-Stranges im Bereich der Deletionsmutation von 30 Bp.

Der Kompetitor konnte nun mittels PCR amplifiziert werden und nach Bestimmung der optischen Dichte auf die gewünschten Konzentrationen eingestellt werden. Zur Amplifikation wurden der Primer V (s. oben) sowie der Primer CD 57-78 anti benutzt:

PCR-Primer CD 57-78 anti:

5' CAG CGG GAT CCT GAC GAG CGC G 3'

Der fertige Kompetitor entsprach also einem 115mer mit folgender Sequenz:

5' ACTGCGGCGT CATCCCGGCT ATAAGCGCAC GGCCTCGGCG ACCCTCTCCG
 ACCCGGCCGC CGCCGCCATG CAGCCCTCCA GTGCACCCGC CTCCGCGCTC
 GTCAGGATCC CGCTG 3'

3.2 Untersuchung der Verteilung der Transkriptionsstartpunkte

Die Untersuchung der Verteilung der Transkriptionsstartpunkte für Kathepsin D bei U937-Zellen wurde exemplarisch für drei Startpunkte untersucht. Diese Startpunkte entsprachen den bei Rochefort et. al. (1993) beschriebenen Transkriptionsstartpunkten V, II und I. Nach Präparation von RNA aus U937-Zellen wurde daraus mRNA isoliert, anschließend wurde revers transkribiert. Es wurden jeweils mehrere reverse Transkriptate gepoolt (RT-Pool). In diesem Pool lagen nun reverse Transkriptate vor, die - abhängig vom Transkriptionsstartpunkt der mRNA - unterschiedliche Längen aufwiesen. Zur Untersuchung des absoluten Gehaltes an mRNA eines bestimmten Startpunktes wurden nun mehrere Ansätze mit jeweils der gleichen Menge an RT-Pool, jedoch in geometrischer Reihe abnehmender Menge an Kompetitor mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden ein für den betreffenden Startpunkt spezifischer sense-Primer und der Primer CD 57-78 anti benutzt. Durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel und anschließende densitometrische Auswertung konnte ein Äquivalenzpunkt bestimmt werden, an dem RT-Pool und Kompetitor in gleicher Menge vorlagen.

Es wurden folgende Primer verwendet:

Primer I:

5' GAC CCG GCC GCC GCC GCC AT 3' (-18 bis +2)

Er beginnt 2 bp in 3'-Richtung von Transkriptionsstartpunkt I (TSP I)

Primer II:

5' CGC ACG GCC TCG GCG ACC CT 3' (-42 bis -23)

Er beginnt 2 bp in 3'-Richtung von Transkriptionsstartpunkt II (TSP II)

Primer V:

5' ACT GCG GCG TCA TCC CGG CTA TA 3' (-67 bis -45)

Er beginnt 5 bp in 3'-Richtung von Transkriptionsstartpunkt V (TSP V)

Im Folgenden ist die Methode dargestellt: Zur Demonstration wurde ein mit Primer V und Primer CD 57-78 anti amplifiziertes DNA-Fragment auf eine Konzentration von 0,3 pg/ μ l eingestellt. Pro PCR-Ansatz wurde je 1 μ l dieser Lösung verwendet. Anschließend wurde für jeden Startpunkt eine Mengenbestimmung dieses Testfragmentes mittels kompetitiver PCR vorgenommen. Da das Testfragment mit Primer V hergestellt wurde, beinhaltet es auch die Bindungsstellen für Primer II und Primer I. Somit müssen in diesem Fall alle drei Mengenbestimmungen zum gleichen Ergebnis führen.

Die kompetitive PCR wurde mit 35 Zyklen bei folgenden Parametern durchgeführt:

30 sec. bei 96°C

30 sec. bei 65°C

45 sec. bei 72°C

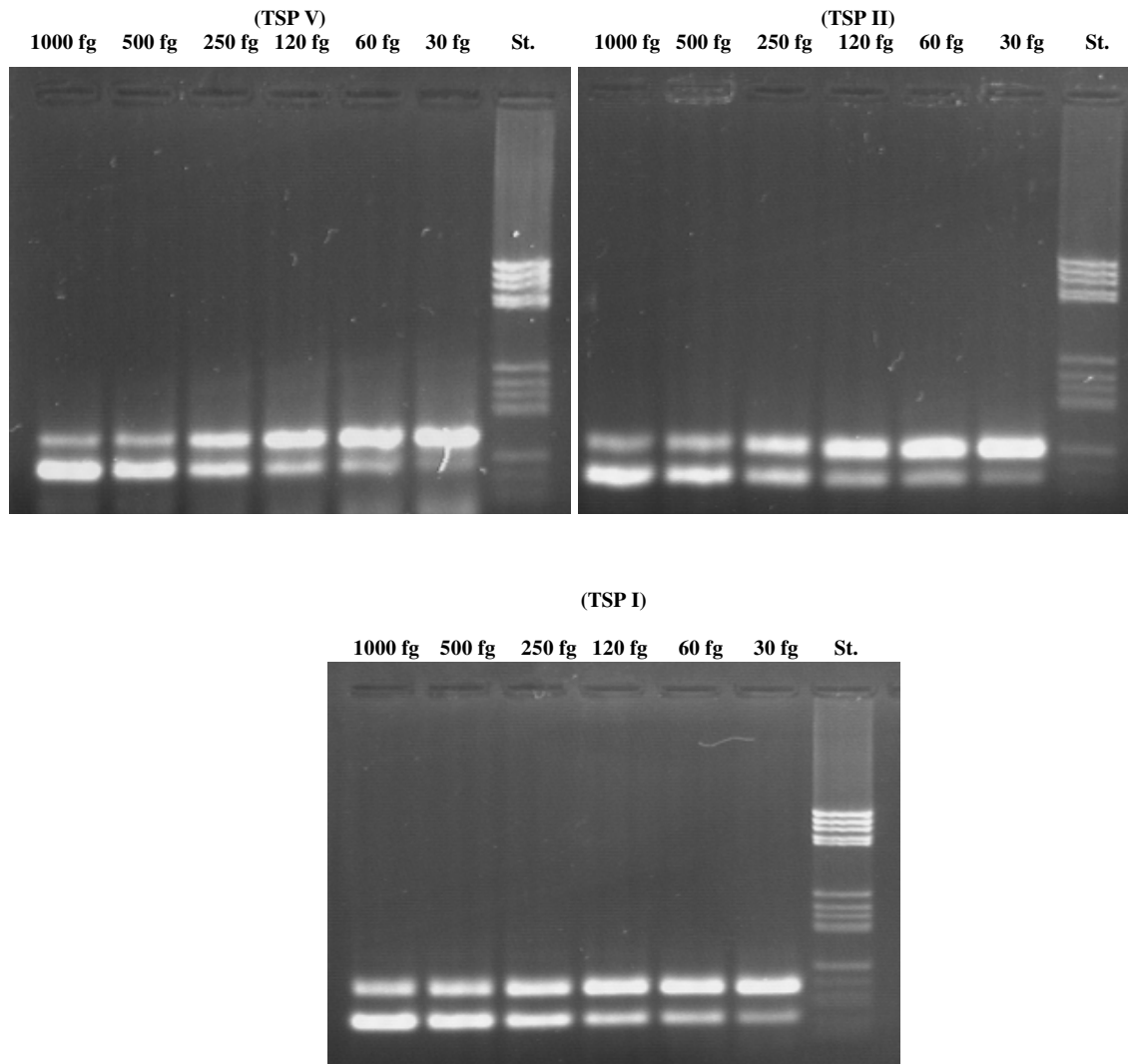


Abb. 11: Mengenbestimmungen für die Transkriptionsstartpunkte V, II und I. Über jeder Spur ist die Menge des Kompetitors im jeweiligen PCR-Ansatz vermerkt, die Targetmenge war in jedem PCR-Ansatz identisch.

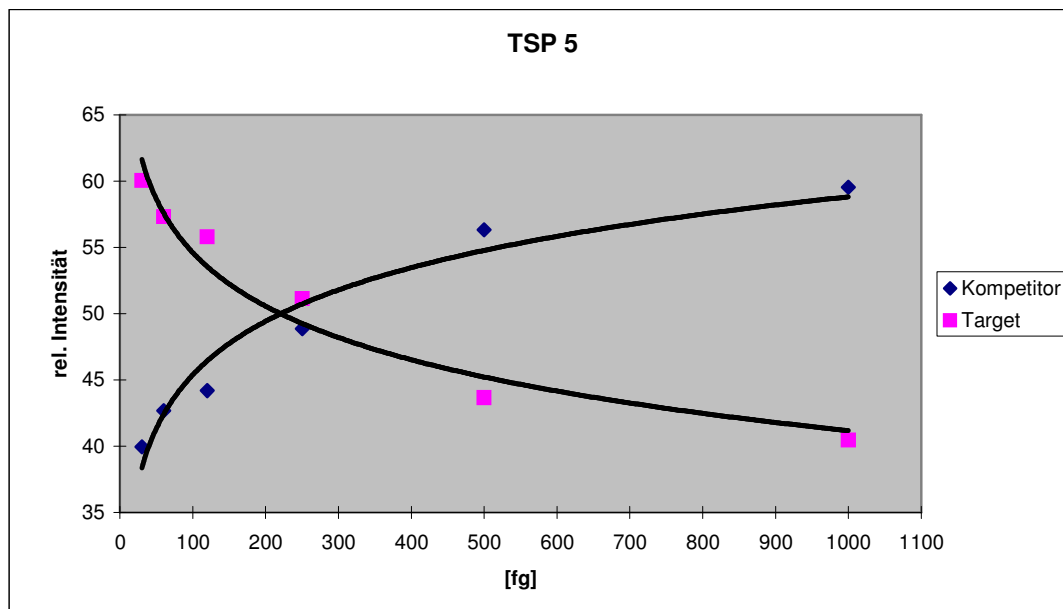
Das Target entspricht der jeweils oberen Bande, der um 30 Bp kürzere Kompetitor der jeweils unteren Bande. Es ist erkennbar, daß das Target um so stärker amplifiziert wurde, je niedriger die Menge an Kompetitor im PCR-Ansatz war, bei äquimolarem Vorliegen wären beide Banden gleich stark.

Die Intensität der Banden wurde densitometrisch bestimmt. Die Intensitäten der jeweiligen Bandenpaare wurden summiert und gleich 100 % gesetzt. Die Intensitäten der Einzelbanden wurden in Prozent der jeweiligen Summe angegeben und graphisch als relative Intensitäten

gegen die Kompetitormenge aufgetragen. Anschließend wurde für die Meßwerte sowohl des Kompetitors als auch des Targets eine Ausgleichskurve erstellt, welche logarithmischen Charakter hat. Der Schnittpunkt der beiden Kurven entspricht derjenigen Menge, an welcher Kompetitor und Target mit gleicher relativer Intensität und somit annähernd äquimolar vorliegen. So konnte für jeden Transkriptionsstartpunkt die Targetmenge ermittelt werden.

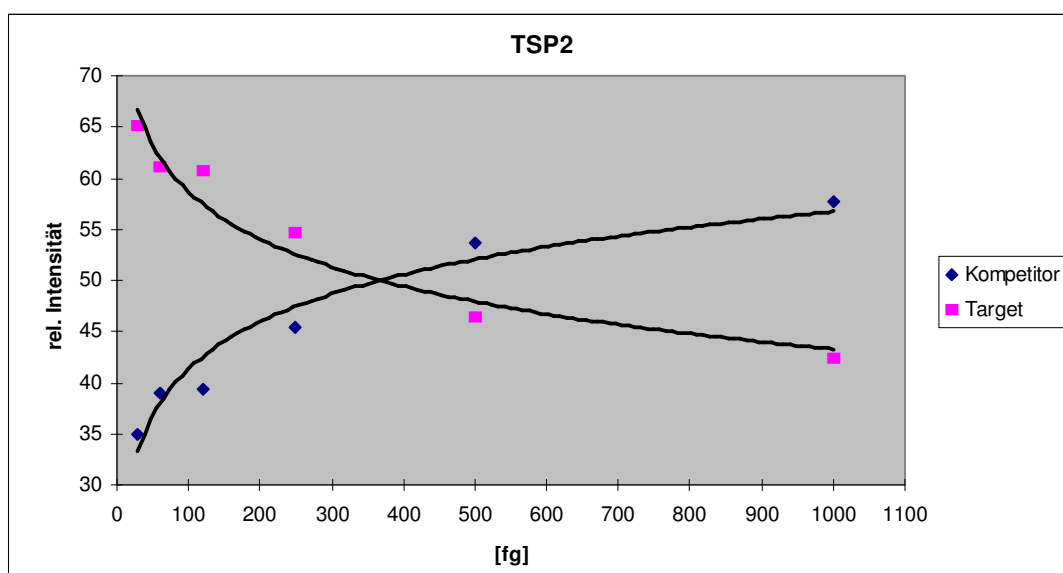
Primer V:

[fg]	Intensität Kompetitor	Intensität Target	rel. Intensität Kompetitor	rel. Intensität Target
1000	174.442	118.527	59.54	40.46
500	162.645	126.034	56.34	43.66
250	150.323	157.313	48.86	51.14
120	139.573	176.291	44.19	55.81
60	137.527	184.84	42.66	57.34
30	125.41	188.435	39.96	60.04



Primer II:

[fg]	Intensität Kompetitor	Intensität Target	rel. Intensität Kompetitor	rel. Intensität Target
1000	156.317	114.217	57.78	42.22
500	148.081	128.206	53.60	46.40
250	129.203	155.228	45.43	54.57
120	113.272	174.98	39.30	60.70
60	117.368	183.634	38.99	61.01
30	100.952	188.039	34.93	65.07



Primer I:

[fg]	Intensität Kompetitor	Intensität Target	rel. Intensität Kompetitor	rel. Intensität Target
1000	180.682	148.696	54.86	45.14
500	175.075	159.378	52.35	47.65
250	160.192	170.359	48.46	51.54
120	141.825	180.905	43.95	56.05
60	134.386	179.211	42.85	57.15
30	120.133	184.044	39.49	60.51

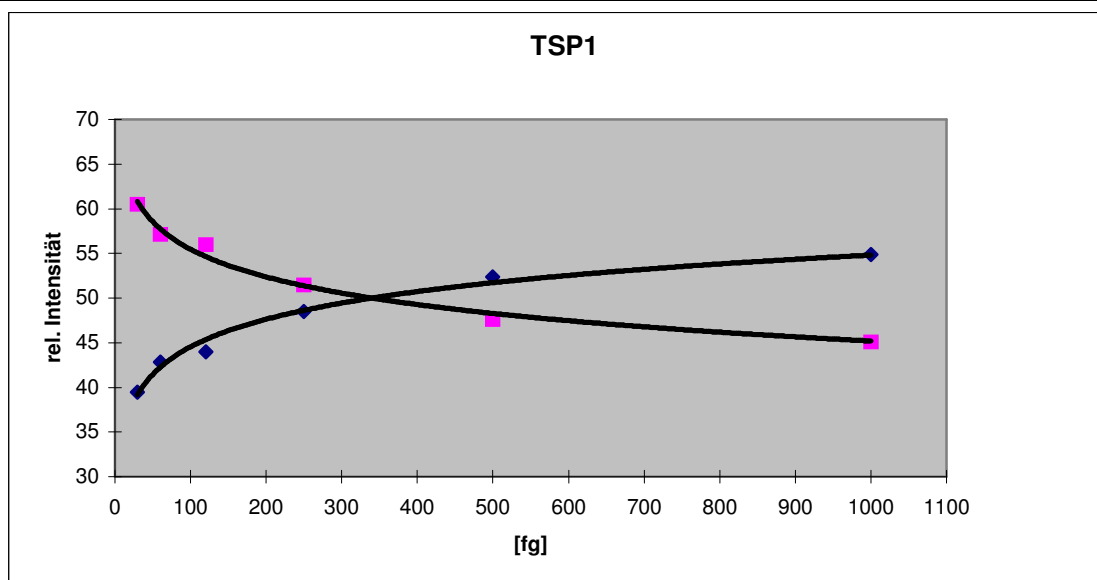


Abb. 12: Wie erwartet führen alle drei Messungen zu einer annähernd gleichen Target-Menge, die Werte betragen 220, 340 und 360 fg.

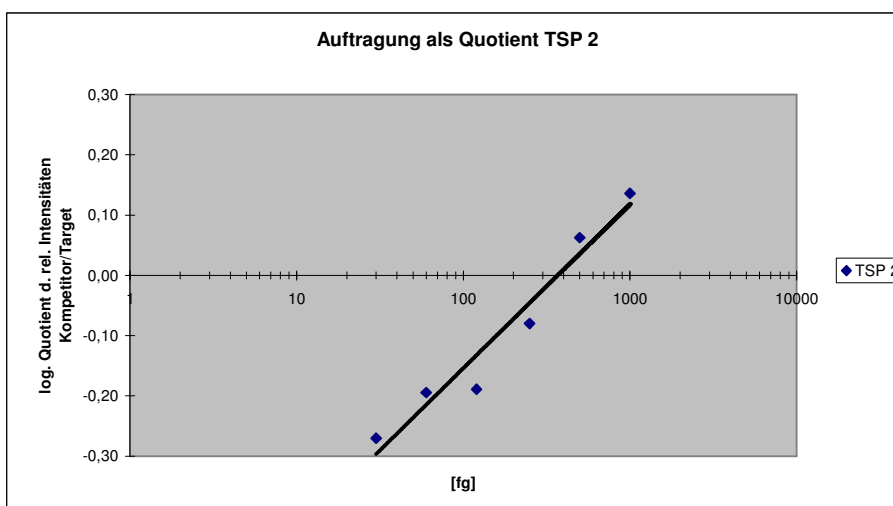
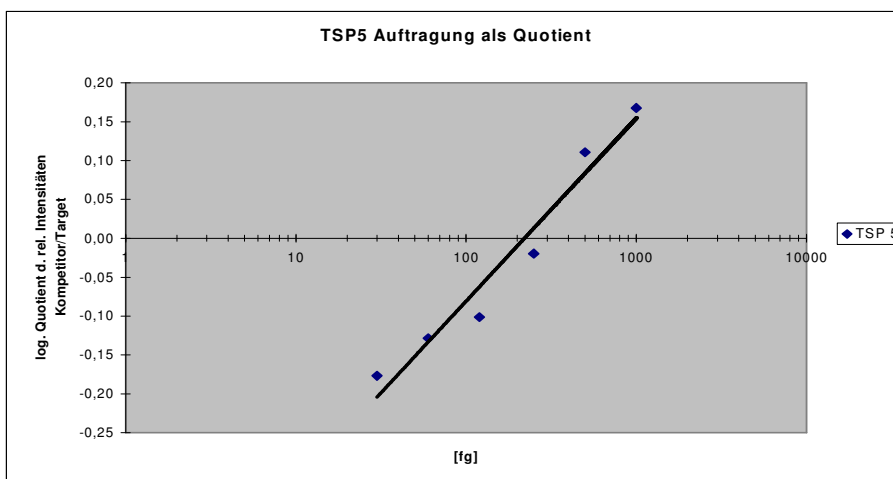
Aus den oben genannten Werten ergibt sich eine Standardabweichung von 75,72. Dies entspricht einem Variationskoeffizienten von 24,69 %, die mittlere Abweichung beträgt 57,78 (Formeln s. S. 63).

Die geringfügigen Abweichungen zwischen den 3 Werten lassen darauf schließen, daß der Nachweis der längeren DNA-Abschnitte nur unvollständig gelingt. Aufgrund dieser methodenbedingten Verzerrung der Werte von 360 : 360 : 360 auf 220 : 340 : 360 (also einer Abweichung vom erwarteten Wert 1:1:1), wurden Korrekturfaktoren für die verschiedenen Messungen bestimmt:

Korrekturfaktor für Primer V: $^{360}/_{220}$

Korrekturfaktor für Primer II: $^{360}/_{340}$

Eine weitere Möglichkeit der graphischen Auswertung besteht darin, den logarithmierten Quotienten der jeweiligen relativen Intensitäten von Kompetitor und Target gegen den Logarithmus der Kompetitor-Menge aufzutragen, wie in Abb. 13 gezeigt.



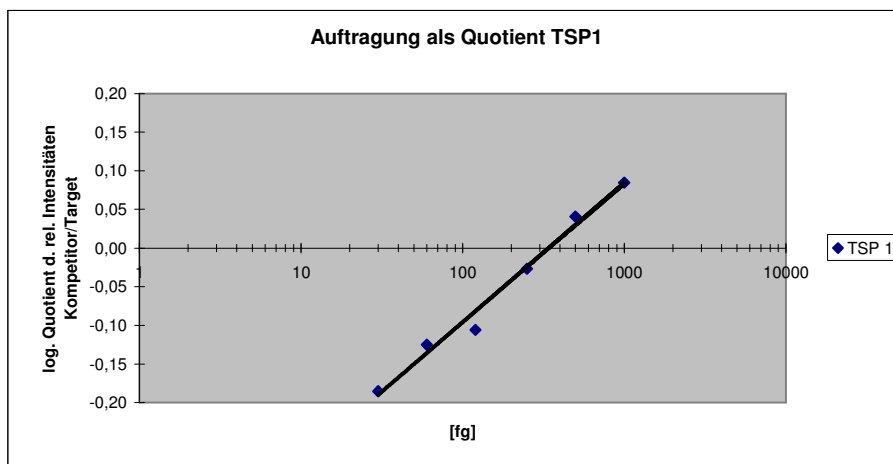


Abb. 13 : Darstellung als logarithmierter Quotient der jeweiligen relativen Intensitäten von Kompetitor und Target gegen den Logarithmus der Kompetitor-Menge.

3.2.1 U937-Zellen ohne Calcitriol-Stimulierung

Die Verteilung der Transkriptionsstartpunkte bei nicht mit Calcitriol stimulierten U937-Zellen wurde wie oben gezeigt mit den Primern I, II und V untersucht. Die Ergebnisse ermöglichten es, die Mengen der Transkripte mit den Startstellen I, II bis IV sowie V zu berechnen. Von der mit dem Primer I experimentell bestimmten mRNA-Menge wurde die mit dem Primer II experimentell bestimmte mRNA-Menge subtrahiert, um die Menge der von Startpunkt I transkribierten mRNA zu ermitteln. Die Menge der von den Startstellen II bis IV transkribierten mRNA wurde durch Subtraktion des mit dem Primer V erzielten Ergebnisses von dem mit dem Primer II erzielten Ergebnis errechnet. Die Messungen mit dem Primer V ergaben die Menge der an der Startstelle V transkribierten mRNA.

Es wurden zwei Messungen durchgeführt: Hierzu wurde mRNA aus $1,2 \cdot 10^8$ U937-Zellen, welche nicht mit Calcitriol stimuliert wurden, isoliert. Dies entsprach $7,45 \mu\text{g}$ mRNA. Im Anschluß wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt, das Pellet wurde in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen, um direkt anschließend die reverse Transkription durchzuführen, das Gesamtvolumen betrug nach reverser Transkription $100 \mu\text{l}$.

Pro PCR-Ansatz wurden $2 \mu\text{l}$ dieses reversen Transkriptats eingesetzt (entsprechend $2,4 \cdot 10^6$ Zellen).

Bei **Messung 1** ergaben sich folgende Mengen an gebildetem Transkript (Rohwerte):

Primer I :	190 fg
Primer II:	120 fg
Primer V:	40 fg

Daraus folgt für die Differenzen:

Startstelle I :	$190 \text{ fg} - 120 \text{ fg} = 70 \text{ fg}$ cDNA von CD-mRNA mit Startstelle I
Startstelle II-IV:	$120 \text{ fg} - 40 \text{ fg} = 80 \text{ fg}$ cDNA von CD-mRNA mit Startstelle II-IV
Startstelle V:	40 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle V

Daraus folgt für das Verhältnis der Transkriptionsstartpunkte:

Startstelle V : Startstelle II-IV : Startstelle I = 1 : 2 : 1,75

Führt man nun die Korrektur der zuvor beschriebenen methodenbedingten Verzerrung mit den entsprechenden Korrekturfaktoren durch (Korrekturfaktor für Primer V: $^{360}/_{220}$, Korrekturfaktor für Primer II: $^{360}/_{340}$), so ergeben sich folgende Rohwerte:

Primer I:	190 fg
Primer II:	127 fg
Primer V:	65,5 fg

Daraus folgt für die Differenzen:

Startstelle I: 62,90 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle I

Startstelle II-IV: 61,60 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle II-IV

Startstelle V: 65,50 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle V

Daraus folgt für das Verhältnis der Transkriptionsstartpunkte nach Korrektur:

Startstelle V : Startstelle II-IV : Startstelle I = 1 : 0,94 : 0,96

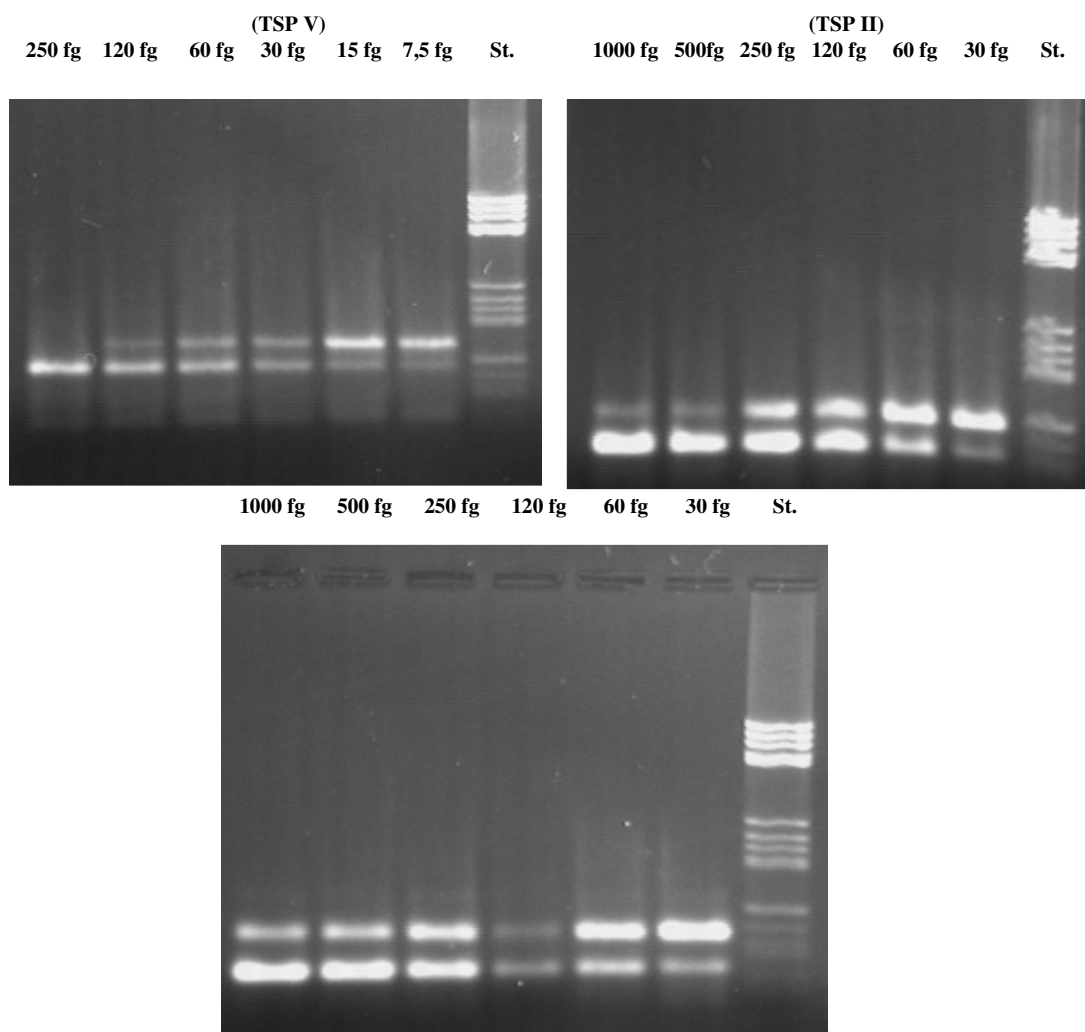


Abb. 14: Agarosegelelektrophorese von Messung 1

Bei **Messung 2** ergaben sich folgende Mengen an gebildetem Transkript (Rohwerte):

Primer I: 710 fg
 Primer II: 280 fg
 Primer V: 110 fg

Daraus folgt für die Differenzen:

Startstelle I: 430 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle I
 Startstelle II-IV: 170 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle II-IV
 Startstelle V: 110 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle V

Daraus folgt für das Verhältnis der Transkriptionsstartpunkte:

Startstelle V : Startstelle II-IV : Startstelle I = 1 : 1,5 : 3,9

Führt man nun die Korrektur der zuvor beschriebenen methodenbedingten Verzerrung mit den entsprechenden Korrekturfaktoren durch (Korrekturfaktor für Primer V: $^{360}/_{220}$, Korrekturfaktor für Primer II: $^{360}/_{340}$), so ergeben sich folgende Rohwerte:

Primer I: 710 fg
 Primer II: 296,5 fg
 Primer V: 180 fg

Daraus folgt für die Differenzen:

Startstelle I: 413,5 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle I
 Startstelle II-IV: 116,5 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle II-IV
 Startstelle V: 180 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle V

Daraus folgt für das Verhältnis der Transkriptionsstartpunkte nach Korrektur:

Startstelle V : Startstelle II-IV : Startstelle I = 1 : 0,65 : 2,3

3.2.2 U937-Zellen mit Calcitriol-Stimulierung

Für die Calcitriol-Stimulierung wurden die U937-Zellen für 3-4 Tage in Gegenwart von 10^{-7} M Calcitriol kultiviert. Zum Nachweis der Effizienz der Stimulierung wurde ein Kathepsin-D-Assay durchgeführt. Es wurde dabei die Aktivität von Kathepsin D aus Zelllysaten von stimulierten U937-Zellen mit der Aktivität von Kathepsin D aus Zelllysaten von unstimulierten U937-Zellen verglichen. Dabei ergab sich bei den stimulierten Zellen eine Aktivitätssteigerung um das 2,4- bis 5,1-fache.

Es wurden drei Messungen durchgeführt.

Hierzu wurde mRNA aus $1,06 \cdot 10^8$ U937-Zellen, welche mit 10^{-7} M Calcitriol stimuliert wurden, isoliert. Dies entsprach $4,17 \mu\text{g}$ mRNA. Im Anschluß wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt, das Pellet wurde in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen, um direkt anschließend die reverse Transkription durchzuführen, das Gesamtvolumen betrug nach reverser Transkription $100 \mu\text{l}$ und wurde anschließend auf $500 \mu\text{l}$ verdünnt.

Bei Messung 1 und bei Messung 2 wurden pro PCR-Ansatz je $2 \mu\text{l}$ dieses reversen Transkriptats eingesetzt (entsprechend $4,24 \cdot 10^5$ Zellen), bei Messung 3 wurden pro PCR-Ansatz je $5 \mu\text{l}$ dieses reversen Transkriptates eingesetzt (entsprechend $1,06 \cdot 10^6$ Zellen).

Die Untersuchung und Auswertung der Transkriptionsstartpunktverteilung wurde wie oben gezeigt vorgenommen. Dabei ergaben sich die folgenden Transkriptionsstartpunktverteilungen :

Bei **Messung 1** ergaben sich folgende Mengen an gebildetem Transkript (Rohwerte):

Primer I :	370 fg
Primer II:	200 fg
Primer V:	90 fg

Daraus folgt für die Differenzen:

Startstelle I : $370 \text{ fg} - 200 \text{ fg} = 170 \text{ fg}$ cDNA von CD-mRNA mit Startstelle I

Startstelle II-IV: $200 \text{ fg} - 90 \text{ fg} = 110 \text{ fg}$ cDNA von CD-mRNA mit Startstelle II-IV

Startstelle V: 90 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle V

Daraus folgt für das Verhältnis der Transkriptionsstartpunkte:

Startstelle V : Startstelle II-IV : Startstelle I = 1 : 1,2 : 1,9

Führt man nun die Korrektur der zuvor beschriebenen methodenbedingten Verzerrung mit den entsprechenden Korrekturfaktoren durch (Korrekturfaktor für Primer V: $^{360}/_{220}$, Korrekturfaktor für Primer II: $^{360}/_{340}$), so ergeben sich folgende Rohwerte:

Primer I: 370 fg

Primer II: $211,8 \text{ fg}$

Primer V: $147,3 \text{ fg}$

Daraus folgt für die Differenzen:

Startstelle I: $158,2 \text{ fg}$ cDNA von CD-mRNA mit Startstelle I

Startstelle II-IV: $64,5 \text{ fg}$ cDNA von CD-mRNA mit Startstelle II-IV

Startstelle V: $147,3 \text{ fg}$ cDNA von CD-mRNA mit Startstelle V

Daraus folgt für das Verhältnis der Transkriptionsstartpunkte nach Korrektur:

Startstelle V : Startstelle II-IV : Startstelle I = 1 : 0,44 : 1,07

Bei **Messung 2** ergaben sich folgende Mengen an gebildetem Transkript (Rohwerte):

Primer I: 1250 fg
 Primer II: 750 fg
 Primer V: 250 fg

Daraus folgt für die Differenzen:

Startstelle I: 500 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle I
 Startstelle II-IV: 500 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle II-IV
 Startstelle V: 250 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle V

Daraus folgt für das Verhältnis der Transkriptionsstartpunkte:

Startstelle V : Startstelle II-IV : Startstelle I = 1 : 2 : 2

Führt man nun die Korrektur der zuvor beschriebenen methodenbedingten Verzerrung mit den entsprechenden Korrekturfaktoren durch (Korrekturfaktor für Primer V: $^{360}/_{220}$, Korrekturfaktor für Primer II: $^{360}/_{340}$), so ergeben sich folgende Rohwerte:

Primer I: 1250 fg
 Primer II: 794,1 fg
 Primer V: 409,1 fg

Daraus folgt für die Differenzen:

Startstelle I: 455,9 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle I
 Startstelle II-IV: 385,0 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle II-IV
 Startstelle V: 409,1 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle V

Daraus folgt für das Verhältnis der Transkriptionsstartpunkte nach Korrektur:

Startstelle V : Startstelle II-IV : Startstelle I = 1 : 0,94 : 1,11

Bei **Messung 3** ergaben sich folgende Mengen an gebildetem Transkript (Rohwerte):

Primer I: 1020 fg
 Primer II: 700 fg
 Primer V: 440 fg

Daraus folgt für die Differenzen:

Startstelle I: 320 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle I
 Startstelle II-IV: 260 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle II-IV
 Startstelle V: 440 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle V

Daraus folgt für das Verhältnis der Transkriptionsstartpunkte:

Startstelle V : Startstelle II-IV : Startstelle I = 1 : 0,6 : 0,7

Führt man nun die Korrektur der zuvor beschriebenen methodenbedingten Verzerrung mit den entsprechenden Korrekturfaktoren durch (Korrekturfaktor für Primer V: $^{360}/_{220}$, Korrekturfaktor für Primer II: $^{360}/_{340}$), so ergeben sich folgende Rohwerte:

Primer I: 1020 fg
 Primer II: 741,2 fg
 Primer V: 720 fg

Daraus folgt für die Differenzen:

Startstelle I: 278,8 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle I
 Startstelle II-IV: 21,2 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle II-IV
 Startstelle V: 720 fg cDNA von CD-mRNA mit Startstelle V

Daraus folgt für das Verhältnis der Transkriptionsstartpunkte nach Korrektur:

Startstelle V : Startstelle II-IV : Startstelle I = 1 : 0,03 : 0,39

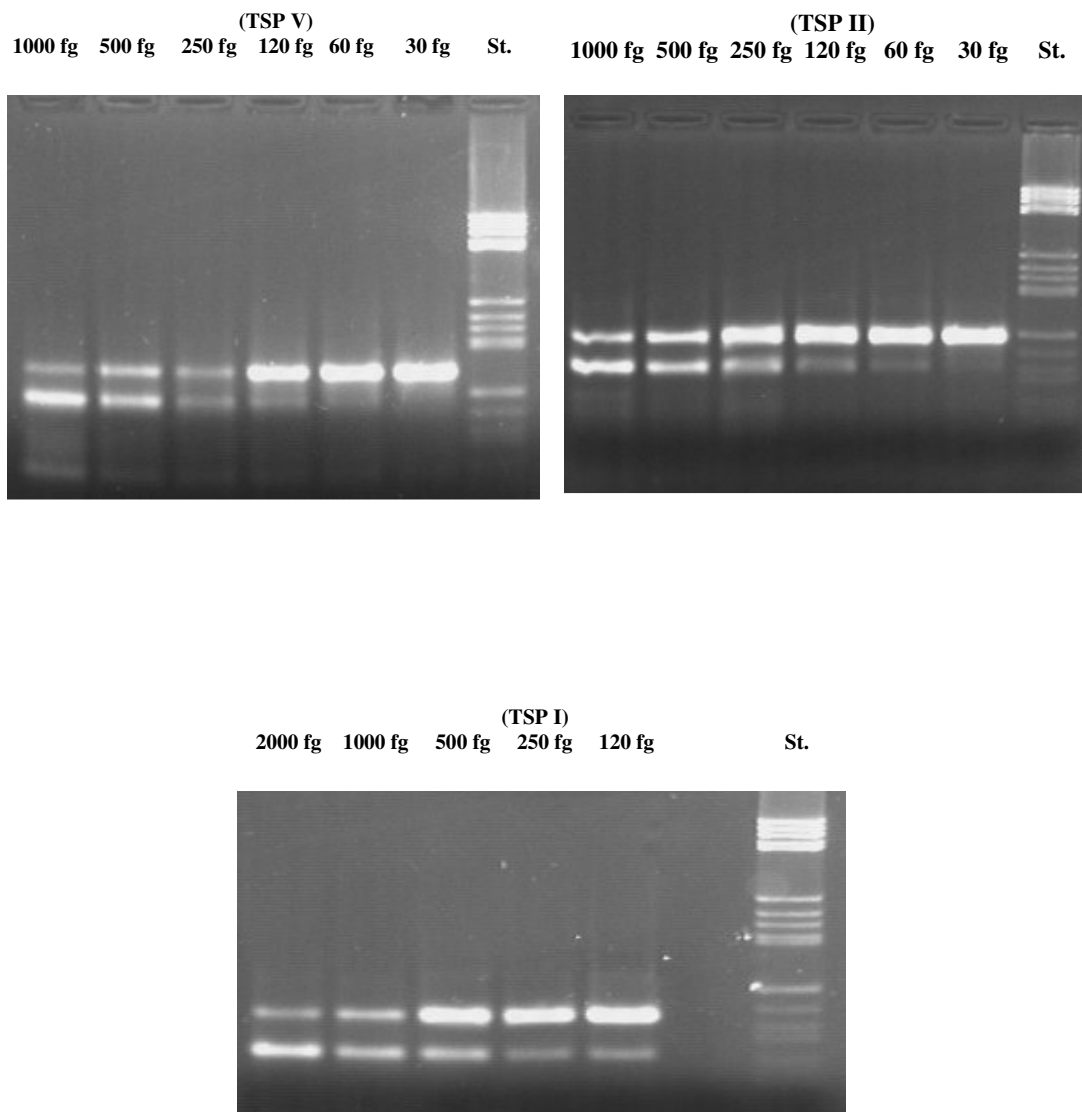


Abb. 15: Exemplarisch ist hier die Agarosegelelektrophorese der 3. Messung dargestellt.

3.2.3 Berechnung in Mol Transkript pro Zelle

Bei den in den oben dargestellten Messungen ermittelten Werten handelt es sich um Mengenangaben, die Äquivalenzwerte des Kompetitors darstellen. Um diese Werte mitteln zu können, wurden sie in Mole umgerechnet (mit dem Molekulargewicht des jeweils amplifizierten Fragmentes als Grundlage) und auf die Ausgangszellzahl bezogen. Für die Berechnung wurde von einem Molekulargewicht von durchschnittlich $649 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ / Basenpaar DNA ausgegangen.

Somit ergibt sich als Berechnungsgrundlage für das mit Primer I amplifizierte cDNA-Fragment (ein 98-mer) ein Molekulargewicht von $63602 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, für das mit Primer II amplifizierte cDNA-Fragment (ein 122-mer) ein Molekulargewicht von $79178 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und für das mit Primer V amplifizierte cDNA-Fragment (ein 147-mer) ein Molekulargewicht von $95403 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Die folgende Tabelle zeigt das Ergebnis der Berechnungen:

	[10 ⁻²⁵ mol Transkript pro Zelle] (vor Korrektur)				[10 ⁻²⁵ mol Transkript pro Zelle] (nach Korrektur)			
	Startstelle I	Startstelle II-IV	Startstelle V	Σ Startstellen I + II-IV + V	Startstelle I	Startstelle II-IV	Startstelle V	Σ Startstellen I + II-IV + V
1. Messung (- Calcitriol)	4,59	4,21	1,75	10,55	4,12	3,24	2,86	10,22
2. Messung (- Calcitriol)	28,17	8,95	4,80	41,92	27,09	6,13	7,86	41,08
arithm. Mittel (- Calcitriol)	16,38	6,58	3,28	26,24	15,61	4,69	5,36	25,65
SA (- Calcitriol)	± 16,67	± 3,35	± 2,16	± 22,18	± 16,24	± 2,04	± 3,54	± 21,82
VK (- Calcitriol)	101,8%	50,9%	65,9%	84,6%	104,1%	43,6%	66,0%	85,1%
1. Messung (+ Calcitriol)	63,04	32,77	22,25	118,06	58,66	19,21	36,42	114,29
2. Messung (+ Calcitriol)	185,41	148,94	61,8	396,15	169,06	114,68	101,14	384,88
3. Messung (+ Calcitriol)	47,47	30,98	43,51	121,96	41,35	2,53	71,20	115,08
arithm. Mittel (+ Calcitriol)	98,64	70,90	42,52	212,06	89,69	45,47	69,59	204,75
SA (+ Calcitriol)	± 75,55	± 67,59	± 19,79	± 159,44	± 69,28	± 60,51	± 32,39	± 156,00
VK (+ Calcitriol)	76,6%	95,3%	46,6%	75,2%	77,2%	133,1%	46,5%	76,2%

In obiger Tabelle entspricht SA der Standardabweichung, berechnet nach der Formel

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right)}$$

und VK entspricht dem Variationskoeffizienten in Prozent:

$$VK = \frac{s}{\bar{x}}$$

$$VK(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Die Werte in der Spalte „ Σ Startstellen I + II-IV + V“ entsprechen der Summe der Einzelmolaritäten und somit der Gesamtmolarität (in 10^{-25} mol pro Zelle). Sie geben also die Gesamtmenge an Transkript pro Zelle an.

Betrachtet man nun die gemittelten Werte in Hinblick auf die Verteilung der Transkriptionsstartpunkte, so ergibt sich für nicht mit Calcitriol stimulierte U937-Zellen folgendes Verhältnis der Transkriptionsstartpunkte:

Startstelle V : Startstelle II-IV : Startstelle I = 1 : 2 : 5 vor der Korrektur

bzw.

Startstelle V : Startstelle II-IV : Startstelle I = 1 : 0,87 : 2,91 nach der Korrektur.

Für die mit Calcitriol stimulierten U937-Zellen ergibt sich folgendes Verhältnis der Transkriptionsstartpunkte :

Startstelle V : Startstelle II-IV : Startstelle I = 1 : 1,67 : 2,32 vor der Korrektur

bzw.

Startstelle V : Startstelle II-IV : Startstelle I = 1 : 0,65 : 1,29 nach der Korrektur.

4 Diskussion

4.1 Herstellung des Kompetitors mittels In-vitro-Mutagenese

Die Deletion von 30 Bp aus der cDNA von Kathepsin D mittels In-vitro-Mutagenese konnte, wie durch die anschließende Sequenzierung gezeigt wurde, genau und effizient durchgeführt werden. Durch die Sequenzierung konnte ferner gezeigt werden, daß die an die Deletion grenzenden Sequenzen nicht verändert wurden. Bis auf die Deletion besteht eine Übereinstimmung mit der ursprünglichen Sequenz von 100 %.

4.2 Vergleich der Transkriptionsstartpunktverteilung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei der Transkription von Kathepsin D in U937-Zellen mehrere Transkriptionsstartpunkte mit unterschiedlicher Häufigkeit genutzt werden.

Bei Calcitriol-stimulierten Zellen wird deutlich mehr Kathepsin-D-mRNA pro Zelle synthetisiert als bei Kontrollzellen. Die erhöhte Synthese beruht auf einer Steigerung der Transkription an mehreren Startstellen. Die Transkriptmenge für Kathepsin-D-mRNA liegt bei calcitriolstimulierten U937-Zellen durchschnittlich etwa 8-fach höher als bei Kontrollzellen.

Mittels Kathepsin-D-Assay wurde eine Steigerung der spezifischen Aktivität von Kathepsin D nach Calcitriol-Behandlung von U937-Zellen auf das 5-fache gefunden. Der geringere Anstieg der Aktivität im Vergleich zu dem der mRNA kann auf einer Steigerung des Abbaus des Kathepsin-D-Proteins in Folge der Erhöhung seiner Konzentration beruhen.

Redecker et al. haben 1991 über einen qualitativen Nachweis (Primer Extension Assay) einer Transkriptionsstartstelle berichtet. Aufgrund einer geringen Empfindlichkeit der Methode

konnte eine Startstelle nur bei mRNA aus Calcitriol-behandelten U937-Zellen untersucht werden. Diese Startstelle entsprach der Position -68.

1993 haben Cavailles, Rochefort et al. bei mRNA aus MCF-7-Zellen von 5 Startstellen berichtet, und zwar in den Positionen -72, -60, -51, -44 und -20. Sie konnten zeigen, daß die Startstelle der kürzesten Transkripte (Startstelle -20, entspricht Startstelle I) bei einer Stimulierung der MCF-7-Zellen mit Östrogen 6 bis 10-fach stärker genutzt wird als in Kontrollzellen ohne Stimulierung. Vermutlich entspricht die von Redecker et al. 1991 in U937-Zellen gefundene Transkriptionsstartstelle bei Position -68 der von Cavailles, Rochefort et al. 1993 beschriebenen Transkriptionsstartstelle bei Position -72 in MCF-7-Zellen (Startstelle V).

Diese Publikationen regten zu der Frage an, ob die Nutzung der Transkriptionsstartpunkte bei U937-Zellen unter Calcitriol-Stimulierung ähnlich sein könnte, da $1\alpha,25$ -Dihydroxycholecalciferol den Steroiden nahe steht. Dies kann mit der vorliegenden Arbeit verneint werden. Allerdings liefert die gezeigte Methode bei der Anwendung zur quantitativen Bestimmung der verschiedenen Transkripte nicht ausreichend genaue Ergebnisse, um eventuelle Veränderungen in der Nutzung der Transkriptionsstartpunkte sicher festzustellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß die vorliegenden Ergebnisse mit den von Redecker et al. 1991 veröffentlichten Ergebnissen ebenso wie mit den von Cavailles, Rochefort et al. 1993 veröffentlichten Ergebnissen gut vereinbar sind.

Redecker et al. fanden im Kathepsin-D-Gen eine CpG-Insel und stuften es daher als Haushaltsgen ein. Sie haben auch gezeigt, daß die Transkriptionsrate durch Calcitriol verändert wird, d. h., daß das Gen regulierbar ist.

Die Steigerung der Transkriptionsrate und somit die Regulierbarkeit des Kathepsin-D-Gens durch Calcitriol konnte in der vorliegenden Arbeit mit einer anderen Methodik deutlich bestätigt werden. In Bezug auf Calcitriolstimulierung konnte gezeigt werden, daß verschiedene Transkriptionsstartpunkte genutzt werden, wobei die Startstelle I sowie die Startstelle V häufiger als die Startstellen II-IV genutzt werden. Dabei wird die Startstelle I, welche downstream der TATA-Box liegt, nicht signifikant stärker genutzt als die Startstelle V. Dies ist auch gut damit vereinbar, daß in der Promotorregion des Kathepsin D-Gens kein Response-Element für Calcitriol nachgewiesen werden konnte (Redecker et al., 1991).

Cavailles, Rochefort et al. beschrieben eine hauptsächliche Nutzung von Startstelle I und Startstelle V bei Kathepsin D-mRNA aus MCF7-Zellen, dies konnte in der vorliegenden Arbeit auch für Kathepsin D-mRNA aus U937-Zellen gezeigt werden. Während allerdings die

Stimulierung der Transkription durch Östrogene die Synthese der mRNA insbesondere an der Transkriptionsstartstelle I verstärkt, zeigt sich bei der Stimulierung durch Calcitriol eine Vervielfachung der Transkription an allen untersuchten Startstellen.

4.3 Ausblick

Die Methode der kompetitiven PCR gelangt in der hier gezeigten Form an ihre Grenzen. Im Femtogrammbereich können schon kleinste Kontaminationen vor der PCR, z.B. durch feinste Staubpartikel, zu signifikanten Veränderungen im Ergebnis führen. Dieses Problem ist sehr wahrscheinlich nur durch eine strikte räumliche und materielle Trennung zwischen Vor-PCR-Bereich und Nach-PCR-Bereich zu lösen, was mit erheblichem Aufwand verbunden wäre.

Weiterhin wäre es sinnvoll, in einer Nachfolgearbeit die Untersuchungen mit einem deutlich höherem Einsatz an mRNA bzw. reversem Transkriptat durchzuführen. So könnten niedrigere Verdünnungsstufen erreicht werden und auf diesem Wege mögliche Ungenauigkeiten beim Pipettieren kleinster Mengen verringert werden. Dies würde eventuell zu eindeutigeren Ergebnissen führen.

Ebenso wäre es denkbar, die Transkriptionsstartpunkte mittels Oligo-capping (Maruyama und Sugano, 1994) zu identifizieren und anschließend zu quantifizieren. Dabei wird bei der mRNA die Cap-Struktur durch einen RNA-Oligonukleotid ersetzt und anschließend revers transkribiert und mittels PCR amplifiziert. Auf diesem Wege könnte zugleich auch die Nutzung der von Cavailles, Rochefort et al. 1993 in MCF-7-Zellen beschriebenen Transkriptionsstartpunkte bei Calcitriol-stimulierten und nicht stimulierten U937-Zellen überprüft werden.

5 Literatur

Barrett, A.J. (1979).

Cathepsin D: the lysosomal aspartic proteinase.

Ciba Found. Symp. 75, 37-50.

Cavaillès, V., Augereau, P., Rochefort, H. (1993).

Cathepsin D gene is controlled by a mixed promoter, and estrogens stimulate only TATA-dependent transcription in breast cancer cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 203-207.

Cavaillès, V., Garcia, M., Rochefort, H. (1989).

Regulation of cathepsin D and pS2 gene expression by growth factors in MCF7 human breast cancer cells.

Mol. Endocrinol. 3, 552-558.

Cavaney - Brooker, D.M., Rakoczy, P.E. (1999).

Cloning of a major human retinal pigment epithelial lysosomal aspartic protease and mapping its transcriptional start sites.

Curr. Eye. Res. 18, 310-318.

Chang, J.C., Yoo, O.H., Lesser, M. (1989).

Cathepsin D activity is increased in alveolar macrophages and bronchoalveolar lavage fluid of smokers.

Am. Rev. Respir. Dis. 140, 958-960.

Glondou, M., Liaudet-Coopman, E., Derocq, D., Platet, N., Rochefort, H. & Garcia, M. (2002).

Down-regulation of cathepsin D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cells.

Oncogene 21, 5127-5134.

Gruninger-Leitch, F., Schlatter, D., Kung, E., Nelbock, P., Dobeli, H. (2002).

Substrate and inhibitor profile of BACE (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases.

J. Biol. Chem. 277, 4687-4693.

Hanahan, D. (1983).

Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.

J. Mol. Biol. 166, 557-580.

Hasilik, A., Neufeld, E. F. (1980).

Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight.

J. Biol. Chem., 255, 4937-4945.

Hasilik, A., Neufeld, E. F. (1980).

Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorylation of mannose residues.

J. Biol. Chem., 255, 4946-4950.

Hasilik, A., von Figura, K., Conzelmann, E., Nehr Korn, H. und Sandhoff, K. (1982).

Lysosomal enzyme precursors in human fibroblasts. Activation of cathepsin D precursor in vitro and activity of β -hexosaminidase A precursor towards ganglioside GM₂.

Eur. J. Biochem. 125, 317-321.

Horst, M. und Hasilik, A. (1991).

Expression and maturation of human cathepsin D in baby-hamster kidney cells.

Biochem. J. 273, 355-361.

Humphries, M.J., Ayad, S.R. (1983).

Stimulation of DNA synthesis by cathepsin D digests of fibronectin.

Nature 305, 811-813.

Kerner, S.A., Scott, R.A. und Pike, J.W. (1989).

Sequence elements in the human osteocalcin gene confer basal activation and inducible response to hormonal vitamin D₃.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 4455-4459.

Kunz, E., Blattert, T.R., Weckbach, A. (1996).

Proteasen und deren Inhibitoren im posttraumatischen Kniegelenkserguß.

Z. Orthop. 134, 426-429.

Maruyama, K., Sugano, S. (1994).

Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eucaryotic mRNAs with oligoribonucleotides.

Gene 138, 171-174.

Moore, G.E., Gerner, R.E. und Franklin, H.A. (1967).

Culture of normal human leucocytes.

J. Am. Med. Assoc. 199, 519-524.

Morioka, M., Terayama, H. (1984).

Cathepsin D stimulates DNA synthesis and mitosis in mouse liver in vivo.

Exp. Cell Res. 151, 273-276.

Papassotiropoulos, A., Bagli, M., Kurz, A., Kornhuber, J., Forstl, H., Maier, W., Pauls, J., Lautenschlager, N., Heun, R. (2000).

A genetic variation of cathepsin D is a major risk factor for Alzheimer's disease.

Ann. Neurol. 47, 399-403.

Papassotiropoulos, A., Lewis, H.D., Bagli, M., Jessen, M., Ptok, U., Schulte, A., Shearman, M., Heun, R. (2002).

Cerebrospinal fluid levels of beta-amyloid(42) in patients with Alzheimers disease are related to the exon 2 polymorphism of the cathepsin D gene.

Neuroreport 13, 1291-1294.

Perbal, B. (1988).

A practical guide to molecular cloning.

Wiley & Sons, New York.

Qiagen (1994).

OligotexTM mRNA Handbook.

Qiagen (1995).

QIAGEN[®] Plasmid Handbook.

Qiagen (1997).

QIAquick Spin Handbook.

Qiagen (1994).

RNeasyTM Handbook.

Redecker, B., Heckendorf, B., Grosch, H. W., Mersmann, G., Hasilik, A. (1991).

Molecular Organization of the Human Cathepsin D Gene.

DNA and Cell Biology 10, 423-431.

Redecker, B., Horst, M., Hasilik, A. (1989).

Calcitriol enhances transcriptional activity of lysozyme and cathepsin D genes in U937 promonocytes.

Biochem. J. 262, 843-847.

Rocheffort, H., Liaudet-Coopman, E. (1999).

Cathepsin D in cancer metastasis: a protease and a ligand.

APMIS 107, 86-95.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989).

Molecular cloning - a laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, sec. edition.

Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y., Mizukami, Y., Ichihara, Y., Takahashi, K. (1982).

Primary structure of human pepsinogen gene.

J. Biol. Chem. 258, 5306-5311.

Stein, M., Braulke, T., von Figura, K., Hasilik, A. (1987).

Effects of differentiation-inducing agents on synthesis, maturation and secretion of cathepsin D in U937 and HL-60 cells.

Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 413-418.

Sundstrom, C., Nilsson, K. (1976).

Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937).

Int. J. Cancer 17, 565-577.

Tsukuba, T., Okamoto, K., Yasuda, Y., Morikawa, W., Nakanishi, H., Yamamoto K. (2000).

New functional aspects of cathepsin D and cathepsin F.

Mol. Cells. 10, 601-611.

van Noort, J.M., van der Drift, A.C.M. (1989).

The selectivity of cathepsin D suggests an involvement of the enzyme in the generation of T-cell epitopes.

J. Biol. Chem. 264, 14159-14164.

von Figura, K., Hasilik, A. (1986).

Lysosomal enzymes and their receptors.

Annu. Rev. Biochem. 55, 167-193.

Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit wurden die Transkriptionsstartstellen für mRNA von humanem Kathepsin D unter dem Einfluß von Calcitriol in U937-Zellen untersucht.

Zu diesem Zweck wurde die Methode der kompetitiven RT-PCR der Fragestellung entsprechend modifiziert. Die Methode der kompetitiven PCR basiert auf der kompetitiven Co-Amplifikation einer spezifischen Target-Sequenz (DNA bzw. revers transkribierte RNA), also der zu bestimmenden Ziel-DNA-Menge, zusammen mit bekannten Mengen eines internen Standards (Kompetitor, Standard-DNA) im selben Reaktionsgefäß. Die Methode erlaubt den Nachweis kleinster Mengen von DNA bzw. RNA und zugleich deren Quantifizierung. Der dazu benötigte Kompetitor konnte mittels In-vitro-Mutagenese entwickelt werden, bis auf eine Deletion von 30 Bp ist er identisch mit der ursprünglichen Sequenz.

Es wurde mRNA aus Calcitriol-stimulierten U937-Zellen und aus Kontroll-U937-Zellen isoliert und untersucht.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß in beiden Fällen mehrere Transkriptionsstartstellen für Kathepsin D benutzt werden.

Weiterhin konnte eine etwa 8-fache Steigerung der Transkriptionsrate für Kathepsin-D-mRNA unter Calcitriol-Stimulierung nachgewiesen werden.

Eine schwerpunktmäßige Nutzung einer bestimmten Startstelle als Ursache für die gesteigerte Transkriptionsrate, wie dies etwa in Östrogen-stimulierten MCF7-Zellen der Fall ist, konnte nicht gezeigt werden.

LEBENS LAUF

Christian Martin Wagenknecht

Dörfflerstraße 5
35037 Marburg

Persönliche Angaben

- Geburtsdatum: 13.05.1966
- Geburtsort: Quierschied / Saar
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

- 1984 Mittlere Reife
- 1984 – 1986 Bergmännische Berufsschule Camphausen
- 1986 – 1989 Saarland – Kolleg Saarbrücken
- 1989 Abitur

Betriebliche Ausbildung

- 1984 – 1986 Ausbildung zum Betriebsschlosser unter Tage bei Saarbergwerke AG, Saarbrücken
- 1986 u. 1989 jeweils mehrmonatige Tätigkeit im erlernten Beruf

Studium

- 1989 - 1990 Studium der Informatik an der Universität des Saarlandes
- 1990 – 2000 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
- 1995 – 1999 Experimenteller Teil der Dissertation am Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität Marburg
- 1999 – 2000 Praktisches Jahr am Klinikum der Philipps-Universität Marburg
- 2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

- 02/2001 - 08/2001 Tätigkeit als AiP in der Abteilung Chirurgie am Krankenhaus Peißenberg
- 09/2001 - 02/2002 Tätigkeit als AiP in der Abteilung Innere Medizin am Krankenhaus Peißenberg
- 03/2002 – 01/2003 Tätigkeit als Faisant Fonction d’Interne in der Abteilung Anesthésie - Réanimation am Centre Hospitalier de Sarrebourg (Frankreich)
- 01/2003 – 04/2003 Tätigkeit als Allgemein- und Taucherarzt auf Kuramathi, Rasdhoo Atoll, Malediven
- seit 08/2003 Tätigkeit als Assistenzarzt in der Abteilung Anästhesie am Klinikum der Philipps–Universität Marburg

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen / Herren in Marburg:

Amon, Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Berndt, Engel, Eschenbach, Feuser, Fuhrmann, Ganz, Geus, Golenhofen, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Happle, Hasilik, Huffmann, Kern, Kleinsasser, Klenk, Köhler, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lennartz, Maisch, Mannherz, Pohlen, Prinz, Riedmiller, Rothmund, Schachtschabel, Schulz, Stinner, Thomas, Vogel, Zelder.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Hasilik für die spannende Themenstellung sowie die geduldige Betreuung.

Allen Mitgliedern der AG Hasilik, insbesondere Herrn Dr. Matthias Hummel und Herrn Dr. Hans-Wilhelm Grosch danke ich für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Methoden sowie bei der Lösung verschiedenster Laborprobleme.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Olf Westphal fürs Korrekturlesen sowie für die Hilfestellung im Umgang mit den Tücken der Textverarbeitung.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihre große Geduld und Unterstützung in all diesen Jahren danken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Untersuchung der Nutzung unterschiedlicher Transkriptionsstartpunkte für mRNA von humanem Kathepsin D unter dem Einfluß von Calcitriol“ im Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. Andrej Hasilik ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.