

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin V Sportmedizin
(Schwerpunkte: Leistungsmedizin, spezielle Prävention,
spezielle Rehabilitation)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. A. M. Nieß

Spezifizierung der Methode der genspezifischen reversen
Transkription am Beispiel des natürlichen Antisense
Transkripts zu HIF-1 α , aHIF und die
Beschreibung von aHIF

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Eva Reich

aus

Tübingen

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nieß

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. P. Wendel

**“One night in Bangkok and
the world’s your oyster”**

Murray Head

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Einführung und Zielsetzung	1
1.2 Natürliche Antisense Transkription	4
1.2.1 ncRNA	4
1.2.2 NAT	4
1.2.2.1 Aufbau	5
1.2.2.2 Funktion	6
1.2.2.2.1 Expression	7
1.2.2.2.2 Regulationsmechanismen	7
1.2.3 Zusammenfassung	9
1.3 Der „Hypoxia-Inducible Factor“ (HIF)	10
1.3.1 Hypoxie	10
1.3.2 HIF	11
1.3.2.1 Aufbau von HIF	11
1.3.2.1.1 Die α -Untereinheit	12
1.3.2.1.2 Die β -Untereinheit:	13
1.3.3 HIF-1 α	14
1.3.3.1 Posttranskriptionelle Modifizierungen der HIF-1 α mRNA	14
1.3.3.2 Regulationsmechanismen	14
1.3.3.2.1 Normoxie	15
1.3.3.2.2 Hypoxie	16
1.3.3.3 Funktion von HIF-1 α	17
1.3.3.4 Die Rolle von HIF-1 α für verschiedene Tumore	19
1.3.4 Zusammenfassung	20

1.4 Ein natürliches Antisense Transkript: aHIF	21
1.4.1 Aufbau und Eigenschaften von aHIF	21
1.4.2 Vorkommen von aHIF	23
1.4.3 Regulation von aHIF	24
1.4.4 Funktion von aHIF	25
1.4.5 aHIF und Tumore	27
1.4.6 Zusammenfassung und Zielsetzung dieser Arbeit	28
2. MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 Material	29
2.1.1 Probenmaterial	29
2.1.2 Kits	29
2.1.3 Enzyme	29
2.1.4 Sonstige Reagenzien für die Molekularbiologie	30
2.1.5 Geräte	30
2.1.6 Datenbanken und Computerprogramme	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Bioinformatische Methoden	32
2.2.1.1 Genome Browser	32
2.2.1.2 Polyadenylierungssignale	34
2.2.1.3 Promotor Region, CpG-Inseln, Transkriptionsfaktor Bindungsstellen und „Hypoxia Response Elements“	35
2.2.1.4 Ermittlung von RNA Sekundärstrukturen	40
2.2.2 Probenmaterial	42
2.2.2.1 PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)	42
2.2.2.2 Erythroleukämiezellen	42
2.2.2.3 THP-1 Zellen	42
2.2.2.4 Benigne und maligne Zellen aus Nierentumoren	43

2.2.3 cDNA (complementary DNA) Synthese	44
2.2.3.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA	44
2.2.3.2 Reverse Transkription	44
2.2.3.3 Reverse Transkription schwieriger Templates mit ausgeprägten Sekundärstrukturen	47
2.2.4 PCR (Polymerasekettenreaktion)	50
2.2.5 Primer Design	53
2.2.6 Agarose Gelelektrophorese	56
2.2.7 Sequenzierung von PCR-Produkten	57
2.2.8 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	58
2.2.8.1 5'- RACE PCR	59
2.2.8.2 3' RACE PCR	61
2.2.9 Realtime PCR	64
2.2.9.1 Schmelzkurvenanalyse	65
2.2.9.2 Housekeeping Gene	65
2.2.9.3 Bestimmung der Primereffizienz	67
2.2.9.4 Auswertung der Realtime PCR	67
3. ERGEBNISSE	70
3.1 Der Genlokus von HIF-1α und aHIF	70
3.2 Verifizierung der Transkriptionsrichtung von aHIF: Etablierung einer Realtime RT-PCR-Methode zur Quantifizierung der Fehlerrate genspezifischer Umschriebe	77
3.3 Vollständige Charakterisierung der aHIF-Sequenz	89
3.3.1 Etablierung einer reversen Transkription mit anschließender PCR zur Amplifikation von aHIF	89
3.3.2 Bestimmung des 5' -Endes von aHIF	98
3.3.2.1 5'-RACE PCR	98

3.3.3 Bestimmung des 3'-Endes von aHIF	101
3.3.3.1 Bioinformatische Suche nach dem Poly(A)-Signal	101
3.3.3.2 3'-RACE PCR	104
3.3.4 Aufklärung der Sekundärstruktur von aHIF	107
3.3.4.1 Mfold Analyse	107
3.3.4.2 A-to-I Editing	111
3.3.5 Bioinformatische Untersuchung der aHIF Promotor Region	115
3.3.5.1 Promotor Analyse mittels MAPPER	115
3.3.5.2 HRE Analyse mittels Pescador Score	116
4. DISKUSSION	118
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	118
4.2 Methode der reversen Transkription	121
4.2.1 Reverse Transkription	121
4.2.2 Fehlerhaftes Priming	125
4.2.3 Schwierigkeiten bei der reversen Transkription durch Sekundärstrukturen	128
4.3. Antisense Transkription	131
4.3.1 Antisense RNA und ihre Funktion	131
4.3.2 Regulationsmechanismen von Antisense Transkripten	133
4.4 aHIF	135
4.4.1 Sekundärstruktur	135
4.4.2 A-to-I Editing	137
4.4.3 Die Sequenz von aHIF	138
4.4.3.1 Das 3'-Ende	138
4.4.3.2 Das 5'-Ende und die Regulation von aHIF	139
4.4.4 Proteinkodierend oder nicht-kodierend? Der „Open Reading Frame“	142
4.5 Zusammenfassung und Ausblick	144

5. ZUSAMMENFASSUNG	146
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	148
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	153
8. TABELLENVERZEICHNIS	155
9. LITERATURVERZEICHNIS	156
DANKSAGUNG	165

1. Einleitung

1.1 Einführung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Beschreibung einer möglichen Methode, mit der die Orientierung einer Nukleotidsequenz, auch bei Vorliegen einer komplizierten Sekundärstruktur, definiert werden kann. Dies wurde am Beispiel des natürlichen Antisense Transkripts zu HIF-1 α , aHIF, gezeigt.

Im Zuge der Entschlüsselung des menschlichen Genoms entstand der Gedanke, dass die Komplexität eines Organismus nicht nur über seine kodierenden Gene erklärt werden kann.

Vereinfachend ausgedrückt beinhaltet das Genom das Erbgut, Informationen über alle Vorgänge eines Organismus. Die Speicherung dieser Information beruht auf einer doppelsträngigen Nukleotidsequenz, der DNA (Desoxyribonucleic Acid), dies ist die „Sprache“ des Genoms. Einzelne Gene können dann zu RNA (Ribonucleic Acid) transkribiert und weiter in ein Protein translatiert werden. Diese Gene sind kodierende Gene. Weiterhin gibt es Gene, aus denen kein Protein entsteht, sondern deren RNA verschiedene Funktionen erfüllt.

Auf der Suche nach einer Erklärung für die Komplexität eines Organismus stießen Forscher auf so genannte nicht-kodierende RNA-Transkripte (ncRNA), denen überwiegend regulatorische Funktionen zugeordnet wurden.

Zu diesen nicht-kodierenden Transkripten gehört auch die Entdeckung von NATs (Natural Antisense Transkripts). Benannt wurden sie nach ihrer Orientierung auf dem DNA-Strang, sie werden in der entgegengesetzten Richtung zu Sense Transkripten abgelesen.

Diese NATs sind bislang nur schlecht charakterisiert. Die Definition der tatsächlichen Orientierung eines Transkripts zeigt sich darüber hinaus als besonders schwierig.

1. Einleitung

Problematisch für die *in vitro* Untersuchung solcher RNA kann dabei auch das Vorliegen einer so genannten Sekundärstruktur sein. RNA liegt dabei nicht in linearer Form, als ein Strang, vor, sondern sie faltet sich, meist in einen energetisch günstigen Zustand.

Die vorliegende Arbeit zeigt eine molekularbiologische Methode auf, anhand derer die Orientierung eines Transkripts überprüft und definiert werden kann. Dies ist relevant, da die Ermittlung der tatsächlichen Orientierung für die weitere Erforschung von NATs von großer Bedeutung ist, denn nur mit der Definition der Orientierung kann von einer Antisense RNA gesprochen werden.

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Protein mit dem Namen „Hypoxia-Inducible Factor“ (HIF) beispielhaft untersucht. Wie der Name bereits vermuten lässt, handelt es sich hierbei um einen Faktor, der durch Hypoxie, also den Mangel an Sauerstoff, induziert wird. Dieses Protein ist ein Transkriptionsfaktor, das heißt, es reguliert das Abschreiben anderer Gene von der DNA in RNA und nimmt auf diese Weise Einfluss auf die Expression verschiedener Gene. Im vorliegenden Fall geschieht dies für Gene, auf die Sauerstoffmangel Einfluss hat. Man kann sagen, dass HIF für die Antwort einer Zelle auf Hypoxie eine entscheidende Rolle spielt.

Für dieses kodierende Gen HIF wurde eine NAT beschrieben, aHIF. In vorangegangenen Arbeiten (siehe Kapitel 1.4) wurde jedoch die tatsächliche Orientierung, Größe und Funktion noch nicht ausreichend untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst auf die Bedeutung von „Natural Antisense Transkripts“ und den bisherigen Wissensstand eingegangen (siehe Kapitel 1.2). Zu diesem Thema liegen verschiedene Veröffentlichungen mit unterschiedlichen Ansätzen vor.

Im Anschluss wird auf die Beschreibung von HIF, beziehungsweise die am besten untersuchte Isoform HIF-1 α , und seine Relevanz für die zelluläre Antwort auf Hypoxie eingegangen (siehe Kapitel 1.3).

Anschließend wird der aktuelle Wissensstand zu aHIF zusammengefasst (siehe Kapitel 1.4). Auch aHIF scheint eine Rolle bei der zellulären Antwort auf Hypoxie zu spielen, wurde bislang aber noch nicht zufrieden stellend

1. Einleitung

beschrieben. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb auch, aHIF näher zu charakterisieren, vor allem die Definition der Orientierung der Sequenz, sowie die Beschreibung des 5'- und des 3'-Endes steht dabei im Vordergrund. Es wird eine vorliegende Sekundärstruktur aufgeklärt und verschiedene charakteristische Elemente identifiziert.

1.2 Natürliche Antisense Transkription

Seit 2001 die vollständige Entschlüsselung des menschlichen Genoms publiziert wurde [74, 145], musste die Zahl der proteinkodierenden Gene stetig nach unten korrigiert werden. Ging man zunächst von ca. 35000 Genen aus, die für ein Protein kodieren, so glaubt man mittlerweile, dass es nur etwa 21000 sind [2, 30, 74]. Aufgrund verschiedener Studien kann man davon ausgehen, dass die Anzahl der proteinkodierenden Gene nicht mit der Komplexität eines Organismus korreliert. Man machte sich auf die Suche nach anderen Mechanismen und stieß unter anderem auf nicht-kodierende RNA (ncRNA).

1.2.1 ncRNA

Die transkriptionelle Leistung eines Organismus wird durch ein komplexes System von funktionellen, strukturellen und regulatorischen Elementen gesteuert. Man nimmt an, dass dabei auch die große Anzahl nicht kodierender RNA (ncRNA) eine Rolle spielt. Diese macht vermutlich mehr als 90% der gesamten transkribierten Menge aus [45, 91, 107, 154].

Anzumerken ist, dass die phylogenetische Konservierung der Regionen der ncRNAs auffallend schlecht ist [21].

ncRNAs werden in verschiedene Klassen unterteilt, „Natural Antisense Transcript“ (NAT) ist eine davon.

1.2.2 NAT

Bei NATs handelt es sich um RNA-Transkripte, die zu einer anderen endogenen RNA komplementär sind und zu dieser in reverser Orientierung vorliegen. Sie können proteinkodierend sein.

Es gibt eine Vielzahl von Screenings des humanen Genoms, anhand derer versucht wird die tatsächliche Häufigkeit von NATs abzuschätzen. Grundlegende Studien verwendeten mRNA und EST (Expressed Sequenced Tag) Verzeichnisse, ergänzt mit Informationen über Spleißing, Poly(A)-Signale und RNA-Formation. Schätzungen auf dieser Grundlage ergaben eine

1. Einleitung

Häufigkeit für NATs zwischen 15% und 25% aller transkriptioneller Einheiten [26, 83, 126, 156]. Eine andere Form des Screenings ist die „Cap-Analysis and Gene Expression“ (CAGE) und „Serial Analysis of Gene Expression“ (SAGE) in Kombination mit den Sequenzierungs-Verzeichnissen über cDNA Microarrays und Tiling Arrays. Durch diese Screenings konnte die Menge der mutmaßlichen NATs erweitert werden [15, 29, 42, 59, 109, 147]. Aktuell wird vermutet, dass mindestens 40% aller transkriptionellen Einheiten überlappende Antisense Partner haben [36]. Dabei ist fraglich, wie exakt diese Screenings sind. Sie selbst und ihr Vergleich untereinander bergen einige Schwierigkeiten und es gibt nur wenige experimentell nachgewiesene NATs.

Bisher konnten keine Anzeichen dafür gefunden werden, dass die Antisense Transkription mit der Komplexität des Organismus verknüpft ist [134, 159].

1.2.2.1 Aufbau

„Antisense Transkription“ ist ein sehr ungenauer Begriff, der lediglich die grundsätzliche Anordnung zweier transkriptioneller Einheiten beschreibt, die auf gegenüberliegenden Strängen des gleichen genomischen Ortes lokalisiert sind. Der Begriff Sense-Antisense (SAS) Paar beschreibt zwei Transkripte, die von gegenüberliegenden Strängen des gleichen Ortes des Genoms transkribiert werden.

Es besteht bislang keine exakte Definition.

Beide Anteile eines SAS Paares können proteinkodierend sein, sie können ohne Introns sein oder gespleißt werden.

Es ist nicht eindeutig festgelegt, welches Transkript der Sense-Partner und welches der Antisense-Partner ist. Normalerweise wird das Transkript als Sense-Partner bezeichnet, das für ein Protein kodiert, zumindest in den Fällen, in denen nur ein Partner proteinkodierend ist. Sind beide Partner proteinkodierend oder nicht kodierend, so erfolgt die Benennung willkürlich. Problematisch ist dies, wenn über die Benennung suggeriert wird, dass einem der beiden Partner eine regulatorische Rolle über den anderen zugemessen wird.

1. Einleitung

Üblicherweise ist das Sense Transkript stärker exprimiert, besser charakterisiert oder hat eine offensichtlichere Funktion, es ist der Partner, der gespleißt wird oder die längeren Intron-Sequenzen besitzt [28, 96].

Unterschieden werden cis-NATs, die vom gegenüberliegenden Strang des gleichen genomischen Ortes wie die Sense RNA transkribiert werden und trans-NATs, die von einem anderen Ort als die Sense RNA transkribiert werden und nur eine kurze oder unvollständige Komplementarität zum Sense Transkript zeigen [83], diese können in einer Entfernung bis zu mehreren hundert Kilobasen lokalisiert sein.

Je nach genomischer Organisation werden verschiedene Muster unterschieden. SAS-Paare können head-to-head, auch divergent genannt, angeordnet sein, das heißt, sie überlappen mit ihren 5'-Enden. Sie können tail-to-tail, auch konvergent genannt, angeordnet sein, das heißt ihre 3'-Enden überlappen sich. Sie können auch embedded vorliegen, das heißt, ein Gen ist in die Region des anderen Gens eingeschlossen [77].

Neuere Studien berichten, dass die divergente Orientierung überwiegt [38, 62, 83, 159].

1.2.2.2 Funktion

Einsträngige RNA hat besondere Eigenschaften, sie kann neben der Übermittlung einer Proteinsequenz auch regulatorische Funktionen übernehmen und eine entscheidende Rolle in der Komplexität der Regulation der Genexpression spielen. Dabei zeichnet sich einsträngige RNA durch eine schnelle und einfache Produzierbarkeit und den ebenso schnellen wie einfachen Abbau aus. Ihre Konformation ist flexibel, sie kann sowohl mit Nucleinsäuren als auch mit Proteinen interagieren. Damit sind die Grundvoraussetzungen für eine schnelle und anspruchsvolle Bindung gegeben, die das Prozessieren und Speichern sowohl endogener als auch exogener Informationen ermöglicht [124].

1. Einleitung

1.2.2.2.1 Expression

Es gibt Arbeiten, die zeigen, dass Gene im Genom nicht zufällig angeordnet sind [54, 106, 123]. Oft sind Gene, die in ähnlicher Weise und/oder im Zusammenhang exprimiert werden, entlang des Genoms gebündelt, so dass die Koexpression zumindest teilweise durch gemeinsame regulatorische Elemente, wie Enhancer und bidirektional ausgerichtete Promotoren [5, 22, 84, 85, 141], oder durch Chromatin-vermittelte Prozesse [44, 58, 108, 130], vermittelt wird.

Verschiedene Studien zeigen, dass NATs je nach Gewebe oder Zellen in einer spezifischen Art exprimiert werden, außerdem scheinen sie mit dem Expressionsmuster ihres Sense Transkripts verknüpft zu sein [15, 26, 100, 143], bisher konnte allerdings kein allgemein gültiges Schema ermittelt werden. Häufig handelt es sich dabei wohl um eine reziproke Beziehung [27, 152], woraus sich schließen lässt, dass NATs dazu tendieren mit der Expression ihres Sense Partners positiv korreliert zu sein [62, 100, 143].

Ob eine solche biologische und funktionelle Relevanz der Koexpression besteht, ist bislang nur für wenige Gene bewiesen, denn die Koexpression zweier Gene bedeutet nicht zwangsläufig eine funktionelle Verknüpfung [10].

1.2.2.2.2 Regulationsmechanismen

NATs wurden mit zahlreichen regulatorischen Mechanismen in Zusammenhang gebracht, die, direkt oder indirekt, auf nahezu allen Ebenen der transkriptionellen Regulation eingreifen können. Die indirekte Rückkopplung mit dem Sense-Partner benötigt ergänzende Faktoren, die die Transkription fördern oder inhibieren. Regulieren NATs dabei einen ganzen Effektor-Komplex, so können sie eine Führungsrolle bei der Regulation der Transkription übernehmen.

Auch eine mögliche Duplex-Formation zwischen Sense-Antisense Partnern kann regulatorische Funktionen übernehmen.

1. Einleitung

Die Frage, ob endogene Sense-Antisense Paare in eukaryotischen Zellen jedoch tatsächlich hybridisieren, ist, auch für die bereits detaillierter erforschten NATs, hauptsächlich ungeklärt [139].

Die Duplex-Formation eines Sense-Antisense Paares kann zum posttranskriptionellen Verbergen regulatorischer Schlüsselemente führen und inhibiert auf diese Weise die Interaktion mit anderen Faktoren, die für das Spleißen, den Export oder die Stabilität des Transkripts erforderlich sind.

Viele Sense-Antisense Paare überlappen mindestens eine Exon-Intron-Grenze und es gibt einen bemerkenswert hohen Prozentsatz an Sense-Antisense Paaren, die eine Spleißvariante einbeziehen. Durch alternatives Spleißen kann das Ausbilden von Duplex-Formationen beeinflusst oder auch vollständig verhindert werden [39, 83]. Es ist eine mögliche Beziehung zwischen alternativem Spleißen und der Regulation durch NATs zu vermuten.

Bisher wurden zwei Beispiele publiziert, die diese Beziehung nahe legen, so soll das RevErbA α Transkript alternatives Spleißen inhibieren und der Thyroid Hormone Rezeptor TR α 2 [49] mit dem transkriptionellen Faktor Zeb2 NAT soll eine Retention des Introns in der Zeb2 mRNA implizieren [12].

Als einen anderen regulatorischen Mechanismus wird angenommen, dass RNA-Duplexe (dsRNA) als Substrat für ADARs (RNA-Editing Adenosine Desaminases) dienen können und so dem „A to I Editing“ unterliegen. Dieses „A to I Editing“ der NATs spielt möglicherweise eine generelle Rolle bei der Regulation der nukleären Retention, der Stabilisierung oder dem Abbau des Sense Transkripts [20, 71]. Dies ist aufgrund verschiedener vorliegender Studien jedoch fragwürdig [63, 98].

Die Ausbildung einer Duplex Struktur ist nicht notwendigerweise die Grundvoraussetzung für regulatorische Aufgaben.

Es gibt auch andere mögliche Mechanismen, die regulatorische Funktionen übernehmen können, wie „Transcriptional Interference“ (TI). Dieser Begriff beschreibt den direkten supprimierenden Einfluss auf transkriptionelle Prozesse [125], ihm wird eine Schlüsselrolle bei der Genregulation in Säugetieren zugeordnet [93].

1. Einleitung

Angesichts der vielfältigen Möglichkeiten dieser Art und Weise der Regulation ist es schwierig, ein generelles Prinzip zu ermitteln. So kann die „TI“ zum Beispiel über einen Promotor oder andere regulatorische Regionen (Aktivatoren, Silencers, Insulators) stattfinden. In manchen Fällen kann „TI“ die Interaktion mit Bindungsproteinen stören [101], während in anderen Fällen die Bindung durch eine verbesserte Chromatin-Erreichbarkeit erleichtert werden kann [80].

1.2.3 Zusammenfassung

Es lässt sich festhalten, dass im humanen Genom NATs vorliegen, die verschiedene regulatorische Funktionen erfüllen.

Allerdings ist offensichtlich, dass die bislang beschriebenen NATs und ihre Funktionsweise nur unvollständig erforscht sind.

Der Anteil experimenteller und biologischer Artefakte darf genauso wenig vernachlässigt werden, wie die Tatsache, dass es sich bei der Menge der beschriebenen Antisense Transkription um Schätzwerte handelt.

Es ist nun wichtig, NATs einzeln zu betrachten. Dabei ist die Feststellung der eindeutigen Orientierung eines Transkripts von besonderem Interesse. In einem weiteren Schritt sollte die Funktion und Beziehung von NATs zu anderen Transkripten und ihre regulatorische Funktion betrachtet werden.

Diese Einzelbetrachtung wurde in der vorliegenden Arbeit für die NAT zu HIF-1 α , aHIF, durchgeführt.

1.3 Der „Hypoxia-Inducible Factor“ (HIF)

1.3.1 Hypoxie

Hypoxie ist definiert als Sauerstoffmangel im Gewebe und im arteriellen Blut.

Ursächlich für eine Hypoxie können eine unzureichende Sauerstoffzufuhr, Anämie, Gefäßverengungen oder Vergiftungen sein.

Sowohl unter Extremsituationen, als auch bei Alltagsbelastungen wie Sport ist der menschliche Körper auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung über das respiratorische und kardiovaskuläre System angewiesen. Viele Vorgänge im Körper brauchen Sauerstoff um ablaufen zu können. Normalerweise ist Sauerstoff in der Luft zu 21% enthalten, im Körper liegt der normale Sauerstoffpartialdruck bei über 65mmHg, bei einem Sauerstoffpartialdruck von weniger als 50mmHg spricht man von einer schweren Hypoxämie.

Beruhend auf den verschiedenen Ursachen, die eine Hypoxie verursachen können, werden verschiedene Formen der Hypoxie unterschieden: hypoxämisch, anämisch, ischämisch oder histotoxisch. Dauert die Hypoxie länger an, so kommt es zur Nekrose.

Für den menschlichen Körper ist es extrem wichtig, sich an den Zustand der Hypoxie optimal anpassen zu können. Dazu stimuliert die Hypoxie im Körper verschiedene Enzyminduktionswege, die zu einer Senkung des Sauerstoffbedarfs führen oder eine bessere Versorgung mit Sauerstoff sicherstellen.

Während des Zustandes der Hypoxie kommt es zu einer Umstellung auf einen anaeroben Stoffwechsel, es kommt zur metabolischen Azidose, der verminderte Sauerstoffpartialdruck bewirkt im Gewebe zunächst eine lokale Vasodilatation. Langfristig wird bei chronischer Hypoxie die Hämoglobinkonzentration und Erythrozytenzahl gesteigert.

Wie gut die Adaptation an Hypoxie im menschlichen Organismus funktioniert ist abhängig von der Intensität und Dauer, der genetischen Ausstattung, dem Trainingszustand und dem Allgemeinzustand.

In der vorliegenden Arbeit wird auf den Enzyminduktionsweg über den Transkriptionsfaktor „Hypoxia-Inducible Factor“ (HIF) näher eingegangen. HIF

1. Einleitung

ist ein wichtiger Faktor, der maßgeblich an der zellulären Adaptation an Hypoxie beteiligt ist, er greift in viele verschiedene Stoffwechselfvorgänge in den verschiedensten Geweben ein.

Die zelluläre Antwort auf Hypoxie stellt ein komplexes System dar, eine umfassende Beschreibung aller Stoffwechselfvorgänge und ihrer Enzyminduktionswege sprengt den Rahmen dieser Arbeit.

Sicher ist, dass HIF eine wichtige Rolle innerhalb dieses Systems übernimmt. Die Rolle seines natürlichen Antisense Transkripts ist dabei bislang nicht abschließend geklärt.

1.3.2 HIF

HIF (Hypoxia-Inducible Factor) ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der, wie der Name bereits sagt, durch Hypoxie induziert wird. HIF wurde entdeckt, als im 3'-Ende von EPO (Erythropoietin) ein HRE (Hypoxia Response Element) beschrieben wurde, HIF bindet an HREs und führt so zu einer Regulation des entsprechenden Transkripts.

HIF ist aus zwei Untereinheiten, α und β , aufgebaut, für die α -Untereinheit bestehen 3 Isoformen.

Es reguliert viele verschiedene Mechanismen und ist maßgeblich an der zellulären Adaptation an Hypoxie beteiligt.

1.3.2.1 Aufbau von HIF

HIF besteht aus zwei Untereinheiten, α und β . Die Aktivität von HIF wird über die Verfügbarkeit der α -Untereinheit reguliert, die β -Untereinheit wird konstitutiv im Zellkern exprimiert.

HIF gehört zur Gruppe der basischen Helix-Loop-Helix Proteine (bHLH), was ein strukturelles Motiv bezeichnet, das Transkriptionsfaktoren kennzeichnet. Die bHLH-Domäne ermöglicht die Bindung der DNA und die Dimerisierung der beiden Untereinheiten. Diese Bindung wird außerdem durch eine Per-ARNT-SIM (PAS) Domäne gefördert.

1. Einleitung

Außerdem beinhaltet HIF eine NLS-Domäne (Amino/Carbony Nuclear Localisation Signal), die unter hypoxischen Bedingungen die Translokation in den Nukleus vermittelt.

1.3.2.1.1 Die α -Untereinheit

Die α -Untereinheit ist 826 Aminosäuren lang und hat ein Gewicht von 120 bis 130 kD, es gibt drei Isoformen: HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α .

Die α -Untereinheit enthält zwei Transaktivierungsdomänen: N-TAD und C-TAD im C-terminalen Ende des HIF-1 α Proteins [116]. C-TAD kann mit Coaktivatoren wie CBP/p300 interagieren und so die Gen-Transkription aktivieren [76].

Außerdem enthält HIF-1 α eine ODDD (Oxygen-Dependent Degradation Domain), die eine über Sauerstoff regulierte Stabilität vermittelt.

Die Stabilität und Aktivität der α -Untereinheit wird durch posttranslationelle Modifizierungen erreicht, dazu gehören Hydroxylierung, Ubiquitinierung, Acetylierung und Phosphorylierung [17].

Bei HIF-2 α handelt es sich um einen Teil der PAS-Familie 2 (MOP2), es wird auch als HLF (HIF-Like Factor) oder als HRF (HIF-Related Factor) bezeichnet. HIF-2 α stimmt zu 48% mit der Aminosäuresequenz von HIF-1 α überein und hat mit diesem auch viele strukturelle und biochemische Eigenschaften, wie zum Beispiel die Heterodimerisierung mit HIF- β und die Bindung an HREs, gemeinsam [35, 137]. HIF-2 α kommt vor allem in der Lunge, dem Endothel und im Glomus caroticum vor [35, 137, 138].

Auch HIF-3 α teilt sich einige strukturelle und biochemische Eigenschaften mit HIF-1 α , so dimerisiert auch diese Isoform mit der β -Untereinheit und bindet an HREs [48]. HIF-3 α wird in verschiedenen Geweben exprimiert. Eine Spleißvariante von HIF-3 α , IPAS (Inhibitorisches PAS), wird überwiegend in den Purkinjezellen exprimiert. Im hypoxischen Zustand wird es außerdem auch in Herz und Lunge induziert, was in einem negativen Feedback für die HIF-1 Aktivität resultiert [89].

1. Einleitung

1.3.2.1.2 Die β -Untereinheit:

Die β -Untereinheit wird auch als ARNT bezeichnet (Aryl Receptor Nuclear Translocator) [112]. Sie wurde ursprünglich als Bindungspartner des Aryl Hydrocarbon Rezeptors und nicht im Zusammenhang mit HIF entdeckt [112].

Sie ist 774 bis 789 Aminosäuren lang und 91 bis 94 kD schwer [148] und wird, unabhängig von Hypoxie, dauerhaft exprimiert. Sie kann mit allen drei Isoformen der α -Untereinheit heterodimerisieren.

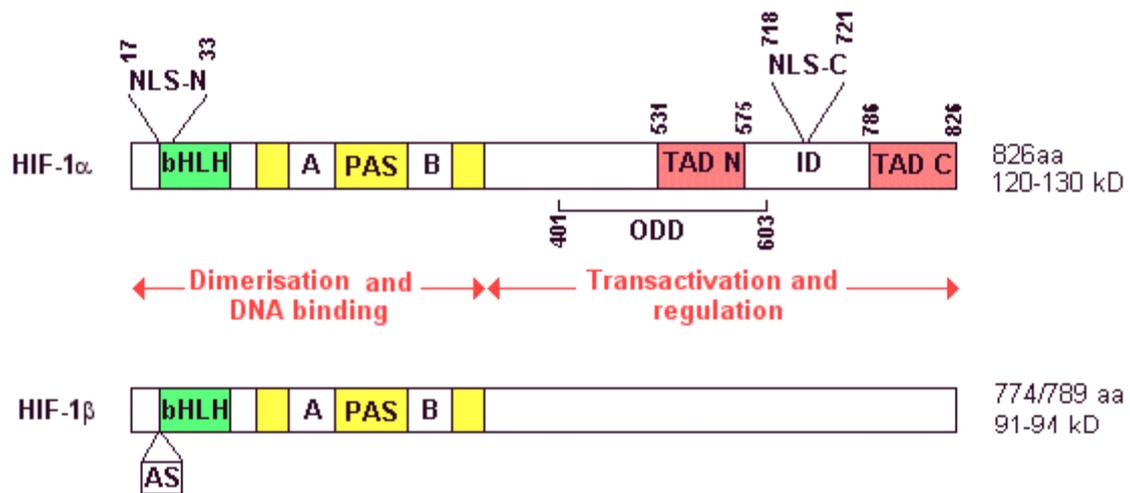


Abbildung 1 zeigt den Aufbau der beiden Untereinheiten für HIF-1. Die obere Zeile zeigt schematisch den Aufbau von HIF-1 α mit den verschiedenen Domänen und ihrer Funktion.

Die untere Zeile zeigt den schematischen Aufbau der HIF-1 β Untereinheit mit ihren funktionellen Domänen. (Abbildung modifiziert nach Semenza, 1999 [121]).

1.3.3 HIF-1 α

Das Gen HIF-1 α ist auf dem Chromosom 14q20-24 lokalisiert und beinhaltet 15 Exons.

1.3.3.1 Posttranskriptionelle Modifizierungen der HIF-1 α mRNA

Die nach der Transkription eines Gens entstandene hnRNA wird durch posttranskriptionelle Prozesse im Nukleus zu mRNA. Dazu gehört das Anhängen eines GTP an das 5'-Ende der hnRNA, die so genannte CAP-Struktur und das Anhängen eines Poly(A)-Schwanzes an das 3'-Ende der hnRNA. Dieser besteht meist aus ungefähr 250 Adeninen und sein Anhängen wird durch ein Poly(A)-Signal vermittelt.

Zu den Modifizierungen gehört weiterhin das Spleißen, dies wird durch Spleißsignale vermittelt, die von Spleißosomen erkannt werden. Dabei kann es auch alternative Spleißsignale geben, die zu unterschiedlichen Spleißvarianten führen, dabei werden neben Introns auch Exons entfernt.

HIF-1 α weist sowohl einen Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende, als auch eine CAP-Struktur am 5'-Ende auf.

Zur HIF-1 α mRNA gibt es vier verschiedene Spleißvarianten [47] unter anderem die wichtige alternative Spleißvariante, der das Exon 14 fehlt [51, 68]. Trotzdem kann sie an die β -Untereinheit binden und senkt auf diesem Weg die transkriptionelle Aktivität von HIF-1.

1.3.3.2 Regulationsmechanismen

Im hypoxischen Zustand wird HIF-1 α hochreguliert, während in Normoxie dessen Abbau angestrebt wird.

Die zelluläre Antwort auf Hypoxie muss sehr schnell, innerhalb einiger Stunden, erfolgen um Zellschäden zu verhindern.

Die gesteigerte Proteinstabilität von HIF-1 α ist dabei der hauptsächliche Mechanismus für die zelluläre Adaptation an niedrige Sauerstoffspiegel [53].

Die Überexpression von HIF-1 α unter Hypoxie wird dabei primär nicht über einen Anstieg der Transkription erreicht, sondern durch posttranslationelle

1. Einleitung

Veränderungen, die den Abbau des Proteins verhindern, die Heterodimerisierung mit HIF- β ermöglichen und so zu einem funktionsfähigen Transkriptionsfaktor HIF-1 führen [17].

Die Regulation von HIF-1 α ist abhängig vom Sauerstoffgehalt eines Gewebes. Der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe wird durch die Familie der Prolyl-Hydroxylasen (PHD) und durch FIH (Factor Inhibiting HIF) erfasst.

Nach der Dimerisation bindet der Komplex HIF-1 an Hypoxia Response Elements (HRE), die sich im Promotor von HIF-1 Zielgenen befindet. Außerdem bindet der Komplex an weitere transkriptionelle Coaktivatoren und induziert so zusätzlich die Gentranskription [76].

Unter normoxischen Bedingungen findet für die α -Untereinheit ein schneller Proteinabbau statt [117].

Unter hypoxischen Bedingungen wird die Prolin-Hydroxylierung blockiert und die α -Untereinheit nicht proteolytisch abgebaut.

1.3.3.2.1 Normoxie

Unter normoxischen Bedingungen wird das HIF-1 α Protein schnell abgebaut und resultiert in keinem nachweisbaren Protein, es hat eine kurze Halbwertszeit von ungefähr fünf Minuten [117]. Dabei gibt es verschiedene Abbauege:

Zum einen durch die Hydroxylierung von zwei konservierten Prolinresten, dies geschieht durch sauerstoffregulierte Prolyl-Hydroxylasen [52, 56]. Die hydroxylierten Prolinreste gehen dann eine spezifische Bindung mit dem pVHL Ubiquitin E3 Ligase Komplex ein, was letztlich zum Abbau führt [60].

Der pVHL Komplex ist der wichtigste Regulator für die HIF-1 α Stabilität [92]. Er befindet sich im Zytoplasma und markiert HIF-1 α mit Ubiquitin, dies ermöglicht den Abbau durch 26S Proteasomen [75]. Diese Ubiquitinierung findet nur in Normoxie und nur nach Prolinhydroxylierung statt [157].

Auch die Acetylierung eines Lysinrestes in der ODDD (Oxygen-Dependent-Degradation-Domain) durch die ARD-1 (Acetyltransferase Arrest Defective-1) führt, wie oben beschrieben über pVHL zum Abbau von HIF-1 α . Dieser Vorgang ist nicht vom Sauerstofflevel abhängig.

1. Einleitung

Ein anderer Mechanismus um möglichst schnell eine „Ausschaltung“ von HIF-1 α zu erreichen ist die Hydroxylierung eines Asparaginrestes in der C-TAD Region, dies inhibiert die Assoziation von HIF-1 α mit den Cofaktoren CBP (CREB-Binding-Protein)/p300 und verhindert auf diesem Weg die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α [75]. In Hypoxie wird diese Hydroxylierung aufgehoben, so dass die Cofaktoren wieder binden können. Die Funktion dieser Hydroxylase kann durch FIH (Factor Inhibiting HIF) beeinträchtigt [50] werden.

1.3.3.2 Hypoxie

Im hypoxischen Zustand wird HIF-1 α stabilisiert, vom Zytoplasma in den Nukleus transloziert und dort akkumuliert. Dort kann es mit der β -Untereinheit dimerisieren [53, 57] und an die HRE von Zielgenen binden [76].

Die Stabilisierung von HIF-1 α wird zum einen über sinkende VHL-Spiegel begründet [7] zum anderen über die Stabilisierung der ODDD-Domäne [150]. Es wird auch vermutet, dass ROS (Reactive Oxygen Species) an der Hemmung des Abbaus der α -Untereinheiten beteiligt sind [6, 119].

Es gibt verschiedene, auch sauerstoffunabhängige, Einflussfaktoren, die die Stabilität und Proteinaktivität von HIF-1 α fördern, wie die direkte Phosphorylierung oder die Phosphorylierung über MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) oder über p42/44, p38.

Diese Phosphorylierung hat keinen Einfluss auf die Stabilität, aber auf die Proteinaktivität.

Auch Wachstumsfaktoren und (Proto-) Onkogene (unter anderem SRC, RAS, HER-2) haben Einfluss auf das HIF-1 α Proteinlevel, sie steigern die Transkriptionsrate und somit auch die transkriptionelle Aktivität [24, 78].

Zudem wird HIF-1 α durch Zytokine und Umweltstimuli beeinflusst.

Voraussetzung für eine gesteigerte Transkription von HIF-1 α Zielgenen ist sowohl das Vorliegen erhöhter HIF-1 α Konzentrationen, als auch eine gesteigerte DNA-Bindungskapazität von HIF-1 α .

1. Einleitung

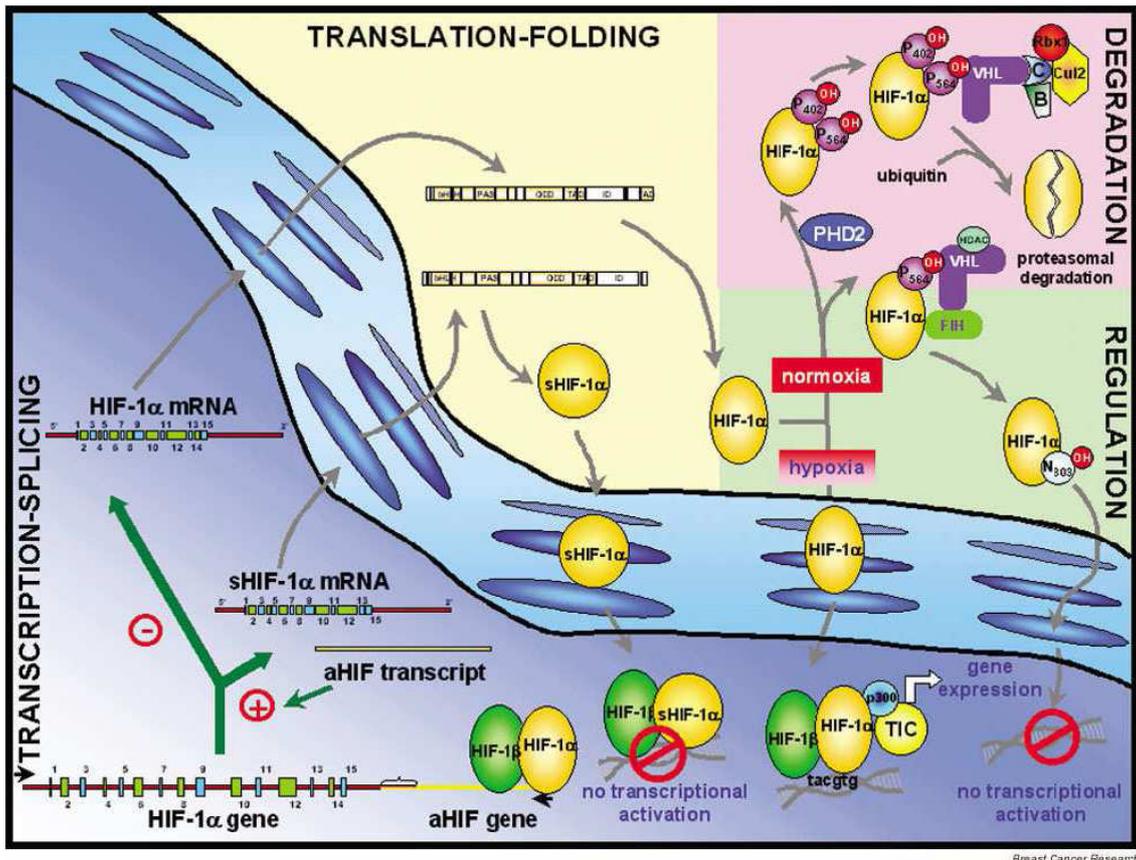


Abbildung 2 zeigt die Regulationsmechanismen für HIF-1 α während Normoxie und Hypoxie, sowie für die beiden Spleißvarianten HIF-1 α und sHIF-1 α (ohne Exon 14). Gezeigt sind sowohl die Abbaumechanismen, als auch die Bindung an Zielgene [23].

1.3.3.3 Funktion von HIF-1 α

Der HIF-1 α Komplex bindet an spezifische Bindungsstellen, HBS (HIF-Binding Sites), im Bereich der HRE-Sequenz des Zielgens. Dazu wird eine Reihe von transkriptionellen Cofaktoren benötigt, wie CBP/p300 und HSP90. Die Bindung an die DNA des Zielgens wird über die bHLH- Domäne vermittelt

Nach Thrash-Bingham und Tartof (1999) [136] hat HIF-1 α viele Funktionen, die beiden wichtigsten sind die Funktion als Transkriptionsfaktor für durch Hypoxie induzierte Gene und die Stabilisierung des Proteins p53 während Hypoxie [8]. Bislang sind über 60 Gene bekannt, die über HIF-1 α reguliert werden und an zahlreichen physiologischen Signalketten der Hypoxieantwort beteiligt sind.

1. Einleitung

Dazu gehören Gene, die an der Erythropoese, dem Glukosestoffwechsel, der Angiogenese, dem Gefäßtonus und dem Zellzyklus beteiligt sind.

Außerdem hat HIF-1 α Einfluss auf die Adipogenese, die „Carotide Body Formation“, die Entwicklung der B-Lymphozyten und die Immunreaktion, sowie auf das Grundgerüst des Stoffwechsels und der Gefäßreifung über MMPs (Matrix-Metallo-Proteinases), PAIs (Plasminogen Activator Receptors and Inhibitors) und die Kollagen Prolyl Hydroxylase.

Der Einfluss von HIF-1 α auf die Erythropoese findet über eine HRE Region im 3'-Enhancer von EPO statt, an die HIF bindet. Diese Bindung führt zu einer verstärkten Transkription von EPO, dadurch wird die Erythropoese gesteigert und die metabolische und vaskuläre Adaptation unter Hypoxie ermöglicht. Außerdem werden andere Proteine hochreguliert, wie Transferrin, Transferrin-Rezeptor und Cerruloplasmin, die über den Eisenstoffwechsel ebenfalls in die Erythropoese involviert sind. Es wird also neben der Erythrozytenzahl auch deren Transportfähigkeit für Sauerstoff reguliert [46, 64, 120].

Zusätzlich werden weitere Gene in der Nähe des EPO-Gens aktiviert, die in Glykolyse, Erythropoese und Angiogenese involviert sind.

In Hypoxie findet die anaerobe Glykolyse statt, deren Enzyme von HIF-1 α hochreguliert werden. Außerdem werden die Glucose-Transporter GLUT1 und GLUT3 hochreguliert, so dass die Aufnahme von Glucose in Zellen beschleunigt wird [25, 33].

Die Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der durch verschiedene Genprodukte gesteuert wird, die in verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. HIF-1 α reguliert die an diesem Prozess beteiligten Proteine PDGF, Amy-2, Tie-2, VEGF-R und VEGF. Die Gensequenz von VEGF und PDGF beinhaltet ein HRE [82].

Die Regulation des Gefäßtonus funktioniert unter anderem über die Nitrous Oxide Synthetase (NOS2), diese beinhaltet in ihrer Gensequenz ein HRE, und

1. Einleitung

die Hämoxigenase 1, Endothelin 1, ADM (Adrenomedulin) und den $\alpha 1B$ Adrenalin-Rezeptor. Durch Bindung von HIF-1 α wird ihre Aktivität reguliert und eine Vasodilatation unter Hypoxie erreicht [64].

Der Zellzyklus, sowohl die Zellproliferation, als auch das Überleben der Zellen, wird durch HIF-1 α mitreguliert [122], so induziert es die Wachstumsfaktoren IGF2 (Insulin-Like Growth Factor 2) und TGF α (Transforming Growth Factor α) [37, 70]. Über diesen werden unter anderem die Signal-Transduktions-Pathways MAPK und PI3K aktiviert, sie können somit ausschlaggebend für die Krebsprogression sein. Auch auf die Apoptose unter Hypoxie nimmt HIF-1 α Einfluss, seine Expression korreliert signifikant mit proapoptotischen Faktoren, wie Caspase-3, Fas und Fas-Ligand. Außerdem unterdrückt HIF-1 α das antiapoptotische Protein Bcl-2, während es das proapoptotische Protein NIP3-like Protein X (NIX) hoch reguliert.

Einfluss auf den Zellzyklus nimmt HIF-1 α auch über p53 und p21. HIF-1 α kann an p53 binden und schützt es so vor proteolytischem Abbau durch Proteasomen [8, 135] in hypoxischen Zellen wird p53 dadurch akkumuliert. p53 induziert die Apoptose über die Induktion Apoptose-bedingter Gene: Bax, NOXA, PUMA, PERP.

1.3.3.4 Die Rolle von HIF-1 α für verschiedene Tumore

Aufgrund seiner weit reichenden Rolle bei der Regulation verschiedenster Mechanismen im hypoxischen Zustand spielt HIF-1 α auch in verschiedensten Tumoren eine Rolle.

Man nimmt an, dass ungefähr die Hälfte aller Tumoren hypoxisch sind oder aus hypoxischen Regionen bestehen und folglich auch hypoxische Gene überexprimieren, um so unter anderem eine Vaskularisierung zu erreichen.

Die Rolle von HIF-1 α wurde für verschieden Tumoren erforscht.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Ausfall der Funktion von VHL (von Hippel-Lindau Faktor) zu hohen Basalraten von HIF-1 α führt [55]. Außerdem interagiert HIF-1 α mit dem Tumorsuppressor p53 und spielt somit eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation [110].

1. Einleitung

Verschiedene Mutationen von VHL (zum Beispiel beim klarzelligem Nierenkarzinom und beim Hämangioblastom) verhindern die Interaktion zwischen VHL und HIF-1 α und erlauben damit die Akkumulation von HIF-1 α .

Salnikow et al. [118] untersuchten das Prostatakarzinom, hier führt der Verlust der p53 Funktion zu einem erhöhten Level der HIF-1 α abhängigen Transkription und in dieser Konsequenz dann zu einem maligneren Phänotyp.

Cayre et al., 2003 [23] untersuchten die Bedeutung von HIF-1 α , sHIF-1 α (Spleiß-Variante ohne Exon 14) und aHIF für das Mammakarzinom. Sie entdeckten eine starke Korrelation zwischen HIF-1 α und sHIF-1 α und zwischen sHIF-1 α und aHIF, aber nur eine schwache Korrelation zwischen HIF-1 α und aHIF.

Es konnte eine positive Korrelation zwischen HER2 und HIF-1 α (auch auf Protein-Ebene) nachgewiesen werden [16, 23], sowie eine negative Beziehung zwischen HIF-1 α mRNA und Östrogen-Rezeptoren [23, 72].

HIF-1 α wird im invasiv duktalem Karzinom stärker exprimiert als im invasiv lobulären Karzinom. Es findet sich jedoch keine Relation zwischen dem histologischen Grading, der HIF-1 α oder aHIF Expression [136].

Auch im Ovarialkarzinom konnte in 71,7% HIF-1 α mRNA gefunden werden [97]. Sondergaard et al. fanden außerdem in 100% der Glioblastome HIF-1 α mRNA [129].

1.3.4 Zusammenfassung

Es kann also abschließend festgehalten werden, dass es sich bei HIF-1 α um einen gut untersuchten Transkriptionsfaktor handelt, der mit allen wichtigen, mit Hypoxie in Zusammenhang stehenden, Stoffwechselfvorgängen vergesellschaftet ist und eine weit reichende Rolle für die Anpassung der Zellen des menschlichen Organismus an Hypoxie spielt.

Darüber hinaus liegen einige Untersuchungen über die Rolle bei Tumoren vor. Für HIF-1 α wurde außerdem das Vorliegen einer NAT, aHIF, beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wird diese und der Zusammenhang zwischen HIF-1 α und aHIF näher betrachtet.

1.4 Ein natürliches Antisense Transkript: aHIF

Die Benennung aHIF für eine Sequenz stammt von Thrash-Bingham und Tartof, 1999 [136], die in einer RCC22 Zelllinie ein natürliches Antisense Transkript komplementär zur 3'-UTR von HIF-1 α fanden und dieses als aHIF bezeichneten.

Dies war nach ihrem Wissensstand der erste Fall eines NATs (Natural Antisense Transcript), das exklusiv mit einer spezifischen menschlichen malignen Erkrankung assoziiert ist [136].

1.4.1 Aufbau und Eigenschaften von aHIF

Thrash-Bingham und Tartof, 1999 [136] beschrieben die von ihnen entdeckte Sequenz mit einer Länge von 1577 Basenpaaren. Diese überlappt mit 882 Basenpaaren mit dem terminalen Ende der 3'-UTR der HIF-1 α mRNA und ist exakt komplementär zu dieser. Die weiteren 695 Basenpaare reichen in Richtung des 5'-Endes, allerdings nahmen Thrash-Bingham und Tartof an, dass sie das 5'-Ende nicht erreichen konnten.

Für das 3'-Ende nahmen sie an, dass sie dieses nahezu oder vollständig erreicht hatten, es soll nicht polyadenyliert sein. Sie fanden eine hohe Konservierung der 3'-UTR von HIF-1 α , was auf einen hohen Selektionsdruck hindeutet und stellten die These auf, dass eine mögliche Duplexbildung zwischen HIF-1 α und aHIF ein Signal für die Stabilisierung oder Destruktion von HIF-1 α sein könnte [86].

Für das gefundene Transkript konnte kein „Open-Reading Frame“ (ORF) vorhergesagt werden. Es konnte weiterhin auch kein Northern-Blot durchgeführt werden.

1. Einleitung

Ein Vergleich der entsprechenden humanen Nukleotidsequenzen mit der Nukleotidsequenz der Maus zeigt, dass diese über die gesamte Länge zu 89% identisch sind. Solch eine starke Homologie zwischen nicht kodierenden Sequenzen ist ein Hinweis darauf, dass diese Sequenz entweder einem starken selektiven Druck unterliegt oder sie eine wichtige Rolle für die Zelle spielt [149]. Rossignol et al., 2002 [113] ergänzten diese Untersuchungen. Sie konnten zeigen, dass aHIF mit wenigstens 1027 Basen mit der 3'-UTR von HIF-1 α komplementär ist, ihre Sequenz ist somit mehr als 140 Basen länger, als die von Thrash-Bingham und Tartof 1999 beschriebene.

Sie zeigten einen AT-Gehalt der Sequenz von 70,8% und einen GC-Gehalt von 29,2%. Außerdem entdeckten sie AU-reiche Sequenzen innerhalb der 3'-UTR von HIF-1 α , die vermutlich die Abbaugeschwindigkeit der HIF-1 α mRNA beschleunigen können.

Sie führten eine Vorhersage der Sekundärstruktur dieser Sequenz durch [113] und konnten zeigen, dass Motive (AU-reiche Sequenzen) auf der mRNA von HIF-1 α innerhalb einer Hairpin-Struktur vorliegen. Diese Hairpin-Struktur kann durch Bindung von HIF-1 α mit aHIF aufgehoben werden, so dass dies in einer single-strand Konformation dieser Motive resultiert. Diese neue Konformation soll eine erleichterte Proteinbindung ermöglichen und möglicherweise zu einem gesteigerten mRNA-Zerfall während der Translation führen, sollte eine zytoplasmatische Translokation des HIF-1 α /aHIF Duplexes existieren [32].

Außerdem führten sie eine Analyse der Promotorregion von aHIF durch, sie postulierten das Auffinden von HRE-Sequenzen, 2800 Basen upstream des bisher beschriebenen Beginns der aHIF Sequenz.

Jedoch konnten auch Rossignol et al. [113] das 5'-Ende nicht abschließend beschreiben.

Auch Uchida et al. 2004 [142] gaben für die Promotorregion von aHIF an, dass diese mögliche HREs beinhalte und über diese reguliert werde.

1. Einleitung

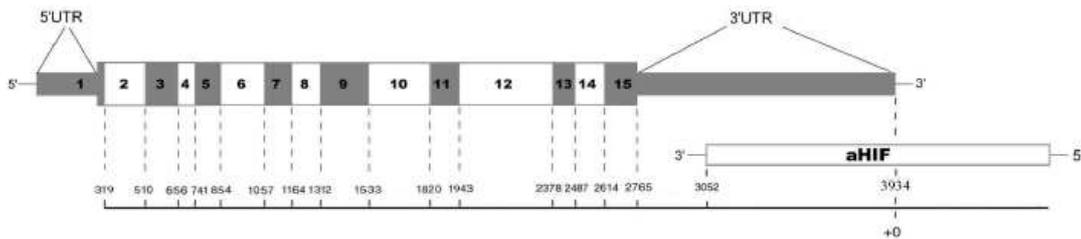


Abbildung 3 zeigt die Lokalisation von aHIF im Vergleich zu HIF-1 α .

Für HIF-1 α gezeigt sind die Exons 1 bis 15 sowie die 5'- und die 3'-UTR. Aus der Abbildung ersichtlich ist die Lokalisation von aHIF, das zu einem Teil komplementär zur 3'-UTR von HIF-1 α ist [94].

1.4.2 Vorkommen von aHIF

Thrash-Bingham und Tartof, 1999 [136] beschrieben das Vorkommen von aHIF erstmals in einer RCC22 Zelllinie. Sie konnten aHIF sowohl in verschiedenen Nierentumoren, als auch im normalen Nierengewebe nachweisen. Außerdem untersuchten sie eine EBV-transformierte Lymphozyten-Zelllinie.

Rossignol et al., 2002 [113] suchten nach der bekannten aHIF Sequenz in mehreren Geweben und fanden es in fetalem Gewebe in Muskel, Leber, Thymus und Lunge, aber nicht in der Niere. In adultem Gewebe war aHIF im Muskel, Leber, Niere, Thymus, Gehirn, Leukozyten und Knochenmark vorhanden. Außerdem fanden sie aHIF im Mammakarzinom, im Knochenmark bei einer chronisch myeloischen Leukämie, sowie im Neuroblastom.

Dabei stellten sie im fetalen Gewebe höhere Expressionslevel fest, als im adulten und eine geringere HIF-1 α /aHIF-Transkriptionsrate. Sie vertraten daraufhin die These, dass im fetalen Gewebe aHIF so hoch exprimiert ist, dass es die HIF-1 α Transkriptionsrate beeinflusst.

Rossignol et al. untersuchten außerdem 2004 [114], das Vorkommen und die Konservierung der aHIF NAT in Nagetieren.

Zolk et al. (2008) [160] untersuchten den HIF-Pathway in der Endphase der Herzinsuffizienz und konnten nachweisen, dass HIF-1 α mRNA Levels signifikant gesenkt waren, während aHIF, im Gegensatz zu Werten aus „Kontroll-Herzen“, nahezu zweifach erhöht war.

1.4.3 Regulation von aHIF

Thrash-Bingham und Tartof, 1999 [136] konnten in den von ihnen untersuchten Nierenkarzinomen feststellen, dass aHIF in allen nichtpapillären klarzelligen Nierentumoren spezifisch überexprimiert war (zehn- bis einhundertfach), im Vergleich zu normalem Nierengewebe, während die Expression von HIF-1 α und ACTB (Beta-Actin) nahezu konstant war. Dies konnte für papilläre Nierenkarzinome nicht beobachtet werden. Außerdem wird aHIF in nichtpapillärem Nierenkarzinomen sowohl unter normoxischen, wie auch unter hypoxischen Bedingungen überexprimiert.

Weiterhin untersuchten sie eine EBV-transformierte Lymphozyten-Zelllinie und entdeckten eine starke Induktion von aHIF unter Hypoxie; die relative Menge (bestimmt gegenüber dem in Normoxie und Hypoxie konstant exprimierten ACTB) war ungefähr um das achtfache gesteigert. Sie ermittelten, dass die Induktion von aHIF nach ungefähr zwei Stunden der Hypoxie beginnt und über die nächsten sechseinhalb Stunden anhält, danach war aHIF um das achtfache erhöht, während HIF-1 α – im Vergleich mit ACTB – zweifach erniedrigt war. Sie stellten die These auf, dass die aHIF Expression das Vorkommen von HIF-1 α mRNA negativ beeinflusst.

Außerdem untersuchten sie Hep3B (Human Hepato-Carcinoma) Zellen und HeLa (Human Ovarian-Carcinoma) Zellen, in beiden war das aHIF Level niedrig und nicht durch Hypoxie induzierbar.

Thrash-Bingham und Tartof vermuteten für die Regulation von aHIF einen Zusammenhang mit VHL, so soll eine Dysfunktion des VHL-Gens zu einer Überexpression von aHIF führen.

Nach Uchida et al., 2004 [142] funktioniert die Regulation von aHIF über HREs, die sich in der Promotorregion befinden sollen und an die sowohl das Protein HIF-1 α , als auch das Protein HIF-2 α binden können, so soll auch HIF-2 α in die Regulation der aHIF Expression eingebunden sein.

1.4.4 Funktion von aHIF

Über die Funktion des aHIF Transkripts ist bislang wenig bekannt. Eine mögliche Regulation des Sense Transkripts durch seine Antisense, wurde bereits für verschiedene Gene beschrieben [10].

Es gibt Beispiele, bei denen die reziproke Regulation eines Sense Transkripts durch die Expression seines Antisense Transkripts gesteuert wird [27, 152].

Bereits 1999 vermuteten Thrash-Bingham und Tartof [136], dass die aHIF Expression das Vorkommen von HIF-1 α mRNA negativ beeinflussen könnte. Sie zeigten dies für Lymphozyten, in denen eine Expression von aHIF zu einem Abfall der HIF-1 α mRNA führte.

Sie vermuteten weiterhin, dass aHIF in der hypoxischen Zellantwort eine regulatorische Rolle spielt.

Rossignol et al. 2002 [113] postulierten, dass aHIF posttranskriptionell die HIF-1 α mRNA reguliert. Dabei sollen durch aHIF AU-reiche Elemente präsentiert werden, die in der 3'-UTR von HIF-1 α mRNA lokalisiert sind und so möglicherweise die Abbaugeschwindigkeit von HIF-1 α mRNA steigern. Diese Präsentation soll durch Interaktion von aHIF mit HIF-1 α mRNA in dessen AU-reicher Region in der 3'-UTR geschehen, ist bislang jedoch nur eine Hypothese [113]. In derselben Arbeit vermuteten Rossignol et al., dass die aHIF Expression keinen Einfluss auf die Expression von HIF-1 α ohne Exon 14 hat.

Rossignol et al. [113] beschrieben in der Promotorregion von aHIF HRE-Sequenzen, die möglicherweise eine Überexpression von aHIF in Hypoxie, durch die Regulation durch HIF-1 α , erklären können. Dies würde in einer negativen Regulationsschleife für HIF-1 α resultieren [113].

Ihre Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die fetalen aHIF Mengen hoch genug sind, um die HIF-1 α mRNA zu beeinflussen. Das bedeutet, dass in einer relativ hypoxischen Umgebung eine langfristige transkriptionelle Regulation von HIF-1 α erforderlich sein kann. Es kann angenommen werden, dass diese Regulation vielmehr durch eine verstärkte Kontrolle durch aHIF zustande kommt, als durch posttranslationelle Modifikationen, die normalerweise bei kurzfristiger Adaptation verwendet werden.

1. Einleitung

Aus den Versuchen mit dem Genom von Nagetieren [114] vermuteten sie, dass aHIF und HIF-1 α auch der Kontrolle gewebsspezifischer Faktoren unterliegen, nicht nur der Kontrolle durch Hypoxie. Uchida et al. 2004 [142] konnten zeigen, dass anhaltende Hypoxie über den Anstieg der HIF-Proteine zu einer Steigerung von aHIF führt. Diese Steigerung von aHIF führt zu einer Destabilisierung der HIF-1 α mRNA und reguliert damit negativ die Expression von HIF-1 α .

Mounier et al., 2006 [95] wollten die Funktion von HIF-1 α und aHIF für die Vorhersage von schlechten und guten Respondern für Trainingseffekte im Blut nachweisen. Diese Vorhersage konnte jedoch nicht getroffen werden.

1.4.5 aHIF und Tumore

Unter den Tumoren, die Rossignol et al. untersuchten fand sich aHIF im Mammakarzinom, bei chronisch-myeloischer Leukämie im Knochenmark und im Neuroblastom [113].

Thrash-Bingham und Tartof, 1999 [136] fanden aHIF vor allem im nichtpapillären klarzelligen Nierenkarzinom überexprimiert, aber nicht im papillären Nierenkarzinom. Im nichtpapillären Nierenkarzinom war es sowohl unter Normoxie, als auch unter Hypoxie überexprimiert [136].

Im nichtpapillären Nierenkarzinom ist VHL im Tumorgewebe mutiert, was zu einer Dysfunktion des VHL-Gens führt. Diese Dysfunktion des VHL-Gens wird als Ursache für die konstitutive Überexpression von aHIF angenommen; aHIF kann unter Hypoxie nicht weiter stimuliert werden [136].

VHL ist ein früh agierender Tumorsuppressor, der bei den meisten (80%) der sporadischen nichtpapillären klarzelligen Nierenkarzinomen mutiert oder „silenced“ ist. Dieser VHL-Defekt ist ein sehr frühes Ereignis in der Tumorgenese und führt vermutlich über aHIF und HIF-1 α zur Überexpression von VEGF, PDGFB und GLUT-1 [136].

In humanen Leberkarzinomzellen (Hep3B) ist der aHIF-Spiegel sehr niedrig und wird nicht durch Hypoxie induziert [136].

In humanen Ovarialkarzinomzellen (HeLa) ist der aHIF-Spiegel ebenfalls sehr niedrig und wird nicht durch Hypoxie induziert [23].

Die Gründe dafür sind bislang unbekannt.

Cayre et al., 2003 [23] stellten fest, dass für die Prognose des Mammakarzinoms aHIF ein eigenständiger Marker ist, nicht jedoch das HIF-1 α Transkript. Die Überexpression von aHIF im Mammakarzinom geht mit einer schlechten Prognose einher [23].

Sie fanden im Mammakarzinom außerdem eine stark positive Korrelation zwischen HIF-1 α und sHIF-1 α (Spleißvariante ohne Exon 14) und zwischen sHIF-1 α und aHIF, aber nur eine sehr schwache Korrelation zwischen HIF-1 α und aHIF [23].

Es gibt keine Relation zwischen aHIF, dem klinischen Lymphknotenstatus, dem histologischen Typ, den Östrogen- Rezeptoren, HER2 und p53.

1. Einleitung

Caniggia et al., 2000 [19] beschrieben aHIF als Inhibitor der HIF-1 α mRNA Translation. Auf diese Weise wird die Trophoblasten-Invasion kontrolliert, was eine Rolle bei der Prä-Eklampsie und beim Chorionkarzinom spielt.

1.4.6 Zusammenfassung und Zielsetzung dieser Arbeit

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass aHIF zwar bereits charakterisiert wurde, aber diese Charakterisierung bei weitem nicht ausreichend ist. So konnte bislang weder die exakte Länge, noch das 5'- oder 3'-Ende abschließend beschrieben werden. Auch über mögliche Regulationsmechanismen oder enthaltene Motive kann bislang nur eine begrenzte Aussage getroffen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist nun zum einen die sichere Feststellung der Orientierung dieses Transkripts, sowie die weitere Charakterisierung.

Dabei sollen das 5'- und 3'-Ende, sowie mögliche Promotoren und Regulationsmechanismen erfasst werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probenmaterial

Siehe auch Kapitel 2.2.2 Probenmaterial

PBMC-Zellen (Peripheral Blood Mononuclear Cell)

Erythroleukämiezellen

THP-1 Zellen

Benigne und maligne Zellen aus Nierentumoren

2.1.2 Kits

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France
Advantage 2 PCR Kit	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France

2.1.3 Enzyme

M-MLV Reverse Transkriptase	Sigma-Aldrich, München
SuperScript III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
ReproFast Polymerase	Genaxxon, Biberach
Ribonuklease A	Sigma-Aldrich, München

Für die Enzymreaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

2. Material und Methoden

2.1.4 Sonstige Reagenzien für die Molekularbiologie

dNTP Set	Qiagen, Hilden
Universal Primer Mix (UPM)	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France
Nuclease-Free Water	Promega, Mannheim
RNasin® Plus (RNase Inhibitor)	Promega, Mannheim
Oligo(dT)15 Primer	Promega, Mannheim
Random Hexamer Primer	Promega, Mannheim
T4 Gene 32 Protein (T4gp32)	USB Europe GmbH, Staufen
SYBR® Green	Invitrogen, Karlsruhe
FITC	Qiagen, Hilden
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
100 bp DNA Leiter	Peqlab, Erlangen
1 kb DNA Leiter	Peqlab, Erlangen
DNA-Ladepuffer	Peqlab, Erlangen

2.1.5 Geräte

Thermocycler	
Primus 25 advanced	Peqlab, Erlangen
Realtime Cycler	
ABI PRISM 5700 Sequenz Detektor	Applied Biosystem, Weiterstadt
Realtime Platten	
Thermo-Fast® 96, Semi-skirted, natural, Ca# AB-0900	AB Gene, Epson, U.K.
Realtime Folie	
Clear Seal Strong Cat# AB-0685	AB Gene, Epson, U.K.
Combi-Thermosealer	
Model-No. 0384 1240	AB Gene, Epson, U.K.
Elektrophoresesystem	
Minigelsystem + Power Supply	Peqlab, Erlangen
Gel Imaging System	

2. Material und Methoden

Gel Doc XR	Bio-Rad GmbH, München
Photometer	
Bio-Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	
Hettich Mikroliter Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen

2.1.6 Datenbanken und Computerprogramme

NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
NCBI Map Viewer	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview
Gendatenbank GenBank	www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/Blast.cgi
UCSC Human Genome Browser	http://genome.ucsc.edu
Ensembl	http://www.ensembl.org
ERPIN	http://tagc.univ-mrs.fr/asterix/erpin
MAPPER	http://mapper.chip.org
Mfold	http://mfold.bioinfo.rpi.edu/
NetPrimer	http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html
geNorm	http://medgen.ugent.be/genorm/
Rest-XL	http://www.gene-quantification.de/
Chromas Lite 2.01	http://www.technelysium.com.au
Transfac	http://www.biobase-international.com/pages/index.php?id=transfac
Jaspar	http://jaspar.cgb.ki.se/
Sequence Analysis Software	http://informagen.com/SA/
JMP IN 5.1	SAS Institute Inc., NC, USA
Sequenz Detektions Software	Applied Biosystems, Weiterstadt
Primer5	Premier, Biosoft International
Primer3	Rozen and Skaletsky, 2000

2.2 Methoden

2.2.1 Bioinformatische Methoden

Eine Grundvoraussetzung für die vorliegende Arbeit war eine umfassende bioinformatische Analyse des Hif-1 α Genlokus. Die Genomanalyse diente zur Identifizierung und Charakterisierung der auf diesem DNA-Abschnitt kodierten genetischen Elemente, wie regulatorische Sequenzen, strukturelle Elemente und Transkriptionseinheiten.

Prinzipiell gibt es zwei Ansatzpunkte, zum einen die Charakterisierung über Homologien zu anderen Spezies und bereits bekannten Genen (extrinsische Methode), zum anderen die Anwendung von Algorithmen, die in der Lage sind, bestimmte Sequenz-Motive in der DNA zu erkennen (intrinsische Methode). In der vorliegenden Arbeit wurden beide Methoden verwendet.

2.2.1.1 Genome Browser

Mittlerweile sind hauptsächlich drei „Human Genome Browser“ veröffentlicht, die es ermöglichen das menschliche Genom zu durchsuchen und zu analysieren: UCSC Genome Browser, NCBI Map Viewer und Ensembl.

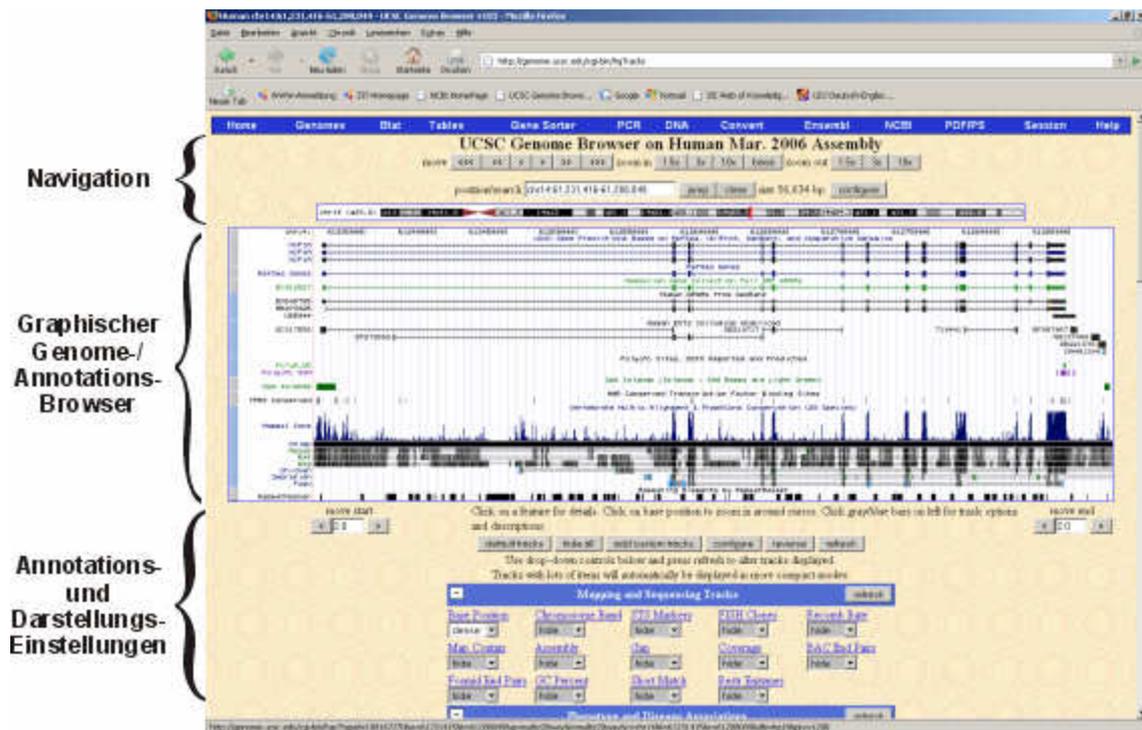
Diese sind unterschiedlich aufgebaut, basieren aber auf der gleichen Version der humanen Genomsequenz, sie verwenden die gleichen Sequenzdaten zur Annotation und sind untereinander verknüpft.

Für die vorliegende Arbeit wurde hauptsächlich der UCSC (University of California Santa Cruz) Genome Browser verwendet [66]. Er beinhaltet Suchfunktionen für DNA-Sequenzen, Genloki und Gennamen (BLAT, Gene Sorter). Man erhält eine Übersicht über den entsprechenden Genbereich, die Basenposition und exprimierte Bereiche durch Alignments mit proteinkodierenden Regionen (Consensus Coding DNA Sequence (CCDS) Project), mRNAs (GenBank), ESTs (Expressed Sequence Tags, GenBank) und Referenzsequenzen (NCBI RefSeq Database). Neben Assembly-Sequenzen zur Identifizierung von alternativen Spleißvarianten erhält man auch Informationen über repetitive Elemente (RepeatMasker), Punktmutationen

2. Material und Methoden

(SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms) und experimentelle Daten zur Genexpression (Affymetrix Chips, Tiling Arrays).

Der Browser ermöglicht die Darstellung der phylogenetischen Konservierung genomischer Bereiche im Vergleich zu wichtigen „Modellorganismen“. Insgesamt sind Sequenzdaten zu elf Säugetieren, acht weiteren Wirbeltieren und 21 Invertebraten zugänglich [61, 79].



Die Abbildung 4 zeigt die Ansicht des UCSC Genome Browsers. Ersichtlich ist der obere Anteil der Homepage, die die Navigation im Genome Browser ermöglicht, der graphische Anteil, der genomische Sequenzen, transkribierte Abschnitte, phylogenetische Konservierung und andere bekannte Informationen aufzeigt und im unteren Abschnitt angeschnitten sind die Möglichkeiten zur Einstellung der Darstellung der genomischen Sequenz [3].

Für die vorliegende Arbeit wurde eine umfassende Analyse des Genlokus von HIF-1 α und der postulierten NAT aHIF durchgeführt. Von besonderem Interesse war dabei das Auffinden von EST-Sequenzen, die die These einer möglichen NAT aHIF unterstützen, sowie repetitiver Elemente, regulatorischer und

2. Material und Methoden

promotortypischer Konsensussequenzen und deren phylogenetische Konservierung.

Die bioinformatische Analyse des HIF-1 α Lokus mittels des Genome Browsers dient als Ausgangspunkt für die experimentelle Verifizierung von aHIF und den experimentellen Nachweis der vollständigen aHIF-Sequenz. Zusätzlich wurden weiterführende bioinformatische Analysen zur Charakterisierung und Expression des Antisense Lokus durchgeführt.

2.2.1.2 Polyadenylierungssignale

Ein typisches Kennzeichen eukaryotischer mRNAs ist der Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende.

Die Polyadenylierung ist eine posttranskriptionelle Modifikation. Die 3'-Enden von mRNA-Molekülen werden durch eine Endonuklease erzeugt, die im Anschluss an die Transkription die Prä-mRNA in der Nähe des Polyadenylierungssignales schneidet und damit die Polyadenylierung durch eine Poly(A)-Polymerase (PAP) ermöglicht. Dabei werden zwischen 30 und 200 Adeninen „angehängt“. Der Poly(A)-Schwanz ist nahezu in jeder Phase des mRNA Stoffwechsels, Abbau, Transport, Translation, von Bedeutung.

In der Regel findet sich ungefähr zwölf bis 30 Nukleotide vor der Polyadenylierungsstelle ein Polyadenylierungssignal, das als zentrales Motiv das Hexamer „AAUAAA“ aufweist. Es gibt auch abweichende Polyadenylierungssignale, wie „AGUAAA“ oder „AUUAAA“ [79].

Die Entdeckung von Polyadenylierungssignalen in einer Sequenz hat große Bedeutung für deren Charakterisierung. Man kann mit dem Nachweis eines Poly(A)-Schwanzes zum einen ein mögliches 3'-Ende einer unvollständig charakterisierten Sequenz identifizieren, zum anderen kann man eine Aussage über die Orientierung eines Transkripts treffen.

Ob ein solches Motiv tatsächlich auch als Polyadenylierungssignal fungiert, wird über andere, downstream oder upstream gelegene Elemente, spezifiziert. Von entscheidender Bedeutung scheinen vor allem Sequenzbereiche in unmittelbarer Nähe zur Schnittstelle zu sein. Diese Elemente zeigen keine

2. Material und Methoden

eindeutige Konsensussequenz, können aber als „U“- oder „GU“-reich charakterisiert werden [158].

Wie findet man nun solch ein tatsächliches Polyadenylierungssignal?

Eine einfache Suche nach „AAUAAA“ Hexameren würde ungefähr 85% der tatsächlichen Poly(A)-Signale abdecken, würde aber auch, statistisch gesehen, alle 1000 Basenpaare mindestens ein falsch positives Signal detektieren [79].

Um zufällige von tatsächlichen Polyadenylierungsstellen unterscheiden zu können, stehen zahlreiche Programme zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde der Algorithmus von Lambert et al. (2004) [73] verwendet, der auf der ERPIN (Easy RNA Profile Identification) Plattform zur Verfügung gestellt wird.

Basierend auf einer Datenbank von 4956 EST-validierter Polyadenylierungssignale unter Berücksichtigung von 300 Nukleotiden sowohl upstream, als auch downstream flankierender Sequenzbereiche, erreicht der ERPIN Algorithmus eine sehr hohe Spezifität von 69 bis 85 %, allerdings zu Lasten einer Sensitivität von nur 56%. Schwache, alternative Polyadenylierungssignale werden deshalb von diesem Programm in der Regel nicht ermittelt.

Die Wahrscheinlichkeit für ein falsch positives Ergebnis wird mit 15 bis 30% angegeben und ist damit vergleichsweise niedrig, allerdings ist die Wahrscheinlichkeit für ein falsch negatives Ergebnis mit 44% relativ hoch.

2.2.1.3 Promotor Region, CpG-Inseln, Transkriptionsfaktor Bindungsstellen und „Hypoxia Response Elements“

Die Promotor Region ist essentieller Bestandteil jedes Gens, sie liegt am 5'-Ende und ist dafür verantwortlich, dass die Transkription initiiert wird.

Generell kann man zwischen dem Kernbereich des Promoters („Core Promoter“), dem proximalen Promoter und distalen regulatorischen Sequenzen (Enhancer, Activator, Silencer oder Insulator) unterscheiden. Typischerweise umfasst der Kernbereich des Promoters den Transkriptionsstartpunkt sowie etwa 35 Nukleotide upstream und downstream. Üblicherweise wird der Transkriptionsstartpunkt mit „+1“ bezeichnet, die Nukleotide upstream werden

2. Material und Methoden

mit einem „-“ versehen. Am „Core Promoter“ bildet sich der Initiationskomplex aus RNA-Polymerase II und allgemeinen Transkriptionsfaktoren.

Der proximale Promotor befindet sich upstream des Kernbereichs (-50 bis -200 Basenpaare) und umfasst typischerweise viele Erkennungsstellen für sequenzspezifische DNA-bindende Transkriptionsfaktoren. Weitere genregulatorische Sequenzen können mehrere Hundert Kilobasen entfernt vom Transkriptionsstartpunkt lokalisiert sein.

Man kann allgemeine Promotor Elemente, Sequenzen, die in verschiedenen Varianten in Promotoren vieler verschiedener Gene vorkommen, von spezifischen Promotor Elementen unterscheiden, die nur bei der Regulation eines bestimmten Gens beziehungsweise einer Gruppe von physiologisch oder funktionell zusammenhängenden Genen Bedeutung haben.

CpG-Inseln

Viele Gene sind in ihrem Promotorbereich mit langen (500 bis 2000 Basenpaare) „GC“-reichen DNA-Abschnitten, den so genannten CpG-Inseln, assoziiert. CpG-Inseln beinhalten Wiederholungen von „GC“-Dinukleotiden. Der „GC“-Gehalt liegt hier bei über 60%, im Gegensatz zu durchschnittlich 41% im Gesamtgenom. Die Methylierung einer CpG-Insel führt zur Abschaltung („Gen-Silencing“) der entsprechenden nachfolgenden Gene.

Wie ermittelt man nun eine solche CpG-Insel?

Der Genome Browser ermöglicht die Identifizierung von CpG-Inseln und damit auch von potentiellen Promotor Regionen, die mit CpG-Inseln assoziiert sind. Zur bioinformatischen Ermittlung von CpG-Inseln werden den Dinukleotiden einer genomischen Sequenz Scores zugeordnet (+17 für „GC“ und -1 für alle anderen möglichen Basenpaarungen). Sequenzsegmente mit maximalem Score werden nach Größe, mehr als 200 Basenpaare, und „GC“-Gehalt, mehr als 50%, selektioniert. Es werden dabei nur Abschnitte berücksichtigt, bei denen der Quotient aus der Anzahl der tatsächlichen „GC“-Dinukleotide zur Anzahl der statistischen „GC“-Dinukleotide größer als 0,6 ist. Der „CpG-Count“ gibt die Anzahl der „GC“-Dinukleotide in der CpG-Insel an, der prozentuale Anteil der „CpG“s wird als Quotient aus der Anzahl der „C“ und „G“ Basen zur Länge der Sequenz ermittelt [40].

Transkriptionsfaktor Bindungsstellen (TFBS)

Die Bestimmung von Transkriptionsfaktor Bindungsstellen (TFBS) mittels bioinformatischer Methoden, die allein auf vorhandenen Sequenzinformationen beruhen, ist äußerst problematisch. Regulatorische DNA-Elemente sind meist kurz und degeneriert, die Chance, dass ein bestimmtes Sequenzmuster zufällig auftaucht ist daher relativ hoch. Dies erschwert die zuverlässige bioinformatische Detektion von TFBS. Um sich trotzdem möglichen TFBS anzunähern, geht man davon aus, dass nicht kodierende Sequenzen, die eine Funktion für ein Gen beinhalten, einem höheren evolutionären Druck unterliegen, als nicht funktionelle Sequenzen, zumindest was eine basensequenzabhängige Funktionalität anbelangt. Zur Minimierung falsch positiver Vorhersagen wird folglich die phylogenetische Konservierung einer Sequenz zwischen zwei oder mehreren Spezies genutzt.

Wie findet man nun eine solche Transkriptionsfaktor Bindungsstelle?

Für die vorliegende Arbeit wurden potentielle Promotorbereiche mit der Suchmaschine MAPPER [90] analysiert. Viele Transkriptionsfaktoren weisen eine erhebliche Variabilität in ihrer DNA-Bindungsspezifität auf. Diese Suchmaschine verwendet daher Konsensussequenzen aus zwei großen Transkriptionsfaktor-Datenbanken (TRANSFAC[®], JASPAR), die die Variabilität innerhalb einer Gruppe bekannter TFBS eines Transkriptionsfaktors widerspiegeln. Zur statistischen Erfassung dieser Variabilität wird in der Regel eine so genannte „Positions-spezifische Scoring-Matrix“ (PSSM) verwendet. Während bei der herkömmlichen Suche nach Konsensussequenzen Mismatches lediglich zugelassen werden, können PSSMs diese zusätzlich in Bezug auf die Nukleotidhäufigkeitsverteilung an der entsprechenden Position bewerten und einen Score für die Ähnlichkeit zwischen einer bestimmten Sequenz und der PSSM berechnen. Über vordefinierte Schwellenwerte lässt sich so wahlweise die Zahl falsch positiver, falsch negativer oder beider Arten von Vorhersagen minimieren. Das Programm MAPPER verwendet eine Scoring-Matrix, die auf so genannten Hidden-Markov-Modellen (HMMs) beruht. Dabei fließt die phylogenetische Konservierung (H. sapiens, M. musculus, D. melanogaster, C. elegans und S. cerevisiae) der einzelnen Nukleotidpositionen

2. Material und Methoden

einer Konsensussequenz in den Score mit ein, dies minimiert die Anzahl falsch positiver Treffer. Da die meisten Konsensussequenzen nur wenige Nukleotide umfassen, liefert diese Suchmaschine trotzdem noch eine sehr hohe Zahl falsch positiver Ergebnisse.

Einige der ermittelten potentiellen TFBS lassen sich mittels einer spezifischen Score-Matrix eindeutiger verifizieren.

Hypoxia Response Element (HRE)

Der Transkriptionsfaktor HIF bindet in seinen Zielgenen an spezifische Sequenzen, die so genannten HREs (Hypoxia Response Elements).

Die HRE-Kernsequenz beinhaltet in der Regel als zentrales Motiv „[A/G]CGTG“. Unter Einbeziehung der upstream und downstream flankierenden Nukleotide wurde die HRE-Konsensussequenz folgendermaßen beschrieben: [T/G/C][A/G]CGTG[CGA][GTC][GTC][CTG] [151].

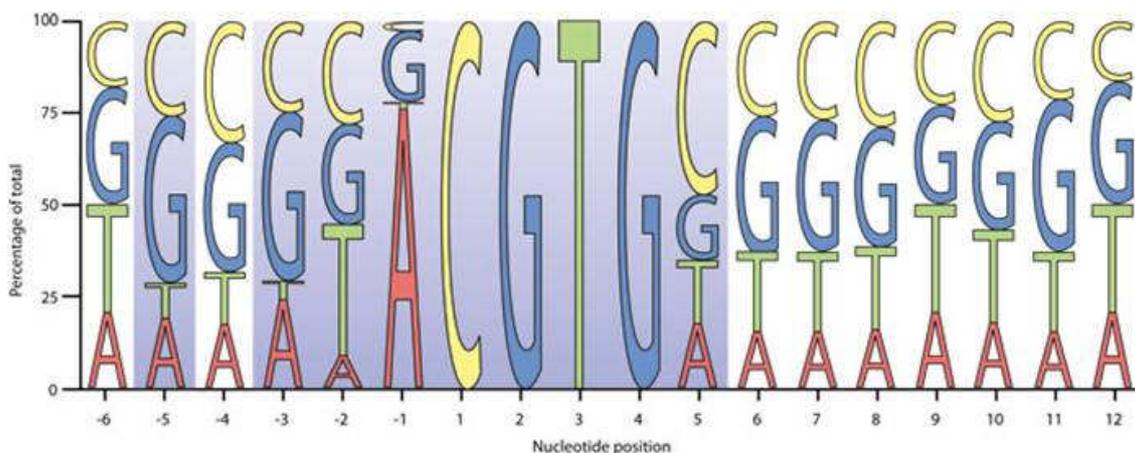


Abbildung 5 zeigt das zentrale Motiv der HRE-Konsensussequenz [A/G]CGTG und die upstream und downstream flankierenden Nukleotide [151].

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Charakterisierung von potentiellen HRE-Bindungsstellen die Matrix von Pescador et al. [102] verwendet.

Diese führten, um eine möglichst positionsspezifische Matrix für die Erkennung von HIF Bindungsstellen herzustellen, ein Alignment verschiedener regulatorischer Sequenzbereiche (100 Basenpaare lang) bekannter, durch Hypoxie induzierter Gene, aus Mensch und Nagern durch. Ihre Analyse zeigt, dass, zusätzlich zu der Kernsequenz, weitere Basenpositionen eine signifikante

2. Material und Methoden

spezifische Nukleotid-Zusammensetzung zeigen. Aus diesem Alignment entwickelten Pescador et al. [102] eine 33 Basenpaare lange positionsspezifische Matrix, die von den Basenpaaren -8 bis +26 reicht. Dabei entspricht +1 der ersten Base des zentralen Motivs „[A/G]CGTG“.

Die folgende Tabelle 1 zeigt die positionsspezifische Frequenz Matrix.

Die Positionsbeschreibungen der Nukleotide beziehen sich auf die erste Base des zentralen Motivs des HRE. „A“, „C“, „G“, „T“ beziehen sich auf die Häufigkeit dieser Nukleotide an dieser Position. „P“ ist der wahrscheinlichste Wert, der beim Vergleich der Häufigkeit verschiedener Nukleotide auf einer bestimmten Position im Vergleich mit der Häufigkeit, die man zufällig erwarten würde, beobachtet wurde. Die Häufigkeiten der Nukleotide in der HRE Kernsequenz sind fett markiert.

Position	A	C	G	T	P	Position	A	C	G	T	P
-8	0.000	0.630	0.250	0.130	0.003	10	0.380	0.500	0.060	0.060	0.023
-7	0.250	0.130	0.500	0.130	0.112	11	0.250	0.380	0.190	0.190	0.682
-6	0.060	0.500	0.310	0.130	0.058	12	0.060	0.130	0.750	0.060	<0.001
-5	0.190	0.060	0.500	0.250	0.090	13	0.310	0.130	0.500	0.060	0.058
-4	0.130	0.560	0.310	0.000	0.009	14	0.190	0.440	0.250	0.130	0.321
-3	0.130	0.560	0.250	0.060	0.023	15	0.560	0.250	0.190	0.000	0.015
-2	0.190	0.190	0.560	0.060	0.029	16	0.130	0.440	0.440	0.000	0.023
-1	0.000	0.310	0.250	0.440	0.090	17	0.130	0.310	0.500	0.060	0.058
1	0.810	0.000	0.190	0.000	<0.001	18	0.130	0.440	0.310	0.130	0.212
2	0.000	1.000	0.000	0.000	<0.001	19	0.310	0.310	0.310	0.060	0.392
3	0.000	0.000	1.000	0.000	<0.001	20	0.060	0.630	0.250	0.060	0.004
4	0.000	0.000	0.000	1.000	<0.001	21	0.190	0.190	0.440	0.190	0.392
5	0.000	0.060	0.940	0.000	<0.001	22	0.130	0.500	0.250	0.130	0.112
6	0.250	0.500	0.130	0.130	0.112	23	0.190	0.310	0.250	0.250	0.919
7	0.000	0.310	0.560	0.130	0.009	24	0.000	0.440	0.130	0.440	0.023
8	0.250	0.250	0.380	0.130	0.572	25	0.190	0.690	0.000	0.130	0.001
9	0.130	0.130	0.250	0.500	0.112						

Tabelle 1 Aus dieser Tabelle lassen sich die entsprechenden Werte für den Pescador-Score ablesen [102].

2. Material und Methoden

Wie ermittelt man nun ein mögliches HRE?

Es wird der Pescador- Score berechnet als:

$$\left(\sum_{j=-8}^{j=+25} Freq_{ij} \right) - mi$$

Dabei steht „i“ für das Nukleotid (Adenosin, Cytosin, Guanosin oder Thymin) an der Position „j“ der analysierten Sequenz, „Freq ij“ ist die Häufigkeit der Nukleotide „i“ an der Position „j“ der positionsspezifischen Matrix („j“ entspricht in der Tabelle 1 der Spalte „Position“). „mi“ ist das Minimum eines theoretisch angenommenen Score Wertes (5,27) für jede Sequenz, die eine „[A/G]CGT“ Kernsequenz enthält.

Ein Score von „0“ bedeutet, dass einer Sequenz das hochkonservierte Kernstück „[A/G]CGT“ fehlt, ansteigende Scores beschreiben Sequenzen, die bereits bekannten HRE-Sequenzen ähnlich sind.

Die Identifizierung einer potentiellen HRE-Sequenz ist letzten Endes nicht nur von der Anwesenheit der Kernsequenz abhängig, sondern auch von dem „Score“, den die 33 umgebenden Basenpaare, beruhend auf der positionsspezifischen Matrix, bilden.

Pescador et al. (2005) [102] zeigten dabei, dass die auf diesem Weg ermittelten „Scores“ für verschiedene 33 basenpaar lange Sequenzen aus bekannten, von Hypoxie induzierten Genen, die ein funktionelles HRE beinhalten, signifikant höher war als die Scores, die für eine Gruppe von zufälligen Sequenzen, die das „[A/G]CGT“ Kernstück beinhalten, erzielt werden konnten.

2.2.1.4 Ermittlung von RNA Sekundärstrukturen

Zu den Eigenschaften von RNA gehört die Ausbildung von Sekundärstrukturen. Voraussetzung hierfür ist das Vorliegen als Einzelstrang. Zueinander komplementäre Abschnitte können Wasserstoffbrücken ausbilden und auf diese Weise intramolekulare Doppelstränge bilden, während nicht komplementäre Abschnitte einzelsträngig bleiben. Man sagt, „die RNA faltet sich selbst“.

2. Material und Methoden

Hauptsächlich entstehen die Paarungen zwischen komplementären Basen, aber auch Guanin und Uracil können eine Bindung ausbilden.

Der Grundgedanke hinter der Ausbildung von Sekundärstrukturen ist das Eingehen von energetisch günstigen Verbindungen.

Als „stems“ bezeichnet werden zusammenhängende Strukturen die nur aus Basenpaarungen bestehen, alle anderen Anordnungen werden als Schleifen bezeichnet, die unterschieden werden in Haarnadel Strukturen („Hairpin Loop“), Ausbuchtungen („Bulge“), und „Interior Loop“ beziehungsweise „Multi Loops“.

Die Ausbildung dieser Sekundärstrukturen hat Auswirkungen auf die regulatorische und katalytische Funktion einer RNA und auf ihre strukturellen Aufgaben.

Wie ermittelt man nun die Sekundärstruktur einer RNA?

Die möglichen, energetisch günstigen Bindungen, ergeben eine sehr große Anzahl an Möglichkeiten und es wurden spezielle Algorithmen entwickelt, die die bevorzugte Sekundärstruktur einer RNA möglichst genau vorhersagen sollen.

In dieser Arbeit wurde der „Zuker-Algorithmus“ [161] verwendet, der auf einem thermodynamischen Modell beruht. Dieser Algorithmus berücksichtigt allerdings keine Pseudoknoten (eine Base einer Schleife paart sich mit einer Base außerhalb dieser Schleife).

Es wurde „mfold“ (Version 3.2) von Zuker und Turner auf dem Rensselaer Bioinformatics Web Server verwendet.

2.2.2 Probenmaterial

Für die vorliegende Arbeit wurde RNA aus verschiedenen Zellen verwendet. Die RNA wurde nicht selbst gewonnen, sondern freundlicherweise aus verschiedenen Laboren zur Verfügung gestellt.

Die RNA lag bereits in aufgereinigter Form vor, so dass sie direkt der reversen Transkription zugeführt werden konnte.

2.2.2.1 PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)

PBMC-Zellen sind mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, Lymphozyten und Monozyten. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PBMC-Zellen entstammen Blutproben von sieben Ausdauerathleten nach ihrer Teilnahme an einem Halbmarathon. Diese Zellen waren bereits isoliert, ihre RNA extrahiert und aufgereinigt. Die aufgereinigten Zellen konnten für die vorliegende Arbeit direkt für die reverse Transkription verwendet werden.

2.2.2.2 Erythroleukämiezellen

Die extrahierte RNA aus Erythroleukämiezellen wurde für die vorliegende Arbeit freundlicherweise von der Kinderklinik aus dem Labor von Fr. Dr. Karin Schilbach-Stückle zur Verfügung gestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die humane Erythroleukämie-Zelllinie K562 verwendet.

2.2.2.3 THP-1 Zellen

THP-1 Zellen sind humane akute monozytäre Leukämiezellen. Die extrahierte RNA aus diesen Zellen wurde für die vorliegende Arbeit freundlicherweise aus dem Labor von Frau PD Dr. Cora Weigert zur Verfügung gestellt.

Die THP-1 Zelllinie wurde in RPMI 1640 kultiviert, gelöst mit 10% FCS in 5% CO₂ bei 37 °C.

Durch Zugabe von 500µM CoCl₂ für eine Stunde wurden hypoxische Bedingungen hergestellt um die HIF-1α Expression zu stimulieren.

2. Material und Methoden

Es wurde sowohl zytosolische als auch nukleäre RNA präpariert, um die mRNA Lokalisation zu differenzieren.

Bei der Durchführung der reversen Transkription wurde für die Kompartimente Nukleus und Zytoplasma die gleiche Menge an Gesamt-RNA verwendet.

Diese Messergebnisse sind kritisch zu betrachten, da dieser „künstliche“ Mengengleich nicht der Realität entspricht, die RNA-Menge ist im Nukleus deutlich geringer, als im Zytoplasma.

2.2.2.4 Benigne und maligne Zellen aus Nierentumoren

Die extrahierte RNA aus Zellen von benignen und malignen Nierentumoren wurde freundlicherweise aus der Urologie aus dem Labor von Herrn Dr. Axel Merseburger zur Verfügung gestellt.

Dabei wurden Zellen aus verschiedenen Nierentumoren, hellzelliges, klarzelliges und papilläres Nierenkarzinom, verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Pool aus allen malignen Geweben und ein Pool aus allen benignen Geweben hergestellt.

2.2.3 cDNA (complementary DNA) Synthese

Um mRNA molekularbiologischen Methoden zugänglich zu machen, wird sie in cDNA „umgeschrieben“, dies erfolgt durch die reverse Transkription. cDNA ist dabei komplementär zu mRNA und enthält somit auch Informationen über Modifizierungen der mRNA. Sie ermöglicht die Erforschung der Struktur eines Gens, durch den Vergleich mit dem Genom können Introns und Exons identifiziert werden und es können Informationen zum alternativen Spleißen gewonnen werden.

2.2.3.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA

Vor der reversen Transkription wurde die Konzentration und Reinheit der RNA-Proben photometrisch ermittelt. Verwendet wurde ein Photometer, gemessen wurde die Absorption der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) unter Verwendung einer Quartzküvette, wobei eine optische Dichte von 1 dem Gehalt von 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA entspricht. Die Reinheit einer Probe wurde über den Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt. Für reine RNA liegt der Quotient A_{260}/A_{280} bei größer als 1,7. Abweichungen deuten auf eine Verunreinigung hin.

2.2.3.2 Reverse Transkription

Prinzip

Für den Ablauf der reversen Transkription benötigt man, neben anderen Reagenzien, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, auch reverse Transkriptase genannt, und Primer.

Die reversen Transkriptasen sind veränderte Enzymvarianten unterschiedlicher Retroviren.

Als Polymerasen für die reverse Transkription wurden in der vorliegenden Arbeit die M-MLV Reverse Transkriptase aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus mit einem Temperaturoptimum von 37°C und die SuperScript III reverse Transkriptase, eine genetisch veränderte Variante der M-MLV reverse

2. Material und Methoden

Transkriptase mit einer reduzierten RNase H-Aktivität und einer erhöhten Thermostabilität verwendet.

Je nach Zielsetzung des Experiments können verschiedene Arten von Primern verwendet werden: Oligo(dT)-Primer, Random Oligomere oder sequenzspezifische Primer.

Oligo(dT) Primer:

Diese Primer bestehen aus Thymin-Basen und hybridisieren so mit einem möglichen Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der RNA, ist ein solcher Poly(A)-Schwanz vorhanden, so kann sie sehr spezifisch umgeschrieben werden.

Diese Primer sind sehr effizient, da zum einen der Poly(A)-Schwanz nicht an der Ausbildung von Sekundär- oder Tertiärstrukturen beteiligt ist und zum anderen diese Primer deutlich weniger temperaturabhängig sind. Theoretisch wird so die gesamte RNA Sequenz in cDNA umgeschrieben, tatsächlich ist dies jedoch nicht immer der Fall.

Random Oligomere:

Dies sind Oligonukleotide mit einer willkürlichen Basenzusammensetzung in allen statistisch möglichen Basenkombinationen. In der vorliegenden Arbeit wurden Random-Hexamere (sechs Nukleotide) verwendet. Theoretisch binden diese Primer entsprechend ihrer spezifischen Sequenz an verschiedensten Stellen der umzuschreibenden RNA. Man versucht so sicherzustellen, dass die ganze Sequenz umgeschrieben wird, wenn auch nur in Form von Einzelfragmenten.

Auf diese Weise kann auch nicht polyadenylierte RNA umgeschrieben werden.

Sequenzspezifische Primer:

Die Sequenzspezifität der Primer soll sicherstellen, dass bereits bei der reversen Transkription selektiv nur ein gewünschtes Transkript in cDNA umgeschrieben wird.

Von Vorteil sind diese Primer, wenn ein umzuschreibendes Transkript nur in sehr geringer Häufigkeit vorliegt, da sich so die „Trefferwahrscheinlichkeit“ deutlich erhöht. Außerdem sind sie vorteilhaft, wenn die Richtung eines Transkripts ermittelt werden soll oder wenn nur einer der Partner eines Sense-Antisense Paares selektiv umgeschrieben werden soll.

2. Material und Methoden

Bei dieser Methode ist man von der Zugänglichkeit der Hybridisierungsstelle des Primers und von seiner Spezifität abhängig.

Reaktionsansatz

500ng Gesamt-RNA wurden entweder mit Random Hexamer Primern (Endkonzentration 0,05µg/µl), Oligo(dT) Primern (Endkonzentration 0,05µg/µl) oder genspezifischen Primern (Endkonzentration 1µM) revers transkribiert.

Ein erster Reaktionsansatz bestehend aus 500ng Gesamt-RNA, 0,5µl dNTPs (10mM) und 0,5µl Primer wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12,5µl gebracht. Dieser Ansatz wurde für zehn Minuten bei 72°C inkubiert und anschließend für fünf Minuten auf Eis gekühlt.

Für die Proben mit Random Hexamer Primern und Oligo(dT) Primern wurde dieser erste Reaktionsansatz bei 25 °C für zehn Minuten vorinkubiert.

Ein Enzym-Mix wurde aus 200 Units Reverse Transkriptase (SuperScript III oder M-MLV Reverse Transkriptase), 20 Units RNase Inhibitor und dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer, entsprechend der Konzentrationsangaben des jeweiligen Herstellers, hergestellt. Dieser Enzym-Mix wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20µl gebracht.

Der Enzym-Mix wurde zum Reaktionsansatz hinzugefügt und für eine Stunde bei 37°C für Proben mit der reversen Polymerase M-MLV und bei 55°C für Proben mit der reversen Polymerase SuperScript III inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 72°C für 15 Minuten beendet.

Die Reaktionsansätze wurden auf ein Endvolumen von 400µl verdünnt und bei -20°C gelagert.

Zusätzlich wurden zwei Kontrollen mitgeführt um endogenes Priming und genomische Verunreinigung auszuschließen. Um endogenes Priming auszuschließen wurde der exogene Primer im Reaktionsansatz durch Nuklease-freies Wasser ersetzt, um genomische Kontamination auszuschließen wurde in der „no-RT“-Kontrolle die Reverse Transkriptase durch Nuklease-freies Wasser ersetzt.

2. Material und Methoden

Übersicht der verwendeten Protokolle

M-MLV Reverse Transkriptase

72 °C 10 min

4 °C 5 min

(25 °C 10 min für Random Hexamer Primer und Oligo(dT)-Primer)

Hinzufügen des Enzym-Mix

37 °C 60 min

72 °C 15 min

SuperScript III Reverse Transkriptase

72 °C 10 min

4 °C 5 min

(25 °C 10 min für Random Hexamer Primer und Oligo(dT)-Primer)

Hinzufügen des Enzym-Mix

55 °C 60 min

72 °C 15 min

2.2.3.3 Reverse Transkription schwieriger Templates mit ausgeprägten Sekundärstrukturen

Prinzip

In der vorliegenden Arbeit konnten mit dem oben beschriebenen Standardverfahren nicht ausreichend zufrieden stellende Ergebnisse bei der reversen Transkription erzielt werden. Eine vermutliche Ursache dafür können ausgeprägte Sekundärstrukturen der umzuschreibenden RNA sein.

Es musste also ein Verfahren etabliert werden, das eine reverse Transkription auch bei Templates mit ausgeprägten Sekundärstrukturen unter Vermeidung von Artefakten ermöglicht.

Der einfachste Weg Sekundärstrukturen aufzulösen, besteht in der thermischen Denaturierung hybridisierter Bereiche. Die neue Generation gentechnisch modifizierter reverser Transkriptasen ermöglicht die cDNA Synthese bei über 50 °C, was die Auflösung von Sekundärstrukturen begünstigt.

2. Material und Methoden

Auch in natürlich vorkommenden Retroviren liegt RNA in Sekundärstrukturen vor, diese werden durch Chaperone (Nukleocapsid (NC) Proteine) verhindert. Chaperone sind kleine stark basische Proteine, die virale RNA mit einer sehr hohen Affinität binden und doppelsträngige Bereiche auflösen [111].

Das Protein T4gp32 (T4 Bacteriophage Gene 32 Protein) ist ein Chaperon des Gens 32 des T4 Bakteriophagen. Es zeigt im Gegensatz zu anderen viralen NC-Proteinen keine Sequenzpräferenz und ist deshalb für den in vitro Einsatz bei der reversen Transkription geeignet. Um die reverse Transkription weiter zu spezifizieren wurde außerdem RNase H hinzugefügt. RNase H ist eine Endonuklease, die RNA-DNA-Hybride erkennt und den RNA-Strang schneidet. Sie entfernt so angelagerte RNA-Primer und stellt ein Vorliegen der neu synthetisierten cDNA als Einzelstrang sicher.

Durch Hinzufügen von T4gp32 und RNase H wurde in der vorliegenden Arbeit versucht die reverse Transkription für Templates mit ausgeprägten Sekundärstrukturen zu spezifizieren.

Reaktionsansatz

Im Folgenden ist das für die vorliegende Arbeit entwickelte Protokoll beschrieben, das eine Abänderung des Protokolls von Piché und Schernthaler [105] darstellt.

Es wurden 500ng Gesamt-RNA entweder mit Random Hexamer Primern (Endkonzentration 0,05µg/µl), Oligo(dT) Primern (Endkonzentration 0,05µg/µl) oder genspezifischen Primern (Endkonzentration 1µM) revers transkribiert.

Es wurde für jede Reaktion ein Reaktionsansatz aus 1µl RNA (Konzentration: 500ng/µl), 1µl Primer, sequenzspezifische Primer (Konzentration: 20µM) oder Oligo(dT)-Primer, und 0,5µl RNase Inhibitor (RNasin® Plus) hergestellt, der mit 8,75µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt wurde. Dieser Reaktionsansatz wurde bei 69°C für drei Minuten inkubiert, um die RNA zu denaturieren, und direkt im Anschluss für drei Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 0,75µl T4gp32 (Konzentration: ca. 3µg/µl) zugegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Auch in diesem Versuchsansatz wurde ein Enzym-Mix angesetzt, der sich aus 4µl First-Strand Buffer (5fach), 1µl DTT (0,1M), 1µl dNTPs (10mM) und 2µl

2. Material und Methoden

SuperScript III Reverse Transkriptase (200 U/ μ l) zusammensetzt. Der Enzym-Mix wurde dem präinkubierten Reaktionsansatz hinzugefügt und dann bei 55 °C für eine Stunde inkubiert. Dies entspricht der maximalen Temperatur bei der die SuperScript III Polymerase noch effektiv cDNA synthetisieren kann. Um die Reaktion zu beenden wurde der Ansatz für 15 Minuten auf 72 °C erhitzt.

Nach Zugabe von 1 μ l RNase H wurde abschließend bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert.

Die RT- PCR Produkte wurden bei -20 °C gelagert.

Übersicht des verwendeten Protokolls

69 °C	3 min
4 °C	3 min
Hinzufügen von T4gp32	
Raumtemp.	5 min
Hinzufügen des Enzym-Mix	
55 °C	60 min
72 °C	15 min
Hinzufügen RNase H	
37 °C	20 min

2.2.4 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Prinzip

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) ist ein schnelles, sensitives, spezifisches und einfaches molekularbiologisches Verfahren um bestimmte Nukleotidsequenzen in vitro millionenfach zu kopieren. Diese Amplifikation macht auch sehr geringe DNA-Mengen einer Analyse zugänglich.

Für den Ablauf der PCR benötigt man, neben anderen Reagenzien, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase und Primer. Für die PCR stehen je nach Problemstellung verschiedene hitzestabile DNA-Polymerasen zur Verfügung.

Taq-Polymerase:

Die Taq-Polymerase aus dem thermophilen Eubakterium „*Thermus aquaticus*“ ist das am häufigsten verwendete PCR-Enzym. Sie hängt an das 3'-Ende der neu synthetisierte DNA-Stränge ein zusätzliches Nukleotid (dATP) an, den so genannten 3'-A-Überhang.

Nachteil der Taq-Polymerase ist, dass sie aufgrund der fehlenden 3'-5'-Exonuklease-Aktivität keine Korrekturlese-Funktion („Proofreading“ Funktion) besitzt und deshalb verhältnismäßig viele Fehler bei der Produktion der DNA generiert.

„Proofreading“-Polymerasen:

Polymerasen mit „Proofreading“ Funktion haben eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und sind in der Lage, den Einbau eines nicht komplementären Nukleotids zu erkennen, es aus der DNA zu entfernen und durch das komplementäre Nukleotid zu ersetzen. Dies ermöglicht eine zehnfach bis zwölffach genauere Amplifikation im Vergleich zu herkömmlichen Taq-Polymerasen [41, 99]. Bei „Proofreading“-Polymerasen findet durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität eine stabilere Polymerase-Template Interaktion statt, was eine effektivere PCR auch von schwierigen Templates, mit ausgeprägten Sekundärstrukturen oder hohem „GC“-Gehalt, ermöglicht.

„Proofreading“-Polymerasen haben allerdings den Nachteil, dass sie wesentlich langsamer arbeiten als herkömmliche Polymerasen und schneller an Aktivität verlieren. Außerdem kann es bereits während des Ansatzens der PCR zum Abbau von Primern kommen, was eine unspezifische Primer-Bindung zur

2. Material und Methoden

Folge hat. In extremen Fällen kann die Amplifikation eines PCR-Fragments vollständig ausbleiben

Reaktionsansatz

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Polymerasen verwendet, die HotStarTaq DNA-Polymerase und die „Proofreading“-Polymerase ReproFast Polymerase. Für die Reaktionen wurden jeweils die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

Ablauf bei Verwendung der HotStarTaq Polymerase:

Der Reaktionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 25µl und beinhaltete 5µl cDNA (500ng/µl) und 2,5µl Primer-Paare (0,3µM), sowie einen PCR-Mix bestehend aus 1x PCR-Buffer (2,5mM MgCl₂), 20µM dNTPs und 0,5 Units HotStarTaq DNA-Polymerase.

Die PCR-Reaktion begann mit der initialen Aktivierung der HotStarTaq Polymerase für 15 Minuten bei 95°C („Hot Start“, durch diesen wird die Polymerase aktiviert), dann folgten 30 bis 35 Zyklen Denaturation der DNA bei 95°C für 20 Sekunden, Primerhybridisierung (Annealing) bei 59°C für 35 Sekunden und Elongation bei 72°C für ein bis drei Minuten. Die Temperatur des Annealings richtet sich nach den verwendeten Primern, die Dauer des Elongationsschritts nach der Länge des zu synthetisierenden DNA-Abschnitts. Am Ende eines Zyklus wurde einmalig eine Extension von sieben Minuten bei 72°C durchgeführt. Anschließend wurde auf 8°C abgekühlt.

Übersicht des verwendeten Protokolls

	95°C	15 min
30-35 Zyklen	95°C	20 sek
	59°C	35 sek
	72°C	1-3 min
	72°C	7 min
	8°C	

2. Material und Methoden

Ablauf bei Verwendung der ReproFast Polymerase:

Der PCR Reaktionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 25µl und beinhaltete 5µl cDNA (500ng/µl) und 2,5µl Primer-Paare (0,3µM), sowie einen PCR-Mix bestehend aus 1x PCR- Buffer (2,5mM MgCl₂) und 20µM dNTPs.

Zur Vermeidung von PCR-Artefakten wurden 2 Units ReproFast Polymerase erst während des initialen Denaturierungsschrittes zugegeben („manueller Hotstart“).

Die Amplifizierung begann mit einem initialen Denaturierungsschritt für vier Minuten bei 94°C, dann folgten 20 Zyklen mit Denaturation bei 94°C für 25 Sekunden, Annealing bei 59°C für 20 Sekunden und Elongation bei 72°C für drei Minuten und 20 Sekunden. Anschließend folgten 18 Zyklen mit Denaturation der DNA bei 94°C für 25 Sekunden, Annealing bei 59°C für 20 Sekunden und Elongation bei 72°C für drei Minuten und 20 Sekunden im ersten der 18 Zyklen, diese Zeitspanne wurde dann um drei Sekunden je Zyklus verlängert. Am Ende wurde einmalig eine Extension von sieben Minuten bei 72°C durchgeführt. Anschließend wurde auf 8°C abgekühlt.

Übersicht des verwendeten Protokolls:

	94 °C	4 min
20 Zyklen	94 °C	25 sek
	59 °C	20 sek
	72 °C	3 min 20 sek
18 Zyklen	94 °C	25 sek
	59 °C	20 sek
	72 °C	3 min 20 sek + 3 sek pro Zyklus
	72 °C	7 min
	8 °C	

2.2.5 Primer Design

Primer sind kurze Oligonukleotidsequenzen mit einer Länge zwischen 18 und 35 Basenpaaren, die spezifisch an eine Nukleotidsequenz binden. Ein Primerpaar besteht aus einem Forward (Sense) und einem Revers (Antisense) Primer.

Die Schmelztemperatur eines Primers ist die Temperatur, bei der 50% der Primer nicht mit DNA hybridisiert sind, die Annealingtemperatur liegt unterhalb der Schmelztemperatur, beide sind abhängig von der Basenzusammensetzung, vor allem dem „GC“-Gehalt des Primers, der 40 bis 60% betragen sollte, und seiner Länge.

Für die Auswahl eines Primerpaares ist wichtig, dass ihre Annealingtemperatur möglichst ähnlich ist.

Für das Design der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Primer wurden die Primerdesignprogramme Primer5 und Primer3 [115] verwendet. Nach Auswahl der Primer mit Hilfe dieser Programme wurden sie mittels der GenDatenbank „GenBank“ auf ihre Spezifität bezüglich des zu amplifizierenden Genabschnittes überprüft.

Alle verwendeten Primer wurden von MWG-Biotech bezogen.

Für HIF-1 α erfolgte die Benennung der Primer ausgehend vom 5'-Ende nach Anzahl der Basenpaare. Primer, die am Anschluss an die 3'-UTR von HIF-1 α lokalisiert sind, also an aHIF binden können, wurden mit einem „-“ gekennzeichnet. Ihre Zahl gibt die Anzahl der Basenpaare ausgehend vom Ende der 3'-UTR von HIF-1 α an. Der Nomenklatur zugrunde liegt die Sequenz NM_001530 (NCBI RefSeq Datenbank).

2. Material und Methoden

Gen	Benennung	Orientierung	Nukleotidsequenz
aHIF	-1	forward	5'-CCCTTTGATCAGCTTTTATGTTCA-3'
	-292	forward	5'-TATGAATGGGATGAGTGAAGCAG-3'
	-365	revers	5'-TCTTCAGAGAAGCTCTAGCCTTTG-3'
	-931	forward	5'-CRGTGACCCAAAGTGCTTCAA-3'
	-1741	revers	5'-CATGGCCACCTCAAAAGCTC-3'
	-1748	forward	5'-TGCAGTGCTAGCCAATCCAG-3'
	-2045	revers	5'-GTGCTTTCCATTCACTACCTTG-3'
	-2612	revers	5'-ATGAACGCCTTCTGGAGCTT-3'
	-2711	forward	5'-GGCAGCGTCTTGGAAAACT-3'
	-2892	revers	5'-CATGTAGCGCCAGCCACA-3'
	-2932	revers	5'-CGGGAAGTTTCTCGGGTTG-3'
	-2975	revers	5'-GAGCACGTA CTGAGGCGTG-3'
	RACE_aHIF	revers	5'-GCTGAGA ACTGCTTCACTCATCCCATT-3'
	5''RACEHif_-1816	forward	5'-GAAGGCGGCAATGGAGGTGTGG-3'
	5'RACE_aHif	revers	5'-AAGACGCTGCCAGACACCCGATC-3'
	3'RACE CDS Primer	forward	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN-3' (N = A,C,G, or T; V = A,G, or C)
	SMART II A Oligonucleotide		5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'
HIF-1 α	2488	forward	5'-AACATTATTACAGCAGCCAGACG-3'
	2473-2637	forward	5'-AGCAGTAGGAATTATTTAGCATGTAGAC-3'
	2618	forward	5'-GCATGTAGACTGCTGGGGC-3'
	2675	revers	5'-ACTGGTCAGCTGTGGTAATCCA-3'
	3219	revers	5'-CTACCACGTA CTGCTGGCAAAG-3'
	3595	forward	5'-AATGTTCTGCCTACCCTGTTGG-3'
GAPDH	GAPDH-forward	forward	5'-TCAACAGCGACACCCACTCC-3'
	GAPDH-revers	revers	5'-TGAGGTCCACCACCCTGTTG-3'

Tabelle 2 zeigt die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer. Aus Spalte eins lässt sich die Zielsequenz des Primers entnehmen, Spalte zwei gibt den verwendeten „Namen“ des Primers an, Spalte drei gibt die Orientierung des Primers an und Spalte vier seine Nukleotidsequenz.

2. Material und Methoden

Aus der nachfolgenden Tabelle lassen sich die Primer-Paare für die Realtime PCR entnehmen. Für die Spezifität der Realtime PCR ist es von Bedeutung, die Lage der Primer so zu wählen, dass der Umfang des zu amplifizierenden Transkripts nicht zu lange ist.

Gensequenz	Primer forward	Primer revers
aHIF		
HIF-1 α	2488	2675
HIF-1 α	2618	2675
HIF-1 α ohne Ex 14	2473-2637	2675
aHIF	-292	-365
aHIF	-2612	-2711

Tabelle 3 zeigt die für die Realtime PCR verwendeten Primer-Paare. Die erste Spalte zeigt an, für welche zu amplifizierende Gensequenz die Primer-Paare verwendet wurden, Spalte zwei zeigt die Bezeichnung des forward Primers, die dritte Spalte zeigt die Bezeichnung des reversen Primers.

Die entsprechenden Nukleotidsequenzen zu den Primern können Tabelle 2 entnommen werden.

2.2.6 Agarose Gelelektrophorese

Prinzip

Die Agarose-Gelelektrophorese dient unter anderem dem sichtbaren Nachweis des Endproduktes der PCR, sie kann Nukleinsäure-Stränge der Länge nach auftrennen und visuell sichtbar machen.

Je nach Länge der aufzutrennenden Nukleinsäuren bestimmt sich der prozentuale Anteil der Agarose: für kürzere Nukleinsäuren ist der prozentuale Agarose Anteil größer, für Längere geringer.

Das Auftrennen der Nukleinsäuren erfolgt durch Anlegen eines elektrischen Feldes, man macht man sich die negative Ladung der DNA zu nutze. Im elektrischen Feld „wandern“ kleinere Moleküle schneller und damit weiter durch das Agarose Gel als Größere. Ihre Länge kann abschließend durch einen standardisierten Längenmarker abgeschätzt werden.

Sichtbar gemacht werden die Nukleinsäuren durch Ethidiumbromid, das sich an die cDNA anlagert und unter UV-Licht fluoresziert.

Durchführung

Für die vorliegende Arbeit wurden, abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente, Agarose Gele mit Konzentrationen zwischen 1% und 1,7% Agarose verwendet. Die Agarose wurde in 100ml TAE-Puffer (40mM Tris Acetate, 1mM EDTA, pH 8,5) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf 50°C bis 60°C wurden 3µl Ethidiumbromidlösung (2mg/ml) zugegeben und die Agaroselösung in die Gelkammer gegossen. Nach Einsetzen der Taschenschablonen polymerisierte das Gel 30 Minuten bei Raumtemperatur aus, anschließend wurde es mit TAE-Puffer überschichtet und die Taschenschablonen entfernt. 10µl PCR-Produkt wurden mit 2µl Probenauftragspuffer (6x), der vom Hersteller des Längenmarkers mitgeliefert wurde, versetzt und in die Probenaschen eingebracht. Um die Basenpaarlänge der Amplifikate abzuschätzen, wurden 3,5µl eines standardisierten Längenmarkers aufgetragen (100bp DNA Leiter oder 1kb DNA Leiter). Es wurde eine Gleichspannung von 100V für 30 bis 40 Minuten angelegt.

2. Material und Methoden

Die aufgetrennten amplifizierten DNA-Fragmente konnten anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden und über das Geldokumentationssystem dokumentiert werden.

Durch Ausschneiden und Aufreinigen von Banden aus einem Agarose Gel kann im Nachhinein die genaue Sequenz einer DNA-Bande ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu das „QIAEX Gel Extraction Kit“ verwendet. Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und gemäß der Anleitung des Herstellers in einem 3x Volumen Buffer QX1 aufgenommen. Nach Zugabe von 10µl QIAEX II wurde die Agarose bei 50°C für zehn Minuten aufgelöst. Gleichzeitig fand eine Bindung der DNA an die QIAEX II Silica-Gel Partikel statt. Nach zweimaligen Pelletieren (10 000g) und Waschen (Puffer QX1 und Puffer PE) wurden die Partikel getrocknet. Die DNA wurde abschließend mit 20µl 10mM Tris Cl (pH 8,5) eluiert.

2.2.7 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung von, aus Agarose Gel aufgereinigten, PCR-Produkten wurde von der Firma „4baselab“ (Reutlingen) durchgeführt. Die im ABI-Format erhaltenen Daten wurden mit dem Programm „Chromas Lite 2.01“ visualisiert und die erhaltenen Sequenzen konnten mit Hilfe des BLAST-Algorithmus mit Sequenzdatenbanken verglichen werden.

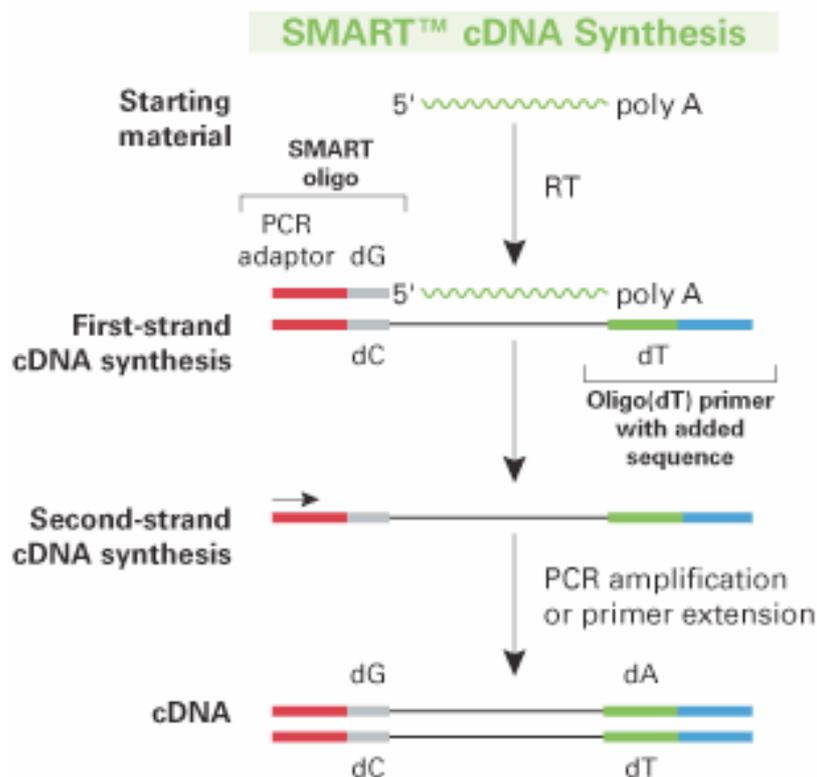
2.2.8 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Das RACE-Verfahren ermöglicht die Identifizierung eines Transkriptionsstarts und -endes. Ist ein Sequenzbereich eines Transkripts bekannt, so können, ausgehend von diesem, gezielt unbekannte 3'- und 5'-Enden amplifiziert werden.

Dazu wird bei der reversen Transkription eine bekannte Adaptorsequenz an das jeweilige Ende der cDNA angefügt. Unter Verwendung eines gegen diese Adaptorsequenz gerichteten Primers („Ankerprimer“) und eines genspezifischen Primers kann dann in einer anschließenden PCR das Transkriptende amplifiziert werden.

Man unterscheidet, je nachdem welches Ende amplifiziert werden soll, 3'-RACE und 5'-RACE.

Die folgende Abbildung zeigt schematisch das Prinzip der Durchführung der RACE.



2. Material und Methoden

Abbildung 6: Die Abbildung zeigt das Prinzip der RACE-PCR. Ausgehend von einer Nukleotidsequenz („starting material“) wird die reverse Transkription mit dem Anhängen der Adaptorsequenz und die anschließende PCR aufgezeigt. Die zweite Zeile („First-strand cDNA synthesis) zeigt das Anhängen der PCR-Adaptor Sequenzen, „PCR adaptor dG“ (rot/grau) und „Oligo(dT) primer with added sequence“ (grün/blau). Die dritte Zeile („Second-strand cDNA synthesis“) zeigt die anschließende PCR zur Amplifizierung des Produktes, das in Zeile vier als cDNA gezeigt wird.

Die 5'-RACE PCR ist durch das Anhängen des hier grau/rot gekennzeichneten „PCR adaptor dG“ markiert, die 3'-RACE PCR ist dargestellt durch das Anhängen des blau/grün markierten Oligo(dT)-Primers an eine polyadenylierte Ausgangssequenz (modifiziert nach Clontech [31]).

2.2.8.1 5'- RACE PCR

Prinzip

Die 5'-RACE dient der Amplifizierung des 5'-terminalen Endes eines Transkripts und wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des „SMART™ RACE cDNA Amplification Kit“ durchgeführt.

Diese Methode basiert auf der Eigenschaft der reversen Transkriptase M-MLV an das 3'-Ende der neu synthetisierten cDNA drei bis fünf zusätzliche Cytosine („C-Schwanz“) anzuhängen. Verwendet man als Primer neben einem genspezifischen Primer ein bekanntes Adaptor-Oligonukleotid, das an seinem 5'-Ende eine Basenfolge von Guanosinen aufweist, „G-Schwanz“, so kann dieser mit dem „C-Schwanz“ hybridisieren. Das Adaptor-Oligonukleotid dient dann als weiteres Template für die reverse Transkriptase („template switching“), dies hat zur Folge, dass die komplementäre Adaptorsequenz an das 3'-Ende der cDNA angefügt wird.

In der sich anschließenden PCR wird dann ein gegen diese Adaptorsequenz gerichteter Primer und ein genspezifischer Primer verwendet und so das 5'-Ende des Transkripts amplifiziert

Infolge vorzeitiger Strangbrüche und unspezifischer Hybridisierung der Primer und des Adaptor-Nukleotids kann es zu einer ausgeprägten Hintergrund-

2. Material und Methoden

Synthese unspezifischer cDNA kommen, daher ist es günstig, den genspezifischen Primer nahe am vermuteten 5'-Ende zu platzieren.

Durchführung

In der vorliegenden Arbeit wurde für die 5'-RACE die humane Erythroleukämie-Zelllinie K562 verwendet. In einem ersten Ansatz wurde 1µl RNA (1µg/µl) mit 1µl des Adaptor-Oligonukleotids („SMART II A Oligonucleotide“, 12µM) und 1µl des genspezifischen RT-Primers („-1748“ siehe Tabelle 2, Konzentration: 20µM) mit 2µl DEPC-H₂O gemischt und für zwei Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde zwei Minuten auf Eis gekühlt und danach der Enzym-Mix bestehend aus 2µl 5x First-Strand Buffer, 1µl DTT (20mM), 1µl dNTP Mix (10mM) und 1µl M-MLV RTase zugegeben und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt. Die cDNA Synthese erfolgte bei 42°C für eine Stunde. Im Anschluss wurde das Reaktionsprodukt durch Zugabe von 100µl Tricine-EDTA (10mM Tricine-KOH (pH 8,5), 1mM EDTA) verdünnt und bei 72°C für sieben Minuten inkubiert.

Die PCR-Amplifizierung erfolgte mit dem „Advantage 2 PCR Kit“. Zu 2,5µl der gewonnenen cDNA wurden 5µl 10x Advantage 2 PCR Buffer, 1µl dNTP Mix (10mM), 5µl Universal Primer Mix (UPM, 10x), 1µl genspezifischer Primer („5RACEHif-1816“ siehe Tabelle 2, 10µM) und 1µl Advantage 2 Polymerase Mix (50x) pipettiert und mit Aqua bidest. auf 50µl aufgefüllt. Bei der Amplifikation der cDNA wurde zunächst bei 94°C für zwei Minuten inkubiert. Es folgten zehn Zyklen mit 94°C für 25 Sekunden, 70°C für 30 Sekunden, die in jedem Zyklus um 0,5°C reduziert wurden, und anschließenden 72°C für zwei Minuten.

Nach diesen Zyklen folgten 25 Zyklen mit 25 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 65°C und zwei Minuten bei 72°C. Abschließend wurde eine einmalige Extension bei 72°C für zwei Minuten durchgeführt.

2. Material und Methoden

Übersicht des verwendeten Protokolls

Reverse Transkription:

70°C	2 min
4°C	2 min
Hinzufügen des Enzym-Mix	
42°C	60 min
Verdünnen	
72°C	7 min

PCR:

	94°C	2 min
<hr/>		
10 Zyklen	94°C	25 sek
	70°C	30 sek (Reduktion um 0,5°C pro Zyklus)
	72°C	2 min
<hr/>		
25 Zyklen	94°C	25 sek
	65°C	30 sek
	72°C	2 min
<hr/>		
72°C	2 min	

2.2.8.2 3' RACE PCR

Prinzip

Zur Identifizierung des 3'-Endes wurde die 3'-RACE angewendet, die auf der Verwendung eines speziellen Oligo(dT)-Primers, „3'-RACE CDS Primer A“ (siehe Tabelle 2) als Ausgangspunkt für die cDNA Synthese beruht. Die Verwendung eines Oligo(dT)-Primers ist nur bei Vorliegen eines Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der gesuchten Sequenz möglich. Dieser Oligo(dT)-Primer ist an seinem 5'-Ende mit einer Adaptorsequenz versehen, die in der anschließenden PCR als Erkennungssequenz für den reversen Primer verwendet wird. Zusätzlich befinden sich am 3'-Ende des Oligo(dT)-Primers zwei degenerierte Positionen (3'(A, G, C oder T)(A, G oder C)) wodurch gewährleistet werden soll, dass die cDNA-Erststrangsynthese nicht an einer beliebigen Stelle des Poly(A)-Schwanzes startet, sondern möglichst an der

2. Material und Methoden

Verknüpfungsstelle zwischen mRNA und Poly(A)-Schwanz initiiert wird. Die spezifische cDNA wird dann mittels PCR amplifiziert, wobei neben dem adaptorgerichteten Primer ein genspezifischer Primer verwendet wird.

Durchführung

In der vorliegenden Arbeit wurde für die 3'-RACE die humane Erythroleukämie-Zelllinie K562 verwendet. Es wurde zunächst 1µl RNA (1µg/µl) mit 1µl 3'-RACE CDS Primer A (12µM), 0,5µl RNAsin und 9,5µl Nuklease-freiem H₂O vermischt, für drei Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend für zwei Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 0,75µl T4gp32 (Konzentration: ~3µg/µl) wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 7,25µl eines Enzym-Mix bestehend aus 4µl First-Strand Buffer (5x), 1µl DTT (0,1M), 1µl dNTPs (10mM), 1µl SuperScript III Reverse Transkriptase (200 U/µl) und 0,25µl DEPC-H₂O zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte bei 50 °C für eine Stunde. Nach Zugabe von 80µl Tricine-EDTA (10mM Tricine-KOH (pH 8.5) und 1mM EDTA) wurde abschließend für 15 Minuten bei 72 °C inkubiert.

Die anschließende PCR-Amplifizierung erfolgte mit dem „Advantage 2 PCR Kit“. Zu 2,5µl der aus der reversen Transkription erhaltenen cDNA wurden 5µl 10x Advantage 2 PCR Buffer, 1µl dNTP Mix (10mM), 5µl 10x Universal Primer Mix, 1µl genspezifischer Primer („5RACEaHif“ siehe Tabelle 2, 10µM) und 1µl 50x Advantage 2 Polymerase Mix pipettiert und mit Aqua bidest. auf 50µl aufgefüllt. Die Amplifikation begann mit der Erhitzung auf 94 °C für eine Minute. Anschließend wurden zehn Zyklen mit drei Temperaturschritten durchgeführt: 30 Sekunden bei 94 °C, 30 Sekunden bei 70 °C, wobei pro Zyklus eine Temperaturreduktion von 0,2 °C stattfand, und zwei Minuten bei 72 °C. Darauf folgend wurden 28 Zyklen mit 30 Sekunden bei 94 °C, 30 Sekunden bei 67,5 °C und zwei Minuten bei 72 °C durchgeführt. Abschließend fand eine einmalige Extension bei 72 °C für drei Minuten statt.

2. Material und Methoden

Übersicht des verwendeten Protokolls

Reverse Transkription:

70°C	3 min
4°C	2 min
Hinzufügen von T4gp32	
Raumtemp.	5 min
Hinzufügen Enzym-Mix	
50°C	60 min
Hinzufügen Tricine-EDTA	
72°C	15 min

PCR:

	94°C	1 min
<hr/>		
10 Zyklen	94°C	30 sek
	70°C	30 sek (Reduktion um 0,2°C pro Zyklus)
	72°C	2 min
<hr/>		
28 Zyklen	94°C	30 sek
	67,5°C	30 sek
	72°C	2 min
<hr/>		
	72°C	3 min

2.2.9 Realtime PCR

Prinzip

Der Realtime PCR liegt das gleiche Prinzip zugrunde, wie der PCR. Echtzeit („Realtime“) ist, dass der Prozess der Amplifizierung mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes direkt beobachtet werden kann und, im Gegensatz zur PCR, über Messungen der Fluoreszenz eine Quantifizierung des entstandenen Produktes ermöglicht wird. Die Fluoreszenz steigt dabei proportional zur Menge des neu synthetisierten PCR-Produktes.

Als Fluoreszenzfarbstoff wird „SYBR-Green“ verwendet, der sich an die neu synthetisierte doppelsträngige DNA anlagert. SYBR-Green ist ein Cyanin-Farbstoff, der für den Nachweis von doppelsträngiger DNA verwendet wird und als Komplex mit doppelsträngiger DNA blaues Licht der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 498$ nm absorbiert und grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 522$ nm emittiert.

Durchführung

Es wurde ein Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 15µl pro Well angefertigt, der 5µl cDNA, 2,5µl Primer (1,25µl forward Primer und 1,25µl revers Primer in der jeweiligen Endkonzentration von je 0,3µM) und 7,5µl Kit enthielt.

Der Kit wurde hergestellt aus PCR-Puffer (2x), MgCl₂ (4mM), dNTPs (0,4mM je Nukleotid), HotStarTaq Polymerase (0,05U/µl), SYBR green (1:20 000) und FITC (0,02µM).

Jede Probe wurde in ein Triplet Wells pipettiert. Anschließend wurde die Platte mit Folie luftdicht verschweißt und diese dann in den vorgeheizten iCycler gestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Polymerase Aktivierung bei 95°C für 15 Minuten durchgeführt. Darauf folgten 40 Zyklen mit Denaturation der DNA bei 94°C für 15 Sekunden, Annealing der Primer bei 60°C für 30 Sekunden und Extension bei 72°C für 10 Sekunden. Die Fluoreszenz wurde während des 72°C Schrittes gemessen.

2. Material und Methoden

Übersicht des verwendeten Protokolls

	95°C	15 min
40 Zyklen	94°C	15 sek
	60°C	30 sek
	72°C	10 sek

2.2.9.1 Schmelzkurvenanalyse

Im Anschluss an die Realtime PCR wurde eine Schmelzkurve für die erzielten Produkte erstellt.

Die Schmelztemperatur gibt die Temperatur an, bei der die Hälfte der DNA in Doppelsträngen vorliegt, sie ist für jeden DNA-Abschnitt annähernd spezifisch und wird vor allem vom „GC“-Gehalt und der Länge der Sequenz beeinflusst.

Das Prinzip der Schmelzkurvenanalyse beruht auf der Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes beim Aufbrechen der DNA-Doppelstränge, die Fluoreszenzintensität sinkt ab.

Über die Schmelzkurvenanalyse lassen sich erzielte Produkte identifizieren, sowie Verunreinigungen und unspezifisch amplifizierte Produkte, wie Primerdimere, detektieren. Generell gilt, dass spezifische Produkte einen höheren Schmelzpunkt haben als unspezifisch entstandene Primerdimere.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung der Schmelzkurve bei 70°C begonnen, ein Zyklus dauerte zehn Sekunden, in jedem Zyklus wurde die Temperatur um 0,5°C erhöht, bis beim 50. Zyklus eine Temperatur von 95°C erreicht wurde.

2.2.9.2 Housekeeping Gene

Ziel der Realtime PCR ist es, über die Menge des amplifizierten PCR-Produkts auf die Menge an eingesetzter cDNA und damit auf die Ausgangsmenge an RNA zu schließen. So lassen sich Aussagen über die Expression eines Gens in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt oder unter einem bestimmten Stimulus treffen. Die Realtime PCR ist dabei eine sehr sensitive und präzise Methode. Methodische Fehler, die zu Fehlinterpretationen des

2. Material und Methoden

Expressionsmuster eines Genes führen können, treten weniger während der Realtime PCR auf, sondern vor allem während der Probenaufarbeitung, von der Gewinnung der RNA bis zur Synthese der cDNA, durch unterschiedliche Ausgangsmengen an RNA und eine schwankende Effektivität der reversen Transkription.

Um diese Fehler in der Auswertung auszugleichen, kann die Expression des Zielgens in Relation zu einem stabil exprimierten Referenzgen (so genanntes Housekeeping-Gen) als internem Standard analysiert werden. Dabei geht man davon aus, dass sich die methodischen Fehler gleichartig auf die in einer Probe vorhandenen Sequenzen auswirken. Die relative Expression des Zielgens in Bezug auf das Housekeeping-Gen bleibt dadurch unbeeindruckt.

Idealerweise sollte ein Housekeeping-Gen in verschiedenen Geweben auf gleich bleibendem Niveau exprimiert werden und unabhängig von äußeren Einflüssen sein.

Es hat sich allerdings gezeigt, dass viele vermeintliche Housekeeping-Gene zwar in einem bestimmten Zelltyp oder unter bestimmten experimentellen Bedingungen stabil exprimiert werden, in anderen Geweben, oder auf bestimmte Stimuli hin, aber großen Expressionsschwankungen unterworfen sein können. Deshalb ist es unumgänglich, die konstante Expression verschiedener Housekeeping-Gene für jedes Studienprotokoll zu evaluieren und das jeweils am besten geeignete Referenz-Gen zu ermitteln. Ein sehr zuverlässiger Algorithmus zur Ermittlung geeigneter Referenzgene wurde von Vandesompele et al. (2002) [144] entwickelt und ist als Software „geNorm“ frei zugänglich. Dieser Algorithmus ermittelt die Stabilität eines Housekeeping-Gens, indem die paarweise Abweichung von anderen Referenzgenen als Standardabweichung des logarithmisch transformierten Expressionsquotienten gebildet wird (interne Kontrollgenstabilität). Je kleiner die interne Kontrollgenstabilität ist, desto stabiler wird das Gen exprimiert. Für die vorliegende Arbeit wurde die Stabilität der Housekeeping-Gene GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase), β -Aktin, UbB (Ubiquitin B), HPRT1 (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase), HMBS (Hydroxymethylbilane Synthase) und ATP5B (ATP Synthase 6) analysiert.

2.2.9.3 Bestimmung der Primereffizienz

Vor Durchführung der Realtime PCR wird die Effizienz der verwendeten Primer bestimmt. Die theoretisch optimale Primereffizienz liegt bei 2,0, dies bedeutet, dass in jedem PCR-Zyklus eine Verdoppelung der DNA stattfindet. In der praktischen Durchführung wird dieser Wert in der Regel nicht ganz erreicht, er kann diesen Wert unter- oder überschreiten. Ein Unterschreiten kann durch die nicht ausreichend spezifische Primer-Bindung entstehen, ein Überschreiten kann durch das Entstehen von Nebenprodukten, wie Primerdimeren, oder durch Messungenauigkeiten erklärt werden.

Die Bestimmung der Primereffizienz erfolgt durch eine Verdünnungsreihe aus sechs Verdünnungsstufen. Die Messung wird mit dem in den nachfolgenden Versuchen verwendeten PCR-Protokoll durchgeführt. Die Effizienz (E) wurde aus den erhaltenen CT-Werten (siehe Kapitel 2.2.9.4) der einzelnen Verdünnungsstufen unter Zuhilfenahme der Software „REST“ [103] berechnet. Dabei wurden die CT-Werte gegen den Logarithmus der jeweiligen cDNA-Konzentration aufgetragen, es ergibt sich für jedes Primerpaar eine Gerade mit einer Steigung f, mit der die Effizienz der Primer nach der Formel

$$E = 10^{(-1/f)}$$

berechnet werden kann.

2.2.9.4 Auswertung der Realtime PCR

Ziel der Auswertung der aus der Realtime PCR gewonnenen Daten ist die Quantifizierung eines Zielgens. Dabei kann das Expressionslevel eines Zielgens entweder im Vergleich zum Expressionslevel einer Referenz (Housekeeping-Gen) ermittelt werden oder, um eine absolute Quantifizierung zu erreichen, im Vergleich zur Expression eines Standards [128, 146]. In der vorliegenden Arbeit ging es nicht um die absolute Quantifikation der Genexpression, sondern um den Vergleich der Genexpressions-Werte derselben Probe bei Anwendung unterschiedlicher reverser Transkriptions-

2. Material und Methoden

Verfahren. Deshalb wurden die Expressionswerte, die mittels unterschiedlichen genspezifischen Umschrieben oder mittels Umschrieben mit Oligo(dT) Primern oder den unspezifischen Primern erreicht wurden jeweils in Relation zu den Werten gesetzt, die mittels Random Hexamer Priming gemessen wurden. Für diesen Vergleich wurde eine Abwandlung der MNE-Wertbestimmung nach Simon [128] verwendet.

Zunächst wurden die erhaltenen Ergebnisse der Triplets verglichen, war die Abweichung innerhalb eines Triplets außerhalb einer maximal tolerierten Abweichung, so wurde dieses von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

Die Auswertung der Realtime PCR erfolgte mit Hilfe der „Sequenz Detektions Software“. Über dieses Programm wurde zunächst ein Fluoreszenzschwellenwert („Threshold“) bei dem Zyklus definiert, bei dem 10% der im Durchschnitt in diesem PCR Lauf maximal erreichten Fluoreszenzintensität erreicht wurden. In der vorliegenden Arbeit lag dieser meist bei ungefähr 25 Zyklen. Für jedes Triplett wurde dann der CT-Wert (Cycle Threshold Value) bestimmt, das ist der Zyklus, an dem die Fluoreszenzintensität den Threshold übersteigt. Der Zyklus, in dem dies stattfindet, ist abhängig von der zu Anfang vorliegenden DNA-Menge. Ein niedriger CT-Wert steht für eine effizientere reverse Transkriptionsreaktion.

Aus den erhaltenen CT-Werten der Triplets wurde ein Mittelwert und die Standardabweichung gebildet und dieser in das Softwareprogramm JMP IN 5.1 übertragen.

Aus diesen CT-Werten wurde dann die mittlere normalisierte Expression („Mean Normalized Expression“, MNE) berechnet:

$$MNE = \frac{(E_{target})^{CT_{hexamer\ mean}}}{(E_{target})^{CT_{other\ mean}}}$$

Dabei ist E_{target} die Effizienz des Primers, der das Zielgen amplifiziert. $CT_{hexamer\ mean}$ beschreibt den Mittelwert der CT-Werte, die mit Hexamer Primern erzielt werden konnten, $CT_{other\ mean}$ beschreibt den Mittelwert der CT-Werte, die mit

2. Material und Methoden

genspezifischen Primern erzielt werden konnte (modifiziert nach Simon, P. (2003) [128]).

Anschließend wurde die Standardabweichung mittels folgender Formel ermittelt:

$$SE_{MNE} = MNE \cdot \left((\ln(E_{target}) \cdot SE_{CT_{other, mean}})^2 + (\ln(E_{target}) \cdot SE_{CT_{hexamer, mean}})^2 \right)^{1/2}$$

In dieser Formel ist MNE der aus der oben beschriebenen Formel ermittelte Wert. E_{target} ist die Effizienz des Primers, der das Zielgen amplifiziert. $SE_{CT_{other, mean}}$ ist die Standardabweichung des Mittelwertes des CT-Wertes, der bei der Verwendung eines genspezifischen Primers erreicht werden konnte. $SE_{CT_{hexamer, mean}}$ ist die Standardabweichung des Mittelwertes des CT-Wertes bei der Verwendung von Random Hexamer Primern.

Aus den vorliegenden Werten wurde das 99%-Konfidenzintervall berechnet:

$$99\text{-Konfidenzintervall} = [MNE - 2,5 \cdot SE_{MNE}; MNE + 2,5 \cdot SE_{MNE}]$$

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die natürliche Antisense RNA zu HIF-1 α , aHIF, genauer charakterisiert.

Es wurde ein experimentelles Verfahren etabliert, mit dem die Untersuchung der tatsächlichen Orientierung ermöglicht wird. Die Sequenz wurde auf ihr 5'-Ende und ihr 3'-Ende und ihre Charakteristika hin untersucht. Außerdem wurden mögliche Regulationsmechanismen ausfindig gemacht.

3.1 Der Genlokus von HIF-1 α und aHIF

Als ersten Schritt im Zuge der Charakterisierung wurde versucht sich dem HIF-1 α und dem aHIF Genlokus bioinformatisch zu nähern und bereits bekannte und untersuchte Informationen zu gewinnen. Die aHIF Sequenz wurde als erstes von Thrash-Bingham und Tartof, 1999 beschrieben, sie legten für diese Sequenz eine Antisense Orientierung fest. Die von ihnen beschriebene Sequenz wird im Human Genome Browser als „U85044“ benannt und ihre Lokalisation ist aus Abbildung 7 ersichtlich.

Auf der bioinformatischen Suche nach HIF-1 α im UCSC Genome Browser findet man die folgende Abbildung. Sie zeigt die Lokalisation der humanen HIF-1 α Sequenz und der von Thrash-Bingham und Tartof, 1999 beschriebenen aHIF Sequenz (U85044) auf Chromosom 14q21-q24.

3. Ergebnisse

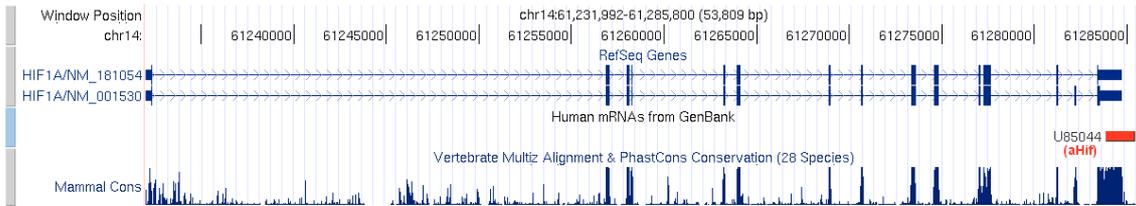


Abbildung 7: In den ersten beiden Zeilen sieht man die beiden beschriebenen Varianten für HIF-1 α , die obere ist die Spleißvariante ohne Exon 14 (HIF1A/NM_181054), die untere mit Exon 14 (HIF1A/NM_001530). Darunter sieht man die von Thrash-Bingham beschriebene Sequenz von aHIF, U85044 (rot markiert).

Pfeile zeigen die Richtung einer Sequenz vom 5'-Ende zum 3'-Ende an, die Linien stehen für Introns, Balken für Exons. Den Exons entsprechende schmalere Balken repräsentieren nicht translatierte Abschnitte einer Sequenz. Außerdem zeigt die Abbildung in der Zeile „Mammal Cons“ die Summe der phylogenetischen Konservierung im Genom verschiedener Säugetiere dieses Genomabschnittes an. Dabei zeigt ein Peak das Vorliegen einer Konservierung an, je höher der Peak, desto stärker ist die Konservierung ausgeprägt. Die maximale Höhe steht für die maximale Konservierung [3].

Aus der Abbildung ersichtlich ist die Lage der beschriebenen Sequenz von aHIF am 3' nicht-translatierten Ende (3'-UTR) der Sequenz von HIF-1 α . Die Sequenz ist an der Position chr14:61283843-61285420 lokalisiert und 1577 Basen lang. Sie überlappt zu einer guten Hälfte, genauer gesagt mit 886 Basen, mit der bekannten Sequenz der 3'-UTR von HIF-1 α .

Betrachtet man die phylogenetische Konservierung ist auffällig, dass dieser Bereich, wie auch die Exons von HIF-1 α , besonders stark konserviert ist.

Die Sequenz aHIF ist im Schaubild als nicht-kodierend markiert, es konnten keine weiterführenden Informationen im Genome Browser über mögliche transkriptionelle Regulationsmechanismen oder verschiedene Motive, wie Spleißstellen oder Poly(A)-Signale, gefunden werden.

3. Ergebnisse

Aus dem Genome Browser lässt sich als weitere Information die genaue Gensequenz erhalten:

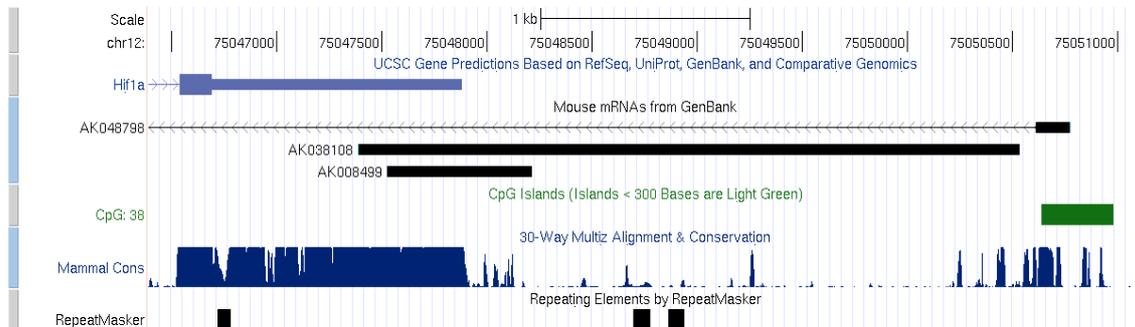
1 cctgtagtg cagggattca tagtgattt tctgtttaa aaatatctt ctacactgtc	actatatatt cctaaaataa
61 tgatttttaa aatagagatt atcagtataa aagaaataca gctatttgt aaaagaaaaa	841 tgcttctaaa attactcaat tattgaaatc tacatgaaaa aaaggatgtt aatagcgaca
121 tacgggagaa aaaggatgaa gctactttgt tttaaaacgc agtatcatta aaacaaaaac	901 aagtcataa aatcaaacat tgtatttga gcaaaltaac atactaggca atttgctaa
181 aaaccaagtt tgttctaggt ttgactttgg agtcaggaga cttgagctta catttttgg	961 gaatgcatga tttttttt ctgtttaca gctgctcaa aatatcttta taccaacagg
241 ctgccatcta ttacttttaa agctggggca aattattcat ttgaagtcta agtttattaa	1021 gtaggcagaa catttaggt taatcagtt tacacaatat tagcataaac ttccacaact
301 tctgtaaatg ggaacagatt agaaatcttc agagaagctc tagcctttgt aacattgtga	1081 acatagggta ttgtttctt ttgagctggc aaagtgacta tagaaacatc agatgatttc
361 ctataatgct gagaactgct tcactcatcc cattcatatt ttaaaaatac taatattttg	1141 tctgaattga gaattttatc caaataaatg ccacatacct tctagatata tgcatactt
421 tgtttgagca ttttaatagg ctcagaaact taaaaatgat gttcttttc taacaacata	1201 tctatattat gtaaatggct ttaccattt aaataataaa ccatacagca ttaagaatc
481 ctcttttcaa tgggatatta tggttgttat tatttaacat gacatttagg gactcaacat	1261 attattatat gattaacaat gtcattgtcc aggtttaaca atttcatagg ccaaaaaaaaa
541 acattaaggt gatggcacta agataaatgt agaaataacc agtaccatgt aattttcata	1321 tttcttcta aaaactagtt ttataaacgc agaataatatt ccatgagtaa ctgctggat
601 agtgctttaa ttgttgtaa acaattttat gagttggagg tgttgaagca aatattatta	1381 ttttaagaa aatataattgt gcaattgtgg ctaccacgta ctgctggcaa agcattatta
661 atatttgaac ataaaagctg atcaaagggg cctgggtccac agaagatgtt tatttgatgt	1441 ttatgtaaa atgtgaaaaa aaagggtgaa aaattttca actgcctatg atcatgatga
721 aacaaaacaa tacagttagt gttagatcca accacaaaga gcaaaaaggaa tgaaaaattt	1501 aaggttactg ccttcttaca aaaattatat tggcatcttc ttaaaaataa ttcgaaaaag
781 gtacaatgta catagaaaaa acaagatatt tactgtgaca	1561 ggataaactc cctagcc

Abbildung 8 zeigt die Nukleinsäuresequenz der bereits beschriebenen aHIF Sequenz, U85044. Grün markiert sind die mit der 3'-UTR von HIF-1 α überlappenden Basen. Schwarz markiert sind die Basen, die über die 3'-UTR hinausgehen.

Um weitere Hinweise, auch auf eine mögliche Funktion der beschriebenen Antisense RNA, zu gewinnen, wurde ein Vergleich zwischen dem menschlichen

3. Ergebnisse

Genom und dem Genom der Maus durchgeführt. In der folgenden Abbildung 9 ist der entsprechende Genomabschnitt der Maus gezeigt.



Die Abbildung 9 zeigt den Genomabschnitt der Maus für die Sequenz von HIF-1 α und der im menschlichen Genom vermuteten Sequenz von aHIF.

Blau markiert in der ersten Zeile ist das 3'-Ende von HIF-1 α und seine 3'-UTR. In den Zeilen darunter werden bereits beschriebene Sequenzabschnitte gezeigt, die an der, im humanen Genom, vermuteten Stelle von aHIF liegen (AK048798, AK038108, AK008499).

Wie in der obigen Abbildung zeigen Pfeile die Richtung einer Sequenz vom 5'-Ende zum 3'-Ende an, Linien stehen für Introns, Balken für Exons. Den Exons entsprechende schmalere Balken repräsentieren nicht translatierte Abschnitte einer Sequenz.

Außerdem ist in dieser Abbildung eine CpG-Insel gezeigt (grün markiert) und wiederum, in der Zeile „Mammal Cons“, die Summe der phylogenetischen Konservierung im Genom verschiedener Säugetiere dieses Genomabschnittes, die maximale Höhe steht für die maximale Konservierung.

Die Zeile „RepeatMasker“ zeigt das Ergebnis eines Programms an, mit dem repetitive Elemente einer Nukleotidsequenz für eine detailliertere Analyse ermittelt werden können [3].

Betrachtet man den für aHIF relevanten Sequenzabschnitt im Genom der Maus, ist auffällig, dass für diese Region in den Datenbanken, wie auch im humanen Genom, beschriebene Sequenzen vorliegen (AK038108 und AK008499). Diese liegen an ähnlicher Position, an der im menschlichen Genom aHIF positioniert

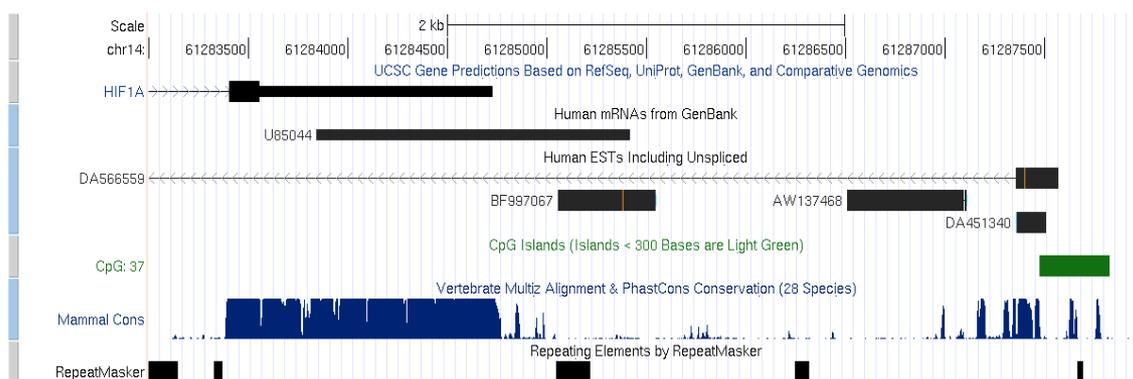
3. Ergebnisse

ist und deuten darauf hin, dass es sich auch hier um Antisense Transkripte handeln könnte.

Zusätzlich ist eine gespleißte Antisense Sequenz (AK048798) angegeben, die ausgehend von einer CpG-Insel (in der Abbildung 9 grün markiert) etwa 3500 Basenpaare downstream der murinen Hif-1 α 3'-UTR überlappende Bereiche mit Exon 2 und 5, sowie Intron 4 und 6 des murinen Hif-1 α Locus zeigt (diese Überlappungen sind in der Abbildung nicht dargestellt). Für diese gespleißte Sequenz kann aufgrund der Spleißstellen eine eindeutige Antisense Orientierung angegeben werden.

Von Interesse für die vorliegende Arbeit ist vor allem der exprimierte Sequenzbereich AK038108, der den gesamten Bereich ausgehend von der CpG-Insel bis zur 3'-UTR abdeckt. Da der Bereich der CpG-Insel eine hohe phylogenetische Konservierung zeigt, liegt die Vermutung nahe, dass dieser Bereich auch im humanen Genom als Promoterbereich für Antisense Transkripte fungieren könnte und legt damit auch nahe, dass die im menschlichen Genom beschriebene Antisense bisher noch nicht vollständig erfasst wurde.

Die folgende Abbildung 10 zeigt zum Vergleich den korrespondierenden Abschnitt des menschlichen Genoms.



Die Abbildung 10 zeigt den humanen Genomabschnitt für die Sequenz von HIF-1 α und aHIF.

Schwarz markiert in der ersten Zeile ist das 3'-Ende und die 3'-UTR von HIF-1 α .

In der Zeile darunter wird die Sequenz für aHIF, U85044, gezeigt.

3. Ergebnisse

Außerdem werden verschiedene für diesen Genomabschnitt ermittelte ESTs angezeigt, DA5666559, BF997067, AW137468 und DA451340, die nahe legen, dass in diesem Bereich eine kodierende Sequenz vorliegen könnte.

Wie in der obigen Abbildung zeigen Pfeile die Richtung einer Sequenz vom 5'-Ende zum 3'-Ende an, Linien stehen für Introns, Balken für Exons. Den Exons entsprechende schmalere Balken repräsentieren nicht translatierte Abschnitte einer Sequenz.

Außerdem ist in dieser Abbildung eine CpG-Insel gezeigt (grün markiert) und wiederum, in der Zeile „Mammal Cons“, die Summe der phylogenetischen Konservierung im Genom verschiedener Säugetiere dieses Genomabschnittes, die maximale Höhe steht für die maximale Konservierung.

Die Zeile „RepeatMasker“ zeigt das Ergebnis eines Programms an, mit dem repetitive Elemente einer Nukleotidsequenz für eine detailliertere Analyse ermittelt werden können [3].

Tatsächlich findet sich auch im menschlichen Genom eine phylogenetisch konservierte CpG-Insel, die mit dem Transkriptionsstartpunkt eines gespleißten Antisense Transkripts (DA5666559) assoziiert zu sein scheint. Zusätzlich finden sich neben der bereits bekannten aHIF Sequenz (U85044) zwei EST-Sequenzen (BF997067 und AW137468), die auf transkribierte Abschnitte zwischen der CpG-Insel und HIF-1 α schließen lassen. Da in diesen Sequenzen weder Poly(A)-Signale noch Spleißstellen beschrieben sind, ist es nicht möglich eine eindeutige Transkriptionsrichtung anzugeben. In der Regel sind EST-Sequenzen nicht vollständig als Gesamtsequenz erfasst und können deshalb nur einen Anhaltspunkt geben, welche Bereiche des Genoms exprimiert werden.

Der Vergleich mit dem Genom der Maus legt die Vermutung nahe, dass der gesamte Sequenzabschnitt zwischen CpG-Insel und 3'-UTR von HIF-1 α transkribiert wird und somit die Sequenz des humanen aHIF deutlich länger sein könnte, als bisher beschrieben.

3. Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bereits beschriebene aHIF Sequenz eine Länge von 1577 Basenpaaren aufweist und im Bereich der 3'-UTR von HIF-1 α lokalisiert ist und mit dieser um 886 Basenpaare überlappt. Der phylogenetische Vergleich mit dem entsprechenden Genomabschnitt der Maus und das Vorliegen von EST-Sequenzen ist ein Hinweis darauf, dass aHIF möglicherweise länger als bisher beschrieben ist und vermutlich bis an die gezeigte CpG-Insel heranreicht. Es konnten primär keine weiteren Informationen über mögliche Charakteristika gewonnen werden.

3.2 Verifizierung der Transkriptionsrichtung von aHIF: Etablierung einer Realtime RT-PCR-Methode zur Quantifizierung der Fehlerrate genspezifischer Umschriebe

Als weiteren Schritt zur näheren Charakterisierung der Sequenz von aHIF soll nun die Orientierung dieses Transkripts eindeutig verifiziert werden.

Für die experimentelle Feststellung der Orientierung einer Sequenz wurde eine genspezifische reverse Transkription mit anschließender PCR durchgeführt.

Es stellt sich in dieser Arbeit zunächst die Frage, wie spezifisch genspezifische Umschriebe tatsächlich sind und wie ihre Spezifität verbessert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Ausmaß von „fehlerhaftem“ Priming, während der genspezifischen reversen Transkription und der anschließenden PCR untersucht. Dazu zählt sowohl das Priming mit „falschen“ Primern, also Primer, die unspezifisch auch an andere Sequenzen als die Zielsequenz binden, als auch das „endogene“ Priming, das durch Schwierigkeiten bei der Aufbereitung der RNA im Sinne von endogenen „Verunreinigungen“ entstehen kann.

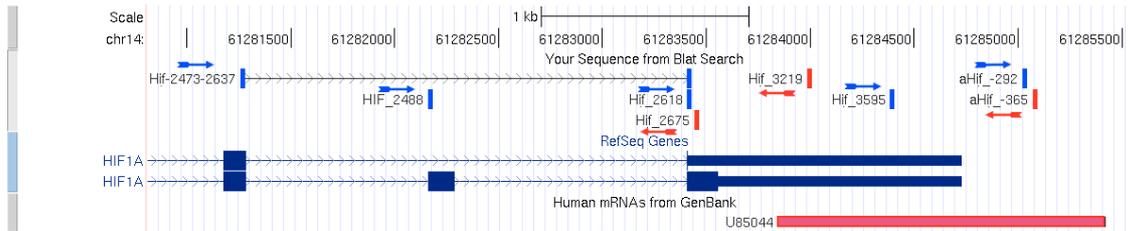
Es wurden zwei verschiedene Polymerasen, verschiedene Zielsequenzen und unterschiedliche Protokolle verglichen. Anschließend wurde mit Hilfe der Realtime PCR das Ausmaß von Primingartefakten quantifiziert.

Zunächst wurden verschiedene genspezifische Primer ermittelt, mit denen die Sequenz HIF-1 α und die Sequenz aHIF revers transkribiert werden sollen.

Die Lokalisation der verwendeten Primer ist Abbildung 11 und Abbildung 12 zu entnehmen.

Dabei sind Primer, die in „forward“ Orientierung angelegt sind, blau markiert, Primer, die in „revers“ Richtung orientiert sind, sind rot markiert. Aus den Abbildungen ist ersichtlich, mittels welcher Primer HIF-1 α und aHIF revers transkribiert werden können.

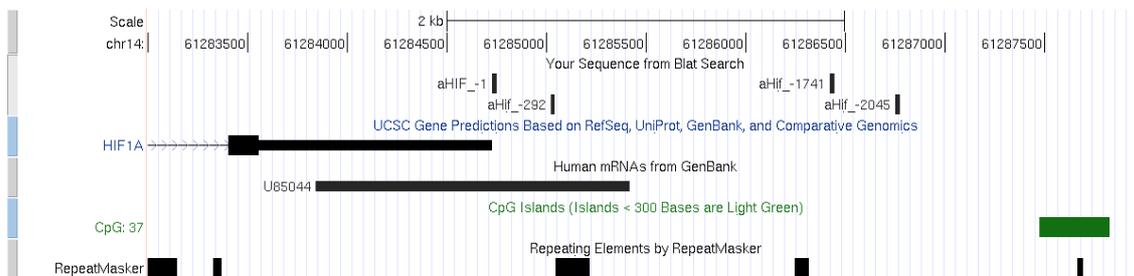
3. Ergebnisse



Die Abbildung 11 zeigt die verschiedenen verwendeten Primer, ihre Lokalisation und ihre Orientierung, „forward“ (blau eingezeichnet) und „revers“ (rot eingezeichnet). Außerdem sind zwei Varianten der Sequenz HIF-1 α gezeigt, die obere ist die Spleißvariante ohne Exon 14, die untere mit Exon 14.

Rot gekennzeichnet ist die Sequenz für aHIF (U85044) [3].

Weitere Informationen zu den Primern können Tabelle 2 entnommen werden.



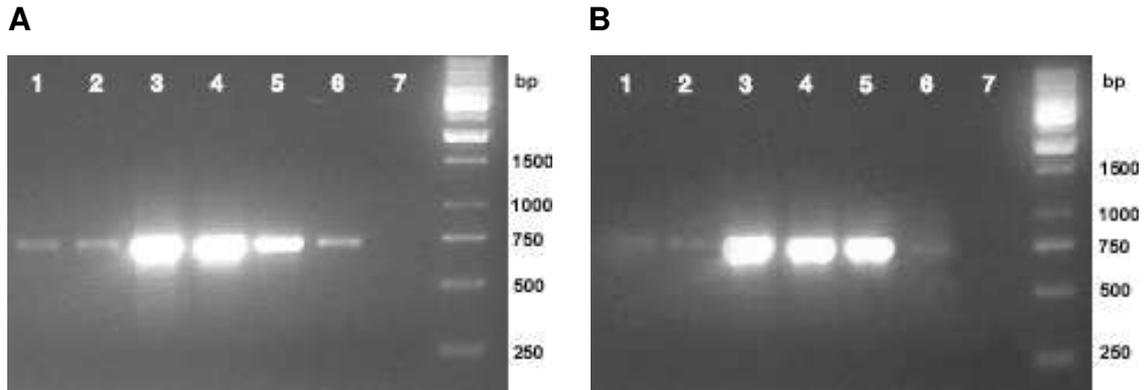
Die Abbildung 12 zeigt weitere Primer. Aus der Abbildung ist ihre Lokalisation zu entnehmen. Primer aHIF_-1 und aHIF_-292 sind „forward“ orientiert, Primer aHIF_-1741 und aHIF_-2045 sind „revers“ orientiert. Weitere Informationen zu den Primern können Tabelle 2 entnommen werden. Außerdem ist aus dieser Abbildung das 3'-Ende und die 3'-UTR von HIF-1 α zu entnehmen, sowie die Lokalisation der aHIF Sequenz U85044.

In der Zeile darunter wird die Lokalisation der CpG-Insel grün markiert gezeigt, wiederum darunter befindet sich das Ergebnis des „RepeatMasker“ [3].

Um die Spezifität der genspezifischen reversen Transkription zu überprüfen, wurden zunächst zwei verschiedene Polymerasen verglichen.

Die folgende Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse für den Vergleich der reversen Transkriptasen M-MLV RTase (Abbildung 13, A) und SuperScript III RTase (Abbildung 13, B).

3. Ergebnisse



Die Abbildung 13 zeigt in Bild A die Ergebnisse der reversen Transkription mit der Polymerase M-MLV bei 37°C, Bild B zeigt die jeweils gleichen Versuche mit der Polymerase SuperScript III RTase bei 55°C. Dabei wurden für die jeweiligen Linien die gleichen Primer verwendet. Die PCR wurde mit der HotStarTaq-Polymerase durchgeführt.

Für Linie 1 wurde der Primer aHIF-1 verwendet, für Linie 2 der Primer aHIF-292. Linie 3 zeigt die synthetisierte cDNA mit dem genspezifischen Primer HIF-1 α 3219. Linie 4 zeigt das Ergebnis, das mit Oligo(dT)-Primern erzielt wurde und Linie 5 zeigt das Ergebnis mit Random Hexamer Primern.

Die endogene Kontrolle zeigt Linie 6, hier wurde kein exogener Primer zugefügt. Linie 7 zeigt die Negativkontrolle, hier wurde keine Polymerase zugegeben. Dies würde eine mögliche genomische Kontamination aufzeigen.

Zunächst wurde die genspezifische reverse Transkription mit THP-1 Zellen durchgeführt. Es wurden die beiden Polymerasen M-MLV bei 37°C und Polymerase SuperScript III RTase bei 55°C getestet und verschiedene Primer verwendet, aHIF-1, aHIF-292, HIF 3219, Oligo(dT)-Primer und Random Hexamer Primer.

Anschließend wurde für alle Umschriebe mittels PCR eine Amplifikation von HIF-1 α durchgeführt, hierbei wurden die Primer HIF 2488 und HIF 3219 verwendet. Für die PCR wurde die HotStarTaq Polymerase verwendet. Dieses Ergebnis wird mit Hilfe der Gelelektrophorese in Abbildung 13 gezeigt. Die Lokalisation der Primer ist Abbildung 11 und Abbildung 12 zu entnehmen.

Abbildung 13 zeigt, dass genspezifische Umschriebe nicht ausreichend genspezifisch sind. Die Synthese von HIF-1 α cDNA erfolgte sowohl in

3. Ergebnisse

Anwesenheit von falschen Primern als auch, wenn kein exogener Primer hinzugefügt wurde: Linie 1 zeigt das Ergebnis für die reverse Transkription mit dem Primer aHIF -1, Linie 2 zeigt das Ergebnis mit dem Primer aHIF -292. Beides sind falsche Primer und führen dennoch zu einem Produkt, wie die diskrete Bande in diesen Linien zeigt. Auch Linie 6 zeigt eine diskrete Bande; obwohl hier kein exogener Primer zugefügt wurde, führte das endogene Priming zu einem Produkt der spezifischen Größe.

Für beide Polymerasen konnten die stärksten Banden mit den Primern für HIF-1 α erzielt werden. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Intensität der erzielten Bande mit dem genspezifischen Primer in Linie 3 HIF 3219 und den nicht genspezifischen Primern Oligo(dT) in Linie 4 und Random Hexamer Primern in Linie 5 ausgemacht werden.

Die unspezifischen Banden sind bei den durchgeführten Versuchen mit der reversen Polymerase M-MLV stärker ausgeprägt, als bei den Versuchen mit der reversen Transkriptase SuperScript III, wie die Intensität der Banden in den Linien 1, 2 und 6 im Vergleich zwischen Bild A und B zeigt. Sowohl das falsche Priming (Linie 1 und 2), als auch das endogene Priming (Linie 6) sind mit der SuperScript III reversen Transkriptase deutlich reduziert.

Dies zeigt, dass durch Verwendung dieser Polymerase und des veränderten Protokolls, die Spezifität des genspezifischen Umschriebs gesteigert werden kann, es kann jedoch keine absolute Spezifität erzielt werden.

Für beide Protokolle und Polymerasen konnte eine mögliche genomische Kontamination ausgeschlossen werden, Linie 7 zeigt keine Banden.

Aus den aufgeführten Ergebnissen lässt sich folgern, dass die genspezifische reverse Transkription nicht absolut spezifisch ist und dass mit Hilfe dieser Methode keine ausreichenden Rückschlüsse über die Orientierung eines Transkripts gezogen werden können.

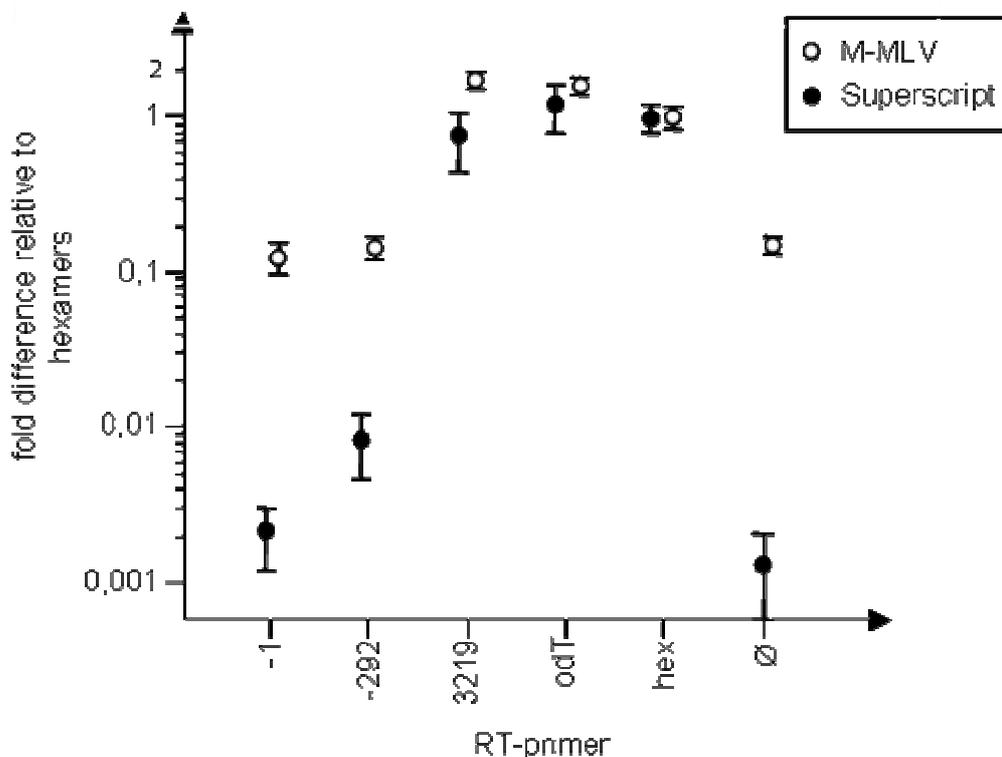
Vielmehr zeigen diese Ergebnisse, dass besonderes Augenmerk auf das so genannte „fehlerhafte Priming“ zu legen ist.

3. Ergebnisse

Um dieses „fehlerhafte Priming“ genauer spezifizieren und quantifizieren zu können und seine Rolle bezüglich der reversen Transkription genauer zu beschreiben wurde im Folgenden die Methode der Realtime PCR verwendet.

Für die durchgeführten Versuche wurde dasselbe Ausgangsmaterial wie im vorangegangenen Versuch verwendet. Die Versuche wurden mit THP-1 Zellen durchgeführt, die reverse Transkription mit den reversen Transkriptasen M-MLV und SuperScript III im Vergleich. Es wurden verschiedene Primer, aHIF-1, aHIF-292, 3219, Oligo(dT) und Random Hexamere, verwendet. Die anschließende Realtime PCR wurde mit den Primern für HIF-1 α , HIF 2488 und HIF 2675, durchgeführt. Die Ergebnisse der Realtime PCR wurden statistisch ausgewertet.

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse als „fold-differences“ (potenziert um die Differenz) im Verhältnis zum Priming mit Random Hexamer Primern und mit ihrem 99%igen Konfidenzintervall, für drei gemessene Wiederholungen pro Versuch, dargestellt.



3. Ergebnisse

Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der durchgeführten Realtime PCR.

Das Diagramm zeigt auf der y-Achse die „fold difference“ des Primings mit den verschiedenen Primern (abzulesen auf der x-Achse: aHIF-1, aHIF-292, 3219, Oligo(dT) und Random Hexamere) im Verhältnis zum Priming mit Random Hexamer Primern. Auf der x-Achse sind die für die reverse Transkription verwendeten Primer aufgezeigt. Mit „-1“ gekennzeichnet ist die reverse Transkription mit dem genspezifischen Primer für aHIF-1, „-292“ kennzeichnet das Ergebnis der Realtime PCR nach der reversen Transkription mit dem genspezifischen Primer für aHIF -292. Mit „3219“ bezeichnet ist der Versuch mit dem Primer HIF 3219, dies ist der genspezifische Umschrieb für HIF-1 α . „odT“ kennzeichnet den Versuch, der mit Oligo(dT) Primern durchgeführt wurde, „hex“ steht für den Versuch mit Random Hexamer Primern. Dieser Wert beträgt für beide reverse Transkriptasen 1, da die anderen Werte im Vergleich zu diesem betrachtet werden. Mit „Ø“ gekennzeichnet ist der Versuch, bei dem kein exogener Primer hinzugefügt wurde.

Die erzielten Ergebnisse mit der M-MLV reversen Transkriptase sind als weiße Kreise markiert, die mit der SuperScript III Polymerase als schwarze Kreise.

Die Lokalisation der verwendeten Primer ist aus Abbildung 11 und Abbildung 12, die Nukleotidsequenz und ihre Orientierung ist aus Tabelle 2 ersichtlich.

Auf den ersten Blick ersichtlich wird, wie bereits der Abbildung 13 zu entnehmen ist, dass die reverse Transkription mit Hilfe der SuperScript III Polymerase und dem veränderten Protokoll deutlich spezifischere Ergebnisse liefert. Offensichtlich wird dies bei der Betrachtung der Primer, die bei der genspezifischen reversen Transkription das, für die Amplifikation mit der nachfolgenden Realtime PCR, „falsche“ Produkt primen. Die Erträge der Realtime PCR sind für die, mit den Primern aHIF-1, aHIF-292 und ohne die Zugabe eines exogenen Primers, durchgeführte reverse Transkription deutlich geringer. Jedoch gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Polymerasen. Die reverse Transkription mittels der SuperScript III reversen Transkriptase ist deutlich spezifischer als mit der M-MLV reversen Transkriptase.

3. Ergebnisse

Für beide Polymerasen konnte die größte Ertragsmenge mit dem Primer für HIF-1 α und den nicht genspezifischen Primern Oligo(dT) und Random Hexameren erzielt werden.

Aufschlussreich ist auch das Ergebnis für die reverse Transkription ohne exogenen Primer (\emptyset), hier wird das Ausmaß des endogenen Primings, vor allem für die reverse Transkription mit der M-MLV reverse Transkriptase, besonders deutlich.

Mit dem vorliegenden Versuch kann das fehlerhafte Priming quantifiziert werden.

Die Menge des endogenen Primings mit der M-MLV reversen Transkriptase (auf der x- Achse: \emptyset , ohne Hinzufügen eines exogenen Primers) ergab einen CT-Wert von 24,4 und war damit nahezu identisch mit der Menge des falschen Primings mit den Primern aHIF -1, hier betrug der CT-Wert 24,7, und aHIF -292, hier betrug der CT-Wert 24,5.

Das fehlerhafte Priming kann somit mit etwa 9% der Gesamtmenge bei der strangspezifischen Priming-Strategie angegeben werden.

Im Vergleich dazu war mit der SuperScript III reversen Transkriptase die Menge des fehlerhaften Primings signifikant reduziert, sie kann mit weniger als 0,5% des Gesamtertrages bei der strangspezifischen Priming-Strategie angegeben werden.

Damit kann mit Verwendung der SuperScript III reversen Transkriptase eine deutliche Steigerung der Spezifität ausgemacht werden, aber weder endogenes, noch „falsches“ Priming ausgeschlossen werden.

Die Spezifität der reversen Transkription ist, neben dem verwendeten Enzym und dem verwendeten Protokoll auch von der RNA-Zielsequenz und der Priming-Strategie abhängig. Auf diese Einflussfaktoren soll im Folgenden näher eingegangen werden. Auf Basis der bereits erzielten Ergebnisse wird weiter spezifiziert, ob endogenes und „falsches“ Priming mit der SuperScript III reversen Transkriptase im Allgemeinen in dieser geringen Häufigkeit

3. Ergebnisse

vorkommen und damit vernachlässigbar wären. Es wurden weiterführende Versuche mit weiteren genspezifischen Primern und anderen Zielgenen durchgeführt

Für die folgenden Versuche wurde die reverse Transkription mit THP-1 Zellen und dem Protokoll der SuperScript III reversen Transkriptase durchgeführt. Die verwendeten Primer sind aHIF -1, HIF -292, 3595, 2675, 3219, Random Hexamer und Oligo(dT). Ihre Lokalisation kann den Abbildungen 11 und 12, ihre Orientierung und Nukleinsäuresequenz kann Tabelle 2 entnommen werden.

Die anschließende Realtime PCR fand für folgende Zielgene statt:

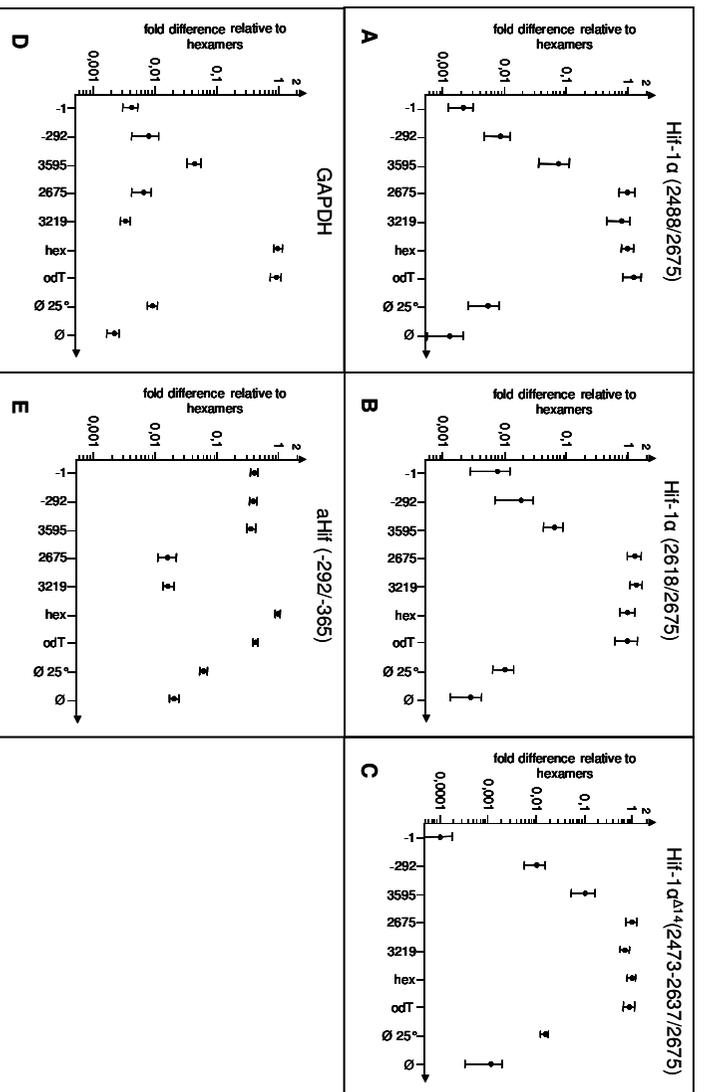
- HIF-1 α mit dem Primer-Paar 2488 und 2675 (Bild A)
- HIF-1 α mit dem Primer-Paar 2618 und 2675 (Bild B)
- HIF1 α Δ 14, eine Spleißvariante von HIF-1 α , der das Exon 14 fehlt, mit dem Primer-Paar 2473-2637 und 2675 (Bild C)
- GAPDH mit den Primern GAPDH_for und GAPDH_rev (Bild D)
- aHIF mit dem Primer-Paar aHIF -292 und aHIF -365 (Bild E)

Die jeweiligen Primer-Paare für die Realtime PCR sind der Abbildung 11 und den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen.

Die Ergebnisse der Realtime PCR wurden statistisch ausgewertet.

In der folgenden Abbildung sind die Daten als „fold-differences“ (potenziert um die Differenz) im Verhältnis zum Priming mit Random Hexamer Primern und mit ihrem 99%igen Konfidenzintervall, für drei gemessene Wiederholungen pro Versuch, dargestellt.

3. Ergebnisse



Die Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse verschiedener, zum Teil genspezifischer, Umschriebe und der nachfolgenden Realtime PCR für verschiedene Zielgene.

Auf der x-Achse jedes Bildes sind die für die genspezifische reverse Transkription verwendeten Primer aufgezeigt. Für aHIF wurden die Primer -1, -292 und 3595 verwendet, für den genspezifischen Umschrieb von HIF-1 α die Primer 2675 und 3219. Außerdem wurden die nicht genspezifischen Primer Random Hexamere und Oligo(dT) verwendet. „Ø 25“ bezeichnet die reverse Transkription bei der auf die Zugabe von exogenen Primern verzichtet und eine Präinkubation bei 25°C durchgeführt wurde, „Ø“ bezeichnet die reverse Transkription ohne exogene Primer und ohne Präinkubationsschritt.

Für die Realtime PCR wurde in Abbildung A die Primer für HIF-1 α 2488 und 2675 verwendet, in Abbildung B die Primer für HIF-1 α 2618 und 2675. Abbildung C zeigt das Realtime PCR Ergebnis mit den Primern für HIF-1 α ohne Exon 14 2473-2637 und 2675, Abbildung D zeigt das Ergebnis für die Realtime PCR Zielsequenz GAPDH mit den Primern GAPDH_for und GAPDH_rev und Abbildung E zeigt das Ergebnis für die Realtime PCR Zielsequenz aHIF mit den Primern aHIF -292 und -365.

3. Ergebnisse

Alle aufgeführten Abbildungen zeigen, dass mit den entsprechenden genspezifischen Primern in der reversen Transkription, in der sich anschließenden Realtime PCR die besten Werte erzielt werden konnten. Evident ist aber auch, dass „fehlerhaftes“ Priming nicht ausgeschlossen werden kann.

Für alle untersuchten Realtime PCR Zielsequenzen lag die Menge des endogenen Primings bei unter 5% des erzielten Gesamtertrages, wurde jedoch ein Präinkubationsschritt bei 25°C durchgeführt, so wurde das fehlerhafte Priming um das 4,5fache gesteigert. Dieser Präinkubationsschritt erweist sich also als bedeutsam für „fehlerhaftes Priming“.

Die erzielten Gesamterträge der reversen Transkription mit strangspezifischen Primern (-1,-292, 3595 für aHIF und 2675, 3219 für HIF-1 α) variierte für die entsprechenden Zielsequenzen kaum, während sich mit „falschen“ Primern große Differenzen beim fehlerhaften Priming, von 0,01% bis 14,8%, zeigten.

Die Menge und das Muster für fehlerhaftes Priming bei der stark exprimierten Zielsequenz HIF-1 α (maximaler CT-Wert bei 20,6) mit den Primern -1, -292 und 3595 war für die beiden verwendeten Realtime PCR Zielsequenzen nahezu identisch (Abbildung 15, A und B) und unterschied sich auch für die weniger exprimierte Spleißvariante HIF-1 α ohne Exon 14 (CT-Wert bei 26,5) kaum (Abbildung 15, C).

Die Ergebnisse der reversen Transkription mit strangspezifischen Primern, Random Hexameren und Oligo(dT) Primern zeigten für die entsprechenden Zielsequenzen keine signifikanten Unterschiede.

Die Tendenz eines bestimmten Primers bei der reversen Transkription unspezifische Produkte zu produzieren scheint von der Zielsequenz unabhängig zu sein, dies zeigt sich anhand des Primers aHIF 3595, der bei allen abgebildeten Realtime PCR Zielsequenzen die höchste Menge an fehlerhaftem Priming aufweist, sowohl bei der Expression der HIF-1 α Zielsequenz, als auch bei der Expression von GAPDH (Abbildung 15, D). Hingegen zeigt der Primer -1 für alle Zielsequenzen das niedrigste Potential für unspezifisches Priming.

3. Ergebnisse

Für die Realtime PCR Zielsequenz aHIF lag die Menge des „falschen“ Primings mit den Primern 2675 und 3219 und ohne exogene Primer bei weniger als 5% (Abbildung 15, E).

Durch den Vergleich der erzielten Muster unspezifischen und fehlerhaften Primings mit den gleichen Primern bei der reversen Transkription für HIF-1 α und aHIF kann die gegensätzliche Orientierung beider Transkripte bestätigt werden.

Auch in diesen Versuchen konnte das „falsche“ und endogene Priming als Problem der genspezifischen reversen Transkription nicht ausgeschlossen werden.

Es lässt sich feststellen, dass genspezifische Umschriebe nicht hundertprozentig genspezifisch sind. Ihre Spezifität ist zu gering um die Orientierung eines Transkripts eindeutig und sicher definieren zu können.

Dies bedeutet, sowohl für die Realtime PCR, als auch für die PCR mit anschließender Gelelektrophorese, dass ein schwaches PCR-Signal zum einen für ein schwach exprimiertes Transkript in Leserichtung stehen kann, als auch, zum anderen, für ein stark exprimiertes Transkript, in umgekehrter Orientierung und dass, trotz des genspezifischen Umschriebs, „fehlerhaftes Priming“ vorliegt. Eine Möglichkeit, dennoch eine Aussage über die Orientierung eines Transkripts zu treffen ist, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, der Vergleich verschiedener Muster fehlerhaften Primings für eine bestimmte Sequenz.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die genspezifische reverse Transkription kein ausreichend spezifisches Verfahren ist um die Orientierung einer Sequenz sicher festlegen zu können. Verantwortlich dafür ist das „fehlerhafte Priming“, sowohl durch eine falsche Primer-Bindung, als auch durch endogenes Priming.

Es konnte gezeigt werden, dass die Strangspezifität der reversen Transkription vom verwendeten Enzym abhängig ist. Mit der reversen Transkriptase SuperScript III und einem veränderten Protokoll konnten deutlich spezifischere

3. Ergebnisse

Umschriebe durchgeführt werden. Einen gewissen Einfluss wird auch den verwendeten Primern und der verwendeten Priming-Strategie zugerechnet. Hingegen ist der Einfluss der RNA-Zielsequenz sehr gering.

Um dennoch mittels der genspezifischen reversen Transkription eine Aussage über die Orientierung eines Transkripts treffen zu können, wird eine quantitative Realtime PCR im Anschluss an die reverse Transkription durchgeführt, die verschiedene Zielsequenzen und Primer beachtet. So wird eine Quantifizierung des endogenen Primings ermöglicht, was dann auf die Orientierung eines Transkripts schließen lässt.

3.3 Vollständige Charakterisierung der aHIF-Sequenz

Nachdem nun also die Orientierung von aHIF auch experimentell bestätigt werden konnte, bleibt noch der, aus bioinformatischen Analysen (siehe Kapitel 3.1), entstandene Verdacht, dass eine tatsächliche Antisense RNA zu HIF-1 α deutlich länger sein könnte, als die bisher von Thrash-Bingham und Tartof, 1999 beschriebene Sequenz.

Dabei wird die Lage des 5'-Endes in Zusammenhang mit einer CpG-Insel vermutet, das 3'-Ende scheint polyadenyliert zu sein.

3.3.1 Etablierung einer reversen Transkription mit anschließender PCR zur Amplifikation von aHIF

Zunächst wurde versucht die vollständige Sequenz von aHIF mit Hilfe der reversen Transkription und der sich anschließenden PCR zu amplifizieren und im Anschluss zu sequenzieren. Die Lage des 5'-Endes wird dabei im Zusammenhang mit der CpG-Insel vermutet, die Lage des 3'-Endes wird in Zusammenhang mit einem Poly(A)-Schwanz vermutet.

Es wurde eine reverse Transkription mit der reversen Polymerase M-MLV und Random Hexamer Primern für verschiedene Zellen, PBMCs, Erythroleukämiezellen und THP-1 Zellen, durchgeführt.

Für die sich anschließende PCR wurden, ausgehend von der vermuteten Lage und Länge der Sequenz und ausgehend von der bereits bekannten und beschriebenen Sequenz U85044, die im Bereich zwischen der 3'-UTR von HIF-1 α und der CpG-Insel liegt, Primer gesucht.

Zunächst wurde die Lokalisation der Primer so gewählt, dass ausgehend von der bekannten Sequenz U85044 in Richtung der CpG-Insel amplifiziert wurde. Es wurde das Primer-Paar aHIF -292 und -2045 verwendet. Der Primer aHIF -292 liegt im Bereich eines stark konservierten Abschnitts der Sequenz U85044,

3. Ergebnisse

während der Primer aHIF -2045 im Bereich zwischen dem bisher angenommenen Ende von aHIF und der CpG-Insel liegt.

Die Lokalisation der Primer ist Abbildung 16 zu entnehmen, ihre Orientierung und Nukleinsäuresequenz ist Tabelle 2 zu entnehmen.

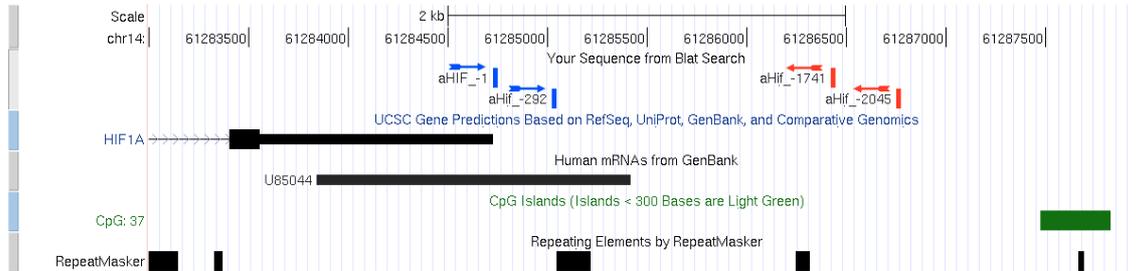


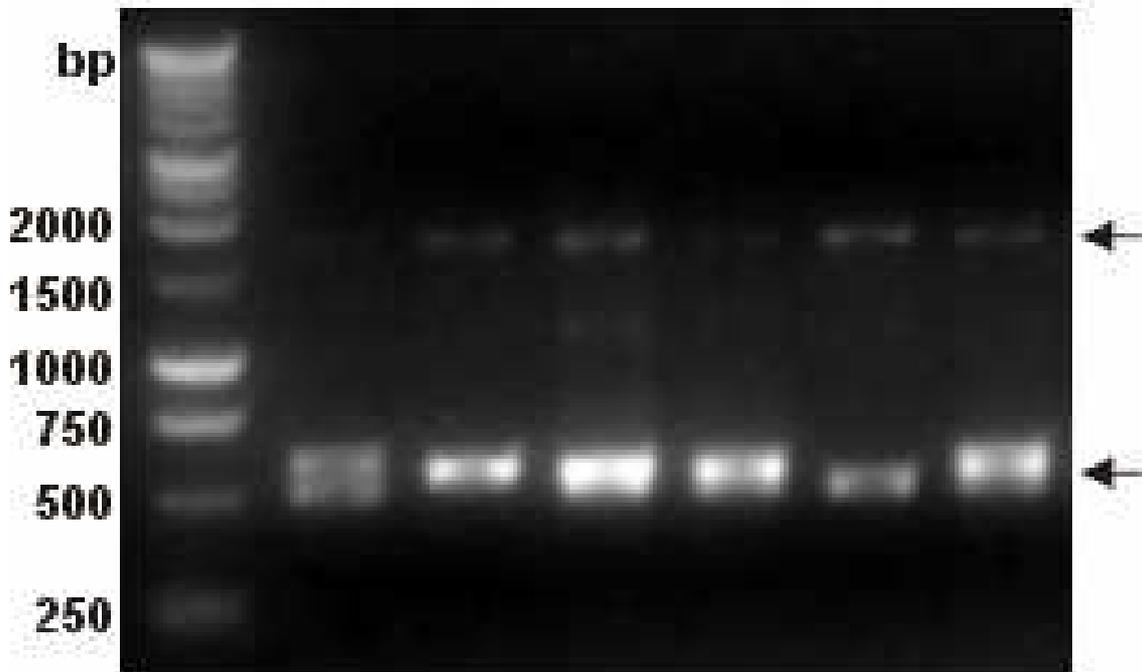
Abbildung 16 zeigt die Lokalisation der für die folgenden Versuche verwendeten Primer. Primer, die „forward“ orientiert sind, sind blau gekennzeichnet, Primer, die „revers“ orientiert sind, sind rot markiert.

Ersichtlich ist das 3'-Ende und die 3'-UTR von HIF-1 α (schwarz), sowie darunter die Sequenz U85044. Pfeile zeigen die Richtung einer Sequenz vom 5'-Ende zum 3'-Ende an, Balken stehen für Exons. Den Exons entsprechende schmalere Balken repräsentieren nicht translatierte Abschnitte einer Sequenz.

Außerdem ist in dieser Abbildung eine CpG-Insel gezeigt (grün markiert). Die Zeile „RepeatMasker“ zeigt das Ergebnis eines Programms an, mit dem repetitive Elemente einer Nukleotidsequenz für eine detailliertere Analyse ermittelt werden können [3].

3. Ergebnisse

Die PCR wurde mit der HotStarTaq DNA Polymerase und 35 Zyklen durchgeführt, die anschließende Gelelektrophorese zeigt folgendes Ergebnis:



Die Abbildung 17 zeigt das Ergebnis der reversen Transkriptase mit M-MLV reverser Transkriptase, Random Hexamer Primern und verschiedenen Zellen als Ausgangsmaterial, die anschließende PCR mit der HotStarTaq Polymerase und den Primern aHIF -292 und -2045 und der Gelelektrophorese.

Linie 1 zeigt den standardisierten Längenmarker. Für die Linien 2 und 3 wurde als Ausgangsmaterial ein cDNA-Pool aus PBMC Zellen verwendet, für die Ergebnisse in den Linien 4 und 5 ein cDNA-Pool aus Erythroleukämiezellen und für die Linien 6 und 7 ein cDNA-Pool aus THP-1 Zellen.

Aus der Abbildung ersichtlich werden zum einen Banden mit einer stärkeren Intensität von ungefähr 500 bis 750 Basenpaaren und schwächere Banden einer Länge zwischen 1500 und 2000 Basenpaaren.

Erwartet wird aufgrund der Lokalisation für das verwendete Primer Paar ein Endprodukt von 1753 Basenpaaren. Aus der Abbildung sind jedoch Doppelbanden ersichtlich, dies bedeutet, dass während der PCR zwei Produkte, ein kürzeres und ein längeres, amplifiziert wurden.

3. Ergebnisse

Das Produkt mit der Basenpaarlänge zwischen 500 und 750 Basenpaaren weist eine deutlich stärkere Intensität der Banden auf, als das Produkt mit der Basenpaarlänge zwischen 1500 und 2000 Basenpaaren.

Aufgrund der erwarteten Länge für das amplifizierte Endprodukt muss man davon ausgehen, dass die Banden mit der geringeren Intensität die tatsächlich gesuchte Sequenz darstellen und es sich bei den kürzeren Fragmenten um ein Artefakt handelt. Außerdem ist eine schwankende Intensität der Banden zwischen den verschiedenen verwendeten Zellmaterialien ersichtlich. Dies deutet auf eine unterschiedliche Expression der untersuchten Sequenz in den verschiedenen Zellarten hin. Es bieten sich verschiedene Erklärungsmöglichkeiten, am wahrscheinlichsten erscheint das Vorliegen einer kürzeren Sequenz zwischen den beiden verwendeten Primern. Diese kann zum einen durch das Vorliegen einer gespleißten Variante, als auch durch das Vorliegen einer Sekundärstruktur erklärt werden, die zu einer problematischen reversen Transkription und damit zu einem fehlerhaften, zu kurzen, Umschrieb führt.

Bei der Sequenzierung des erhaltenen kürzeren Produktes konnten keine Hinweise auf eine Spleißstelle gefunden werden.

Aufgrund der ebenfalls amplifizierten längeren Sequenzen, deren Länge dem gesuchten Transkript von aHIF entspricht, kann man annehmen, dass eine Sequenz vorhanden ist, die vollständig zwischen dem Primer -292 und -2045 liegt und deren Sekundärstruktur die reverse Transkription behindert.

Um ein spezifischeres Ergebnis der PCR zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein verändertes Protokoll verwendet, durch das Sekundärstrukturen aufgelöst werden können.

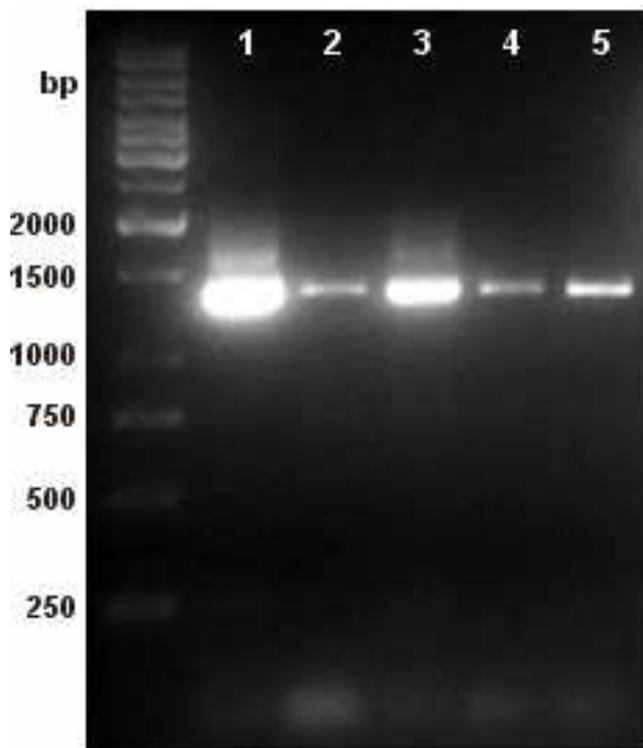
Dazu wurde die reverse Transkriptase SuperScript III verwendet, sowie das Chaperon T4gp32. Die reverse Transkription wurde mit RNA aus verschiedenen Zellarten, Erythroleukämiezellen und THP-1 Zellen, durchgeführt. Als Primer wurden die genspezifischen Primer aHIF -1, aHIF -2045 und Oligo(dT) Primer verwendet.

3. Ergebnisse

Anschließend an die, mit diesem veränderten Protokoll, durchgeführte reverse Transkription wurde eine PCR mit der ReproFast Polymerase, 38 Zyklen, und den Primern aHIF -292 und -1741 durchgeführt. Die Lokalisation der Primer ist Abbildung 16 zu entnehmen, ihre Orientierung und Nukleotidsequenz der Tabelle 2.

Der in dieser PCR amplifizierte Abschnitt liegt, wie bereits bei der vorangegangenen PCR, im Bereich zwischen der 3'-UTR von HIF-1 α und der CpG-Insel. Das zu erwartende Transkript ist 1449 Basenpaare lang.

Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der im Anschluss an die PCR durchgeführten Gelelektrophorese.



Die Abbildung 18 zeigt das Ergebnis der PCR mit der ReproFast Polymerase und den Primern aHIF -292 und -1741 und die anschließende Gelelektrophorese. Dem voraus ging die reverse Transkription mit der SuperScript III reversen Transkriptase, den Primern aHIF -1 und -2045 und dem Chaperon T4gp32.

3. Ergebnisse

Die vorderste Linie zeigt den standardisierten Längenmarker. Für die Linien 1, 2 und 3 wurde als Ausgangsmaterial Erythroleukämiezellen verwendet, für die Ergebnisse in den Linien 5 und 6 THP-1 Zellen.

Für den Versuchsansatz in Linie 1 und 5 wurde eine genspezifische reverse Transkription mit dem Primer aHIF -1 durchgeführt, für Linie 2 ein genspezifischer Umschrieb mit dem Primer aHIF -2045. Linie 3 und 4 zeigen die reverse Transkription mit Oligo(dT) Primern.

Aus der Abbildung ersichtlich werden Banden mit einer ungefähren Länge von 1450 Basenpaaren.

Die aus der obigen Abbildung ersichtlichen Banden haben eine Länge von ungefähr 1450 Basenpaaren und entsprechen damit dem gesuchten Transkript. Durch das veränderte Protokoll konnte folglich ein spezifischeres Ergebnis erzielt werden. Die Vermutung, dass es sich bei dem in Abbildung 17 ersichtlichen kürzeren Transkript um ein Artefakt handelt, konnte bestätigt werden.

Die Intensität der Banden ist je nach verwendetem Zellmaterial und durchgeführtem genspezifischem Umschrieb verschieden, dies deutet auf eine unterschiedliche Expression der untersuchten Sequenz in verschiedenen Zellarten und eine unterschiedliche Spezifität der genspezifischen Umschriebe hin.

So zeigen Erythroleukämiezellen eine deutlich stärkere Expression als THP-1 Zellen.

Zum anderen zeigt sich die tatsächliche Spezifität der genspezifischen Umschriebe. So ist der in Linie 2 für die genspezifische reverse Transkription verwendete Primer „falsch“ für die anschließend durchgeführte Amplifizierung mittels PCR. Die Intensität dieser Bande muss dem „fehlerhaften Priming“ zugerechnet werden.

Es zeigt sich jedoch auch ein deutlicher Intensitätsunterschied zwischen den Linien 1 und 3, was dafür spricht, dass die genspezifische reverse Transkription tatsächlich spezifischer ist und quantitativ zu mehr Produkt führt.

3. Ergebnisse

Die im obigen Versuch durchgeführte PCR wurde mit einem Primer durchgeführt, der ein kürzeres Template, als in der ersten durchgeführten PCR, amplifizierte.

Um sich der exakten Länge der Sequenz von aHIF weiter zu nähern wurde nun versucht, mit Hilfe des verbesserten Protokolls für die reverse Transkription, auch das längere Template zu amplifizieren.

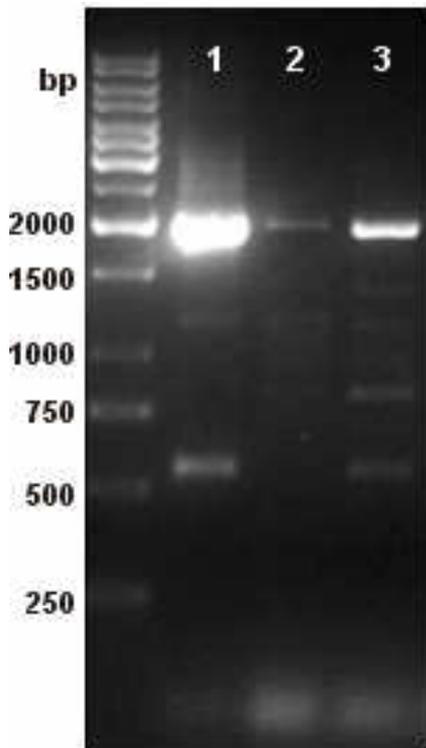
Es wurde eine reverse Transkription mit der reversen Transkriptase SuperScript III Polymerase und dem Chaperon T4gp32 durchgeführt. Verwendet wurde RNA aus Erythroleukämiezellen und verschiedene Primer, aHIF -1, aHIF -2045 und Oligo(dT) Primer. Anschließend wurde eine PCR mit den Primern aHIF -1 und -2045 durchgeführt.

Für die PCR wurde die ReproFast Polymerase verwendet und 38 Zyklen durchgeführt. Die Lokalisation der Primer ist Abbildung 16 zu entnehmen, ihre Orientierung und Nukleotidsequenz Tabelle 2.

Das zu erwartende Transkript ist 2044 Basenpaare lang.

3. Ergebnisse

Auf der Abbildung 19 ist das Ergebnis der nachfolgenden Gelelektrophorese abgebildet:



Die Abbildung 19 zeigt das Ergebnis der mit den Primern aHIF -1 und -2045 durchgeführten PCR und anschließenden Gelelektrophorese. Für die PCR wurde die ReproFast Polymerase verwendet. Dem voraus ging jeweils die reverse Transkription mit der SuperScript III reversen Transkriptase und dem Chaperon T4gp32. Für alle Versuche wurden Erythroleukämiezellen verwendet. Die vorderste Linie zeigt den standardisierten Längenmarker. Für den Versuchsansatz in Linie 1 wurde eine genspezifische reverse Transkription mit dem Primer aHIF -1 durchgeführt, für Linie 2 ein genspezifischer Umschrieb mit dem Primer aHIF -2045. Linie 3 zeigt die reverse Transkription mit Oligo(dT) Primern.

Aus der Abbildung ersichtlich werden Banden mit einer ungefähren Länge von 2000 Basenpaaren. Die Intensität der Banden ist, je nach den für die reverse Transkription verwendeten Primern, verschieden.

3. Ergebnisse

Das vorliegende Ergebnis zeigt Banden starker Intensität mit einer Basenlänge von etwa 2000 Basenpaaren, dies entspricht dem erwarteten Ergebnis und legt damit die Transkription des vollständigen Templates nahe.

Allerdings zeigen sich in der vorliegenden Gelelektrophorese auch weitere, deutlich intensitätsschwächere Banden. Diese weisen daraufhin, dass, außer dem beabsichtigt amplifizierten Abschnitt, auch einige kürzere Fragmente vorliegen, die durch den durchgeführten Umschrieb und die anschließende PCR produziert wurden.

Dabei kann es sich um Artefakte handeln, um „fehlerhaftes Priming“, um vorliegende kürzere Sequenzen zwischen den verwendeten Primern, sowie weitere - nicht vollständig transkribierte - Sekundärstrukturen.

Das vorliegende Bild der Gelelektrophorese zeigt die Bande mit der stärksten Intensität für den genspezifischen Umschrieb mit aHIF -1. Auch der Umschrieb mit Oligo(dT) Primern zeigt eine intensitätsstarke Bande. Das quantitativ und qualitativ schlechteste Ergebnis wurde mit dem genspezifischen Primer aHIF-2045 erzielt.

Das Ergebnis zeigt eindeutig, dass die genspezifische reverse Transkription für aHIF mit dem Primer aHIF -1 das spezifischste Ergebnis mit den geringsten Artefakten erzielt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Sequenz von aHIF vermutlich eine Sekundärstruktur aufweist, die für die reverse Transkription hinderlich ist.

Die Etablierung eines verbesserten Protokolls für die reverse Transkription mit der reversen Transkriptase SuperScript III und dem Chaperon T4gp32 ist entscheidend um auch Templates mit schwieriger Sekundärstruktur vollständig umschreiben zu können.

Aus den durchgeführten Versuchen wird ersichtlich, dass die Sequenz von aHIF deutlich länger ist, als bisher beschrieben wurde. So reicht ihr 5'-Ende sicher mindestens bis zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer -2045.

3. Ergebnisse

3.3.2 Bestimmung des 5' -Endes von aHIF

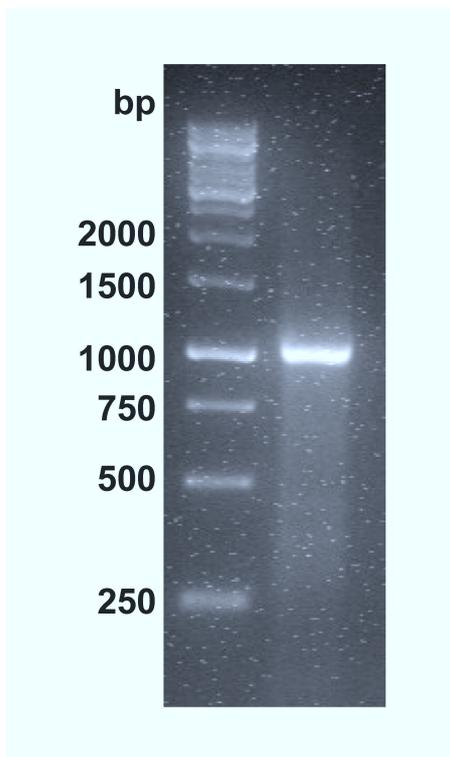
Aus den vorangegangenen Analysen ergab sich der Verdacht, dass das 5'-Ende der Sequenz aHIF im Zusammenhang mit der bioinformatisch ermittelten CpG-Insel liegt, die als Promotorbereich für die Sequenz fungieren könnte. Im nachfolgenden Teil wird das 5'-Ende der Sequenz experimentell bestätigt.

3.3.2.1 5'-RACE PCR

Um experimentell das 5'-Ende der Sequenz aHIF zu ermitteln, das vermutlich in Zusammenhang mit einer CpG-Insel steht, wurde in der vorliegenden Arbeit die molekularbiologische Methode der 5'-RACE PCR verwendet.

Die CpG-Insel gilt als mögliches Regulationselement, genauer als Promotor, für die Sequenz aHIF.

Zur Durchführung der 5'-RACE PCR wurde der aus Abbildung 22 ersichtlichen Primer aHIF -1748. verwendet. Sie führt zu folgendem Ergebnis.



Die Abbildung 20 zeigt das Ergebnis der 5'-RACE PCR und der nachfolgenden Gelelektrophorese. In Linie 1 ist der standardisierte Längenmarker gezeigt, Linie 2 zeigt eine deutliche Bande bei 1000 Basenpaaren.

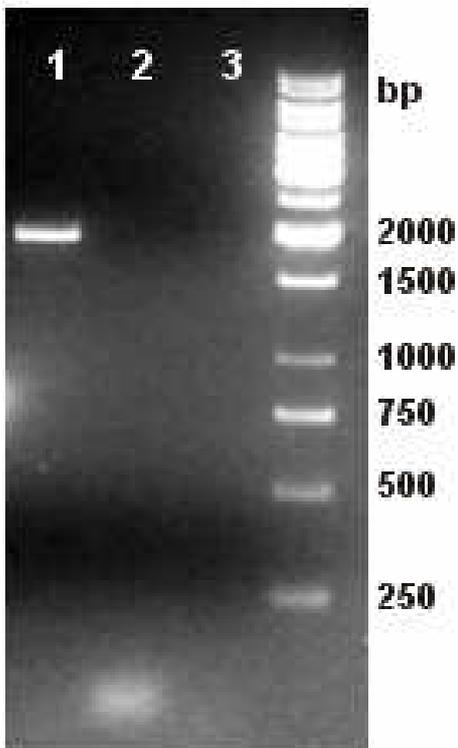
3. Ergebnisse

Aufgrund des verwendeten Primers wurde eine Länge des erhaltenen Produktes von 1000 Basenpaaren erwartet, wie aus der Abbildung ersichtlich, wurde dieses erreicht. Es wurde ein Produkt ausgehend von der bekannten Sequenz von aHIF bis zum Beginn der CpG-Insel erzielt. Damit konnte das 5'-Ende der Sequenz experimentell bestätigt werden.

Liegt tatsächlich eine RNA vor, die die angenommene Länge der Sequenz aHIF hat, so muss diese auch mittels der PCR bestätigt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb, anschließend an die 5'-RACE PCR, weitere PCRs mit verschiedenen Primern, die verschiedene Abschnitte der Sequenz von aHIF in Richtung der CpG-Insel amplifizieren, durchgeführt. Für die PCR wurde die ReproFast Polymerase verwendet.

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese im Anschluss an die PCR mit Erythroleukämiezellen und den Primern -931 und -2891, -931 und -2932 und -931 und -2977. Die Sequenz der verwendeten Primer ist Tabelle 2 zu entnehmen.



3. Ergebnisse

Die Abbildung 21 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese im Anschluss an die PCR mit ReproFast Polymerase und Erythroleukämiezellen.

In Linie 1 ist das Ergebnis der PCR mit den Primern -931 und -2891 gezeigt, in Linie 2 das Ergebnis mit den Primern -931 und -2932 und in Linie 3 mit den Primern -931 und -2977. Linie 4 zeigt den standardisierten Längenmarker.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass nur mit dem Primer Paar -931 und -2891 ein Ergebnis erzielt werden konnte. Die Größe dieser Bande entspricht mit einer Basenpaarlänge von etwa 2000 Basenpaaren dem erwarteten Ergebnis von 1960 Basenpaaren.

Aus der vorliegenden PCR lässt sich schließen, dass die beiden anderen Primer nicht mehr innerhalb der transkribierten aHIF Sequenz liegen.

Man kann also davon ausgehen, dass sich das 5'-Ende von aHIF in der Gensequenz zwischen den Primern -2891 und -2932 befindet, damit reicht es bis zum Beginn der CpG-Insel und legt diese als Transkriptionsstartpunkt fest.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Transkriptionsstartpunkt der Sequenz aHIF im Bereich der CpG-Insel liegt.

3.3.3 Bestimmung des 3'-Endes von aHIF

Nachdem im vorangegangenen Kapitel nachgewiesen werden konnte, dass die Sequenz von aHIF deutlich länger ist, als bislang angenommen, wurde nun das 3'-Ende dieser Sequenz gesucht. Die Suche erfolgte zunächst bioinformatisch und wurde anschließend experimentell bestätigt.

3.3.3.1 Bioinformatische Suche nach dem Poly(A)-Signal

Zu den posttranskriptionellen Modifizierungen der RNA gehört unter anderem die Polyadenylierung an ihrem 3'-Ende. Das bedeutet, es liegt ein so genanntes Poly(A)-Signal vor, das das Anhängen eines Poly(A)-Schwanzes aus ungefähr 30 bis 200 Adeninen vermittelt.

Das bioinformatische Auffinden eines solchen Poly(A)-Signals in einer Sequenz deutet auf ihre Polyadenylierung und damit auf ihr 3'-Ende hin.

Es war also für die vorliegende Arbeit nahe liegend zunächst auf bioinformatischem Weg nach einem Poly(A)-Signal zu suchen um das 3'-Ende zu charakterisieren.

Aus der bisherigen Charakterisierung der Sequenz von aHIF lässt sich vermuten, dass ihr 3'-Ende überlappend zum Bereich der 3'-UTR von HIF-1 α lokalisiert ist.

Eine Möglichkeit zur bioinformatischen Suche nach möglichen Poly(A)-Signalen ist mit dem Programm ERPIN gegeben.

Für die Analyse wurde der Strang in negativer Orientierung verwendet, ERPIN gab die Position des ermittelten Poly(A)-Signals vom 224. bis zum 275. Basenpaar an, diese Position ergibt die Sequenz:

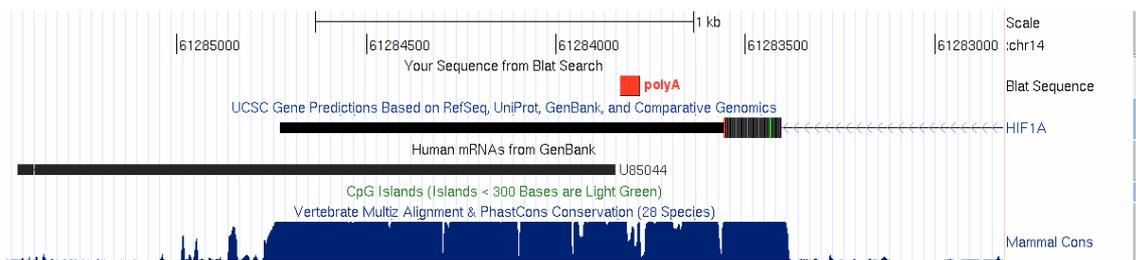
```
AATAAA.AAGGTG.CATTTTTTAAAATGATGC.TACTGCAATGCA.ATGGTTTAA  
AA
```

Der von ERPIN für diese Sequenz ermittelte Score beträgt 12,47, der zu erwartende Wert E-value = 7,60e-04. Dies ist ein statistischer Wert, der die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der diese Sequenz bei der Datenbanksuche zufällig angetroffen wird.

3. Ergebnisse

Die von ERPIN ermittelten Werte sind stark signifikant für ein Polyadenylierungssignal.

Ein vermutetes 3'-Ende von aHIF ist also mit großer Wahrscheinlichkeit polyadenyliert. Die bioinformatische Suche nach dem zugehörigen Poly(A)-Schwanz ergibt die aus der folgenden Abbildung ersichtliche Position:



Die Abbildung 22 zeigt rot markiert die Lage eines Poly(A)-Schwanzes, der das vermutete 3'-Ende der Sequenz von aHIF markiert. In der Linie darunter ist die Position des 3'-Endes und der 3'-UTR von HIF-1 α eingezeichnet. Weiterhin darunter gezeigt ist die bisher beschriebene Sequenz für aHIF U85044. Pfeile zeigen dabei die Richtung einer Sequenz vom 5'-Ende zum 3'-Ende an, die Linien stehen für Introns, Balken für Exons. Den Exons entsprechende schmalere Balken repräsentieren nicht translatierte Abschnitte einer Sequenz. Außerdem zeigt die Abbildung in der Zeile „Mammal Cons“ die Summe der phylogenetischen Konservierung dieses Genomabschnittes an. Dabei zeigt ein Peak das Vorliegen einer Konservierung an, je höher der Peak, desto stärker ist die Konservierung ausgeprägt. Die maximale Höhe steht dabei für die maximale Konservierung [3].

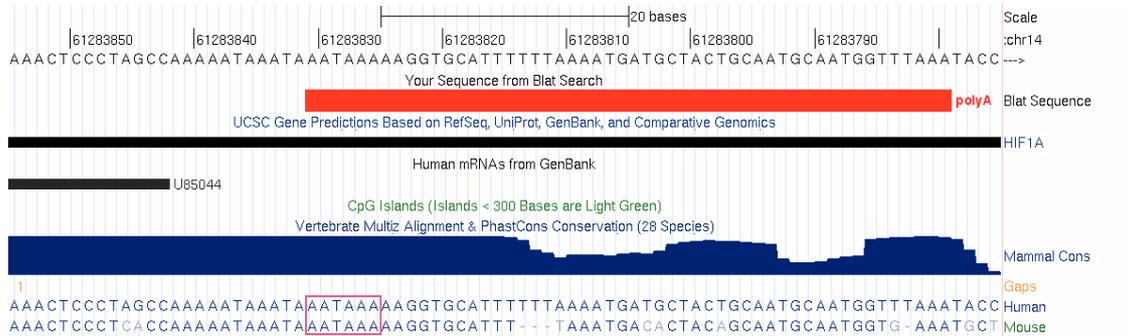
Aus der gezeigten Abbildung ersichtlich ist die Beziehung des ermittelten Poly(A)-Schwanzes sowohl zur 3'-UTR von HIF-1 α , wie auch zur bisher beschriebenen Sequenz von aHIF, U85044.

Demnach liegt der Poly(A)-Schwanz im Bereich der 3'-UTR von HIF-1 α und schließt sich an das 3'-Ende der bisher beschriebenen Sequenz von aHIF an.

Die phylogenetische Konservierung dieses Abschnittes deutet auf seine Bedeutung hin und unterstützt damit diese These.

3. Ergebnisse

Eine detailliertere bioinformatische Betrachtung der Lage des Poly(A)-Schwanzes führt zu folgender Abbildung:



Die Abbildung 23 zeigt rot markiert die Lage des ermittelten Poly(A)-Schwanzes, der das 3'-Ende von aHIF bildet. In der Linie darunter ist die 3'-UTR von HIF-1 α eingezeichnet. Weiterhin darunter gezeigt ist die beschriebene Sequenz für aHIF U85044. Die schwarzen Balken repräsentieren nicht translatierte Abschnitte einer Sequenz.

In der Zeile „Mammal Cons“ ist die Summe der phylogenetischen Konservierung dieses Genomabschnittes abgebildet, dabei zeigt ein Peak das Vorliegen einer Konservierung an, je höher der Peak, desto stärker ist die Konservierung ausgeprägt. Die maximale Höhe steht dabei für die maximale Konservierung.

Weiter unterhalb ist die Nukleotidsequenz des betrachteten Abschnittes aufgezeigt, in der ersten Zeile für das menschliche Genom, in der zweiten Zeile für das Genom der Maus. Rot umrandet ist das von ERPIN ermittelte Polyadenylierungssignal, das in gleicher Weise im Genom des Menschen und der Maus vorliegt [3].

Diese Abbildung zeigt in detaillierter Form den Bereich zwischen U85044 und dem ermittelten Poly(A)-Schwanz. Aus der Nukleotidsequenz ist das von ERPIN ermittelte Polyadenylierungssignal (rot umrandet) zu entnehmen.

In der Abbildung 23 wird gezeigt, dass dasselbe Polyadenylierungssignal auch im Genom der Maus vorliegt. Außerdem lässt sich seine maximale phylogenetische Konservierung erkennen, dies ist ein starker Hinweis auf seine tatsächliche Funktion und spricht gegen eine zufällige Sequenzfolge. Bislang

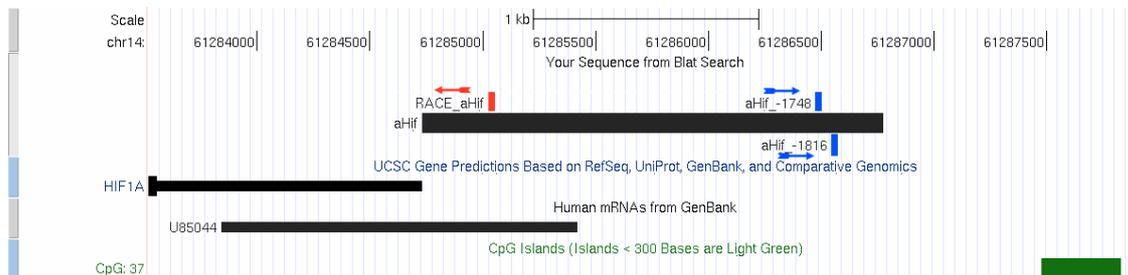
3. Ergebnisse

nicht als zu einem Transkript gehörend beschrieben ist die Sequenz zwischen dem Ende der Sequenz von U85044 und dem Poly(A)-Schwanz, die elf Basenpaare lang ist.

3.3.3.2 3'-RACE PCR

Nach der bioinformatischen Ermittlung des 3'-Endes von aHIF bleibt seine experimentelle Bestätigung. Eine Standardmethode der Molekularbiologie ist hierzu die Durchführung einer 3'-RACE PCR. Aufgrund der bioinformatischen Ergebnisse wird ein Poly(A)-Schwanz erwartet.

Für die Durchführung der 3'-RACE PCR wurde, neben dem speziellen Oligo(dT) Primer „3'RACE CDS Primer“ der genspezifische Primer RACE_aHIF verwendet, dessen Lokalisation folgender Abbildung 24 entnommen werden kann. Die Orientierung und Nukleotidsequenz dieser Primer kann Tabelle 2 entnommen werden.



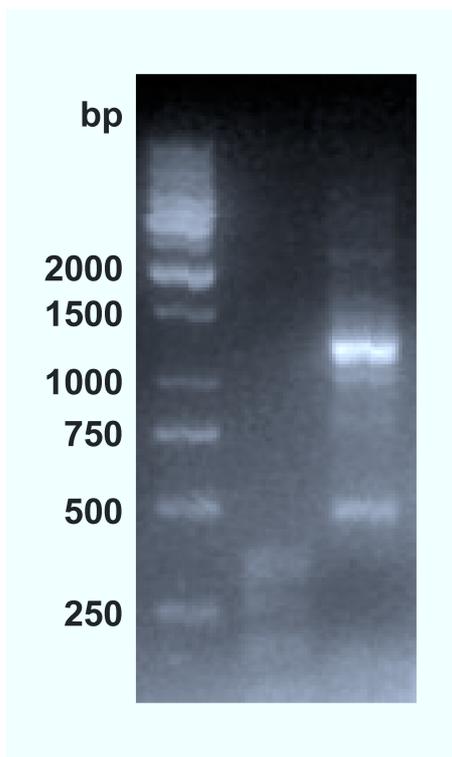
Die Abbildung 24 zeigt rot markiert den für die 3'-RACE PCR verwendeten genspezifischen Primer RACE_aHIF. Die blau markierten Primer wurden für die 5'-RACE PCR verwendet.

Darunter ist die Position der bislang in dieser Arbeit gezeigten Sequenz von aHIF gezeigt. Die nächste Zeile zeigt die Position des 3'-Endes und der 3'-UTR von HIF-1 α . Weiterhin gezeigt ist die beschriebene Sequenz für aHIF U85044. Die schmalen schwarzen Balken repräsentieren nicht translatierte Abschnitte einer Sequenz.

Aus dieser Abbildung zu entnehmen ist außerdem die Lokalisation einer CpG-Insel (grün) [3].

3. Ergebnisse

Die durchgeführte 3'-RACE PCR und die anschließende Gelelektrophorese führt zu folgendem Ergebnis:



Die Abbildung 25 zeigt das Ergebnis der 3'-RACE PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese. Linie 1 zeigt den standardisierten Längenmarker, Linie 3 zeigt neben Artefakten eine deutliche Bande bei etwa 1200 Basenpaaren.

Die Abbildung 25 zeigt eine deutliche Bande von ungefähr 1200 Basenpaaren Länge, dies entspricht der erwarteten Länge für den verwendeten Primer bis zum Poly(A)-Schwanz von 1175 Basenpaaren.

Die ebenfalls produzierten schwächeren Banden können zum einen Artefakte sein, zum anderen können sie durch andere, alternative Polyadenylierungssignale (wie zum Beispiel „ATAAA“), zustande gekommen sein, sie können für ein alternatives 3'-Ende der Sequenz von aHIF stehen.

Mit diesem Ergebnis konnte das 3'-Ende der Sequenz aHIF auch experimentell nachgewiesen werden. Das 3'-Ende von aHIF endet an der Position chr14:61283835

3. Ergebnisse

Aus den vorherigen Kapiteln lässt sich nun die genaue Länge der Natürlichen Antisense RNA zu HIF-1 α , aHIF genau beschreiben, sie reicht ausgehend von der CpG-Insel bis in den Bereich der 3'-UTR von HIF-1 α und ist an ihrem 3'-Ende polyadenyliert.

Aufgrund einer durchgeführten Sequenzierung lässt sich schließen, dass aHIF nicht gespleißt wird.

3.3.4 Aufklärung der Sekundärstruktur von aHIF

3.3.4.1 Mfold Analyse

Die Mfold Analyse ist ein thermodynamisches Modell, mit dem RNA analysiert werden kann, um eine Vorhersage über die Sekundärstruktur zu treffen.

Diese Vorhersage beruht auf dem „Zucker“-Algorithmus, der nach dem Prinzip der „Energy Minimization“ die vermutlich energetisch günstigste Sekundärstruktur für einsträngige Nukleinsäuren ermittelt.

Die Vorhersage der Sekundärstruktur mittels Mfold ergab folgende graphische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Sequenz von aHIF.

3. Ergebnisse

Output of sir_graph
by D. Stewart and M. Zuker

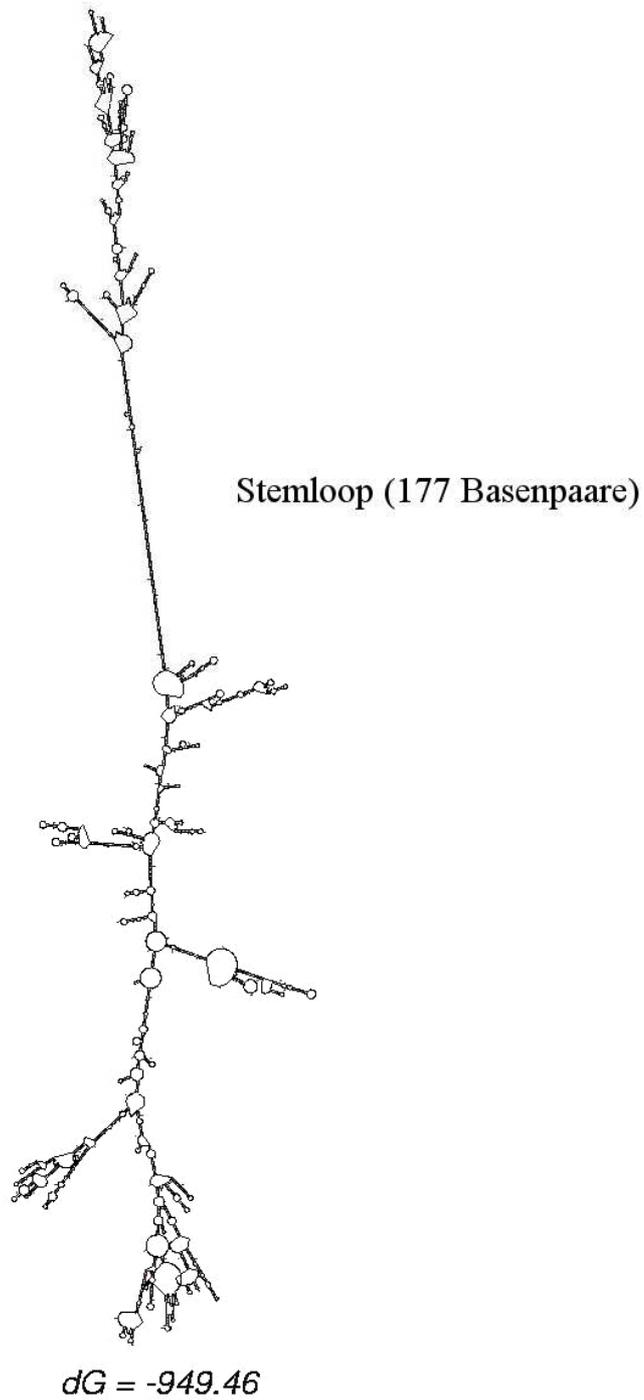


Abbildung 26 zeigt die durch Mfold ermittelte Sekundärstruktur der Sequenz von aHIF [1].

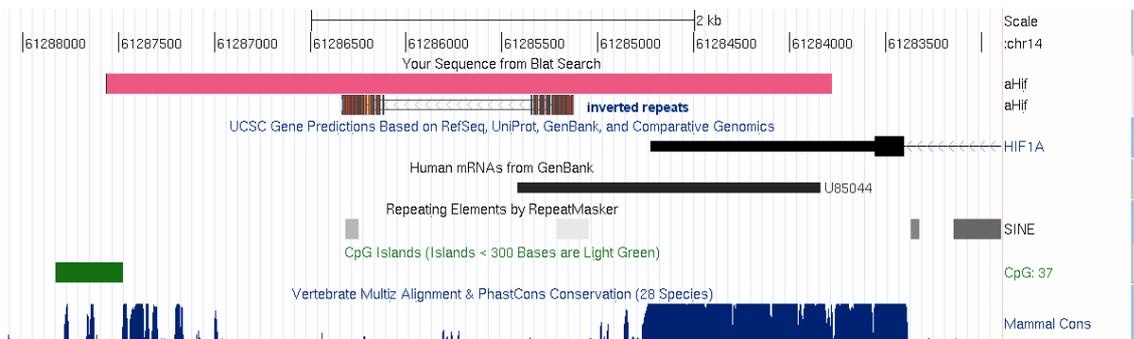
3. Ergebnisse

Diese graphische Darstellung zeigt, dass ein großer Anteil der Sequenz in der Lage ist, sich auf sich selbst zurückzufalten und eine Doppelhelix auszubilden. So kommt es zur Ausbildung der stark ausgeprägten Sekundärstruktur eines „Stemloops“.

Um diese Analyse des „Zucker-Algorithmus“ zu bestätigen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine weitergehende bioinformatische Analyse des aHIF Genlokus mittels USCS Genome Browser durchgeführt.

Mit Hilfe des USCS Genome Browsers können verschiedene Strukturen ausgemacht werden, die für die Ausbildung von Sekundärstrukturen von Bedeutung sind. Dazu gehören zum Beispiel „Inverted Repeats“, die zur Ausbildung solcher „Loops“ führen können.

In der folgenden Abbildung sind die bioinformatisch ermittelten Informationen zur Sekundärstruktur von aHIF abgebildet.



Die Abbildung 27 zeigt den Genomabschnitt für die Sequenz von HIF-1 α und aHIF.

Die bislang in dieser Arbeit ermittelte Sequenz für aHIF ist in der ersten Zeile rosa markiert, darunter sind „Inverted Repeats“ eingezeichnet. Für HIF-1 α ist das 3'-Ende und die 3'-UTR gezeigt, die darunter liegende Sequenz U85044 zeigt die von Thrash-Bingham und Tartof, 1999 beschriebene Sequenz von aHIF. Pfeile zeigen die Richtung einer Sequenz vom 5'-Ende zum 3'-Ende an, Linien stehen für Introns, Balken für Exons. Den Exons entsprechende schmalere Balken repräsentieren nicht translatierte Abschnitte einer Sequenz.

3. Ergebnisse

Gezeigt sind außerdem „SINE-Repeats“ (grau), die im Bereich der Sequenz aHIF liegen.

Außerdem sind der Abbildung die Lage der CpG-Insel und die phylogenetische Konservierung (Zeile „Mammal Cons“ zu entnehmen [3].

Aus der obigen Abbildung 27 ist die Lokalisation so genannter „SINE (Short Interspersed Nuclear Element) Repeats“ zu entnehmen, dies sind 100 bis 400 Basenpaar lange, häufig wiederholte DNA-Sequenzen. Im humanen Genom machen sie etwa 14% aus, sie werden zu den transponierbaren Elementen gerechnet und sind Retroposons.

Vermutlich sind sie grundlegend an der Ausbildung der Sekundärstruktur beteiligt.

„Inverted Repeats“, deren Lokalisation ebenfalls obiger Abbildung 27 zu entnehmen ist, sind Nukleotidsequenzen, die in invertierter Form zu einer anderen, weiter downstream gelegenen, Sequenz vorliegen. Sie stehen für Regionen, die in der Lage sind, mit sich selbst komplementär Basen zu paaren. Solche Nukleotidsequenzen können beispielsweise an den gegenüberliegenden Enden eines Transposons gefunden werden.

Dies legt in diesem Fall auch die Lokalisation von „SINE Repeats“ und „Inverted Repeats“ nahe.

„Inverted Repeats“ sind durch ihre Eigenschaft mit sich selbst Basen zu paaren in der Lage einen „Loop“ auszubilden.

Für die Nukleotidsequenz von aHIF konnten mit Hilfe des USCS Genome Browsers keine weiteren Elemente ausgemacht werden, die Hinweise auf eine mögliche Sekundärstruktur liefern.

Diese ermittelte Sekundärstruktur bietet eine Angriffsquelle für ADARs (Adenosine Deaminases Acting on RNA), dies sind RNA-Editing Enzyme, die bei doppelsträngig vorliegender RNA (dsRNA) Adenosine zu Inosinen deaminieren (A-to-I Editing).

3. Ergebnisse

3.3.4.2 A-to-I Editing

Wie bereits erwähnt können an doppelsträngige RNA (dsRNA) ADARs (Adenosine Deaminases Acting on RNA) angreifen, diese RNA-Editing Enzyme deaminieren Adenosine zu Inosinen, das so genannte A-to-I Editing.

Bei der reversen Transkription werden Inosine als Guanosine erkannt und entsprechend statt eines Thymins ein Cytosin umgeschrieben.

Rückwirkend lässt sich daher ein möglicherweise vorliegendes A-to-I Editing ermitteln, in dem man die cDNA Sequenz mit der entsprechenden genomischen Sequenz aligned.

Über dieses Alignment lässt sich wiederum auch noch einmal die Orientierung einer Sequenz bestätigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine reverse Transkription der Region mit „Inverted Repeats“ aus verschiedenen Geweben durchgeführt und die Produkte der anschließenden PCR sequenziert.

Im Anschluss wurde ein Alignment mit der entsprechenden genomischen Nukleinsäuresequenz durchgeführt.

3. Ergebnisse

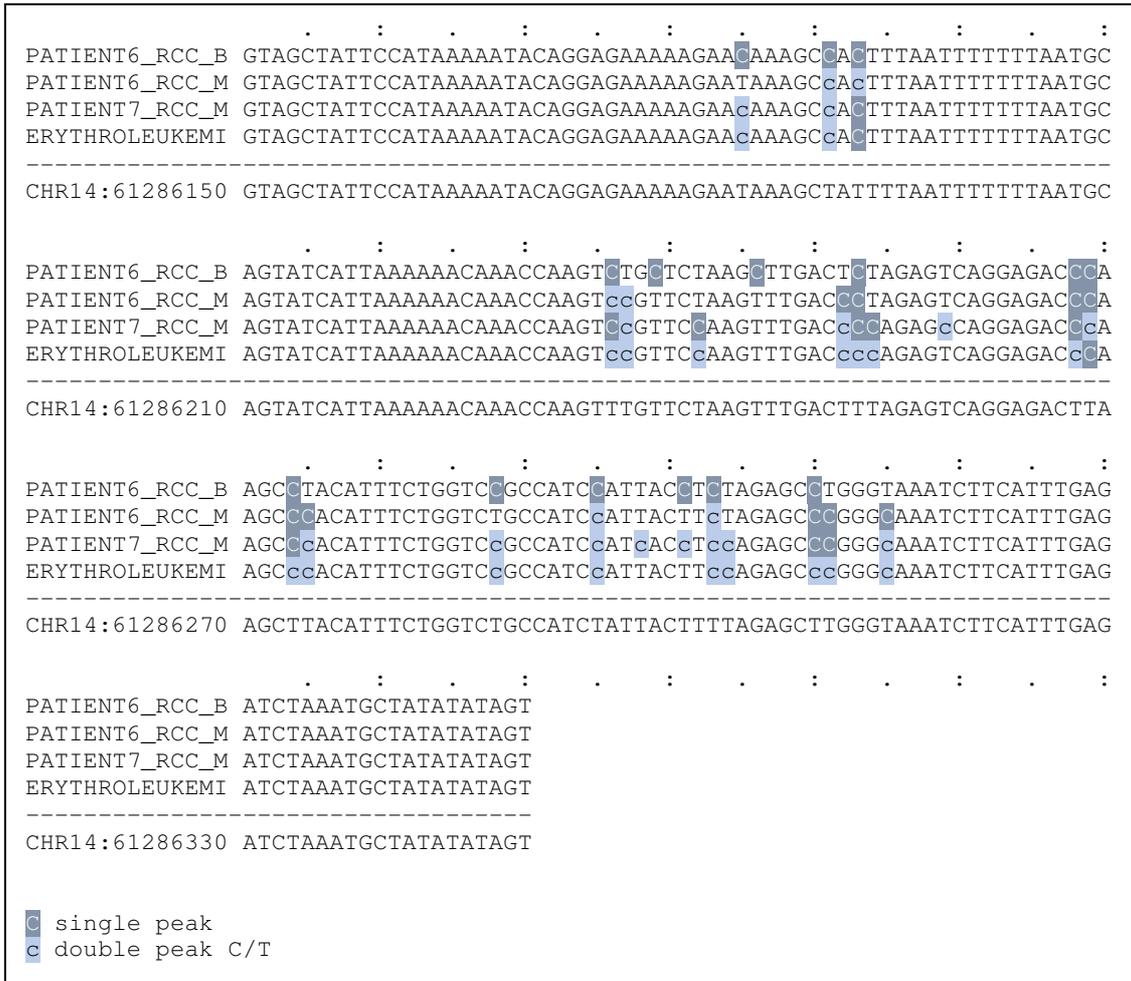


Abbildung 28 zeigt das Alignment zwischen benignen und malignen Geweben aus klarzelligen Nierentumoren, Erythroleukämiezellen und der genomischen Nukleinsäuresequenz. Für Patient 6 ist sowohl das Ergebnis der Sequenzierung von aHIF aus benignen (Linie 2), als auch aus malignen (Linie 3) Zellen gezeigt, für Patient 7 ist nur das Ergebnis der malignen Zellen (Linie 4) gezeigt. In Linie 5 ist das Ergebnis für Erythroleukämiezellen gezeigt. Linie 6 zeigt die genomische Nukleinsäuresequenz.

Dunkelgrau markiert sind Nukleotide, die einen einfachen Peak beim Alignment zeigten, Hellgrau markiert sind Nukleotide, die dabei einen doppelten Peak zeigten.

3. Ergebnisse

Aus der obigen Abbildung ersichtlich ist das Vorliegen von A-to-I Editing. Dabei zeigt eine dunkelgraue Markierung eines Nukleotids das Vorliegen eines einfachen Peaks an, die hellgraue Markierung eines Nukleotids zeigt das Vorliegen eines doppelten Peaks an, der auftritt, wenn bei PCR-Produkten nur ein Teil des ursprünglichen Transkripts dem A-to-I Editing unterliegt.

Es ist aus der obigen Abbildung 28 ersichtlich, dass es an bestimmten Stellen der Nukleinsäuresequenz zu einem A-to-I Editing kommt. Dabei ist auffällig, dass sich für alle Zellarten ein relativ homogenes Bild ergibt.

Da sich zeigte, dass die von Thrash-Bingham und Tartof, 1999 beschriebene Sequenz an ihrem 5'-Ende einige Unterschiede in der Nukleotidsequenz im Vergleich mit der genomischen Sequenz zeigte, kann man nun folgern, dass es sich vermutlich auch hierbei um A-to-I Editing handeln könnte. Deshalb wurde auch die Sequenz U85044 im Vergleich zu dem in dieser Arbeit beschriebenen aHIF in verschiedenen Zellarten untersucht.

Erythroleuk U85044	CTGAAGATTCTAATCTGTTCCCATTAACAGATTAATAAACTTAGACTTCAAATGAATAA
chr14:61285088	CTGAAGATTCTAATCTGTTCCCATTAACAGATTAATAAACTTAGACTTCAAATGAATAA
Erythroleuk U85044	TTTGCCCAAGCTTTAAAAGTAATAGATGGCAGACCAAAAATGCAAGCCCAAGTCTCCTGA
chr14:61285148	TTTGCCCAAGCTTTAAAAGTAATAGATGGCAGACCAAAAATGTAAGCTTAAGTTTCCTGA
Erythroleuk U85044	CTCCAAAGTCAAACCCAGAACAAACCTGGTTTGTGTTTTGTTTTAATGATACTGCGTTTTA
chr14:61285208	CTCTAAAGTCAAACCTAGAACAAATTTGGTTTGTGTTTTGTTTTAATGATACTGCGTTTTA
Erythroleuk U85044	AAACAAAGTAGCTTTATCCTTTTTCTCCTGTATTTTTCTTTTACAAAATAGCTGTATTTTC
chr14:61285268	AAACAAAGTAGCTTTATCCTTTTTCTCCTGTATTTTTCTTTTACAAAATAGCTGTATTTTC

Abbildung 29 zeigt das Alignment zwischen aHIF in Erythroleukämiezellen (Linie 1), der durch Thrash-Bingham und Tartof, 1999 beschriebenen Sequenz U85044 (Linie 2) und der genomischen Nukleinsäuresequenz (Linie 3).

3. Ergebnisse

Aus der obigen Abbildung ersichtlich ist, dass auch die von Thrash-Bingham und Tartof, 1999 beschriebene Sequenz für aHIF sich in ihrem 5'-Ende an den Stellen von der genomischen Sequenz unterscheidet, an der sich die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Sequenz für aHIF von der genomischen Sequenz unterscheidet und ein A-to-I Editing aufweist.

Es kann also gefolgert werden, dass die von Thrash-Bingham beschriebenen Unterschiede in ihrer Sequenz verglichen mit der genomischen Sequenz auf A-to-I Editing basieren.

3. Ergebnisse

3.3.5 Bioinformatische Untersuchung der aHIF Promotor Region

Zur weiteren Charakterisierung von aHIF stellt sich nun die Frage nach der Regulation. Bereits die durchgeführte 5'-RACE PCR zeigte, dass sich aufgrund der Lokalisation der Nukleinsäuresequenz von aHIF ein Zusammenhang mit einer CpG-Insel vermuten lässt. Eine solche Region kann als Promotor funktionieren. Eine Promotor-Region enthält Transkriptionsfaktorbindungsstellen, wie zum Beispiel eine TATA-Box oder im Falle von durch HIF regulierten Genen ein HRE (Hypoxia Response Element).

3.3.5.1 Promotor Analyse mittels MAPPER

MAPPER ist eine Plattform für die computergestützte Identifizierung von Transkriptionsfaktorbindungsstellen.

Aufgrund der Annahme, dass die, in der Nähe des 5'-Endes der Sequenz von aHIF lokalisierte, CpG-Insel eine grundlegende Rolle bei der Regulation von aHIF übernehmen könnte und als Promotor fungiert, wurde diese mittels MAPPER analysiert.

Diese bioinformatische Analyse ergab drei mögliche Sequenzen, die ein HRE (Hypoxia Response Element) darstellen könnten.

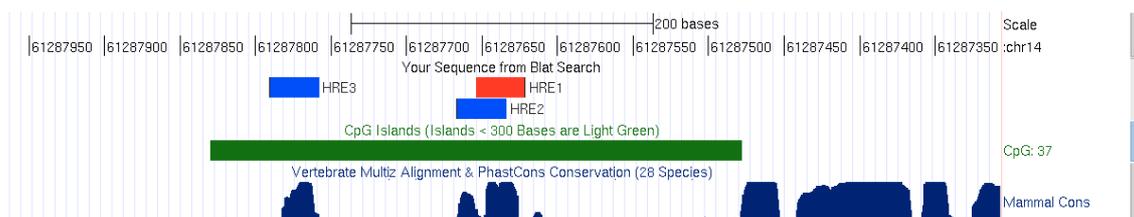


Abbildung 30 zeigt die Lokalisation der CpG-Insel, die am 5'-Ende von aHIF lokalisiert ist.

In den ersten drei Zeilen ist die Lokalisation der bioinformatisch ermittelten HRE-Sequenzen gezeigt (blau und rot markiert), in der Zeile darunter ist die CpG-Insel gezeigt (grün markiert). Außerdem ist die phylogenetische Konservierung dieses Sequenzabschnittes in der Zeile „Mammal Cons“ gezeigt [3].

3. Ergebnisse

Aus der gezeigten Abbildung 30 ist ersichtlich, dass die drei, durch MAPPER bioinformatisch ermittelten möglichen HRE-Sequenzen im Bereich der CpG-Insel liegen. Diese CpG-Insel scheint nicht vollständig phylogenetisch konserviert zu sein. Offensichtlich sind jedoch drei deutlich herausragende und stark phylogenetisch konservierte Abschnitte im Bereich der Lokalisation der bioinformatisch ermittelten HREs.

Zur Ermittlung und Bestätigung potentieller HREs wurde der „Pescador Score“ verwendet.

3.3.5.2 HRE Analyse mittels Pescador Score

Nachdem im Bereich der CpG-Insel drei mögliche HREs ausgemacht werden konnten, stellte sich die Frage, ob diese HREs tatsächliche HREs sind und als Bindungsstelle für HIF dienen können.

Um solche Sequenzen detaillierter untersuchen zu können, wurde der Pescador Score entwickelt, der die Spezifität von HREs ermittelt.

Für die drei in der bioinformatischen Analyse ermittelten HREs konnte ein positiver Pescador Score erzielt werden, dies bedeutet, dass hier mit großer Spezifität ein HRE vorliegt.

Allerdings wurde dieser Score für zwei der ermittelten HREs in Sense Orientierung ermittelt. In Abbildung 30 sind diese blau markiert. Beide zeigen einen hohen Score und sind damit hoch verdächtig ein HRE zu sein. Es gibt „bidirektionale Promotoren“, die sowohl in Sense, als auch in Antisense Orientierung als Promotor fungieren können. Geht man davon aus, dass es sich im Fall der gezeigten HREs in Sense Orientierung um bidirektionale Promotoren handelt, so gelten auch diese beiden HREs als Regulationselemente. Das dritte gezeigte HRE, in der Abbildung 30 rot gekennzeichnet, ist in Antisense Richtung orientiert.

Das Vorliegen dieser HREs deutet auf eine Regulation von aHIF durch HIF hin.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass das 3'-Ende der Sequenz aHIF sowohl bioinformatisch, als auch experimentell ermittelt werden konnte. Es handelt sich dabei um ein stark konserviertes Poly(A)-Signal, das im Bereich

3. Ergebnisse

der 3'-UTR von HIF-1 α lokalisiert ist und zum Anhängen eines Poly(A)-Schwanzes führt. Dies ist wiederum rückwirkend auch eine Bestätigung der antisense Orientierung dieser Sequenz.

Das 5'-Ende der Sequenz stellt die CpG-Insel dar, sie ist somit der Promotor und Transkriptionsstartpunkt. Außerdem enthält sie HREs, dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Regulation durch HIF.

Die genaue Länge des natürlichen Antisense Transkripts zu HIF-1 α , aHIF reicht ausgehend von der CpG-Insel bis in den Bereich der 3'-UTR von HIF-1 α . Sie beginnt inklusive der CpG-Insel an der Position chr14:61287475 und endet an der Position chr14:61283835. Damit ist die Sequenz 3640 Basenpaare lang.

Aufgrund einer durchgeführten Sequenzierung lässt sich schließen, dass aHIF nicht gespleißt wird.

Außerdem weist aHIF eine komplexe Sekundärstruktur auf, es bildet einen Stemloop und wird an den Stellen, an denen es als doppelsträngige Nukleinsäuresequenz vorliegt A-to-I editiert. Das Vorliegen des A-to-I Editings ist darüber hinaus ein weiterer Hinweis auf die antisense Orientierung der zugrunde liegenden RNA-Sequenz.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beschreibung einer Methode, mit der die Orientierung einer Nukleotidsequenz, auch bei Vorliegen von fehlerhaftem Priming und einer komplizierten Sekundärstruktur, definiert werden kann. Dazu gehörte unter anderem auch die Etablierung einer Realtime RT-PCR Methode zur Quantifizierung der Fehlerrate genspezifischer Umschriebe.

Dies wurde am Beispiel der Antisense RNA zu HIF-1 α , aHIF, gezeigt.

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Kenntnissen lässt sich feststellen, dass die genspezifische reverse Transkription kein ausreichend spezifisches Verfahren ist, um die Orientierung einer Sequenz sicher festlegen zu können. Verantwortlich dafür ist fehlerhaftes Priming, sowohl durch eine falsche Primer-Bindung, als auch durch endogenes Priming.

Es konnte gezeigt werden, dass die Strangspezifität der reversen Transkription von verschiedenen Einflussfaktoren abhängig ist. In der vorliegenden Arbeit wurde ein verändertes Protokoll entwickelt, das zusammen mit der reversen Transkriptase SuperScript III, den verwendeten Primern und der verwendeten Priming-Strategie zu einer deutlich spezifischeren reversen Transkription führt.

Um mittels der genspezifischen reversen Transkription eine Aussage über die Orientierung eines Transkripts zu treffen, wurde im Anschluss eine quantitative Realtime PCR mit verschiedenen Zielsequenzen und Primern durchgeführt. So kann eine Quantifizierung des endogenen Primings ermöglicht und auf die Orientierung eines Transkripts geschlossen werden. Die Orientierung der Sequenz aHIF in antisense Richtung konnte bestätigt werden.

Die weitere Charakterisierung von aHIF ergab ein Poly(A)-Signal an ihrem 3'-Ende und einen Poly(A)-Schwanz. Dieser ist im Bereich der 3'-UTR von HIF-1 α lokalisiert und phylogenetisch stark konserviert.

Das 3'-Ende von aHIF liegt an der Position chr14:61283835, das 5'-Ende konnte bis zur Position chr14:61287475 experimentell nachgewiesen werden.

4. Diskussion

Das 5'-Ende von aHIF ist charakterisiert durch eine CpG-Insel, die vermutlich die Promotor Region für aHIF darstellt. Die Regulation könnte dabei über HREs vermittelt werden, dies wäre ein Hinweis auf eine Regulation von aHIF durch HIF.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass aHIF eine komplexe Sekundärstruktur, einen Stemloop, ausbildet. An den Stellen, die als doppelsträngige Nukleinsäuresequenz vorliegen, wird aHIF A-to-I editiert. Das Vorliegen des A-to-I Editings ist darüber hinaus, ebenso wie das Auffinden eines Poly(A)-Schwanzes, ein weiterer Hinweis auf die antisense Orientierung der zugrunde liegenden RNA-Sequenz.

In der folgenden Abbildung 31 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

4. Diskussion

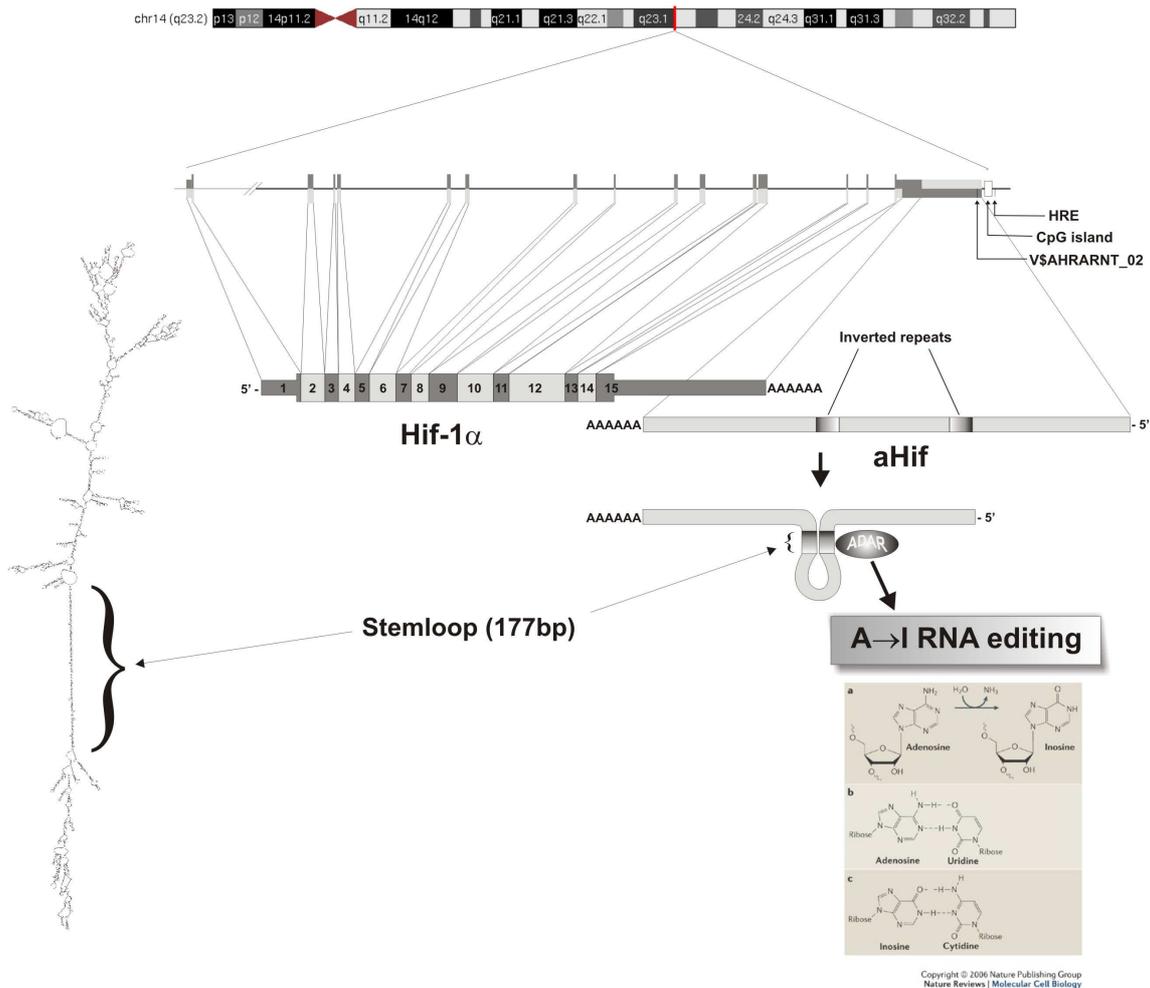


Abbildung 31 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse. Ganz oben gezeigt ist das Chromosom 14, auf dem HIF-1 α und aHIF lokalisiert sind. Die genaue Lokalisation ist mit einem roten Strich gekennzeichnet. Darunter ist schematisch HIF-1 α gezeigt, Balken zeigen Exons an, die Linien stehen für Introns. Am 3'-Ende gezeigt ist die Lokalisation der HRE und der CpG-Insel. Als nächstes folgt die Abbildung der gespleißten HIF-1 α Sequenz mit ihrer 5'-UTR, der 3'-UTR und dem Poly(A)-Schwanz. Die Zahlen 1 bis 15 bezeichnen die Exons. Es folgt die Sequenz von aHIF, die in Antisense Richtung zu HIF-1 α lokalisiert ist und an ihrem 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz trägt. Gezeigt sind auch die „Inverted Repeats“, die zur Sekundärstruktur führen, die darunter abgebildet ist. Detaillierter gezeigt ist das Ergebnis der Analyse der Sekundärstruktur mittels Mfold (links im Bild) und den Stemloop von 177 Basenpaaren. Auch der Ansatz von ADARs und dem folgenden A-to-I Editing ist rechts unten im Bild gezeigt.

4.2 Methode der reversen Transkription

4.2.1 Reverse Transkription

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich zunächst, dass für die Betrachtung von aHIF, beziehungsweise NATs im Allgemeinen, eine Methode etabliert werden muss, mittels derer eine verlässliche Aussage über die Orientierung einer Sequenz getroffen werden kann. Für die weitergehende Spezifizierung von antisense Transkription ist es von großer Bedeutung, die Orientierung eines Transkripts sicher definieren zu können. Es zeigte sich, dass die genspezifische reverse Transkription dafür kein ausreichend spezifisches Verfahren ist. Diese scheint, obwohl sie zu den Standardmethoden der molekularen Biologie zählt, noch nicht ausreichend verstanden zu sein und birgt einige Schwierigkeiten, die zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse und damit auch zu einer Fehlinterpretation der Orientierung einer Sequenz führen können [18, 132, 133]. Nach Stahlberg, A. (2004) [133] ist die reverse Transkription der unsicherste Schritt der Genexpressionsanalyse.

Das Phänomen der natürlichen antisense Transkription wurde bisher nur unzureichend erforscht. Bislang beschriebene NATs wurden nur zu einem geringen Anteil experimentell überprüft, auch ihre tatsächliche Orientierung wurde nur für einige wenige experimentell bestätigt. Vermutlich wurde für ungefähr 10 bis 20% der bei „UniGene“ notierten EST-Sequenzen die falsche Orientierung angegeben [159]. Es fehlt an glaubwürdigen „in silico“-Screenings, die mit relativer Sicherheit die richtige Orientierung eines Transkripts feststellen können, diese würden die Menge der angenommenen Antisense Transkription vermutlich deutlich senken.

Auf experimenteller Ebene gilt bislang die strangspezifische reverse Transkription als eine Standardmethode um die Orientierung eines Transkripts zu verifizieren. Verschiedene Studien verwendeten die strangspezifische reverse Transkription auch, um mit zufällig ausgewählten Sense-Antisense Paaren ihre Screening Strategie zu evaluieren [27, 29, 36, 42]. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen jedoch, dass das Verfahren der genspezifischen reversen Transkription nicht ausreichend spezifisch ist, um die

4. Diskussion

Orientierung einer Sequenz feststellen zu können. Sie ist damit auch nicht zur Evaluation dieser Screening-Strategien geeignet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage gestellt, wie spezifisch die genspezifische reverse Transkription tatsächlich ist und wie ihre Spezifität verbessert werden kann. Im Zuge dessen kam auch die Frage auf, ob die genspezifische reverse Transkription überhaupt ausreichend sein kann, um für die Orientierung eines Transkripts beweisend zu sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ihre Spezifität von allen beteiligten Faktoren abhängig ist. Eine Hauptrolle spielen die verwendeten Primer, das verwendete Enzym und das Protokoll der Durchführung.

Auch die Effizienz der verwendeten Primer und die Priming-Strategie haben Einfluss auf die Spezifität. Nicht zu vernachlässigen ist die RNA-Zielsequenz mit ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur, sowie die totale RNA-Konzentration [133].

Diese Einflussfaktoren müssen bei der Durchführung der genspezifischen reversen Transkription beachtet werden. Es muss angemerkt werden, dass diese Faktoren nicht isoliert voneinander agieren, sondern sich immer auch gegenseitig beeinflussen. Daher ist es notwendig, ein möglichst optimales Zusammenspiel dieser Faktoren, für jeden durchzuführenden Versuch, herauszufinden. Entscheidend für die Spezifität der genspezifischen reversen Transkription ist die Ermittlung des am besten geeigneten Protokolls, der Primer und der reversen Transkriptase entsprechend des zu amplifizierenden Zielgens [133].

Eine Aufgabe in der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss dieser Faktoren möglichst zu minimieren und somit eine optimale, wenn auch nicht absolute, Spezifität für die Ermittlung der Orientierung von aHIF sicherzustellen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Strangspezifität der reversen Transkription vom verwendeten Enzym abhängig ist.

Es wurden verschiedene Enzyme getestet, letztlich zeigten sich mit der reversen Transkriptase SuperScript III die besten Ergebnisse mit der geringsten Produktion von Artefakten im Hintergrund, mit dieser reversen Polymerase

4. Diskussion

konnten auch Stahlberg, A. (2004) [132] die zuverlässigsten Ergebnisse erzielen. Es ist zu beachten, dass auch die Spezifität der Polymerasen wiederum von anderen Faktoren abhängig ist. Die unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen reversen Polymerasen machen es erforderlich, je nach verwendetem Primer, Protokoll und Zielgen, unterschiedliche Polymerasen zu testen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass durch die Verwendung einer anderen Polymerase die Genspezifität gesteigert werden kann, es kann jedoch keine absolute Spezifität erzielt werden.

Die RNA-Zielsequenz lässt sich im Grunde genommen nur wenig beeinflussen und ihr Einfluss auf die Spezifität ist sehr gering. Beeinflussbar ist jedoch der Einfluss der Sekundär- und Tertiärstruktur der Zielsequenz, durch eine Erhöhung der Annealingtemperatur können diese aufgelöst werden.

Auf die Problematik der Sekundärstrukturen für die reverse Transkription wird in einem folgenden Kapitel eingegangen.

Das Protokoll zur Durchführung der genspezifischen reversen Transkription lässt Spielräume bei den verwendeten Temperaturstufen und ihrer Länge, die je nach verwendeter Polymerase, Transkript und Primern ausgetestet werden sollten.

Die RNA-Konzentrationen wurden in der vorliegenden Arbeit zu Beginn der Versuche angeglichen. Dies führte jedoch zu einer nicht der Realität entsprechenden Verzerrung der Quantität der RNA-Proben. Es darf also kein Rückschluss auf die RNA-Menge in verschiedenen Zellen beziehungsweise Zellkompartimenten gezogen werden.

Ein großes Problem der Methode der reversen Transkription ist das „fehlerhafte Priming“, sowohl durch eine falsche Primer-Bindung, als auch durch endogenes Priming. Dieser Einflussfaktor wurde in den vorliegenden Ergebnissen ausführlich untersucht und wird in Kapitel 4.2.2 gesondert besprochen.

Im Allgemeinen bleibt festzuhalten, dass es sich bei der reversen Transkription um ein sensibles Verfahren mit vielen Einflussfaktoren handelt. Die

4. Diskussion

Veränderung der Einflussfaktoren hat entscheidenden Einfluss auf die Spezifität der genspezifischen reversen Transkription. Es sollte daher für jede Versuchsreihe versucht werden, zunächst eine optimale Anpassung der Einflussfaktoren zu erreichen um dann mit dieser Minimierung von Störeinflüssen die genspezifische reverse Transkription durchzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Protokoll ermittelt, mit dem die Einflussfaktoren für die reverse Transkription von aHIF minimiert werden konnten.

4.2.2 Fehlerhaftes Priming

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass eine der Hauptschwierigkeiten für die Spezifität der genspezifischen reversen Transkription die Menge des „fehlerhaften Primings“ ist [11]. Diesem Einflussfaktor sollte daher besondere Beachtung geschenkt werden, unter anderem auch, um eine falsche Interpretation der Orientierung eines Transkripts zu vermeiden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deshalb eine detailliertere Betrachtung des bei der reversen Transkription von aHIF entstehenden „fehlerhaften Primings“ und dessen Quantifizierung.

Zum „fehlerhaften Priming“ zählt das endogene Priming (Hintergrund-Priming) und das Priming mit „falschen“ Primern, also Primer die nicht komplementär binden.

Problematisch ist das „fehlerhafte Priming“, weil es zu vielen verschiedenen Artefakten führt. Es kann eine positive Korrelation von sense und antisense Transkript vortäuschen, während lediglich dasselbe Transkript mit unterschiedlicher Effizienz der Primer detektiert wurde. Verschiedene Autoren zeigten dies für die am häufigsten vorkommenden Expressionsmuster von Sense-Antisense Paaren [15, 62, 69, 143].

Die Möglichkeit reverser Transkriptasen die cDNA-Synthese in Abwesenheit von exogenen Primern zu initiieren wurde bisher nur schlecht erforscht. Man kann verschiedene Mechanismen annehmen, die dies ermöglichen.

Die reverse Transkription kann durch „Hairpin“-Strukturen in der RNA-Zielsequenz geprimt werden, wie sie auch für aHIF gezeigt werden konnten, oder durch andere, ubiquitär in der Probe vorkommende, RNA-Moleküle, wie Transport- oder Ribosomale-RNA [140]. Auch die Kontamination mit Oligo(dT)s, die meist bei der Aufbereitung der mRNA geschieht, ist eine mögliche Quelle für fehlerhaftes Priming [104]. Abgesehen davon enthält eine RNA-Probe bereits bei der Aufarbeitung RNA des Sense und des Antisense Stranges, was zu unspezifischem Priming führen kann.

4. Diskussion

Nicht auszuschließen ist auch, dass NATs selbst eine Quelle von endogenen Primern bieten. Die Menge des „fehlerhaften Primings“ scheint vom verwendeten Primer abhängig zu sein, aber unabhängig von der Zielsequenz.

Dies zeigt sich anhand der Ergebnisse für die reverse Transkription mit dem Primer aHIF 3595. Die anschließende Realtime PCR mit verschiedenen Primern, die innerhalb der genspezifischen revers transkribierten Sequenz lagen, zeigte für alle Zielsequenzen die größte Menge „fehlerhaften Primings“ auf, während mit dem Primer aHIF -1 für alle Zielsequenzen die geringsten Mengen unspezifischen Primings gezeigt werden konnten (siehe Abbildung 15). Die verschiedenen Möglichkeiten des endogenen Primings sind auch für die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse nicht auszuschließen. Entscheidend für die Spezifizierung der reversen Transkription ist nicht die Identifizierung des Vorganges des „fehlerhaften Primings“, sondern seine Quantifizierung und Reduktion.

Eine einfache Art und Weise das endogene Priming zu reduzieren ist die Verwendung höherer Temperaturen während der Durchführung der reversen Transkription. Dies reduziert unter anderem die Ausbildung von Sekundärstrukturen, darüber hinaus reduziert die Verwendung einer thermostabilen reversen Polymerase die Bindungskapazität falscher Primer.

Dies zeigen auch die hier vorliegenden Ergebnisse. Die Verwendung der thermostabilen reversen Polymerase SuperScript III führte zu einer deutlichen Steigerung der Spezifität der reversen Transkription. Über welchen Mechanismus dies genau geschieht konnte nicht detailliert gezeigt werden.

Dennoch konnte mit diesem veränderten Protokoll die Spezifität der reversen Transkription nicht derart gesteigert werden, dass die Menge des „fehlerhaften Primings“ generell vernachlässigbar ist.

Es muss davon ausgegangen werden, dass auch die Ermittlung des optimalsten Protokolls nicht zu einer solchen Reduktion des „fehlerhaften Primings“ führen kann, dass dieses vernachlässigbar wäre. Um falsche Schlüsse über die Orientierung einer Sequenz zu vermeiden ist es daher unabdingbar das fehlerhafte Priming zu quantifizieren.

4. Diskussion

Die Ermittlung des „fehlerhaften Primings“ setzt die Untersuchung verschiedener strangspezifischer und unspezifischer Primer während der genspezifischen reversen Transkription voraus. Auch Versuche ohne das Hinzufügen eines exogenen Primers sollten durchgeführt werden. Nur über einen Vergleich der so erzielten Produkte kann die Menge des fehlerhaften Primings identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vergleich der erzielten Intensitäten und damit der verschiedenen erzielten Produktmengen durchgeführt. Dabei ist zu beachten, dass ein schwaches PCR-Signal zum einen für ein schwach exprimiertes Transkript in Leserichtung stehen kann, als auch, zum anderen, für ein stark exprimiertes Transkript in umgekehrter Orientierung und dass, trotz der genspezifischen reversen Transkription „fehlerhaftes Priming“ vorliegt.

Die detailliertere Quantifizierung erfolgte mittels Realtime PCR.

Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass durch diesen Ansatz nur die Orientierung eines einzelnen Transkripts festgestellt werden kann. Die Anwesenheit eines zweiten überlappenden Transkripts mit reverser Orientierung kann auf diese Art und Weise nicht ausgeschlossen werden. Daher sollten die Daten strangspezifischer reverser Transkription immer auch durch zusätzliche Methoden bestätigt werden. In Frage kommt die in situ Hybridisierung sowie die Durchführung von Northern Blots.

4.2.3 Schwierigkeiten bei der reversen Transkription durch Sekundärstrukturen

Es wurde bereits darauf eingegangen, dass Sekundärstrukturen zu Schwierigkeiten bei der reversen Transkription führen können. Dabei kann die Sekundärstruktur durch Ausbildung von „Hairpins“ zu „fehlerhaftem Priming“ führen. Im folgenden Abschnitt wird Augenmerk auf die Behinderung der reversen Transkription durch Sekundärstrukturen gelegt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen Schwierigkeiten bei der reversen Transkription. In Abbildung 17 wurde ein längeres Endprodukt erwartet. Man muss davon ausgehen, dass es sich bei den Banden mit der geringeren Intensität um die tatsächlich gesuchte Sequenz und bei den kürzeren Fragmenten um ein Artefakt handelt. Es bleibt die Frage, wie es zu dieser Konstellation kommen kann und es bieten sich verschiedene Erklärungsmöglichkeiten.

Zum einen könnte es an einer fehlerhaften Bindung des Primers -2045 liegen, zum anderen könnte zwischen den beiden verwendeten Primern eine kürzere Sequenz vorliegen, die amplifiziert wurde.

Gegen das Vorliegen eines zufälligen Artefakts spricht die Intensität der Banden, gegen eine fehlerhafte Bindung des Primers spricht die vorangegangene bioinformatische Überprüfung bei der Ermittlung des geeigneten Primers.

Am Wahrscheinlichsten erscheint das Vorliegen einer kürzeren Sequenz zwischen den beiden verwendeten Primern. Diese vermeintlich kürzere Sequenz mit der korrekten Bindung beider Primer kann zum einen durch das Vorliegen einer gespleißten Variante, als auch durch das Vorliegen einer Sekundärstruktur erklärt werden, die zu einer problematischen reversen Transkription und damit zu einem fehlerhaften, zu kurzen, Umschrieb führt.

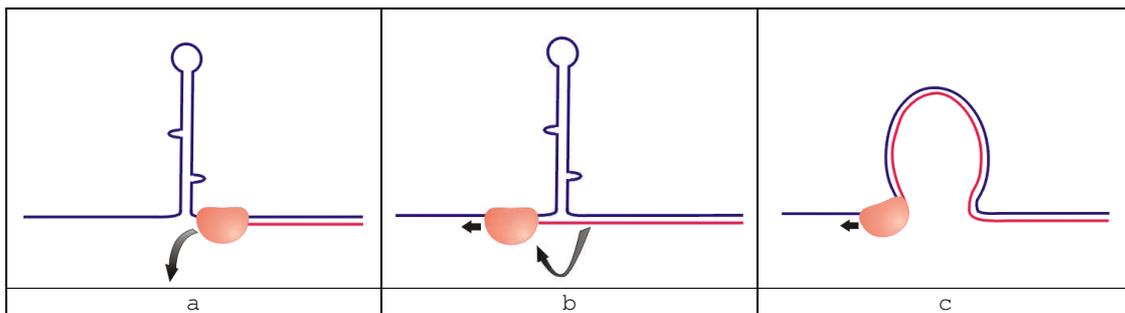
Bei der Sequenzierung des erhaltenen kürzeren Produktes konnten keine Hinweise auf eine Spleißstelle gefunden werden.

Aufgrund der ebenfalls amplifizierten längeren Sequenzen, deren Länge dem gesuchten Transkript von aHIF entspricht, kann man annehmen, dass eine

4. Diskussion

Sequenz vorhanden ist, die vollständig zwischen dem Primer -292 und -2045 liegt und deren Sekundärstruktur die reverse Transkription behindert. Es ist davon auszugehen, dass dieses Artefakt der aHIF Sequenz ohne die „Hairpin“-Struktur entspricht. Der zugrunde liegende Mechanismus ist vermutlich das „Überspringen“ der „Hairpin“-Sekundärstruktur durch die reverse Polymerase wie in Abbildung 32 „b“ gezeigt. Abgesehen davon konnte in der vorliegenden Arbeit eine solche Sekundärstruktur für aHIF bioinformatisch ermittelt werden, auf diesen Aspekt wird in einem folgenden Kapitel eingegangen.

Die folgende Abbildung 32 zeigt drei anzunehmende Möglichkeiten, wie sich eine vorliegende Sekundärstruktur auf den Ablauf der reversen Transkription auswirken kann und so zu fehlerhaften Transkripten führt.



Aus der Abbildung 32 sind drei Möglichkeiten ersichtlich, wie sich eine Sekundärstruktur auf den Ablauf der reversen Transkription auswirken kann.

Blau gekennzeichnet ist das Template mit Sekundärstruktur, eine Hairpin-Struktur, rot gekennzeichnet ist die, durch die reverse Transkriptase (als roter ausgefüllter Kreis markiert), synthetisierte Sequenz.

„a“ zeigt den Abbruch der reversen Transkription am Beginn der Sekundärstruktur, „b“ zeigt das „Überspringen“ der Sekundärstruktur durch die reverse Transkriptase, „c“ zeigt die vollständige reverse Transkription durch Auflösen der Sekundärstruktur.

Abbildung 32 zeigt, wie sich eine Sekundärstruktur auf die reverse Transkription auswirken kann. „a“ zeigt, dass durch Sekundärstrukturen der RNA die reverse Transkriptase angehalten werden kann und von der Template RNA abfällt.

4. Diskussion

„b“ zeigt das „Überspringen“ der Sekundärstruktur durch die reverse Transkriptase, dieser cDNA fehlt dann der entsprechende Abschnitt innerhalb der Sekundärstruktur.

Für ein optimales Ergebnis der reversen Transkription und der nachfolgenden PCR sollte die reverse Transkriptase vorliegende Sekundärstrukturen auflösen und ungeachtet der Sekundärstruktur den kompletten Strang transkribieren, wie in „c“ gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein Protokoll ermittelt, das die Auflösung von Sekundärstrukturen fördert und somit die reverse Transkription der vollständigen Zielsequenz ermöglicht.

Der einfachste Weg Sekundärstrukturen aufzulösen besteht in der thermischen Denaturierung. Dies wird durch Verwendung einer thermostabilen reversen Polymerase erzielt. Dabei muss beachtet werden, dass RNA-Moleküle sehr stabil sind, deutlich stabiler als DNA. Temperaturen über 55°C führen bereits zu einer deutlichen Degradierung des Templates, während Temperaturen zwischen 50°C und 55°C oftmals nicht ausreichend sind um Sekundärstrukturen aufzulösen.

„In vivo“ wird die Ausbildung von Sekundärstrukturen durch Chaperone verhindert [111]. Diese wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit dem Reaktionsansatz hinzugefügt und mittels eines verbesserten Protokolls und der SuperScript III reversen Transkriptase konnte ein Auflösen der Sekundärstrukturen und die reverse Transkription der RNA-Zielsequenz erreicht werden.

Diese Ergebnisse sind in Abbildung 18 gezeigt. Die Vermutung, dass es sich bei dem in der obigen PCR (Abbildung 17) erhaltenen kürzeren Transkript um ein Artefakt handelt, konnte bestätigt werden.

4.3. Antisense Transkription

4.3.1 Antisense RNA und ihre Funktion

Bei der Literaturrecherche zur vorliegenden Arbeit wurde offensichtlich, dass zu HIF-1 α einiges an Literatur vorliegt. Ganz anders ist die Situation für aHIF, hier liegen nur wenige Studien vor. Auch die generelle Rolle von Antisense Transkription ist bislang nur mäßig erforscht. Bei den meisten Arbeiten zu diesem Thema handelt es sich um „Screenings“ des Genoms, nur die wenigsten vermuteten NATs wurden auch tatsächlich experimentell nachgewiesen und auf ihre Orientierung hin untersucht.

Aufgrund der aktuellen Studienlage kann davon ausgegangen werden, dass die Hälfte aller transkriptionellen Einheiten im Genom von Säugetieren überlappende Antisense Partner haben [36]. Der größte Anteil NATs ist nicht-kodierende RNA. Besonders diese sind jedoch schlecht erforscht. Es bleibt eine wichtige Aufgabe, weitere nicht-kodierende und konservierte RNA-Sequenzen zu entdecken und zu beschreiben [43].

„Transkriptions Profiling Studien“ geben die mögliche Lokalisation von NATs an. Anhand dieser müssen nun mögliche NATs im Einzelnen betrachtet und auf ihre Orientierung hin überprüft werden.

Abgesehen davon ist bislang nur sehr wenig über die Funktion von Antisense Transkription bekannt.

NATs im Allgemeinen wird eine Vielzahl von Aufgaben zugerechnet. Abgesehen von ihrer Aufgabe als passiver Übermittler einer Gensequenz, hat einsträngige RNA auch Eigenschaften, die sie für eine regulatorische Rolle qualifizieren, wie den schnellen und einfachen Abbau der RNA, ihre Flexibilität in der Konformation und die Möglichkeit, mit Nukleinsäuren genauso wie mit Proteinen interagieren zu können. Damit bieten sie das Potential für eine schnelle und anspruchsvolle Bindung, sowie die Prozessierung und das Speichern sowohl endogener, als auch exogener Informationen [124, 131]. Sie könnten so grundlegend zur regulatorischen Komplexität des Genoms beitragen.

4. Diskussion

Es sind einige NATs beschrieben, die das überlappende Gen nicht durch eine direkte Rückkopplung regulieren, sondern in indirekter Form agieren, in dem sie Faktoren ergänzen, die die Transkription fördern oder inhibieren. Handelt es sich dabei um einen Effektor-Komplex, so können sie auf diese Art und Weise eine führende Rolle übernehmen.

Eine andere Vermutung ist, dass Antisense Transkription ein grundlegendes räumliches Phänomen ist, das aus der Kombination regulatorischer Elemente und/oder einer transkriptionell günstigen lokalen Chromatinstruktur resultiert. Weiterhin wurde postuliert, dass einige NATs durch Veränderung der dynamischen Eigenschaften von Chromatin, eine zentrale Rolle in der Regulation von Genen spielen [13, 14].

Verschiedene Studien zeigten auch, dass Antisense Transkription für den Mechanismus des genomischen Imprintings im Genom des Säugetiers entscheidend ist [101, 155].

Insbesondere die Regulationsmechanismen einzelner NATs sind bislang nur schlecht beschrieben. Welche dieser Funktionen tatsächlich von NATs übernommen werden, bleibt im Einzelfall experimentell nachzuweisen. Auch die Erforschung der möglichen Funktionen von aHIF steht noch offen. Für jedes Sense-Antisense Paar stellt sich die Frage nach einer möglichen direkten oder indirekten cis-regulierenden gegenseitigen Interaktion.

Die vorliegende Arbeit widmete sich der genaueren Beschreibung der NAT zu HIF-1 α , aHIF. Es wurde die Antisense Orientierung dieser Sequenz bestätigt und ihr 3'-Ende und 5'-Ende beschrieben.

Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit nichts über die Funktion von aHIF ausgesagt werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass aHIF durchaus eine Duplex-Formation mit HIF-1 α ausbilden könnte. Für HIF-1 α wurden verschiedene Spleißvarianten beschrieben. Es liegt also durchaus im Bereich des Möglichen, dass die Duplex-Formation von aHIF und HIF-1 α dieses alternative Spleißen begünstigt. Diese Vermutung bleibt experimentell zu bestätigen.

4.3.2 Regulationsmechanismen von Antisense Transkripten

Um einen Anhaltspunkt für die Regulation von Transkripten zu erhalten werden von vielen Studien gewebe- oder stimuluspezifische Expressionsmuster als Indikator verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass tendenziell die Expressionsmuster von NATs mit den Expressionsmustern ihrer Sense Partner verknüpft zu sein scheinen [15, 26, 100, 143]. Allerdings wurde auch offensichtlich, dass es kein einheitliches Schema gibt, anhand dessen sich die Expressions-Beziehungen zwischen Sense und Antisense Partnern beschreiben lassen. Für Sense-Antisense Paare im Genom von Säugetieren wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass sie häufig reziproke Expressionsmuster aufzeigen [27, 152]. Die meisten dieser Studien schließen daraus, dass viele NATs mit der Expression ihres korrespondierenden Sense Partners positiv korreliert sind [62, 100, 143]. Problematisch bei der Bewertung dieser Studien ist allerdings, dass es vermutlich zu einer Überbewertung von koexprimierter und koregulierter Sense-Antisense Paare kommt. Außerdem ist es häufig schwierig zu überprüfen, ob Gene tatsächlich in derselben Zelle transkribiert werden. Abgesehen davon ist in den meisten Studien der Anteil der nicht-kodierenden NATs deutlich unterrepräsentiert.

Es ist also notwendig die Regulationsmechanismen eines jeden NATs gesondert zu betrachten.

Eine funktionelle Beziehung zwischen Sense und Antisense Partnern kann zum einen durch eine zusammenhängende Regulation zustande kommen, als auch durch eine regulatorische Beziehung zwischen den Sense-Antisense Partnern. Man sollte sich jedoch darüber bewusst sein, dass die negative oder positive Korrelation von Expressionsmustern zwischen Sense-Antisense Partnern nicht ausreichend ist, um eine Vorhersage über eine mögliche regulatorische Interaktion zu treffen.

Ein weiterer Hinweis auf eine verknüpfte Expression oder einen regulatorischen Zusammenhang zwischen Sense-Antisense Partnern kann auch ihre Lokalisation im Genom sein. Es gibt Anzeichen dafür, dass Gene im eukaryotischen Genom nicht zufällig angeordnet sind [54, 106, 123], sondern, dass Gene, die gleich und/oder zusammenhängend exprimiert werden, häufig

4. Diskussion

in gebündelter Weise entlang des Genoms lokalisiert sind. Ihre Koexpression wird durch die gemeinsame Verwendung regulatorischer Elemente, wie Enhancer oder bidirektionale Promotoren, vermittelt [5, 22, 84, 85, 141]. Auch Chromatin-vermittelte Prozesse können bei dieser Koexpression eine Rolle spielen [44, 58, 108, 130]. Bislang ist jedoch die biologische Relevanz der Koexpression nur für wenige benachbarte Gene bewiesen [10].

Es ist eine mögliche Regulation von aHIF durch die in der CpG-Insel lokalisierten HREs möglich. Seine Regulation würde dann in direktem Zusammenhang mit HIF-1 α stehen. Es gelang in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht, eine sichere Aussage über die Regulation zu treffen. Es kommen auch andere Mechanismen durchaus in Frage.

4.4 aHIF

4.4.1 Sekundärstruktur

Wie bereits beschrieben, kann eine vorliegende Sekundärstruktur zu Störungen beim Ablauf der reversen Transkription führen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorliegen einer „Hairpin“-Sekundärstruktur für aHIF vermutet.

Der bioinformatischen Analyse dieser Sekundärstruktur ist noch ein weiterer Aspekt zu entnehmen.

An der Ausbildung von Sekundärstrukturen sind häufig so genannte „Inverted Repeats“ beteiligt, die zur Ausbildung von „Loops“ oder „Hairpin“-Strukturen führen. „Inverted Repeats“, deren Lokalisation im Bereich von aHIF Abbildung 27 zu entnehmen ist, kennzeichnen Stellen, an denen eine invertierte Wiederholung eines Sequenzabschnittes gezeigt werden kann. Nukleotidsequenzen wie diese können beispielsweise an den gegenüberliegenden Enden eines Transposons gefunden werden. Die in dieser Abbildung 27 gezeigten „Inverted Repeats“ sind maßgeblich an der Ausbildung der „Hairpin“-Sekundärstruktur von aHIF beteiligt.

Besondere Beachtung sollte deshalb in diesem Fall auf „SINE (Short Interspersed Nuclear Element) Repeats“ gelegt werden. Dies sind 100 bis 400 Basenpaare lange, sich häufig wiederholende DNA-Sequenzen, die im humanen Genom etwa 14% ausmachen. Sie werden zu den transponierbaren Elementen gerechnet und sind Retroposons. Transposons sind „springende Gene“, das heißt, sie können ihren Ort im Genom verändern und sind häufig von Repeats umgeben. Ihr Ursprung und ihre biologische Funktion sind noch nicht vollständig geklärt. Es wird diskutiert, dass es sich dabei vermutlich um von Retroviren abgeleitete DNA handelt, die sich in das Wirtsgenom integrierte und auf diese Weise weitervererbt wurde.

Es wurden im Bezug auf die Evolution von Sense-Antisense Paaren verschiedene Mechanismen, wie Translokation oder Transposition, diskutiert. Auch die Genverlängerung durch Adoption von Transkriptions-, Initiations- oder Terminations-Signalen vom gegenüberliegenden Strang wurden als Mechanismen für die Bildung neuer Gene oder Spleißvarianten in Betracht

4. Diskussion

gezogen [65, 87, 88, 127]. Eine vergleichende Analyse verschiedener Genome von Wirbeltieren zeigte jedoch Anzeichen dafür, dass sich die meisten überlappenden Gene stochastisch entwickeln, ohne einen positiven Druck auf das überlappende Transkript auszuüben [88].

Aufgrund dessen nahmen Makalowska et al. (2007) [88] an, dass die cis-regulatorische Interaktion zwischen Sense und Antisense Partnern Ausnahmen sind und sich lediglich als Konsequenz von Genzusammenstellungen entwickeln. Diese Annahme scheint für proteinkodierende Transkripte durchaus eine Berechtigung zu haben, es ist allerdings fraglich ob und in welchem Ausmaß sich dieses Konzept auf nicht-kodierende NATs übertragen lässt.

Welcher ursprünglicher Natur die „Hairpin“-Struktur von aHIF ist, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Jedoch sollte das mögliche Vorliegen eines Transposons bei weiteren Untersuchungen nicht außer Acht gelassen werden.

4.4.2 A-to-I Editing

Im Zusammenhang mit der Ausbildung von „Hairpin“-Sekundärstrukturen steht noch ein weiterer Mechanismus, der durch diese begünstigt wird, das A-to-I Editing.

Natürlich vorkommende RNA-Duplexe, beispielsweise Sense-Antisense Paare, sind in vivo A-to-I editiert. Man nimmt an, dass lange, exakt intermolekular doppelsträngige RNA das Substrat für ADARs darstellt und so A to I editiert wird. Diesem Mechanismus wird unterstellt, dass er eine Rolle bei der Regulation der antisense Transkription spielt, über die nukleäre Retention, die Stabilisierung oder den Abbau des jeweiligen Sense Partners [20, 71].

Es gibt verschiedene Studien, die Stellen für A-to-I Editing innerhalb invertierter Elemente im humanen Genom untersuchten. Diese konnten zeigen, dass A-to-I Editing hauptsächlich bei vorliegenden „Hairpin“-Sekundärstrukturen auftritt, vor allem auch innerhalb von Alu-Wiederholungen [9, 67, 81]. Es wurde eine Verbindung zwischen antisense Transkription und Editierung von RNA in Säugetieren angenommen [63, 98], dabei muss, um eine Fehlinterpretation der Daten zu vermeiden, beachtet werden, dass einige editierte Sequenzen schnell abgebaut oder im Nukleus zurückgehalten werden und so nicht in EST-Datenbanken erscheinen [98].

Die rückwirkende Ermittlung eines möglicherweise vorliegenden A to I Editings erfolgt durch das Alignment der cDNA-Sequenz mit der entsprechenden genomischen Sequenz. Dieses Alignment wurde auch in der vorliegenden Arbeit für aHIF durchgeführt und es konnte eine A-to-I Editierung festgestellt werden. Dieses Alignment bestätigt außerdem die Orientierung der Sequenz. Je nachdem, ob im Vergleich mit dem genomischen Sense-Strang ein Guanodin statt eines Adenosins oder ein Cytosin statt eines Thymins auftaucht, handelt es sich um ein Transkript in antisense oder sense Orientierung.

Welche Bedeutung das Vorliegen des A-to-I Editings für aHIF hat, bleibt jedoch ungeklärt.

Allerdings ist es eine Erklärung für die Unterschiede in der von Thrash-Bingham und Tartof (1999) [136] beschriebenen Sequenz im Vergleich zur genomischen Sequenz.

4.4.3 Die Sequenz von aHIF

Die bereits besprochenen Schwierigkeiten bei der reversen Transkription der vollständigen aHIF Sequenz in der vorliegenden Arbeit führten dazu, dass auch hier die vollständige Sequenz von aHIF nicht an einem Stück amplifiziert werden konnte.

Auch der Nachweis des 3'-Endes und des 5'-Endes mittels RACE PCR führte zwar zu einer Darstellung der Enden, jedoch nie zur Darstellung der vollständigen Sequenz.

4.4.3.1 Das 3'-Ende

Es gibt einige Studien, die darauf hinweisen, dass eine signifikante Anzahl an NATs nicht polyadenyliert ist und/oder außerdem im Nukleus lokalisiert zu sein scheint [29, 62, 69].

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Sequenz aHIF konnte die Polyadenylierung des 3'-Endes nachgewiesen werden.

Dieser wurde zunächst bioinformatisch, mittels des Programms ERPIN, aufgesucht und anschließend experimentell bestätigt. Die bioinformatische Suche ist dabei lediglich eine Annäherung an mögliche Sequenzen, die für ein Poly(A)-Signal stehen. Dabei zeigt das verwendete Programm ERPIN zwar eine sehr hohe Spezifität von 69% bis 85%, allerdings zu Lasten einer Sensitivität von nur 56%. Dies bedeutet, dass schwache und/oder alternative Polyadenylierungssignale in der Regel nicht erfasst werden.

Das Auffinden des 3'-Endes von aHIF und seine experimentelle Bestätigung schließt also das Auftreten alternativer oder anderer Polyadenylierungssignale nicht aus. Die experimentelle Bestätigung mittels der 3'-RACE PCR zeigte jedoch, neben einer starken Bande, weitere schwächere Banden, die zum einen Artefakte, zum anderen auch durch alternative Polyadenylierungssignale, wie zum Beispiel „ATAAA“ zustande gekommen sein können und für ein alternatives 3'-Ende der Sequenz stehen.

Es ist durchaus möglich, dass für die Sequenz von aHIF ein weiteres Polyadenylierungssignal vorliegt, das zu einem alternativen 3'-Ende und zu

4. Diskussion

einer anderen Länge der Sequenz führt. Mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden konnte dies nicht erfasst werden.

Dass es sich bei dem in dieser Arbeit ermittelten Poly(A)-Schwanz um eine tatsächlich vorliegende Struktur handelt, wird auch durch die Tatsache gestützt, dass dieser Abschnitt phylogenetisch stark konserviert ist. Die maximale phylogenetische Konservierung ist ein starker Hinweis auf eine tatsächliche Funktion und spricht gegen eine zufällige Sequenzfolge.

4.4.3.2 Das 5'-Ende und die Regulation von aHIF

Bioinformatisch wurde in der Gegend des angenommenen 5'-Endes von aHIF eine phylogenetisch hoch konservierte CpG-Insel ermittelt. Aufgrund ihrer phylogenetischen Konservierung und ihrer Lage im Bezug zu aHIF, ist die ermittelte CpG-Insel hoch verdächtig als Promotorregion für dieses zu fungieren.

In der Regel sind CPG-Inseln in der Nähe von Transkriptionsstartstellen lokalisiert, ihr Vorkommen weist auf eine starke Expression des zugehörigen Gens hin [40].

Das Auffinden von Promotorregionen ist ein bioinformatisches Verfahren und bietet somit keinen Anhaltspunkt für eine tatsächlich vorliegende biologische Funktion. Es handelt sich dabei um Berechnungen nach einem Score, der „GC“-reiche Regionen charakterisiert. Ob diesen dann jedoch auch tatsächlich eine Funktion zugeordnet werden kann, bleibt experimentell zu bestätigen.

Einen Anhaltspunkt für eine mögliche tatsächliche Funktion kann die phylogenetische Konservierung bieten. Doch auch die Bedeutung der phylogenetischen Konservierung ist mit Vorsicht zu genießen. Ein wesentliches Problem der vergleichenden Genomik ist die Frage, welche Spezies miteinander verglichen werden sollen, um funktionelle Bereiche möglichst zuverlässig bestimmen zu können. Für die Identifizierung funktioneller Bereiche im menschlichen Genom haben sich Vergleiche mit dem Genom der Maus als nützlich erwiesen. Die Divergenzrate zwischen beiden Genomen ist gering genug, um orthologe Sequenzen alignen zu können, aber gleichzeitig hoch genug, um die Diskrimination funktioneller Elemente aufgrund ihrer höheren

4. Diskussion

Konservierung zu ermöglichen. Vergleiche des menschlichen Genoms mit dem der Maus werden intensiv genutzt, um potentiell regulatorische Elemente zu identifizieren, von denen sich viele auch als funktionell herausstellen [34].

Das 5'-Ende von aHIF wurde, nach der bioinformatischen Ermittlung der CpG-Insel, auch experimentell nachgewiesen. Die Sequenz von aHIF konnte mittels 5'-RACE PCR bis in die CpG-Insel reichend amplifiziert werden.

Es bleibt die Funktion der CpG-Insel für aHIF zu klären. Anzunehmen ist, dass die CpG-Insel eine entscheidende Rolle für die Regulation von aHIF spielt. Aufgrund der Tatsache, dass eine gewisse Interaktion zwischen Sense und Antisense Partnern angenommen werden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit die Regulation von aHIF durch Hypoxia-Response Elements (HREs) untersucht.

Dies schließt jedoch auch das Auftreten anderer, nicht entdeckter, regulatorischer Elemente nicht aus, die aHIF unabhängig von seinem Sense Transkript HIF-1 α oder Hypoxie regulieren können.

Die Überprüfung der CpG-Insel auf mögliche HREs erfolgte mittels des Pescador-Score. Für die in der vorliegenden Arbeit betrachtete, CpG-Insel konnten drei mögliche HREs ermittelt werden. Wie bereits beschrieben handelt es sich dabei in zwei Fällen um HREs, die in sense Richtung orientiert sind und um ein HRE, das in antisense Richtung orientiert ist. Als Regulationselemente für aHIF kommen die in sense Richtung orientierten HREs nur in Frage, wenn es sich um bidirektionale Promotoren handelt. Diese Annahme ist nicht unwahrscheinlich, da CpG-Inseln im Allgemeinen mit bidirektionalen Promotoren assoziiert sein können. Diese sind wiederum mit alternativen Transkriptionsstartstellen assoziiert [22].

Es liegt eine aktuelle Studie vor, die die bidirektionale Aktivität von Promotoren, die mit divergent orientierten Sense-Antisense Paaren im humanen Genom in Verbindung gebracht wurden, untersuchte [38]. Anzunehmen ist, dass Promotoren nicht an sich auf eine Richtung fixiert sind [153]. Die Festlegung ihrer Orientierung ist vermutlich ein Nebenprodukt Chromatin-modulierender und -modifizierender Prozesse, die mit einer allgemeinen transkriptionellen Aktivität assoziiert sind.

4. Diskussion

Für die vorliegende Sequenz von aHIF wurde bioinformatisch eine CpG-Insel ermittelt, die die Promotorregion darstellen könnte. Der experimentelle Nachweis einer tatsächlich vorliegenden CpG-Insel, ihrer Aktivität und der Orientierung ihrer Aktivität, steht jedoch aus. Auch ob den ermittelten HREs tatsächlich eine regulatorische Funktion zugerechnet werden kann, bleibt experimentell zu bestätigen.

Die wechselseitig zusammenhängende Regulation von HIF-1 α und aHIF scheint jedoch durchaus wahrscheinlich zu sein. In hier nicht gezeigten Ergebnissen konnte eine Korrelation zwischen den Expressionsmustern von HIF-1 α und aHIF festgestellt werden, was auf eine Verknüpfung ihrer Regulation hinweisen kann. Aus dieser Korrelation darf jedoch nicht direkt auf eine funktionelle Interaktion geschlossen werden.

Ist die Lokalisation im Genom ein tatsächlicher Hinweis auch auf eine funktionelle Verknüpfung, so ist die überlappende Anordnung von aHIF und HIF-1 α ein Anzeichen für die gleiche und/oder zusammenhängende Expression der beiden Sense-Antisense Partner.

Auch die Annahme, dass die gefundene CpG-Insel und die beinhalteten HREs als bidirektionale Promotoren agieren, kann ein Hinweis auf die Koexpression zwischen aHIF und HIF-1 α sein.

Es gelang in der vorliegenden Arbeit nicht, eine sichere Aussage über die Regulation von aHIF, beziehungsweise die regulatorische Interaktion zwischen aHIF und HIF-1 α zu treffen.

Wie bereits erwähnt muss diese Möglichkeit der Regulation nicht die Einzige sein. Der experimentelle Nachweis einer biologischen Funktion und der bidirektionalen Orientierung eines Promotors könnte über die Klonierung der CpG-Insel und der beinhalteten HREs in einen Vektor erfolgen.

4.4.4 Proteinkodierend oder nicht-kodierend? Der „Open Reading Frame“

Nach der ausführlichen Charakterisierung von aHIF, stellt sich die Frage, ob aHIF eine proteinkodierende oder nicht-kodierende NAT ist. Auch dieser Nachweis kann letzten Endes nur experimentell erfolgen, jedoch bietet die Ermittlung von „Open Reading Frames“ (ORF) sehr gute Anhaltspunkte. „Open Reading Frames“ kennzeichnen den Anteil des Genoms, der eine Basensequenz beinhaltet, die potentiell proteinkodierend ist.

„ORF“-Suchmaschinen basieren auf bekannten genetischen Codes und suchen alle möglichen „Reading Frames“ ab. Das Auffinden eines „ORF“ ist insbesondere bei längeren Sequenzen ein guter Indikator für die Anwesenheit eines Gens in der umgebenden Sequenz. Allerdings können auch außerhalb von Genen „ORF“s auftauchen, diese entstehen meist durch Zufall und enden nach einigen Codons. Die längste Sequenz ohne Stopp-Codon legt in der Regel den ORF fest.

Die weiterführende Analyse der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Sequenz ergab nur sehr kurze „Open Reading Frames“ (ORF), dies deutet daraufhin, dass aHIF nicht proteinkodierend ist.

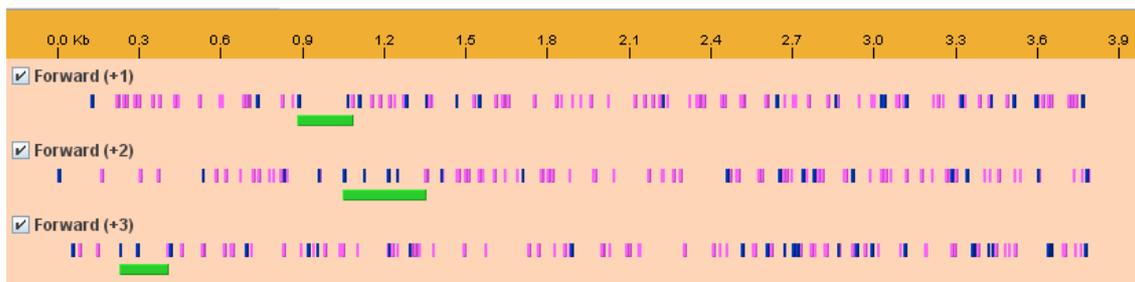


Abbildung 33 zeigt die Analyse der ermittelten aHIF Sequenz auf "ORF"s. Gezeigt ist die Basensequenz für aHIF in drei verschiedenen Leserahmen. Grün gekennzeichnet sind die jeweils ermittelten "ORF"s. Demnach wäre die längste kodierende Sequenz 303 Basenpaare lang [4].

Aus der Abbildung 33 zu entnehmen sind, je nach Lage des Leserahmens, drei ermittelte "ORF"s für die ermittelte Sequenz von aHIF. Der längste ORF ist

4. Diskussion

dabei 303 Basenpaare lang und zeigt keine signifikante Homologie mit bekannten, proteinkodierenden Genen. Es ist daher anzunehmen, dass es sich dabei nicht um einen ORF handelt und aHIF nicht-kodierend ist.

Ein anderer Hinweis auf kodierende Sequenzen wäre auch das Vorliegen von Intron-Exon Sequenzen beziehungsweise von Exon-Intron-Grenzen. Für die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Sequenz konnten keine Exon-Intron-Grenzen ausgemacht werden. aHIF ist also mit großer Wahrscheinlichkeit nicht proteinkodierend. Der experimentelle Nachweis ist noch ausstehend.

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Für die Betrachtung von NATs ist es von entscheidender Bedeutung die Orientierung eines Transkripts sicher feststellen zu können.

In der vorliegenden Arbeit stellte sich zunächst die Frage, wie genspezifisch die reverse Transkription tatsächlich ist und ob diese Methode ausreichend ist, um auf die Orientierung eines Transkripts schließen zu können. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die genspezifische reverse Transkription nicht spezifisch genug ist. Eine große Rolle spielt dabei das „fehlerhafte Priming“, auf das in der vorliegenden Arbeit besonderes Augenmerk gelegt wurde. Es konnte eine verbesserte Methode aufgezeigt werden, mit der zum einen die Spezifität der genspezifischen reversen Transkription gesteigert werden kann und mit der zum anderen das fehlerhafte Priming quantifiziert werden kann. Auf diese Art und Weise kann die Orientierung eines Transkripts mit deutlich höherer Sicherheit vorhergesagt werden.

Es ist nun notwendig, beschriebene NATs auf ihre tatsächliche Orientierung zu prüfen. Dabei muss für jedes Sense-Antisense Paar das optimale Protokoll ausgetestet werden. Wichtig ist auch die weitere Bestätigung durch in situ Hybridisierung oder Northern Blot.

In der vorliegenden Arbeit wurde aHIF, die NAT zu HIF-1 α , genauer charakterisiert. Dabei konnte eine vorliegende Sekundärstruktur aufgezeigt werden, das 3'-Ende ist polyadenyliert, das 5'-Ende liegt an einer CpG-Insel.

Dabei bleibt der experimentelle Nachweis dieser Sekundärstruktur noch zu erbringen. Abgesehen davon, gelang es in der vorliegenden Arbeit nicht, die vollständige aHIF Sequenz an einem Stück zu amplifizieren und sequenzieren. Auch diese Aufgaben stehen noch aus.

Ebenso steht die detailliertere Beschreibung und weitergehende Charakterisierung der CpG-Insel am 5'-Ende der Sequenz noch aus.

Abgesehen davon konnten lediglich Vermutungen über die Regulationsmechanismen und die Funktion von aHIF ausgesagt werden. Auch diese bleiben noch experimentell zu ermitteln.

4. Diskussion

Die gewonnenen Erkenntnisse sind für die weitere Charakterisierung von NATs von großer Bedeutung. Mit der sicheren Festlegung der Orientierung eines Transkripts kann die einzelne Betrachtung einzelner NATs und ihre Charakterisierung begonnen werden.

5. Zusammenfassung

Als Standardmethode zur Festlegung der Orientierung einer Sequenz gilt bislang die genspezifische reverse Transkription. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass diese Methode jedoch nicht ausreichend spezifisch ist, um für die Orientierung eines Transkripts beweisend zu sein. Verantwortlich hierfür ist „fehlerhaftes“ Priming, sowohl durch eine falsche Primer-Bindung, als auch durch endogenes Priming.

Die Etablierung einer Methode mit der die Orientierung eines Transkripts eindeutig bestimmt werden kann, ist jedoch für die weiterführende Beschreibung von Antisense Transkripten, NATs, unabdingbar.

Es wurde in der vorliegenden Arbeit eine Realtime RT-PCR Methode beschrieben, mit der die Orientierung einer Nukleotidsequenz durch die Quantifizierung der Fehlerrate genspezifischer reverser Transkription, auch bei Vorliegen von „fehlerhaftem“ Priming und einer komplizierten Sekundärstruktur, definiert werden kann. Diese, in der vorliegenden Arbeit etablierte, Realtime RT-PCR Methode zeigt, dass die Ermittlung der Orientierung eines Transkripts mittels genspezifischer reverser Transkription durch quantitative PCR-Analytik gegen Kontrollumschriebe der RNA erfolgen sollte.

Als Beispiel wurde die Antisense zu HIF-1 α , aHIF, auf ihre Orientierung hin untersucht. Im Anschluss an die Festlegung der Antisense Orientierung von aHIF, wurde diese NAT detaillierter charakterisiert.

Es konnte ein Poly(A)-Signal am 3'-Ende von aHIF und ein Poly(A)-Schwanz gezeigt werden. Dieser ist im Bereich der 3'-UTR von HIF-1 α lokalisiert und phylogenetisch stark konserviert.

Das 3'-Ende von aHIF liegt an der Position chr14:61283835, das 5'-Ende konnte bis zur Position chr14:61287475 experimentell nachgewiesen werden.

Das 5'-Ende von aHIF ist charakterisiert durch eine CpG-Insel, die vermutlich die Promotor Region für aHIF darstellt. Außerdem konnten hier HREs ermittelt werden, dies ist ein Hinweis auf eine Regulation von aHIF durch HIF.

aHIF bildet eine komplexe Sekundärstruktur, einen Stemloop, aus. An den Stellen, die als doppelsträngige Nukleinsäuresequenz vorliegen, wird aHIF A-to-

5. Zusammenfassung

l editiert. Das Vorliegen des A-to-I Editings ist darüber hinaus, ebenso wie das Auffinden eines Poly(A)-Schwanzes, ein weiterer Hinweis auf die Antisense Orientierung der zugrunde liegenden RNA-Sequenz.

Für die weitergehende Betrachtung von NATs ist es entscheidend, die Orientierung eines Transkripts sicher feststellen zu können. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Realtime RT-PCR zeigte sich durch die Quantifizierung des fehlerhaften Primings als ausreichend spezifische Methode um die Orientierung eines Transkripts festlegen zu können.

Es ist nun notwendig, beschriebene NATs auf ihre tatsächliche Orientierung zu prüfen.

6. Abkürzungsverzeichnis

ATP S 6	Adenosintriphosphat Synthetase 6
°C	Grad Celsius
A	Adenosin
ACTB	Actin, Beta
ADARs	Adenosine Deaminases Acting on RNA
ADM	Adrenomedulin
aHIF	antisense Hypoxia Inducible Factor
ARD-1	Acetyltransferase Arrest Defective 1
ARNT	Aryl Receptor Nuclear Translocator
AT	Adenosin-Thymin
AU	Adenosin-Uracil
bHLH	basische Helix-Loop-Helix Proteine
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLAT	BLAST Like Alignment Tool
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CAGE	Cap-Analysis and Gene Expression
CBP/p300	CREB-Binding-Protein/p300
CCDS	Consensus Coding DNA Sequence
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
chr	Chromosom
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoCl ₂	Cobalt(II)-Chlorid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CT	Cycle Threshold Value
C-TAD	C-terminale Transaktivierungsdomäne
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate

6. Abkürzungsverzeichnis

dsRNA	double-stranded Ribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
E	Effizienz
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
ERPIN	Easy RNA Profile Identification
EST	Expressed Sequenced Tag
f	Steigung
FCS	Fetal Calf Serum
FIH	Factor Inhibiting HIF
FITC	Fluorescein, fluoreszierender Triphenylmethanfarbstoff
for	forward
g	Gramm
G	Guanosin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphatase Dehydrogenase
GC	Guanosin, Cytosin
GLUT	Glucosetransporter
GTP	Guanosintriphosphat
GU	Guanosin, Uracil
H ₂ O	Wasser
HBS	HIF-Binding Sites
HeLa	Human Ovarian-Carcinoma Cells
Hep3B	Human Hepato-Carcinoma Cells
HER-2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HLF	HIF-like Factor
HMBS	Hydroxymethylbilane Synthase
HMMs	Hidden-Markov-Modelle
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA
HPRT 1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
HRE	Hypoxia Response Element

6. Abkürzungsverzeichnis

HRF	HIF-related Factor
HSP90	Hitzeschockprotein 90
I	Inosin
IGF 2	Insulin-like Growth Factor 2
IPAS	Inhibitorische Per-Arnt-SIM
kb	Kilo Basen
kD	Kilo Dalton
ln	natürlicher Logarithmus
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M-MLV	Moloney-Maus Leukämie Virus
MMPs	Matrix-Metallo-Proteinases
MNE	Mean Normalized Expression
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NAT	Natural Antisense Transcript
NC Proteine	Nukleocapsid Proteine
nc RNA	Non-coding Ribonucleic Acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NIX	NIP3-like Protein X
NLS-Domäne	Amino/Carbony Nuclear Localisation Signal Kontrollversuch, in der die reverse Transkriptase durch Nuklease-freies Wasser ersetzt wurde
noRT	durch Nuklease-freies Wasser ersetzt wurde
NOS 2	Nitrous Oxide Synthetase
N-TAD	N-terminale Transaktivierungsdomäne
ODDD	Oxygen-Dependent Degradation Domain
OdT	Oligo(dT)-Primer
ORF	Open Reading Frame
PAIs	Plasminogen Activator Receptors and Inhibitors

6. Abkürzungsverzeichnis

PAP	Poly(A)-Polymerase
PAS-Domäne	Per-Arnt-SIM- Domäne
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PDGFB	Platelet-derived Growth Factor B
PERP	TP53 apoptosis effector
PHD	Prolyl-Hydroxylasen
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PSSM	Positions-spezifische Scoring Matrix
pVHL	von Hippel-Lindau Protein
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RAS	Rat Sarcoma
RCC22	Nierenkarzinomzellreihe 22
rev	revers
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium
RT	Reverse Transkription
Rtase	Reverse Transkriptase
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SAS	Sense-Antisense
SE	Standardabweichung
sek	Sekunden
sHIF-1 alpha	Spleißvariante von HIF-1alpha ohne Exon 14
SINE	Short Interspersed Nuclear Element
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
T	Thymin
T4gp32	T4 Bacteriophage Gene 32 Protein
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TATA	Thymin-Adenin-Thymin-Adenin
TFBS	Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen

6. Abkürzungsverzeichnis

TGF alpha	Transforming Growth Factor alpha
THP-1	akute monozytäre Leukämiezellen
TI	Transcriptional Interference
Tie-2	Angiopoietin Receptor
Tricine-KOH	Tricine-Kaliumhydroxid
U	Uracil
UbB	Ubiquitin B
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
UPM	Universal Primer Mix
USCS	University of California Santa Crus
UTR	Untranslated Region
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHL	von Hippel-Lindau Faktor

7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Schematischer Aufbau von HIF-1 α und HIF-1 β
- Abbildung 2 Regulationsmechanismen von HIF-1 α
- Abbildung 3 Schematische Darstellung von HIF-1 α und aHIF und ihre Lokalisation
- Abbildung 4 Homepage des USCS Genome Browser
- Abbildung 5 Schematische Darstellung der HRE-Konsensussequenz nach der Pescador-Martrix
- Abbildung 6 Prinzip der RACE_PCR
- Abbildung 7 Genomabschnitt von HIF-1 α und sHIF-1 α
- Abbildung 8 Nukleinsäuresequenz von U85044
- Abbildung 9 Genomabschnitt der Maus für die Sequenz von HIF-1 α
- Abbildung 10 Humaner Genomabschnitt für die Sequenz von HIF-1 α und aHIF
- Abbildung 11 Lokalisation und Orientierung verwendeter Primer
- Abbildung 12 Lokalisation verwendeter Primer
- Abbildung 13 Ergebnis des Vergleichs reverser Transkriptasen
A: M-MLV bei 37 °C
B: SuperScript III bei 55 °C
- Abbildung 14 Ergebnis der Realtime PCR zum Vergleich reverser Transkriptasen
- Abbildung 15 Ergebnisse verschiedener, zum Teil genspezifischer, Umschriebe und nachfolgender Realtime-PCR für verschiedene Zielgene
A: Zielgen HIF-1 α , Primer-Paar: 2488/2675
B: Zielgen HIF-1 α , Primer-Paar: 2618/2675
C: Zielgen HIF-1 α ohne Exon 14, Primer-Paar: 2473-2637/2675
D: Zielgen GAPDH, Primer-Paar: GAPDH_for/GAPDH_rev
E: Zielgen aHIF, Primer-Paar: -292/-365
- Abbildung 16 Lokalisation und Orientierung verwendeter Primer
- Abbildung 17 Ergebnis der reversen Transkription mit M-MLV und Random

7. Abbildungsverzeichnis

- Hexamer Primern für verschiedene Zellen
- Abbildung 18 Ergebnis der reversen Transkription mit verändertem Protokoll
- Abbildung 19 Ergebnis der reversen Transkription mit verändertem Protokoll und verlängerter Zielsequenz
- Abbildung 20 Ergebnis der 5'-RACE PCR
- Abbildung 21 Ergebnis der PCR zur Bestätigung des 5'-Endes
- Abbildung 22 Lokalisation des bioinformatisch vermuteten Poly(A)-Schwanzes
- Abbildung 23 Lokalisation des ermittelten Poly(A)-Schwanzes und des Poly(A)-Signals
- Abbildung 24 Lokalisation der Primer für RACE-PCR
- Abbildung 25 Ergebnis der 3'-RACE PCR
- Abbildung 26 Sekundärstruktur von aHIF
- Abbildung 27 Genomabschnitt für HIF-1 α und aHIF
- Abbildung 28 Alignment verschiedener Zellarten zur Ermittlung von A-to-I Editing
- Abbildung 29 Alignment der von Thrash-Bingham und Tartof, 1999 beschriebenen Sequenz mit Erythroleukämiezellen und der genomischen Nukleinsäuresequenz
- Abbildung 30 Lokalisation der CpG-Insel und des 5'-Endes von aHIF
- Abbildung 31 Zusammenfassung der Ergebnisse
- Abbildung 32 Schematische Darstellung der Auswirkungen einer Sekundärstruktur auf den Ablauf der reversen Transkription
A: Abbruch der reversen Transkription
B: „Überspringen“ der Sekundärstruktur
C: vollständige reverse Transkription
- Abbildung 33 Analyse der ermittelten aHIF Sequenz auf "ORF"s

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Werte des Pescador-Score
Tabelle 2	Verwendete Primer. Ihre Benennung, Orientierung und Nukleotidsequenz
Tabelle 3	Primer-Paare für die Realtime PCR

9. Literaturverzeichnis

1. <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>.
2. www.ensembl.org.
3. <http://genome.uscs.edu/>.
4. <http://informagen.com/SA/>.
5. Adachi, N. and M.R. Lieber, *Bidirectional gene organization: a common architectural feature of the human genome*. Cell, 2002. **109**(7): p. 807-9.
6. Agani, F.H., et al., *The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 35863-7.
7. Ameln, H., et al., *Physiological activation of hypoxia inducible factor-1 in human skeletal muscle*. Faseb J, 2005. **19**(8): p. 1009-11.
8. An, W.G., et al., *Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha*. Nature, 1998. **392**(6674): p. 405-8.
9. Athanasiadis, A., A. Rich, and S. Maas, *Widespread A-to-I RNA editing of Alu-containing mRNAs in the human transcriptome*. PLoS Biol, 2004. **2**(12): p. e391.
10. Batada, N.N., A.O. Urrutia, and L.D. Hurst, *Chromatin remodelling is a major source of coexpression of linked genes in yeast*. Trends Genet, 2007. **23**(10): p. 480-4.
11. Beiter, T., et al., *Sense or antisense? False priming reverse transcription controls are required for determining sequence orientation by reverse transcription-PCR*. Anal Biochem, 2007. **369**(2): p. 258-61.
12. Beltran, M., et al., *A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition*. Genes Dev, 2008. **22**(6): p. 756-69.
13. Bernstein, E. and C.D. Allis, *RNA meets chromatin*. Genes Dev, 2005. **19**(14): p. 1635-55.
14. Bernstein, E., et al., *Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(7): p. 2560-9.
15. Bertone, P., et al., *Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays*. Science, 2004. **306**(5705): p. 2242-6.
16. Bos, R., et al., *Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(4): p. 309-14.
17. Brahimi-Horn, C., N. Mazure, and J. Pouyssegur, *Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications*. Cell Signal, 2005. **17**(1): p. 1-9.
18. Bustin, S.A. and T. Nolan, *Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction*. J Biomol Tech, 2004. **15**(3): p. 155-66.
19. Caniggia, I., et al., *Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia*. Placenta, 2000. **21 Suppl A**: p. S25-30.

9. Literaturverzeichnis

20. Carmichael, G.G., *Antisense starts making more sense*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(4): p. 371-2.
21. Carninci, P., *Tagging mammalian transcription complexity*. Trends Genet, 2006. **22**(9): p. 501-10.
22. Carninci, P., et al., *Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution*. Nat Genet, 2006. **38**(6): p. 626-35.
23. Cayre, A., et al., *aHIF but not HIF-1alpha transcript is a poor prognostic marker in human breast cancer*. Breast Cancer Res, 2003. **5**(6): p. R223-30.
24. Chan, D.A., et al., *Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1alpha*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 40112-7.
25. Chen, C., et al., *Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 9519-25.
26. Chen, J., et al., *Over 20% of human transcripts might form sense-antisense pairs*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(16): p. 4812-20.
27. Chen, J., et al., *Genome-wide analysis of coordinate expression and evolution of human cis-encoded sense-antisense transcripts*. Trends Genet, 2005. **21**(6): p. 326-9.
28. Chen, J., et al., *The small introns of antisense genes are better explained by selection for rapid transcription than by "genomic design"*. Genetics, 2005. **171**(4): p. 2151-5.
29. Cheng, J., et al., *Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution*. Science, 2005. **308**(5725): p. 1149-54.
30. Clamp, M., et al., *Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(49): p. 19428-33.
31. Clontech.
http://www.clontech.com/products/detail.asp?product_id=169243&tabno=2. 2009 [cited].
32. Curatola, A.M., M.S. Nadal, and R.J. Schneider, *Rapid degradation of AU-rich element (ARE) mRNAs is activated by ribosome transit and blocked by secondary structure at any position 5' to the ARE*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(11): p. 6331-40.
33. Ebert, B.L., J.D. Firth, and P.J. Ratcliffe, *Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences*. J Biol Chem, 1995. **270**(49): p. 29083-9.
34. Elnitski, L., et al., *Locating mammalian transcription factor binding sites: a survey of computational and experimental techniques*. Genome Res, 2006. **16**(12): p. 1455-64.
35. Ema, M., et al., *A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4273-8.
36. Engstrom, P.G., et al., *Complex Loci in human and mouse genomes*. PLoS Genet, 2006. **2**(4): p. e47.

9. Literaturverzeichnis

37. Feldser, D., et al., *Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2*. *Cancer Res*, 1999. **59**(16): p. 3915-8.
38. Finocchiaro, G., et al., *Localizing hotspots of antisense transcription*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(5): p. 1488-500.
39. Galante, P.A., et al., *Sense-antisense pairs in mammals: functional and evolutionary considerations*. *Genome Biol*, 2007. **8**(3): p. R40.
40. Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes*. *J Mol Biol*, 1987. **196**(2): p. 261-82.
41. Gassen, H.G.u.S., G. (Hrsg.), in *Gentechnische Methoden – Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 1999, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin.
42. Ge, X., et al., *A large quantity of novel human antisense transcripts detected by LongSAGE*. *Bioinformatics*, 2006. **22**(20): p. 2475-9.
43. Gerstein, M.B., et al., *What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition*. *Genome Res*, 2007. **17**(6): p. 669-81.
44. Gierman, H.J., et al., *Domain-wide regulation of gene expression in the human genome*. *Genome Res*, 2007. **17**(9): p. 1286-95.
45. Gingeras, T.R., *Origin of phenotypes: genes and transcripts*. *Genome Res*, 2007. **17**(6): p. 682-90.
46. Goldberg, M.A., C.C. Gaut, and H.F. Bunn, *Erythropoietin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and posttranscriptional events*. *Blood*, 1991. **77**(2): p. 271-7.
47. Gothie, E., et al., *Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(10): p. 6922-7.
48. Gu, Y.Z., et al., *Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha*. *Gene Expr*, 1998. **7**(3): p. 205-13.
49. Hastings, M.L., et al., *Post-transcriptional regulation of thyroid hormone receptor expression by cis-acting sequences and a naturally occurring antisense RNA*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(15): p. 11507-13.
50. Hewitson, K.S., et al., *Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(29): p. 26351-5.
51. Hogenesch, J.B., et al., *Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(13): p. 8581-93.
52. Huang, J., et al., *Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39792-800.
53. Huang, L.E., et al., *Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(50): p. 32253-9.
54. Hurst, L.D., C. Pal, and M.J. Lercher, *The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order*. *Nat Rev Genet*, 2004. **5**(4): p. 299-310.
55. Iliopoulos, O., et al., *Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(20): p. 10595-9.

9. Literaturverzeichnis

56. Ivan, M., et al., *HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing*. Science, 2001. **292**(5516): p. 464-8.
57. Kallio, P.J., et al., *Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5667-72.
58. Kalmykova, A.I., et al., *Regulated chromatin domain comprising cluster of co-expressed genes in Drosophila melanogaster*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(5): p. 1435-44.
59. Kampa, D., et al., *Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22*. Genome Res, 2004. **14**(3): p. 331-42.
60. Kamura, T., et al., *Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10430-5.
61. Karolchik, D., et al., *The UCSC Genome Browser Database: 2008 update*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D773-9.
62. Katayama, S., et al., *Antisense transcription in the mammalian transcriptome*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1564-6.
63. Kawahara, Y. and K. Nishikura, *Extensive adenosine-to-inosine editing detected in Alu repeats of antisense RNAs reveals scarcity of sense-antisense duplex formation*. FEBS Lett, 2006. **580**(9): p. 2301-5.
64. Ke, Q. and M. Costa, *Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(5): p. 1469-80.
65. Keese, P.K. and A. Gibbs, *Origins of genes: "big bang" or continuous creation?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(20): p. 9489-93.
66. Kent, W.J., et al., *The human genome browser at UCSC*. Genome Res, 2002. **12**(6): p. 996-1006.
67. Kim, D.D., et al., *Widespread RNA editing of embedded alu elements in the human transcriptome*. Genome Res, 2004. **14**(9): p. 1719-25.
68. Kimura, K., et al., *Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes*. Genome Res, 2006. **16**(1): p. 55-65.
69. Kiyosawa, H., et al., *Disclosing hidden transcripts: mouse natural sense-antisense transcripts tend to be poly(A) negative and nuclear localized*. Genome Res, 2005. **15**(4): p. 463-74.
70. Krishnamachary, B., et al., *Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1*. Cancer Res, 2003. **63**(5): p. 1138-43.
71. Kumar, M. and G.G. Carmichael, *Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(4): p. 1415-34.
72. Kurebayashi, J., et al., *Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells*. Jpn J Cancer Res, 2001. **92**(10): p. 1093-101.
73. Lambert, A., et al., *The ERPIN server: an interface to profile-based RNA motif identification*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W160-5.

9. Literaturverzeichnis

74. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
75. Lando, D., et al., *FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor*. Genes Dev, 2002. **16**(12): p. 1466-71.
76. Lando, D., et al., *Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch*. Science, 2002. **295**(5556): p. 858-61.
77. Lapidot, M. and Y. Pilpel, *Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms*. EMBO Rep, 2006. **7**(12): p. 1216-22.
78. Laughner, E., et al., *HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3995-4004.
79. Legendre, M. and D. Gautheret, *Sequence determinants in human polyadenylation site selection*. BMC Genomics, 2003. **4**(1): p. 7.
80. Leupin, O., et al., *Transcriptional activation by bidirectional RNA polymerase II elongation over a silent promoter*. EMBO Rep, 2005. **6**(10): p. 956-60.
81. Levanon, E.Y., et al., *Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(8): p. 1001-5.
82. Levy, A.P., et al., *Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13333-40.
83. Li, Y.Y., et al., *In silico discovery of human natural antisense transcripts*. BMC Bioinformatics, 2006. **7**: p. 18.
84. Li, Y.Y., et al., *Systematic analysis of head-to-head gene organization: evolutionary conservation and potential biological relevance*. PLoS Comput Biol, 2006. **2**(7): p. e74.
85. Lin, J.M., et al., *Transcription factor binding and modified histones in human bidirectional promoters*. Genome Res, 2007. **17**(6): p. 818-27.
86. Lipman, D.J., *Making (anti)sense of non-coding sequence conservation*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(18): p. 3580-3.
87. Makalowska, I., C.F. Lin, and W. Makalowski, *Overlapping genes in vertebrate genomes*. Comput Biol Chem, 2005. **29**(1): p. 1-12.
88. Makalowska, I., C.F. Lin, and K. Hernandez, *Birth and death of gene overlaps in vertebrates*. BMC Evol Biol, 2007. **7**: p. 193.
89. Makino, Y., et al., *Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 32405-8.
90. Marinescu, V.D., I.S. Kohane, and A. Riva, *MAPPER: a search engine for the computational identification of putative transcription factor binding sites in multiple genomes*. BMC Bioinformatics, 2005. **6**: p. 79.
91. Mattick, J.S. and I.V. Makunin, *Non-coding RNA*. Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 1**: p. R17-29.
92. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature, 1999. **399**(6733): p. 271-5.

9. Literaturverzeichnis

93. Mazo, A., et al., *Transcriptional interference: an unexpected layer of complexity in gene regulation*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 16): p. 2755-61.
94. Monje, D., *Die Erstbeschreibung zweier bisher unbekannter AntiHif1a-Varianten*, in *Abteilung Innere Medizin V Sportmedizin*. 2008, Eberhard-Karls-Universität: Tübingen.
95. Mounier, R., et al., *Leukocyte's Hif-1 expression and training-induced erythropoietic response in swimmers*. Med Sci Sports Exerc, 2006. **38**(8): p. 1410-7.
96. Munroe, S.H. and J. Zhu, *Overlapping transcripts, double-stranded RNA and antisense regulation: a genomic perspective*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(18): p. 2102-18.
97. Nakayama, K., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) gene expression in human ovarian carcinoma*. Cancer Lett, 2002. **176**(2): p. 215-23.
98. Neeman, Y., et al., *Is there any sense in antisense editing?* Trends Genet, 2005. **21**(10): p. 544-7.
99. Newton, C.R.u.G., A., , *PCR*. 1994, Heidelberg, Berlin Spektrum Akademischer Verlag
100. Oeder, S., et al., *Uncovering information on expression of natural antisense transcripts in Affymetrix MOE430 datasets*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 200.
101. Pauler, F.M., M.V. Koerner, and D.P. Barlow, *Silencing by imprinted noncoding RNAs: is transcription the answer?* Trends Genet, 2007. **23**(6): p. 284-92.
102. Pescador, N., et al., *Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene*. Biochem J, 2005. **390**(Pt 1): p. 189-97.
103. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(9): p. e36.
104. Piche, C. and J.P. Schernthaner, *Background priming during reverse transcription by oligo(dT) carried over from mRNA isolation*. Biotechniques, 2003. **34**(4): p. 720-2, 724.
105. Piche, C. and J.P. Schernthaner, *Optimization of in vitro transcription and full-length cDNA synthesis using the T4 bacteriophage gene 32 protein*. J Biomol Tech, 2005. **16**(3): p. 239-47.
106. Poyatos, J.F. and L.D. Hurst, *Is optimal gene order impossible?* Trends Genet, 2006. **22**(8): p. 420-3.
107. Prasanth, K.V. and D.L. Spector, *Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the 'genome complexity' conundrum*. Genes Dev, 2007. **21**(1): p. 11-42.
108. Purmann, A., et al., *Genomic organization of transcriptomes in mammals: Coregulation and cofunctionality*. Genomics, 2007. **89**(5): p. 580-7.
109. Quere, R., et al., *Mining SAGE data allows large-scale, sensitive screening of antisense transcript expression*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(20): p. e163.

9. Literaturverzeichnis

110. Ravi, R., et al., *Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha*. Genes Dev, 2000. **14**(1): p. 34-44.
111. Rein, A., L.E. Henderson, and J.G. Levin, *Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(8): p. 297-301.
112. Reyes, H., S. Reisz-Porszasz, and O. Hankinson, *Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor*. Science, 1992. **256**(5060): p. 1193-5.
113. Rossignol, F., C. Vache, and E. Clottes, *Natural antisense transcripts of hypoxia-inducible factor 1alpha are detected in different normal and tumour human tissues*. Gene, 2002. **299**(1-2): p. 135-40.
114. Rossignol, F., et al., *Natural antisense transcripts of HIF-1alpha are conserved in rodents*. Gene, 2004. **339**: p. 121-30.
115. Rozen, S. and H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, 2000. **132**: p. 365-86.
116. Ruas, J.L., L. Poellinger, and T. Pereira, *Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38723-30.
117. Salceda, S. and J. Caro, *Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes*. J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22642-7.
118. Salnikow, K., et al., *Hyperinducibility of hypoxia-responsive genes without p53/p21-dependent checkpoint in aggressive prostate cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(20): p. 5630-4.
119. Schroedl, C., et al., *Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(5): p. L922-31.
120. Semenza, G.L., et al., *Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5680-4.
121. Semenza, G.L., *Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 551-78.
122. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
123. Semon, M. and L. Duret, *Evolutionary origin and maintenance of coexpressed gene clusters in mammals*. Mol Biol Evol, 2006. **23**(9): p. 1715-23.
124. Shabalina, S.A. and N.A. Spiridonov, *The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences*. Genome Biol, 2004. **5**(4): p. 105.
125. Shearwin, K.E., B.P. Callen, and J.B. Egan, *Transcriptional interference--a crash course*. Trends Genet, 2005. **21**(6): p. 339-45.
126. Shendure, J. and G.M. Church, *Computational discovery of sense-antisense transcription in the human and mouse genomes*. Genome Biol, 2002. **3**(9): p. RESEARCH0044.

9. Literaturverzeichnis

127. Shintani, S., et al., *Origin of gene overlap: the case of TCP1 and ACAT2*. Genetics, 1999. **152**(2): p. 743-54.
128. Simon, P., *Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data*. Bioinformatics, 2003. **19**(11): p. 1439-40.
129. Sondergaard, K.L., et al., *Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in tumours of patients with glioblastoma*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2002. **28**(3): p. 210-7.
130. Sproul, D., N. Gilbert, and W.A. Bickmore, *The role of chromatin structure in regulating the expression of clustered genes*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(10): p. 775-81.
131. St Laurent, G., 3rd and C. Wahlestedt, *Noncoding RNAs: couplers of analog and digital information in nervous system function?* Trends Neurosci, 2007. **30**(12): p. 612-21.
132. Stahlberg, A., et al., *Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification*. Clin Chem, 2004. **50**(3): p. 509-15.
133. Stahlberg, A., M. Kubista, and M. Pfaffl, *Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis*. Clin Chem, 2004. **50**(9): p. 1678-80.
134. Sun, M., et al., *Evidence for variation in abundance of antisense transcripts between multicellular animals but no relationship between antisense transcription and organismic complexity*. Genome Res, 2006. **16**(7): p. 922-33.
135. Suzuki, H., A. Tomida, and T. Tsuruo, *Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia*. Oncogene, 2001. **20**(41): p. 5779-88.
136. Thrash-Bingham, C.A. and K.D. Tartof, *aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(2): p. 143-51.
137. Tian, H., S.L. McKnight, and D.W. Russell, *Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells*. Genes Dev, 1997. **11**(1): p. 72-82.
138. Tian, H., et al., *The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development*. Genes Dev, 1998. **12**(21): p. 3320-4.
139. Timmons, J.A. and L. Good, *Does everything now make (anti)sense?* Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 6): p. 1148-50.
140. Timofeeva, A.V. and N.A. Skrypina, *Background activity of reverse transcriptases*. Biotechniques, 2001. **30**(1): p. 22-4, 26, 28.
141. Trinklein, N.D., et al., *An abundance of bidirectional promoters in the human genome*. Genome Res, 2004. **14**(1): p. 62-6.
142. Uchida, T., et al., *Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14871-8.
143. Vallon-Christersson, J., et al., *Non-coding antisense transcription detected by conventional and single-stranded cDNA microarray*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 295.

9. Literaturverzeichnis

144. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
145. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
146. Vu, H.L., et al., *A method for quantification of absolute amounts of nucleic acids by (RT)-PCR and a new mathematical model for data analysis*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(7): p. E18.
147. Wahl, M.B., U. Heinzmann, and K. Imai, *LongSAGE analysis revealed the presence of a large number of novel antisense genes in the mouse genome*. Bioinformatics, 2005. **21**(8): p. 1389-92.
148. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1995. **270**(3): p. 1230-7.
149. Wenger, R.H., et al., *Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia-inducible factor-1 alpha*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **223**(1): p. 54-9.
150. Wenger, R.H., *Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation*. J Exp Biol, 2000. **203**(Pt 8): p. 1253-63.
151. Wenger, R.H., D.P. Stiehl, and G. Camenisch, *Integration of oxygen signaling at the consensus HRE*. Sci STKE, 2005. **2005**(306): p. re12.
152. Werner, A., et al., *Expression profiling of antisense transcripts on DNA arrays*. Physiol Genomics, 2007. **28**(3): p. 294-300.
153. Whitehouse, I., et al., *Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription*. Nature, 2007. **450**(7172): p. 1031-5.
154. Willingham, A.T. and T.R. Gingeras, *TUF love for "junk" DNA*. Cell, 2006. **125**(7): p. 1215-20.
155. Yang, P.K. and M.I. Kuroda, *Noncoding RNAs and intranuclear positioning in monoallelic gene expression*. Cell, 2007. **128**(4): p. 777-86.
156. Yelin, R., et al., *Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(4): p. 379-86.
157. Yu, F., et al., *HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9630-5.
158. Zarudnaya, M.I., et al., *Downstream elements of mammalian pre-mRNA polyadenylation signals: primary, secondary and higher-order structures*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(5): p. 1375-86.
159. Zhang, Y., et al., *Genome-wide in silico identification and analysis of cis natural antisense transcripts (cis-NATs) in ten species*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(12): p. 3465-75.
160. Zolk, O., et al., *Activation of negative regulators of the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in human end-stage heart failure*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **376**(2): p. 315-20.
161. Zuker, M., *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3406-15.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Abteilung für Sportmedizin der Eberhard Karls Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. A. M. Niess ermöglicht, wofür ich mich bedanken möchte.

Im Besonderen danke ich Dr. med. Dr. rer. nat. P. Simon für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine stetige Ansprechbarkeit und sehr gute Betreuung, seine Geduld und Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Stunden, die er in diese Arbeit investierte.

Mein außerordentlicher Dank gilt dem Labor der Sportmedizin Tübingen. Ganz besonders verpflichtet bin ich T. Beiter für seinen fachlichen Beistand, die viele Geduld und Freude an der Arbeit, humorvolle Stunden, sowie die Erweiterung meiner Allgemeinbildung.

Frau L. Stockinger, sowie allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Sportmedizin möchte ich für die hilfsbereite Zusammenarbeit und die kollegiale Unterstützung danken.

Vielen Dank an die zahlreichen Personen, die aus den verschiedenen Laboren Gerätschaften und Proben zur Verfügung stellten. Besonderer Dank geht dabei an das physiologische Institut und das Labor der Thorax-Herz-Gefäß-Chirurgie, sowie der Transfusionsmedizin, die durch ihre Erlaubnis, Geräte und Räume zu benutzen, die durchgeführten Versuche erst ermöglichten.

Vielen Dank an Frau PD Dr. Cora Weigert, Frau Dr. Karin Schilbach-Stückle und Herrn Dr. Axel Merseburger für die freundliche Bereitstellung vieler Proben.

Ich danke meinen Eltern und meinem Bruder für ihre Unterstützung.

Für die Erhaltung meines sozialen Umfeldes, viel Essen und Ablenkung danke ich „meinen Mädels“, die mit Geduld alle Launen ertrugen. Danke an Donat für seine Unterstützung und danke an Christoph für die tägliche virtuelle Begleitung.

Abgesehen von den hier persönlich genannten vielen herzlichen Dank an meine Familie, Freunde und Bekannte, die die Sorgen, Höhenflüge und Nöte dieser Arbeit mit mir teilten, Verständnis zeigten und Geduld mit mir hatten.