

Mutanten, Moleküle und Mikroarrays Dem Appetit auf der Spur ...

M. Bauer, J. Katzenberger, I. Zinke, C. Melcher, C. Schütz, A. Gähler, M. Ritter, M. Pankratz, ITG

Hunger?

Haben Sie gerade Hunger während Sie diesen Artikel lesen? Kennen Sie die Warteschlangen in der Kantine? – Keine Angst, wir wollen an dieser Stelle nicht über die Essgewohnheiten der FZK-Mitarbeiter referieren.

Das Hunger-Gefühl ist ein physiologischer Mechanismus, der im ersten Moment sehr rudimentär und einfach erscheint. Bei näherer Betrachtung jedoch sind die Steuerung der Nahrungsaufnahme und die Verwertung der Nährstoffe komplizierte und in hohem Maße regulierte biochemische Vorgänge. Die Erforschung dieser Prozesse können wichtige Erkenntnisse der Wechselwirkungen zwischen physiologischen Zustand des Gesamtorganismus und der Genkontrolle einzelner Zellen und Geweben bringen. Das Verständnis dieser biochemischen Koordination kann in der Bekämpfung verschiedener Krankheiten und Gesundheitsstörungen, wie beispielsweise Diabetes, Fettleibigkeit oder auch in der Krebs-Diagnose und -Therapie, neue Ansätze liefern.

Fruchtfliegen

Nahrungsaufnahme und die damit verbundenen biologischen Prozesse sind bei einfachen und höher entwickelten Organismen sehr ähnlich. Deshalb wird in unserer Arbeitsgruppe die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus eingesetzt. Sie ist im Haushalt weit weniger beliebt als sie es im wissenschaftlichen Sinne ist. Die Fruchtfliege wurde von vielen verschiedenen

Forschern seit dem Beginn der genetischen und molekularbiologischen Untersuchungen eingesetzt [1]. Das biologische Hintergrundwissen ist entsprechend umfangreich. Eine der bekanntesten Arbeitsgruppen um die Tübinger Biologin Prof. Nüsslein-Volhard wurde für ihre Ergebnisse in der Embryonalentwicklung von *Drosophila* 1995 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet [2, 3].

Das Genom der Fruchtfliege wurde bereit vollständig entschlüsselt. Die DNA-Sequenz aller Gene ist somit bekannt. Dies beinhaltet jedoch nicht, dass alle genetischen Funktionen bekannt und daraus abgeleitet, dass alle funktionalen Gene bereits als solche erkannt wurden. Ein weiterer Punkt, der die Fruchtfliege gerade für die Erforschung im Feld der Nahrungsaufnahme und damit verbundenen Kontrollmechanismen interessant macht, ist ihr Entwicklungszyklus in mehreren Stadien. 21 Stunden nach der Eiablage beginnt eine dreistufige Larven-Entwicklung, an deren Ende, 117 Stunden nach Eiabla-

ge, sich die Larven verpuppen und 213 Stunden nach Eiablage die Fliegen schlüpfen. Der Zeitpunkt der Verpuppung ist davon abhängig, ob sich die Larve einen ausreichenden Nährstoffvorrat anfrassen konnte. Dieser Umstand zeigt, dass an diesem Punkt eine enge Kopplung zwischen Nahrungsaufnahme und Entwicklung vorliegt.

Beginn der Suche

Die Suche nach Kontaktpunkten in der genetischen und biochemischen Kontrolle des Fressverhaltens begann in unserer Arbeitsgruppe vor 4 Jahren mit der systematischen Untersuchung von *Drosophila*-Mutanten, deren Larve ein gestörtes Fressverhalten zeigten. In diesen Mutanten wurden verschiedene Gene durch Einfügen von DNA-Elementen außer Funktion gesetzt. Dabei wurde unter anderem das „Rotkehlchen“-Gen entdeckt. Sein Ausschalten bewirkt, dass die Larven ihre Nahrung zwar aufnehmen jedoch nicht in den Ma-



Abb. 1: *Drosophila-melanogaster*-Larven, die mit rotgefärbten Futter gefüttert wurden. Die mit „wt“ gekennzeichneten Fliegen sind genetisch unverändert (Wildtyp). In den übrigen Larven ist das „Rotkehlchen-Gen“ („rot“-Gen) genetisch inaktiviert worden. Unvollständige Nahrungsaufnahme, verzögertes Wachstum und Abbruch der Larvenentwicklung sind die Folgen.

gen befördern. Dabei treten keine gewebe- oder organspezifischen Veränderungen auf. Vielmehr scheint es eine grundlegende Veränderung in der Steuerung der Nahrungsaufnahme zu bewirken (Abb. 1). Die Analyse des Gens identifizierte das davon kodierte Protein als sogenannten Transkriptionsfaktor. Dies ist eine zelluläre Komponente, die als Schalter zur Aktivierung anderer Gene fungiert. Das „Rotkehlchen“-Protein scheint ein Teil eines regulatorischen Netzwerks zu sein, das die Nahrungsaufnahme steuert.

In der ersten Suche, aus der auch das „Rotkehlchen“-Gen hervorging, wurden weitere Gene gefunden, die eine Rolle in einem solchen Netzwerk spielen können. Detaillierte Untersuchungen einzelner Gene zeigten, dass die

weiteren Forschungsarbeiten einen umfassenderen Ansatz verfolgen mussten, um die Komplexität des Kontrollsystems erfassen zu können.

Technologische Weiterentwicklung: Mikroarrays

Aus dieser Intention heraus wuchs auch der Beschluss, eine neue Technologie für unsere Arbeitsgruppe und das Institut zu erschließen. Es handelt sich dabei um die Mikroarray-Technik [4]. In diesem Verfahren werden zunächst Teil-DNA-Stücke bekannter und unbekannter Gene hergestellt. Die DNA kann dabei entweder *de-novo* in einer chemischen Reaktion synthetisiert werden oder durch Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase

Chain Reaction, PCR) von genomischer DNA erhalten werden. Die PCR ist eine etablierte molekularbiologische Methode, bei der durch eine mehrstufige Reaktion von DNA-Molekülen als Vorlage definierte Teilstücke vervielfältigt werden können [5]. Die Start- und End-Sequenz des vervielfältigten DNA-Bereichs wird durch die Wahl von sogenannten Primern definiert. Primer sind kurze synthetisch hergestellte, einzelsträngige DNA-Moleküle. Das *Drosophila*-Genom ist, wie bereits oben erwähnt, vollständig sequenziert. Deshalb ist es möglich für alle bekannten und potenziellen Gene spezifische PCR-Primer zu entwerfen. Anhand eines umfassenden Primer-Satzes konnten wir 14.151 unterschiedliche Teil-Sequenzen von *Drosophila*-Genen durch PCR herstellen. Die Reaktionen wurden im 100µl-Maßstab in Mikrotiter-Platten durchgeführt, bei denen 96 Ansätze parallel gehandhabt werden können. Das Verwenden des Mikrotiter-Formats mit hohem Probendurchsatz (engl. high-throughput) brachte auch Neuerungen in der Arbeitsmethodik. So konnte und musste der Automatisierungsgrad mit Hilfe von Robotern erhöht werden, um den zeitlichen Aufwand des Gesamtprojekts eingrenzen zu können.

Die DNA-PCR-Produkte werden bei der Herstellung der Mikroarrays mit Hilfe eines Roboters auf 26 x 76 mm große, beschichtete Glas-Objektträger transferiert (Abb. 2). Am Roboterkopf befestigte Stahlnadeln, an deren Spitze eine Mikrokapillare eingearbeitet wurde, werden zunächst in die DNA-Lösung getaucht. Da-

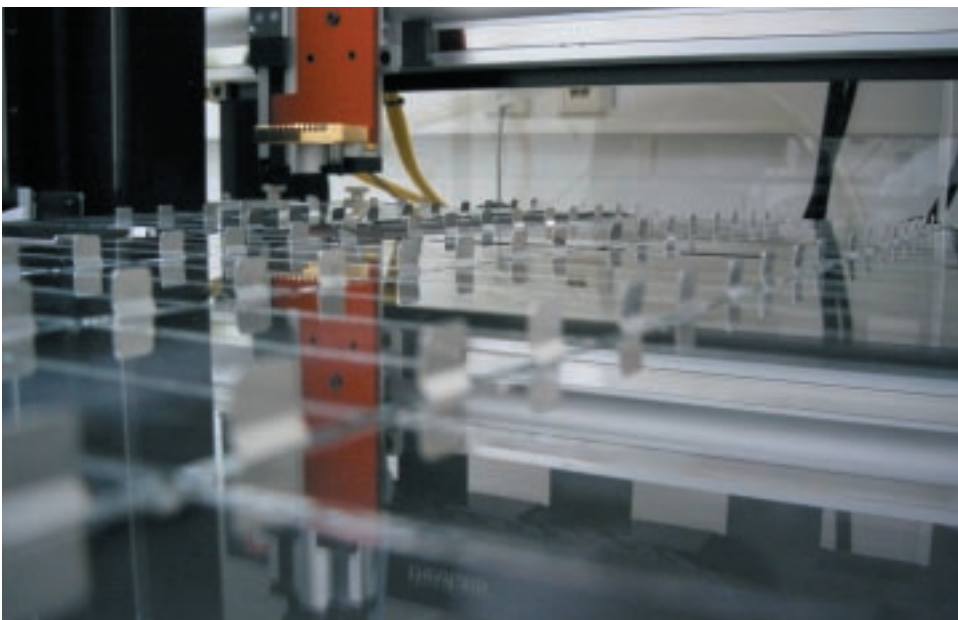


Abb. 2: Blick über den Arbeitstisch des Mikroarray-Roboters mit dem die DNA-Proben aus Mikroplatten auf beschichtete Objektträger übertragen werden. Die eingespannten Objektträger sind im Vordergrund, der rote Roboterarm mit goldfarbigem Halter der Nadeln zum Transfer der Lösungen ist im Hintergrund erkennbar.

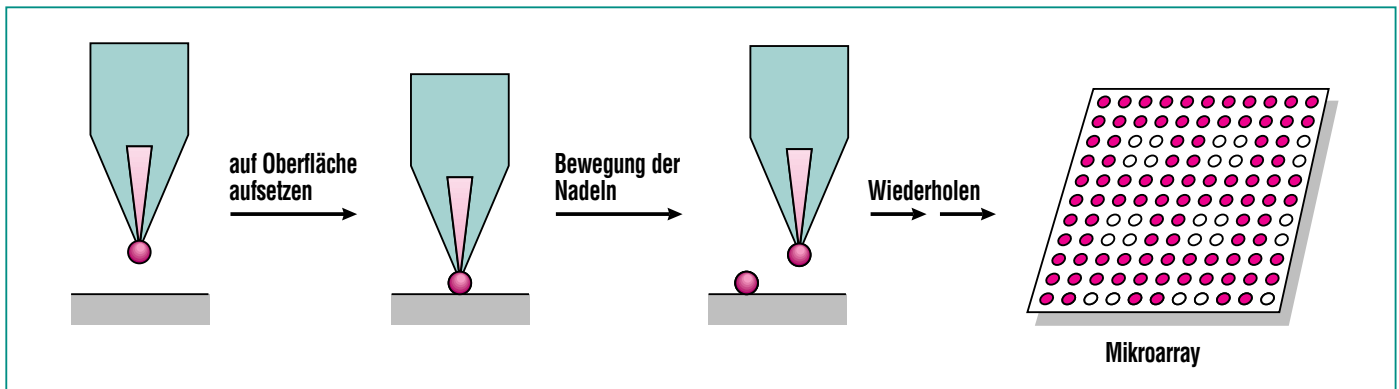


Abb. 3: Der Transfer der DNA-Lösungen mit Hilfe der Nadeln erfolgt nach einem einfachen Prinzip. Die Nadelspitzen sind mit einem etwa 50 µm breiten Spalt versehen. Die Lösungen werden durch die Kapillarkraft aufgenommen. Beim Kontakt der Nadeln mit der Oberfläche der Objektträger wird eine geringe Menge abgegeben, die einen Tropfen von etwa 100 µm Durchmesser bildet. Durch Wiederholen des Vorgangs werden alle (in unserem Falle ca. 14.000) Proben auf jeden Mikroarray aufgebracht.

bei werden etwa 0,25 µl Flüssigkeit aufgenommen. Durch kurzes Aufsetzen der Nadeln auf die Objektträger wird eine geringe Menge abgegeben, die einen Tropfen von etwa 100 µm Durchmesser bildet. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis alle Proben auf die Mikroarrays aufgebracht sind (Abb. 3). Vor der Aufnahme neuer Lösung werden die Nadeln im Ultraschallbad und in einem Durchflussbecken gereinigt und in einem Luftstrom getrocknet. Der von uns verwendete Roboter kann mit bis zu 48 Nadeln und 100 Objektträgern gleichzeitig arbeiten [6]. Die aufgebrachte DNA wird durch Wärme denaturiert, d.h. die gegenläufigen helikalen Stränge werden getrennt und durch eine chemische Reaktion mit der Beschichtung der Objektträger fest an die Oberfläche gebunden.

Mikroarray-Experimente

Die Verwendung der Mikroarrays ist in Abb. 4 schematisch dargestellt. Zunächst wird aus experi-

mentell behandelte Fliegen, Larven oder Geweben RNA isoliert. Bei aktiven Genen wird im Zellkern eine einzelsträngige mRNA-Kopie (engl. messenger RNA, Boten-RNA) des Abschnitts der genomischen DNA hergestellt, die als Matrize für die zelluläre Proteinsynthese dient. Proteine vermitteln nahezu alle zellspezifischen Funktionen. Die mRNA- und nachfolgende Proteinsynthese eines aktivierten Gens wird als Gen-Expression bezeichnet. Das Transkriptom einer Zelle, eines Gewebes oder Organismus, als Summe aller mRNA-Moleküle, repräsentiert somit die Gesamtheit aller aktiven Gene. Nach der Isolierung der mRNA werden zu deren Sequenz komplementäre DNA-Kopien *in vitro* hergestellt und dabei mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Diese ebenfalls einzelsträngigen DNA-Moleküle werden auch als Sonden bezeichnet. Die DNA-Sonden werden auf einen Mikroarray gegeben und verbinden sich spezifisch mit den komplementären DNA-Stücken auf der Oberfläche,

also an den Punkten, an denen die entsprechende PCR-DNA aufgebracht wurde. Dabei bilden sich Hybride aus dieser DNA und den Molekülen der Sonde auf dem Mikroarray (Hybridisierung). Unspezifische Bindung, die zu starken Hintergrundsignalen führen könnte, wird durch die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen und nachfolgender Waschschriffe unterbunden. Die Hybridisierung wird gleichzeitig mit verschiedenen Sonden-Typen vorgenommen, die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert wurden. Die ursprünglichen mRNA-Proben können beispielsweise einerseits von gentechnisch veränderten (Mutanten) („Zustand A“) und andererseits von unveränderten, sog. Wildtyp-Fliegen („Zustand B“) stammen.

In einem Scanner werden die Farbstoffe durch Laserlicht angeregt und die Fluoreszenz gemessen. Anhand der verschiedenen Signalstärken kann für jeden Zustand ein Expressionsprofil aller auf dem Mikroarray erfassten Ge-

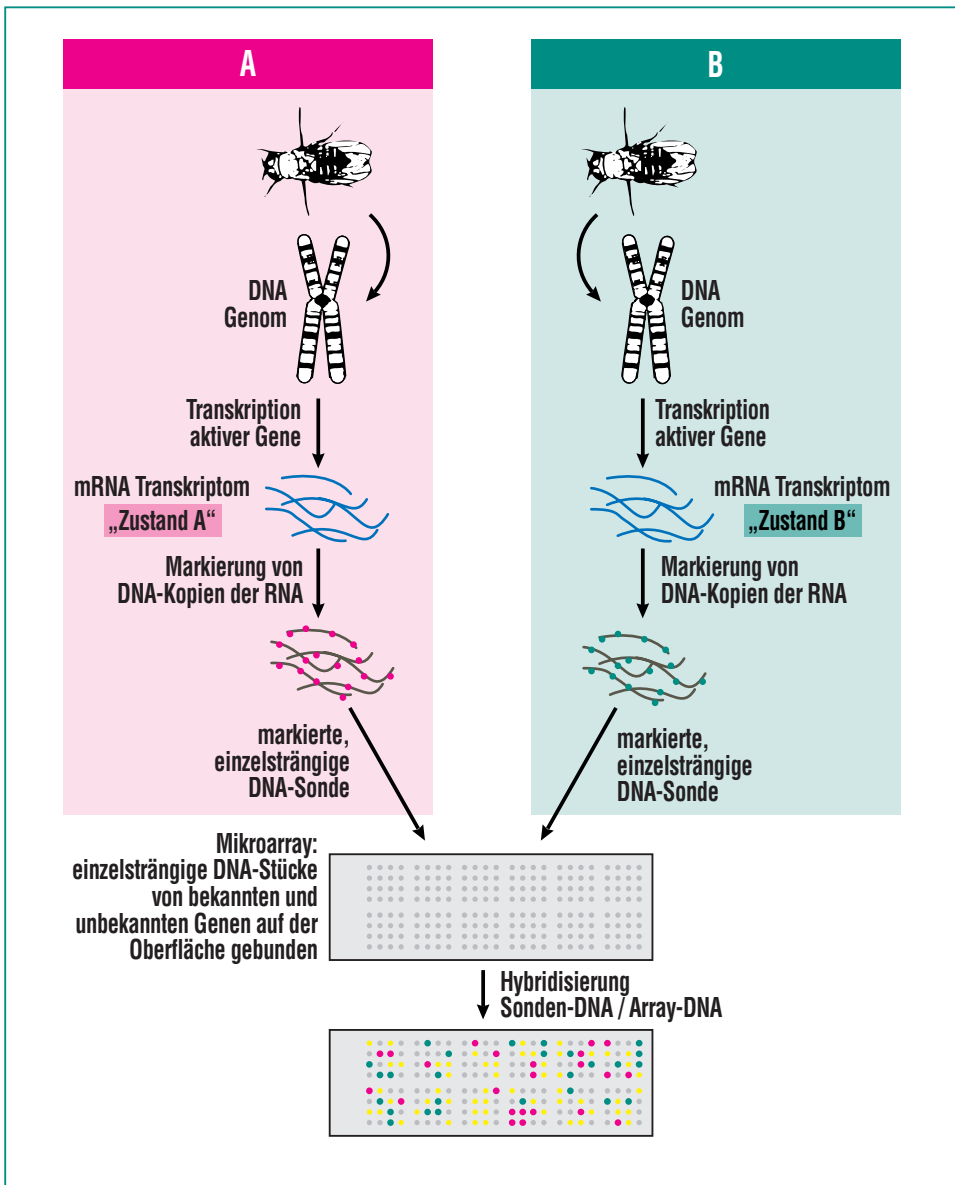


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Mikroarray-Experiments. Die dargestellten Fliegen stehen stellvertretend für Organismen (Fliegen, Larven oder Embryos) oder Gewebe aus Tieren. Von aktiven Genen des Genoms (Summe aller Gene) werden in der Zelle während der Transkription mRNA-Kopien hergestellt. Die Summe aller mRNA-Moleküle (Transkriptom) kann somit als Abbild aller aktiven (exprimierten) Gene betrachtet werden. Je Zustand werden von den isolierten mRNA-Molekülen in vitro markierte DNA-Kopien (Sonden) hergestellt. Die Sonden der zu vergleichenden Zustände werden auf den selben Mikroarray gegeben und koppeln sich dort an die bei der Herstellung des Arrays aufgebracht und gebundenen DNA-Proben verschiedener bekannter und unbekannter Gene. Die Kopplung (Hybridisierung) erfolgt dabei sequenzspezifisch, also nur wenn die Basenabfolge von Sonden- und Array-DNA übereinstimmen.

ne erstellt werden (Abb. 5). Durch Vergleich der Profile kann eine quantitative Aussage über die Veränderung der Genaktivitäten zwischen den beiden Zuständen gemacht werden.

In einer Serie von Mikroarray-Experimenten wurden Fliegen-Larven unter verschiedenen Bedingungen wachsen gelassen. Dabei wurden unter anderem die Veränderungen des Expressionsprofils in Abhängigkeit unterschiedlicher Zucker-Konzentrationen im Futter getestet. Dabei konnte ein Gen identifiziert werden, dessen Funktion in nachfolgenden Experimenten näher charakterisiert wurde. Es handelt sich, wie bei „Rotkehlchen“, um einen Transkriptionsfaktor, der offensichtlich eine wichtige Regulationsfunktion im Fettstoffwechsel erfüllt. Es wurden transgene Fliegen hergestellt deren „Rotkehlchen“-Gen ständig und verglichen zum ursprünglichen Wildtyp-Zustand auf einem höheren Niveau aktiviert ist. Diese Situation wird auch als Überexpression des Gens bezeichnet. Mit Hilfe der Mikroarray-Technik konnte das Expressionsprofil dieser Tiere wiederum analysiert und weitere Gene identifiziert werden, die durch das veränderte Gen reguliert werden. In dieser Weise soll in Zukunft Stück für Stück eine Karte des regulatorischen Netzwerks der Nahrungsaufnahme und davon beeinflusster Mechanismen erarbeitet werden. Die Knotenpunkte des Netzes werden von Genen gebildet, deren Charakterisierung durch ergänzende Experimente und verschiedene Methoden bewerkstelligt werden muss.

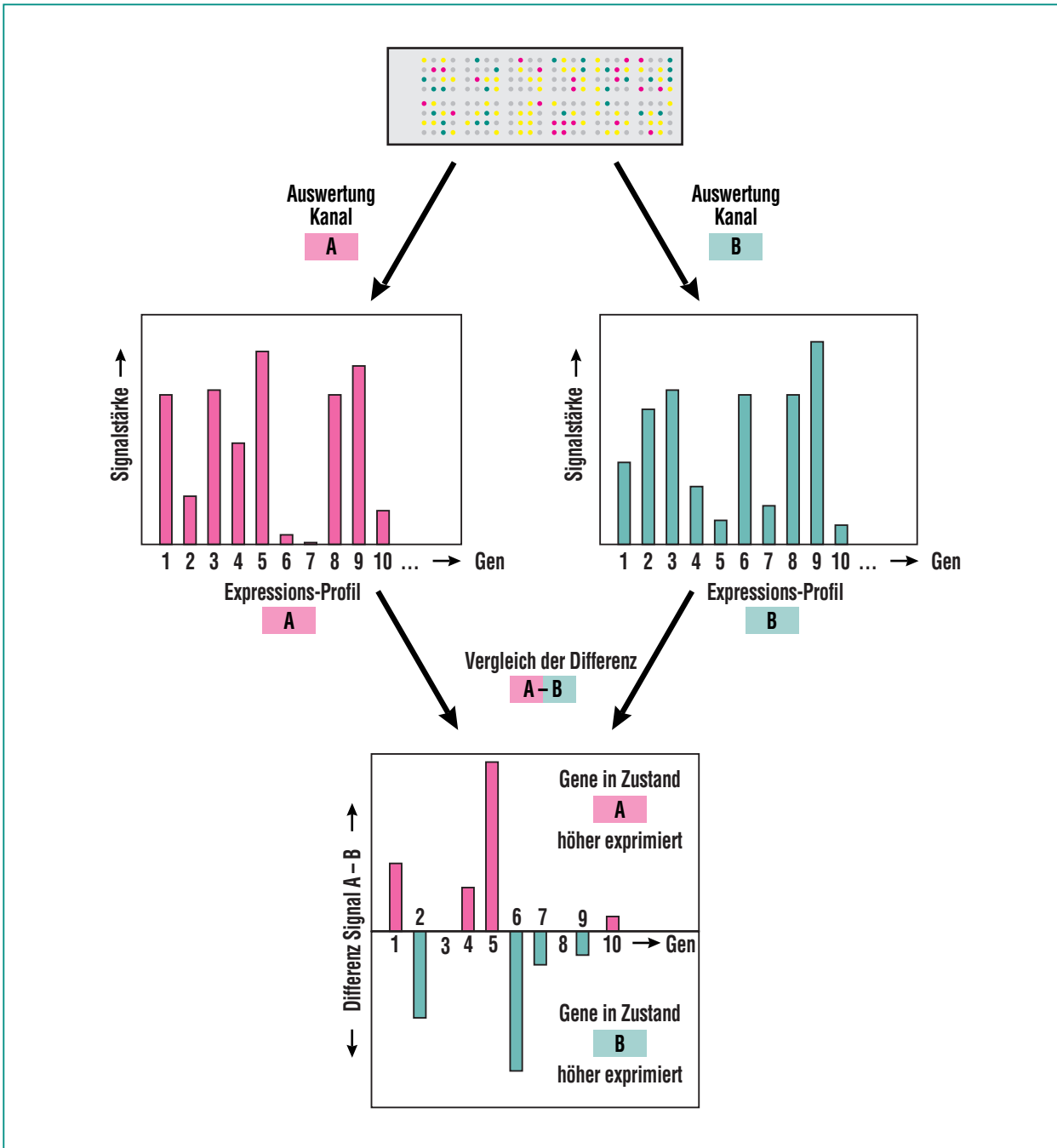


Abb. 5: Die spezifisch gebundene, markierte Sonden-DNA wird mit Hilfe eines Scanners detektiert. Die Signalstärke korrespondiert dabei mit der Anzahl der gebundenen Sonden-Moleküle, damit lässt sich auf die Konzentration der mRNA im verwendeten Gewebe rückschließen. Da die Identität der einzelnen Punkte der gebundenen Array-DNA bekannt ist, kann für jedes Gen, das auf dem Array repräsentiert wird, eine spezifische Signalstärke zugeordnet werden. Die Gesamtheit aller Signale ergibt ein Profil aller aktiven Gene (Expressionsprofil) des untersuchten Organismus bzw. Gewebes für beide verglichenen Zustände. Die Analyse der Signalstärken zeigt die regulatorische Veränderung der Genexpression zwischen diesen Zuständen.

Neuronale Signale

Als einen weiteren Ansatz zur Beschreibung übergeordneter regulatorischer Zusammenhänge verfolgen wir die Erforschung

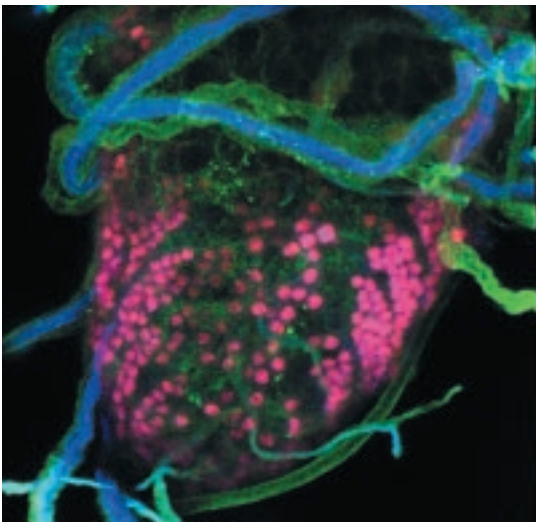


Abb. 6: Ein Teil des Nervensystems einer *Drosophila*-Larve wurde mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Das Bild wurde auf drei (Farben) Kanälen mit Hilfe eines Konfokalen-Laserscanning-Mikroskops aufgenommen. Das Laserlicht des Mikroskops regt in verschiedenen Fokusebenen und verschiedenen Wellenlängen die Farbstoffe zur Fluoreszenz an und zeichnet die Bilder auf. In der Darstellung sind Axone (Nervenbahnen) mit blau, Neuronen (Nervenzellen) mit rot und Zellmembranen mit grün fluoreszierendem Farbstoff markiert.

bekannter und potentieller Neuropeptide. Es handelt sich dabei um Botenstoffe, die Signale zwischen neuronalem System und verschiedenen Geweben übermitteln. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es Neuropeptide gibt, die bei der Steuerung des Fressverhaltens eine Rolle spielen. Die Expression der Neuropeptid-Gene wird dabei ebenfalls durch Mikroarray-Experimente analysiert. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei jedoch auch in welchen Zellen oder Geweben die Neuropeptid-Gene aktiviert werden. Dies kann durch histologische Färbung mit spezifischen Sonden erfolgen. Im konfokalen Laserscanning-Mikroskop werden die gefärbten Gewebeproben in verschiedenen Fokusebenen abgetastet. Für jede Ebene wird dabei ein Bild aufgezeichnet, auf denen die Positionen der angeregten Fluoreszenzfarbstoffe zu erkennen sind. Aus vielen Bildern kann nachfolgend eine dreidimensionale Darstellung rekonstruiert werden (Abb. 6).

In Zukunft soll die Maus als zusätzlicher Modellorganismus hinzugezogen werden, um die mit *Drosophila* erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen. Die Maus ist als Säugetier evolutiv näher mit

dem Menschen verwandt als die Fruchtfliege. Sie kann deshalb als wichtiges Bindeglied in der Nutzung des erlangten Grundlagenwissens für Fragestellungen in der human Medizin dienen. Mäuse werden am ITG bereits zu Versuchen eingesetzt, so dass die entsprechende Infrastruktur vorhanden ist. In unserer Arbeitsgruppe hergestellte Mikroarrays zur Analyse von Maus-Genen befinden sich in der Entwicklung.

Literatur

- [1] Francois Jacob
Die Maus, die Fliege und der Mensch,
Berlin-Verlag, Berlin, 1998
- [2] <http://www.nobel.se>
- [3] Keller,
Drosophila embryos as transitional objects: the work of Donald Poulson and Christiane Nusslein-Volhard,
Historical studies in the physical and biological sciences,
1996;26(2):313-46
- [4] Philip Ball,
Gen-Chips,
Der Tagesspiegel, 14.02.2001
- [5] Hubert Rehm, Friederike Hammar:
Biochemie light,
Verlag Harri Deutsch, 2001
- [6] <http://www.genemachines.com/OmniGrid/OmniGrid.html>