

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE
PROF. DR. MED. ROLAND SEIFERT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Komplexe Veränderungen in der Genexpression der
Ecto-Nukleosid-5'-Triphosphat-Diphosphohydrolase bei
Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase Defizienz**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Veronika Lorenz

2008

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE
PROF. DR. MED. ROLAND SEIFERT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Komplexe Veränderungen in der Genexpression der
Ecto-Nukleosid-5'-Triphosphat-Diphosphohydrolase bei
Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase Defizienz**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Veronika Lorenz

2008

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter	Prof. Dr. Roland Seifert
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ludwig Aigner
Tag der mündlichen Prüfung:	06.03.2009

LNS	Lesch-Nyhan-Syndrom
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
APRT	Adenosin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
PPRT	Pyrophosphatribosyltransferase
PPRP	Pyrophosphoribosylphosphat
DNA	Desoxynukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
RNA	Ribonukleinsäure
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
IMP	Inosin-5'-monophosphat
FBS	Fetales Bovines Serum (Rinderserum)
L-GI	L-Glutamin
NTPDase	Ecto-Nukleosid 5'-Triphosphat-Diphosphohydrolase
PS	Penicillin G und Streptomycinsulfat
TAE	Trisacetat-EDTA-Puffer

1. Einleitung.....	5
1.1 Das Lesch-Nyhan-Syndrom	5
1.1.1 Historie	5
1.1.2 Molekulare Grundlagen	6
1.1.3 Biochemische Grundlagen	7
1.1.4 HPRT-Defizienz.....	9
1.1.5 Therapie und Prognose	12
1.2 Die Rolle der Ectonukleotidasen	13
2. Fragestellung.....	15
3. Material und Methoden.....	17
3.1 Chemikalien und Reagenzien	17
3.2 Verbrauchsmaterial	17
3.3 Geräte	18
3.4 Kits für die Molekularbiologie	18
3.5 Molekulargewichtsstandards	18
3.6 Enzyme	18
3.7 Primer und Enzyme.....	19
3.8 Zellkulturen, RNA-Isolation.....	20
3.9 RT-PCR.....	23
4. Resultate	26
5. Diskussion	32
6. Literaturverzeichnis	35
7. Publikation.....	40
8. Lebenslauf.....	41
9. Danksagung	42

1 Einleitung

1.1 Das Lesch-Nyhan-Syndrom

1.1.1 Historie

Die erste detaillierte klinische Beschreibung des LNS wurde im Jahre 1964 von Michael Lesch und William Nyhan anhand eines Beispiels zweier Brüder mit Hyperurikämie und einem charakteristischen Verhaltensstörungssyndrom, welches motorische Dysfunktionen und ein selbstverletzendes Verhalten einschloss, vorgelegt (Lesch et al., 1964). Rückblickend wurde dieses Syndrom wahrscheinlich auch schon in früheren Berichten des zwölften Jahrhunderts beschrieben (Beck et al., 1991). 1967 zeigte Seegmiller, dass dieser Erkrankung ein Enzymdefekt der HPRT, welche beim Purinstoffwechsel eine wichtige Rolle spielt, zugrunde liegt und ermöglichte so die Identifikation und Abgrenzung von Patienten mit weniger schweren Ausprägungen des Enzymdefektes (Seegmiller et al., 1967).

Die klinischen Symptome reichen von Hyperurikämie, Gicht, Arthritis, geistiger Retardierung über Dystonie, Spasmus, gestörte motorische Entwicklung bis hin zu zwanghafter Selbstverstümmelung.



Abb.1.: Selbstverstümmelungen bei LNS Patienten, Abgebissene Unterlippe (Leiber:Die klinischen Syndrome, 1996, Aufl. 8, 471)

Man kann die klinischen Symptome in drei allgemeine Kategorien einteilen: Erstens eine Überproduktion an Harnsäure und die daraus resultierenden Konsequenzen, zweitens neurologische Manifestationen welche eine Dysfunktion des Nervensystems aufzeigen und drittens eine Mischkategorie, welche Wachstumsstörungen und eine Anämie beinhaltet (Jinnah et al., 2001).

Zwischen der Enzymaktivität und der Ausprägung der klinischen Symptome besteht ein Zusammenhang (Page et al., 1981). Bei einer maximalen Restaktivität von 1,5% der HPRT spricht man von dem klassischen LNS mit starker Überproduktion von Harnsäure und dem typischen autoaggressiven Verhaltensmuster. Patienten mit einer Restaktivität von 1,5-8% zeigen ebenfalls eine Überproduktion von Harnsäure, allerdings sind die neurologischen Symptome und Verhaltensabnormitäten weniger stark ausgeprägt und autoaggressives Verhalten fehlt gänzlich. Hierbei spricht man von einer neurologischen Variante der HPRT-Defizienz (Kelley et al., 1969).

1.1.2 Molekulare Grundlagen

LNS ist eine X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung mit einer Inzidenz von ca. 1:100 000, jedoch können auch Spontanmutationen, ohne erbliche Genese zu dieser Erkrankung führen. Es sind hauptsächlich Jungen betroffen, allerdings gibt es auch sehr seltene Fälle, in denen Mädchen an LNS erkrankten (Hara et al., 1982). Die Erkrankung resultiert in einer Mutation des HPRT-Gens, welches 45kb am distalen Ende des langen Armes des X-Chromosomes umfasst (Shows et al., 1975). Mehr als 200 genetische Mutationen können für diese Erkrankung verantwortlich sein (Nyhan 1997). Es existiert nur eine funktionsfähige Kopie des HPRT-Genes auf dem X-Chromosom, wogegen Pseudogene auf den Chromosomen 3, 5 und 11 vorhanden sind, die jedoch nicht abgeschrieben werden können (Patel et al., 1984). HPRT wird

ubiquitär in allen Geweben des Körpers exprimiert, in den Basalganglien des Gehirns lassen sich jedoch die höchsten Aktivitäten messen (Jinnah et al. 2001).

1.1.3 Biochemische Grundlagen

HPRT besitzt eine große Bedeutung im Purinstoffwechsel des DNA-Metabolismus. Purine bilden eine Gruppe von Molekülen mit diversen Aufgaben in der Zellphysiologie. Sie spielen eine wichtige Rolle in energieabhängigen Reaktionen, der Nukleinsäuresynthese, verschiedenen Cofaktor-Reaktionen und in der inter- und intrazellulären Kommunikation (Murray, 1971). Abbildung 2 zeigt die Stoffwechselwege der Synthese, der Verwertung und des Abbaus von Purinen.

Im Allgemeinen gewinnt der Körper zelluläre Purine aus drei unterschiedlichen Abläufen. Zum einen durch die *de novo* Synthese aus kleineren organischen Molekülen, welche sich aus energetischer Sicht jedoch als sehr aufwändig darstellt. Zweitens durch die Wiederverwertung bereits vorgeformter Purinbasen und drittens durch die Aufnahme aus der extrazellulären Umgebung. Der Weg des Recyclings von Purinen wird im menschlichen Körper durch die drei Enzyme HPRT, APRT und Adenosinkinase vermittelt. Purine, die beim Stoffwechsel von Mono- und Polynukleotiden, sowie durch intestinale Resorption anfallen, werden in erheblichem Umfang wiederverwertet. Dieser, auch als Reutilisierung (salvage pathway) bezeichnete Vorgang, ist für den Organismus von beträchtlichem Vorteil, da auf diese Weise Energie eingespart wird. Man schätzt, dass ca. 90% der freien Purine, welche während des intrazellulären Metabolismus entstanden sind, vorwiegend über diesen Weg wiederverwertet (recycled) und nicht abgebaut oder ausgeschieden werden (Murray, 1971).

Abbildung 2 zeigt eine Übersicht des Purinstoffwechsels:

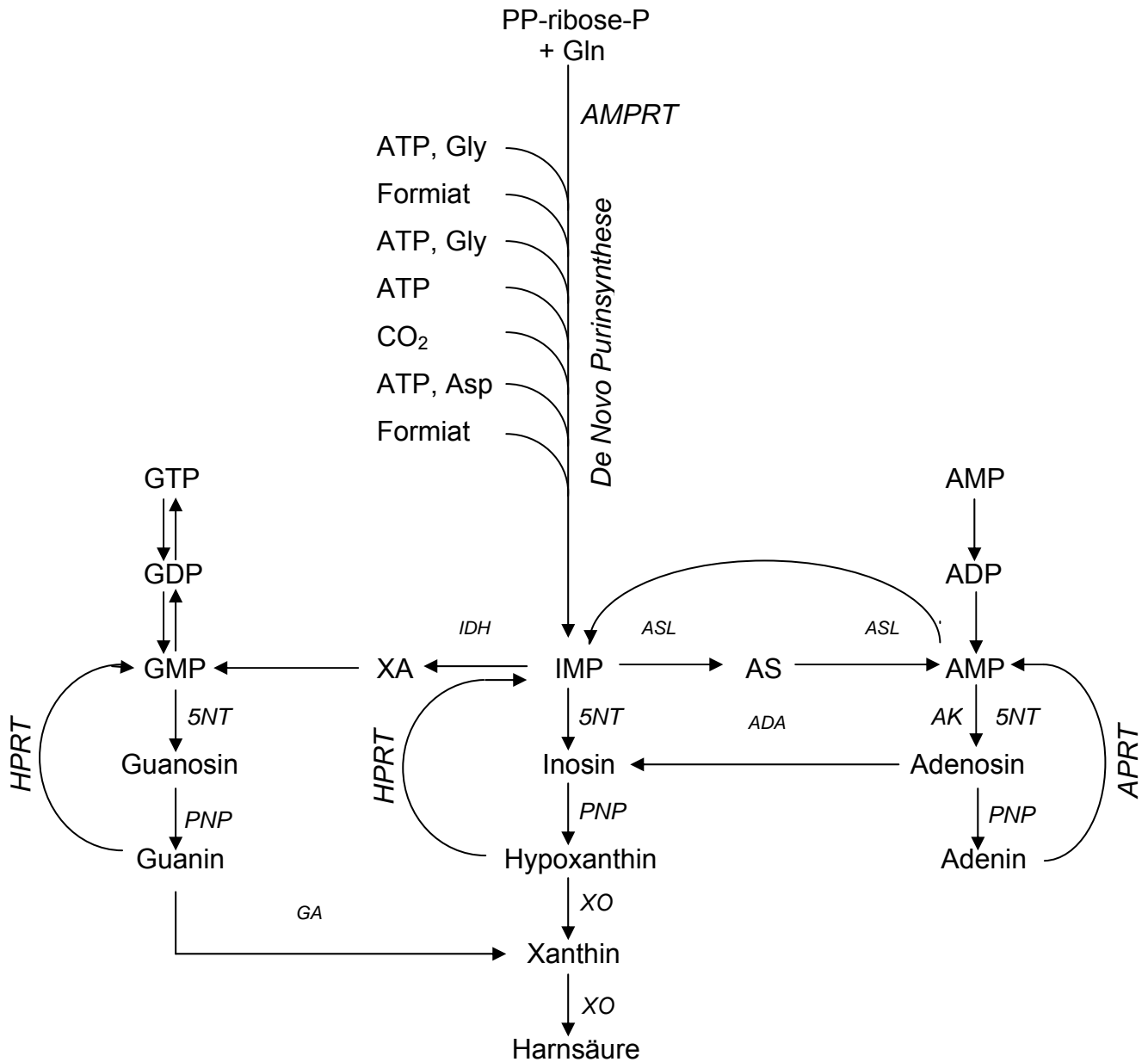


Abb.2.: Die Rolle von HPRT im Purinstoffwechsel.

Verwendete Abkürzungen: 5NT, 5'-Nukleotidase; ADA, Adenosindeaminase; ADP, Adenosindiphosphat; AK, Adenosinkinase; AMP, Adenosinmonophosphat; AMPRT, Amidophosphoribosyltransferase; APRT, Adenin-Phosphoribosyltransferase; AS, Adenylsuccinat; ASL, Adenin-Succinatsynthetase/-lyase; ATP, Adenosin-5'-triphosphat; GA, Guanase; GDP, Guanidin-5'-diphosphat; Gln, Glutamin; Gly, Glycin; GMP, Guanidin-5'-monophosphat; GTP, Guanidin-5'-triphosphat; HPRT, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase; IDH, IMP-Dehydrogenase; IMP, Inosinmonophosphat; PNP, Purin-Nukleosid-Phosphorylase; PP-ribose-P, Phosphoribosylpyrophosphatase; XA, Xanthylacetat; XO, Xanthinoxidase.

HPRT dient dazu, freies Guanin und Hypoxanthin in GMP und IMP zurück zu überführen (Abb. 2). Dieses Enzym verwendet statt ATP die Energie der Phosphodiesterbindung für die Katalyse. Es katalysiert den Transfer der 5-Phosphoribosylgruppe des PPRP auf die 9. Position des Hypoxanthins/Guanins in Anwesenheit von Magnesium um das erwartete Nukleotid zu bilden (Jinnah et al., 2001).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Aufrechterhaltung der zellulären Purinbilanz beinhaltet die Aufnahme freier Purinbasen und Nukleoside, welche durch die Verdauung von pflanzlicher oder tierischer DNA bzw. RNA entstanden sind. Diese gelangen zum Teil vom Magen über den Blutweg an die Leber, um dort in den oben beschriebenen Stoffwechselwegen wiederverwertet zu werden. Von dort aus gelangen diese dann wiederum über den Blutweg zu den entsprechenden Geweben (Murray, 1971; Pritchard et al., 1970).

Somit resultiert ein Enzymdefekt des salvage pathway nicht nur in der fehlenden Wiederverwertung von Purinen aus dem intrazellulären Metabolismus, sondern auch in einer Unfähigkeit, Purine aus extrazellulären Quellen aufzunehmen und weiterzuverwenden (Jinnah et al., 2001).

1.1.4 HPRT-Defizienz

1.1.4.1 Akkumulation von Oxypurinen

Die Abwesenheit von HPRT resultiert in einer Anhäufung der Substrate Hypoxanthin und Guanin. Da kein anderer Stoffwechselweg für die Weiterverwertung dieser Substrate existiert, kommt es zum Abbau und zur Ausscheidung. Im Blut werden Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure abgebaut und danach über den Urin ausgeschieden. Im Blut und Urin von LNS-Patienten verbleiben allerdings erhöhte Konzentrationen an Hypoxanthin und Xanthin, was die unvollständige

Verstoffwechslung dieser Purine zu Harnsäure widerspiegelt (Sweetman et al., 1970).

Da im Gehirn hohe Konzentrationen an Guanase vorherrschen, wird ein Großteil des im Gehirn produzierten Guanins zu Xanthin abgebaut. LNS-Patienten scheiden über die cerebrospinale Flüssigkeit die vier- bis fünffache Menge an Hypoxanthin aus, während die Konzentration an Xanthin relativ normal ist (Harkness et.al, 1988). Allerdings herrschen im Gehirn geringere Konzentrationen an Xanthinoxidase vor und somit ist der Abbau zu Harnsäure aus Xanthin und Hypoxanthin limitiert. Aus diesem Grund entspricht die Harnsäurekonzentration der cerebrospinalen Flüssigkeit bei LNS-Patienten der eines Gesunden bzw. ist nur leicht erhöht (Rijksen et al., 1981).

1.1.4.2 Erhöhung der intrazellulären PPRP Konzentration

Zum einen kommt es durch die fehlende Weiterverwertung von PPRP durch HPRT zu einer Anhäufung dieses Substrates. Zusätzlich kommt es zu einer weiteren Erhöhung der PPRP-Konzentration durch eine erhöhte Aktivität der PPRP-Synthetase in HPRT-defizienten Zellen. Diese erhöhten Konzentrationen an PPRP sind indirekt verantwortlich für die Aktivitätserhöhung anderer Enzyme, welche PPRP als Substrat nutzen, wie z.B. APRT. Man nennt dies das Phänomen der Substratstabilisierung (Jinnah et al. 2001).

1.1.4.3 Purinstoffwechsel

Da HPRT eine große Rolle in der Wiederverwertung der Purine spielt, erscheint es wahrscheinlich, dass ein Defekt dieses Enzymes zu einer Abnahme der Purinkonzentration und damit zu einer intrazellulären Purinverarmung führt (Raivio et al., 1973). Jedoch konnte keine definitive Abnahme in Studien mit Blutzellen von

Patienten, HPRT-defizienten Zellen *in vitro* oder HPRT-defizienten Mäusen nachgewiesen werden.

Darüberhinaus haben Studien gezeigt, dass mit der Anhäufung der HPRT-Substrate und dem möglichen Mangel an Purinen eine deutliche Erhöhung der *de novo* Purinsynthese verbunden ist. Somit ist die Kombination aus erhöhter Purinsynthese und dem Versagen der Purinwiederverwertung für die starke Überproduktion von Harnsäure bei HPRT-Defizienz verantwortlich (Jinnah et al. 2001).

1.1.4.4 Pathophysiologie

Renale Dysfunktion:

Die eingeschränkte Nierenfunktion bei LNS-Patienten hängt mit einer Nephropathie zusammen, welche möglicherweise aus den erhöhten Harnsäurewerten und/oder einer direkten Schädigung der Enzymdefizienz auf die Nierenfunktion resultiert. Es zeigten sich radioluzente Nierensteine, welche sich aus Harnsäure, Xanthin, Hypoxanthin und Oxypurinol zusammensetzten (Rosenfeld et al., 1994)

Neurologie:

Eine Gehirndystrophie mit einer Erweiterung der Liquorräume konnte in den meisten Fällen von Untersuchungen festgestellt werden. Quantitative Untersuchungsmethoden zeigten eine bevorzugte Beteiligung der Basalganglien. Die gleichzeitige Ausdehnung der cranialen Sinus deutet daraufhin, dass der Volumenmangel auf eine mangelhafte Entwicklung des Gehirns zurückzuführen ist und es sich nicht um einen degenerativen Prozess im Sinne einer Atrophie handelt (Harris et al., 1998).

Dopamin:

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass HPRT-Defizienz mit Veränderungen der Neurochemie der Monoamine, im Speziellen Dopamin, in Zusammenhang steht. HPRT-Defizienz verursacht signifikante Dysfunktionen von neuronalen Systemen, welche Dopamin als Neurotransmitter benutzen. Obwohl der Dopaminanteil in den mittleren Gehirnregionen von LNS Patienten nicht signifikant erniedrigt ist, was zu der Annahme führt, dass Dopaminneurone dieser Region intakt seien, so sind jedoch die neuronalen Fasern der Dopaminneurone, welche zu den Basalganglien führen, reduziert (Lloyd et al., 1981). Autopsieberichte von Gehirnen von LNS-Patienten belegen, dass der Dopaminanteil in den Basalganglien um 80% geringer ist als in gesunden Gehirnen (Preston 2007). Die Mechanismen, welche diese Störung der Dopaminsysteme verursachen, bleiben rätselhaft, da bis jetzt noch kein direkter Zusammenhang zwischen den biochemischen Funktionen von HPRT und dem Dopaminstoffwechsel bekannt ist (Jinnah et al., 2001).

Neuropathogenese:

Es existiert eine Fülle an Hypothesen, welche die neurologisch bedingten Verhaltensabnormalitäten im Rahmen der HPRT-Defizienz zu erklären versuchen. Man kann diese Hypothesen in zwei Kategorien einteilen, die eine setzt voraus, dass die Anhäufung von überschüssigen Metaboliten einen neurotoxischen Effekt ausüben, wogegen die zweite den Mangel eines Metaboliten für die Dysfunktion und die Fehlentwicklung verantwortlich macht.

1.1.5 Therapie und Prognose

Das Lesch-Nyhan-Syndrom ist bis jetzt nicht ursächlich heilbar. Durch die Behandlung mit die Purinsynthese hemmenden Medikamenten (Allopurinol) und

einer speziellen Diät sind die Symptome zum Teil behandelbar. 5-Hydroxytryptophan-Gaben können die Athetose bessern. In manchen Fällen ist eine vorbeugende Entfernung sowohl der Milch-, als auch der bleibenden Zähne notwendig. Unbehandelt sterben Jungen mit dem Lesch-Nyhan-Syndrom innerhalb der ersten Lebensjahre und erreichen das Jugendalter nicht. Neue Ansätze basierend auf Tiefenhirnstimulation versprechen Linderung der Symptome bis hin zum kompletten Einstellen der Selbstattacken (Jinnah et al., 2001).

1.2 Die Rolle der Ectonukleotidasen

Nukleotide wie ATP, ADP, UTP und die Diadenosin-Pyrophosphate sind extrazelluläre Signalmoleküle im Gehirn und anderen Geweben. Auf der Zelloberfläche lokalisierte Enzyme katalysieren die Hydrolyse dieser Nukleotide und begrenzen somit deren räumlich-zeitliche Aktivität. Hierzu zählen die 6 Isoenzyme aus der Familie der NTPDasen, welche Nucleosid-5'-triphosphate und Nucleosid-5'-diphosphate hydrolysieren können, obgleich variierender Präferenz für die unterschiedlichen Nucleotide (Abb.3). Als Endprodukt entstehen das Nucleosid und Phosphat.

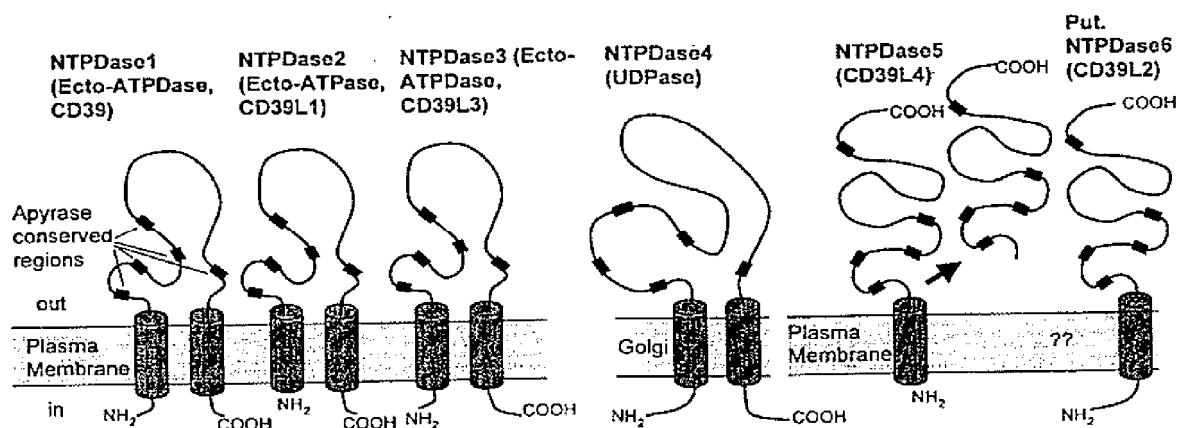


Abb 3: Übersicht über die Ectonukleotidasen (NTPDase 1-6) und deren Lokalisation auf der Zelloberfläche (Quelle: Herbert Zimmermann (2000): Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362:299-309

Alle 6 Isoformen besitzen jeweils fünf höchst konstante Sequenzbereiche („Apyrase conserved regions“), welche möglicherweise ausschlaggebend für die katalytische Aktivität sind. Über deren Membranlokalisation kann man die 6 Isoformen in zwei Hauptgruppen einteilen, die erste umfasst NTPDase 1-4, da diese jeweils am C- und N-Terminus Transmembrandomänen besitzen. Die zweite Gruppe beinhaltet NTPDase 5 und 6, welche nur über eine Transmembrandomäne am N-Terminus verfügen, es fehlt der hydrophobe Bereich am C-terminus (Zimmermann, 2000).

2 Fragestellung

Der Zusammenhang zwischen der HPRT-Defizienz und den neurologisch bedingten Verhaltenssymptomen ist bis jetzt unbekannt. Um die biochemischen Grundlagen der Symptome bei LNS zu erforschen, wurde eine HPRT-knockout Maus erzeugt (Williamson et al., 1992). Sowohl bei LNS-Patienten, als auch bei der Knockout-Maus besteht eine Veränderung der dopaminergen Neurotransmission (Jinnah et al., 1994; Wong et al., 1996). Zusätzlich wurden bestimmte HPRT-defiziente Zelllinien, wie primäre humane Fibroblasten der Haut, immortalisierte Fibroblasten der Maushaut, Neuroblastomzellen der Maus (Neuro2a) und der Ratte (B103), als biochemische Modelle für LNS verwendet (Zoref-Shani et al., 1993; Connolly et al., 2001; Fairbanks et al., 2002; Pinto et al., 2005; Pinto und Seifert, 2006).

In einer neueren Studie wurde gezeigt, dass die Aktivität der Nucleosid-5'-triphosphatase (NTPase) auf den Zellmembranen der B103 und Neuro2a-Zelllinien bei den HPRT-defizienten Zellen erniedrigt ist (Pinto et al., 2005). Im Gegensatz dazu ist die Aktivität bei Maushaut-Fibroblasten bei den HPRT-defizienten Zellen erhöht. Demnach stellt die Veränderung der NTPDase-Aktivität ein Merkmal der HPRT-Defizienz dar und diese Abweichungen sind vom Zelltyp und von der Zellspezies abhängig. Jedoch ist es schwierig, die molekulare Identität der NTPDase(n) in komplexen Systemen durch Messung der Enzymaktivität aufzudecken. Besonders bei Analysen der Enzymaktivität mit verschiedenen Substraten und Inhibitoren konnte eine monophasische Kinetik in den Kontroll- und HPRT-defizienten Zellen beobachtet werden (Pinto et al., 2005), was auf ein definiertes Protein hinweist, das die beobachtete Aktivität bedingt. Jedoch wird bei diesen biochemischen Analysen ein potentiell geringer Anteil von multiplen Proteinspezies zur gesamten Enzymkinetik vernachlässigt.

Für die Veränderungen der NTPDase-Aktivität bei HPRT-Defizienz stellt die Genfamilie der Ecto-nucleosid 5'-triphosphat Diphosphohydrolase einen potentiell verantwortlichen Kandidaten dar (Zimmermann 2002; Robson et al., 2006). In der Tat existieren Hinweise darauf, dass diese Enzyme eine Rolle in der neuronalen Entwicklung spielen, welche bei LNS gestört ist, und in der Regulation der Signaltransduktion, welche über purinerge Rezeptoren vermittelt wird. Es ist ebenfalls eine aktuelle Erkenntnis, dass verschiedene Isoformen der NTPDasen unterschiedlich klare Rollen in der neuronalen Entwicklung und Signaltransduktion spielen (Zimmermann 2002; Robson et al., 2006). Hierfür untersuchten wir die Genexpression mittels Reversertranskription und Polymerasekettenreaktion der NTPDasen 1-6 in B103-Zellen, Neuro2a-Zellen und Fibroblasten.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich, Steinheim
DMEM-Fertigmedium	Pan Biotech, Aidenbach
dNTP-Mix	Promega, Madison, WI (USA)
EMEM-Fertigmedium	Pan Biotech, Aidenbach
Ethanol	Merck, Darmstadt
gereinigtes Wasser Milli-Q	Millipore, Neu-Isenburg
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison, WI (USA)
SeaKem LE Agarose	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Tween 20	Sigma Aldrich, Steinheim

3.2 Verbrauchsmaterial

Gewebekulturflaschen (12 cm ² /25 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflaschen (6-well/24-well)	Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Gefäße (0,2 ml/0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, diverse Größen	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße (1,5 ml/2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

3.3 Geräte

Analysenwaage	BP 211D	Sartorius, Göttingen
Autoklav	KSG 112	KSG, Olching
Geldokumentation	BDA Digital	Biometra, Göttingen
Inkubationsschüttler	Classic C24	New Brunswick, USA
PCR-Gerät	T1-Thermocycler	Biometra, Göttingen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Vortexgerät	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Zentrifugen	Centrifuge 541	Eppendorf, Hamburg

3.4 Kits für die Molekularbiologie

QiaEXII	Qiagen, Hilden
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
cDNA Synthesis Kit	GE Healthcare, München

3.5 Molekulargewichtsstandards

100bp DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt
1kb DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt

3.6 Enzyme

<i>Taq</i> -Isopolymerase	Qiagen, Hilden
<i>Pfu-Turbo</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>BsrGI</i>	New England Biolabs, Frankfurt

<i>Accl</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Sacl</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>HincII</i>	New England Biolabs, Frankfurt

3.7 Primer und Enzyme

NTPDase	Forward- und reverse-Primer	Genbank Accession- Nummer	PCR- Produkt Länge	Restriktions- enzym	Schnitt- stelle	DNA-Verdau
1 (rat)	F: 5'-GAT CAT CAC TGG GCA GGA GGA AGG-3' R: 5'-AAG ACA CCG TTG AAG GCA CAC TGG-3'	U81295	542	<i>BsrGI</i>	740/741	302, 239
1 (mouse)	F: 5'-GGC TGT GAT AGC TTT G-3' R: 5'-AGC ATG GGT CCT TAA G-3'	AF037366	763	<i>Accl</i>	377/378	466, 296
3 (rat)	F: 5'-GCT ACT TCA AGT CCC A-3' R: 5'-AAT CAG AAT CCA CTG C-3'	NM_178106	1103	<i>Sacl</i>	1217/1218	732,317
3 (mouse)	F: 5'-GCT ACT TCA AGT CCC A-3' R: 5'-AAT CAG AAT CCA CTG C-3'	AY714060	1103	<i>Sacl</i>	1217/1218	732,317
4 (rat)	F: 5'-ATG GGG AGG ATT GGC A-3' R: 5'-CTT CCT CCA TCC ACA G-3'	XM_34134	1783	<i>HincII</i>	750/751	750, 1033
4 (mouse)	F: 5'-ATG GGG AGG ATT GGC A-3' R: 5'-CTT CCT CCA TCC ACA G-3'	NM_026174	1807	<i>HincII</i>	750/751	750,1057
5 (rat)	F: 5'-TCT TGT CTT CCA TGT G-3' R: 5'-GTT CAC TTT CTT TGT G-3'	NM199394	1117	<i>Sacl</i>	768/769	446, 671
5 (mouse)	F: 5'-TCT TGT CTT CCA TGT G-3' R: 5'-GTT CAC TTT CTT TGT G-3'	NMU238636	1117	<i>Sacl</i>	768/769	446, 671
6 (rat)	F: 5'-GTT CAT CTA TGT TGC C-3' R: 5'-GGG AGT CGA TGT AAT G-3'	AJ277748	1264	<i>HincII</i>	612/613	538, 726
6 (mouse)	F: 5'-GTT CAT CTA TGT TGC C-3' R: 5'-GGG AGT CGA TGT AAT G-3'	NM_172117	1264	<i>HincII</i>	612/613	538, 726

Tabelle 1: Übersicht über verwendete Primer inklusive der zu amplifizierenden Fragmentlängen und passender Restriktionsenzyme mit Schnittstellen und Fragmenten nach dem Restriktionsverdau

3.8 Zellkulturen, RNA-Isolation

Zellen: Immortalisierte Fibroblasten der Maushaut aus gesunden Kontroll- und HPRT-defizienten Knock-out-Mäusen wurden freundlicherweise von Dr. Hyder A. Jinnah (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA) (Pinto et al., 2005) zur Verfügung gestellt, gesunde und HPRT-defiziente B103 Zellen der Ratte von Dr. Esther Zoref-Shani (Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel). Neuro2a Zellen von gesunden Kontrollmäusen und HPRT-defizienten Mäusen wurden von Dr. Tatsuo Takahashi (Japan Health Science Foundation, Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt.

Zellkulturen: Die oben beschriebenen Zellstämme wurden bei -80°C eingefroren und dienten als Zellreservoir für die weiteren Untersuchungen. Die eingefrorenen Zellen wurden nach Entnahme aus der Kühltruhe bis zum Auftauen in flüssigem Stickstoff gelagert. Für jede Zellsorte wurde ein eigenes Nährmedium hergestellt, bestehend aus DMEM bzw. EMEM und den Zusätzen FBS (10%), L-Gl (1%) und PS (1%), somit konnte eine Vermischung von Kontrollzellen und kranken Zellen durch Verschleppung bei der Zugabe der Nährmedien ausgeschlossen werden. Nach schnellem Auftauen und zügigem Pipettieren der Zellen in die mit Nährmedium gefüllten Röhrchen wurden die Zellen bei 1000 Umdrehungen/min und 24°C für 5 min. abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes verblieben die gereinigten Zellen am Röhrchenboden, welche danach wieder mit Nährmedium vermischt wurden. Die so entstandene Zellsuspension wurde auf den Boden eines Zellkulturbehälters aufgebracht und in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Die HPRT-defizienten Zellen wurden mit 6-Thioguanin ($100\ \mu\text{M}$) versetzt, welches aufgrund des HPRT-Defektes nicht in die DNA eingebaut werden konnte und somit ausschließlich ein Überleben der HPRT-defizienten Zellen ermöglichte.

Das Anwachsen der adhärennten Zellen wurde täglich unter dem Lichtmikroskop kontrolliert, sowie ein Wechsel des Nährmediums durchgeführt. Sobald sich unter dem Lichtmikroskop ein dichter Zellrasen am Boden des Behälters zeigte, wurde die Kultur geteilt.

Um die Zellkultur zu teilen wurden 3-5 ml Trypsin auf die Zellkultur aufgebracht, um ein Ablösen der festgewachsenen Zellen zu erreichen. Der Zellkulturbehälter wurde einige Male geschwenkt und dann für 1-2 min zurück in den Brutschrank gestellt. Die so entstandene Zell-Trypsin-Lösung wurde abpipettiert und in ein mit Nährmedium gefülltes Röhrchen pipettiert. Nach Zentrifugieren der Lösung bei 1000 Umdrehungen/min und 24°C für 5 min wurde der Überstand abgesaugt und das am Boden verbliebene Zellsediment wieder in Nährmedium gelöst um jetzt, je nach Verdünnungswunsch, auf mehrere Zellkulturbehältnisse verteilt zu werden.

Somit konnte nach der Ernte der Zellen eines Zellkulturbehälters ein Zellkulturbehälter mit verdünnter Zellpopulation für die nächste Ernte weiterwachsen. Die Zellernte wurde vorgenommen, sobald man unter dem Lichtmikroskop nach vorangegangenem Teilen einen dichten Zellrasen sehen konnte.

Aus B103-, Neuro2a- und Fibroblasten-Zellkulturen wurde nach 4-6 Tagen die gesamte mRNA mit Qiagen RNA-Extraction-Kit isoliert, wobei mit der Zellhomonisierung, der DNA-Auswaschung und der RNA-Aufreinigung in drei Schritten vorgegangen wurde. Zuerst wurde ein Lysepuffer (RLT-Puffer) zur Zerstörung der Zellmembranen aus Mercaptoethanol und RLT-Puffer (Qiagen) hergestellt. Dies wurde auf die Zellkultur pipettiert und geschwenkt. Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden des Behälters abgelöst. Die Mischung aus RLT-Puffer und gelösten Zellen wurde abpipettiert und in ein Eppendorf-Gefäß (Midi Cup) gefüllt. Die Lösung wurde durch zweimaliges, je 15 Sekunden andauerndes, Eintauchen in den Stab des SonoPlus Gerätes per

Ultraschall homogenisiert und danach für 5-8 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Bearbeitung in ein neues Röhrchen gegeben, der sich am Boden gebildete Niederschlag, bestehend aus unbrauchbaren Zellfragmenten, wurde verworfen. 1 Volumina Ethanol wurde dem abpipettierten Überstand zugesetzt und mittels Pipette mit dem Lysat vermischt. Zur DNA-Auswaschung wurden die im Kit befindlichen RNeasy Säulen verwendet. Diese Säulen wurden mit der Ethanol-Lysat-Lösung beladen und für 1 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert, wobei der Durchlauf verworfen wurde. Danach wurde der im Kit befindliche RW1-Puffer auf die Säulen pipettiert und wiederum für 1 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert, das Sammelröhrchen wurde daraufhin gegen ein neues ausgetauscht. Ein weiterer im Kit befindlicher Puffer (RPE-Puffer) wurde zugegeben und wiederum abzentrifugiert, dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Danach konnte von einer relativ sauberen DNA-Auswaschung ausgegangen werden und mit dem Lösen der im Filter der RNeasy-Säule befindlichen RNA fortgefahren werden. Dies wurde mittels 30 µl RNase-freiem Wasser durchgeführt, welches auf die Filtermitte pipettiert, 2 Minuten lang inkubiert und danach abzentrifugiert wurde. Vor dem Zentrifugieren wurde das Sammelröhrchen durch ein Eppendorfgesäß (1,5 ml) ersetzt. Im Durchlauf befand sich nun die aus den geernteten Zellen extrahierte RNA. Um die Ausbeute zu verbessern, konnte der letzte Schritt 1-2 mal wiederholt werden. Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden 5 µl Eluat auf 100 µl RNase-freies Wasser pipettiert, so dass über Berechnungen exakt 2 µg RNA in den weiteren Reaktionen eingesetzt werden konnten.

3.9 RT-PCR

Da sich RNA nicht direkt durch Einsatz der PCR amplifizieren lässt, muss diese vorab in cDNA überschrieben werden. Erreicht wird dies durch die reverse Transkription.

Nach Extinktionsmessungen am Photometer wurden 2 µg RNA eingesetzt, ad 9 µl mit DEPC-Wasser versetzt und nach Zugabe von 1 µl oligo-dT für fünf Minuten bei 65°C in den Thermocycler gestellt. Anschließend wurden, unter Aufbewahrung auf Eis, 12 µl des RT-Mixes, welcher sich aus 4 µl dNTP (2,5 mM), 4 µl 5xPuffer, 2,5 µl DEPC-Wasser, 0,5 µl RNAsin und 1 µl Reverse Transkriptase zusammensetzte, zugegeben, für 1h bei 37°C und 2 min bei 95°C im Thermocycler inkubiert. Die so hergestellte cDNA wurde in Aliquots zu je 22 µl bei –80°C eingefroren.

2 µg cDNA wurden bei einem Endvolumen von 20 µl für die PCR eingesetzt. Bei einer Denaturierungstemperatur von 95°C und unterschiedlichen Annealingtemperaturen (50-60°C) wurde die Elongation bei 72°C durchgeführt, worauf ein finaler Extensionsschritt bei 72°C folgte. Es wurden 35 Zyklen pro NTPDase durchgeführt.

Die Primer der NTPDasen 3-6 konnten speziesübergreifend verwendet werden, für die NTPDase 1 mussten für jede Spezies eigene Primerpaare verwendet werden. Eine Darstellung der NTPDase 2 mittels PCR gelang auch nach unterschiedlicher Primerverwendung nicht, deswegen wird diese hier nicht aufgeführt.

Es wurden zwei unterschiedliche DNA-Polymerasen verwendet, die *Taq*-Isopolymerase (Qiagen) für die NTPDasen 3-6 und die *Turbo-Pfu*-DNA-Polymerase (Fermentas) für die NTPDase 1.

Dadurch ergaben sich zwei unterschiedliche PCR-Ansätze: 10 µl DEPC, 1 µl dNTP (2,5 mM), 2 µl 10xPFU-Puffer, 2 µl DMSO, 0,8 µl MgCl₂ (nur bei Taq) 1 µl Primer F, 1 µl Primer R, 2 µl cDNA und 0,2 µl Turbo-PFU bzw. Taq-Isopolymerase. Es ergaben sich folgende Annealingtemperaturen der Isoenzyme, für NTPDase 1 B103: 60°C, NTPDase 3+4: 57°C und NTPDase 5+6: 50°C.

Ebenso ergaben sich durch die Primerwahl unterschiedliche Fragmentlängen: für NTPDase 1 B103: 542bp, NTPDase 1 Neuro2a/Maus Fibroblasten: 763 bp, NTPDase 3: 1103 bp, NTPDase 4 B103: 1783, Neuro2a/Maus Fibroblasten:1807 bp, NTPDase 5: 1117 bp, NTPDase 6: 1264 bp.

Nach Abschluss der PCR wurden den 20 µl des PCR-Ansatzes 5 µl Loading-Buffer (5x) zugefügt um die so hergestellte Lösung auf einem mit Ethidiumbromid versetzten 1,5 %igen Agarosegel (TAE) für 45 min bei 100 Volt laufen zu lassen. Es wurden zwei Standard-DNA-Leitern verwendet, 1 kb und 100 bp. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Ergebnis unter UV-Licht visualisiert und fotografiert (siehe Resultate).

Anschließend wurde ein Restriktionsverdau der gewonnenen Banden durchgeführt, nachdem diese aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QiaEX-II Kit aufgereinigt wurden. Folgender Ansatz mit einem Endvolumen von 30 µl wurde verwendet:

2,5 µl DEPC, 3 µl Puffer (für *BsrGI*: 2, *Accl*: 4, *Sacl*: 1, *HincII*:3), 3 µl 10xBSA, 20 µl aufgereinigtes PCR-Produkt und 1,5 µl Enzym (NTPDase 1: B103: *BsrGI*, Maus Fibroblasten: *Accl*, NTPDase 3: *Sacl*, NTPDase 4: *HincII*, NTPDase 5: *Sacl*, NTPDase 6: *HincII*). Dieser Ansatz wurde für 2 h bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurden wiederum 20 µl des Ansatzes mit 5 µl Loading-Buffer versetzt und auf ein 2% iges Agarosegel (TAE) aufgetragen.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse des Restriktionsverdaus.

Restriktionsenzym	NTPDase	Schnittstelle	Fragmente in bp
<i>BsrGI</i>	1 (B103)	740/741	302, 239
<i>AccI</i>	1 (Fibroblasten)	377/378	446, 296
<i>SacI</i>	3	1217/1218	732, 371
	5	768/769	671, 446
<i>HincII</i>	4 (B103)	750/751	750, 1033
	4 (Neuro2a/Fibro)	750/751	750, 1057
	6	612/613	537, 726

Tab. 2: Übersicht des Restriktionsverdaus:
Eingesetzte Restriktionsenzyme, betreffende NTPDase, enzymatische Schnittstelle und erhaltene Fragmente

4 Resultate

Nach Auftrennung der einzelnen Banden auf dem Agarosegel konnten folgende Ergebnisse abgelesen werden:

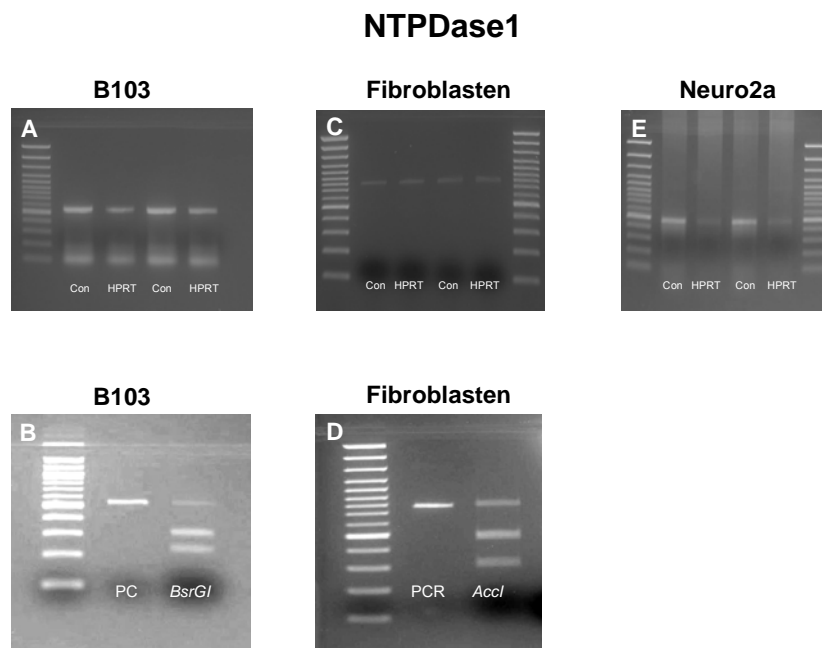


Abb. 4.: Fotografierte Ergebnisse nach PCR und Verdau der NTPDase 1, 1,5% iges Agarosegel mit Ethidiumbromid unter UV-Licht, A, C, E 1kb-Leiter als Referenz, B, D 100bp-Leiter als Referenz, weitere Erläuterungen siehe Text

NTPDase 1-Expression: B103 Zellen der gesunden Kontrollgruppe zeigten eine höhere Genexpression der NTPDase 1 (542 bp Bande) als die HPRT-defizienten Zellen (Abb. 4. A). Bei den Maus Fibroblasten war die Genexpression relativ gering, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den HPRT-defizienten Zellen erkannt werden konnte (763bp Bande in Abb. 4. C). Der Restriktionsverdau bestätigte, dass die korrekten Banden amplifiziert wurden, 302 bp und 239 bp für die B103 Zellen (Abb. 4. B) und 466 und 296 bp bei den Fibroblasten (Abb. 4. D). Der Verdau beider PCR-Produkte war nicht ganz vollständig, was die dritte Bande, zu dem initialen PCR-Produkt gehörig, erklärt.

Wir erwarteten auch in den Neuro2a Zellen das entsprechende Fragment (763 bp) amplifizieren zu können, jedoch war, selbst nach Ansetzen verschiedener Reaktionskonditionen, wie unterschiedliche Annealingtemperaturen, Verwendung verschiedener Polymerasen und Primer/Templat Zusammensetzungen keine Bande in der entsprechenden Höhe bei 763 bp sichtbar (Abb. 4. E). Aufgrund der eindeutig positiven Resultate bei Verwendung derselben Primer und PCR-Reaktionsbedingungen bei anderen Zelllinien, könnte diese Tatsache eine Abwesenheit der NTPDase 1 in Neuro2a Zellen widerspiegeln.

NTPDase 2-Expression: Wir unternahmen zahlreiche Versuche um die NTPDase 2 in den verschiedenen Zelllinien nachzuweisen. Im Einzelnen untersuchten wir unterschiedliche Primerpaare, zwei unterschiedliche Polymerasen, unterschiedliche Annealingtemperaturen und verschiedene Primer/Template Verhältnisse um die NTPDase 2 zu amplifizieren. Jedoch waren all diese Bemühungen erfolglos und es konnte keine spezifische Bande amplifiziert werden.

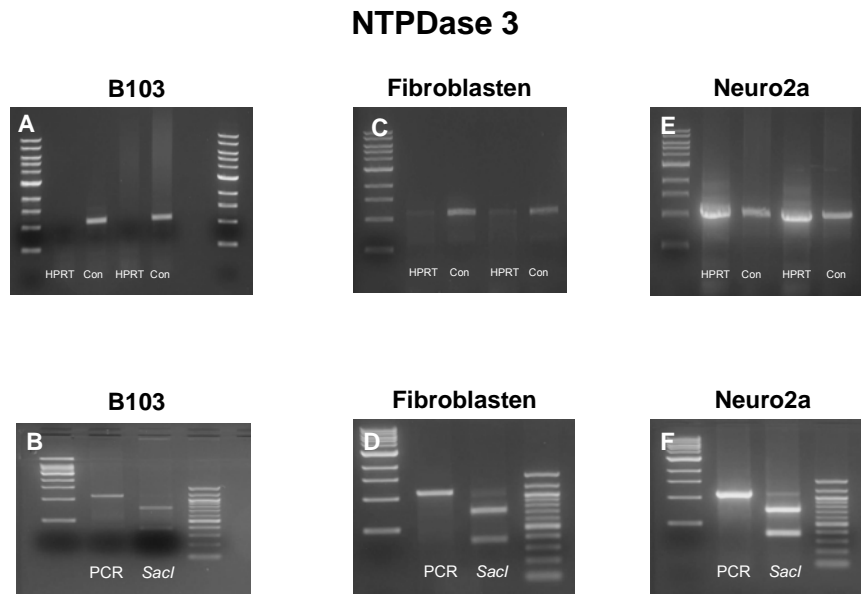


Abb. 5.: Fotografierte Ergebnisse nach PCR und Verdau der NTPDase 3, 1,5% iges Agarosegel mit Ethidiumbromid unter UV-Licht, A, C, E 1kb-Leiter als Referenz, B, D, F 100bp-Leiter als Referenz, weitere Erläuterungen siehe Text

NTPDase 3-Expression: In den B103 Kontroll-Zellen konnte man eine deutliche Expression der NTPDase 3 erkennen (1103 bp), wogegen das Enzym in den HPRT-defizienten Zellen zu fehlen schien (Abb. 5. A). In der Kontrollgruppe der Fibroblasten konnten wir ein sehr viel stärkeres Signal der NTPDase 3 nachweisen, als in den HPRT-defizienten Fibroblasten (Abb. 5. C). Die Neuro2a-Zellen zeigten ein gegenteiliges Bild, da in den erkrankten Banden eine deutlich stärkere Bande zu sehen war als in den gesunden Kontrollzellen (Abb. 5. E). Die Analyse durch den Restriktionsverdau bestätigte die Richtigkeit, der amplifizierten Banden (732 und 371 bp, Abb. 5. B, D und F).

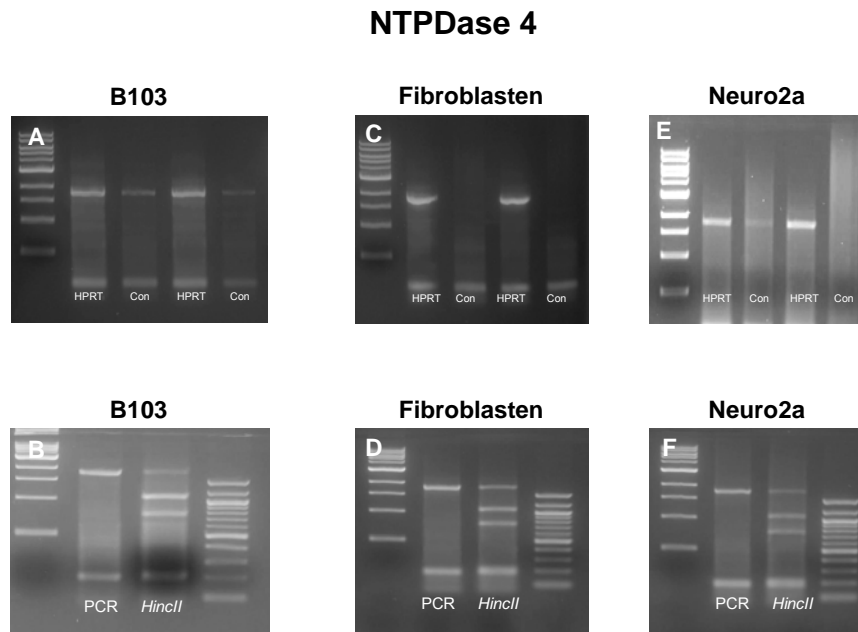


Abb. 6.: Fotografierte Ergebnisse nach PCR und Verdau der NTPDase 4, 1,5% iges Agarosegel mit Ethidiumbromid unter UV-Licht, A, C, E 1kb-Leiter als Referenz, B, D, F 100bp-Leiter als Referenz, weitere Erläuterungen siehe Text

NTPDase 4-Expression: Anders als bei den NTPDasen 1 und 3 (Abb. 4. und 5.) war das Expressionsmuster der NTPDase 4 in allen drei untersuchten Zelllinien konstant. Die NTPDase 4 zeigte in den HPRT-defizienten Zellen aller Zellarten eine stärkere Genexpression als in den gesunden Zellen (1807 bp in B103 Zellen und 1783 bp in Maus Fibroblasten und Neuro2a Zellen, Abb. 6. A, C und E). Der Restriktionsverdau bestätigte die Richtigkeit der amplifizierten Banden (750 bp und 1033 bp in den B103-Zellen und 750 bp und 1057 bp in den Fibroblasten und Neuro2a-Zellen, Abb. 6. B, D und F). Auch hier war ein unvollständiger Verdau des PCR Produkts erkennbar.

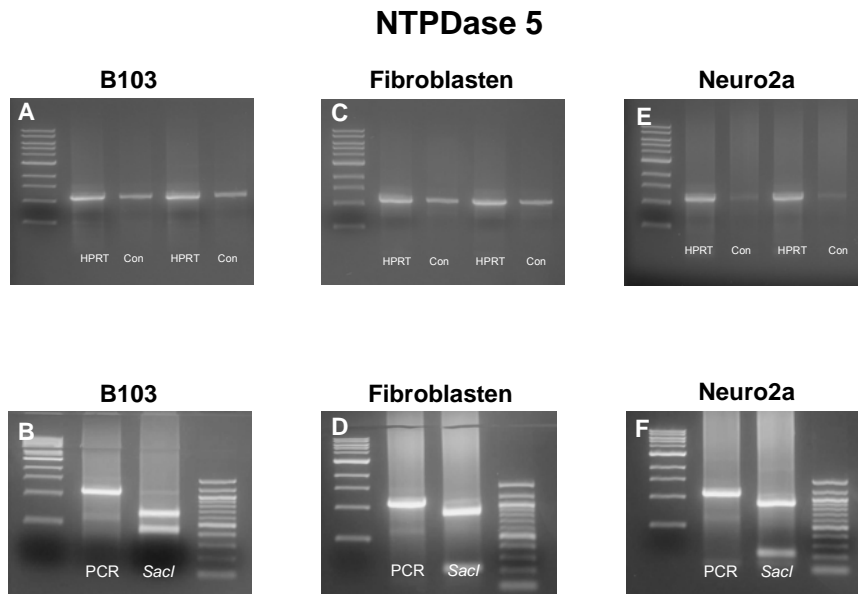


Abb. 7.: Fotografierte Ergebnisse nach PCR und Verdau der NTPDase 5, 1,5% iges Agarosegel mit Ethidiumbromid unter UV-Licht, A, C, E 1kb-Leiter als Referenz, B, D, F 100bp-Leiter als Referenz, weitere Erläuterungen siehe Text

NTPDase 5-Expression: Ähnlich zu den aus den Untersuchungen mit NTPDase 4 gewonnenen Daten zeigte sich auch hier eine Assoziation von HPRT-Defizienz und einer Erhöhung der Genexpression (1117 bp Bande) im Vergleich zu den Kontrollzellen aller drei untersuchten Zelllinien (Abb. 7. A, C und E). In den Neuro2a Zellen war ein stärkerer Unterschied in der Expression sichtbar als in den B103 Zellen und Fibroblasten. Der Restriktionsverdau bestätigte die Richtigkeit der amplifizierten Banden (671 bp und 446 bp, Abb. 7. B, D und F).

NTPDase 6

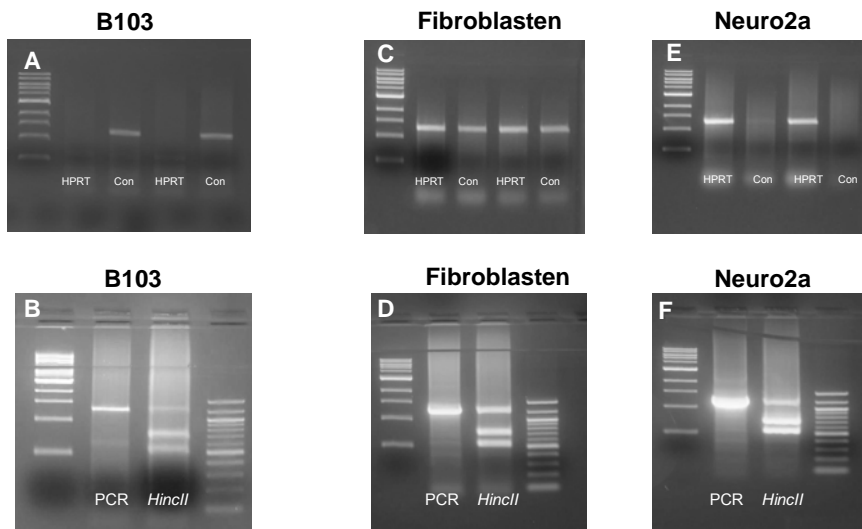


Abb. 8.: Fotografierte Ergebnisse nach PCR und Verdau der NTPDase 6, 1,5% iges Agarosegel mit Ethidiumbromid unter UV-Licht, A, C, E 1kb-Leiter als Referenz, B, D, F 100bp-Leiter als Referenz, weitere Erläuterungen siehe Text

NTPDase 6-Expression: Hier zeigte sich ein sehr heterogenes Expressionsmuster. Während in B103-Zellen die HPRT-Defizienz mit einer Erniedrigung der Expression (1264 bp Bande) einherging (Abb. 8. A), zeigte sich bei Neuro2a Zellen nur in den HPRT-defizienten Zellen ein Nachweis der NTPDase 6 (Abb. 8. E). In den Fibroblasten konnte eine leichte Erhöhung der Expression in den HPRT-defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden (Abb. 8. C). Auch hier lieferte der Restriktionsverdau die Bestätigung für die Richtigkeit der amplifizierten Banden (538 bp und 726 bp, Abb. 8. B, D und F).

5 Diskussion

Die vorausgegangenen Untersuchungen zur Analyse der NTPDase Aktivität deuteten an, dass HPRT-Defizienz mit einer Erhöhung oder Erniedrigung der Enzymaktivität einhergeht und, dass diese Veränderungen abhängig sind von der verwendeten Spezies und dem verwendeten Zelltyp (Pinto et al. 2005). Basierend auf diesen Daten wollten wir die beobachtete Erniedrigung der NTPDase Expression in HPRT-defizienten B103- und Neuro2a- Zellen in Relation zu den Kontrollzelllinien und die Erhöhung der NTPDase-Expression in Maus Fibroblasten darstellen. Allerdings führten unsere RT-PCR-Untersuchungen zu wesentlich komplexeren Ergebnissen. Besonders in den B103-Zellen der Ratte ist eine HPRT-Defizienz mit einem deutlichen Abfall der Expression von NTPDase 3 und 6 und einem mäßigen Abfall der Expression von NTPDase 1 assoziiert, wogegen jedoch die Expression der NTPDasen 4 und 5 tatsächlich erhöht ist. Hingegen war auffällig, dass bei den HPRT-defizienten Neuro2a-Zellen ausschließlich eine Erhöhung der Expression beobachtet werden konnte. Bei den Mausfibroblasten war die Expression der NTPDase 3 erniedrigt, wogegen die der NTPDasen 4-6 sogar erhöht war. Auf diese Weise konnten unsere Daten zur Expression der einzelnen NTPDase-Isoenzyme die Annahme bestätigen, dass sekundäre biochemische Veränderungen bei HPRT-Defizienz abhängig vom Zelltyp und der Zellspezies sind (Pinto et al. 2005; Pinto and Seifert 2006).

Wodurch lassen sich die auffallenden Diskrepanzen zwischen der eindeutigen Erniedrigung der NTPDase Aktivität in B103- und Neuro2a-Zellen und der deutlichen Erhöhung der NTPDase Aktivität in HPRT-defizienten Mausfibroblasten auf der einen Seite und den komplexen Veränderungen der NTPDase Expression auf der anderen Seite erklären? Zum Einen wäre es denkbar, dass nicht die gesamte in der PCR

amplifizierte cDNA in den Kontrollzellen zu funktionsfähigen aktiven NTPDase-Proteinen translatiert wurde. Zum Zweiten könnten sich die spezifischen Aktivitätsgrade der jeweiligen NTPDasen voneinander unterscheiden. Zum Dritten wäre es möglich, dass die in dieser Studie nicht untersuchten NTPDasen, wie die alkalische Phosphatase oder die Ecto-5'-Nukleotidase (Zimmermann 2000; Robson et al. 2006) für die beobachteten Enzymaktivitäts-Veränderungen verantwortlich sind (Pinto et al. 2005). Letztendlich darf auch nicht vergessen werden, dass von all den hier untersuchten NTPDasen ausschließlich die NTPDasen 1,2 und 4 zur Hydrolyse von ATP im Stande sind und, dass sich die jeweiligen Isoenzyme der NTPDasen in ihrer Substratspezifität unterscheiden, weswegen wir hier eine wesentlich komplexere Situation vor uns liegen haben (Robson et al. 2006). Die Aktivierungs- und Inhibierungskinetiken der NTPDase Aktivität auf B103-, Neuro2a- und Fibroblastenmembranen sind monophasisch, was auf eine einzelne Enzymspezies hinweist, welche für die untersuchte katalytische Aktivität verantwortlich ist (Pinto et al. 2005). Unglücklicherweise erlaubten uns die eingeschränkte Sensitivität der derzeit vorhandenen NTPDase Antikörper und die Nichtverfügbarkeit von Antikörpern der NTPDasen 3-6 keine weiteren Studien der NTPDase-Expression auf der Proteinebene.

Ohne Rücksicht darauf, welches Isoenzym genau für die substantiellen Unterschiede der NTPDase-Aktivität in Folge von HPRT-Defizienz verantwortlich ist, so zeigt unsere vorliegende Studie über die Expression einer begrenzten und genau definierten Anzahl an möglichen Zielgenen deutlich, wie komplex die Expression der NTPDase-Isoenzyme ist. Unsere Ergebnisse deuten daraufhin, dass jede einzelne NTPDase-Isoform eine bestimmte funktionelle Rolle besitzt. Diese komplexen Veränderungen der NTPDase-Expression könnten (insuffiziente) Kompensierungsversuche von Zellen aufgrund der primären Veränderung des Nukleotidstoffwechsels

bei HPRT-Defizienz widerspiegeln. Abhängig von den gesamten Veränderungen der Expression der NTPDase-Isoenzyme und den spezifischen Aktivitäten der Isoenzyme, scheint das Endergebnis eine Erhöhung oder Erniedrigung der NTPDase Aktivität zu sein.

6 Literaturverzeichnis

Beck ChTh: Jacobus de Voragine (1230-1298): First to describe a Lesch-Nyhan-Syndrome? *Eur J Pediatr Surg* 2:355, 1991

Connolly GP, Duley JA, Stacey NC (2001): Abnormal development of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-deficient CNS neuroblastoma. *Brain Res* 918:20-27

Fairbanks LD, Jacomelli G, Micheli V, Slade T, Simmonds HA (2002): Severe pyridine nucleotide depletion in fibroblasts from Lesch-Nyhan patients. *Biochem J* 366:265-272

Hara K, Kashiwamata S, Ogasawara N, Ohishi H, Natsume R, Yamanaka T, Hakamada S, Miyazaki S, Watanabe K (1982): A female case of the Lesch-Nyhan syndrome. *Tohoku J Exp Med* 137:275

Harkness RA, McCreanor GM, Watts RWE (1988): Lesch-Nyhan syndrome and its pathogenesis: Purine concentrations in plasma and urine with metabolite profiles in CSF. *J Inherit Metab Dis* 11:239

Harris JC, Lee RR, Jinnah HA, Wong DF, Yaster M, Bryan N (1998): Craniocerebral magnetic resonance imaging measurement and findings in Lesch-Nyhan syndrome. *Arch Neurol* 55:547

Jinnah HA, Friedmann T (2001): Lesch-Nyhan Disease and Its Variants. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease* 8th Ed., 107: 2537-2570

Jinnah HA, Wojcik BE, Hunt M, Narang N, Lee KY, Goldstein M, Wamsley JK, Langlais PJ, Friedmann T (1994): Dopamine deficiency in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *J Neurosci* 14:1164-1175

Kelley WN, Greene ML, Rosenbloom FM, Henderson JF, Seegmiller JE: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency in gout. *Ann Intern Med* 70:155, 1969

Lesch M, Nyhan WL (1964): A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am J Med* 36:561

Lloyd KG, Hornykiewicz O, Davidson L, Shannak K, Farley I, Goldstein M, Shibuya M, Kelley WN, Fox IH (1981): Biochemical evidence of dysfunction of brain neurotransmitters in the Lesch-Nyhan syndrome. *N Engl J Med* 305:1106

Murray AW (1971): The biological significance of purine salvage. *Ann Rev Biochem* 40:811

Nyhan WL (1997): The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. *J Inherit Metab Dis* 20: 171.

Page T, Bakay B, Nissinen E, Nyhan WL (1981): Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase variants: Correlation of clinical phenotype with enzyme activity. *J Inherit Metab Dis* 4:203

Patel PE, Nussbaum RL, Framson PE, Ledbetter DH, Caskey CT, Chinault AC (1984): Organisation of the HPRT gene and related sequences in the human genome. *Somat Cell Mol Genet* 10:483

Pinto C. S. and Seifert R. (2006): Decreased GTP-stimulated adenylyl cyclase activity in HPRT-deficient human and mouse fibroblast and rat B103 neuroblastoma cell membranes. *J. Neurochem.* 96, 454-459.

Pinto C. S., Jinnah H. A., Shirley T. L., Nyhan W. L. and Seifert R. (2005): Altered membrane NTPase activity in Lesch-Nyhan disease fibroblasts: Comparison with HPRT knock-out mice and HPRT-deficient cell lines. *J. Neurochem.* 93, 1579-1586.

Preston R (2007): An error in the code. *The New Yorker* 13th Aug, 30-36

Pritchard JB, Chavez-Peon F, Berlin RD (1970): Purines: Supply by liver to tissues. *Am J Physiol* 219:1263

Rijksen G, Staal GEJ, van der Vlist MJM, Beemer FA, Troost J, Gutensohn W, van Laarhoven JPRM, De Bruyn CHMM (1981): Partial hypoxanthin-guanine phosphoribosyl transferase deficiency with full expression of the Lesch-Nyhan syndrome. *Hum Genet* 57:39

Robson S. C., Sèvigny J., Zimmermann H. (2006): The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure and function relationships and pathophysiological relevance. *Purinergic Signalling* 2, 409-430.

Rosenfeld DL, Preston MP, Salvaggi-Fadden K (1994): Serial renal sonographic evaluation of patients with Lesch-Nyhan syndrome. *Pediatr Radiol* 24:509

Seegmiller JE, Rosenbloom FM, Kelley WN (1967): Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder an excessive purine synthesis. *Science* 155: 1682

Shows TB, Brown JA (1975): Localisation of genes coding for PGK, HPRT, and G6PD on the long arm of the X chromosome in somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet* 14:426

Sweetman L, Nyhan WL (1970): Detailed comparison of the urinary excretion of purines in a patient with the Lesch-Nyhan syndrome and a control subject. *Biochem Med* 4:121

Williamson DJ, Hooper ML, Melton DW (1992): Mouse models of hypoxanthine phosphoribosyltransferase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 15:665-673

Wong DF, Harris JC, Naidu S, Yokoi F, Marenco S, Dannals RF, Ravert HT, Yaster M, Evans A, Rousset O, Bryan RN, Gjedde A, Kuhar MJ, Breese GR (1996): Dopamine transporters are markedly reduced in Lesch-Nyhan disease in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5539-5543

Zimmermann H. (2000): Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362, 299-309.

Zoref-Shani E, Bromberg Y, Brosh S, Sidi Y, Sperling O (1993): Characterization of the alterations in purine nucleotide metabolism in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-deficient rat neuroblastoma cell line. *J Neurochem* 61:457-463

7. Publikation

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Veronika Lorenz, Cibele S. Pinto, Roland Seifert (2007): Complex changes in ecto-nucleoside 5'-triphosphate diphosphohydrolase expression in hypoxanthine phosphoribosyl transferase deficiency, *Neuroscience Letters* 420: 6-11

8. Lebenslauf

Name und Vorname: Lorenz Veronika, Christine
Geburtsdatum: 20.08.1981
Geburtsort: München
Familienstand: ledig
Vater: Alfred Lorenz
Mutter: Gabriele Lorenz
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulischer Werdegang

1988 – 1992 Herterich-Grundschule, München
1992 – 1994 Gymnasium Fürstenried-West, München
1995 – 2001 Ruperti-Gymnasium, Mühldorf a. Inn
31.05.2001 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Universitärer Werdegang

SS 2002 – SS 2007 Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg
WS 2002/2003 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
SS 2005 Zahnärztliche Vorprüfung
SS 2007 Zahnmedizinisches Staatsexamen

seit September 2007 Tätigkeit als Vorbereitungsassistentin in der
Kinderzahnarztpraxis Dr. Benz/Dr. Reeka-Bartschmidt in
Landshut

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Roland Seifert danke ich für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit, die unermüdliche und zuverlässige Unterstützung und die guten Rahmenbedingungen, welche die Erarbeitung der vorliegenden Dissertation wesentlich vereinfachten.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Katharina Wenzel-Seifert für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Laborexperimente bedanken.

Des Weiteren schulde ich Frau Corinna Matzdorf und Herrn David Schnell aufrichtigen Dank für die tatkräftige Unterstützung bei der Vermittlung der Laborabläufe und der Versuchsvorbereitung und -optimierung. Im Besonderen möchte ich mich noch bei Frau Gertraud Wilberg für die unermüdliche Unterstützung bei der Arbeit mit den Zellkulturen bedanken.