

Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie

**Identifizierung molekularer Marker zur
Charakterisierung pleiotroper Effekte eines experimentellen
Zinkmangels *in vivo***

Heike tom Dieck

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Daniel

2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 01.09.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 25.11.2003 angenommen.

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. H. Daniel möchte ich für die Auswahl und Überlassung des interessanten und anspruchsvollen Themas und der Möglichkeit des Einsatzes solcher neuartiger Technologien danken sowie für ihr wissenschaftlich-kritisches Feedback zu diesem Dokument und ihre Geduld auch während der vergangenen drei Jahre.

Ohne die Finanzierung durch die SKW Biosystems GmbH/Degussa BioActives GmbH wäre diese Arbeit wohl gar nicht zustande gekommen. Hier möchte ich insbesondere Herrn Dr. H.-U. Hoppe neben der Finanzierung und der Herstellung des Kontaktes zu Nanogen Inc. für die Chance danken, bereits während der Promotionszeit Industrieluft schnuppern zu können.

Mein herzlicher Dank gilt natürlich auch Prof. Dr. A. Gierl dafür, dass er sich bereit erklärt hat diese Arbeit als zweiter Gutachter zu beurteilen.

Ein großes Dankeschön geht darüber hinaus an Dr. Dirk Böenkamp. Ohne seine exzellenten mathematisch-analytischen Fähigkeiten wäre das Projekt „Methodenentwicklung“ sicherlich ab und an ins Stocken geraten. Deshalb waren die (zeitbedingt) seltenen aber intensiven Diskussionen sehr wertvoll für mich.

PD Dr. Frank Döring danke ich für die Betreuung meiner Arbeit und die Erkenntnis, dass das Leben neben der Wissenschaft auch eine psychologische und sportliche Komponente besitzt.

PD Dr. H. P. Roth und Frau J. Welzhofer danke ich nicht nur für die Durchführung der Tierversuche, sondern auch für die tiefgängigen „Zink“-Diskussionen. Rainer Reichlmeier sei gedankt, dass er sein Wissen zur Triglyceridanalytik noch einmal ausgegraben hat.

Ich freue mich, dass die Zusammenarbeit zwischen den Lehrstühlen so unkompliziert war. Dr. Angelika Lehner und Justyna Adamczyk gaben mir neben der Möglichkeit, meine Microarrays dort auslesen zu lassen, viele wertvolle Tipps. Dr. Michael Pfaffl danke ich für die Hilfe bei den Real time RT PCR- Experimenten und für Erlaubnis zur Nutzung des Lightcyclers.

Insbesondere möchte ich Angelique´sche (Angelika Herzog) für ihre Spontaneinsätze bei psychischen Tiefpunkten und Diana Wittstock-Stengl für ihre gewissenhafte und selbständige Arbeitsweise sowie ihre immerwährende Ruhe („Das klappt schon!“) danken. Dagmar Fuchs danke ich für ihren Einsatz an der 2D-Elektrophorese und MALDI-TOF-MS. Ohne den Rest der Arbeitsgruppe wären die drei Jahre aber bei weitem nicht so angenehm gewesen - auch hierfür meinen Dank.

Gleiches gilt auch für die „Degussaner“ - zuallererst Dr. („Soviel Zeit muß sein!“) Martin Müller für seine jahrelange Information über das „WIE“, Sabine Mocek für ihren flexiblen Einsatz, Sinian Huang für ihren fernöstlichen Einschlag in meinem Leben, Dr. Roland Rabeler für seine Korrekturvorschläge und Alke Feenders, ohne die sowie nichts gelaufen wäre.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, v.a. Dr. „The Brain“ Susu tom Dieck für ihre ausdauernde, ehrliche Unterstützung und wenn nötig auch mal einen „Tritt in den Allerwertesten“ sowie Prof. Dr. H. tom Dieck (Poarse) für die Erleuchtung über generelle Dinge des Lebens in erkenntnisreichen Diskussionen und natürlich Moarse für ihre Geduld mit mir.

A mi Nelli: Muchas gracias por tu amabilidad, tranquilidad y apoyo!

INHALTVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Zinkmangel.....	1
1.2 Biologische Funktion von Zink im Säuger.....	2
1.3 Regulation der Transkription und die Rolle von Zink	4
1.4 Beeinflussung des Transkriptom im Zinkmangel.....	9
1.5 <i>Screening</i> -Methoden zur Expressionsanalyse.....	13
1.5.1 <i>DNA-Array</i> -Technologie	14
1.5.2 <i>Proteomics</i>	17
2 Ziel der Arbeit.....	19
3 Methoden.....	20
3.1 Tierexperimentelle Methoden	20
3.1.1 Erzeugung eines Zinkmangels <i>in vivo</i>	20
3.1.2 Erzeugung eines Zinkmangels <i>in vivo</i> (<i>Pair fed</i> -Design)	21
3.2 Analytische Methoden.....	21
3.2.1 Atomabsorptions-Spektralphotometrie (AAS).....	21
3.2.2 Fettextraktion.....	22
3.2.3 Enzymatische Triglyceridbestimmung	23
3.2.4 Gaschromatographische Fettsäurenanalyse	25
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	26
3.3.1 Extraktion der Gesamt-RNA	26
3.3.2 Extraktion von Poly(A) ⁺ -RNA	27
3.3.3 Amplifikation von Poly(A) ⁺ -RNA nach modifiziertem <i>Eberwine</i> -Protokoll...27	
3.3.4 Verkürzung des Poly(A) ⁺ -RNA- <i>Pools</i> auf < 1000 bp	29
3.3.5 Generierung reiner Poly(A) ⁺ -RNA-Spezies zur Systemevaluierung	30
3.3.6 Generierung kurzer genspezifischer RNA-Amplifikate	31
3.3.7 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT PCR)	32
3.3.8 Quantitative <i>Real time-RT PCR</i>	33
3.3.9 Ligation und Transformation	34
3.3.10 Kontrolle der cDNA-Insertgröße	34
3.3.11 Sequenzierung	35
3.3.12 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren für <i>Northern Blot</i> -Analysen.36	
3.3.13 <i>Northern Blot</i> -Analyse	37
3.3.14 Expressionsanalyse mittels <i>Array</i>	38
3.4 Biochemische Methoden	48
3.4.1 Rohhomogenatgewinnung zur Enzymaktivitätsbestimmung	48
3.4.2 Enzymaktivitätsbestimmung	48
3.4.3 Proteinisolierung	51
3.4.4 <i>Western Blot</i> -Analyse	51
3.4.5 2D-Gelelektrophorese.....	52
3.4.6 Aufbereitung der Proben für die folgende MALDI-TOF-MS-Analyse	54
3.4.7 MALDI-TOF-MS-Analyse	55
3.5 Berechnungen und statistische Auswertung	55

4 Ergebnisse	56
4.1 Manifestation des experimentellen Zinkmangels <i>in vivo</i>	56
4.2 <i>Screening</i> auf zink-sensitive Markergene	60
4.2.1 <i>Screening</i> mit elektronischem <i>Array</i> -System – Methodenentwicklung	60
4.2.2 <i>Screening</i> mit <i>DNA-Arrays</i>	75
4.2.3 <i>Screening</i> mit 2D-Gelelektrophorese	89
4.3 Bestätigung ausgewählter <i>Array</i> -Daten mit <i>Northern Blot</i> und quantitativer <i>Real time RT-PCR</i> (Leber)	96
4.4 Bestätigung ausgewählter <i>Array</i> -Befunde mittels <i>Northern Blot</i> (Gehirn)	102
4.5 Bestätigung der Regulation ausgewählter Transkripte in der Leber eines <i>Pair fed</i> -Zinkmangelversuchs mittels <i>Northern Blot</i>	103
4.6 Bestätigung der Zinkabhängigkeit der Proteinexpression auf Transkriptebene mittels <i>Northern Blot</i>	105
4.7 Verifizierung der veränderten Expression ausgewählter Gene mit dem elektronischen <i>Array</i> -System	106
4.8 Vergleichende Gewebeexpressionsanalyse	109
4.8.1 Niere	109
4.8.2 Muskel.....	111
4.8.3 Darm	112
4.8.4 Gehirn.....	114
4.9 Bestimmung der Proteinexpression für ausgewählte Transkripte	117
4.9.1 Proteinexpression von ausgewählten Transkripte der Leber	117
4.9.2 Proteinexpression von ausgewählten Transkripten der Niere.....	118
4.10 Einfluß des Zinkmangels auf den hepatischen Lipidmetabolismus	119
4.10.1 Bestimmung des Triglyceridgehaltes in der Fettfraktion der Leber.....	119
4.10.2 Gaschromatographische Fettsäureanalyse	120
4.11 Enzymaktivitäten.....	123
4.11.1 Aktivität der alkalischen Phosphatase	123
4.11.2 Aktivitäten der Aspartat Aminotransferase, der Kreatinkinase und der Laktat-Dehydrogenase	124
4.12 Einfluß des Zinkmangels auf die Konzentration anderer zweiwertiger Kationen im Lebergewebe	126
5 Diskussion	127
5.1 <i>Screening</i> -Methoden zur Genexpressionsanalyse.....	127
5.1.1 Mustererkennung mittels elektronischem <i>Array</i> -System.....	127
5.1.2 Kommerzielle <i>Array</i> -Systeme zur Hochdurchsatzexpressionsanalyse	130
5.1.3 Vergleich der Befunde aus Transkriptom- und Proteomanalyse	134
5.2 Pleiotrope Effekte des Zinkmangels	137
5.2.1 Tiermodell und Organauswahl	138
5.2.2 Allgemeine Aspekte der Genexpression im Zinkmangel	139
5.2.3 Organspezifische Ausprägung der Regulation zink-sensitiver Gene	141
5.2.4 Effekte des Zinkmangels auf ausgewählte Gengruppen	144
6 Zusammenfassung	148
7 Abstract	161
8 Anhang	162
8.1 Material.....	162
8.2 Anhang zu Ergebnissen.....	176

9 Abkürzungen.....	179
10 Literatur	182

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1: Ausgewählte zink-sensitive Gene aus Literaturbefunden.....	9
Tab. 3.1: Applizierte Spannung zur isoelektrischen Fokussierung der Proteine verschiedener pH-Bereiche in der ersten Dimension	53
Tab. 4.1: Veränderung der Transkriptmenge in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten in Abhängigkeit von der Zinkversorgung untersucht mittels <i>DNA-Arrays</i>	77
Tab. 4.2: Veränderung der Transkriptmenge in Hirngewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten in Abhängigkeit von der Zinkversorgung untersucht mittels <i>DNA-Arrays</i>	86
Tab. 4.3: Theoretisches Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt der korrespondierenden Proteine von auf mRNA-Ebene identifizierten und regulierten Transkripte	89
Tab. 4.4: Veränderung der Proteinexpression in Abhängigkeit von der Zinkversorgung in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten ermittelt mit 2D-Gelelektrophorese und anschließender MALDI-TOF-MS-Analyse nach Auftrennung in erster Dimension im pH-Bereich 3-11	92
Tab. 4.5: Proteine mit veränderter Expression in Abhängigkeit von der Zinkversorgung in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten ermittelt mit 2D-Elektrophorese und anschließender MALDI-TOF-MS-Analyse und Datenbankvergleich (Mascot).....	92
Tab. 4.6: Veränderung der Proteinexpression in Abhängigkeit von der Zinkversorgung in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten nach Aufteilung des pH-Bereichs der ersten Dimension ermittelt mit 2D-Gelelektrophorese und anschließender MALDI-TOF-MS-Analyse	94
Tab. 4.7: Proteine mit veränderter Expression in Abhängigkeit von der Zinkversorgung in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten nach Aufteilung des pH-Bereichs der ersten Dimension ermittelt durch 2D-Gelelektrophorese und anschließender MALDI-TOF-MS-Analyse	95
Tab. 4.8: Verifizierung der Zinksensitivität ausgewählter durch den <i>Array</i> -Einsatz ermittelter Transkripte der Leber mittels <i>Northern Blot</i> -Analyse und quantitativer <i>Real time RT-PCR</i>	96
Tab. 4.9: <i>Northern Blot</i> -Analyse im Gehirn zur Verifizierung der Regulation ausgewählter Transkripte im Zinkmangel identifiziert mittels <i>Array</i> -Analyse.....	103
Tab. 4.10: Regulation ausgewählter Transkripte aus dem <i>Pair fed</i> -Zinkmangelversuch im Vergleich zur Regulation im Schlundsonden-Zinkmangelversuch.....	104
Tab. 4.11: Stärke der zinkabhängigen Regulation von Proteinen bzw. ihrer korrespondierenden Transkripte in Lebergewebe von Zinkmangel- und Kontrollratten.....	105
Tab. 5.1: Vergleich der Regulation von mRNA- und Proteinspiegeln im Zinkmangel anhand der <i>Array</i> - und <i>Proteomics</i> -Daten.....	136

Tab. 5.2: Identifizierte Transkripte des Lipidmetabolismus und ihre Beziehung zu PPAR/PPRE oder SREBP	156
---	-----

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: (A) Allgemeine Struktur eines Zinkfingerproteins und (B) Charakteristika der Zinkbindungsstellen der DNA-Bindungsdomänen von Transkriptionsfaktoren	6
Abb. 1.2: Einflussebenen von Zink auf die Genexpression	7
Abb. 1.3: Schematische Darstellung der MTF-1-Wirkungsweise	8
Abb. 1.4 NanoChipä Mikroelektronik- <i>Chip</i> mit 100 Adressierungsplätzen in der Trägerkassette	17
Abb. 3.1: Eichgerade (Olivenöl) für die Berechnung der Triglyceridmenge in Lebergewebe.....	24
Abb. 3.2: Eichgerade (Sonnenblumenöl) für die Berechnung der Triglyceridmenge in Lebergewebe	24
Abb. 3.3: Prozessierter (A) cDNA CLONTECH Atlasä RAT 1.2 Array (Phosphorimagerbild) und (B) Oligonukleotid-Array Pan ^a Rat Liver Oligonukleotidarray (Falschfarbendarstellung)	38
Abb. 4.1: Durchschnittliche Lebendmassezunahme bei Kontroll- und Zinkmangelratten (Zn-) während der Schlundsondenfütterung	57
Abb. 4.2: (A) Aktivität der alkalischen Phosphatase (Serum) und (B) Serumzinkgehalt in Kontroll- (Zn+) und Zinkmangelratten (Zn-) in Abhängigkeit von der Zinkversorgung zur Überprüfung des erzeugten Zinkmangels	57
Abb. 4.3: Zinkkonzentrationen im Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten ermittelt durch AAS	58
Abb. 4.4: mRNA-Expression von Metallothionein I in der Leber von Kontroll- und Zinkmangelratten untersucht mittels <i>Northern Blot</i> -Analyse.	59
Abb. 4.5: Thermische Diskriminierbarkeit von <i>Mismatches</i> (A) Cy5-markierte 25mer Desoxyribonukleotiden; (B) Cy5- markierte 25mer Ribonukleotid hybridisiert an nicht-modifizierten Oligonukleotidfängern	62
Abb. 4.6: Unterschied zwischen LNA-Nukleotiden und DNA bzw. RNA-Monomeren (Proligo, Boulder, USA).....	62
Abb. 4.7: Hybridisierung und Temperaturdiskriminierung eines (A) komplementären Cy5-markierten Poly d(A)-Desoxyribonukleotids (1nM) und eines (B) komplementären Cy5-markierten Poly r(A)-Ribonukleotids (1 nM) an DNA-bzw. LNA-Fänger	63
Abb. 4.8: Initial gebundene Menge an sequenzspezifischen Proben an LNA-haltigen und LNA-losen <i>Match</i> - bzw. <i>Mismatch</i> -Fängern	64
Abb. 4.9: Thermische und elektronische Diskriminierbarkeit von 5'-Cy5-markierten Modell-Ribonukleotidproben	65
Abb. 4.10: Detektion von <i>in vitro</i> synthetisierten cRNA.....	67
Abb. 4.11: Nachweisempfindlichkeit einer <i>in vitro</i> transkribierten cRNA (M-cRNA) und eines kurzen unmarkierten Modell-Ribonukleotids an DNA- und LNA-haltigen Fängermolekülen.....	68
Abb. 4.12: Nachweisempfindlichkeit für Poly-(A) ⁺ -RNA aus der Rattenleber an DNA- und LNA-haltigen Fängermolekülen	68

Abb. 4.13:	Muster erzeugt durch die Hybridisierung von Poly(A) ⁺ -RNA von Kontroll- und Zinkmangeltieren, Hybridisierung an die Fänger 1-48.....	69
Abb. 4.14:	Muster erzeugt durch die Hybridisierung von Poly(A) ⁺ -RNA aus Leber von Kontrolltieren und Zinkmangeltieren. Fänger 1-64	70
Abb. 4.15:	<i>Experiment Clustering PCA (Principle Component Analysis)</i> durchgeführt von Lion Bioscience mit <i>Array-Scout-Software</i>	71
Abb. 4.16:	Projektion der 30 Experimente (Kontrolle rot, Zinkmangelgruppe blau) im Unterraum	72
Abb. 4.17:	Hybridisierung eines spezifischen Cy3-markierten GAPDH-Reporter-Oligonukleotids (18mer) an das erzeugte Poly(A) ⁺ -Muster zur Lokalisierung von hybridisierten GAPDH-mRNA-Sequenzen.....	73
Abb. 4.18:	Verkürzte Poly(A) ⁺ -RNA <i>Pools</i> hergestellt durch modifiziertes <i>Eberwine</i> -Protokoll	74
Abb. 4.19:	Muster erzeugt durch die Hybridisierung gekürzter Poly(A) ⁺ -RNA von Kontroll- und Zinkmangeltieren.	74
Abb. 4.20:	Reproduzierbarkeit der Gesamt-RNA Isolierung aus Lebergewebe von Kontroll- (Zn+) und Zinkmangelratten (Zn-).....	76
Abb. 4.21:	Expressionsmuster von (A) Leber und (B) Gehirn (Ratte) der 5260 Zielsequenzen des <i>5K Pan Rat Arrays</i>	87
Abb. 4.22:	Gewebespezifische Genexpression in Leber und Gehirn (Ratte) von 5260 Zielsequenzen auf dem <i>5K Pan Rat Array</i> in Kontrolltieren	88
Abb. 4.23:	Zinkabhängige Veränderung der Proteinexpression in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten ermittelt mit 2D-Elektrophorese dargestellt für die Spots 66, 29 und 18.	91
Abb. 4.24:	Proteinexpression in Lebergewebe von Kontrolltieren ermittelt mit 2D-Elektrophorese vor und nach Trennung des pH-Bereichs in der ersten Dimension.	93
Abb. 4.25:	Vergleich der <i>Array</i> -, <i>Northern Blot</i> - und <i>Real time RT-PCR</i> -Daten in logarithmischer Darstellung des Quotienten (Zn-/Zn+)	99
Abb. 4.26:	Regulation der RNA-Spiegel von ausgewählten Transkripten des Bereichs (A) „Wachstum“, (B) „Lipidstoffwechsel“, (C) „Biotransformation und Stressantwort“, (D) „Stickstoffstoffwechsel“ und (E) „Transkription und Andere“ im Zinkmangel ermittelt durch <i>Northern Blot</i> -Analyse	101
Abb. 4.27:	<i>Northern Blot</i> -Analyse von Transkripten des Hirngewebes zur Verifizierung der Regulation in Abhängigkeit vom Zinkstatus ermittelt anhand der <i>Array</i> -Analyse	102
Abb. 4.28:	<i>Northern Blot</i> -Analyse des Lebergewebes von Kontroll- und <i>Pair fed</i> -Zinkmangeltieren zur Verifizierung der Regulation ausgewählter Transkripte im <i>Pair fed</i> -Zinkmangelversuch.....	104
Abb. 4.29:	<i>Northern Blot</i> -Analyse des Lebergewebes von Zinkmangel- und Kontrollratten zur Verifizierung der mittels 2D-Elektrophorese ermittelten regulierten Proteine auf transkriptioneller Ebene	105
Abb. 4.30:	Metallothionein-Expression in Lebergewebe von Zinkmangel- und Kontrollratten untersucht mittels NanoChip™ des elektronischen <i>Array</i> -Systems und detektiert durch enzymatisches „ <i>Reporting</i> “	106
Abb. 4.31:	Metallothionein-Expression in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten untersucht mit elektronischem <i>Array</i> -System	107

Abb. 4.32: Metallothionein-Expression in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten untersucht mittels NanoChip™ detektiert mit (A) Cy3-markiertem GAPDH-Reporteroligonukleotid und (B) Cy5-markiertem Metallothionein-Reporteroligonukleotid.	108
Abb. 4.33: Metallothionein-Expression in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten untersucht mit elektronischem Array-System; Detektion mit Cy-markiertem spezifischem Reporteroligonukleotid.....	108
Abb. 4.34: Nierenspezifische Expression verschiedener zink-sensitiver Gene in Kontroll- (+) und Zinkmangeltieren (-) untersucht mittels Northern Blot-Analyse	109
Abb. 4.35: Änderung der Genexpression im Zinkmangel in Nierengewebe.	110
Abb. 4.36: Muskelspezifische Expression verschiedener zink-sensitiver Gene in Kontroll- (+) und Zinkmangeltieren (-) untersucht mittels Northern Blot-Analyse	111
Abb. 4.37: Änderung der Genexpression im Zinkmangel in Muskelgewebe..	112
Abb. 4.38: Darmspezifische Expression verschiedener zink-sensitiver Gene in Kontroll- (+) und Zinkmangeltieren (-) untersucht mittels Northern Blot-Analyse	112
Abb. 4.39: Änderung der Genexpression im Zinkmangel in Darmgewebe..	113
Abb. 4.40: Hirnspezifische Expression verschiedener zink-sensitiver Gene in Kontroll- (+) und Zinkmangeltieren (-) untersucht mittels Northern Blot-Analyse	115
Abb. 4.41: Organpezifische Änderung der Genexpression im Zinkmangel	116
Abb. 4.42: Western Blot-Analyse ausgewählter Genprodukte in Lebergewebe von Kontroll- (+) und Zinkmangelratten (-)	117
Abb. 4.43: Western Blot-Analyse ausgewählter Genprodukte in Nierengewebe von Kontroll- (+) und Zinkmangelratten (-)	118
Abb. 4.44: Triglyceridgehalt in Lebergewebe von Kontroll- (Zn+) und Zinkmangeltieren (Zn-)	119
Abb. 4.45: Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der Leberfettfraktion im (A) Kontrolltier und (B) Zinkmangeltier	121
Abb. 4.46: Fettsäurezusammensetzung der Leberfettfraktion von Kontrolltieren (Zn+) und Zinkmangeltieren (Zn-)	122
Abb. 4.47: Aktivität der alkalischen Phosphatase in Rohhomogenaten der Leber und der Niere von Kontroll (Zn+)- und Zinkmangeltieren (Zn-).....	123
Abb. 4.48: Aktivität der (A) Aspartat-Amino-Transferase, (B) der Kreatinkinase und (C) der Laktat-Dehydrogenase in Rohhomogenaten von Leber und Niere und im Serum von Kontroll- und Zinkmangeltieren	125
Abb. 4.49: Magnesium- und Kalziumgehalte in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangeltieren ermittelt durch AAS-Analyse	126
Abb. 5.1: Identifizierung im Zinkmangel veränderter Stoffwechselwege; Einfluß auf Transkripte des Lipidmetabolismus	152
Abb. 5.2: Postulierter Mechanismus zum Einfluß eines Zinkmangels auf Transkripte des hepatischen Lipidstoffwechsels	159

1 Einleitung

1.1 Zinkmangel

Das Spurenelement Zink ist ein unedles, zweiwertiges Schwermetall mit Atommasse 65,39 und der Ordnungszahl 30. Das ubiquitär vorkommende Element ist für alle Lebewesen essentiell. Die Essentialität von Zink für den höheren Organismus wurde erstmals von Todd *et al.* (1934) an jungen Ratten nachgewiesen. Die in tierexperimentellen Studien beobachteten klinischen Symptome einer nicht hinreichenden Zinkversorgung sind Appetitlosigkeit, retardiertes Wachstum, Haarausfall, Dermatitis, Schwächung des Immunsystems, Hypogonadismus und verzögerte Wundheilung (Mills *et al.*, 1969; Quarterman *et al.*, 1970; Pallauf und Kirchgessner, 1971a, 1971b; Kirchgessner und Roth, 1975; Fraker *et al.*, 1986; Kukral *et al.*, 1988; Schüle *et al.*, 1992).

Auch beim Menschen konnten entsprechende Mangelsymptome festgestellt werden. So beobachtete Prasad in den 60er Jahren bei persischen und ägyptischen Jugendlichen mit „Geophagie“, also mit einem Verzehr von bis zu einem Pfund Ton pro Tag einen damit einhergehenden Eisen- und Zinkmangel, Zwergwuchs und verzögerte sexuelle Entwicklung (Prasad *et al.*, 1961, 1963a, 1963b).

Beim manifesten Zinkmangel des Menschen muss zwischen einem angeborenen Defekt des Zinktransports und einem erworbenen Zinkmangel unterschieden werden. Sowohl der angeborene als auch der erworbene Zinkmangel äußern sich in Veränderungen der Haut und ihrer Anhangsorgane. Dabei lassen sich akute von chronischen Mangelzuständen unterscheiden, meist bestehen jedoch Übergangsformen (Prasad und Oberleas, 1973).

Beim angeborenen Zinkmangel des Jugendlichen, der autosomal rezessiven *Acrodermatitis enteropathica* kommt es vor allem zu Gedeihstörungen und Wachstumsstillstand, darüber hinaus entwickeln sich Haarausfall, Hautekzeme bevorzugt im Mund und After, erosiv ulzeröse Kolitis mit Durchfällen, Immunschwäche und eine allgemeine geistige Retardierung (Moynahan, 1974, 1982).

Ein erworbener oder nutritiver Mangel kann bei parenteraler Ernährung oder Malabsorptionssyndromen, beispielsweise bei Steatorrhoe durch Bildung von Zinkseifen oder bei Morbus Crohn auftreten. Darüber hinaus kann eine Leberzirrhose zu einem sekundären Zinkmangel führen. Der alimentär bedingte Zinkmangel geht

einher mit einer Symptomatik stark verzögerter oder fehlender Rekonvaleszenz nach schweren Erkrankungen (Sandstead, 1982; Abbasi und Shetty, 1999), Störung der Wundheilung (Lansdown, 2002; Iwata *et al.*, 1999), Verminderung der Immunabwehr (Salgueiro *et al.*, 2000), erhöhter Infekthäufigkeit und Geschmacksstörungen sowie Appetitlosigkeit. Zudem wirkt er sich negativ auf bereits bestehende primäre Krankheitsbilder wie das nephrotische Syndrom, Mukoviszidose, Zöliakie, Leukose, regionale Enteritis und Immundefekte aus.

Verglichen mit dem selten auftretenden schweren Zinkmangel ist der „marginale Zinkmangel“ in der Weltbevölkerung weit verbreitet. Die Symptome sind aber weniger gut erfassbar und damit die Diagnostik sehr viel schwieriger als für einen klinisch manifesten Zinkmangel (Sandstead, 1991). Der „*Third National Health and Nutrition Examination Survey*“ belegt für den Zinkstatus einer ausgewählten US-amerikanischen Bevölkerungsgruppe, dass nur etwa 56% der untersuchten Personen (29103 Personen) eine adequate alimentäre Zinkaufnahme besitzen. Das höchste Risiko einer inadäquaten Zinkversorgung zeigen Kinder von 1-3 Jahren, heranwachsende Frauen und ältere Personen (Briefel *et al.*, 2000).

Der Bedarf an Zink kann bei einer ausgewogenen Ernährung durch die Nahrung gedeckt werden. Toxische Wirkungen von Zink werden bei Erwachsenen erst ab einer oralen Einnahme von 1-2 g erreicht. Akute Vergiftungen traten dabei früher häufiger nach Aufnahme von Zink-Acetat zum Beispiel mit sauren Speisen aus Zinkgefäßen, nach Einatmen von Zinkdampf bei Schmelzarbeiten oder nach Resorption zur Wundbehandlung verwendeten Zinkchlorids auf. Symptome sind Verätzung, metallischer Geschmack, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Hyperperistaltik, Kreislaufschwäche bis hin zu Schock und Koma (Barceloux, 1999).

1.2 Biologische Funktion von Zink im Säuger

Zink spielt als essentieller Kofaktor einer Vielzahl von physiologischen Prozessen eine bedeutende Rolle und dient damit der Gesunderhaltung von Mensch und Tier. Die weitreichende Funktion wird deutlich durch seine Beteiligung bei Wachstum und Reifung, Immunantwort, Kohlenhydrat-, Lipid-, Protein-, Porphyrin-, DNA-, RNA-, Hormon-Stoffwechsel, sowie Säure- und Basenhaushalt (Riordan, 1976).

Die Zinkhomöostase in eukaryotischen Zellen wird über die Aufnahmemenge, die intrazelluläre Verteilung in zinkspeichernden Vesikeln („Zinkosome“), die nukleo-

zytoplasmatische Verteilung und über die Zink-Eliminierung kontrolliert (Beyersmann und Haase, 2001; Cao *et al.*, 2001).

Alle Prozesse, die eine verstärkte Proteinsynthese erfordern, wie z.B. Zellproliferation, Zellwachstum, Katabolismus und Rekonvaleszenz sind zinkabhängig und verlieren im Zinkmangel an Dynamik (Prasad, 1995; Bettger *et al.*, 1981).

Die Notwendigkeit einer ausreichenden Zinkversorgung spiegelt sich auch in seiner Beteiligung an der extrazellulären Signalerkennung, dem „*second messenger*“ Metabolismus, Proteinphosphorylierungs- und -dephosphorylierungsprozessen wider. Zink besitzt somit einen Einfluss auf extra- und intrazelluläre Signaltransduktionsvorgänge, auf Proliferation und Differenzierung von Säugerzellen (Beyersmann und Haase, 2001) und möglicherweise auch eine direkte regulatorische Wirkung auf die Apoptose (Fraker *et al.*, 2000).

Hinreichend belegt sind auch die von Coto *et al.* (1992) beschriebenen Funktionen von Zink bei der Aufrechterhaltung der zellulären Immunfunktion (T-Zellen) und der Aufrechterhaltung der Struktur und Funktion von Plasmamembranen (Warren *et al.*, 1966; Chvapil, 1973).

Außerdem gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Zink im Stoffwechsel von Antioxidantien. Sie gründen ursprünglich auf *in vitro* Untersuchungen und *in vivo* Studien mit Einsatz von pharmakologischen Zinkdosen (Bray und Bettger, 1990). Dabei beruht die antioxidative Funktion nicht im eigentlichen Sinne auf der Fähigkeit zum Valenzwechsel als vielmehr auf den komplexierenden und damit stabilisierenden Eigenschaften auf zinkbindende Strukturen. Hierfür sprechen auch Beobachtungen reduzierter Zinkplasmaspiegel bei Krankheiten wie Diabetes mellitus und Lebererkrankungen, die mit erhöhtem oxidativen Stress einhergehen (Kiilerich *et al.*, 1980; Keeling *et al.*, 1981; Bode *et al.*, 1988; Car *et al.*, 1992; Faure *et al.*, 1993; Faure *et al.*, 1995; DiSilvestro *et al.*, 2000).

Zink dient bekanntlich als katalytische, strukturelle und regulatorische Komponente von mehr als 300 Enzymen aller bekannten Klassen. Dazu gehören beispielsweise DNA- und RNA-Polymerasen, tRNA-Synthetase, Carboanhydrase und Nukleosidphosphorylasen (Riordan, 1976). Allerdings gilt auch als gesichert, dass das Zinkmangelsyndrom nicht allein mit dem Aktivitätsrückgang zinkabhängiger Enzyme erklärt werden kann.

Eine unzureichende alimentäre Aufnahme an Zink führt, wie oben beschrieben, zu einem komplexen Muster an Mangelsymptomen, und die biochemischen Ursachen der Zinkmangelpathologie sind bisher nicht hinreichend geklärt (Bettger, 1993). Die sichere Diagnose einer marginalen Versorgung ist daher aufgrund fehlender verlässlicher Marker ebenfalls kaum möglich.

Neben zinkabhängigen Protein-Protein- und Protein-Substrat-Interaktionen wird deshalb zunehmend auch die Beteiligung des Znks in der Genexpression betrachtet. Eine Regulation der Genexpression durch metallische Kofaktoren wie Zink ist zwar sehr gut bekannt, jedoch ist dieser Einfluss nur für einige wenige Gene gut dokumentiert (Blanchard und Cousins, 1996). Etwa 1% des menschlichen Erbmateri- als kodiert für Zinkfingerproteine, die am häufigsten vorkommenden Transkriptionsfaktoren (Cousins, 1998; <http://www.nutrition.org/nutinfo/content/zinc.shtml>). Da das Spurenelement als nicht ersetzbarer Kofaktor von Transkriptionsfaktoren in die Genexpression eingreift, könnten „zink-sensitive“¹ Gene daher als Biomarker zur Beurteilung der Zinkversorgung dienen.

1.3 Regulation der Transkription und die Rolle von Zink

Die meisten somatischen Zellen, mit Ausnahme einiger rearrangierter Zellen des Immunsystems, weisen das gleiche Erbgut auf. Für die Expression eines zell- oder gewebespezifischen Phänotyps, die Anpassung der Zelleistungen an geänderte physiologische Bedingungen und beim Zustandekommen pathobiochemischer Vorgänge spielt die Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle oder ist sogar unabdingbare Voraussetzung.

Änderungen der Genexpressionsrate können prinzipiell durch Aktivierung der Genstruktur, Initiation oder Hemmung der Transkription oder durch veränderten Transport und Prozessierung des Transkriptes entstehen. Auch die Translation der mRNA kann einer Veränderung unterliegen.

Bei der Untersuchung der Transkriptiongeschwindigkeit viraler Gene stieß man erstmalig auf Kontrollelemente, deren Vorhandensein zu einer vielfachen Steigerung

¹ Im Rahmen dieser Arbeit werden mit dem Begriff „zink-sensitive“ jene Gene bezeichnet, deren korrespondierende Transkripte oder von ihnen kodierte Proteine in Abhängigkeit vom Zinkangebot signifikante Veränderungen der Menge erfahren. Die veränderte Transkriptmenge wird dabei maßgeblich durch eine erhöhte oder verminderte Transkriptionsrate des betroffenen Gens und/oder durch eine Veränderung der Transkriptstabilität bedingt. Entsprechend kann die veränderte Proteinmenge auf veränderter mRNA-Menge, Translation und/oder Proteinstabilität basieren.

der Transkription dieser Gene führte (Nevins, 1981; Lusky *et al.*, 1983). So wurden die sogenannten *Enhancer*²- (=Verstärker)-Sequenzen entdeckt, die auch als *cis*-aktivierende Elemente bezeichnet werden (Arst und McDonald, 1975).

Enhancer-Elemente liegen meist einige hundert Basenpaare oberhalb der Promotorregion, können aber auch unterhalb oder innerhalb des Gens lokalisiert sein. Die Transkriptionssteigerung durch *Enhancer* findet nur dann statt, wenn diffusile, induzierbare Proteine an diese DNA-Sequenzen binden. Der entstehende Komplex wirkt als zusätzlicher Faktor für die RNA-Polymerase II und stimuliert die Initiation der Transkription. *Enhancer*-Elemente (z.B. MRE = *metal response element*) und zugehörige Proteinfaktoren (z.B. MTF1 = *metal response element-binding transcription factor-1*) vermitteln die sogenannte *trans*-Aktivierung. Entsprechend der homo- oder heterodimeren Struktur der Transkriptionsfaktoren handelt es sich bei den *cis*-Elementen meist um kurze palindromische oder als Tandem wiederholte Sequenzen (Choo und Klug, 1994).

Ein die Transkription regulierendes induzierbares Protein benötigt für die Aktivierung dabei wenigstens drei Domänen:

- eine Domäne für die Bindung des aktivierenden Liganden
- eine Domäne, die den Initiationskomplex der Transkription aktiviert, sowie
- eine Domäne für die DNA-Bindung (bspw. zinkhaltig)

Bei den zinkhaltigen Domänen wird je nach entstehender dreidimensionaler Struktur zwischen Zinkfinger-, Zinkcluster- (z.B. GAL4) und Zinkdrehungsproteinen unterschieden (z.B. bei der Steroidhormonrezeptor-Superfamilie) (Abb. 1.1).

² die der englischen Sprache oder einer anderen Fremdsprache entnommenen Begrifflichkeiten werden folgend im Textfluß stets kursiv dargestellt

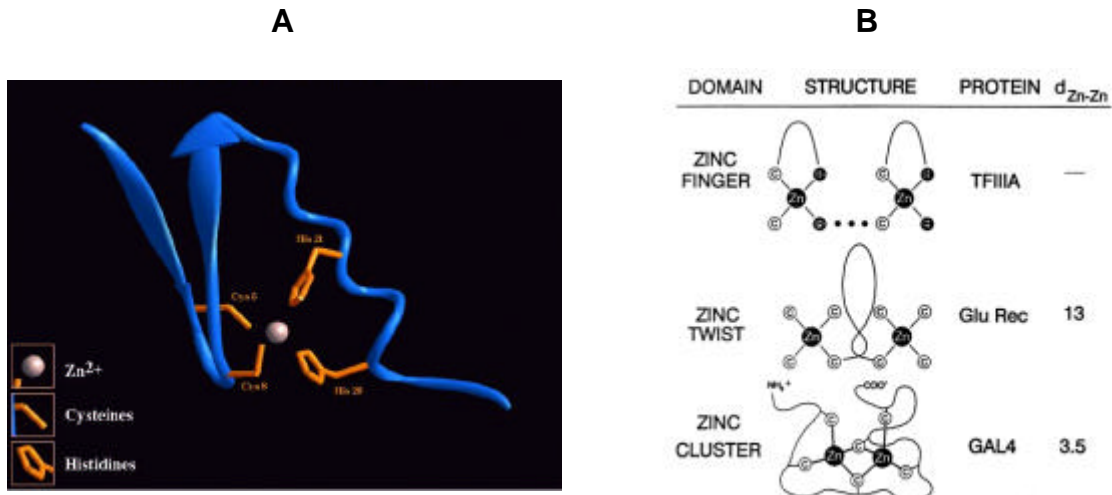


Abb. 1.1: (A) *Allgemeine Struktur eines Zinkfingerproteins* (Appel et al., 1994; SWISS-3D IMAGE, <ftp://ftp.expasy.org/databases/swiss-3dimage/IMAGES/JPEG/S3D00404.jpg>) und (B) *Charakteristika der Zinkbindungsstellen* der DNA-Bindungsdomänen von Transkriptionsfaktoren, mit Beispiel eines Vertreters jeder Gruppe; TF IIIA=transcription factor IIIA; Glu Rec = glucocorticoid receptor; GAL4 = galactose pathway regulator in *Saccharomyces Cerevisiae*; d_{Zn-Zn} = Zink-Zink-Interatomabstand in Å (nach Vallée et al., 1991)

Zinkfinger wurden ursprünglich beim die 5S mRNA Transkription aktivierenden Transkriptionsfaktor TF IIIA in *Xenopus* beobachtet (Hanas et al., 1983). Die Fingerstruktur entsteht dadurch, dass Cysteinyl- oder Histidylreste in der Peptidkette so positioniert sind, dass sie durch ein Zinkatom komplexiert werden können, wobei eine schleifenförmige Struktur, der Zinkfinger, entsteht. Die Schleifen bilden α -helikale oder β -Faltblattstrukturen, die imstande sind, in der großen Furche der DNA basenspezifische Kontakte zu knüpfen. Man unterscheidet Cys_2-His_2 (beispielsweise der „Zinksensor“ MTF1) bzw. Cys_2-Cys_2 -Zinkfinger, wobei letztere bevorzugt in der Großfamilie der Steroidhormonrezeptoren vorkommen (Vallée et al., 1991; Lichtlen und Schaffner, 2001). Ein Fehlen des Zinkatoms führt somit zur Zerstörung dieser essentiellen Strukturen und entsprechend ändert sich sowohl die Art der Transkripte, als auch die Transkriptionsrate ausgewählter Gene (Falchuk, 1998).

Zink beeinflusst die Genexpression durch direkte Interaktion mit regulatorischen Elementen, als strukturelle Komponente von Transkriptionsfaktoren oder über die Beeinflussung von übergeordneten Signaltransduktionswegen (Abb. 1.2) (Cousins, 1998; 1999).

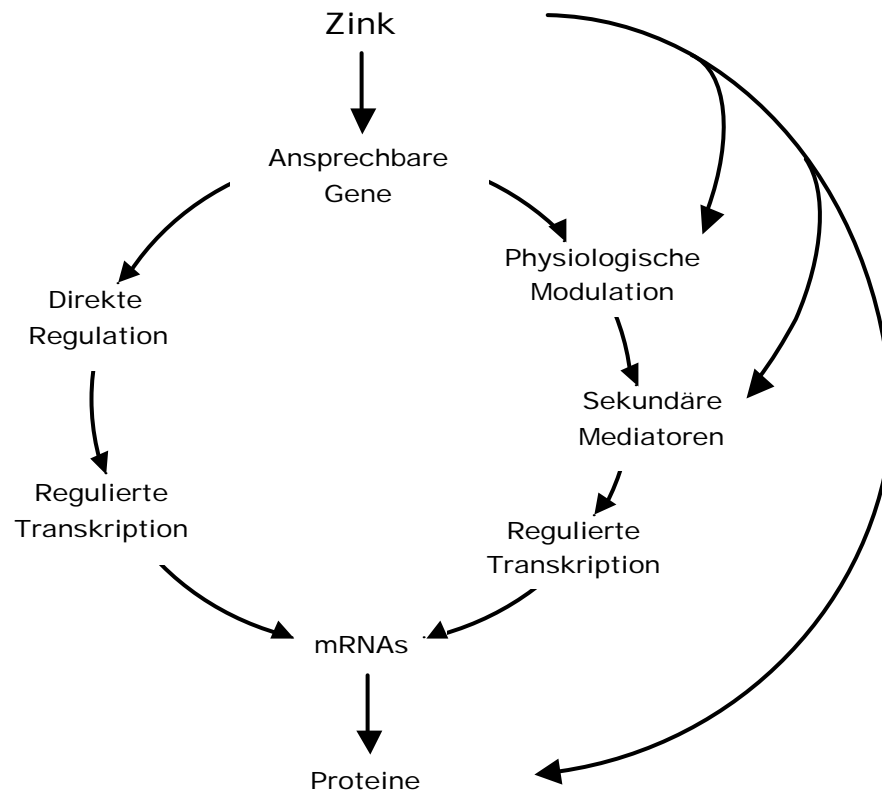


Abb. 1.2: Einflussebenen von Zink auf die Genexpression (mod. nach Cousins, 1998; 1999)

Als Ligand des diffusiblen, induzierbaren DNA-bindenden Transkriptionsfaktors MTF-1, der als Zinksensor der Zelle fungiert, verändert Zink die Transkriptionsrate einiger Gene direkt. Beispielsweise wird die Expression von Metallothionein durch das Binden von Zink an MTF-1 reguliert, welches mit dem *cis*-aktivierenden Element MRE des Metallothionein-Promotors interagiert (Westin und Schaffner, 1988). Das Zink-Cluster-Protein weist dabei sechs Zinkfinger auf, wovon vier zur Bindung an die DNA dienen und zwei frei bleiben und als Sensoren für das freie zelluläre Zink fungieren (Andrews, 2000; Andrews *et al.*, 1987; Lichtlen und Schaffner, 2001). Dem gleichen Regulationsweg über MTF-1 unterliegt die Transkription des ZnT1-Gens, das für einen Zinktransporter kodiert, der den Zink-Efflux aus Zellen vermittelt (McMahon und Cousins, 1998 a, b) (Abb. 1.3).

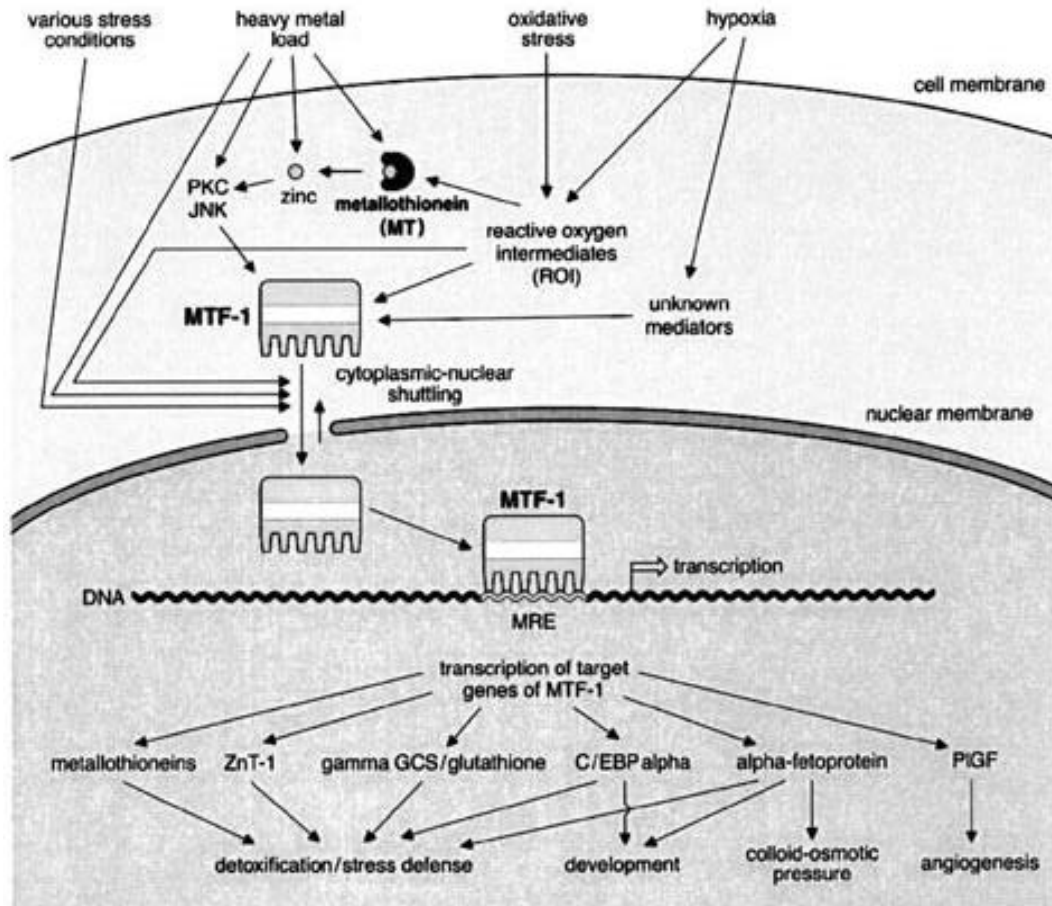


Abb. 1.3: *Schematische Darstellung der MTF-1-Wirkungsweise* (Lichtlen und Schaffner, 2001); MTF-1= metal transcription factor ; PKC=protein kinase C; JNK= c-Jun N-terminal kinase; MRE=metal response element; ZnT1= zinc transporter 1; GCS= gamma glutamyl-cysteine synthetase; C/EBP=CCAAT/enhancer-binding protein; PlGF= placenta growth factor.

Der Effekt von Zink auf die Expression anderer Gene konnte jedoch bislang nicht im vergleichbaren molekularen Detailreichtum aufgeklärt werden (Cousins, R., 1999).

Neben der regulatorischen Liganden-Sensor-Eigenschaft von Zink bei der Expressionskontrolle spielen auch die strukturelle (im Zinkfingermotiv) und katalytische Funktion eine Rolle. Die katalytische Funktion kommt bei der RNA-Synthese, einem essentiellen Schritt der Genexpression, zum tragen. Zinkionen werden hier für die Aktivität der RNA-Polymerasen benötigt (Cousins, 1998;1999).

Weitere Wirkungen von Zink kommen indirekt über seine Beeinflussung der Hormonwirkung und von Stoffwechselwegen zustande, welche wiederum die Transkription entweder direkt oder indirekt über spezielle Signaltransduktionskaskaden modulieren.

1.4 Beeinflussung des Transkriptoms im Zinkmangel

Basierend auf der Annahme, dass Zink eine regulierende Rolle in der Expressionskontrolle besitzt, konnte in der Tat gezeigt werden, dass unter Einsatz herkömmlicher Untersuchungsmethoden der Expression, wie der *Subtracted Library Hybridisation* und *mRNA Differential Display*-Technik, beim Säuger zink-sensitive Gene existieren. Demnach werden die mRNA-Mengen von Uroguanylin, Endothelin, p53, Retinol-Bindungsprotein und Apo-Lipoproteinen in Abhängigkeit des Zinkstatus reguliert (Yanagisawa und Wada, 2000; Blanchard und Cousins, 2000; Fanzo *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1998; Satre *et al.*, 2001; Blanchard und Cousins, 1996). Blanchard und Cousins (1996) identifizierten mittels *Differential Display* 47 potentiell regulierte Gene im Darm von Zinkmangelratten, von denen für vier die Regulation mit unabhängiger Methode bestätigt werden konnte (Tab. 1.1). Bei neueren Studien unter Einsatz von *cDNA-Arrays* und 1176 untersuchten Zielsequenzen konnten im Dünndarmgewebe 16 auf- und 16 herabregulierte Transkripte im Zinkmangelzustand identifiziert werden. Eine Verifizierung erfolgte für 6 ausgewählte Gene, wobei für fünf davon die Regulation bestätigt werden konnte (Blanchard *et al.*, 2001). Zwar wurde in Säugern eine Reihe zink-sensitiver Gene beschrieben (Tab. 1.1), eine umfassende Analyse des „Zinkregulons“ fehlt jedoch.

Tab. 1.1: *Ausgewählte zink-sensitive Gene aus Literaturbefunden; * Namen werden in Anlehnung an die Bezeichnung in der Datenbank in der Tabelle in englischer Sprache beibehalten*

Gen / Protein / Homologie*	Spezies/ Gewebe	Veränderte Expressionsebene/Methode	Quelle
α-amylase	Ratte Leber Darm	↓ mRNA im Zinkmangel, <i>Northern Blot</i> Analyse, differentielle Hybridisierung mit cDNA –Bibliothek	Shay & Cousins 1993
aldehyde reductase	Ratte Darm	↓ mRNA <i>cDNA-Array</i> und <i>Real time RT PCR</i>	Blanchard et al. 2001
aldolase B	Ratte Darm Leber Niere	↓ mRNA im Zinkmangel, <i>Northern Blot</i> Analyse, differentielle Hybridisierung mit cDNA-Bibliothek	Shay & Cousins 1993
alkaline phosphatase II	Ratte Darm	↓ mRNA in Zinkzulage ↑ mRNA in Zinkmangel, <i>Northern Blot</i> Analyse, differentielle Hybridisierung mit cDNA – Bibliothek	Blanchard & Cousins 2000
angiotensin converting enzyme	Ratte Hoden	↓ mRNA im Zinkmangel <i>Northern Blot</i> Analyse ↓ Protein in Zinkmangelratten	Stallard & Reeves 1997
apolipoprotein A1	Ratte und Hamster Leber Darm	↓ cDNA im Zinkmangel, differentielle Hybridisierung mit cDNA – Bibliothek ↓ hepat. mRNA , <i>RNAse protection assay</i> , <i>Northern Blot</i> Analyse ↓ Plasmaproteinmenge, <i>SDS-PAGE</i>	Shay & Cousins 1993 Wu et al. 1998

Gen / Protein / Homologie*	Spezies/ Gewebe	Veränderte Expressionsebene/Methode	Quelle
apolipoprotein B mRNA editing catalytic SU 1	Ratte Leber	↓ mRNA im Zinkmangel <i>RNAse protection assay</i> <i>Apo B mRNA editing assay</i>	Reaves et al. 1999
apurinic endonuclease	Ratten Zelllinie	↑ mRNA in Zinkmangel	Ho & Ames 2002
bovine complex I ubiquinone oxidoreductase SU ASHI	Ratte	↓ mRNA im Zinkmangel <i>Northern Blot Analyse</i> und <i>Differential Display</i>	Blanchard & Cousins 1996, 2000
bovine ubiquinone oxidoreductase SU CI-B9	Ratte	↑ mRNA im Zinkmangel <i>Northern Blot Analyse</i> und <i>Differential Display</i>	Blanchard & Cousins 1996, 2000
Calbindin	Ratte Darm Herz	↓ cDNA im Zinkmangel, differentielle Hybridisierung mit cDNA –Bibliothek	Shay & Cousins 1993
c-fos	Humane Lungenzelllinie	↑ mRNA in Zinkmangel , <i>RNAse Protection Assay</i>	Fanzo et al. 2001
cholecystokinin	Ratte Darm	↑ mRNA im Zinkmangel <i>Northern Blot Analyse</i> und <i>Differential Display</i>	Blanchard & Cousins 1996, 2000
cis Golgi p28		↑ mRNA im Zinkmangel, <i>Northern Blot Analyse</i> und <i>Differential Display</i>	Blanchard & Cousins 2000
cryptdin	Ratte Darm	↓ cDNA im Zinkmangel, differentielle Hybridisierung mit cDNA –Bibliothek	Shay & Cousins 1993
CYP 2C11	Ratte Leber	↓ mRNA im Zinkmangel mit <i>RT PCR</i> ↓ Protein im Zinkmangel mit <i>Western Blot Analyse</i> , ↓ nachfolgende Aktivität der Testosteron 2-alpha und 16-alpha Hydroxylase	Xu et al. 2001
CYP 2C12	Ratte Leber	↑ mRNA im Zinkmangel mit <i>RT PCR</i>	Xu et al. 2001
CYP 3A18	Ratte Leber	↓ mRNA im Zinkmangel mit <i>RT PCR</i>	Xu et al. 2001
CYP 3A2	Ratte Leber	↓ mRNA im Zinkmangel mit <i>RT PCR</i>	Xu et al. 2001
CYP 3A9	Ratte Leber	↑ mRNA im Zinkmangel mit <i>RT PCR</i>	Xu et al. 2001
cytochrome b	Ratte Darm, Leber, Herz, Niere, Gehirn, Lunge, Hoden	↓ cDNA im Zink, differentielle Hybridisierung mit cDNA –Bibliothek	Shay & Cousins 1993
cytochrome c oxidase	Ratte Darm, Leber, Herz, Niere, Gehirn, Lunge, Hoden	↓ cDNA im Zinkmangel, differentielle Hybridisierung mit cDNA -Bibliothek	Shay & Cousins 1993
cytochrome oxidase SU II	Mensch, Fibroblasten von AE Patienten	↓ mRNA im Zinkmangel <i>Northern Blot Analyse</i> und <i>Differential Display</i>	Muga & Grider 1999
deoxythymidine kinase	Humane Zelllinie	↓ mRNA im Zinkmangel <i>Northern Blot Analyse</i> ↓ Aktivität in Zellen	Prasad et al. 1996
DNA damage repair and recombination protein 23B protein	T-Lymphocyten	↑ mRNA <i>Microarray</i> und <i>Real time RT PCR</i>	Moore et al. 2001
EGR-1 und HNF-3 beta	Leberzelllinie Mensch	↓ Protein im Zinkmangel und vermehrte Degradierung	Cui et al. 2002

Gen / Protein / Homologie*	Spezies/ Gewebe	Veränderte Expressionsebene/Methode	Quelle
fatty acid binding protein	Ratte Darm	↓ cDNA in Zinkmangeltieren, differentielle Hybridisierung mit cDNA –Bibliothek ↓ mRNA-Ebene im Zinkmangel <i>Differential Display</i> und <i>Northern Blot</i> Analyse	Shay & Cousins 1993 Blanchard & Cousins 2000
fatty acid binding protein	Ratte Darm	↑ mRNA, <i>cDNA-Array</i> und <i>Real time RT PCR</i>	Blanchard et al. 2001
Gadd45	Humane Lungenzelllinie	↑ mRNA in Zinkmangel, <i>RNAse Protection Assay</i>	Fanzo et al. 2001
galanin	Ratte Hypothalamus	↓ Zinkmangel mRNA <i>Northern Blot</i> Analyse ↓ Konzentrationen bei Zinkmangelratten	Selvais et al. 1997
growth hormone receptor/growth hormone binding protein	Ratte Leber	↓ mRNA in Zinkmangel <i>Northern Blot</i> Analyse ↓ Leber-GH-Rezeptor ↓ Serum-GHBP	McNall et al. 1995 Lefebvre et al. 1998 Ninh et al. 1995, 1998a
glutathione-s-transferase SU 8	Ratte Darm	↓ mRNA, <i>cDNA-Array</i> und <i>Real time RT PCR</i>	Blanchard et al. 2001
glutathion-s-transferase	Ratte olfaktorisches Epithelium	↓ mRNA im Zinkmangel <i>in situ</i> Hybridisierung ↓ mRNA im Zinkmangel mit <i>cRNA antisense</i> Sonde ↓ Protein Immunoreaktivität	Kudo et al. 2000
hepatic apolipoprotein B	Ratte	↓ Editieren in Leber von Zinkmangelratten, aber keine Änderung in der mRNA-Menge von Apo B, <i>Ribonuclease Protection Assay</i>	Nassir et al. 1996 Reaves et al. 2000
hepatic pyruvate kinase	Ratte	↓ mRNA bei Zinkmangel <i>Northern Blot</i> Analyse	Kennedy et al. 1998
insulin-like growth factor 1 (IGF1)	Ratte Leber	↓ mRNA im Zinkmangel, <i>Northern Blot</i> Analyse ↓ Serumkonzentration im Zinkmangel radioimmunologische Bestimmung	McNall et al. 1995 Lefebvre et al. 1998 Ninh et al. 1998a, b
IGF-binding proteins 2 / 3 (IGFBP)	Ratte Leber	↓ Protein im Zinkmangel <i>Western Blot</i> Analyse ↓ in Serum im Zinkmangel	Freake et al. 2001 Ninh et al. 1998a,b
interleukin 2	Humane Lymphoblastoid zelllinie HUT-78	↓ mRNA, <i>Northern Blot</i> Analyse und <i>Real time RT PCR</i>	Prasad et al. 2002
laminin receptor	T-Lymphocyten	↑ mRNA, <i>Microarray</i> und <i>Real time RT PCR</i>	Moore et al. 2001
lck (p56 ^{lck})	T-Lymphocyten	↑ mRNA <i>Microarray</i> und <i>Real time RT PCR</i> ↑ Protein <i>Western Blot</i> Analyse	Moore et al. 2001
leptin	Ratte Adipocyten	↓ mRNA im Zinkmangel <i>Northern Blot</i> Analyse ↓ zirkulierende Leptinmengen im Zinkmangel,	Ott and Shay 2001
metallothionein	u.a. Maus, Ratte Darm; Niere und Leber	↓ mRNA im Zinkmangel; <i>Differential Display</i> und <i>Northern Blot</i> Analyse Zink reguliert Genexpression direkt durch Bindung an MTF-1 über multiple MRE's im MT-Promotor, ↑ mRNA nach Zinkzulage <i>Northern Blot</i> Analyse	Andrews et al. 1987 Westin & Schaffner 1988, Shay & Cousins 1993
myeloid cell leukemia sequence-1	T-Lymphocyten	↓ mRNA, <i>Microarray</i> und <i>Real time RT PCR</i>	Moore et al. 2001

Gen / Protein / Homologie*	Spezies/ Gewebe	Veränderte Expressionsebene/Methode	Quelle
Nestin	Maus Fötus Gehirn	↓ Protein im Zinkmangel des Muttertiers <i>Western Blot</i> Analyse	Wang et al. 2001
neuropeptide Y	Ratte Hypothalamus	↑ mRNA im Zinkmangel <i>Northern Blot</i> Analyse ↑ Protein im Zinkmangel ELISA	Selvais et al. 1997, Lee et al. 1998
p53	Humane Lungenzelllinie Ratten Zelllinie	↑ mRNA in Zinkmangel, <i>RNAse Protection Assay</i> aber nachgelagerte Aktivität vermindert	Fanzo et al. 2001 Ho & Ames 2002
precursor peptide hormone uroguanylin	Ratte Darm	↑ mRNA im Zinkmangel <i>Northern Blot</i> Analyse und <i>Differential Display, in situ-Hybridisierung</i> ↑ Protein im Zinkmangel, <i>Western Blot</i> Analyse, Immunohistochemie	Blanchard & Cousins 1996, 1997, 2000 Cui et al. 2000, 2001, 2003
proteasomal ATPase	Ratte Darm	↑ mRNA im Zinkmangel <i>Northern Blot</i> Analyse und <i>Differential Display</i>	Blanchard & Cousins 2000
ribosomal protein L36a	Ratte Darm	↓ mRNA im Zinkmangel, <i>cDNA-Array</i> und <i>Real time RT PCR</i>	Blanchard et al. 2001
thymulin	Human T-Zellen	↓ Serumproteinmenge ↓ Thymulinaktivität	Prasad et al. 1988 Prasad. 1998
transthyretin	Ratte Leber	↑ mRNA im Zinkmangel <i>Northern Blot</i> Analyse ↑ mRNA Analyse nach <i>in vitro</i> Translation und 2D-Gelelektrophorese	Kimball et al. 1995
ubiquitin	Ratte Darm, Leber, Herz, Niere, Gehirn, Lunge, Hoden	↓ cDNA in Zinkmangeltieren, differentielle Hybridisierung mit cDNA –Bibliothek	Shay & Cousins 1993
Unknown gene bank no. H00013	Ratte	↑ mRNA im Zinkmangel, <i>Differential Display</i> und <i>Northern Blot</i> Analyse	Blanchard & Cousins 1996
zinc transporter 1 (ZnT1)	Ratte Darm Niere Leber Maus Zellen	↑ mRNA bei Zinkzulage, <i>Northern Blot</i> Analyse, <i>Western Blot</i> Analyse u.a. über MRE im Promotor reguliert, nicht ↓ im Mangel	Liuzzi et al. 2000 Langmade et al. 2000
zinc transporter 2 (ZnT2)	Ratte Darm Niere Leber	↑ mRNA bei Zinkzulage, <i>Northern Blot</i> Analyse	Liuzzi et al. 2000

Im Gegensatz zu den in humanen Zelllinien und in tierexperimentellen Studien erhaltenen Befunden konnte man im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* unter Einsatz der *DNA-Array-Technologie* sehr viel mehr zink-sensitive Gene identifizieren. Lyons *et al.* (2000) dokumentierten, dass 15% der Gene in *Saccharomyces cerevisiae* im Zinkmangel, ermittelt durch Variation des Zink-Angebots (Zink-Depletion und Zink-Exzess), reguliert werden. Diese ausgeprägte Zink-Sensitivität lässt daher auch für den Säuger einen stärkeren Einfluß von Zink auf das Genom vermuten, als bisher mit den verfügbaren Techniken nachgewiesen werden konnte. Die *DNA-Array-Methode* scheint demnach als leistungsfähiges

Screening-Werkzeug zur umfassenden Identifikation von Genen geeignet, die durch Nahrungsinhaltsstoffe, beispielsweise Metallionen wie Zink und Kupfer, reguliert werden (Gross *et al.*, 2000). *Screening*-Untersuchungen auf Proteinebene zum Zinkversorgungszustand, beispielsweise mittels 2D-Elektrophorese, existieren dagegen kaum. Kimball *et al.* (1995) untersuchten mit dieser Technik das mittels *in vitro* Translation erzeugte Protein-Expressionsprofil der Rattenleber im Zinkmangel. Aus den Ergebnissen schlossen die Autoren, dass Zink die Synthese spezifischer Leberproteine durch Veränderung der relativen mRNA-Menge regulieren kann. Für einzelne Proteine, für die bereits auf mRNA-Ebene eine Regulation nachgewiesen wurde, konnte die Veränderung ihrer Spiegel ebenfalls bestätigt werden. Mit der Weiterentwicklung von *Screening*-Methoden auf Proteinebene und der damit verbundenen Möglichkeit zur schnellen Identifikation der differentiell regulierten Proteine ist zu erwarten, dass auch hiermit umfangreiche Analysen zur Bedeutung von Zink für das Proteom gelingen.

1.5 *Screening*-Methoden zur Expressionsanalyse

Klassische Expressionsanalysen bedienen sich Methoden wie *Northern Blot*, *RT PCR*, *RNAse Protection Assays*, *Subtracted Library Hybridisation* und *mRNA Differential Display*. Allerdings identifizieren diese Methoden jeweils nur wenige Gene gleichzeitig. Ein vielversprechender Ansatz für die parallele hochauflösende Analyse vieler Gene sind dagegen Nukleinsäure-Arrays bzw. *DNA-Arrays* (Hochdurchsatzanalyse der Genexpression).

Voraussetzung für die Entwicklung der *DNA-Arrays* war die Generierung umfassender Sequenzinformation aus den verschiedenen Genomprojekten (Aaronson *et al.*, 1996; Hillier *et al.*, 1996). Da sich jedoch ein beträchtlicher Teil der Regulation physiologischer Prozesse post-translational ereignet, ergibt sich aus der alleinigen Messung der mRNA-Menge nur ein unvollständiges Bild. Strategien, um globale Expression, Lokalisierung und Interaktionen von Proteinen zu untersuchen, fallen in das Feld der *Proteomics* mit einer Vielzahl an Variationsmöglichkeiten zur Separierung und Identifikation der Proteine (McDonald und Yates, 2000). Da hierbei gegenwärtig jedoch die Proteinmenge meist noch die limitierende Größe für den Einsatz der *Proteomics* darstellt, scheint die Kombination von Transkriptom- und Proteomanalyse besonders geeignet für eine umfassende Untersuchung zellulärer Antworten auf die Zinkversorgung.

1.5.1 DNA-Array-Technologie

Das Prinzip der *DNA-Array*-Technologie macht sich die spezifischen DNA-Basenpaarungen A-T und G-C zu Nutze, um im großen Maßstab RNA-Spezies in ihrem Vorkommen nachzuweisen. Die Analyse der Menge gebundener Probe gibt dabei Aufschluß über die vorhandene Transkriptmenge.

Die Herstellung der *Arrays* erfolgt maschinell durch punktförmige Deposition von Proben bekannter Sequenz an einer spezifischen Stelle auf einem Trägersubstrat (Nylonmembran, Glas-, Silikon- oder Plastiksubstrat (Dhiman, 2001; Heller, 2002)). In einem einzigen Experiment kann durch hochspezifische Hybridisierung einer komplexen Probe an die Fänger des definierten Rasters die Transkriptmengenänderung für eine Großzahl an Genen effizient erhalten werden (Heller, 2002).

Basierend auf diesem grundlegenden Konzept gibt es eine Vielzahl von *Array*-Systemen und Anwendungstechniken (Maughan, 2001), die sich nach Typ der Fängermoleküle in komplementäre DNA- (*cDNA*) und Oligonukleotid-*Arrays* einteilen lassen (Schulze und Downward, 2001).

1.5.1.1 Komplementäre DNA (*cDNA*)-*Arrays*

Die Fängersonden bei *cDNA-Arrays* sind genspezifische DNA-Amplifikate, generiert aus *cDNA*-Bibliotheken oder Klonkollektionen, immobilisiert auf Glasträgern oder Nylonmembranen. Bis zu 30.000 *cDNAs*, mit einer typischen *Spot*-Größe von 100-300 μm , lassen sich auf einem *Array* unterbringen (Schulze und Downward, 2001).

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten *cDNA-Arrays* enthalten auf der positiv geladenen Nylonmembran (8 x 12 cm) 1176 einfach gespottete, genspezifische Amplifikate. Neben diesen 200-600 bp langen *cDNA*-Fragmenten, ohne repetitive und hochhomologe Bereiche, sind Plasmid- und Bakteriophagen-DNA als Negativkontrollen zum Nachweis der Hybridisierungsspezifität immobilisiert. Zur Normalisierung der mRNA-Menge dienen aufgebraute *cDNAs* einiger „*House keeping*“-Gene. Die Anordnung der spezifischen Gensequenzen auf dem *Array* erfolgt in funktionellen Klassen. Um das Problem der nichtspezifischen Hybridisierung zu minimieren, nutzt dieses *Array*-System neben bioinformatisch optimierten immobilisierten Zielsequenzen eine spezielle Sondenherstellung. Eine Mischung von zielsequenzspezifischen *Primern*, eingesetzt zur radioaktiven Sondensynthese, führt zu einer deutlichen Reduktion der Komplexität der zu untersuchenden Probe. Im Gegensatz

zur üblichen Sondenherstellung über Oligo-(dT)- oder *Random-Primer* verbessert sich durch die reduzierte Komplexität die Sensitivität um den Faktor zehn und geht mit einer Verminderung des nicht spezifischen Hintergrundsignals einher. Der Einsatz von ³²Phosphor-dATP oder ³³Phosphor-dATP erlaubt in diesem System theoretisch eine Detektion der markierten Probe bei einer Kopienzahl von nur 10-20 Kopien pro Zelle. Durch die hohe Sensitivität kann Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial in die Analyse eingesetzt werden.

1.5.1.2 Oligonukleotid-Arrays

Für Oligonukleotid-Arrays werden kurze (20-25 bp) Oligomere *in situ* durch Photolithographie auf Silizium-Halbleiterscheiben auf dem Array synthetisiert. Alternativ können durch Tintenstrahltechnologie auch längere vorsynthetisierte Oligonukleotide (30-100 bp) auf Glasträger gedruckt werden. Ein Vorteil der Oligonukleotid-Arrays ist, dass die Sequenzinformation allein ausreichend ist, um einen Fänger zu generieren, ohne zeitaufwendiges Herstellen von cDNA- Proben. Die Kürze der Fänger erleichtert zwar das Fängerdesign zur diskriminierenden Detektion von *Splice*-Varianten und hochhomologen Sequenzen, führt aber auch zu geringerer Sensitivität kurzer Oligonukleotid-Arrays. Hoher bioinformatischer Aufwand ist nötig, um bei gegebener Länge der Fänger gleiche Hybridisierungsbedingungen anwenden zu können. Die Entwicklung von Arrays mit längeren präsynthetisierten Oligomeren hat dieses Problem allerdings reduziert. Die hohen Kosten, sowohl der *in situ* synthetisierten, als auch der längeren präsynthetisierten Oligomer-Arrays, stellen sicherlich ein Problem dar. Mit sinkenden Kosten der Oligonukleotidsynthese wird allerdings auch eine Kostenreduktion der käuflichen Arrays erwartet (Schulze und Downward, 2001).

Die hier verwendeten Oligonukleotid-Arrays Pan® Rat Liver und Pan® Rat 5 K Array mit präsynthetisierten Oligonukleotiden repräsentieren 1353 (auf 1,8 x 1,8 cm) bzw. 5535 (auf 1,8 x 3,6 cm) Rattengene. Nach der „MWG“-Methode 1Gen/1Oligo wurde jedes 50mere Oligonukleotid spezifisch für die Bindung an ein jeweiliges Gen entworfen. Die Sequenzen wurden einer Redundanzprüfung durch Datenbank-Vergleich (GenBank) unterzogen. Der Vergleich zweier Expressionsprofile erfolgt bei diesem System über kompetitive Bindungshybridisierung. Aus den zu vergleichenden Proben werden durch Einbau verschiedener Cy-Farbstoffe Sonden synthetisiert, die gemeinsam auf einem Glasträger-Array - und damit unter identischen Bedingungen - um die Bindungsplätze konkurrieren.

1.5.1.3 Elektronisches Array-System

Als elektronisches *Array*-System wurde hier die NanoChip™ Molecular Biology Workstation (Nanogen Inc., San Diego, CA) eingesetzt. Auch dieses System nutzt die Immobilisierung präsynthetisierter Oligonukleotide und ist mit hundert möglichen Besetzungsplätzen momentan ein *Low-Density-Array*-System.

Die Grundeinheit ist ein aktiv programmierbarer Elektronik-Matrix-*Chip* mit individuell adressierbaren Plätzen auf der *Chip*-Oberfläche. Der *Chip* ist kleiner als 1x1 cm mit einer aktiven Fläche von etwa 2x2 mm. Die Produktion der *Chips* erfolgt auf Halbleiterscheiben mit einer Basis aus Silizium und einer isolierenden Schicht aus Siliziumdioxid. Der zunächst unbeladene Semikonduktor-*Microchip* weist 80 µm weite Mikrolokationen mit darunter liegenden Platin-Mikroelektroden und 20 äußeren Nebenelektroden auf.

Voraussetzung zur Verwendung des *Chips* für die Analyse von Biomolekülen ist die Gelpermeationsschicht aus porösem Hydrogelmaterial (Agarose oder Polyacrylamid), die die *Chip*-Oberfläche bedeckt. Sie ist mit dem Kupplungsagens Streptavidin für die Anheftung der biotinylierten DNA-Fänger versehen. Die Halbleiterkontrollelemente sind in der Siliziumstruktur lokalisiert und kommen deshalb nicht mit den applizierten wässrigen Fänger-Lösungen in Kontakt, die für das Experiment über die *Chip*-Oberfläche gespült werden. Elektrophoretische Felder bedingen einen kontrollierten Transport der biotinylierten Oligonukleotide nacheinander zu den adressierten Besetzungsplätzen. Sowohl für den schnellen elektrophoretischen Transport der DNA-Fänger als auch für die effiziente elektrisch getriebene Probenhybridisierung werden spezielle zwitterionische Puffersysteme mit geringen Leitfähigkeiten (<100 µS/cm) eingesetzt. Als besonders geeignet erwies sich ein Histidin-Puffersystem (Edman *et al.*, 1997). Dieser Ansatz ermöglicht die Beschleunigung der normalerweise passiven Hybridisierungsereignisse durch aktive Aufkonzentrierung der Probe am Besetzungsplatz. Die Permeationsschicht erlaubt das Anlegen verschiedener Stromstärken (>100 nAmp) und Spannungen (>1,2 Volt) und wirkt als Schutz der sensitiven DNA-Hybridisierungsreaktion. Nachteilige elektrochemische Oxidations- und Reduktionseffekte, die während der Aktivierungsphase an den Mikroelektroden auftreten, werden reduziert und die adversen Effekte von Elektrolyseprodukten auf die Hybridisierung minimiert. Das Umkehren des elektrischen Feldes am spezifischen Platz produziert einen

Stringenzeffekt, was die Hybridisierungsspezifität und Diskriminierungsfähigkeit des Systems stark erhöht (Heller, 2002).

Der *Chip* liegt in einer Trägerkassette (Abb.1.4), die zur Kopplung an die elektronische und optische Einheit und die Flüssigkeitszufuhr des Systems dient.

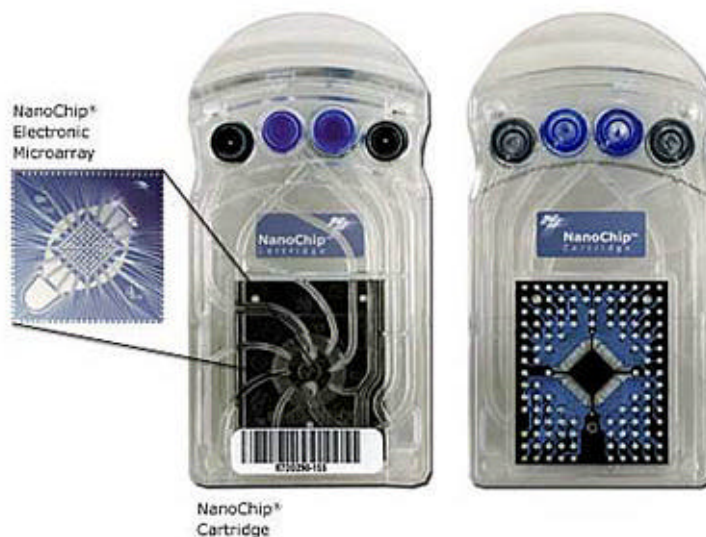


Abb. 1.4 *NanoChip*ä **Mikroelektronik-Chip** mit 100 Adressierungsplätzen in der Trägerkassette (Vorder- und Rückansicht: Kanäle zur Puffer-Versorgung, Platinkontakte zur Verbindung mit dem Kontrollsystem; <http://www.nanogen.com>)

Das komplette System besteht aus der elektronischen Beladungskomponente, einem Fluoreszenzleser zur „*online*“-Detektion und einer Computer-Kontrolleinheit.

1.5.2 *Proteomics*

Proteomics umschreibt alle Techniken zur Erfassung des Proteoms als Gesamtheit aller Proteine einer Zelle oder eines Organismus. Zur Zeit basiert *Proteomics* bevorzugt auf der Anwendung der bereits 1975 entwickelten zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-Elektrophorese) (O’Farrell, 1975 und Klose, 1975) zur Proteintrennung in Kombination mit der nachfolgenden Identifizierung der Proteinspezies mittels MALDI-TOF-MS.

Diese Technik trennt Proteine aus komplexen Proteingemischen in zwei separaten Schritten aufgrund zweier unabhängiger Eigenschaften auf: In der ersten Dimension, einer isoelektrischen Fokussierung (IEF), werden Proteine gemäß ihrer isoelektrischen Punkte (pI) separiert. Die zweite Dimension ist eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und trennt die Proteine entsprechend ihrer

Molekulargewichte (M_r , relatives Molekulargewicht). Jeder Protein-Spot auf dem resultierenden zweidimensionalen Gel entspricht im Optimalfall einer einzigen Proteinspezies der Probe. Mit Einführung immobilisierter pH-Gradienten und Immobililine-Reagenzien wurde eine verbesserte Auflösung und Reproduzierbarkeit der ersten Dimension erreicht (Görg *et al.*, 1988; 1995). Limitierungen bestehen nach wie vor v.a. bei der Trennung von Membranproteinen sowie der Auflösung, d.h. durch sich überlagernde Proteine im Gel (McDonald und Yates, 2000).

Der Einsatz der 2D-Elektrophorese als universelles *Screening*-Werkzeug wurde allerdings erst durch die Entwicklung nachgeschalteter hochauflösender Analysemethoden zur Proteinidentifikation ermöglicht. Verfeinerte Massenspektrometrie-techniken und die Sequenzinformationen aus den verschiedenen Genomprojekten ermöglichen die schnelle Identifikation auch geringer Mengen an Peptiden und Proteinen aus einem 2D-Gel.

Durch die Geschwindigkeit und Sensitivität, mit der Proteine identifiziert werden können, besitzt die MALDI-TOF-MS (*Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight* - Massenspektrometrie) eine zentrale Bedeutung im Kanon der *Proteomics*-Technologien. Die elementaren Komponenten aller Massenspektrometer sind eine Ionisationsquelle, ein Massenanalysator und ein Ionendetektor. Die Ionisationsquelle wandelt dabei den Analyten in gasförmige Ionen um. MALDI erzeugt Ionen mittels Lasereinsatz, durch Anregung einer kristallinen Mischung des zu analysierenden Moleküls auf einer energieabsorbierenden Matrix. Bei dieser gepulsten Ionisierungstechnik werden bei Laserbestrahlung der Mischung separate Ionisierungen initiiert. Der Massenanalysator (TOF) bestimmt das Masse/Ladungs-Verhältnis eines Ions über dessen Flugzeit zum Detektor. Nach dem Verdau des aus dem Gel isolierten Proteins mit einer spezifischen Protease - meist Trypsin - kann nach Bestimmung der Massen der resultierenden Peptidfragmente ein „Massen-Fingerabdruck“ erzeugt werden. Zur Identifizierung des Proteins wird diese Massenkarte mit einer theoretischen Massenkarte aus der Genom-Datenbank mit Sequenzinformationen der Proteine verglichen.

Proteomics umfaßt damit alle Schritte von der Probenaufbereitung und der 2D-Elektrophorese über die Abbildungsdetektion und -analyse, bis hin zur Proteinidentifikation und Datenbanksuche. Momentan gibt es keine andere Technik, welche die simultane Auflösung/Ermittlung so vieler Proteinen in einer Auftrennungsprozedur ermöglicht.

2 Ziel der Arbeit

Ausgehend von der Hypothese, dass zink-sensitive Gene als Biomarker zur Beurteilung der Zinkversorgung dienen könnten und die Zinkmangel-Pathophysiologie auf molekularer Grundlage besser erklärt werden kann, wurde ein umfassendes *Screening* durchgeführt. Zur Identifizierung des „Zinkregulons“ *in vivo* erfolgte eine Analyse des Transkriptoms mittels *Array*-Technologie, sowie ein *Screening* auf Proteomebene unter Einsatz von 2D-Elektrophorese und MALDI-TOF-MS-Analyse.

Diese Arbeit diene damit auch dem Vergleich der Aussagekraft einer Transkriptomanalyse gegenüber der Proteomanalyse, was nicht zuletzt Aufschluß über die Verwertbarkeit von Genexpressionsstudien auf mRNA-Ebene geben sollte. Zur Untersuchung des Zinkmangels *in vivo* wurde durch Schlundsondenfütterung im Modelltier Ratte ein experimenteller Zinkmangel erzeugt. Aufgrund der zentralen Rolle der Leber im Metabolismus stand der Einfluß des Zinkmangels auf die hepatische Funktion im Fokus der Betrachtungen, wenngleich auch andere Organe, u.a. das Gehirn, analysiert wurden.

Die molekularen Auswirkungen des experimentellen Zinkmangels sollten charakterisiert werden durch:

- a) Musterdarstellung des Transkriptoms mittels eines elektronischen *Array*-Systems.
- b) Gezielte Analyse des Transkriptoms mit Bestimmung spezifischer Gene, die im Zinkmangel einer Regulation unterliegen und möglicherweise als Biomarker fungieren können („Zinkregulon“).
- c) Vergleichende Analyse der identifizierten mRNA- (DNA-*Array*) und Proteinspezies (2D-Elektrophorese und MALDI-TOF-MS-Analyse).
- d) Nachweis der Veränderung von ausgewählten Funktionsparametern der als reguliert identifizierten Gengruppen/-*Cluster*.

3 Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden

3.1.1 Erzeugung eines Zinkmangels *in vivo*

Für den Zinkmangelversuch kam eine von Schülein *et al.* (1992) etablierte Methode der künstlichen Ernährung zum Einsatz. 24 pathogenfreie männliche Sprague-Dawley Ratten mit einer durchschnittlichen Lebendmasse von 121 g wurden randomisiert in zwei Gruppen zu je 12 Tieren eingeteilt. Die Tiere erhielten eine halbsynthetische Diät (AIN-93G) auf Caseinbasis nach Roth und Kirchgessner (1994) (siehe 8.1.8.1). Die Grunddiät war für beide Behandlungsgruppen identisch. Eine Gruppe erhielt eine Zinkmangeldiät mit 1,3 mg Zn/kg Diät, die andere eine mit Zinksulfat supplementierte Kontrolldiät mit 25 mg Zn/kg Diät. Die Schlundsondenfütterung wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. H.P. Roth am Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie, TUM, vorgenommen (Roth, 2001).

Die Fütterung über Schlundsonde erfolgte viermal täglich, jeweils um 8.00, 12.00, 18.00, 22.00 Uhr. Pro Fütterung und Tier wurden 4 ml Futterbrei, entsprechend 2,9 g Diät, verabreicht. Die tägliche Futterraufnahme der Ratten betrug für beide Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum von 11 Tagen 11,6 g Diättrockensubstanz pro Tag.

Die Ratten wurden für die Dauer des Versuchs in metallfreien Makrolonkäfigen mit Plexiglasabdeckung und Laufrosten bei vollklimatisierten Bedingungen, konstanter Temperatur von 23 °C, 60 % relativer Luftfeuchtigkeit und Beleuchtungszyklus untergebracht. Auf Einstreu wurde wegen möglicher Spurenelementkontamination verzichtet. Als Trinkwasser stand *ad libitum* destilliertes Wasser, mit 0,014% zugesetztem NaCl unbegrenzt zur Verfügung. Zur Erfassung der Gewichtsentwicklung wurden die Tiere täglich vor der ersten Fütterung gewogen.

Die Versuchstiere wurden am 12.Tag nach zwölfstündiger Nüchterung mit Ether narkotisiert und anschließend dekapitiert. Das Vollblut wurde in heparinisierten Röhrchen für weitere Analysen aufgefangen. Zur Serumgewinnung wurde das Vollblut 5 min bei 8000 x g zentrifugiert (Tischzentrifuge, Jouan, Unterhaching) und portioniert bei -80 °C eingefroren. Nach dem Ausbluten wurden sofort die Organe (Leber, Niere, Muskel, Dünndarmepithel und Gesamtgehirn) entnommen und für die Langzeitlagerung (-80 °C) in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.1.2 Erzeugung eines Zinkmangels *in vivo* (*Pair fed*-Design)

Für eine vergleichende Analyse der Ergebnisse aus dem Tierversuch mit Schlundsondenfütterung wurde aus einem weiteren Zinkmangelversuch Lebergewebe für die Expressionuntersuchung eingesetzt. Auch dieser Fütterungsversuch wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. H. P. Roth am Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie, TUM, durchgeführt. Der Versuch unterlag einem sogenannten *Pair fed*-Aufbau, d.h. neben Zinkmangel- und *ad libitum*-ernährten Tieren gab es eine weitere Gruppe, welche die gleiche Futtermenge einer zinkadäquaten Diät erhielten, wie von den Zinkmangeltieren am Vortag verzehrt worden war. Die Zusammensetzung der Diät entsprach der oben aufgeführten (8.1.8.1). Die Diät besaß durch den Einsatz von zinkfreiem Casein einen Proteingehalt von 20 %, sowie Zinkgehalte von 1 mg Zn/kg Diät (Zinkmangeldiät) bzw. 53 mg Zn/kg Diät (Kontrolldiät) durch Zinksulfatzugabe. Die Versuchsdauer des *Pair fed*-Versuchs betrug 28 Tage (Roth, unveröffentlicht). Die Expressionsanalysen wurden mit Lebergewebe von Zinkmangeltieren und *Pair fed*-Tieren durchgeführt.

3.2 Analytische Methoden

3.2.1 Atomabsorptions-Spektralphotometrie (AAS)

3.2.1.1 AAS-Bestimmung der Zinkkonzentration in Serum

Das Serum (200 µl) wurde 1:5 mit zweifach entionisiertem Wasser verdünnt und direkt in der Flamme eines Atomabsorptions-Spektralphotometers (Perkin-Elmer, Modell 5100; Norwalk, CT, USA) die Zinkkonzentration ermittelt. Als Eichlösung fungierte eine Zink-Nitrat-Lösung in verdünnter Salzsäure (1 mg Zn²⁺/L in 0,6 N HCl).

3.2.1.2 AAS-Bestimmung der Zink-, Magnesium- und Kalzium-Konzentration im Lebergewebe

Die Einwaage der frischen Lebergewebestücke erfolgte in ausgeglühte Platintiegel und nach Trocknung (105 °C /3 h) wurde durch Rückwaage die Trockensubstanz ermittelt. Vorveraschung und Hauptveraschung (220 °C / 24 h bzw. 480 °C, 148 h) wurden im Muffelofen durchgeführt.

Die Asche wurde dreimal mit 6 N HCl in Lösung gebracht und auf einem Wasserbad zur Trockne eingedampft. Nach dem dritten Eindampfen wurde der Rückstand ein

weiteres Mal in Säure aufgenommen (1/10 des Endvolumens) und die Lösung durch aschefreies Filterpapier (Schleicher & Schüll, Dassel) in 50 ml Messkolben überführt. Filter und Platin-Schalen wurden mit bidestilliertem Wasser nachgespült, auf 50 ml aufgefüllt und in Polyethylenflaschen umgefüllt.

Die Messung des Zink-Gehaltes am Atomabsorptionsspektralphotometer erfolgte nach einer Verdünnung der Proben (1:11) gegen eine Zink-Nitrat-Eichlösung in verdünnter Salzsäure (1 mg Zn^{2+} /L in 0,6 N HCl).

Die Messung des Mg-Gehaltes am AAS wurde nach einer Verdünnung der Proben (1:51) mit 0,5 % $LaCl_3$ in 0,6 N HCl gegen eine Magnesiumchlorid-Eichlösung (0,5 mg Mg^{2+} /L in 0,6 N HCl und Zusatz von 0,5% Lanthanchlorid $LaCl_3$) durchgeführt.

Die Messung des Ca-Gehaltes am AAS erfolgte nach einer Verdünnung der Proben (1:2) mit 0,5% $LaCl_3$ in 0,6 N HCl gegen eine Kalziumchlorid-Eichlösung (5 mg Ca^{2+} /L in 0,6 N HCl und Zusatz von 0,5% Lanthanchlorid $LaCl_3$).

3.2.2 Fettextraktion

Die Analyse der Triglyceridmenge und Fettsäurezusammensetzung des Lebergewebes erfolgte nach Extraktion der Lipide aus der Leber in Anlehnung an die Hexan-Isopropanol-Methode nach Hara und Radin (1978). Hierzu wurde 0,5-1 g in flüssigem Stickstoff pulverisiertes Lebergewebe in einen Spitzkolben eingewogen und mit 20 ml HIP (entält 50 mg BHT/l) (8.1.8.2) und mittels Ultraschallstab (2 min Dauerpuls der Stärke 40) homogenisiert. Zur vollständigen Extraktion der Lipide wurde die Suspension über Nacht inkubiert, filtriert (Schleicher & Schüll, Dassel) und mit 3 x 5 ml HIP in einen gewogenen 50ml Rundkolben überführt. Der Probenextrakt wurden am Rotationsverdampfer bis zur vollständigen Trockne eingeeengt und das Gewicht der erhaltenen Fettfraktion durch Rückwaage ermittelt.

Für die enzymatische Triglyceridbestimmung (3.2.3) wurde die gesamte Fettfraktion in 5 ml Chloroform aufgenommen, für die gaschromatographische Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung (3.2.4) in 1 ml „*Internal Standard Solution*“ (8.1.8.3) gelöst.

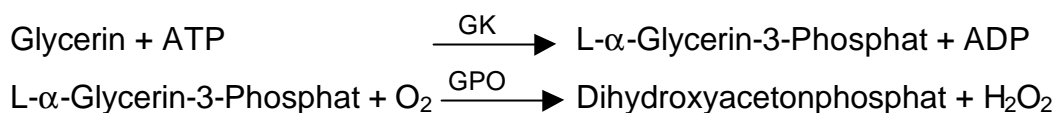
3.2.3 Enzymatische Triglyceridbestimmung

Die enzymatische Triglyceridbestimmung des Leberfettes wurde mit dem Serum-Triglyceridbestimmungs-Kit *Ecoline 25* von Merck (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

Für die Eichreihe wurden jeweils Oliven- und Sonnenblumenöl als Triglyceridquelle eingesetzt. 31,4 mg Olivenöl bzw. 38 mg Pflanzenöl wurden dann in einen 50 ml Messkolben abgewogen und mit Chloroform bis zu Marke aufgefüllt und das Öl mittels Ultraschallbad vollständig in Lösung gebracht. Aus den Kolben wurden jeweils 5, 10, 20, 50, 100, 150 und 200 µl Lösung entnommen, sowie zwei Leerwerte zur Eichung des Photometers mit nur je 50 µl Chloroform mitgeführt.

Für die Probenaufbereitung wurden die wie in 4.2.1 beschriebenen Leberfettextrakte jeweils mit 4 x 1 ml Chloroform aus den Rundkolben in 5 ml Meßkölbchen überführt und mit Chloroform ad 5 ml aufgefüllt. Zur Probenanalyse wurde aus den Chloroformextrakten 50 µl, 100µl und 200µl entnommen. Die Leberproben, Eichreihenproben, sowie die Leerwerte wurden im Exsikkator unter Vakuum bis zur Trockne eingengt. Um die lipophilen Proben in einer wässrigen Lösung einer enzymatischen Analyse unterziehen zu können, wurde das minimale zur Resuspendierung benötigte Volumen von 20 µl eines 1:3 Gemisches von Triton X-100 : Chloroform benutzt. Das enthaltene Chloroform wurde anschließend im Exsikkator unter Vakuum wieder entfernt. Mit den verbleibenden 5 µl gelöster Probe erfolgte die enzymatische Triglyceridbestimmung.

Das Messprinzip folgt den Methoden von McGowen *et al.* (1983) und Fossati und Prencipe (1982). Mit Hilfe spezieller Lipasen werden die Triglyceride enzymatisch zu Glycerin und freien Fettsäuren hydrolysiert. Das Glycerin wird entsprechend folgendem Reaktionsschema umgesetzt:



Das entstandene H₂O₂ wird in einer Peroxidase-katalysierten Reaktion mit 4-Aminoantipyrin und Salicylalkohol zu einem farbigen Chinonimin umgesetzt, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 500 nm der Triglyceridmenge proportional ist.

Zur Durchführung wurden je 20 ml Pufferlösung 1 mit 5 ml des Startreagenz 2 gemischt und die Temperatur auf 30 °C eingestellt. Die 5 µl Probenmaterial im 1,5 ml

Mikrozentrifugengefäß wurden in je 500 µl der Reagenzlösung resuspendiert, in Einmalküvetten (Schichtdicke 1cm) überführt und 10 min bei 25 °C inkubiert. Im Anschluß wurde die Extinktion der Eichreihenproben und die Extinktion (E_P) der Proben bei 500 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Berechnung der Triglyceridmenge erfolgte durch den Bezug auf die Eichreihe der Pflanzenölstandards und wird als µg/g Lebereinwaage bzw. µg/g Fettfraktion angegeben (Abb. 3.1 und 3.2).

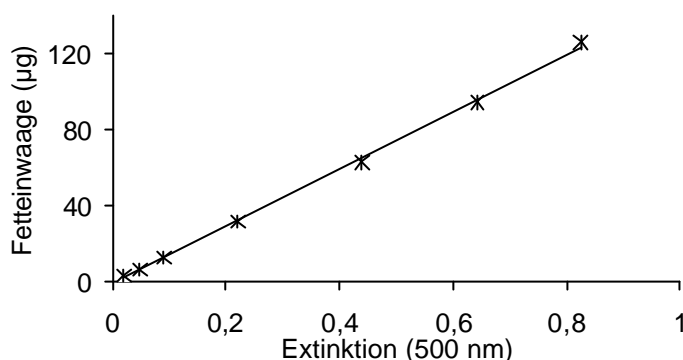


Abb. 3.1: *Eichgerade (Olivenöl) für die Berechnung der Triglyceridmenge in Lebergewebe; Berechnung: Triglyceridgehalt (µg) = (150,83 x E_P - 1,2128) / Lebereinwaage bzw. Fettfraktionsrückwaage*

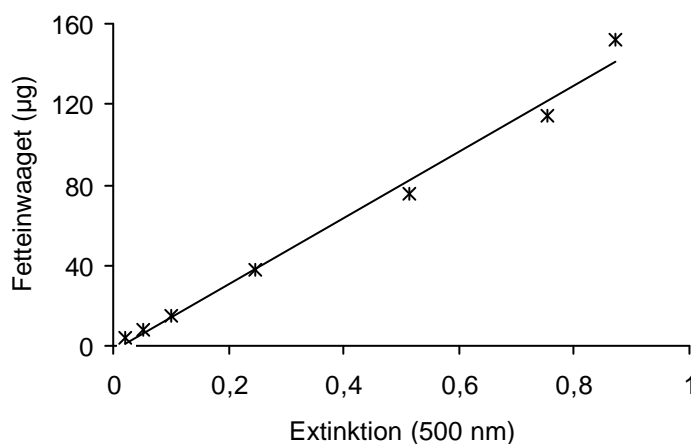


Abb. 3.2: *Eichgerade (Sonnenblumenöl) für die Berechnung der Triglyceridmenge in Lebergewebe, Berechnung: Triglyceridgehalt (µg) = (164,55 x E_P - 2,122) / Lebereinwaage bzw. Fettfraktionsrückwaage*

3.2.4 Gaschromatographische Fettsäurenanalyse

Die gaschromatographische Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung erfolgte nach Umesterung der Leberlipide zu Methylestern. Eine Vermeidung der Isolierung der freien Fettsäuren durch Hydrolyse und anschließender Reveresterung, schützt leicht oxidierbare Fettsäuren vor oxidativer Schädigung.

Da Fettsäuren nicht-flüchtige Substanzen sind, müssen sie für ihre Bestimmung mittels Gaschromatographie durch geeignete Derivatisierungsschritte in leicht flüchtige Formen überführt werden. Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) ist ein gutes Methylierungsmittel zur gaschromatographischen Erfassung von Carbonsäuren in kleinsten Mengen (Syhre *et al.*, 1996).

Die gewonnene Leber-Fettfraktion (3.2.2) wurde für die folgende Derivatisierung in 1ml „*Internal Standard Solution*“ (8.1.8.3) aufgenommen und im Ultraschallbad vollständig zur Lösung gebracht. Je 3x 100 µl der Probe wurden in ein Autoanalysatorgefäß überführt und mit 50 µl Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)-Derivatisierungsreagenz in Methanol versetzt, das Reaktionsgefäß luftdicht verschlossen und gemischt. Die Derivatisierung erfolgt bei Raumtemperatur.

Bei Injektion in den Gaschromatographen bei 250 °C erfolgt eine Pyrolyse des überschüssigen Derivatisierungsreagenzes in flüchtiges Methanol und Disulfid, was die folgende Analyse nicht mehr beeinflusst.

Die Analyse der Fettsäuremuster in den Fettfraktionen wurde mittels eines Gaschromatographen (Hewlett Packard 6850) mit Flammenionisationsdetektor (FID), *split/splitless* Injektor und *Autosampler* (6850 Automatic Liquid Sampler, Agilent Technologies) durchgeführt. Die Trennsäule war eine DB-23 (50%-Cyanopropyl)-methylpolysiloxan) von 30 m Länge, einem Durchmesser von 250 µm und einer Filmdicke von 0,25 µm. Die Auftrennung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Temperaturprogramm:	120 °C-2 °C/min-150 °C-10 °C/min-180 °C-15 °C/min- 250 °C- 1 min (Laufzeit 16 Minuten)
Injektortemperatur:	250 °C
Injektionsvolumen:	1 µl
Modus:	split
<i>Split-Ratio</i> :	1:100
Trägergas:	Helium (Druck 1,7 bar)
Flussrate:	2ml/min
Lineraren Velozität	45cm/sec.

Der FID-Detektor besaß eine Temperatur von 250 °C und einen Wasserstofffluss von 35 ml/min, einen Luftfluss von 350 ml/min und einem *Makeupflow* (konstanter Stickstofffluss) von 20ml/min.

Zur Identifizierung der Fettsäuren der aus der Leber isolierten Fettfraktion diente die Retentionszeit der entsprechenden Fettsäuremethylester im Vergleich zu einem Standard-FAME (*fatty acid methyl esters*)-Gemisch aus 21 Fettsäuremethylestern (8.1.8.4).

Die Auswertung erfolgte nach Integration der Peakflächen und Abzug der internalisierten Standard-Fettsäuremethylester C13 und C17, als prozentualer Anteil einzelner Fettsäuremethylester an der Summe aller Fettsäuremethylester.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde mit einem monophasischen Reagenz mit Guanidin-Thiocyanat und Phenol (RNAwiz, Ambion, Austin, Texas oder nach *Atlasä Pure Total RNA Labeling System*, Clontech, Palo Alto, CA, USA) extrahiert in Anlehnung an die Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Die gefrorenen Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff pulverisiert, gewogen und im jeweiligen Reagenz des Kits aufgenommen (1 ml je 100 µg). Der Gewebeaufschluß erfolgte unter Einsatz eines Homogenisators (Potter) bei höchster Stufe für 2 min unter Kühlung. Die Extraktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers (RNAwiz, Ambion, USA) bzw. des Protokolls zur Prozessierung der Clontech *Atlas Arrays* (Clontech, USA) durchgeführt. Aus der erhaltenen wässrigen Extraktlösung wurde die Gesamt-RNA Isopropanolgefällt, in DEPC-Wasser (Ambion) bzw. doppelt deionisiertem Wasser (Clontech) aufgenommen und portioniert bei -80 °C gelagert.

Konzentration, Qualität, Menge und Reinheit wurden absorptionsphotometrisch (bei 260nm und 280nm) und mittels Ethidiumbromidfluoreszenz in der Elektrophorese eines Aliquots der Präparationen unter denaturierenden Bedingungen (3.3.13.1) bestimmt.

3.3.2 Extraktion von Poly(A)⁺-RNA

Die Isolierung der Poly(A)⁺-RNA aus der Gesamt-RNA erfolgte nach Herstellerangaben des Micro Poly(A)Pure™-Kits (Ambion, Austin, Texas, USA). Das Isolierungsprinzip beinhaltet die Aufreinigung der mRNA durch Hybridisierung der Poly(A)⁺-Enden enthaltenen RNAs an Oligo-dT-Fängermoleküle. Die gewaschenen gebundenen Poly(A)⁺-RNAs werden durch Niedrigsalz-Puffer und erhöhte Temperatur wieder von den Fängern gelöst.

Zur Isolierung mittels Micro Poly(A)⁺ Pure Kits wurden 400 µg Gesamt-RNA eingesetzt. 5 M NaCl wurden für eine Endkonzentration von 0,45 M in einem Endvolumen von 1 ml (Bindungspuffer ad 1 ml) zugegeben.

Das Probengemisch wurde denaturiert (65 °C, 5 min), gekühlt, mit Oligo dT-Zellulose (20 mg) gemischt und zur Bindung bei Raumtemperatur inkubiert und mehrmals gewaschen. Das Zellulosepulver wurde auf ein Säulchen übertragen und mit vorgewärmten (60-70 °C) Eluierungspuffer eluiert. Aus dem Eluat (200 µl) wurde durch Zugabe von 20 µl (0,1 x Volumen, 5 M Ammoniumacetat, 1 µl Glycogen und 2,5 x Volumen 100% Ethanol (500µl) die Poly(A)⁺-RNA über Nacht bei -20 °C präzipitiert, am Morgen pelletiert (14000 rpm, 20 min, 4 °C), in DEPC-Wasser resuspendiert und aliquotiert bei -80 °C gelagert.

Konzentration und Qualität der mRNA wurden absorptionsphotometrisch (bei 260nm und 280nm) und mittels Ethidiumbromidfluoreszenz in der Elektrophorese eines Aliquots der Präparationen unter denaturierenden Bedingungen (siehe 3.3.13.1) bestimmt.

3.3.3 Amplifikation von Poly(A)⁺-RNA nach modifiziertem „Eberwine“-Protokoll

Die Amplifikation eines Poly(A)⁺-RNA Pools aus einer Probe erfolgte nach einem modifizierten Eberwine („Antisense“) Amplifikationsprotokoll nach Vorschrift von Chris Barry MD, PhD, Pat Brown Lab vom 22.4.1999 barry_c@cmgm.stanford.edu (Luo *et al.*, 1999; Carninci *et al.*, 1998; Eberwine *et al.*, 1992; Van Gelder *et al.*, 1990) Zur Amplifikation wurden jeweils 3 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Durchführung der Erststrangsynthese (cDNA) erfolgte in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen.

Es wurden

- x μl = 3 μg Gesamt-RNA,
- 7 μl 1,7 M Trehalose-Stocklösung in DEPC-Wasser, = 0,6M/20 μl)
- 1 μl „Eberwine“-Oligo d(T)/T7-Primer (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (8.1.7.3)
- Wasser ad 9 μl vereinigt und gut gemischt.
- 4 μl 5 x Erststrangpuffer (Superscript II-RT-Kit, Invitrogen),
- 2 μl 0,1 M DTT (Superscript II-RT-Kit, Invitrogen, San Diego, CA, USA),
- 1 μl Ribonuklease-Inhibitor (Invitrogen, San Diego, CA, USA),
- 1 μl 10 mM dNTP-Gemisch (in DEPC-Wasser),
- 1 μl lineares Acrylamid (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und
- 1 μl Superscript II zu einem Gesamtvolumen von 20 μl zusammengegeben.

Das folgende Programm zur Erststrangsynthese wurde im *Robocycler Gradient 96* (Stratagene) durchgeführt:

- 37 °C - 5min
- 45 °C - 5 min
- 60 °C-2 min; 55 °C- 2 min (10 Zyklen alternierend)

Während der Zugabe der Komponenten zur Zweitstrangsynthese musste das Gemisch auf Eis gekühlt werden.

Es wurden

- 106 μl DEPC-Wasser
- 15 μl 10 x Zweitstrangpuffer (8.1.8.5),
- 3 μl 10 mM dNTP-Gemisch,
- 1 μl E. coli DNA Ligase (10 U/ μl),
- 4 μl E. coli DNA Polymerase-Holoenzyme (10U/ μl) und
- 1 μl Ribonuklease H (2U/ μl) zur Erststrangsynthesereaktion zugegeben.

Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei 16 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 7,5 μl 1 M NaOH / 2mM EDTA und Inkubation für 10 min bei 65 °C gestoppt.

Die doppelsträngige cDNA wurde mit PIC (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert mit 70 μl 7,5 M Ammonium-Acetat (in DEPC-Wasser 0,2 μm gefiltert) versetzt und Ethanol-gefällt. Das sofortige Zentrifugieren (20 min, 13.000, RT, Biofuge, Heraeus) war wichtig, um enthaltene *Primer* und überschüssige

Nukleotide nicht mitzufällen. Die pelletierte doppelsträngige cDNA (ds-cDNA) wurde in 10 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Es folgte ein Pufferaustausch über Sephadex G-75 Säule für die anschließende *in vitro* Transkription mittels MEGAshortscript™ Kit (Ambion, Austin, Texas, USA)

Die Sephadex G-75 Säule wurde gepackt, indem 1-2 ml eines Gemisches von 3 g G-75 Pulver in 50 ml TE-Puffer (8.1.8.11) auf einen Glaswollestopfen in einer 1cm³ Spritze pipettiert wurden. Zum Packen wurde 2x bei 700 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge 4K15C, Sigma). Die 10 µl ds-cDNA wurden auf die Säule appliziert, eluiert (5 min, 700 x g, RT) und in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert.

Die *in vitro* Transkription wurde mittels MEGAshortscript™ Kit (Ambion, Texas, USA) unter Verdoppelung des Herstellerprotokollmengen durchgeführt. Das erhaltene RNA-Gemisch wurde einmal mit PIC extrahiert und über DEPC-Wasser *Chroma-Spin* Säulen (Clontech, Palo Alto, CA, USA) gereinigt.

3.3.4 Verkürzung des Poly(A)⁺-RNA-Pools auf < 1000 bp

3.3.4.1 Zeitabhängige Verkürzung der Poly(A)⁺-RNA Amplifikate

Zur zeitabhängigen Verkürzung der RNA-Amplifikate wurde die normalerweise zweistündige Synthesezeit der *in vitro* Transkription verkürzt. Es wurden bereits nach 20, 40, 60 und 80 min Aliquots der Reaktion entnommen und auf einem denaturierenden Agarosegel die entstandenen Größen überprüft. Ausserdem wurde, um eine möglichst hohe Initiation der *in vitro* Transkription vom Poly(A)⁺-Ende zu erreichen, die Ausgangskonzentration an ds-cDNA im Ansatz stark erhöht, d.h. bei gleichbleibender Einsatzmenge an ds-cDNA wurde das Reaktionsvolumen halbiert.

3.3.4.2 Enzymatische Kürzung der doppelsträngigen cDNA

Zur enzymatischen Kürzung der doppelsträngigen cDNA (3.3.3) und anschließender *in vitro* Transkription, wurde das Enzym Bsp 143 I (MBI Fermentas, identisch mit MboI und Sau 3AI) eingesetzt mit einer spezifischen Schnittstelle bei 5'-GATC-3'. Das Enzym erkennt nur doppelsträngige DNA-Spezies. Zum vollständigen Verdau der cDNA aus dem modifizierten Eberwine-Protokoll wurde die ds-cDNA erhalten aus der reversen Transkription von 3 µg Gesamt-RNA mit 1 µl (= 10 Units) Bsp 143 I und 2 µl Bsp 143 I Puffer versetzt und mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und 4 h bei 37 °C

inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Aufreinigung über Sephadex-30-Säulchen (Clontech, Palo Alto, CA, USA) gestoppt. Die geschnittene ds cDNA wurde auf nativem Agarosegel einer Größenkontrolle unterzogen. Im Anschluß erfolgte nach Vorschrift des MEGAshortscript™ Kit (Ambion) die Generierung der gekürzten Poly(A)⁺-RNA.

3.3.5 Generierung reiner Poly(A)⁺-RNA-Spezies zur Systemevaluierung

Die Herstellung reiner synthetischer Poly(A)⁺-RNA-Spezies einer Sequenz mit einer Länge >600 bp wurde für die Evaluierung des elektronischen *Array*-Systems durchgeführt. Die generierten RNA-Spezies wiesen ein 3'-Poly(A)⁺-Ende, direkt anschließend einen komplementären Bereich zur humanen GAPDH-Sequenz (*Match*) bzw. an zwei Stellen nicht komplementär (*Mismatch*), einen Sequenzbereich der Ratten-GAPDH-Sequenz und eine Länge > 600 bp auf. Für die Herstellung eines Linkers zum Inserieren in die linearisierte Plasmid-DNA mit enthaltender Ratten-GAPDH-Sequenz wurden *Primer* folgender Sequenz (8.1.7.4.1) eingesetzt.

Linkerherstellung

Je 1 µg der *Primer*-Paare für *Match*- bzw. *Mismatch*-Sequenz wurden vereinigt (8.1.7.4.1), auf 20 µl mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt, 10 min denaturiert (70 °C) und dann durch Rückkühlen des Heizblocks für ca. 1 h auf 35 °C die entsprechenden Hybride gebildet.

T4-Ligase-Ligation der Linker in pCRII-Ratte-GAPDH

Für die Ligation mittels T4-Polymerase wurden pCRII-Ratten-GAPDH-Vektoren (3.3.7; 3.3.9; 3.3.10) mit den Restriktionsenzymen Hind III und BamHI linearisiert. Für die Ligation (1h, RT) wurden 1 µl Linker, 2 µl linearisierter Vektor (ca. 30 ng/µl) 2 µl T4-Ligase Puffer, 1 µl T4-Ligase und bidestilliertes Wasser ad 20 µl eingesetzt.

Transformation in TOP 10 chemisch kompetente Zellen (Invitrogen Kit)

2 µl der Ligation wurden in die folgende Hitzschock-Transformation (30 min Eis, 30 s, 42 °C Hitzschock, Eis) in Top 10 Zellen nach Herstellerangaben (Invitrogen, San Diego, CA, USA) eingesetzt. Mit je 125 µl SOC-Medium (8.1.8.6) wurden die transformierten Zellen 1 h bei 37 °C kultiviert und auf LB-Amp-Platten (8.1.8.7) ausgestrichen.

Kontrolle der insertierten cDNA-Linker-Konstrukte

Durch die Insertierung des Linkers wurden die Schnittstellen von BamHI und HindIII zerstört, aber eine SspI-Schnittstelle insertiert. Nach Kultivierung ausgewählter Klone folgte eine alkalische Lyse (Flexiprep-Kit, Amersham, Freiburg) und ein SspI, sowie ein BamHI- und Hind III-Verdau. Klone deren Plasmide sich nur mit SspI schneiden liessen, wurden in 15 ml LB-Amp-Medium über Nacht kultiviert. Die Überprüfung der Sequenz der insertierten Konstrukte erfolgte durch Sequenzierung (3.3.11).

SspI-Verdau für die *in vitro* Transkription

Aus den 15 ml Kulturen wurden am nächsten Tag durch alkalische Lyse die Plasmide gewonnen und 10 µg Plasmid-Konstrukt-DNA einem vollständigen SspI-Verdau unterzogen (37 °C, 1,5 h). Die Kontrolle der linearisierten Klone erfolgte mit 1%iger TAE-Agarosegelelektrophorese (8.1.8.9).

„Phenolextraktion“ mit *Phase-Lock* und Ethanol-fällung

Die Proben wurden mit TE-gepuffertem Phenol pH 7,5-8,0 und Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, ethanolisch aus der wässrigen Phase präzipitiert, in 20 µl sterilem bidestilliertem Wasser resuspendiert und die Konzentration spektralphotometrisch bei 260nm und 280 nm bestimmt.

In vitro-Transkription der mit SspI linearisierten pCRII-GAPDH Linker-DNA in cRNA:

Für die *in vitro* Transkription wurde der T7 mMessage Machine™-Kit (Ambion) verwendet. 1 µg linearisierte cDNA dienten zur cRNA-Synthese. Transkriptionsstart war die enthaltene T7-Erkennungssequenz. Es folgte eine LiCl₂-Fällung und die Kontrolle der Größe, Reinheit und Qualität eines Aliquots der generierten cRNA auf einem nativem Agarosegel (1%) und mittels spektralphotometrischer Bestimmung bei 260 und 280 nm. Die wässrige Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

3.3.6 Generierung kurzer genspezifischer RNA-Amplifikate

Für die Untersuchung der Expression spezifischer Gene mit dem elektronischem Array-System wurden aus Poly(A)⁺-RNA genspezifische Amplifikate synthetisiert. Zur Multiplex-cDNA-Synthese wurden die *Ready-To-Go™ RT-PCR Beads* (Amersham, Freiburg) verwendet. 500ng mRNA von Kontroll- bzw. Mangeltieren

wurde parallel prozessiert, sowie zur Kontrolle auf eventuelle Verunreinigung durch genomische DNA auch je ein Ansatz (Kontrolle und Mangel) mit inaktivierter reverser Transkriptase. Durch Zugabe der RNA, Addition der genspezifischen T7-Vorwärts- und Rückwärts-*Primer* (10µM; 8.1.7.6) und Wasser wurde in einer „Ein-Schritt“-Reaktion in 50 µl Volumen eine cDNA-Synthese mit anschließender linearer Amplifikation durchgeführt. Je 12 µl der cDNA-Reaktion wurden mit MEGAshortscript™ T7 Kit (Ambion, Austin, Texas, USA) zu den korrespondierenden RNA-Polynukleotiden von GAPDH und Metallothionein in einem Reaktionsvolumen von 30 µl umgeschrieben, die verbliebene DNA durch einen anschließenden DNase I Verdau entfernt und die RNA-Amplifikate über BioRad Sepadex-Säulchen (BioRad, München) aufgereinigt und die Lösung entsalzt.

3.3.7 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT PCR)

3.3.7.1 cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA wurde 2,5 µg der extrahierten Gesamt-RNA eingesetzt. Für die cDNA-Synthese wurde *Retroscriptä Kit* (Ambion, Austin, Texas, USA) verwendet, entweder unter Einsatz von Oligo-dT *Primern* oder *Random Priming* Methode des Kits.

Die Generierung der cDNA für die quantitative *Real time-RT PCR* erfolgte aus 1000 ng Gesamt-RNA unter Einsatz von Superscript II RT-Kit (Invitrogen, San Diego, CA, USA), und hexameren *Random-Primern* (Promega, Madison, WI, USA).

3.3.7.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Von der generierten cDNA wurde 2 µl (entspricht ca. 250 ng) in die folgende Amplifikation mittels PCR-Reaktion eingesetzt. PCR-Amplifikationen erfolgten in einem Volumen von 50 µl. Die Reaktionsansätze enthielten neben der entsprechenden Menge cDNA, 5 µl 10 x Polymerase Reaktionspuffer (8.1.8.12), 2,5 µl 5 mM dNTPs, 1,25 µl spezifische Vorwärts- und Rückwärts-*Primer* (5 µM, 8.1.7.1 und 8.1.7.2), 0,5 µl Taq-Polymerase und Wasser ad 50 µl. Eingangs erfolgte eine Denaturierung der cDNA bei 95 °C anschliessend 30-35 Zyklen gemäß dem folgenden Schema:

PCR-Zyklus:

30-35 x Zyklus: 94 °C; 20 sec / 55 °C; 30 sec / 72 °C; 40 sec

Endsynthese: 72 °C; 5-10 min

Kühlung: 4 °C

Die Größenbestimmung der erhaltenen PCR-Fragmente erfolgte im 1 %igen nativen Agarosegel.

3.3.8 Quantitative *Real time-RT PCR*

Für die Expressionsanalyse mit quantitativer *Real time RT-PCR* (*Lightcycler*, Roche, Mannheim) wurde die cDNA 1:15 in DEPC-Wasser verdünnt. Von der Verdünnung wurde 2 µl in die folgende Heißstart-Amplifikation eingesetzt. Die PCR-Amplifikation wurde in einem Volumen von 10 µl mit dem *FastStart DNA Master SYBR[®]-Green I* System (Roche, Mannheim) nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Die Reaktionsansätze enthielten:

2 µl cDNA

5,4 µl Wasser

4 mM MgCl₂ (= 1,2 µl)

je 4 pmol der spezifische Vorwärts- und Rückwärts-*Primer* (=0,2 µl)

1 µl 10x LCM-Mischung .

Für jedes zu untersuchende Transkript wurde zur Analyse einer Wasserprobe, einer Kontrolle und einer Mangel-RNA ein *Mastermix* angesetzt. In jedem Lauf wurde eine Ansatz für das „*House Keeping*“-Gen GAPDH mitgeführt. Das experimentelle Protokoll des Analyselaufs war wie folgt:

Denaturierung: 95 °C, 10 min

45 Zyklen:

Denaturierung: 95 °C, 15 s

Annealing: 62 °C, 10 s

Synthese: 72 °C, 20 s

Schmelzkurvenanalyse von 100 °C bis zur Endtemperatur 42 °C.

Im *Real time-RT PCR*-Lauf wurde zur „*Online*“-Detektion SYBR[®]-Green als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt. Die Überprüfung der Endprodukte erfolgte über Schmelzkurvenanalyse und native Gelelektrophorese. Die Auswertung wurde mit der *Data-Analysis*-Software des *Lightcycler*-Systems, als relative Expressionshöhe des Zielgenes gegenüber der GAPDH-Expressionshöhe, durchgeführt.

3.3.9 Ligation und Transformation

Die Ligation der PCR-Produkte in den TOPO-pCRII-Vektor und die folgende Transformation wurde mit TOPO[®] Cloning Kit von Invitrogen[™] (San Diego, CA, USA) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Zur Klonierung wurden 1,2 µl des PCR-Ansatzes mit 0,25 µl Salzlösung und je 0,3 µl Vektor gemischt und 7 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es handelt sich hierbei um eine TA-Klonierungsreaktion in den TOPO-pCRII-Vektor unter Einsatz einer Topoisomerase mit Ligaseaktivität. Fragment-enhaltende Plasmide wurden in F'10-Zellen (*E.coli*) per Hitzeschock transformiert. 25 µl chemisch kompetente Zellen wurden zur Klonierungsreaktion zugegeben, 30 min auf Eis inkubiert und 30 s einem Hitzeschock bei 42°C im Heizblock ausgesetzt. 200 µl SOC-Medium wurden zur Inkubation (37°C, 1h) zugegeben. Auf die vorbereiteten Agarplatten (aus ampicillinhaltigem LB-Medium, 8.1.8.7) mit je 40 µl X-Gal Stock (8.1.8.13) und IPTG-Lösung (8.1.8.14) (zur blau-weiß-Selektion) wurden 100 und 50 µl der transformierten Zellen steril ausgestrichen und 12-16 h bei 37 °C inkubiert.

Der Plasmid-Vektor (pCRII) enthält neben Antibiotikaresistenzen für Kanamycin und Ampicillin, Ori-Region (Replikationssequenzen für Polymerase) und *multiple cloning site* (MCS) auch das LacZ-Gen für eine „Blau/Weiss“-Selektion.

Blaue Kolonien enthalten das (gewünschte) Fragment nicht und behalten daher die Fähigkeit X-Gal zu einem blauen Farbstoff zu spalten. Weiße Kolonien weisen ein insertiertes Fragment auf, welches die Funktionalität des LacZGens zerstört.

3.3.10 Kontrolle der cDNA-Insertgröße

Zur Vermehrung der insertierten PCR-Produkte wurden jeweils 6-10 weiße Klone pro Insert von der Platten gepickt und über Nacht in 1,5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (8.1.8.7) kultiviert. Die Plasmide wurden mit der alkalischen Lysemethode (Miniprep,

Flexiprep™-Kit Amersham, Freiburg) isoliert. Zur Kontrolle der Größe der insertierten PCR-Fragmente wurde 1 µg der fragmenthaltigen Plasmide mittels geeignetem Restriktionsenzym (Eco RI bzw. BstX1) verdaut. Hierdurch wurde die vermehrten cDNA-Inserts beidseitig aus dem Plasmid geschnitten. Die DNA wurde auf 1% nativen TAE-Agarosegel (8.1.8.8, 8.1.8.9) der Größe nach getrennt und über die Laufhöhe der Fragmente in der nativen Gelelektrophorese bestimmt. Als Maß für die Größenabschätzung diente der λ- -Marker „Gene ruler DNA Ladder Mix“ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot).

Positive Klone wurden in 15 ml-Kultur angezogen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit der alkalischen Lysemethode (*Qiafilterä Plasmid Midi Kit*, Qiagen, Hilden). Die Konzentration wurde absorptionsphotometrisch (bei 260nm und 280nm) ermittelt, 10-20 µg mit Restriktionsenzym (Eco RI bzw. BstXI) inkubiert, der gesamte Verdau auf 1 %igem TAE-Agarosegel (8.1.8.8, 8.1.8.9) aufgetrennt und die Fragmente mittels *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt.

3.3.11 Sequenzierung

Die Sequenzanalyse der eingebrachten PCR-Fragmente erfolgte in Anlehnung an die Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Die Didesoxysequenzierung beruht auf einer basenspezifischen Terminierung von enzymkatalysierten *Primer*-Kettenverlängerungsreaktionen. Vier separate Reaktionen, die notwendigen *Primer*, die zu sequenzierende DNA, dNTP's und DNA-Polymerase enthaltend, inklusive eines Kettenabbruch verursachenden Cy-markierten Didesoxynukleotids (ddNTP), werden angesetzt.

Durch die Zugabe von Cy-markierten 2',3' Dideoxynukleotiden (ddNTPs), die bei Einbau einen Abbruch der Kettenverlängerung bewirken, werden statistisch verteilte Fragmente generiert, die anschliessend auf einem denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt werden. Automatische DNA Sequenzer können die entstandenen Fragmente über Fluoreszenzmarkierungen an den ddNTPs detektieren.

Zur Sequenzierung der PCR-Produkte wurde der *Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Thermo Sequenase™ Cy™5) von Amersham Biosciences (Freiburg) verwendet. Die Sequenzierung erfolgte im Autosequenzierer ALFExpress™ DNA Sequenzierer (Amersham, Freiburg). Als *Primer* kam der Universal-*Primer* des Kits zum Einsatz mit

Bindungsstelle im pCRII-Vektor. Für das Cycle-Sequenzieren wurde die zu sequenzierende Vorlage mit dem unmarkierten *Primer*, thermostabiler Polymerase und Cy5-markierten ddNTPs und dNTPs vereinigt. Dieses Gemisch wird dann mehreren Zyklen von thermischer Denaturierung und Polymerisierung zur linearen Amplifikation unterworfen, um Produkte mit endständigen Cy5-markierten ddNTPs zu generieren. Für jedes „*Template*“ wurden 4 verschiedene Cy5-Didesoxyreaktionen (Terminationsgemisch: 2 µl 1,0 mM dNTP, 1 µl Cy5 ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP bzw. ddGTP), 7 µl bidestilliertes Wasser und 1 µl 0,55 mM EDTA; 2 µl aus jeweiligem Terminationsgemisch (A, C, G, T), *Template* 1-4 µg, 1 µl *Universal-Primer*, 3,5 µl Reaktionspuffer, 1 µl Thermosequenzase und bidestilliertes Wasser ad 26,2 µl) benötigt. Die lineare Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema im PCR-Cycler: 2 min bei 94 °C, 30 bis 35 Zyklen 30 s, 94 °C, 30 s, 57 °C, 80 s, 72 °C, 4 °C. Die entstandenen Fragmente wurden Ethanolgefällt, vor der Sequenzierung in 7 µl Stop-Lösung resuspendiert und denaturiert (72 °C, 3 min). 5,5 µl der Ansätze wurden zur Analyse auf das UV-ausgehärtete Gel (Mischung aus Gellösung B und Gellösung A (Amersham Pharmacia, Freiburg)) geladen. Die Reaktionen wurden in 4 beieinanderliegende Taschen des Sequenziergels geladen und mit 0,5 M TBE-Puffer (8.1.8.10) elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA Fragmente passieren bei ihrer Migration durch das Gel einen Laserstrahl, was eine Generierung von Fluoreszenzsignalen bedingt, die automatisch detektiert und gespeichert wurden. Der Sequenzvergleich erfolgte mit NCBI Blast 2.

3.3.12 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren für *Northern Blot*-Analysen

Für die Herstellung von Sonden für *Northern Blot*-Analysen standen die aufgereinigten Fragmente aus dem präoperativen Restriktionsverdau (3.3.10) zur Verfügung. Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte in Anlehnung an die *Random Priming*-Methode mit einem Gemisch statistisch zusammengesetzter Hexamere (Feinberg und Vogelstein, 1983). Eingesetzt wurde der *MegaPrime Labelling Kit* (Amersham Pharmacia, Freiburg) Für die zu detektierenden Zielsequenzen wurden 50-100 ng cDNA mit 50 µCi α -³²P dATP und einer Klenow DNA-Polymerase (ohne Exonukleaseaktivität) zu hoher spezifischer Aktivität (3,7 x 10⁹ dpm/µg DNA) markiert und durch MicroSpin™ G 25 Molekularsiebsäulen von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt.

3.3.13 Northern Blot-Analyse

Mit der *Northern Blot*-Methode (Thomas, 1980) kann die RNA eines Gewebes mit einer spezifischen Sonde nach dem Vorhandensein einer bekannten mRNA untersucht werden. Nach Auftrennung der RNA entsprechend ihrer Größe auf einem denaturierenden Agarosegel und nachfolgendem Transfer auf eine Membran kann mit einer radioaktiv markierten spezifischen Sonde die Zielsequenz detektiert werden. Die Analyse und Verifizierung der Regulation einiger mittels *Array*-Analyse ermittelter Kandidatengene erfolgte über die Ermittlung von Größe und exprimierter Menge der RNA mit *Northern Blot*.

3.3.13.1 Denaturierende Formaldehyd-Gelelektrophorese

10 µg Gesamt-RNA-Präparation wurde in dreifachem Volumen denaturierendem Ladungspuffer *NorthernMax*TM Formaldehyde Load Dye (Ambion, Austin Texas) aufgenommen, denaturiert (75 °C, 5 min) erhitzt und auf Eis gekühlt. Die Proben wurden auf ein denaturierendes 1%iges Gel (8.1.8.15) aufgetragen und in 1x MOPS-Laufpuffer (8.1.8.20) mit 0,5 V/cm elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht über mehrere Stunden aufgetrennt. Zur späteren Größenberechnung anhand der Banden der ribosomalen RNA wurde das ethidiumbromidgefärbte Gel nach Beendigung des Trennlaufes unter UV-Licht neben einem angelegten Lineal mittels Geldokumentationssystem oder Warmlichtkamera dokumentiert.

3.3.13.2 Nukleinsäuretransfer

Vor dem Transfer auf die Nylonmembran wurde das Gel nacheinander einem Entfärbungs-, Denaturierungs-, Neutralisierungs- und Equilibrierungsschritt unterzogen (8.1.8.31 - 8.1.8.33). Der Kapillartransfer auf die Nylonmembran (Southern, 1975) wurde mindestens 12 h mit 10 x SSC vollzogen. Zur kovalenten Fixierung der transferierten Nukleinsäuren auf der Membran wurde die RNA drei Minuten mit UV-Licht bestrahlt.

3.3.13.3 Hybridisierung der Membran mit ^{32}P -dATP-markierten Sonden

Die markierte Sonde (3.3.12) wurde nach Denaturierung (95 °C, 5min) in 6 ml ExpressHyb™-Lösung (Clontech, Palo Alto, CA) auf die prähybridisierte Membran (30 min, 68 °C, 5 ml ExpressHyb™) appliziert und 4 h bei 68 °C hybridisiert.

Das Vorgehen bei Prähybridisierung, Hybridisierung und anschließenden Waschschritten verschiedener Ionenstärke zum Entfernen unspezifisch gebundener Nukleinsäuren richtete sich nach den Empfehlungen der Hersteller der eingesetzten Hybridisierungslösung ExpressHyb™ (Clontech, Palo Alto, CA). Die *Blot*-Membran wurde in Glasflaschen im temperierbaren rotierenden Hybridisierungssofen Typ *Shake n Stack*® (Hybaid, Teddington, England) prozessiert. Die Visualisierung erfolgte durch Autoradiographie nach Exposition auf einer *Phosphorimager*-Platte (*Cycloneä Storage Phosphor System*, Packard Bioscience) Für sukzessive Analysen desselben *Blots* wurden die hybridisierten Sonden durch Hochtemperaturinkubation (100 °C, 10 min, RT, 10 min) in einem Puffer sehr geringer Ionenstärke (0,5 % SDS) heruntergewaschen. Der Erfolg dieser Prozedur konnte mit einem Handmonitor durch die Analyse der Restaktivität der Nylonmembran zuverlässig überprüft werden.

3.3.14 Expressionsanalyse mittels Array

Eingesetzt wurden die kommerziell erhältlichen *cDNA-Arrays* CLONTECH Atlas™ Rat 1.2 *cDNA Expression Arrays* (Clontech, Palo Alto) auf Nylonmembranen und Oligonukleotid-Arrays Pan® Rat Liver (1353 genspezifischen Oligonukleotide) bzw. der größere Pan® Rat 5K Oligonuklotid-Array (5535 genspezifischen Oligonukleotide) auf Glaträgern (MWG Biotech AG, Ebersberg) (Abb. 3.3).

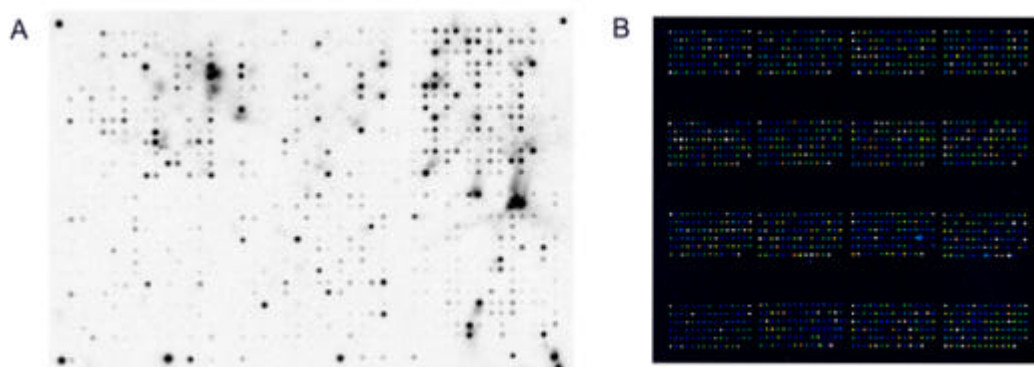


Abb. 3.3: *Prozessierter (A) cDNA CLONTECH Atlasä RAT 1.2 Array (Phosphorimagerbild) und (B) Oligonukleotid-Array Panä Rat Liver Oligonukleotidarray (Falschfarbendarstellung)*

3.3.14.1 cDNA-Arrays

Die Prozessierung der *cDNA-Arrays Atlas™ Rat 1.2 cDNA Expression Arrays* wurde gemäß den Herstellerempfehlungen durchgeführt. Initial erfolgte die Synthese der Probengemische durch reverse Transkription jeder zu untersuchenden RNA-Population unter Einsatz des *cDNA Primer-Mixes*, ein Gemisch genspezifischer *Primer* des eingesetzten *Array-Typs* und [α -³²P]- bzw. [α -³³P]-dATP.

DNase I Behandlung

Die Gesamt-RNA (3.3.1 nach Clontech) wurde vor der Sondensynthese einer DNase I Behandlung unterzogen. 500 μ l Gesamt-RNA (1 μ g/ μ l), 100 μ l 10 x DNase I Puffer (Invitrogen), 50 μ l 10 x DNase I (1 U/ μ l, Invitrogen) und 350 μ l bidestilliertes Wasser wurden gemischt, inkubiert (30 min, 37 °C), zweimal mit PCI extrahiert und mit 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat und 2,5 fachem Volumen Ethanol (95%ig) präzipitiert. Die pelletierte RNA wurde in 250 μ l Wasser gelöst. Konzentration und Qualität wurden absorptionsphotometrisch (bei 260nm und 280nm) und mittels Ethidiumbromidfluoreszenz in der Elektrophorese eines Aliquots der Präparationen unter denaturierenden Bedingungen (3.3.11.1) bestimmt.

Reverse Transkription zur Markierung der cDNA

Die reverse Transkription der mRNA in cDNA unter Einbau von radioaktiven Nucleotiden erfolgte mit Streptavidin-*Magnetbeads* direkt aus der DNA-freien Gesamt-RNA. 50 μ g RNA wurden mit 1 μ l biotinylierten Oligo(dT)-*Primer* in einem Volumen von 45 μ l versetzt, denaturiert (70 °C, 2 min), 10 min bei RT hybridisiert, 15 μ l präparierte streptavidinhaltige *Magnetbeads* zugegeben und 30 min bei 1500 rpm geschüttelt. Die hybridisierte mRNA wurde im Magnetstand separiert, mehrmals gewaschen und in 3 μ l bidestilliertem Wasser aufgenommen. Zur cDNA-Sondensynthese wurden 4 μ l CDS-*Primer*-Gemisch auf die Probe appliziert, inkubiert (65 °C, 2min, 50 °C, 2min), 13,5 μ l *Mastermix* (4 μ l 5 x Reaktionspuffer, 2 μ l 10 x dNTP-Gemisch, 5 μ l [α -³²P]- bzw. [α -³³P]-dATP (10 μ Ci/ μ l), 0,5 μ l DTT, 2 μ l MMLV Reverse Transkriptase) zugegeben und der komplementäre Strang synthetisiert (25 min, 50 °C).

Entfernung nicht inkorporierter Nukleotide

Die *Magnetbeads* wurden vom Reaktionsansatz im Magnetstand separiert, der Reaktionsansatz verdünnt und die nicht inkorporierten Nukleotide mittels *Nucleospin*-Säulen (Clontech, Palo Alto, CA, USA) entfernt (14000 rpm, 1 min). Die Bestimmung der spezifische Aktivität erfolgte nach Szintillatorzugabe mit 1 µl Probe im Zähler.

Prähybridisierung und Hybridisierung der *cDNA*-Arrays

0,5 mg (=50 µl einer 10 mg/ml Lösung) einer *Salmon Testis DNA* (Sigma) wurden zur Denaturierung auf 95-100 °C für 5 min erhitzt, mit 5 ml ExpressHyb (68 °C) gemischt und zur Membranblockierung 30 min bei 68 °C und kontinuierlicher Rotation (5-7 rpm) die *Array*-Membranen prähybridisiert. 5 µl C₀t-1 DNA wurden mit der gesamten markierten Probe gemischt, denaturiert (2 min, 100 °C, 2 min, Eis) und nach der Prähybridisierung in die Hybridisierungslösung gegeben (68 °C, 20h, 6-7 rpm).

Waschen des Arrays

Die *cDNA*-Arrays wurden nach der parallelen Hybridisierung der zu vergleichenden [α -³³P]-markierten *cDNA*-Sonden gewaschen (Waschlösung 1 (2 x SSC, 1% SDS 68 °C), Waschlösung 2 (0,1 x SSC und 0,5 % SDS 68 °C), Waschlösung 3 (2 x SSC RT), 12-15 rpm) und 96h auf einen *Phosphorimager*-Platte (*Cycloneä Storage Phosphor System*) exponiert.

Autoradiographie

Die Analyse des Hybridisierungsmuster erfolgte autoradiographisch im *Phosphorimager*. Die Auswertung wurde mit *Optiquant Software 3.00* (Packard Instruments) durchgeführt. Die quantitative Analyse wurde nach Hintergrundabzug durch Vergleich der Signalstärke zwischen den zu vergleichenden Populationen vorgenommen. Für die Normalisierung wurde sowohl auf Intensität von Kontrollgenen als auch auf die Gesamtintensität Bezug genommen. Nach Normalisierung der Intensitäten der *Spots* wurden die Intensitäten der zu vergleichenden Zielsequenzen zueinander ins Verhältnis gesetzt.

3.3.14.2 Oligonukleotid-Arrays

Die Prozessierung der Pan[®] Rat Liver Oligonukleotid-Arrays mit 1353 genspezifischen Oligonukleotiden und Pan[®] Rat 5K Array mit 5535 genspezifischen Oligonukleotiden (MWG Biotech AG, Ebersberg) auf Glasträgern und die Synthese der Cy3 bzw. Cy5-fluoreszenzmarkierten, cDNA-Sonden erfolgte jeweils nach dem Herstellerprotokoll.

DNase I Behandlung

Die Gesamt-RNA (3.3.1 nach Ambion) wurde vor der Sondensynthese einer DNase I Behandlung unterzogen. 400 µg Gesamt-RNA (in 250 µl), 60 µl 25 mM MgCl₂, 33 µl 200 mM Tris-HCl (pH 8.0) und 7 µl DNase I (10 U/µl) gemischt, inkubiert (30 min, 30°C), einmal mit PIC extrahiert und die Gesamt-RNA bei -20 °C (45min) mit 3M NaCl und zweifachem Volumen Ethanol (100%) präzipitiert. Das Pellet wurde in 24 µl Ribonuklease-freiem Wasser resuspendiert. Konzentration und Qualität wurden absorptionsphotometrisch (bei 260nm und 280nm) und mittels Ethidiumbromid-fluoreszenz in der Elektrophorese eines Aliquots der Präparationen unter denaturierenden Bedingungen (3.3.11.1) bestimmt.

Reverse Transkription zur Markierung der cDNA

Die reverse Transkription der mRNA in cDNA unter Einbau von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden erfolgte der DNA-freien Gesamt-RNA. 100 µg RNA (17 µl) wurden mit 2 µl Oligo d(T₁₅)-Primer (0,5 µg/µl) gemischt und inkubiert (65 °C, 10 min, RT, 10 min) und die folgenden Substanzen zugegeben: 8 µl 5 x Reaktionspuffer (Superscript II Kit, Invitrogen), 4 µl 5 mM dNTP-Gemisch, 4 µl 1 mM Cy3-dCTP bzw. Cy5-dCTP (Amersham, Freiburg), 4 µl 0,1 M DTT und 1 µl Superscript II (200 U/µl, Invitrogen). Die cDNA-Synthese erfolgte für 2h bei 39 °C in einem abgedeckten Heizblock, um das Ausbleichen der Cy-Farbstoffe zu vermeiden.

Entfernung nicht inkorporierter Nukleotide

Für die Entfernung nicht inkorporierter Nukleotide wurde der *PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Die unterschiedlich markierten cDNAs wurden mit 50 µl bidestilliertem Wasser eluiert, vereinigt und in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingengt.

Prähybridisierung und Hybridisierung der Oligonukleotid-Arrays

Die Glasträger wurden für 45 min mit 200 ml Blockierungslösung (8.1.8.16) bei 42 °C inkubiert und 5 x mit bidestillierten Wasser bei RT gewaschen, um unspezifische Bindungsstellen vor der Hybridisierung zu blockieren. Das markierte cDNA-Gemisch wurde für die Hybridisierung in 25 µl formamidhaltigem Hybridisierungspuffer (MWG Biotech, Ebersberg) resuspendiert, 3 min bei 95 °C denaturiert und auf RT rückgekühlt. Die gesamte Lösung wurde auf den bedruckten Bereich des Arrays appliziert, mit einem Deckgläschen abgedeckt und in einer befeuchteten Hybridisierungskammer (MWG Biotech, Ebersberg) bei 42 °C unter Lichtabschirmung für 24 h hybridisiert.

Nach den anschließenden Waschschrritten (Waschlösung 1 (2x SSC, 0,1 % SDS, 30 °C) Waschlösung 2 (1x SSC, 0,1 % SDS, 30 °C) Waschlösung 3 (0,5 x SSC, 30 °C)) wurden diese Arrays trocken (Anregung bei 532 und 633 nm) eingescannt (Affymetrix® GMS 418™ Array Scanner, Genetic Micro Systems). Die quantitative Auswertung erfolgte mit ImaGene™ 4.2-Software (BioDiscovery, Inc.). Für die Normalisierung wurde auf die Gesamtintensität Bezug genommen. Nach Normalisierung der Intensitäten der Spots wurden die Intensitäten der zu vergleichenden Zielsequenzen zueinander ins Verhältnis gesetzt.

3.3.14.3 Versuchsaufbau und Auswertung der Expressionsanalyse

Das Versuchsdesign berücksichtigte dabei den Vergleich einzelner Tierpaarproben wie auch den vereinigter Tierproben einer Gruppe (*Pool*). Die Auswertung erfolgte für jeden Versuch jeweils gepaart, d.h. für jeden Versuch wurde eine individuelle Kontrolle (Einzeltier oder *Pool*) mitgeführt und als Bezug definiert. Es wurden nicht die Mittelwerte aller Kontrollexperimente sondern die individuellen Ergebnisse von Tieren der Kontrollgruppe zur Auswertung genutzt. Dadurch entsteht eine größere Variationsbreite in den Ergebnissen, spiegelt aber die durch den Tierversuch erzeugten individuellen Schwankungen wider.

3.3.14.4 Elektronisches *Array*-System

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das System *NanoChip* *Molecular Biology Workstation* (Nanogen, San Diego, CA USA) in Anlehnung an die Vorgaben für die SNP-Analyse zur Methodenentwicklung für die Untersuchung von Expressionsmustern auf mRNA-Ebene eingesetzt werden. Parallel dazu versuchte auch eine Arbeitsgruppe von Nanogen Inc. mit dem Einsatz des Systems einen Ansatz zur Expressionsanalyse zu entwickeln.

3.3.14.4.1 Methodenentwicklung zur Expressionsmustererkennung

Ziel war die Entwicklung eines Verfahrens zum Sortieren einsträngiger Nukleinsäuren. Durch die Isolierung und Hybridisierung von Nukleinsäure-*Pools* und abschliessendem Auslesen sollten Muster generiert werden, wobei die RNA mit Hilfe von auf einer festen Matrix-Oberfläche immobilisierten Fängersubstanzen, die variable und invariable Bereiche aufweisen, selektiv gebunden werden. Die Fänger sind dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Oligonukleotide mit 5'-terminalen invariablen „Anker“-Sequenzen, die in komplementärer Form mindestens einmal in jeder einsträngigen Nukleinsäure vorkommen, handelt. Das 3'-terminalen Ende weist dagegen variable Diskriminierungssequenzen auf, bestehend aus jeder möglichen Abfolge von drei Nukleotiden, die die Bildung von bestimmten Sorten der einsträngigen Nukleinsäuren ermöglichen.

Ziel war es, mit der genannten *Array*-Technik eine Expressionsanalyse durchzuführen. Hierbei sollte nicht, wie bei der Expressionanalyse anderer *Array*-Systeme, nach konkreten regulierten Genen gesucht werden, sondern eine komplette Verteilung der RNA auf dem *Array* erreicht werden. Hierzu wurden Fänger-Oligonukleotide eingesetzt, die alle möglichen Sequenzen abdecken (8.1.7.5).

Prinzip

Die Fänger-Oligonukleotide wurden in einem Puffer geringer Leitfähigkeit (50 mM Histidin) durch Applikation einer Spannung an den vorgesehenen Positionen des *Arrays* konzentriert und immobilisiert. Die Immobilisierung der biotinylierten Fängermoleküle erfolgte durch Bindung an Streptavidin in der Permeationschicht (*Agarose-Layer*) des *Chips*, welche die *Chip*-Oberfläche zur Analyse von Biomolekülen bedeckt. Nach Immobilisierung der Fänger (500-200 nM in 50 mM Histidin) wurde je

nach Versuchsaufbau die elektrophoretisch getriebene Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide, synthetischer Poly(A)⁺-RNA (>600 bp) oder der mRNA aus Kontroll- bzw. Mangeltieren durchgeführt.

Evaluierung des Systems zur Anwendung für Genexpressionsstudien

Zur Optimierung des angestrebten Versuchsaufbaues wurden zunächst veränderbare Parameter des Systems mit Hilfe von markierten und nicht-markierten Modell-Oligonukleotiden geprüft, variiert und für das angestrebte Versuchdesign der Mustererkennung übernommen. Erste Versuche erfolgten mit 10-25meren Oligonukleotid-Fängern (mit und ohne LNA-Nukleotiden) und komplementären markierten und nicht-markierten bzw. zwei *Mismatch*-enthaltenden Desoxy- und Ribonukleotid-Zielsequenzen (8.1.7.4.2 – 8.1.7.4.3).

Grundsätzlich erfolgt eine Verdünnung der biotinylierten Fänger zunächst auf 500 nM in 50 mM Histidin, welche später auf 200 nM verringert wurde, um eventuelle Verschleppungen auf Nachbarbesetzungsplätze zu minimieren. Diese Konzentration erwies sich als ausreichend zur Absättigung der Streptavidinbinder (ca. 1×10^9 / Besetzungsplatz). Für Untersuchungen des Verhaltens längerer Nukleinsäuremoleküle in der Hybridisierung auf dem *Chip* wurden zunächst reine synthetische Poly(A)⁺-RNA-Spezies einer Sequenz eingesetzt (3.3.5).

Mustergenerierung

Nach Fertigstellung des *Arrays* (Bedingungen, siehe nächster Absatz; Fänger: 8.1.7.5) wurden zwei sich unterscheidende RNA-*Pools* auf verschiedenen *Chips* hybridisiert und die entstehenden Muster miteinander verglichen. Über Fluoreszenz konnte das sich ergebende Muster des RNA-Hybridisierungsereignisses detektiert werden. Eingesetzt wurden je 125-250 ng Poly(A)⁺-RNA aus Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangeltieren.

Elektronische Adressierung und Hybridisierung

Die in 50 mM Histidin gelösten Fänger wurden durch die Pufferkanäle der Trägerkassette auf den *Chip* gespült. Die elektronische Adressierung wurde mit 2 Volt für 60 s durchgeführt. Für die Hybridisierung der in 50 mM Histidin gelösten Probe (Ribo- oder Desoxy-Oligonukleotid oder Poly(A)⁺-RNA) wurde für jeden gewählten Versuchansatz die optimale Konzentration ermittelt. Grundsätzlich liessen sich kurze

Modell-Sequenzen bis in den pikomolaren Bereich verdünnen und waren noch detektierbar. Für die Versuchsdurchführungen der Mustererkennung wurden 125 bzw. 250 ng Poly(A)⁺-RNA von Kontroll- bzw. Zinkmangeltier mit 2,1 Volt für 2 min auf der *Chip*-Oberfläche hybridisiert.

Thermische und elektrisch getriebene Diskriminierung

Je nach eingesetzten Fängermolekülen (LNA-haltig oder ohne LNA) erfolgte die Diskriminierung der hybridisierten Probe durch Salzkonzentration und Temperatur oder durch Anlegen einer elektrischen Spannung. Zur thermischen Diskriminierung wurde eine Temperaturreihe je nach Probe von 24 °C bis maximal 55 °C und Niedrigsalzpuffer (8.1.8.17) durchgeführt. Die elektrisch getriebene Diskriminierung erfolgte in „20/20“-Puffer (8.1.8.19) unter sukzessiver Erhöhung der Gegenspannung (-0,5 Volt bis maximal – 1,4 Volt). Zwischen jedem Schritt der Diskriminierungsreihe wurde bei markierten hybridisierten Proben „*online*“ mittels Laser die Fluoreszenz (Cy5/Cy3; Anregung bei 532 und 633 nm) ausgelesen.

On-Chip-Markierung

a.) Enzymatisches *Reporting*

Die gebundene Menge nicht markierter hybridisierter mRNA wurde durch eine Reverse Transkription auf dem *Chip*, bei dem die *Match*-Bindung des Fängers an die Probe als Transkriptionsstart (*Primer*) dient, unter Einbau von Cy5- oder Cy3-dCTP nach folgendem Schema detektiert:

- 14 µl DEPC-Wasser
- 8 µl 5 x Puffer (Superscript RT Kit)
- 4 µl 0,1 M DTT
- je 2 µl 2 mM dATP, dTTP, dGTP
- 4 µl 1 mM Cy5- bzw. Cy3-dCTP
- 4 µl Superscript RT

Die 40 µl wurden auf der *Chip*-Oberfläche bei 37 °C für 10 min inkubiert, die überschüssige Reaktionslösung durch mehrmaliges Waschen mit Niedrigsalz-Puffer (8.1.8.17) entfernt und die verbleibende Fluoreszenz ausgelesen.

b.) Interkalierende *PICO^äGreen-* / *SYBR^äGreen* I-Färbung

Die gebundene Menge nicht markierter hybridisierter mRNA wurde durch die Zugabe einer 1:1000 verdünnte *SYBRGreen* I bzw. *PICOGreen*-Lösung (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande) im Bereich doppelsträngiger Nukleinsäuren durch Interkalieren des Farbstoffes gefärbt und das Fluoreszenzsignal detektiert (Anregung bei 633 nm).

c.) Detektion mit sequenzspezifischen markierten Reportersonden

Für den Nachweis hybridisierter unmarkierter RNA bekannter Sequenz wurden speziell synthetisierte komplementäre 3'-Cy5 bzw. Cy3-markierte Reporter-Oligonukleotide eingesetzt. Diese wurden als 500 nM Lösung in Hochsalzpuffer (8.1.8.18) 3 min auf dem *Chip* bei RT inkubiert und durch Waschen mit Niedrigsalzpuffer (8.1.8.17) nicht gebundene Reporter entfernt.

d.) Absättigung nicht besetzter Fängermoleküle (Negativfärbung)

Für den Nachweis nicht besetzter Fängermoleküle wurden speziell synthetisierte komplementäre 5'-Cy5 bzw. Cy3-markierte Oligo-d(A)-Reporter-eingesetzt. Diese wurden als 500 nM Lösung in Hochsalzpuffer (8.1.8.18) 3 min auf dem *Chip* bei RT inkubiert und durch Waschen mit Niedrigsalzpuffer (8.1.8.17) nicht gebundene Reporter entfernt.

Bioinformatische Auswertung der Muster

Die Muster generiert durch die Hybridisierung mRNA aus Lebergewebe von Kontroll- bzw. Zinkmangeltieren, wurden freundlicherweise sowohl von Lion Bioscience unter Anwendung der *Array-Scout Software*, als auch von Dr. Wiesner (phase-it AG, Heidelberg) einer bioinformatischen Auswertung unterzogen. Die Auswertung der phase-it AG wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

Die Daten bestanden aus zweimal 15 Experimenten, hälftig verteilt auf Kontrollgruppe und Zinkmangelgruppe, mit je 64 Genexpressionswerten („Probes“). Die zugrundeliegende Bedeutung der Gene war der Firma unbekannt.

Um einen Klassifikator auf Basis der Daten zu lernen, wurden zuerst geeignete Variablen („Probes“) selektiert und mit diesen dann der Klassifikator trainiert. Die zu lernende Zielvariable war für die Kontrolle mit 0, für die behandelte Gruppe mit 1 kodiert. Trainiert wurde der Klassifikator mit einem Bayes'schen Verfahren.

Als Fehlerfunktion wurde die „*Cross-Entropy*“ Fehlerfunktion verwendet, die sicherstellt, daß die Ausgabe des Klassifikators der Wahrscheinlichkeit der Klassenzugehörigkeit entspricht. Folgende Schritte wurden im Einzelnen ausgeführt:

- Iteratives Ranking der Variablen (= „Probes“) nach ihrem Informationsgehalt bezüglich der Fragestellung.
- Selektion des informativsten Paares von Variablen.
- Training eines linearen Klassifikators mit diesen 2 Variablen nach einem Bayes'schen Lernverfahren.
- Berechnung des „*Leave-One-Out*“-Errors

Zur Einschätzung der Güte der Klassifikation wurde von der phase-it AG für den Datensatz der „*Leave-One-Out-Error*“ berechnet. Es wurden insgesamt 30 lineare Klassifikatoren trainiert, in dem jedes der 30 Experimente einmal als Testpunkt verwendet wurde und die restlichen 29 jeweils als Trainingspunkte. Jedes Experiment wird so einmal zum unabhängigen Testpunkt.

3.3.14.5 Genexpressionsuntersuchung spezifischer Transkripte

Zur Untersuchung der Genexpression spezifischer Gene mittels elektronischem *Array*-System wurden genspezifische biotinylierte Fänger-Oligonukleotide (500 nM in 50 mM Histidin, 8.1.7.6) aller zu untersuchenden Genprodukte (MT und GAPDH) auf einem *Chip* an gewünschter Stelle immobilisiert (2 Volt, 60 s). Kurze Amplifikate (<100bp) der zu untersuchenden Gene von Kontroll- und Zinkmangeltieren wurden generiert (siehe 3.3.6) und in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (1:2; 1:4, 1:40) auf dem gleichen *Chip* durch Anlegen einer Spannung hybridisiert (2,1 Volt, 2 min). Die gebundene Menge, als Nachweis der Transkriptmenge, wurde entweder durch enzymatisches *Reporting* (3.3.14.4.1) oder durch Hybridisierung genspezifischer Cy5 bzw. Cy3-markierter Reporter-Oligonukleotide (3.3.14.4.1) und Auslesen der generierten Fluoreszenzintensität detektiert. Die relative Transkriptmenge wurde durch den Bezug auf die Signalintensität des *House keeping*-Gens GAPDH ermittelt.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Rohhomogenatgewinnung zur Enzymaktivitätsbestimmung

Zur Gewinnung der Rohhomogenate aus untersuchten Organen wurde Gewebe in gekühlte Glasgefäße (Glaszentrifugenröhrchen) eingewogen. Nach Zugabe der zehnfachen Menge an EGTA-Puffer (8.1.8.23) wurde mit einem Ultraturrax bei 9500-13500 rpm das Gewebe für 2 min unter Eiskühlung homogenisiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens (Volumen Gewebe + Volumen Flüssigkeit) bidestilliertem Wasser wurde das Rohhomogenat bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

3.4.2 Enzymaktivitätsbestimmung

3.4.2.1 Alkalische Phosphatase im Serum

Für die Beurteilung des Zinkstatus der Ratten wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum herangezogen. Die Aktivitätsbestimmung im Serum erfolgte mit Hilfe einer Testkombination (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) nach der „optimierten Standardmethode“ der Deutschen Gesellschaft der Klinischen Chemie.

3.4.2.2 Alkalische Phosphatase in Leber und Niere

Die Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase in Serum, Leber und Niere erfolgte in Anlehnung an die Methode zu Anreicherung von Membranproteinen. Die Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase in der Niere wurde mit einer 1:20 Verdünnung der Probe in Diethanolaminpuffer (8.1.8.24) durchgeführt. Das Leberrohhomogenat wurde unverdünnt eingesetzt. Die Messung erfolgt nach dem folgenden Schema:



Das farblose Substrat wird durch Hydrolyse in das gelb gefärbte p-Nitrophenol überführt.

Nach Start der Reaktion durch Zugabe von 25 μl Rohhomogenat (oder Verdünnung) zu 750 μl frisch hergestellter Substratlösung (10 mM Na-p-Nitrophenylphosphat in Diethanolaminpuffer) wurden von 200 μl des Ansatzes wurde über 10 min jede

Minute bei 405 nm die Extinktion bestimmt. Die Zunahme der Extinktion ($\Delta E/\text{min}$) über die Zeit diene zur Berechnung der Enzymaktivität nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

$$E = \varepsilon \times d \times c$$

E = dimensionslose Extinktion (bei 405 nm)

ε = molarer Extinktionkoeffizient ($\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$)

d = Schichtdicke der Meßküvette (cm)

c = Konzentration des Stoffs

Umgeformte Formel:

$$c \text{ (U/ml)} = (\Delta E/\text{min})/(\varepsilon \times d) \times (V/v) \times VF$$

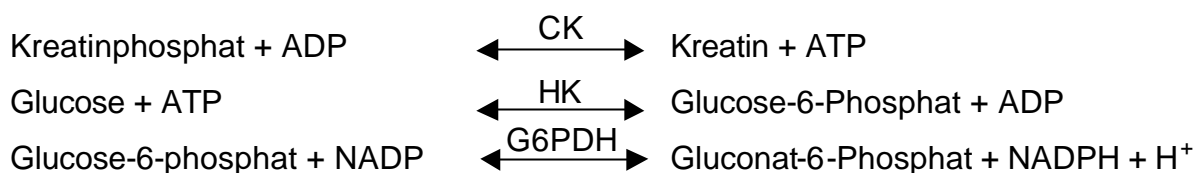
V = Gesamtvolumen der Messung (μl)

v = eingesetztes Probenvolumen (μl)

VF = Verdünnung der eingesetzten Probe

3.4.2.3 Kreatinkinase

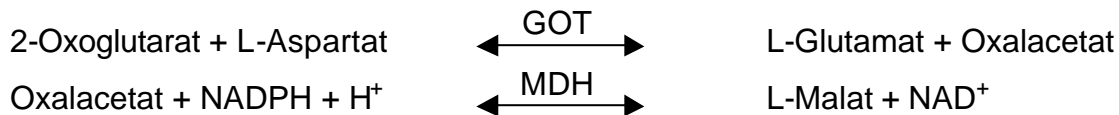
Die Aktivitätsbestimmung der Kreatinkinase in Serum, Leber und Niere erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift des Herstellers (CK NAC aktiviert Kreatin Kinase, Sigma, Taufkirchen) nach der „optimierten Standardmethode“ der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie.



Für eine Messung im linearen Bereich wurde von Serum, Leber- und Nierenrohhomogenat jeweils eine 1:10-Verdünnung in 0,9 %iger NaCl zur Bestimmung eingesetzt. Zur Ermittlung der Enzymaktivität wurde nach Bestimmung der Anfangs-extinktion über 3 min alle 60 Sekunden die Extinktion der Probe bei 340 nm gemessen, und über die Extinktionszunahme mit der Zeit ($\Delta E/\text{min}$) die Enzymaktivität berechnet.

3.4.2.4 Aspartat-Aminotransferase (GOT)

Die Aktivitätsbestimmung der Aspartat-Aminotransferase in Serum, Leber- und Nierenrohhomogenat erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift des Herstellers (GOT optimized Aspartat-Aminotransferase UV-Test, Sigma Taufkirchen) nach der „optimierten Standardmethode“ der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie.



Für eine Messung im linearen Bereich wurde von Serum eine 1:2-, von Leberrohhomogenat eine 1:200- und von Nierenrohhomogenat eine 1:100-Verdünnung in 0,9 %iger NaCl zur Bestimmung eingesetzt. Zur Ermittlung der Enzymaktivität wurde 1 min nach dem Mischen die Anfangsextinktion bei 340 nm bestimmt und dann wieder nach 0,5 und 1 min. Aus den Messungen wurde die Abnahme der Extinktion über die Zeit ($\Delta E/\text{min}$) errechnet und zur Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzt.

3.4.2.5 Laktat Dehydrogenase

Die Aktivitätsbestimmung der Laktat-Dehydrogenase in Serum, Leber- und Nierenrohhomogenat erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift des Herstellers (LDH OPT. Laktat-Dehydrogenase UV-Test, Sigma, Taufkirchen) nach der „optimierten Standardmethode“ der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie.



Für eine Messung im linearen Bereich wurde vom Serum eine 1:10-, von Leberrohhomogenat eine 1:100- und von Nierenrohhomogenat eine 1:10-Verdünnung in 0,9 %iger NaCl eingesetzt zur Bestimmung eingesetzt. Zur Ermittlung der Enzymaktivität wurde 0,5 min nach dem Mischen die Anfangsextinktion bei 340 nm bestimmt und dann alle 60 s über eine Zeit von 3 min die Extinktion bei 340 nm abgelesen. Aus den Messungen wurde die Abnahme der Extinktion über die Zeit ($\Delta E/\text{min}$) errechnet und daraus die Enzymaktivität ermittelt.

3.4.3 Proteinisolierung

Die Isolierung der Proteine aus den Organproben erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Görg *et al.* (1988, 2000). Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff pulverisiert und mit 200 µl Lysepuffer (8.1.8.38)/10mg Gewebe versetzt. Der Lysepuffer enthielt Harnstoff und das zwitterionische Detergenz CHAPS, mit deren Hilfe die Proteine denaturiert und in Lösung gebracht werden. CHAPS diente zum Schutz vor erneuter Aggregation der denaturierten Proteine. Um Membranproteine zu lösen, mußte eine Mischung aus Harnstoff und Thioharnstoff eingesetzt werden. Um Disulfidbrücken zu zerstören und um die Proteine in ihrem reduzierten Zustand zu halten, wurde dem Puffer DTT zugesetzt. Trägerampholyte minimierten die Proteinaggregation aufgrund von Ladungswechselwirkungen. Die durch Zellyse freigesetzten Proteasen wurden durch Proteaseinhibitoren inaktiviert.

Unter Eiskühlung wurde die Gewebesuspension mit Hilfe eines Ultraschallstabes (30 Stöße, Amplitude 3) homogenisiert. Das Lysat wurde für 30 min auf Eis inkubiert und dann für 30 min bei 43000 rpm in der Ultrazentrifuge die Zelltrümmer pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen. Der Proteingehalt des extrahierten Proteinlysates wurde photometrisch nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Mit Hilfe von Standardproben bekannter BSA-Konzentration wurde eine Eichgerade ermittelt. Von den zu bestimmenden Proben wurde 1,25 µl eingesetzt, mit bidestilliertem Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 1,25 ml Bio-Rad-Reagenz zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 595 nm in einem Spektralphotometer. Die Proteinkonzentration wurde durch den Vergleich mit der BSA-Eichgeraden ermittelt. Die Proben wurden aliquotiert und bei -80°C bis zum Gebrauch eingefroren.

3.4.4 Western Blot-Analyse

Die Analyse der Proteine wurde in Anlehnung an die Methode von Towbin *et al.* (1979) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgte, je nach zu erwartender Größe des Proteins durch 10-15%ige vertikale SDS-PAGE Gelelektrophorese (8.1.8.25 und 8.1.8.26). Gleiche Mengen Gesamtprotein (50-100µg) jeder Probe wurden in 1 x Volumen mercaptoethanolhaltigem Lämmli-Proben-Ladungspuffer (50 µl β -Mercaptoethanol/950µl Puffer, Bio-Rad), auf-

genommen, denaturiert (5 min 95 °C) und in einem SDS-PAGE Gel nach der Größe bei 30 mA aufgetrennt.

Gel und Membran wurden vor dem Proteintransfer 10 min in gekühltem 1 x Transferpuffer (8.1.8.28) inkubiert. Der Transfer aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran wurden im methanolhaltigem Tris-Glycin-Transferpuffer (8.1.8.28) 1h bei 100 Volt angelegter Spannung durchgeführt. Die Überprüfung des Transfers erfolgte durch Färbung der Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Färbelösung (8.1.8.29) und Coomassiefärbung des Trenngels.

Nach einstündigem Blocken der Membran in TBST (8.1.8.30)-Milch (3% Magermilchpulver), folgendem Waschen mit je 25 ml TBST erfolgte die Inkubation mit Antikörpern bei 4 °C für mindestens 12 h in TBST-Milch (3%) (Batteiger *et al.*, 1982). Nach anschließenden Waschschritten wurde für 1 h ein Peroxidase-gekoppelter sekundärer Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Für jeden primären Antikörper wurden die Bedingungen, wie Verdünnung und Inkubationszeit und -temperatur, optimiert. Die Visualisierung erfolgte durch Umsatz von 3-Amino-9-ethylcarbazol und H₂O₂-Zusatz durch die gekoppelte Peroxidase des zweiten Antikörpers zu einem rötlichen Endprodukt. Die Dokumentation erfolgte durch Einlesen des *Blot*-Bildes.

3.4.5 2D-Gelelektrophorese

Die Proteinexpressionsanalyse wurde freundlicherweise von Frau Dipl. oec. troph. Dagmar Fuchs durchgeführt. Das Vorgehen erfolgte in Anlehnung an Görg *et al.* (1988). Die isoelektrische Fokussierung (IEF) der Proteine in der ersten Dimension fand im IPGphor (*Isoelectric Focusing*) System (Amersham Pharmacia, Freiburg) statt. Die Proteine wurden mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG) in den Bereichen pH 3-10, pH 4-7 und pH 6-11 aufgetrennt. Der immobilisierte pH-Gradient entsteht durch Kopolymerisation der *Immobiline*[®] (Acrylamidderivate mit puffernden Gruppen) mit Acrylamidmonomeren (Amersham Pharmacia, Freiburg). Die Trennungszurückführung der ersten Dimension beinhaltete die Streifenrehydratisierung mit 340 µl Rehydratisierungslösung (8.1.8.40) bei RT über Nacht, die Probenapplikation durch *Cup Loading*-Verfahren und Auftrennung mit isoelektrischer Fokussierung. Je nach gewählten pH-Bereichen unter folgenden Bedingungen (Tab. 3.1; 8000 Volt, 50 µA pro IPG-Streifen). 500 µg Proteinisolat (3.4.3) wurden für die Analysen auf den Streifen der ersten Dimension appliziert.

	pH 3-10	pH 4-7	pH 6-11
Phase	KVh	KVh	kVh
1	0.001	0.001	0.001
2	3	3	3
3	17-22	20-27	20-27
Gesamt	25000 Vh	30000 Vh	30000 Vh

Tab. 3.1: *Applizierte Spannung zur isoelektrischen Fokussierung der Proteine verschiedener pH-Bereiche in der ersten Dimension*

Für die Auftrennung in zweiter Dimension wurde das Ettan DALT II System (Amersham Pharmacia, Freiburg) eingesetzt. Die 12,5%igen analytischen SDS-PAGE-Trenngele, in der ETTAN DALT Gelgießkammer gegossen und bei 4 °C auspolymerisiert, wurden nach der Methode von Laemmli (1970) (8.1.8.39) hergestellt. Direkt vor dem Start der zweiten Dimension wurden die Streifen mit den fokussierten Proteinen in 10 ml Equilibrierungspuffer 1 (8.1.8.41) und 10 ml Equilibrierungspuffer 2 (8.1.8.42) für je 15 min bei RT equilibriert, auf die Geloberkante appliziert, mit einer Agaroselösung (8.1.8.43) entstehende Zwischenräume versiegelt und unter Anlegen des Stromstärke-Programms (45 mA 1h, 145 mA 17h) in SDS-Elektrophoresepuffer (8.1.8.36) der Größe nach aufgetrennt.

Die Detektion der getrennten Proteine erfolgte mit kolloidaler Coomassiefärbung (Diezel *et al.*, 1972; Blakesley und Boezi, 1977). Sie basiert auf der unspezifischen Bindung des Farbstoffes *Coomassie-Blue G250* an praktisch alle Proteine, die sich im Gel befinden. Die Proteine wurden zunächst fixiert (40% Ethanol, 10% Eisessig, 6 h) und mit der Färbelösung (8.1.8.45) über Nacht imprägniert. Der nicht gebundene Farbstoff wurde durch Waschen des Gels mit bidestilliertem Wasser bis zum Verschwinden der Hintergrundfärbung entfernt. Die Detektion und vergleichende Auswertung der gefärbten 2D-Gele wurde mit *Proteome-Weaver*-Software (Definiens, München) und *Image-Master* (Amersham, Freiburg) durchgeführt.

3.4.6 Aufbereitung der Proben für die folgende MALDI-TOF-MS-Analyse

3.4.6.1 Waschen und Trocknen Coomassie-gefärbter Gel-Spots

Die Aufarbeitung der Protein-Spots für die folgende Analyse im MALDI-TOF-Massenspektrometer wurde in Anlehnung an die Empfehlungen des Herstellers (Bruker) durchgeführt. Die Coomassie-gefärbten Protein-Spots wurden mittels einer sterilen Hautstanze (\varnothing 2 bzw. 3 mm) aus dem Gel ausgestochen und zur Entfärbung der Gelbanden solange abwechselnd in 50 μ l Acetonitril und 50 μ l 50 mM NH_4HCO_3 gewaschen, bis das *Coomassie-Blue* vollständig entfernt war. Im letzten Schritt vor der Trocknung der Gelbande in der Vakuumzentrifuge erfolgte das Waschen mit Acetonitril.

3.4.6.2 Tryptischer Protein-Verdau und Eluieren der tryptischen Fragmente

Zum Einquellen der Trypsinlösung (0,02 μ g/ μ l in 1 mM HCl) wurde diese für 1 h bei 4 $^{\circ}\text{C}$ mit den getrockneten Gelbanden inkubiert. Der anschließende alkalische „*In-Gel*“-Verdau wurde nach Zugabe von 50 mM Ammoniumbicarbonat für 16 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die Elution der Proteinfragmente erfolgte durch zweimalige Zugabe von 10 μ l ACN/0,1%TFA (3:2). Nach 6 h Inkubation (37 $^{\circ}\text{C}$) wurde der Überstand abgenommen, überführt und in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockenheit eingeeengt. Die verbliebene Gelbande wurde erneut mit 10 μ l ACN/0,1%TFA überschichtet, über Nacht inkubiert (37 $^{\circ}\text{C}$) und der Überstand wieder eingetrocknet. Für die MALDI-TOF-MS-Analyse der tryptischen Fragmente der getrockneten Überstände wurden die zweite Fraktion in 5 μ l 1% TFA vollständig resuspendiert und darin die erste Fraktion aufgenommen. Bis zur massenspektrometrischen Analyse wurden die tryptischen Fragmente trocken und bei -20°C gelagert.

3.4.7 MALDI-TOF-MS-Analyse

Die Proteinfragmente wurden mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer Autoflex® (Bruker, Leipzig) identifiziert. Die Probenapplikation für die MALDI-TOF-MS-Analyse wurde nach Gobom *et al.* (2001) durchgeführt. Die Proben wurden hierfür auf eine Trägerplatte (MTP AnchorChip-Target 400, Bruker, Leipzig) aufgebracht. Auf die vorgelegte Matrix (Hydroxycyanozimsäure (HCCA)-Aceton/TFA (0,1%) (97:3)) wurde 2 µl der Peptidgemisches in 1% TFA appliziert. Die Spektren wurden nach Herstellerangaben generiert und mit *BioTools*-Software (Bruker, Leipzig) und *Mascot Server*-Software eine Datenbanksuche zur Identifizierung der Proteine, durchgeführt.

3.5 Berechnungen und statistische Auswertung

Zur Auswertung der mit *Northern Blot* Analyse detektierten Banden bzw. der radioaktiven ³²Phosphor- bzw. ³³Phosphor-dATP-markierten prozessierten cDNA-*Arrays* wurden die Membranen auf *Phosphorimager*-Platten des *Cycloneä Storage Phosphor System* (Packard Bioscience) je nach Signalintensität unterschiedlich lang exponiert und dann eingescannt. Mit Hilfe der zugehörigen *Software OptiQuant Version 3* erfolgte die densitometrische Auswertung. Die ermittelten Daten sind in den entsprechenden Grafiken als Mittelwerte ± Standardabweichung der Einzelwerte dargestellt. Die Berechnung und grafische Darstellung erfolgte mit *Microsoft Excel* (Office 2000).

Für jede Variable wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt (n=3). Mit T-Test ermittelte signifikanten Unterschiede zu den korrespondierenden Kontrollen sind mit *(P<0,05), **(<0,01) und ***(<0,001) gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

Während die Symptome eines drastischen Zinkmangels bei Säugern bekannt sind, ist die sichere Diagnose einer marginalen Versorgung nach wie vor schlecht möglich. Dies zeigt die Notwendigkeit, leicht zugängliche und schnelle Diagnosemethoden zu entwickeln und Marker zu identifizieren. Wir haben den experimentellen Zinkmangel genutzt, um zu prüfen ob eine Mustererkennung (4.2.1) die Korrelation zwischen beeinflusstem Transkriptom und Phänotyp zulässt. Parallel dazu wurde die Zink-Sensitivität spezifischer Gene zur Identifizierung von Marker-Genen untersucht. Dazu wurde die *DNA-Array-Technologie* als umfassende *Screening-Methode* eingesetzt. (Blanchard *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1999). Die auf der Transkriptomanalyse (4.2.2) aufbauende Proteomanalyse (4.2.3), sowie die biochemischen und physiologischen Analysen (4.4 - 4.12) sollten ein möglichst umfassendes Bild der metabolischen Veränderungen im Zinkmangel erlauben.

4.1 Manifestation des experimentellen Zinkmangels *in vivo*

Ein manifester Zinkmangelzustand im Rattenmodell wurde hier durch Schlundsondenfütterung über 11 Tage erreicht.

Wachstumsretardierung, reduzierte Aktivität der alkalischen Phosphatase und Verminderung des Serumzinkgehalts im Zinkmangel

Schwache Ausprägungen beschriebener klinischer Symptome eines Zinkmangels bei Ratten (Mills *et al.*, 1969; Pallauf & Kirchgessner, 1971a) wie Veränderungen an Fell und Haut der Pfoten, ließen sich in dem durchgeführten Versuch bereits nach den elf Versuchstagen beobachten.

Eindeutig diagnostiziert wird der manifeste Zinkmangel aber erst durch die Bestimmung der Lebendmassenzunahme, Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum und Serumzinkgehalt (Roth & Kirchgessner, 1999).

Die Zwangsfütterung führte zu einer signifikant verminderten Lebendmassezunahme über den Versuchsverlauf (Abb. 4.1) (Roth, 2001).

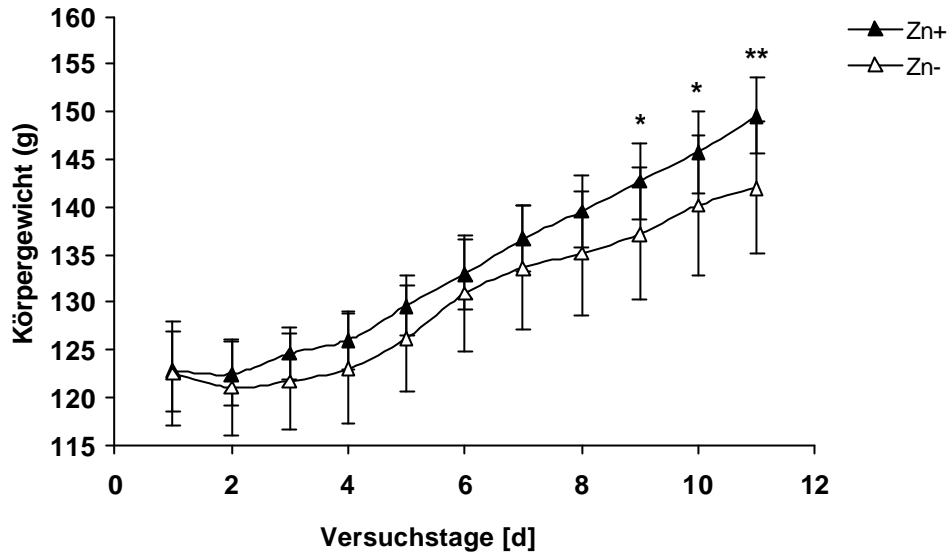


Abb. 4.1: *Durchschnittliche Lebendmassezunahme bei Kontroll- (Zn+) und Zinkmangelratten (Zn-) während der Schlundsondenfütterung über die Versuchstage; (n=12); Signifikante Unterschiede der Zinkmangelgruppe zur Kontrolle sind mit * (P<0,05) bzw. ** (P<0,01) angegeben*

In Abhängigkeit von der Zinkversorgung war auch für die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum und den Serum-Zinkgehalt eine signifikante Verminderung nachweisbar (Abb 4.2 A und B). Dabei war die Aktivität des Enzyms bei den Zinkmangeltieren durchschnittlich um 37,5 % verglichen mit der Kontrollgruppe erniedrigt. Der Zinkgehalt war durchschnittlich um 58 % gegenüber der Konzentration in Kontrolltieren vermindert (Roth, 2001) .

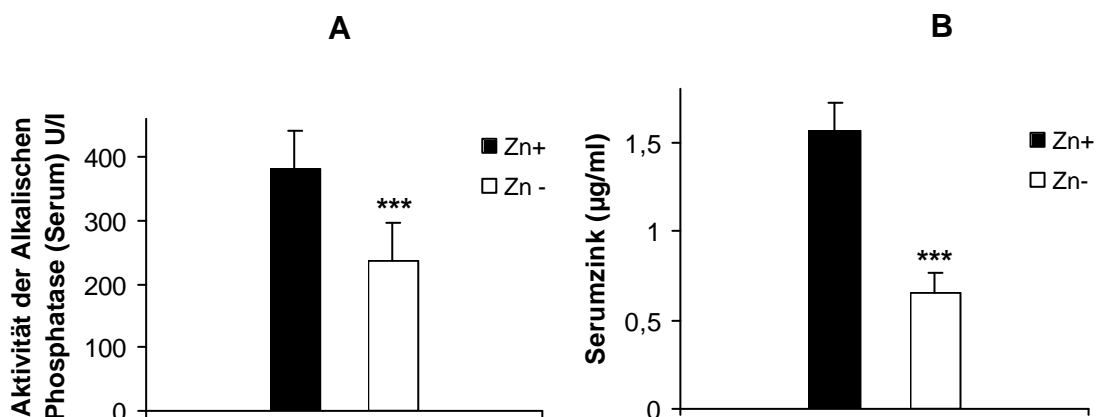


Abb. 4.2: *(A) Aktivität der alkalischen Phosphatase (Serum) und (B) Serumzinkgehalt in Kontroll- (Zn+) und Zinkmangelratten (Zn-) in Abhängigkeit von der Zinkversorgung zur Überprüfung des erzeugten Zinkmangels ; (n=12), Darstellung = Mittelwerte ± Standardabweichung der Einzelwerte, Signifikante Unterschiede der Zinkmangelgruppe zur Kontrolle sind mit *** (P<0,001) angegeben*

Als zentrales Organ des Stoffwechselgeschehens und der Homöostase stand die Leber im Mittelpunkt der Analyse. Um die Zinkversorgung der Leber zu ermitteln wurde die Zinkkonzentration in den Geweben von Kontroll- und Zinkmangeltieren verglichen.

Mittels Atomabsorptionspektrometrie (AAS) wurde dokumentiert, dass die Zwangsfütterung mit zinkarmer Kost zu einer hochsignifikanten Verringerung der Zinkkonzentration im Lebergewebe von im Mittel 23,6 % (Abb. 4.3) führt.

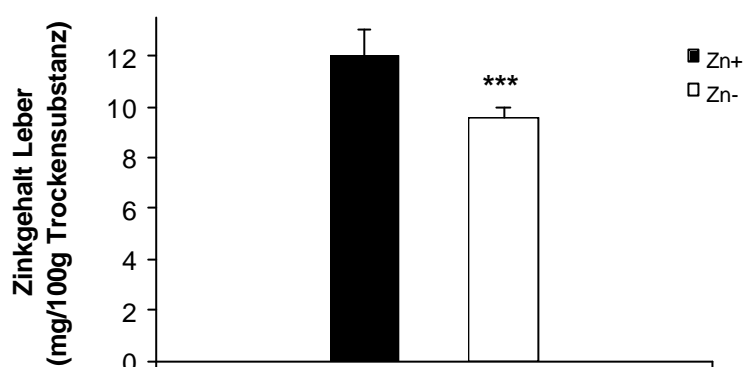


Abb. 4.3: *Zinkkonzentrationen im Lebergewebe von Kontroll- (Zn+) und Zinkmangeltieren (Zn-) ermittelt durch AAS, (n=6); Untersuchte Verdünnung 1:11 in 0,6 N HCl; Darstellung= Mittelwerte \pm Standardabweichung der Einzelwerte, Signifikante Unterschiede der Zinkmangelgruppe zur Kontrolle sind mit *** ($P < 0,001$) angegeben*

Metallothioneinexpression zum Nachweis des Mangels auf Transkriptebene

Metallothionein fungiert über den Transkriptionsfaktor MTF1 als ein Sensor für freies Zink in der Zelle (Andrews, 2000). Seine Expression wird durch die Abnahme des freien zellulären Zinks vermindert. Daher wurden zur Verifizierung des Zinkmangels auf molekularer Ebene die mRNA-Spiegel des Metallothionein-Gens in der Leber mittels *Northern Blot*-Analyse bestimmt (Davis und Cousins, 2000).

Der erzeugte Zinkmangel führte wie Abbildung 4.4 zeigt zu einer ausgeprägten Unterdrückung der Metallothioneinexpression in Lebergewebe von Zinkmangeltieren.

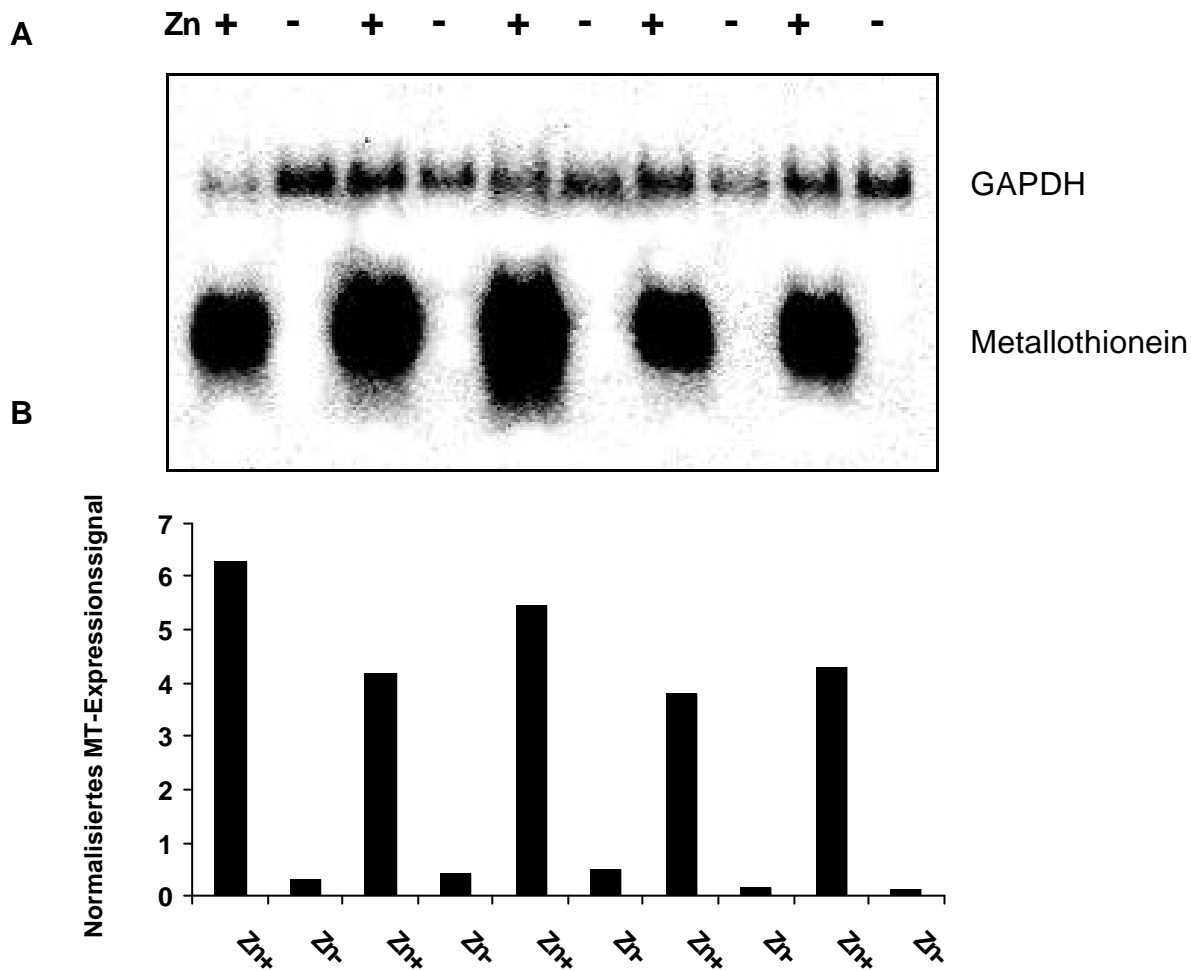


Abb. 4.4: *mRNA-Expression von Metallothionein-1 in der Leber von Kontroll- (Zn+) und Zinkmangelratten (Zn-) untersucht mittels Northern Blot-Analyse. (A) Northern Blot mit 15 µg Gesamt-RNA/Spur von fünf individuellen Tierpaaren und (B) Auftragung der Signalintensitäten nach Normalisierung auf das konstitutiv exprimierte „House keeping-Gen“ GAPDH*

4.2 *Screening* auf zink-sensitive Markergene

Im Mittelpunkt der Arbeit stand der Einsatz von *DNA-Array*-Technologien, um Veränderungen der RNA-Expression hervorgerufen durch den Zinkmangel zu charakterisieren.

Dabei ist im folgenden zwischen der Methodenentwicklung des elektronischen *Array*-Systems (Nanogen, San Diego, CA, USA) zur Erzeugung diagnostischer Muster (4.2.1) und dem Einsatz kommerzieller *Array*-Systeme für die Identifizierung spezifischer zink-sensitiver Zielsequenzen (4.2.2) zu unterscheiden. Ergänzend wurde ein *Screening* auf Proteinebene mittels 2D-Gelelektrophorese durchgeführt (4.2.3).

4.2.1 *Screening* mit elektronischem *Array*-System – Methodenentwicklung zur Mustererkennung

Ziel dieser Studien war eine Expressionsprofil-Nachweismethode zur Mustererkennung zu entwickeln. Erhaltene Muster aus sortierten Poly(A)⁺-RNA-*Pools* von Kontroll- und Zinkmangeltieren sollten charakteristisch für den jeweiligen Phänotyp sein. Hierzu wurde das elektronische *Array*-System *NanoChip* *Molecular Biology Workstation* (Nanogen, San Diego, CA, USA) verwendet.

Bis dahin wurde das System nach Prototyp-Experimenten im Bereich der Nukleinsäurehybridisierung fast ausschließlich für SNP-Analysen, d.h. zur Einzelbasen-*Mismatch*-Bestimmung (Sosnowski *et al.*, 1997) eingesetzt und von der Vertreiberfirma dafür optimiert. Weitere Applikationen waren noch nicht veröffentlicht. Da das System durch den unbeladenen *Chip* aber eine hohe Flexibilität aufweist, ist theoretisch eine Analyse aller geladenen Biomoleküle möglich.

Die zugrundeliegende Idee der Expressionsanalyse mittels Nanogen-System war, jede vorkommende Poly(A)⁺-RNA des aufgebrachten Transkriptoms auf dem *Chip* festzuhalten und so zu verteilen, dass sie an ihrer komplementären Fängersequenz bindet. Das entstehende Muster sollte reproduzierbar und eindeutig zuzuordnen sein. Das Einfangen aller kodierender mRNAs folgte dabei dem Prinzip der Poly(A)⁺-RNA-Aufreinigung.

Um alle mRNAs zu fangen, wird eine invariable, allen mRNAs eigene Sequenz gebraucht, das Poly(A)⁺-Ende. Die spezifische Verteilung benötigt dagegen eine variable und damit sortierende Sequenz. Alle statistischen Möglichkeiten der vier vorhandenen Basen in den drei Nukleotiden im Anschluß an den invariablen Part

decken damit alle Sortierungsmöglichkeiten ab (z.B.: 5'-d(T)₁₈-X₁X₂X₃-3' wobei X₁X₂X₃ alle möglichen Kombinationen der Nukleotide mit den Basen A, C, G und T umfaßt; 4³ = 64 Möglichkeiten).

Erste Untersuchungen dienten zur Ermittlung optimaler Einstellungsparameter des Systems. Für diesen Ansatz zur Expressionuntersuchung existierten keine Parametervorgaben für die *NanoChipä Molecular Biology Workstation*. Die Ermittlung der Einstellungsparameter erfolgte daher in Anlehnung an die Vorgaben des Herstellers zur Durchführung von SNP-Analysen.

4.2.1.1 Bestimmung der Diskriminierbarkeit von *Mismatches*

Da bisherige Anwendungen auf der Bildung von DNA:DNA Hybriden basieren, sollte zuerst vergleichend untersucht werden, wie sich Ribonukleinsäureproben unter gleichen Bedingungen verhalten.

Wie bei Sosnowski *et al.* (1997) beschrieben, ist für DNA:DNA Hybridisierungen bereits die Möglichkeit einer *Single-mismatch*-Diskriminierung auf diesem System nachgewiesen. In eigenen Analysen wurde deshalb untersucht, ob geringe Veränderungen (*Mismatches*) im Fänger auf diesem System detektierbar sind. Diese ersten Experimente wurden mit kurzen endständig Cy-markierten Modell-Ribo- bzw. Desoxyribonukleotiden humaner GAPDH-*Match*- bzw. *Mismatch*-Sequenzen durchgeführt (Sequenzen 8.1.7.4.2). Die anschließende Diskriminierung erfolgte in diesem Versuch durch Temperatur.

Bei der thermischen Diskriminierung von *Mismatches* zeigte sich, dass für Desoxyribonukleinsäureproben eine vollständige Trennung von komplementärer und nicht-komplementärer Probe am Fänger („0 oder 1“-Antwort) durch Temperaturerhöhung möglich war. Ribonukleinsäureproben wiesen dagegen initial die stärkste Diskriminierung am Fänger auf. Eine weitere Verbesserung durch das Anlegen einer Temperatur-Diskriminierungsreihe war nicht mehr zu erreichen. Auffallend war die unter den gleichen Versuchsbedingungen geringere Menge gebundener Ribonukleotid-Proben im Vergleich zu den Desoxy-Oligonukleotiden (Abb. 4.5).

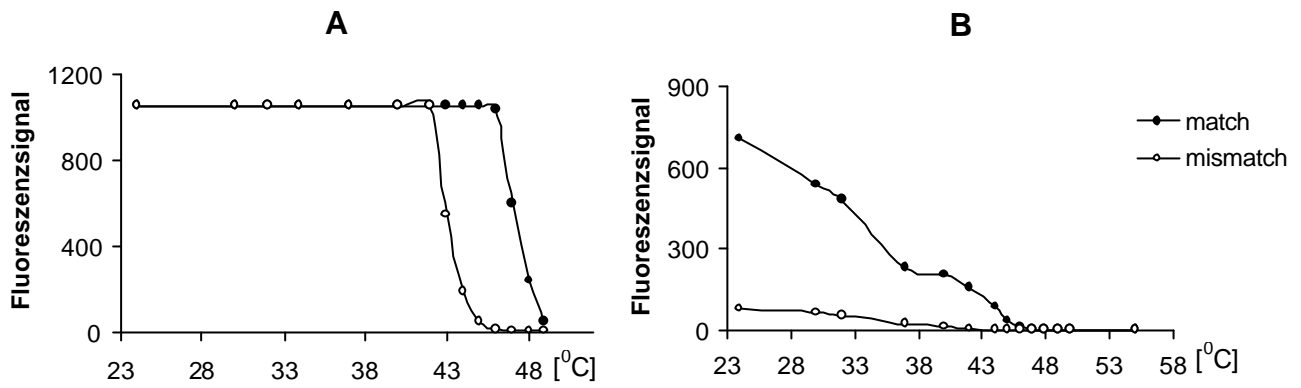


Abb. 4.5: Thermische Diskriminierbarkeit von Mismatches (A) Cy5-markierte 25mer Desoxyribonukleotiden (Match und Mismatch, je 1nM); (B) Cy5- markierte 25mer Ribonukleotid (Match und Mismatch, je 1 nM) hybridisiert an nicht-modifizierten Oligonukleotidfängern

4.2.1.2 Bestimmung optimaler Fängermoleküle

Kernpunkt der Methodenentwicklung stellte die spezifische Hybridisierung aller Poly(A)⁺-RNA- Moleküle einer applizierten Poly(A)⁺-Probe durch komplementäre Oligo-d(T)-Sequenz mit anschließendem diskriminierendem Abschnitt dar. Normalerweise bilden gerade RNA:DNA-Hybride einen stabileren Bindungsduplex als reine DNA:DNA-Hybride (RNA:RNA>DNA:RNA>DNA:DNA) (Casey und Davidson, 1977). Die Verbindung dT-rA stellt allerdings, insbesondere als Poly-dT-rA-Struktur, eine energetisch ungünstige und labile Verbindung dar (p.M., E. Weidenhammer, Nanogen). Um diese Problematik zu umgehen, wurde nach alternativen Fängermolekülen mit höherer Bindungskraft als DNA-Oligonukleotide gegenüber Ribonukleinsäuren gesucht. Untersucht wurde der Einfluss modifizierter Monomere/Nukleotide, sogenannter „locked-nucleic-acid (LNA)“-Nukleotide (Proligo, Boulder) (Abb. 4.6). Diese erfahren durch das Einführen einer Methylenbrücke zwischen C₂ und C₄ des Zuckers eine Versteifung des Polynukleotidrückgrats. Der Austausch eines DNA- durch ein LNA-Monomer führt damit unter mittleren Salzbedingungen zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur von 3-8 °C (Koshkin *et al.*, 1998).

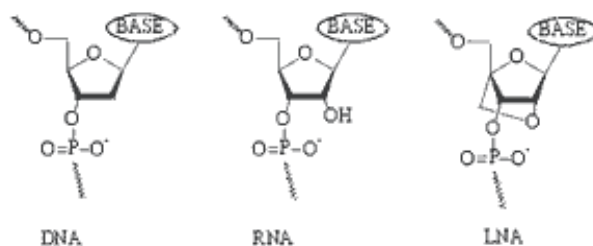
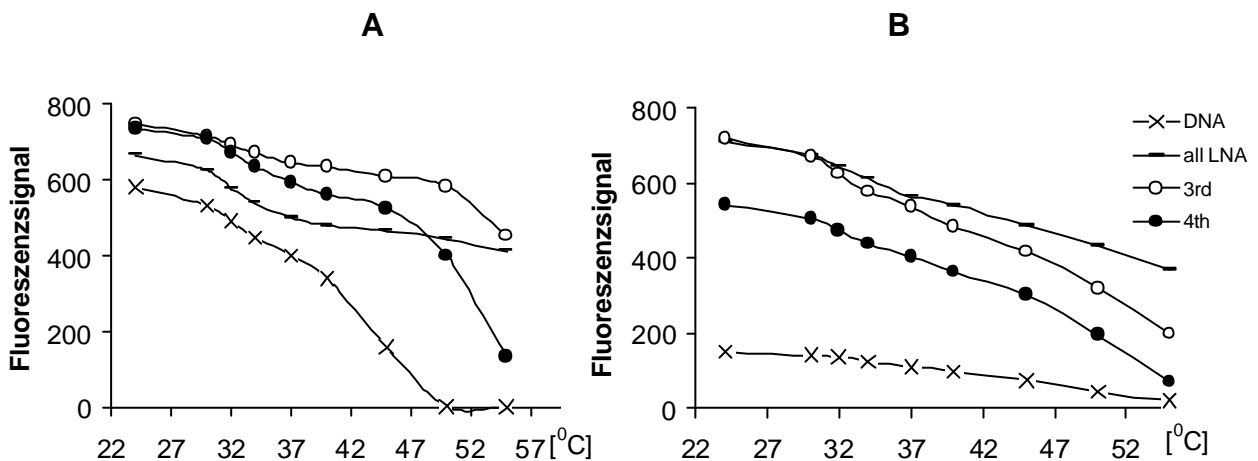


Abb. 4.6: Unterschied zwischen LNA-Nukleotiden und DNA bzw. RNA-Monomeren (Proligo, Boulder, USA)

Die vergleichende Untersuchung zwischen LNA- und Desoxyribonukleotidfängern wurde mit markierten Desoxy-Poly(A)- bzw. Ribo-Poly(A)-Modellproben durchgeführt (Abb. 4.7 C).

Der Einsatz von LNA-Nukleotiden in unterschiedlicher Häufigkeit und Verteilung im Fänger-molekül zeigte dabei für die gebundene Menge von kurzen synthetischen RNA-Molekülen eine deutliche Erhöhung gegenüber herkömmlichen Oligonukleotidfängern (Abb. 4.7 A,B). Die schwache Bindung zwischen Poly-rA und dT wurde hier durch LNA-Gehalte im Fänger von 25-30% kompensiert. Die gebundene Menge Ribooligonukleotid erfuhr beispielsweise durch den Einsatz des „every-3rd-LNA“-Fängers eine Erhöhung um ca. 400 %. Das Detektionslimit konnte, für den Einsatz von LNA-haltigen Fängern, bei angenommenen $\sim 10^9$ Fängern / Besetzungsplatz (p.M., Nanogen) für Desoxyribo- und Ribooligonukleotid-Probe im picomolaren Bereich (~ 10 pM) ermittelt werden.



C

DNA:=	5'-Biotin-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T-3'
all LNA=	5'-Biotin- TTT TTT TTT T -3'
3 rd = every 3 rd LNA =	5'-Biotin-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T-3'
4 th = every 4 th LNA =	5'-Biotin-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T-3'

Abb. 4.7: *Hybridisierung und Temperaturdiskriminierung* eines (A) komplementären Cy5-markierten Poly d(A)-Desoxyribonucleotids (1nM) und eines (B) komplementären Cy5-markierten Poly r(A)-Ribonucleotids (1 nM) an DNA-bzw. LNA-Fänger; (C) Sequenzen der eingesetzten Fänger-moleküle zur Untersuchung der Bindungsfähigkeit LNA-haltiger Fänger im Vergleich zu Desoxyribonucleotiden; T= LNA; T = Desoxyribonucleotid

Da die Nukleinsäuremustererkennung mit dem *Array* die hinreichende Diskriminierbarkeit verschiedener Nukleinsäuresequenzen voraussetzt, sollte neben der gebundenen Probenmenge auch die Möglichkeit der Diskriminierbarkeit an den LNA-haltigen Fängern untersucht werden. Die Analysen wurden mit LNA-haltigen Fängern humaner GAPDH-*Match*- und *Mismatch*-Sequenzen (8.1.7.4.3) durchgeführt. Jedes drittes Desoxyribonukleotid des Poly d(T)-Bereichs im Fänger war hier durch ein LNA-Monomer ersetzt. Als Modell-Zielsequenz kam eine *Match*-komplementäre, Cy-markierte Ribonukleotidprobe (8.1.7.4.3) zum Einsatz. Der Vergleich hybridisierter Ribonukleotidprobe an *Match*- bzw. *Mismatch*-LNA- bzw. LNA-losen Fängern zeigte wieder initial eine höhere Bindung an LNA-haltigen Fängern (Abb. 4.8 A, B). LNA-lose Fänger erlaubten nur eine Bindung von 10% verglichen mit LNA-Fängern. Allerdings zeigte sich initial wieder eine als maximal zu bezeichnende Diskriminierung der Ribonukleotidprobe an Desoxyribonukleotidfängern (vergleiche Abb. 4.5 B). LNA-Fänger wiesen dagegen bei zu Beginn höherer gebundener Probenmenge diese anfängliche Diskriminierungsfähigkeit nicht auf (Abb. 4.8 A, B).

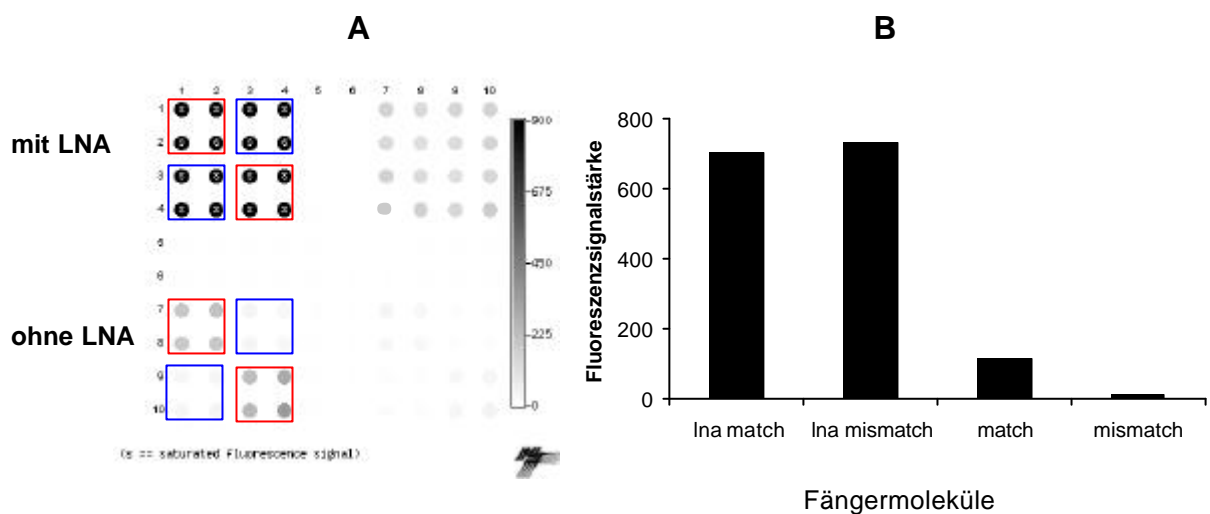


Abb. 4.8: *Initial gebundene Menge an sequenzspezifischen Proben an LNA-haltigen (oben) und LNA-losen (unten) Match- bzw. Mismatch-Fängern. (A) Chipauftrag: oben LNA-haltige Match- (rot) und Mismatch- (blau) Fänger und 10 nM (links) und 1 nM (rechts) markierte Ribonukleotid- Proben Match-komplementärer Sequenz, sowie unten LNA-lose Fänger Match (rot) und Mismatch (blau) Fänger und 10 nM (links) und 1 nM (rechts) markierte Ribonukleotid-Proben Match-komplementärer Sequenz (B) Initial gebundene Menge einer 10 nM applizierten Probe mit komplementärer Sequenz zum Match-Fängermolekül*

Daraufhin wurde die Diskriminierbarkeit der initial hohen Menge gebundener Ribonukleotidprobe am LNA-haltigen Fänger untersucht.

Die Hybridisierung sequenzspezifischer Ribonukleotide zeigte, dass eine thermische Diskriminierung der initial unspezifisch gebundenen Menge nicht möglich ist. (Abb. 4.9 A). Mit Gegenspannungsdiskriminierung konnte dagegen die zum *Match*-Fänger komplementäre Ribonukleotidprobe an LNA-haltigen *Match*- und *Mismatch*-Fängern eindeutig getrennt werden (Abb. 4.9 B). Als optimale Diskriminierungsstärke erwies sich dabei eine Gegenspannung von $-1,08$ Volt.

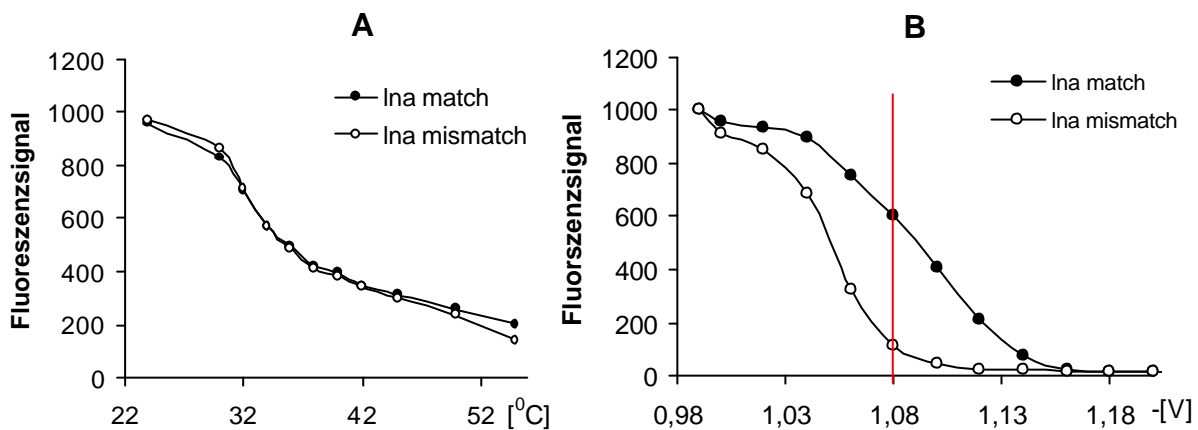


Abb. 4.9: *Thermische und elektronische Diskriminierbarkeit* von 5'-Cy5-markierten Modell-Ribonukleotidproben an komplementären *Match*- und nicht komplementären *Mismatch*-LNA-Fängern (A) thermische Diskriminierung (B) Diskriminierung mittels Gegenspannungsreihe von Cy5 -markiertem *Match*-Riboproben (10 nM)

4.2.1.3 Eignung verschiedener Fluoreszenzmarkierungsmethoden zum Nachweis von nicht-markierten Nukleinsäuren

Um systematische Fehler zu reduzieren, sollten die zu verwendeten RNA-Moleküle direkt markiert werden. Voraussetzung für den Nachweis der nicht-markierten Probenmoleküle war es daher, eine robuste fluoreszenzoptische Methode zu finden. Interkalierende Farbstoffe wie SYBR[®]Green, PICO[®]Green oder Ethidiumbromid erwiesen sich als nicht geeignet, da sie bereits an nicht hybridisierte einsträngige Fängermoleküle banden und detektiert werden konnten. Nichtenzymatische Fluoreszenzmarkierungen (Cy5, Cy3) der Proben-RNA-Pools unter Verwendung des MIRUS Label IT Kit (MoBiTec, Göttingen) waren aufgrund der geringen Signalintensität nur bedingt geeignet. Demgegenüber ermöglichte die enzymatische Kettenverlängerung auf dem *Chip* durch reverse Transkription (enzymatisches

Reporting) unter Einbau von Cy-markierten dCTP-Nukleotiden den Nachweis von unmarkierten Probenmolekülen, wie Oligonukleotiden, längeren RNA-Molekülen und aus Geweben isolierten RNA-Proben. Komplementär zum enzymatischen *Reporting* wurde außerdem eine Negativfärbung etabliert, die das Auslesen der nicht besetzten Fängermoleküle ermöglicht. Bei dieser Methode wurden Cy-markierte Oligonukleotide (15mer, dA) in Hochsalzpuffer eingesetzt, die nicht besetzte Oligo-dT-Fänger in einer nachgeschalteten passiven Hybridisierung absättigen.

4.2.1.4 Detektion und Verhalten langer Poly(A)⁺-RNA-Moleküle

Um zu prüfen, ob und unter welchen Bedingungen längere RNA-Moleküle mit dem *Array*-System nachgewiesen werden können, wurde eine synthetische cRNA verwendet. Hiermit sollte das Verhalten längerer Moleküle bezüglich Mobilität, Diskriminierbarkeit und Bindungsmenge am Fänger untersucht werden. Die Herstellung dieser cRNA umfaßte folgende Schritte: a) RT-PCR mit sequenzspezifischen *Primern* der GAPDH (Ratte), b) Insertion und Klonierung des RT-PCR Produktes in ein Plasmid, c) Insertion eines DNA-Linkers (T)₃₀CCAA *Match*- bzw. (T)₃₀GCAAT *Mismatch* am 5'-Ende des PCR-Produktes und d) T7-*in vitro* Transkription der hergestellten GAPDH-cDNA. Die so hergestellte cRNA wurde mit verschiedenen komplementären und nicht komplementären Fängermolekülen hybridisiert und durch enzymatisches *Reporting* oder nicht-enzymatische Cy-Markierung nachgewiesen.

Die Diskriminierung zwischen *Match*- und *Mismatch*-cRNA-Proben wurde mit zwei verschiedenen cRNAs, deren 3'-Enden sich an zwei Positionen unterscheiden, geprüft. Die cRNAs wurden dazu mit komplementären bzw. nicht-komplementären LNA-Fängermolekülen hybridisiert, durch Gegenspannung diskriminiert und anschliessend mit enzymatischem *Reporting* nachgewiesen. Die Applikation der reinen cRNA-Spezies erfolgte einzeln (Abb. 4.10 C) oder in Form von Gemischen, bestehend aus *Match*- und *Mismatch*-cRNA-Proben. Unter beiden Bedingungen war die Diskriminierung der cRNA gemäß ihrer Sequenz - komplementär bzw. nicht komplementär zu den Fängermolekülen – möglich. Das erwartete Muster erwies sich als reproduzierbar und konnte quantifiziert werden (Abb. 4.10 A, B).

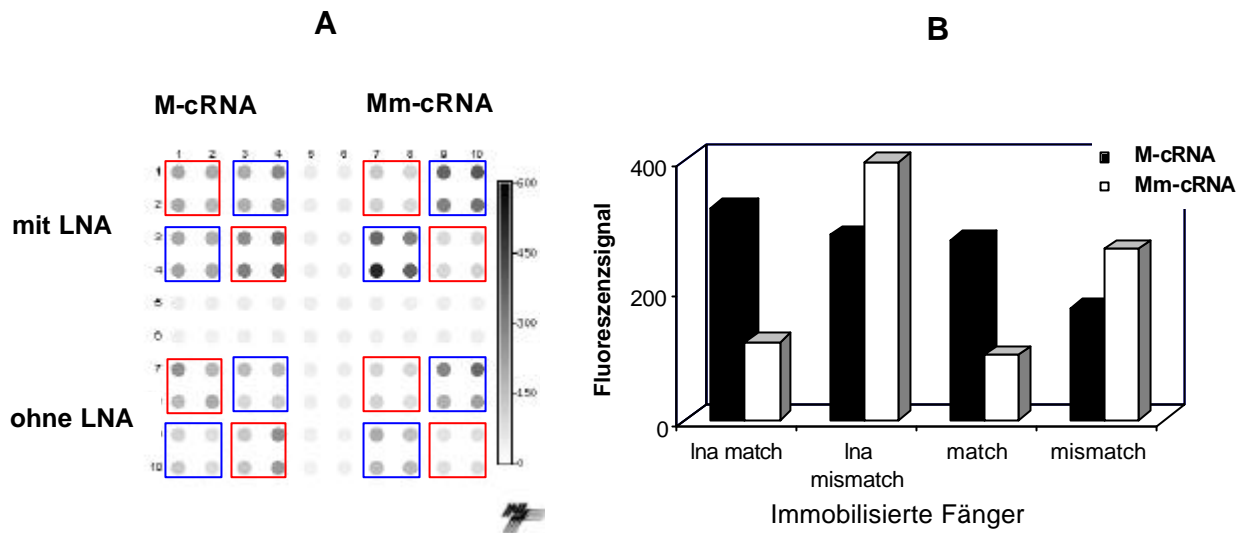


Abb. 4.10: *Detektion von in vitro synthetisierten cRNA; Diskriminierung zwischen einer Match-cRNA (M-cRNA) und einer Mismatch-cRNA (Mm-cRNA) mit LNA-Fängermolekülen (LNA) bzw. DNA-Fängermolekülen (DNA). (A) Optische Auslesung des Chips. rot=Match-Fänger, blau=Mismatch-Fänger; (B) Quantitative Auswertung der Hybridisierung nach elektronischer Diskriminierung und enzymatischem „Reporting“, (C) eingesetzt Match- und Mismatch-LNA-Fänger und Sequenzen der reinen cRNAs. T=LNA-Nukleotid*

Die Analysen zeigten, dass auch nach elektrisch getriebener Diskriminierung an den LNA-Fängern höhere Mengen RNA spezifisch gebunden bleiben als an LNA-losen Fängern zu Beginn gebunden wurden. Da die eingesetzten reinen Poly(A)-cRNA-Spezies nicht markiert vorlagen, erfolgte die Detektion mittels enzymatischem *Reporting*. Auch hier war der Nachweis bis in den picomolaren Bereich möglich (Abb. 4.11).

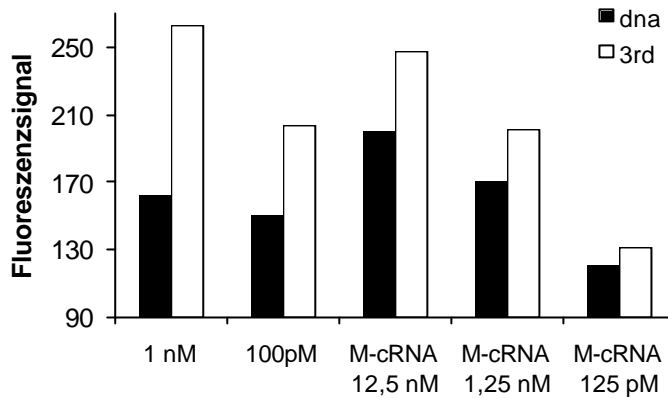


Abb. 4.11: *Nachweisempfindlichkeit einer in vitro transkribierten cRNA (M-cRNA) und eines kurzen unmarkierten Modell-Ribonukleotids an DNA- und LNA-haltigen (3rd= jedes dritte Nukleotid ist ein LNA-Nukleotid) Fänger-molekülen; Detektion durch enzymatisches „Reporting“*

4.2.1.5 Detektion von isolierter Poly(A)⁺-RNA aus Lebergewebe

Aus der Rattenleber wurde Gesamt-RNA (3.5 mg ± 0.5 mg/500 mg Gewebe) isoliert. Aus dieser konnten 20 µg ± 5 µg Poly(A)⁺-RNA präpariert werden. Die Poly(A)⁺-RNA-Ausbeute aus verschiedenen Präparationen war damit gut reproduzierbar. Die Isolierungsmethode eignete sich somit auch für die Experimente zur Mustererkennung. Zur Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit des Systems für die Leber-Poly(A)⁺-RNA wurden zunächst Poly-d(T)-Fänger-moleküle (ohne LNA- sowie mit LNA-Nukleotiden) eingesetzt. Der Nachweis erfolgte durch enzymatisches *Reporting*. Mit dieser Methode konnte die Poly(A)⁺-RNA im picomolaren Bereich detektiert werden (Abb. 4.12).

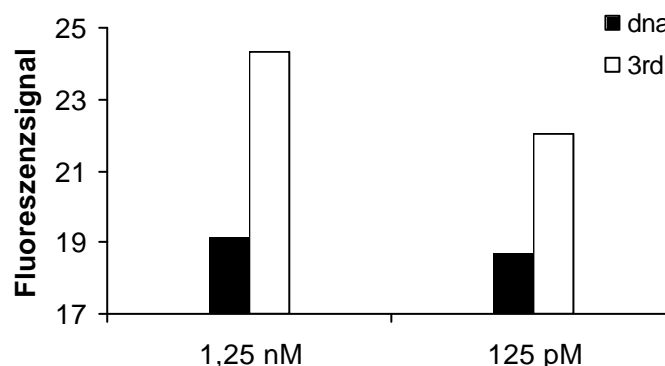


Abb. 4.12: *Nachweisempfindlichkeit für Poly(A)⁺-RNA aus der Rattenleber an DNA- und LNA-haltigen (3rd= jedes dritte Nukleotid ist ein LNA-Nukleotid) Fänger-molekülen, Detektion durch enzymatischen „Reporting“*

4.2.1.6 Mustererkennung: Exposition des mikroelektronischen DNA-Arrays mit Poly(A)⁺-RNA aus Geweben von Zinkmangeltieren und Kontrolltieren

Um die Methode der Nukleinsäuremustererkennung zu etablieren, wurden Poly(A)⁺-Proben aus der Leber von Zinkmangeltieren und Kontrolltieren mit dem mikroelektronischen *DNA-Array* hybridisiert und die Signale ausgelesen. Die für diesen *Array* ausgewählten LNA-haltigen Fängeroleküle hatten folgende Sequenz: (T)₁₈X₁X₂X₃, (Sequenzen siehe 8.1.7.5) wobei X₁-X₃ im ersten Ansatz alle 48 möglichen Kombinationen der Nukleotide mit den Basen A, G, C, oder T darstellten. Kombinationen mit X₁=Nukleotid mit Base T waren vorerst nicht zugelassen, um auf dem *Array* mit nur 100 Positionen eine Doppelbestimmung jedes Fängers zu ermöglichen. Der Hybridisierungsnachweis wurde mit enzymatischem *Reporting* (Cy5) durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Negativfärbung mit Cy3 (15mer, dA). Die entstehenden Muster waren reproduzierbar, ließen aber keine eindeutige Unterscheidung zwischen den Zinkmangel- und Kontroll-Poly(A)⁺-Proben zu (Abb. 4.13).

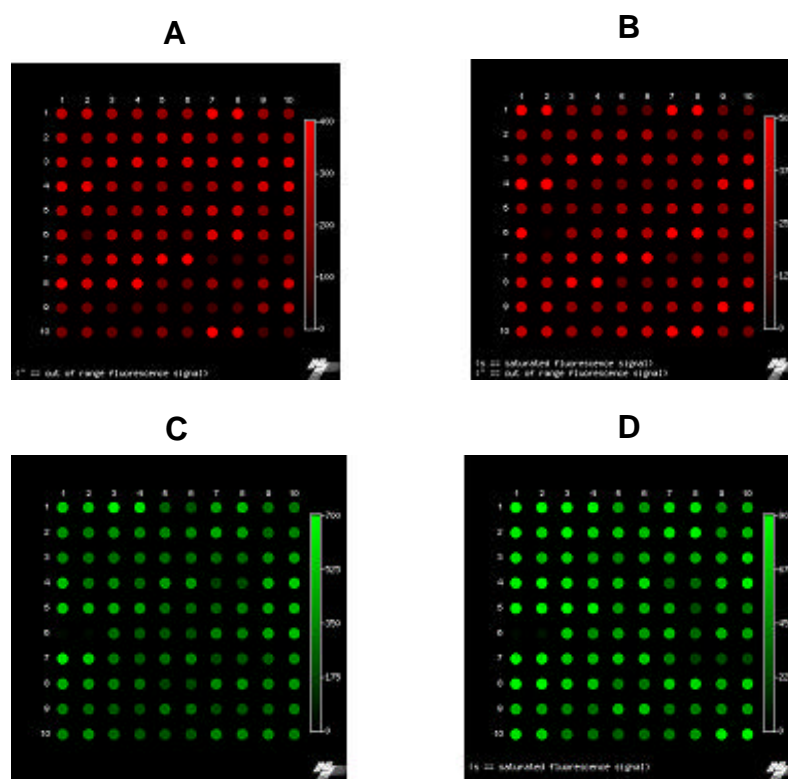


Abb. 4.13: Muster erzeugt durch die Hybridisierung von Poly(A)⁺-RNA von Kontroll- und Zinkmangeltieren. (A), (C): Poly(A)⁺-RNA aus der Leber von Kontrolltieren; (B), (D): Poly(A)-RNA aus der Leber von Zinkmangeltiere; (A), (B): Postivfärbung durch enzymatisches Reporting mit Cy5-CTP Einbau; (C), (D): Negativfärbung durch Markierung der nicht besetzten Fängeroleküle mittels Cy3-markierten Oligonukleotiden d(A)₁₅, Hybridisierung an die Fänger 1-48 (siehe 8.1.7.5); Hybridisierungsbedingungen: +2.1 Volt für 2 min in 50 mM Histidinpuffer.

In einem weiteren Versuchansatz wurde das Muster um weitere 16 Fänger erweitert, d.h. auch $X_1 = \text{Nukleotid mit Base T}$ war zulässig, um die Sensitivität durch erhöhte statistische Bindungsmöglichkeit zu vergrößern. Durch diese Versuchsanordnung konnte neben aufgebrauchten Kontrollen (GAPDH- und Aktin-Sequenz) die statistisch verteilten Fänger nur noch in einfacher Ausführung appliziert werden. Es wurde in fünfzehn Durchführungen Muster von Kontroll- und Mangelgruppen generiert. Die Muster erwiesen sich als reproduzierbar, aber eine Musterunterscheidung zwischen der Kontrollgruppe und der Zinkmangelgruppe war mit einfacher Auswertung in *Microsoft-Excel* nicht möglich (Abb. 4.14).

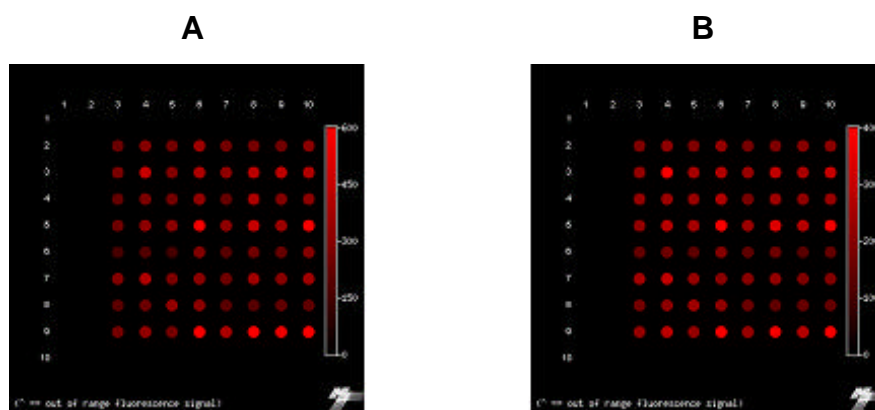


Abb. 4.14: *Muster erzeugt durch die Hybridisierung von Poly(A)⁺-RNA aus Leber von Kontrolltieren und Zinkmangeltieren. (A) Poly(A)⁺-RNA aus der Leber von Kontrolltieren (B) Poly(A)-RNA aus der Leber von Zinkmangeltiere, verteilt auf allen statistisch möglichen Fänger von (T)₁₈ X₁X₂X₃, (Fänger 1-64, siehe 8.1.7.5); Hybridisierung: 2 min, -2,1 Volt in 50 mM Histidinpuffer, detektiert mit enzymatischen „Reporting“ (Cy5)*

Die Daten aus den vielfach wiederholten Experimenten wurden deshalb von Lion Bioscience (Heidelberg) unter Anwendung der *Arrayscout Software* untersucht. Hierbei wurde versucht nach globaler Normalisierung die Gruppen zu „*clustern*“. Es konnte aber keine eindeutige bioinformatische Trennung der beiden Gruppen erreicht werden (Abb. 4.15).

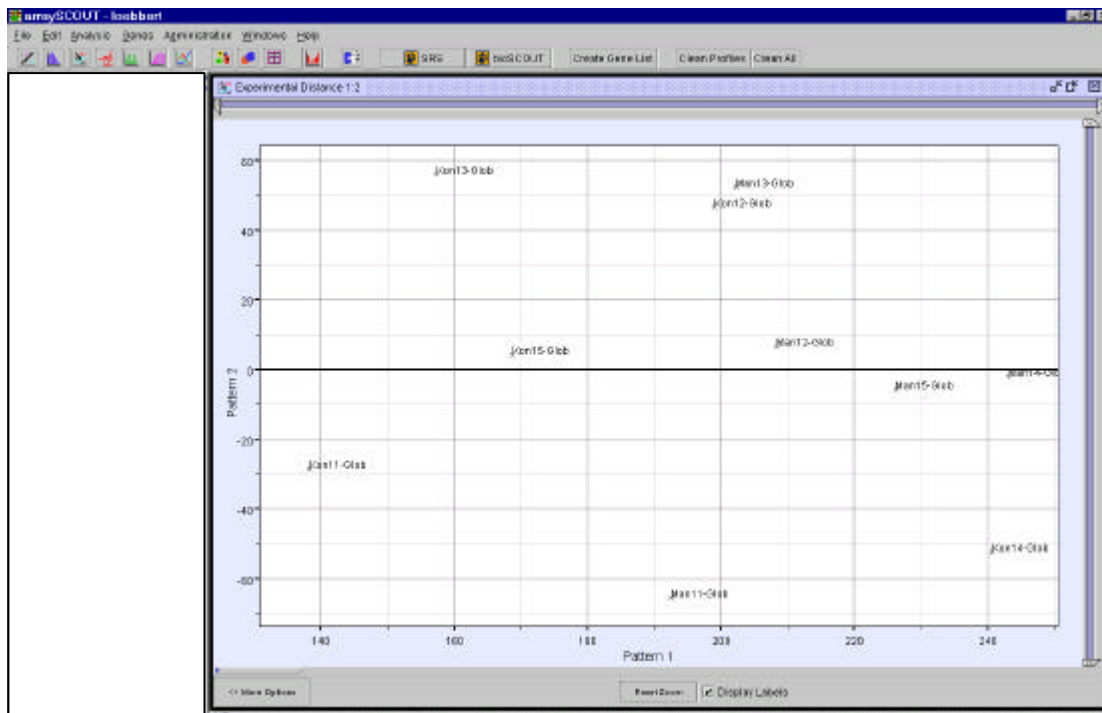


Abb. 4.15: *Experiment Clustering PCA (Principle Component Analysis)* durchgeführt von Lion Bioscience mit Array-Scout-Software (Lion Bioscience) nach globaler Normalisierung der Daten der Experimente. Die der Analyse zugrundeliegenden Muster wurden durch den Einsatz von Kontrolltier und Zinkmangeltier-mRNA erzeugt ($n=5$; Kontrolle = Kon10-Kon15; Zinkmangel = Man10-Man15).

Eine weitere bioinformatische Auswertung wurde von der Firma phase-it AG (Heidelberg, Dr. Wiesner) durchgeführt. Die Daten bestanden aus zweimal 15 Experimenten, hälftig verteilt auf Kontrollgruppe und Zinkmangelgruppe, mit je 64 Genexpressionswerten („Probes“).

Die Abbildung (4.16) zeigt die Klassifikationsgrenze im Raum, der durch die beiden als am informativsten berechneten Variablen aufgespannt wird, die bereits einen großen Teil der Datenpunkte richtig trennt (rechts der Linie sollte blau sein, links der Linie rot). In den zwei Dimensionen kann eine deutliche Gruppierung der Punkte wahrgenommen werden. Die Abbildung legt laut phase-it AG (Dr. Wesner) nahe, daß es unter Umständen eine nicht-lineare Abhängigkeit zur Zielvariablen gibt.

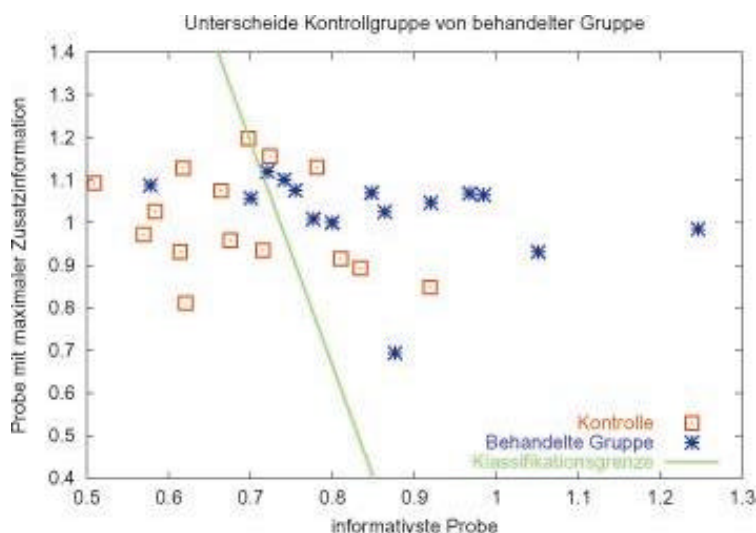


Abb. 4.16: Projektion der 30 Experimente (Kontrolle rot, Zinkmangelgruppe blau) im Unterraum, der durch die zwei informativsten „Probes“ aufgespannt wird (Die Genexpressionswerte wurden dazu normalisiert). Die grüne Linie zeigt die Klassifikationsgrenze.

Zur Einschätzung der Güte der Klassifikation wurde von der phase-it AG für den Datensatz der „Leave-One-Out- Error“ berechnet. Man erreichte eine Vorhersagegenauigkeit von ca. 70%, d.h. 21 der 30 Punkte wurden bei dieser Vorgehensweise in die richtige Klasse eingeordnet. Die phase-it AG empfiehlt diesen Wert durch den Einsatz mächtigerer Methoden (nicht-lineare Klassifikation) und Vergrößerung der Datenbasis zu verbessern.

Bedingt durch das negative Gruppierungsergebnis der Lion Bioscience-Analyse und der visuellen Auffälligkeit, dass ein vermehrtes Hybridisierungsereignis durchgängig für Fänger auftrat, die in der variablen Region ($X_1X_2X_3$) Thymidin-reich waren, musste eine zufällige Verteilung der Poly(A)⁺-Probe unabhängig von der Sequenz im Anschluß an das Poly(A)⁺-Ende in Betracht gezogen werden.

Daraufhin wurde mit markierten GAPDH- und MT-Reporteroligonukleotiden untersucht, ob nach Musterherstellung, d.h. Hybridisierung einer unmarkierten Poly(A)⁺-RNA-Probe nur an einem spezifischen Besetzungsplatz ein Signal detektiert werden kann. Die Analyse zeigte sowohl für den GAPDH- (Abb. 4.17), als auch für den MT1-Reporter eine diffuse Verteilung des Reporters auf dem *Chip*. Demnach binden die Poly(A)⁺-RNA-Moleküle einer Spezies nicht nur am komplementären Fänger, sondern verteilen sich unspezifisch auf dem gesamten *Chip*. Die Spezifität der eingesetzten Reporter wurde in unabhängigen Analysen bestätigt, was eine unspezifische Bindung im beschriebenen Fall ausschließt.

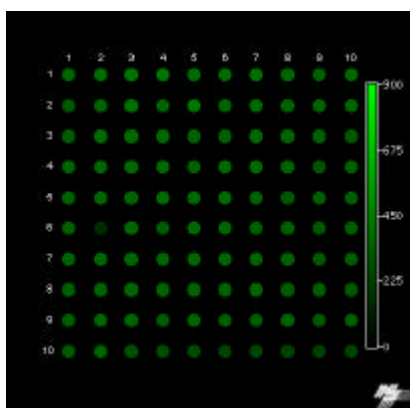


Abb. 4.17: *Hybridisierung eines spezifischen Cy3-markierten GAPDH-Reporteroligonukleotids (18mer) an das erzeugte Poly(A)⁺-Muster zur Lokalisierung von hybridisierten GAPDH-mRNA-Sequenzen.*

Zur Reduzierung unspezifischer Bindungsereignisse erfolgten Veränderungen der Hybridisierungsbedingungen für die komplexen Poly(A)⁺-Proben durch abwechselndes Anlegen von Spannung und Gegenspannung. Dieses Vorgehen, ähnlich einer „Pulse-field“- Gelelektrophorese zur Größenauftrennung hochmolekularer Nukleinsäuren in einem Gel, zeigte keine Verbesserung der spezifischen Bindung der unverkürzten Poly(A)⁺-Moleküle. Auch bei den SNP-Analysen, für deren Einsatz das Gerät ursprünglich konzipiert wurde und in deren Anlehnung die Methodenentwicklung erfolgte, kann eine hochspezifische Hybridisierung (*Mismatch*-Detektion) nur erreicht werden, wenn die eingesetzten Amplifikate eine Größe < 200 bp aufweisen.

Deshalb wurden die Ausgangs-Poly(A)⁺-RNA-Pools nach modifiziertem „Eberwine“-Protokoll, einer cRNA-Amplifikation über doppelsträngige cDNA, gekürzt. Durch kurze cRNA-Synthesezeit bei hoher ds-cDNA-Ausgangsmaterialmenge, sowie durch einen vollständigen Verdau der ds-cDNA vor der *in vitro* Transkription erfolgte die Generierung der gekürzten Poly(A)⁺-Pools. Abb. 4.18 zeigt neben originärer Gesamt-RNA zum Größenvergleich die generierten cRNAs auf denaturierendem Agarosegel. Als störend für die anschließenden *Chip*-Analyse erwies sich jedoch der hohe Gehalt an tRNA im Amplifikationspuffer des Kits, zugesetzt für die Ausbeuteerhöhung bei der Fällung im finalen Schritt der *in vitro* Transkription.

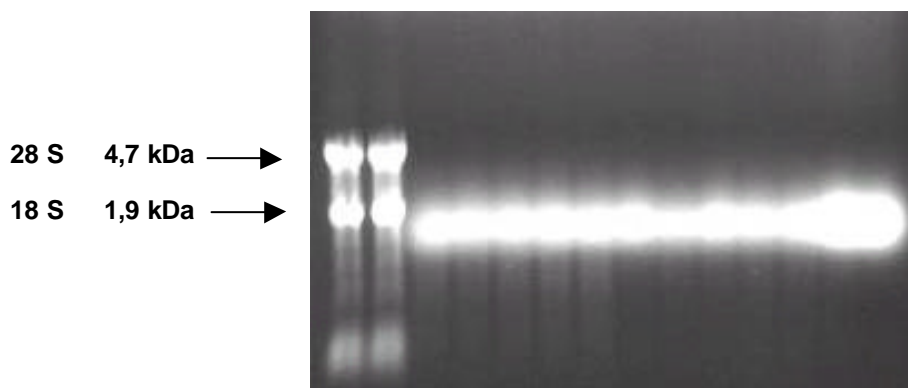


Abb. 4.18: Verkürzte Poly(A)⁺-RNA-Pools hergestellt durch modifiziertes „Eberwine“- Protokoll; Lane 1-2: unbehandelte Gesamt-RNA von Kontroll- und Mangeltieren für den Größenvergleich, Lane 3-7: amplifizierte cRNA von Kontrolltieren zu verschiedenen Reaktionszeitpunkten; Lane 8-12 amplifizierte cRNA von Zinkmangeltieren zu verschiedenen Reaktionszeitpunkten; Lane 13 – 14 amplifizierte cRNA aus Kontroll- und Mangeltieren nach Bsp143II-Verdau der ds-cDNA

Muster, die aus der Hybridisierung gekürzten Poly(A)⁺-RNA-Pools hergestellt wurden, wiesen verglichen mit Mustern hergestellt aus mRNA in Originallänge einen veränderten Mustertyp auf. Die Muster waren jedoch nicht reproduzierbar (Abb. 4.19).

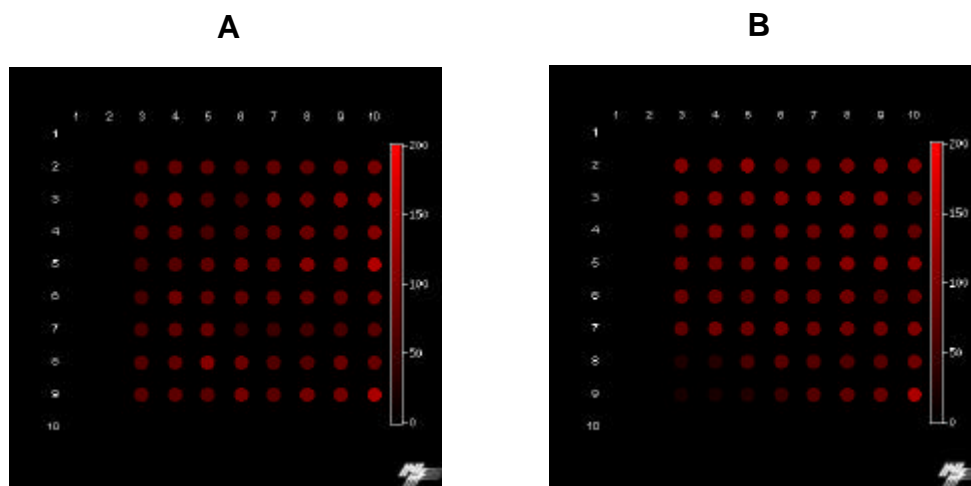


Abb. 4.19: Muster erzeugt durch die Hybridisierung gekürzter Poly(A)⁺-RNA von Kontroll- und Zinkmangeltieren. (A) Kontrolltiere (B) Zinkmangeltiere, Hybridisierungsbedingungen: 2 min, 2,1 Volt, je 125 ng RNA in 50 mM Histidinpuffer, detektiert mit enzymatischem „Reporting“

4.2.2 Screening mit *DNA-Arrays*

Unter Einsatz zweier *Array*-Systeme sollten Unterschiede der Genexpression in Zinkmangel- und Kontrolltieren verglichen und neue zink-sensitive Kandidatengene ermittelt werden. Für die Bearbeitung solcher Fragestellungen im Hochdurchsatzverfahren stellt die *DNA-Array*-Technologie derzeit die vielversprechendste Technik auf diesem Gebiet dar (Gabrielson *et al.*, 2001).

Aufgrund ihrer funktionellen Stellung im Organismus wurden Leber und Gehirn von Kontroll- und zinkdepletierten Tieren im *Arrayscreening* auf differentiell exprimierte Transkripte untersucht. Die Leber wurde wegen ihrer vorfilternden Verteilerfunktion im Organismus ausgewählt, während für das Gehirn eine weitreichend körpereigene Abschirmung gegenüber dem Spurenelementmangel angenommen wurde.

4.2.2.1 Beeinflussung des Transkriptoms der Leber im Zinkmangel

Für die Identifizierung möglichst vieler zink-sensitiver Gene in der Leber und in Anbetracht der anhaltenden kontroversen Diskussion über *Array*-generierte Daten wurden zwei verschiedene *Array*-Systeme eingesetzt. Beide Systeme lassen dabei hinsichtlich erfasster Gene, Sensitivität, Spezifität, Signal-Hintergrund-Verhältnis und Hybridisierungsbedingungen (siehe 3.3.14) Vor- und Nachteile erwarten (Yang *et al.*, 2002).

Zum Einsatz kamen der cDNA Atlas Rat 1.2 Array auf Nylonmembran (1176 Zielsequenzen) und der Oligonukleotid-Array Pan Rat Liver Array (1353 Zielsequenzen) bzw. Pan Rat 5K Array (5535 Zielsequenzen) auf Glaträgern.

Vergleichend versprach die radioaktive Markierung von cDNA eine höhere Sensitivität, während die unterschiedliche Markierung mit Cy-Farbstoffen eine parallele Hybridisierung auf ein *Array* erlaubt. Letzteres bot den Vorteil, Unterschiede durch Qualitätsunterschiede bei den Hybridisierungen vernachlässigen zu können.

Da die eingesetzte RNA aus Gesamt-Lebergewebe isoliert wurde, war die Menge nicht begrenzt. Sie repräsentierte damit aber die Transkriptome einer Vielzahl verschiedener Zelltypen. Abbildung 4.20 zeigt die Reproduzierbarkeit der Gesamt-RNA-Isolierung aus je drei Präparationen von Leber-Gewebe aus Kontroll- und Mangeltieren. Die ausgewählte Isolierungsmethode erwies sich als gut geeignet zur Generierung des Ausgangsmaterials für die *Array*-Analyse.

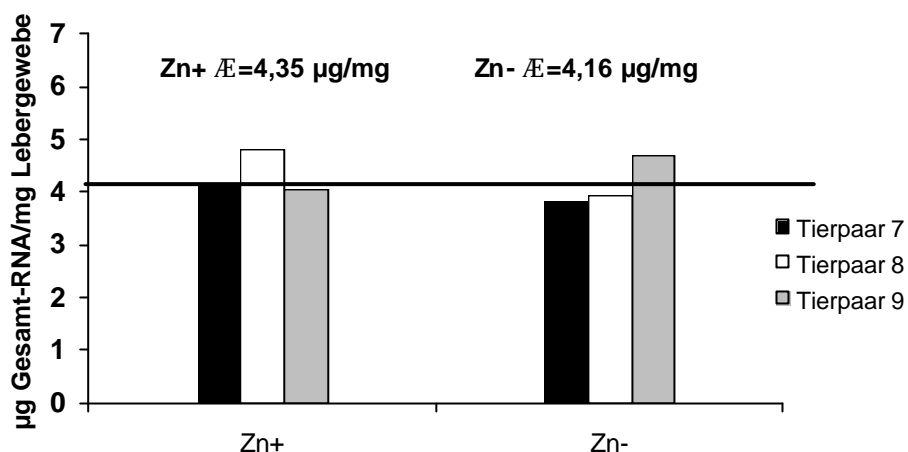


Abb. 4.20: Reproduzierbarkeit der Gesamt-RNA Isolierung aus Lebergewebe von Kontroll- (Zn+) und Zinkmangelratten (Zn-) mit RNAwiz Reagenz (Ambion), Mittelwert aller Isolierung 4,26 µg Gesamt-RNA/mg Lebergewebe

Zur Analyse wurden je 50 µg bzw. 100 µg Gesamt-RNA, isoliert aus Leber von Zinkmangel- und Kontrolltieren, eingesetzt. Nach Umschreiben in cDNA unter Einbau markierter Nukleotide (32 Phosphor- dATP oder Cy5- bzw. Cy3-dCTP), erfolgte die Hybridisierung über Nacht. Das Auslesen der prozessierten *Arrays* wurde je nach Markierungsart für Nylon-*Arrays* am Phosphorimager bzw. für Glasträger im Fluoreszenzleser durchgeführt.

Um die auf den Rastern durch Hybridisierung mit komplexen cDNA-Proben generierten Signalintensitäten miteinander vergleichen zu können, müssen diese normalisiert werden. Durch diese Normalisierung werden Unterschiede in den absoluten Messwerten, die beispielsweise durch unterschiedliche spezifische Aktivitäten, Expositionszeiten oder Einbauraten bei cDNA-Erststrangsynthese entstehen, ausgeglichen.

Als Bezugspunkt diente hier die Gesamtheit aller Signalintensitäten unter der Annahme, dass >80% der untersuchten Zielsequenzen keiner Regulation unterliegen. Zusätzlich zum Bezug auf die Gesamtintensität wurde für die Nylon-*Arrays* eine Normalisierung auf den Mittelwert der Signalintensitäten der *House keeping*-Gene GAPDH und β -Aktin durchgeführt. Die zugrunde liegende Annahme geht davon aus, dass *House keeping*-Gene keiner Regulation unterliegen und deshalb in Bezug auf die eingesetzte cDNA-Menge ein konstantes Verhältnis aufweisen.

Eine Veränderung der Transkriptmenge wurde hier ab einem Schwellenwert von $\pm 1,6$ oder mehr in zwei bzw. drei unabhängigen Hybridisierungen als signifikant betrachtet. Dieser Wert hat sich in mehreren Studien als verlässlicher Schwellenwert

erwiesen. Die in der Tabelle aufgeführten Δ -Werte stellen die Ratio-Veränderungen (Zn-/Zn+) der Transkriptmenge als Mittelwerte aller Versuche dar.

Für die identifizierten Transkripte erfolgte eine Einteilung auf Basis ihrer Genfunktion, um dadurch bereits Rückschlüsse auf die durch Zinkmangel betroffenen Stoffwechselwege ziehen zu können.

Wie Tabelle 4.1 zeigt, führte der Zinkmangel zu einer deutlichen Veränderung des Expressionsmusters in der Leber. Die Analyse der Daten ergab, dass etwa 4100 (=66%) von ca. 6200 unterschiedlichen Zielsequenzen Signalintensitäten über Hintergrundintensität aufwiesen. Unter Berücksichtigung der Detektiongrenze wiesen 268 Transkripte eine Regulation in Abhängigkeit von der Zinkversorgung auf, was einer Menge von 4,3 % der untersuchten Zielsequenzen entspricht. Davon war eine Änderung der Gleichgewichts-mRNA-Menge mit einer Hochregulation bei 73 (27,2%) und eine Herabregulation für 195 (72,8 %) Zielsequenzen im Zinkmangel nachzuweisen.

Tab. 4.1: Veränderung der Transkriptmenge in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangeltieren in Abhängigkeit von der Zinkversorgung untersucht mittels DNA-Arrays. Zusammenstellung aus dem Screening der drei eingesetzten Arrays und Einordnung der identifizierten Transkripte nach funktionellen Gruppen; (A = Atlas Rat 1.2 Array mit ³³P-dATP-Markierung (n=4, Einzeltierpaar- und gepoolte RNA-Proben mit je 50 µg Gesamt-RNA), P = Pan Rat Liver Array mit Cy5 bzw. Cy3-dCTP-Markierung (n=3; Einzeltierpaar-RNA-Proben mit je 100 µg Gesamt-RNA), R= Pan Rat 5K Array mit Cy-dCTP-Markierung (n=3;ein Einzeltierpaar- und gepoolte RNA-Proben mit je 100 µg Gesamt-RNA). **D** = x-fache Veränderung im Zinkmangel (Zn-/Zn+) als Mittelwert aller durchgeführten Einzelversuche, GH = Wachstumshormon, IGF = Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor, TG = Triglycerid, FS = Fettsäure, PL= Phospholipid; * Namen werden in Anlehnung an die Bezeichnung in der Datenbank in der Tabelle in englischer Sprache beibehalten

Genidentifikation	System	Kodiertes Protein *	Funktion	D
Wachstum				
J04811	R	growth hormone receptor	GH-IGF Achse	-1,7
M15650	P	IGF I	GH-IGF Achse	1,8
M89791	A	IGF-binding protein 1	GH-IGF Achse	-2,5
L22979	R	IGF binding protein-1 (IGFBP-1)	GH-IGF Achse	-2,4
J04486	A	IGF-binding protein 2	GH-IGF Achse	-2,3
S46785	A	IGF-binding protein, acid-labile su	GH-IGF Achse	-1,4
U44722	R	growth hormone receptor/binding protein (GHR/BP)	GH-IGF Achse	-1,4
U41183	R	Plac. pre-progrowth hormone-RH	GH-IGF Achse	-1,6
M29014	R	insulin receptor	Insulin Achse	-1,5
J00748	R	Propreinsulin II	Insulin Achse	-1,4
S53721	R	insulin-degrading enzyme	Insulin Achse	-1,6
L13619	R	growth response protein (CL-6); insulin-induced.	Insulin Achse	-1,6
M37394	A	EGF-Receptor	Mitogener Effekt	-1,8
AF147757	R	FGFR2 protein (FGFR2) gene	Mitogener Effek	-1,6

Genidentifikation	System	Kodiertes Protein *	Funktion	D
J02998	A	Ras-related protein	Mitogener Effekt	-2,2
X52590	R	cMG1; cMG1 protein (AA 1-338).	Mitogener Effekt	-1,4
NM021653	P	Thyroxine deiodinase type I	Thyroidhormonachse	1,6
S65838	R	Growth inhibitory factor – metallothionein homolog	Wachstumsfaktor	-6,0
X54400	R	hepatocyte growth factor	Regulator für Regeneration	3,0
X05137	R	fast nerve growth factor receptor (NGFR)	Neuronale Entwicklung	-2,0
M31076	R	transforming growth factor alpha (TGF-alpha),	Regeneration	1,8
M96643	R	transforming growth factor beta-2 partial cds.	Regeneration	-1,4
U58289	R	antisense basic fibroblast growth factor GFG	Posttranskriptionale Regulation	-1,4
AF205717	R	tetraspan protein LRTM4 (LRTM4)	Leberregeneration	-1,5
X95096	R	macrophage stimulating protein.	Hepatozyten Wachstumsfaktor Familie	2,1
M21967		Calcium-mobilizing parathyroid-hormone-like protein	Lokaler Zellwachstumsfaktor	-1,4
U04842	R	preproepidermal growth factor	EGF Prekursor	-1,4
Lipidmetabolismus				
L09216	R	glycosylated membrane-associated lipase	TG Degradation	-2,4
M33333	R	colipase	TG Degradation	-3,4
X61925	R	lipase; triacylglycerol acyl hydrolase.	TG Degradation	-3,3
AF171640	R	carboxylesterase partial cds.	TG Degradation	-2,0
AF171640	P	Carboxylesterase	TG Degradation	-1,8
D00362	R	carboxylesterase E1, partial cds.	TG Degradation	-1,8
D16102	A	Glycerol kinase	TG-Synthese	1,6
K01934	P	Lipogenic factor (S14 gene)	TG-Synthese	2,1
M15893	R	pancreatic lysophospholipase	PL Degradation	-2,2
D63885	A	Lysophospholipase	PL Degradation	-3,5
M32801	A	3-keto thiolase acyl-CoA	FS Degradation	-2,3
D00729	A+R	delta3, delta2-enoyl-CoA isomerase.	FS Degradation	-1,8
M61112	R	delta-3,delta-2-enoyl-CoA isomerase	FS Degradation	-1,6
NM130433	P	Acetyl-CoA acyltransferase 2	FS Degradation	-1,5
NM053674	P	Phytanoyl-CoA hydroxylase	FS Degradation	-1,5
AJ245707	R	partial 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase.	FS Degradation	-2,1
D16478	R	mitochondrial long-chain enoyl-CoA hydratase	FS Degradation	-1,6
L07736	R	carnitine palmitoyltransferase I	Transport für FS Abbau	-1,4
J05470	R	mitochondrial carnitine palmitoyltransferase II	Transport FS Abbau	-1,8
AB012933	R	acyl-CoA synthetase 5	FS-Aktivierung	1,6
D90109	P	Long-chain acyl-CoA synthetase	FS-Aktivierung	1,6
AF218826	R	acyl-CoA: dihydroxyacetonephosphate acyltransferase	FS-Synthese	1,8
J05210	P	ATP-citrat lyase	FS-Synthese	2,3
U89529	A	Fatty acid transporter	FS-Aufnahme	-2,6
U02096	A	Fatty acid-binding protein	FS-Trafficking	2,8
M89902	R	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	Ketonkörperumwandlung	1,6

Genidentifikation	System	Kodiertes Protein *	Funktion	D
J02752	R	acyl-coA oxidase; acyl-CoA oxidase	Peroxisomale β -Oxidation	-1,5
K03249	R	Peroxis. enoyl-CoA: hydratase-3-hydroxyacyl-CoA	Peroxisomale β -Oxidation	-1,8
U08976	R	peroxisomal enoyl hydratase-like protein (PXEL)	Peroxisomale β -Oxidation	-1,8
U89905	R	alpha-methylacyl-CoA racemase;	Gallensäuresynthese und verzweigtkettigen FS Abbau	-1,5
M77479	R	sodium/bile acid cotransporter	Gallensäuretransport	-1,4
X95189	R	Trihydroxycoprostanoyl-CoA Oxidase.	Gallensäureabbau	5,1
M29249	R	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase	Cholesterinsynthese	-1,5
AF180334	R	3alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase gene	Androgenaktionsbeendigung	-1,8
X91234	R	17-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2.	Bioaktivitätsregulation der Sexhormone	-1,6
U22424	R	11-beta-hydroxylsteroid dehydrogenase type 2	Glucocorticoidinaktivierung	-1,5
M88592	R	peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)	Nukleärer Steroidrezeptor	-2,3
AJ005837	R	putative progesterone binding protein.	Hormonwirkungs - Vermittlung	-1,4
Fremdstoffstoffwechsel Stressantwort				
AF110477	R	liver aldehyde oxidase (AOX1)	Biotransformation Phase I	-2,1
AF110477	P	Liver aldehyde oxidase	Biotransformation, Phase I	-1,6
M73714	R	microsomal aldehyde dehydrogenase	Biotransformation, Phase I	-1,6
M10068	R	NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase	Biotransformation Phase I	-1,3
D00636	R	NADH-cytochrome b5 reductase	Biotransformation Phase I	-1,4
M12516	A	NADPH-cytochrome P450 reductase	Biotransformation Phase I	-2,1
U04733	R	cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase (cyp 2C23)	Biotransformation Phase I	-1,7
X55446	A	Cytochrome P450 (CYP2C23)	Biotransformation Phase I	-1,8
M031839	P	Arachidonic acid epoxygenase	Biotransformation Phase I	-1,5
NM016999	P	Cytochrome P450 (CYP4b1)	Biotransformation Phase I	-1,8
M33936	R	Cyp4a locus, encoding cytochrome P450 (IVA3);	Biotransformation Phase I	-2,1
M33936	A	Cytochrome P450 (CYPIVA3)	Biotransformation Phase I	-2,1
M26125	R	epoxide hydrolase; epoxide hydrolase.	Biotransformation Phase I	-1,4
K02246	R	cytochrome P-450c (methylcholanthrene-inducible)	Biotransformation Phase I	-1,4
K02422	R	cytochrome P-450d methylcholanthrene-inducible gene.	Biotransformation Phase I	-1,7
M58041	R	P49 cytochrome P450	Biotransformation Phase I	-1,7
M38566	R	mitochondrial cytochrome P450 (P450C27)	Biotransformation Phase I	-1,4
U39206	R	cytochrome P450 4F4 (CYP4F4);	Biotransformation Phase I	-1,5
K03501	R	cytochrome P450 PB1 (PB1-2 allele);	Biotransformation Phase I	-2,0
AB008424	R	CYP2D3; CYP2D cytochrome P450 isoform.	Biotransformation Phase I	-1,4

Genidentifikation	System	Kodiertes Protein *	Funktion	D
U17375	R	cytochrome P-450c27/25 gene, exons 10 and 11.	Biotransformation Phase I	-1,3
X79991	R	CYP3	Biotransformation Phase I	-1,4
J03786	R	cytochrome P-450 (growth hormone-inducible)	Biotransformation Phase I	-2,5
J02669	R	cytochrome P-450a	Biotransformation Phase I	-1,4
M14972	R	cytochrome P-450-LA-omega	Biotransformation Phase I	-1,6
M13646	R	pregnenolone 16-alpha-carbonitrile-inducible cytochrome P450	Biotransformation Phase I	-1,4
J05509	R	cytochrome P450 cholesterol 7-alpha-hydroxylase (P450 VII)	Biotransformation Phase I	-1,5
J02589	R	UDP glucuronosyltransferase	Biotransformation Phase II	2,4
D38065	R	UDP glucuronosyltransferase	Biotransformation Phase II	-1,7
NM031533	P	UDP-glucuronosyltransferase	Biotransformation, Phase II	4,2
D14989	P	Tyrosine sulfotransferase	Biotransformation, Phase II	-1,6
L32132	R	lipopolysaccharide binding protein	Akutphase Antwort	-1,6
M11884	R	LMW K-kininogen precursor.	Akutphase Antwort	-1,6
M22359	R	plasma proteinase inhibitor alpha-1-inhibitor III	Akutphase Antwort	-1,5
J03552	A	Plasma proteinase inhibitor	Akutphase Antwort	2
X67654	R	glutathione-S-transferase.	Stressantwort	1,7
X67654	A	Glutathione transferase subunit 5 theta	Stressantwort	3,8
**	P	Similar to glutathione-S-transferaseP	Stressantwort	2,2
M21210	R	glutathione peroxidase (GSH-PO)	Stressantwort	1,8
NM030826	P	Glutathione peroxidase 1	Stressantwort	1,8
S81478	R	oxidative stress-inducible protein tyrosine	Stressantwort	-1,6
AB008807	R	glutathione-dependent dehydroascorbate reductase	Biotransformation	-1,5
AF151377	R	pregnane X receptor	nukleärer Receptor Biotransformation	-1,5
K01929	R	liver catalasem clone pMJ501.	Fremdstoffwechsel	-1,7
M11794	R	metallothionein-2 and metallothionein-1	Multifunktionsprotein	-3,7
M11794	R	metallothionein-2 and metallothionein-1	Multifunktionsprotein	-
M11794	P	Metallothionein	Multifunktionsprotein	-
Kohlenhydratstoffwechsel				
L04796	R	glucagon receptor; hepatic receptor related to glucagon-like peptide (GLP-1) receptor.	Blutzuckerregulation	1,7
K03248	R	phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene,	Glukoneogenese	-1,9
J03145	R	glucose transporter; glucose transporter.	KH-Aufnahme	-1,9
U09256	R	Transketolase	Monomerumbau	1,4
X68497	R	glucokinase regulator.	Glucoseumsatz	2,4
NM013098	P	Glucose-6-phosphatase	Glucosefreisetzung	-1,8
D78592	R	glucose-6-phosphatase catalytic subunit	Glucosefreisetzung	-1,5
X16481	R	zinc(2+) binding protein.	Zn-abhängige Inaktivierung der Phosphofruktokinase	5,3
L05541	P	Galactose-1-phosphate uridyl	Gal-Glu Interkonversion	1,7

Genidentifikation	System	Kodiertes Protein *	Funktion	D
		transferase		
Stickstoffmetabolismus				
J04733	P	Acyl-peptide hydrolase	Proteinabbau	-5,3
J04733	R	Acyl-peptide hydrolase	Proteinabbau	-1,4
AF095740	P	Ubiquitin-like protein	Proteinabbau	1,8
D10756	R	proteasome subunit R-ZETA	Proteinabbau	-1,4
M36320	A	Cathepsin H	Proteinabbau	1,8
D00252	P	Cytosolic aspartate aminotransferase	Proteinabbau	-1,6
X06357	R	serine pyruvate aminotransferase	Transaminierung	3,2
AJ010709	R	gene encoding tyrosine aminotransferase.	Transaminierung	-2,2
AF165887	R	cytosolic branch chain aminotransferase BCAT	Verzweigt-kettige AS Transaminierung	-4,7
X06150	R	glycine methyltransferase	AS Modifizierung	2,0
K02599	R	Phenylalanine hydroxylase	AS Synthese (Tyrosin)	-1,6
NM030850	P	Betaine-homocysteine methyltransferase	AS Synthese	1,7
AF038870	R	betaine homocysteine methyltransferase (BHMT)	AS Synthese	1,6
U68168	R	L-kynurenine hydrolase; kynureninase.	Ala Synthese Trp Abbau	6,5
X15734	R	s-adenosylmethionine synthetase	Homocysteinsynthese	-1,8
AB052882	R	CSE cystathionine gamma-lyase	AS Abbau Methionin	1,9
NM017074	P	Probasin-related antigen	AS Abbau Methionin	2,3
Y00752	P	Serine dehydratase	AS-Abbau	-1,9
Y00752	R	Serine dehydratase	AS-Abbau	-1,2
M58308	R	Histidase	AS-Abbau Desaminierung	2,4
AF295535	R	amino acid transport system A3 (Ata3)	AS-Aufnahme	-1,3
S57565	R	histamine H2-receptor [Genomic, 1928 nt];	Biogene Amine	-1,8
M12335	R	nucleus-encoded mit. carbamyl phosphate synthetase I	Harnstoffcyclus	-1,5
AF042167	R	urea transporter UT-A4	Harnstofftransport	-1,6
AB032766	R	Legumain	Lysosomale Endopeptidase	-1,4
Signaltransduktion/ Trafficking				
S45392	R	heat shock protein 90	Faltung	-1,5
M11942	R	70 kd heat-shock-like protein	Faltung	-1,7
X92097	R	transmembrane protein rnp21.4	Trafficking (Vesikel)	-1,4
AF041373	R	clathrin assembly protein short form (CALM);	Trafficking	-1,5
U05334	R	rap7a	IZ Trafficking	-1,4
X74401	R	rab GDI beta	IZ Trafficking Vesikel	-2,4
L20823	A	Syntaxin 2	IZ Trafficking	-2,8
L20821	A	Syntaxin 4	IZ Trafficking	-2,1
M27925	A	Synapsin II	IZ Trafficking	-3,1
AJ238236	R	ribosome associated membrane protein RAMP4.	Trafficking	-1,7
M96377	R	neurexin II-beta-a	Signaltransduktion	-1,5
U03629	A	Arrestin D	Signaltransduktion	-2,0
AF026472	R	guanine aminohydrolase GAH	Signaltransduktion	-1,5
U09402	A	P2U purinoreceptor 1	Signaltransduktion	-1,9
U47287	P	Prostaglandin F2 alpha-receptor	Signaltransduktion	1,9
L26173	A	B2 bradykinin receptor	Signaltransduktion	2,3
U71089	R	CXC chemokine receptor1-like protein (CXCR1)	Signaltransduktion	-1,6

Genidentifikation	System	Kodiertes Protein *	Funktion	D
U65417	A	G protein coupled receptor	Signaltransduktion	2,7
L19699	R	GTP-binding protein (ral B)	Signaltransduktion	-2,3
U53710	R	GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein; GFRP.	Signaltransduktion	1,8
D89373	R	DNA for protein tyrosine phosphatase epsilon	Signaltransduktion	-1,6
D44481	R	CRK-II	Signaltransduktion	1,8
U73503	R	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II	Signaltransduktion	-1,6
D30041	R	RAC protein kinase beta	Signaltransduktion	-1,5
D78588	R	diacylglycerol kinase	Signaltransduktion	3,5
U95157	R	ryanodine receptor type II (RATRYR2) partial cds.	Regulation der Ca-Ausschüttung	1,9
X94186	R	dual specificity phosphatase	Inhibitor von MAP Kinasenaktivität	-1,8
M55636	R	heat-stable enterotoxin receptor	Rezeptor für natriuretisches Peptid	-1,5
AB023624	R	SCOP	Intrazelluläres <i>Signaling</i>	-1,6
U20906	R	5-HT4S receptor	Signaltransduktion (neural)	1,8
Struktur				
X78949	P	Prolyl 4-hydroxylase	Kollagensynthese	1,6
AJ005395	R	collagen alpha 1 type III.	EZ Struktur	-1,4
S67621	R	collagen alpha 1(IX)	EZ Struktur	-1,5
M69246	R	collagen-binding protein (gp46)	EZ Struktur	-1,5
L29191	R	fibronectin	Strukturglykoprotein/Chemotaxis	-1,4
D28875	R	Osteonectin	Strukturglykoprotein	-1,4
V01226	R	alpha-tubulin; alpha-tubulin.	Cytoskelett IZ Mikrotubulstruktur	1,7
AF084186	R	alpha-fodrin (A2A)	Neuronales Zytoskelettprotein	3,3
M63482	R	cytokeratin 8 polypeptide	Struktur	1,8
AJ011656	R	cldn3 gene.	Tight junction-Strukturprotein	-1,8
Y00169	R	TM-4 fibroblast tropomyosin 4.	Nichtmuskläres Strukturprotein	-1,6
Transkription				
U94858	R	poly A binding protein	Transkriptionskontrolle	1,9
U78134	R	zinc finger protein 6 (DZF6) partial cds.	Transkriptionskontrolle	-1,6
U78142	R	zinc finger protein 14 (DZF14) partial cds.	Transkriptionskontrolle	-1,7
AF054586	R	brain finger protein (BFP); BFP; RING finger protein	Transkriptionskontrolle	-1,6
J03179	R	D-binding protein; D-binding protein.	Transkriptionskontrolle	-1,9
L13202	R	HNF-3/fork-head homolog-2 (HFH-2)	Transkriptionskontrolle	-2,9
X84210	R	transcription factor NF1 (L4).	Transkriptionskontrolle	-1,4
U17253	P	Transcriptional repressor NAB1	Transkriptionskontrolle	-1,6
M72711	R	transcriptional repressor of myelin-specific genes (SCIP)	Transkriptionskontrolle	-1,6
S58745	R	thyrotroph embryonic factor	Transkriptionskontrolle	2,7
AB012230	R	NF1-B1, partial cds.	Transkriptionskontrolle	1,6
**	P	Similar to KRAB-A interacting protein	Transkriptionskontrolle	1,6
M88592	P	peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)	Transkriptionskontrolle	-1,7
D84418	R	chromosomal protein HMG2	Unspez. Transkriptionskontrolle	1,7
Translation				
X04809	R	ribosomal protein L31	Translation	-1,4
K02932	R	ribosomal protein L30; ribosomal protein L30.	Translation	-1,3
X14671	R	liver ribosomal protein L26; rpl	Translation	-1,4

Genidentifikation	System	Kodiertes Protein *	Funktion	D
		26 (AA 1-145).		
D25224	R	40kDa ribosomal protein	Translation	1,6
X02414	R	ribosomal protein S26; ribosomal protein S26.	Translation	-1,4
X62145	R	ribosomal protein L8.	Translation	-1,3
U92696	R	ribosomal protein S2	Translation	-1,4
Energiemetabolismus				
K00750	R	cytochrome c	e ⁻ -Transfer Atmungskettenprotein	1,4
D13127	P	F0F1-ATP Synthase (subunit c)	ATP Synthase	1,8
D13127	R	F0F1-ATP Synthase (subunit c)	ATP Synthase	1,5
**	P	Similar NADPH Ubiquinone	ATP Synthase	1,7
M22030	R	electron transfer flavoprotein (ETF)	ATP Synthase	-1,5
J03621	R	mitochondrial succinyl-CoA synthetase alpha subunit (cytoplasmic precursor)	Zitratzyklus	-1,3
M14400		Brain Creatine kinase	Energietransfer	-1,4
X59737	A	Creatinekinase, mitochondrial	Energietransfer	-1,6
M54926	R	lactate dehydrogenase	Laktatsynthese	1,7
Nukleinsäurestoffwechsel				
D44495	A	AP endonuclease	DNA Reparatur	1,8
Z34922	P	Nap57	rRNA Biogenese	1,7
X16554	R	PRPSI phosphoribosylpyrophosphate synthetase	Purinbiosynthese	2,2
J05579	R	xanthine dehydrogenase	Purinabbau	-1,6
AF041066	R	ribonuclease 4	Pyrimidinspez. Ribonuklease	-1,6
AJ010934	R	ddx5 gene	RNA Helikase	-1,4
M93401	R	methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	Pyrimidinabbau	-1,6
Andere				
J03190	P	5-Aminolevulinat synthase	Porphyrinsynthese	-2,3
J03190	R	5-aminolevulinat synthase	Porphyrinsynthese	-2,2
L33869	A	Ceruloplasmin	Fe(II) Oxidation	2,1
M18053	R	ferritin heavy subunit.	Fe(III)Speicherung	1,4
AF344185	R	prohepcidin (Hepc).	Regulator für Eisenhomöostase	2,2
AF203698	R	T calcium channel alpha1G subunit (Cacna1g)	Neuronale Reizleitung	-1,7
M59980	A	Voltage gated K ⁺ channel protein	Membranpotential	-3,3
NM031818	P	Chloride ion channel p64h1	IZ Ionenkanal	1,7
AF000973	R	calcium-activated potassium channel (rSK1)	Reizweiterleitung	-1,5
AB013453	R	NaPi-2 alpha	Phosphattransport	-1,8
D14437	R	calponin; aorta calponin.	Ca(2+)-Calmodulin-Bindungsprotein	-2,6
AF268468	R	voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2)	Mitoch. Anionen-Transporter	2,27
L34666	R	H ⁺ /K ⁺ -ATPase beta subunit (HKB) gene, exon 7	Kalium-Transport	-1,9
AF239219	R	prostaglandin transporter subtype 2 (Pgt2)	Prostaglandintransport	-1,9
D16339	R	alpha-tocopherol transfer protein	Vit E-Transport	-1,7
U33500	R	retinol dehydrogenase type II	Vitamin A Speicherung	-1,5
M20373	A	Neuropeptide Y	Nahrungsaufnahme	-1,9
NM022220	P	L-Gulono-gamma-lactone oxidase	L-Ascorbinsäuresynthese	1,6
AF080453	R	sodium-coupled ascorbic acid	Ascorbinsäureaufnahme	4,6

Genidentifikation	System	Kodiertes Protein *	Funktion	D
		transporter		
NM024143	P	Bile acid CoA ligase	Divalent Kationen abhängig Gallensäurekonjugation	2,0
M15327	A	Alcohol dehydrogenase A subunit	Ethanolmetabolismus	-1,9
X52196	R	five-lipoxygenase activating protein (FLAP).	Leukotriensynthese	-2,2
AF087943	R	CD14	LPS-Erkennung Differenzierungsantigen	-1,6
M22899	A	Interleukin 2	Cytokine	-4,6
AF154569	R	interleukin 18 binding protein (Il18bp)	IL-18 Inhibitor	-1,8
AF335281	R	tumor suppressor pHyde	Apoptoseinduktor	-2,2
M31591	R	follistatin gene	FSH Sekretionshemmer	-4,8
AF170918	R	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase.	Caritinbiosynthese	-1,6
U49071	R	complement component C9 precursor	Komplementsystem	-1,6
D42116	R	5I2 antigen, clone 17, partial cds.	Komplementsystem	2,1
L08134	R	proline-rich glycoprotein (sgp158) gene	Komplementsystem	-1,4
L17318	R	Prolin-rich proteoglycan (PRPG2)	EZ Matrix	-1,5
U96637	R	Eotaxin	Chemokin	-2,0
D17809	R	beta-4N-acetylgalactosaminyltransferase	Gangliosidbiosynthese	-1,4
AF185570	R	putative N-acetyltransferase Camello 4 (cml 4)	Keimblattbildung	-2,3
S73424	R	MIF=macrophage migration inhibitory factor	GSH-Bindungsaktivität	-1,5
L34049	R	Megalin	LDL-Rezeptor Protein	-1,6
S65555	R	gamma-glutamylcysteine synthetase light chain	GSH-Synthese	-1,9
Y10019	R	DRM protein	Zellwachstumskontrolle	-1,6
AF136230	R	bcl-x short	Apoptosefaktor	-1,3
M60786	R	endothelin receptor	Vasokonstriktor	-1,4
D00753	R	contrapsin-like protease inhibitor related protein	Proteaseinhibitor	-1,7
AF226608	R	prolactin-like protein M; PLP-M.	GH-ähnlich	-2,0
AF154831	R	PV-1; gp68.	Endotheliales Caveolarprotein	-1,8
AF010444	R	MARRLC9A partial cds.	-	-1,5
D55648	R	T-cell receptor gamma chain	Immunantwort	-3,0
Y11283	R	plasma protein.	Inter- α -Inhibitor, Blutbestandteil	-1,4
AB033771	R	SUP	-	-1,5
L41684	R	(clone REM2) ORF partial cds; ORF.	Reaktiv auf Autoantikörper	1,6
L37380	R	apical endosomal glycoprotein	Rezeptor- <i>Sorting</i>	-1,7
U33472	R	type 1 astrocyte and olfactory- limbic associated protein	Überlebensfaktor dopaminerger Neuronen	-1,9
U81295	R	ecto-apyrase; CD39.	EZ Nukleosiddiphosphat- degradation	-2,1
AF031880	R	light molecular-weight neurofilament (NF-L)	Cytoskelettkomponente (Axon)	1,7

Die vielen identifizierten Zielsequenzen machen den massiven Einfluß deutlich, den ein Zinkmangel auf die Leber hat. Von der Regulation betroffene Gengruppen sind vorwiegend der Wachstumsregulation (27), Lipidmetabolismus (37), Fremdstoffstoffwechsel und Stressantwort (43), Kohlenhydratstoffwechsel (9), Stickstoffmetabolismus (23), Signaltransduktion und intrazellulärem *Trafficking* (30), Strukturgebung (11), Transkriptionskontrolle (14), Translation (7), Energiemetabolismus (9) und Nukleinsäurestoffwechsel (7) zuzuordnen. Diese Klassen umfassten 80 % der identifizierten Gene, darunter auch das bekannte zink-sensitive Metallothionein-Gen. Die Regulation im Zinkmangel ist ebenso für 54 Gene nachgewiesen, die nicht in eine der Gruppen eingeordnet werden können, einschließlich Genen des Eisenstoffwechsels, der unspezifischen Immunabwehr, der Apoptosekontrolle und anderer Funktionen.

4.2.2.2 Beeinflussung des Transkriptoms des Gehirns im Zinkmangel

Für die Untersuchung der mRNA-Spiegel im Rattenhirn wurden mit dem Einsatz der Oligonukleotid-Arrays 5K Rat Pan (MWG Biotech) auf Glaträgern und der cDNA Rat 1.2 Atlas Array (Clontech) auf Nylonmembranen ein ähnliches Versuchsdesign wie bei der Analyse des Lebergewebes gewählt. Die Untersuchung der Genexpression im Gehirn beinhaltete damit etwa 6000 Zielsequenzen.

Der Expressionsanalyse nach unterlagen 99,4 % der untersuchten Zielsequenzen im Gehirn keiner Regulation durch den Zinkversorgungszustand. Nur 36 im Zinkmangel veränderte Kandidatengene, was 0,6 % der untersuchten Zielsequenzen entspricht (Tab. 4.2), wurden identifiziert. Von diesen wiesen 11 % (4 von 36) eine erhöhte, 89 % eine verminderte Expression im Zinkmangel auf. Es zeigte sich, dass 9 der 36 Kandidatengene des Gehirns auch in der Leber reguliert werden. In Übereinstimmung mit den Leberdaten wurden Metallothionein (M11794), die dual-spezifische Phosphatase (X94186), das plazentale Präprowachstumshormon-Ausschüttungshormon (U41183), das Zinkfingerprotein 14 (U78142), die 11-beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2 (U22424), der transformierende Wachstumsfaktor beta-2 (M96643), und cMG1 Protein (X52590) im Zinkmangel herabreguliert, während für das Fettsäurebindungsprotein (U02096) und der G Protein-gekoppelte Rezeptor (U65417), im Gegensatz zur Hochregulation in der Leber, im Gehirn eine verminderte Expression dokumentiert wurde. Eine Einteilung in funktionelle Gruppen wurde aufgrund der geringen Zahl an Kandidatengenen nicht vorgenommen.

Tab. 4.2: Veränderung der Transkriptmenge in Hirngewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten in Abhängigkeit von der Zinkversorgung untersucht mittels DNA-Arrays. Zusammenstellung aus dem Screening der zwei eingesetzten Array-Systeme (A = Atlas Rat 1.2 Array mit ³²P-dATP-Markierung; n=3, Einzeltier- und gepoolte RNA-Proben mit je 50 µg Gesamt-RNA), R= Pan Rat 5K Array mit Cy-dCTP-Markierung (n=5, gepoolte RNA-Proben mit je 100 µg-Gesamt-RNA). D=x-fache Veränderung im Zinkmangel (Zn-/Zn+) als Mittelwert aller durchgeführten Einzelversuche. GH = Wachstumshormon, IGF = Insulin-like growth factor, IZ= intrazellulär, EZ = extrazellulär; * Namen werden in Anlehnung an die Bezeichnung in der Datenbank in der Tabelle in englischer Sprache beibehalten

Gen-ID	Array	Kodiertes Protein*	Funktion	D
U41183	R	placental pre-progrowth hormone-releasing hormone (GHRH)	GH-IGF-Achse	-1,5
L29232	R	insulin-like growth factor I receptor	GH-IGF-Achse	-1,4
AF259981	R	CCN family protein COP-1 (Cop-1)	Cysteinreicher Wachstumsregulator	-1,4
X52590	R	cMG1; cMG1 protein (AA 1-338).	Wachstumsfaktorwirkung	-1,4
AF051093	R	Bcl-2-related ovarian killer protein	Pro-apoptotisches bcl2 Protein	3,7
D63704	R	Dihydropyrimidinase	Pyrimidin Abbau	-1,4
D78610	R	protein tyrosine phosphatase ε C	IZ Signaltransduktion	-1,4
X94186	R	dual specificity phosphatase	IZ Signaltransduktion	-1,4
U51013	R	phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate binding protein.	Signaltransduktion	1,7
M96643	R	transforming growth factor beta-2 partial cds.	Zell-Zell Signaling	-1,3
U65417	A	G protein-coupled receptor	Signaltransduktion	-2,9
M14053	A	Glucocorticoid receptor	Hormonwirkungsvermittlung	-4,5
U04740	A	Platelet activating factor receptor	Signaltransduktion	-2,7
L19931	A	Amphotropic murine retrovirus receptor ram1	Signaltransduktion	-2,6
U59672	A	5-OH Tryptamine 3 receptor	Serotoninwirkung (Ionenkanal)	-2,3
M55050	A	Interleukin 2 Receptor	Zytokinwirkung	-3,3
J04488	R	prostaglandin D synthetase	Prostaglandinsynthese	-1,4
X52619	R	ribosomal protein L28	Ribosom	-1,3
M11794	R	metallothionein-1 and -2	Stressantwort, u.a.	-1,5
AJ006695	R	apobec-1 gene downstream located promoter region	Posttranskriptionaler Basenaustausch	-1,5
U78142	R	zinc finger protein 14 (DZF14) partial cds.	Transkription	-1,4
M36461	R	delayed-rectifier-type K+ channel	K ⁺ -Transport	-1,3
M22253	A	Na Channel I	Na ⁺ -Transport	-2,3
U39555	A	EAAC1 glutamate transporter	Glutamat-Transport	-3,8
M85301	R	sodium-hydrogen exchange protein-isoform 4 (NHE -4)	Na ⁺ /H ⁺ Austauscher	-1,6
M85300	R	sodium-hydrogen exchange protein-isoform 3 (NHE -3)	Na ⁺ /H ⁺ Austauscher	-1,4
U02096	R	fatty acid binding protein	Fettsäure-Trafficking	-1,3
X55572	R	Apo D	Lipoproteinmetabolismus	-1,5
U22424	R	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2	Synthese lipophiler Hormone	-1,3
U27562	R	SC1 protein; neural ECM molecule	EZ Matrix Glycoprotein	-1,3
X07686	R	L1Rn B6 repetitive DNA element; ORFI (1857 is 2nd base in codon).	Funktion. Komponente des Genoms	-1,7
X53581	R	long interspersed repetitive DNA	Funktion. Komponente des Genoms	-1,5
M13100	R	long interspersed repetitive DNA sequence LINE3	Funktion. Komponente des Genoms	-1,4
S62903	R	genetic hypertension component (SA) partial cds;	Blutdruckregulation (genetisch)	-1,3
J03823	A	Mas 1 proto-oncogene	Zell. Onkogenprodukt	1,9
S68987	A	Set β isoform	Leukämogenese	2,2

4.2.2.3 Vergleich der Expressionmuster von Leber und Gehirn

Die Ergebnisse der *Arrayscreenings* von Leber- und Hirngewebe unterschieden sich in der Anzahl der regulierten Gene stark. Deshalb wurde unter Vernachlässigung der zink-sensitiven Veränderungen das Expressionsmuster der beiden Gewebe weiter mittels des Pan-5K *Array*-Formats analysiert, um eine unterschiedlich hohe Anzahl exprimierter Gene auszuschließen.

Abbildung 4.21 zeigt die Muster der hybridisierten 5K *Chips* in Falschfarbendarstellung. Bereits visuell ist ein deutlicher Musterunterschied zu erkennen.

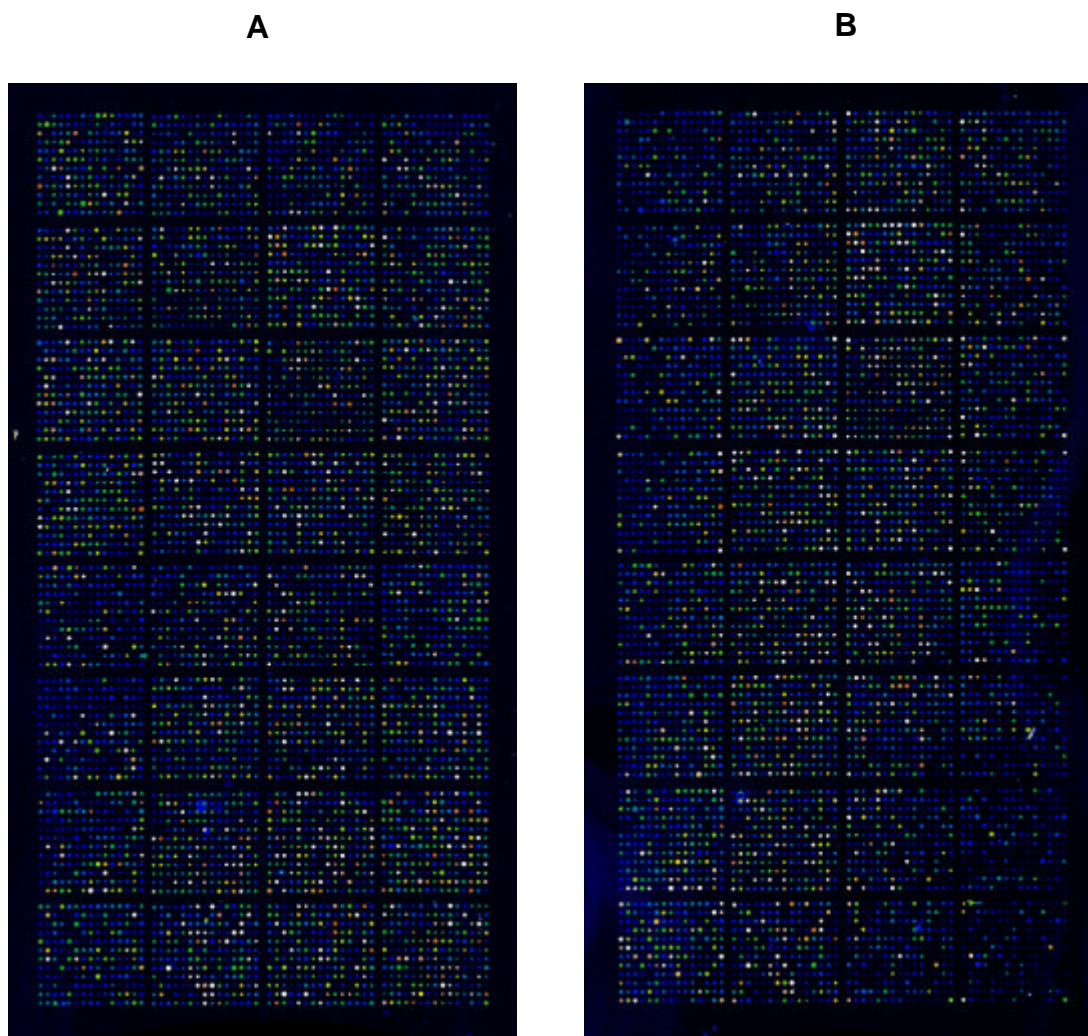


Abb. 4.21: *Expressionsmuster von (A) Leber und (B) Gehirn (Ratte) der 5260 Zielsequenzen des 5K Pan Rat Arrays. Hybridisiert wurden je Cy5-dCTP markierte cDNA aus 100 µg Gesamt-RNA von Rattenleber und Rattenhirn der Kontrolltiere.*

Von 5260 untersuchten Zielsequenzen (ohne Replika und Leerwerte) auf dem 5K Pan Rat Array wurden in der Leber 61,1% (absolut = 3319) und im Gehirn 65 % (absolut = 3543) über der Nachweisgrenze detektiert. Der Vergleich der Expression von Rattenhirn und Leber zeigt, dass 2239 (fast 50 %) gleiche Gene exprimiert wurden. Unterschiede in der Expression lagen bei 804 hirnspezifisch und 580 leber-spezifisch exprimierten Genen vor. Rund 2/5, d.h. 2217 bzw. 2441 Gene des eingesetzten Arrays waren in Gehirn bzw. Leber nicht detektierbar. Abbildung 4.22 zeigt die prozentuale Verteilung der gewebespezifischen Expression auf dem 5K Rat Array.

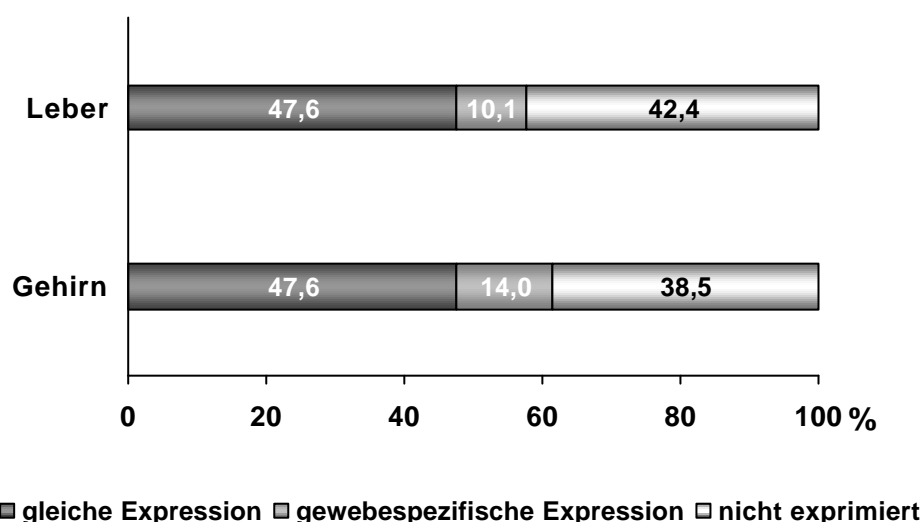


Abb. 4.22: Gewebespezifische Genexpression in Leber und Gehirn (Ratte) von 5260 Zielsequenzen auf dem 5K Pan Rat Array in Kontrolltieren; prozentuale Darstellung von in Leber- und Hirngewebe gleich exprimierten, unterschiedlich exprimierten oder nicht exprimierten Transkripten

Der Vergleich der Expressionmuster zeigt, dass die im Zinkmangel quantitativ weniger ausgeprägte Regulation im Rattenhirn nicht auf eine verminderte Anzahl detektierbarer Zielsequenzen durch die Array-Auswahl zurückzuführen ist. Es wurde vielmehr bei hybridisierter Gehirn-cDNA ein leicht höherer Anteil der Zielsequenzen (3,9%) über der Detektionsgrenze vorgefunden.

4.2.3 Screening mit 2D-Gelelektrophorese

Zur Ergänzung und möglicherweise auch zur Bestätigung der Genregulation wurde neben der Transkriptomanalyse auch eine Proteomanalyse der Rattenleber mittels 2D-Elektrophorese und MALDI-TOF-MS-Analyse durchgeführt.

4.2.3.1 Ermittlung proteinchemischer Eigenschaften und Molekulargewicht

Anhand des Molekulargewichts und des isoelektrischen Punktes der Proteine deren Transkriptmenge zinkabhängig verändert war, wurde eine Abschätzung der pH-Bereiche vorgenommen, in denen die Proteintrennung erfolgen müsste (Tab. 4.3), um diese Proteine im Gel zu identifizieren. Der minimale berechnete isoelektrische Punkt lag bei 4,8, das Maximum bei 9,8. Innerhalb der ausgewählten Kandidatengenprodukte zeigte sich eine Häufung mit vorhergesagtem isoelektrischem Punkt im pH-Bereich von 6-7 (10 Kandidaten) und im basischen pH-Bereich von 8-9 (9 Kandidaten). Deshalb wurde im ersten Ansatz eine Auftrennung im pH-Bereich 3-11 durchgeführt.

Tab. 4.3: *Theoretisches Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt* der korrespondierenden Proteine von auf mRNA-Ebene identifizierten und regulierten Transkripte, * Namen werden in Anlehnung an die Bezeichnung in der Datenbank in der Tabelle in englischer Sprache beibehalten; Berechnung erfolgte nach: http://us.expasy.org/cgi-bin/pi_tool; MW = Molekulargewicht

GenBank Nr.	Kodiertes Protein*	iP	Errechnetes MW (kDa)
M15650	IGF I	9,2	20,32
M89791	IGF-binding protein 1	5,7	29,79
J04486	IGF-binding protein 2	7,5	32,88
S46785	IGF-binding protein, acid-labile SU	6,0	66,81
M37394	EGF-Receptor	6,7	134,89
J02998	Ras-related protein	6,0	22,76
NM021653	Thyroxine deiodinase type I	9,3	29,70
AF171640	Carboxylesterase	6,2	62,13
D63885	Lysophospholipase	6,0	24,71
M32801	3-keto thiolase acyl-CoA	8,3	44,78
D00729	$\Delta 2 \Delta 3$ enoyl CoA Isomerase	9,8	32,89
NM130433	Acetyl-CoA acyltransferase 2	8,1	41,87
NM053674	Phytanoyl-CoA hydroxylase	8,8	38,59

GenBank Nr.	Kodiertes Protein*	iP	Errechnetes MW (kDa)
D90109	Long-chain acyl-CoA synthetase	6,6	78,18
D16102	Glycerol kinase	5,5	57,48
K01934	Lipogenic factor (S14 gene)	4,8	17,01
U89529	Fatty acid transporter	8,8	71,28
X67654	Glutathione transferase SU 5 theta	7,1	27,47
NM016999	Cytochrome P450 (CYP4b1)	9,2	58,21
M33936	Cytochrome P450 (CYP1VA3)	9,2	58,23
X55446	Cytochrome P450 (CYP2C23)	8,3	56,49
M031839	Arachidonic acid epoxygenase	8,3	56,49
M12516	NADPH-cytochrome P450 reductase	5,3	76,96
AF110477	Liver aldehyde oxidase	6,6	146,92
D14989	Tyrosine sulfotransferase	7,6	33,53
NM031533	UDP-glucuronosyltransferase	7,7	60,99
J04733	Acyl-peptide hydrolase	5,5	81,38
AF095740	Ubiquitin-like protein	6,6	8,97
Y00752	Serine dehydratase	7,0	34,47
D00252	Cyt. aspartate aminotransferase	6,7	46,43
L20821	Syntaxin 4	5,8	34,21
U03629	Arrestin D	6,9	7,75
M11794	Metallothionein	8,4	6,01
D44495	AP endonuclease	8,2	6,15
J03190	5-Aminolevulinat synthase	9,0	71,13
L33869	Ceruloplasmin	5,3	120,84
M20373	Neuropeptide Y	6,6	11,03
M15327	Alcohol dehydrogenase A subunit	8,5	39,65

4.2.3.2 Screening im pH-Bereich 3-11 (Erste Dimension)

Zur Analyse wurde von Lebergewebe verschiedener Tierpaare aus Zinkmangel- und Kontrollgruppen Gesamtprotein isoliert, mittels 2D-Elektrophorese aufgetrennt und mit kolloidaler Coomassie-Färbung detektiert. Regulierte Proteine wurden mit MALDI-TOF-MS-Analyse identifiziert. In paralleler Analyse wurden individuelle Tierpaare untersucht.

Die Detektion und Auswertung der Färbungsintensität bezogen auf das *Spot*-Volumen als Maß der Proteinmenge, ist anhand von drei als zink-sensitiv ermittelten Kandidaten exemplarisch dargestellt (Abb. 4.23).

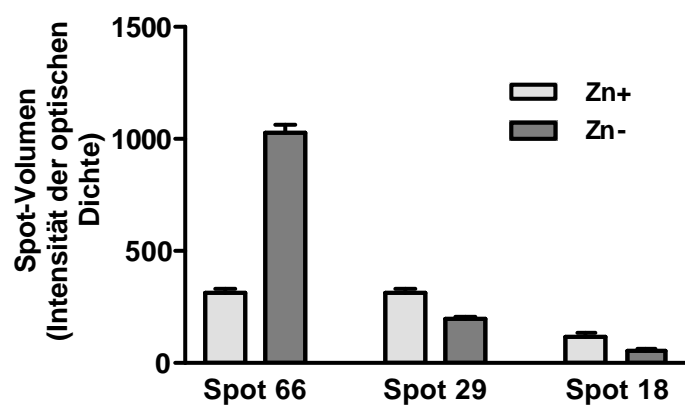
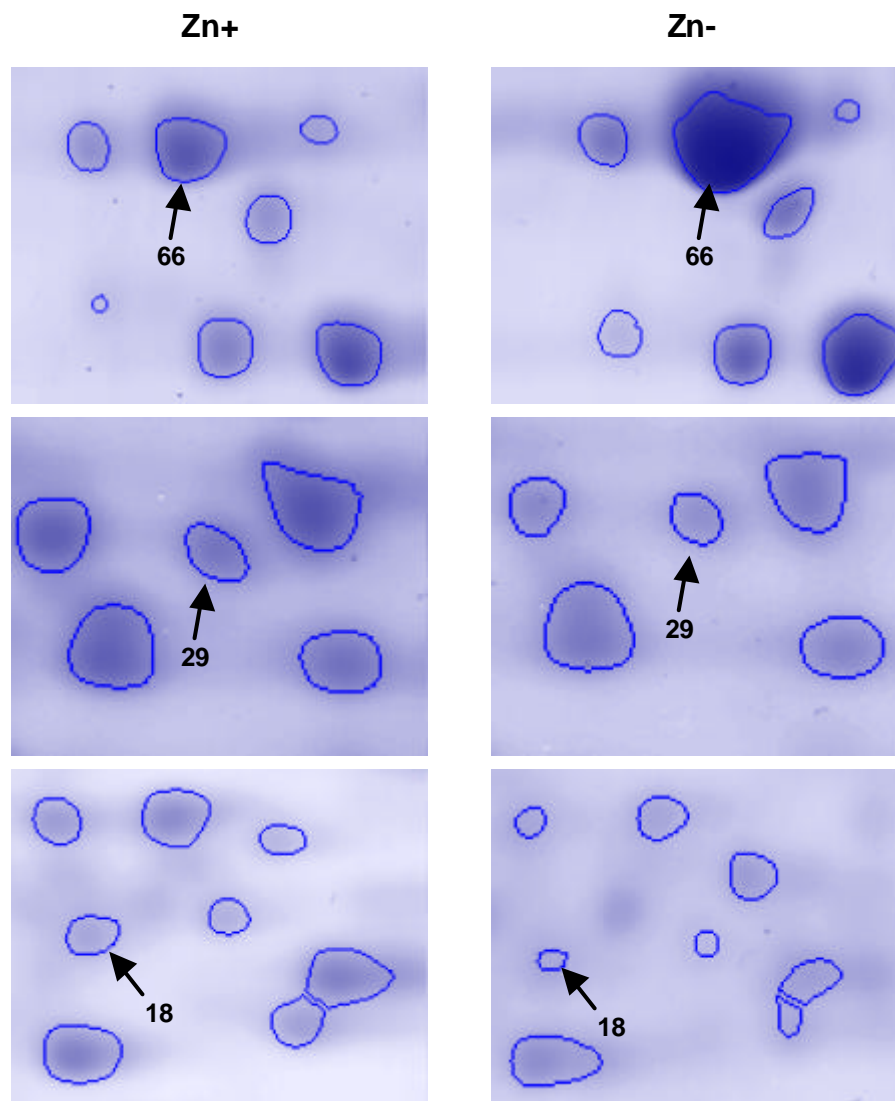


Abb. 4.23: Zinkabhängige Veränderung der Proteinexpression in Lebergewebe von Kontroll- (Zn+) und Zinkmangelratten (Zn-) ermittelt mit 2D-Elektrophorese dargestellt für die Spots 66, 29 und 18.; Links: Ausschnitte aus 2D-PAGE der Kontrolltiere, Rechts: Ausschnitte aus 2D-PAGE von Zinkmangeltieren; Detektion erfolgte mittels Coomassiefärbung und Image-Master Software (Amersham, Freiburg); Diagramm: Darstellung der Spotvolumina von Kontroll- und Zinkmangeltieren; Spot-Volumen als Mittelwert aller durchgeführten Einzelversuche.

In Abhängigkeit vom Zinkstatus wurden bei einer Auftrennung in erster Dimension im pH Bereich 3-11 siebzehn Proteine als reguliert detektiert, wovon 5 durch MALDI-TOF-MS-Analyse eindeutig identifiziert werden konnten (Tab 4.4 und Tab. 4.5).

Tab. 4.4: *Veränderung der Proteinexpression in Abhängigkeit von der Zinkversorgung in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten ermittelt mit 2D-Gelelektrophorese und anschließender MALDI-TOF-MS-Analyse nach Auftrennung in erster Dimension im pH-Bereich 3-11;(n=3)*

	Gesamt	im Zn-Mangel vermindert	im Zn-Mangel erhöht
zink-sensitive Proteine	17	15	2
mit MALDI-TOF-MS identifiziert	5	4	1

Die beobachtete Regulation im Zinkmangel bewegte sich in einem Rahmen von +3,28 für die Gluthathion-S-Transferase bis -2,52 für das salztolerante Protein (Tab. 4.5).

Tab. 4.5: *Proteine mit veränderter Expression in Abhängigkeit von der Zinkversorgung in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten ermittelt mit 2D-Elektrophorese und anschließender MALDI-TOF-MS-Analyse und Datenbankvergleich (Mascot); (n=3); 1. Dimension pH 3-11, je 300 µg Protein von Einzeltierpaaren wurden einer vergleichenden Analyse unterzogen; Detektion erfolgte mittels Coomassiefärbung; D = x-fache Volumenänderung (Zn-/Zn+) im Mangel als Mittelwert aller durchgeführten Einzelversuche. * Namen werden in Anlehnung an die Bezeichnung in der Datenbank in der Tabelle in englischer Sprache beibehalten*

Spot-Nr.	D	MW (kDa)	Ip	Protein ID	MALDI-TOF-MS-Analyse*
66	+3,28	30	8,8	AAA41287	Glutathion-S-transferase
18	-2,38	40	6,5	B O88453	Scaffold Attachment Factor
29	-2,50	37	6,9	Q9EPI7	Putative Mage-Like Protein
80	-2,27	31	7,6	D63761NID BAA23759	Prec. adrenodoxin reductase.
73	-2,52	100	7,8	JC5261	Salt-Tolerant Protein

Bei Einsatz eines pH-Gradienten von pH 3-11 in der ersten Dimension zeigte sich für den sauren Bereich eine schlechte Auftrennung und Fixierung der Proteine, was die geringe Anzahl detektierter und identifizierter Proteine bei dieser Vorgehensweise erklären kann. Im basischen pH-Bereich könnte es zu einer Anhäufung und möglicherweise auch Überlagerung gut fixierter Proteine gekommen sein, was Probleme bei der MALDI-TOF-MS-Analyse annehmen ließ. Um eine größere Fläche zur Auftrennung möglicher Kandidatenproteine zu erlangen, wurde die Trennung in der ersten Dimension deshalb in die Bereiche pH 4-7 und pH 6-11 vorgenommen.

4.2.3.3 Trennung in der ersten Dimension in pH-Bereich 4-7 und 6-11

Auch in dieser Versuchserie wurden die Proteinisolate individueller Tierpaare verglichen. Die 2D-Gele zeigen erwartungsgemäß eine geringere Zahl von sich überlagernden Protein-Spots. Die Protein-Spots erscheinen gut getrennt und scharf fixiert, sowohl für den niedrigen (Bereich pH 4-7) als auch für den höheren pH Bereich (6-11) (Abb. 4.24).

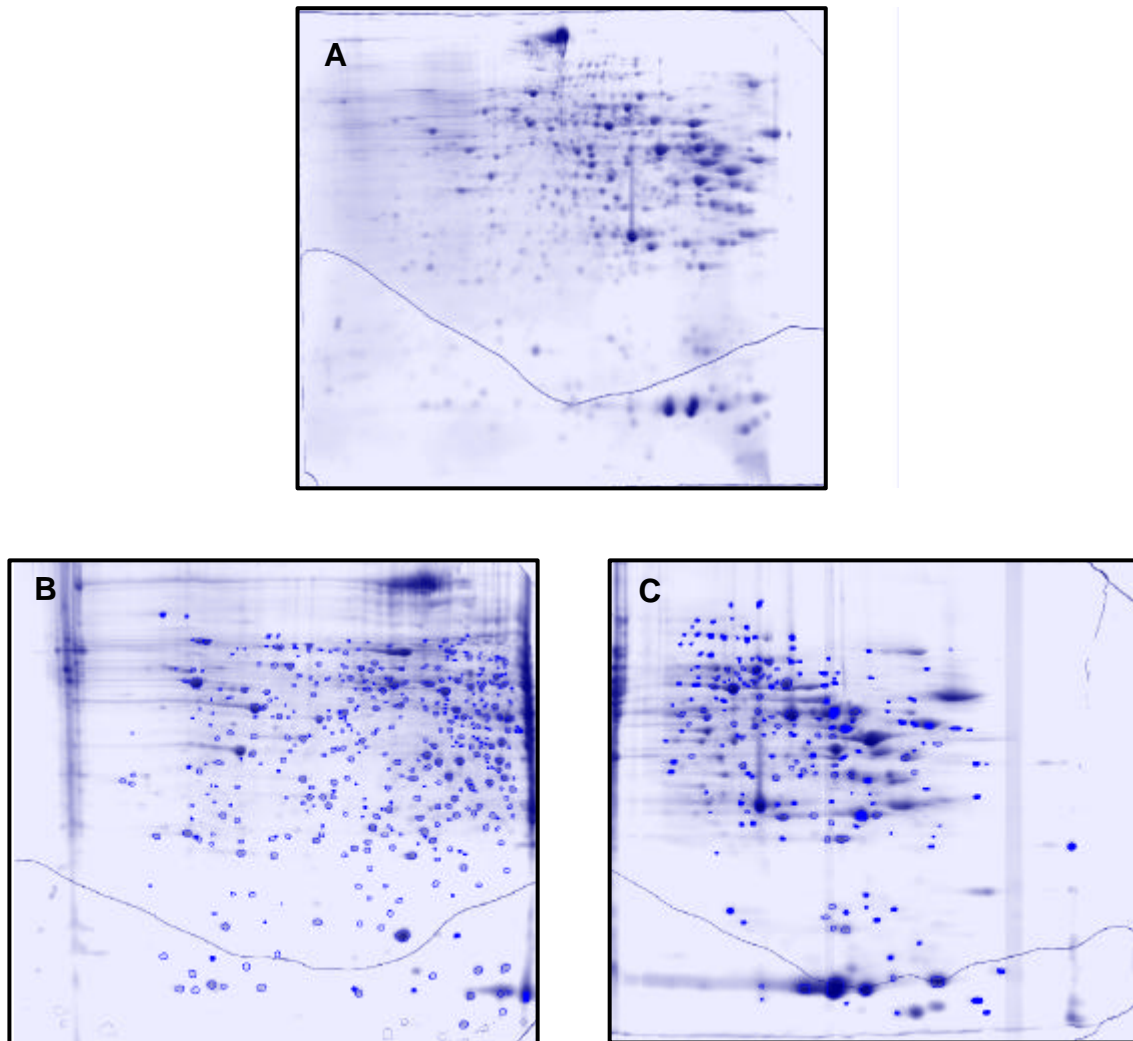


Abb. 4.24: *Proteinexpression in Lebergewebe von Kontrolltieren ermittelt mit 2D-Elektrophorese vor und nach Trennung des pH-Bereichs in der ersten Dimension. (A) pH-Bereich 3-11 (B) pH-Bereich 4-7 und (C) pH-Bereich 6-11. Auftragung: je 300 µg Protein, Detektion erfolgte mittels Coomassiefärbung und Image-Master Software (Amersham, Freiburg)*

Die Ausweitung der isoelektrischen Fokussierung auf eine größere Auftrennungslänge erhöhte die Anzahl der als im Zinkmangel reguliert detektierbaren Proteine auf insgesamt 158. Es wurden 94 Proteine mit einem IP im Bereich pH 4-7 bzw. 64 im Bereich pH 6-11 vorgefunden (Tab. 4.6). Generell zeigte sich in Übereinstimmung mit der *Array*-Analyse für die Reaktion des Lebergewebes im Zinkmangel auch auf Proteinebene für die Mehrzahl der Gene/Proteine ein verminderter „*steady state level*“.

Tab. 4.6: *Veränderung der Proteinexpression in Abhängigkeit von der Zinkversorgung in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten nach Aufteilung des pH-Bereichs der ersten Dimension* ermittelt mit 2D-Gelelektrophorese und anschließender MALDI-TOF-MS-Analyse, Auftrennung der ersten Dimension erfolgte in die pH-Bereiche 4-7 und 6-11. (n=3)

	Gesamt	davon pH 4-7	Davon pH 6-11
Zink-sensitive Proteine	158	94	63
davon vermindert exprimiert	140	88	62
davon vermehrt exprimiert	7	6	1
Mit MALDI-TOF-MS identifiziert	36	23	13
davon vermindert exprimiert	35	22	13
davon vermehrt exprimiert	1	1	0

Die Stärke der Regulation im Zinkmangel bewegte sich für die identifizierten Proteine im Bereich von -6,82 bis +2,11 fach (Tab. 4.7). Die 36 identifizierten Proteine erfüllen Funktionen in ganz unterschiedlichen Stoffwechselwegen, z.B. durch Beteiligung am Fettstoffwechsel (*Fettsäurebindungsprotein*), der Transkriptionskontrolle (*UBF Transkriptionsfaktor*) und hepatischem Harnstoffzyklus (*Argininosuccinat-Synthase*). Aufgrund der geringen Anzahl der identifizierten Proteine wurde auf eine Klassifikation verzichtet.

Tab. 4.7: *Proteine mit veränderter Expression in Abhängigkeit von der Zinkversorgung in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten nach Aufteilung des pH-Bereichs der ersten Dimension ermittelt durch 2D-Gelelektrophorese und anschließender MALDI-TOF-MS-Analyse; Auftrennung der ersten Dimension erfolgte in die pH-Bereiche 4-7 und 6-11.(n=3); * Namen werden in Anlehnung an die Bezeichnung in der Datenbank in der Tabelle in englischer Sprache beibehalten*

pH - Bereich	D	MW (kD)	IP	Protein-ID	MALDI-TOF-MS-Analyse*
4-7	-2,44	87	5,6	AAA60743	Thyroid hormone receptor β
4-7	-2,53	75	6,0	CAA30916	Protein disulfid isomerase
4-7	+2,11	75	6,5	BAA32736	Tubulin beta-7
4-7	-6,82	83	5,0	CAA44722	Vimentin
4-7	-2,83	73	5,0	A25113	Tubulin beta chain;
4-7	-3,53	79	6,1	BAA09339,	Protosomal ATPase (MSS1)
4-7	-4,06	77	6,4	AAA40811	3-Methyl,2-oxobutanoat dehydrogenase
4-7	-2,55	77	6,6	CAA78146	Pyruvate dehydrogenase;
4-7	-2,36	67	6,1	AAA42252	Brain alpha-Tropomyosin (TMB α -1)
4-7	-2,4	65	5,4	ATRTC	Actin-beta
4-7	-3,68	72	5,5	CAA33754	Methionin adenosyl-transferase
4-7	-2,96	66	5,3	S34588	Senescence marker protein SMP-30
4-7	-2,89	57	5,9	AAA41336	Hydroxy-Methyl-CoA Synthase
4-7	-2,19	56	6,5	AAA42181	N-Hydroxyarylamine sulfotransferase HAST-I
4-7	-2,02	62	6,2	AAA40830	Biliverdin reductase
4-7	-2,65	29	6,1	CAA06377	SMC-Protein
4-7	-2,33	26	6,2	-	Phosphotyrosin Protein Phosphatase
4-7	-2,02	24	5,8	AAA40785	Ca ²⁺ - ATPase
4-7	-3,22	25	6,5	AAA42160	Superoxiddismutase Cu/Zn
4-7	-2,07	10	6,8	AAA41191	GAP-43-Protein
4-7	-2,56	81	6,5	AAB96342	Basement membrane-associated chondroitin proteoglycan bamacan
4-7	-2,25	53	6,4	AAA41132	6-phosphate fructo bisphosphate 2-phosphatase
4-7	-3,87	74	4,8	A40439	UBF transcription factor, long form;
6-11	-3,09	71	7,0	CAA52670	L-iditol-2-dehydrogenase
6-11	-3,32	58	8,1	AAP42162	L-3-Hydroxy acyl CoA dehydrogenase
6-11	-2,15	64	9,0	AA38840	Unconventional myosin heavy chain;
6-11	-2,57	62	7	-	VDAC-1
6-11	-3,50	48	7,1	HDC 2	3-OH CoA dehydrogenase type II
6-11	-2,90	43	7,9	S28061	SCP1 protein
6-11	-2,43	25	7,9	-	Kinesin
6-11	-3,03	81	7,5	AAA4163	Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase
6-11	-3,27	73	7,5	AAA40771	Argininosuccinate synthetase
6-11	-4,52	51	7,3	P14141	Carbonic anhydrase III
6-11	-3,61	6	7,9	AAA41135	Fatty acid binding protein
6-11	-3,98	6	9,0	AAA40755	Apolipoprotein E
6-11	-3,48	74	8,1	CAA28952	Acetyl-CoA-Acyltransferase, mitochondrial

4.3 Bestätigung ausgewählter *Array*-Daten mit *Northern Blot* und quantitativer *Real time RT-PCR* (Leber)

Für die Beurteilung der Qualität und Signifikanz der Befunde aus der Transkriptionsanalyse mittels *Array* ist eine Bestätigung der Daten mit unabhängigen Methoden unerlässlich. Die Verifizierung der Regulation von Transkripten bzw. Genprodukten (Proteinen) in Abhängigkeit von der Zinkversorgung erfolgte mittels *Northern Blot*-Analyse und mit quantitativer *Real time RT-PCR*.

Für die *Northern Blot*-Analyse wurden cDNA-Fragmente (8.1.7.1) vertretend für die offenen Leserahmen von 31 aus unterschiedlichen Gengruppierungen ausgewählten Gene eingesetzt. Tabelle 4.8 zeigt die durch Normalisierung und Quantifizierung im *Northern Blot* vorgefundenen Änderungen der Transkriptmengen der 31 untersuchten Gene. Für 24 Gene wurde zusätzlich eine Überprüfung mittels quantitativer *Real time RT-PCR* vorgenommen.

Tab. 4.8: *Verifizierung der Zinksensitivität ausgewählter durch den Array-Einsatz ermittelter Transkripte der Leber mittels Northern Blot-Analyse und quantitativer Real time RT-PCR; (Northern Blot: n=3, Auftrag 15 µg Gesamt-RNA/Spur; D N.B.= Verhältnis der Signalintensität von Zn-/Zn+ nach Normalisierung auf House keeping-Gen GAPDH; n.d.= nicht detektierbar; D RT= Verhältnis von Zn-/Zn+ nach Normalisierung auf „House-keeping-Gen GAPDH) n.b.= nicht bestimmt; ± 1= Expression nicht verändert, * Namen werden in Anlehnung an die Bezeichnung in der Datenbank in der Tabelle in englischer Sprache beibehalten*

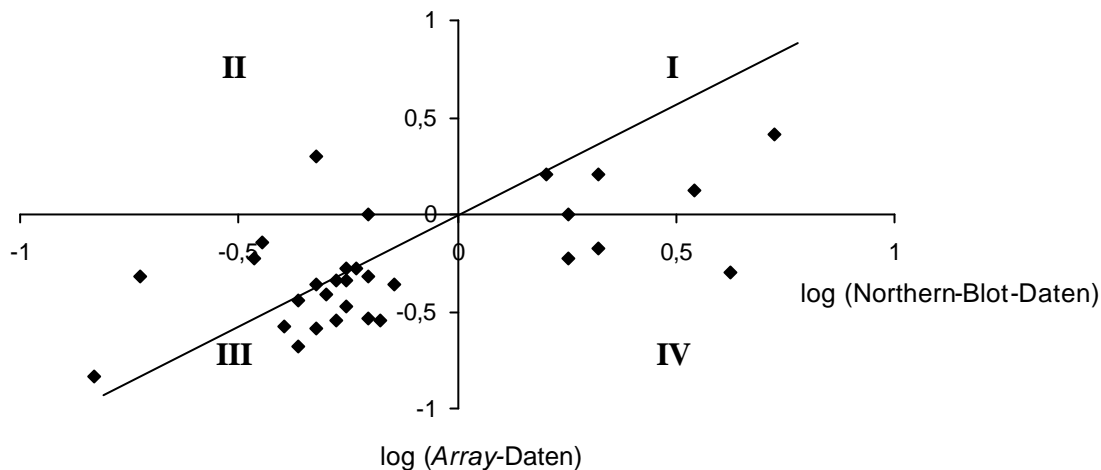
Gen	System	Kodiertes Protein*	Array	D N.B.	D RT	Funktion
Wachstum						
M89791	A	IGF-binding protein 1	-2,5	-3,8	-3,8	GH-IGF Achse
J04486	A	IGF-binding protein 2	-2,3	-2,8	-11,4	GH-IGF Achse
S46785	A	IGF-binding protein, acid-labile su	-1,4	-2,3	-1,7	GH-IGF Achse
M29014	R	Insulin receptor	-1,5	-3,5	n.b.	Insulinwirkung
M37394	A	EGF-Receptor	-1,8	-2,2	-1,12	Mitogener Effekt
Lipidmetabolismus						
AF171640	P	Carboxylesterase	-1,8	-1,9	-2,5	Triglyceridabbau
D00729	A	Δ2,Δ3-enoyl CoA isomerase	-1,8	-3	-2,8	Fettsäureabbau
D16102	A	Glycerol kinase	1,6	1,6	n.b.	Fettsäuresynthese
K01934	P	Lipogenic factor S14	2,1	1,6	1,3	Fettsäuresynthese
AJ245707	R	2-OH-phytanoyl-CoA lyase	-2,1	-2,0	n.b.	Verzweigt-kettige Fettsäureabbau

Gen	System	Kodiertes Protein*	Array	D N.B.	D RT	Funktion
Fremdstoffumsatz/ Stressantwort						
M33936	A	Cytochrome P450 (CYP1A3)	-2,1	-3,9	-6,5	Biotransformation, phase I
M12516	A	NADPH-cytochrome P450 reduct.	-2,1	-2,3	-1,9	Biotransformation, phase I
AF110477	P	Liver aldehyde oxidase	-1,6	-2,1	-3,9	Biotransformation, phase I
NM031533	P	UDP-glucuronosyltransferase	4,2	-2	1,5	Biotransformation, phase II
Stickstoffmetabolismus						
J04733	P	Acyl-peptide hydrolase	-5,3	-2,1	-1,9	Proteinabbau
AF095740	P	Ubiquitin-like protein	1,8	-1,7	1,1	Proteinabbau
Y00752	P	Serine dehydratase	-1,9	-3,5	-4,9	Aminosäureabbau
D00252	P	Cyt. Aspartat aminotransferase	-1,6	-3,4	-2,1	Transaminierung
Trafficking/ Signaltransduktion						
L20822	A	Syntaxin 5	-2,8	-1,43	n.b.	Intrazelluläres Trafficking
D78588	R	Diacylglycerolkinase	3,48	1,34	1,4	Signaltransduktion
U03629	A	Arrestin D	-2	-2,6	-2,6	Signaltransduktion
Transkription						
L13202	R	HNF 3	-2,9	-1,7	-2,6	Transkription
Andere						
D16339	R	Alpha-Tocopherol transfer Protein	-1,7	-1,9	n.b.	Tocopheroltransfer
X16481	R	Zn (2+) binding protein	5,3	2,6	1,1	KH-Stoffwechsel
D13127	P	F0F1-ATP Synthase SU c	1,8	±1	1,3	ATP Synthese
M11794	P	Metallothionein	-6,8	>-100	n.b.	Multifunktionsprotein
J03190	P	5-Aminolevulinate synthase	-2,3	-4,8	-8,6	Porphyrinsynthese
L33869	A	Ceruloplasmin	2,1	-1,5	-1,9	Fe(II) Oxidation
M20373	A	Neuropeptide Y	-1,9	-2,2	-4,3	Nahrungsaufnahme
X59737	A	Mitoch. Creatinekinase	-1,6	n.d.	n.b.	Energiemetabolismus
M15327	A	Alcohol dehydrogenase A SU	-1,9	-1,2	-2,1	Ethanolabbau

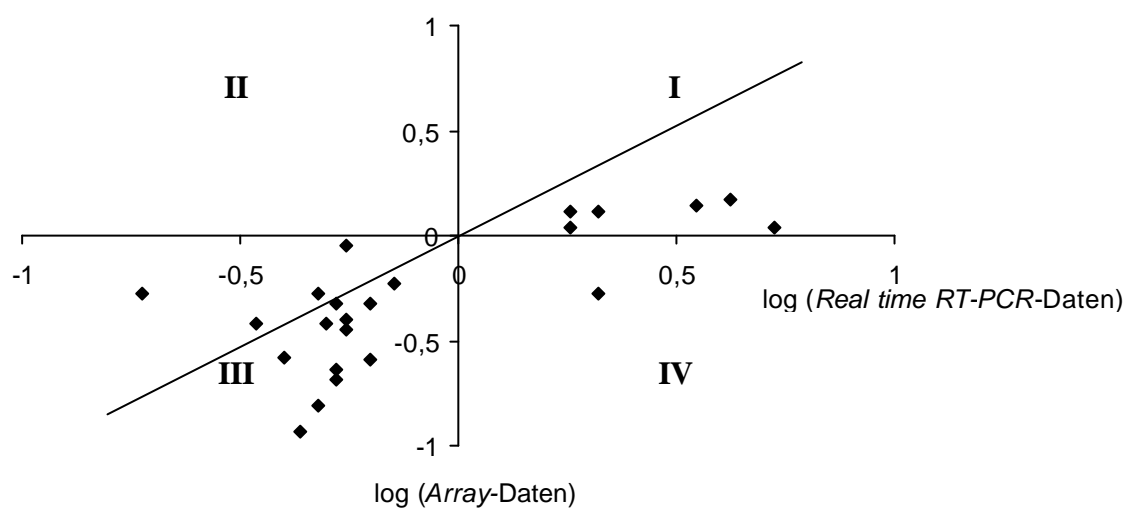
Die Ergebnisse zeigen, dass Veränderungen in der Expressionshöhe der ausgewählten Gene in 84% der Fälle (26 von 31) mit *Northern Blot* bzw. *Real time RT-PCR* unabhängig bestätigt werden konnten. Von den nicht bestätigten Veränderungen lag das Transkript der Kreatinkinase unterhalb der Detektionsgrenze, das der F0F1 ATP Synthase UE c wies keine Regulation in Abhängigkeit vom Zinkstatus auf und die verbleibenden 3 Sequenzen (UDP-Glucuronosyltransferase, Ubiquitin-ähnliches Protein, Ceruloplasmin) waren gegenteilig reguliert. In den meisten Fällen (65 %) sind die detektierten Veränderungen im *Northern Blot* stärker ausgeprägt als die durch die *Array*-Analyse ermittelten. Mit quantitativer *Real time RT-PCR* wurden 24 Transkripte in ihrer Expressionshöhe untersucht. Hier ergab sich in 83% der Fälle eine Übereinstimmung mit den *Array*-Daten. Für drei Genprodukte (EGF-Rezeptor, Ubiquitin-ähnliches Protein, Zink(2+)-Bindungsprotein) konnte dagegen keine Regulation nachgewiesen werden. Für Ceruloplasmin zeigte sich eine gegenläufige Veränderung.

Abbildung 4.25 (A, B, C) stellt den Vergleich zwischen *Array*-, *Northern Blot*- und *Real time RT-PCR*-Daten nochmals graphisch dar. Für 4.25 A und B bedeuten Datenpunkte auf und in unmittelbarer Nähe der x-Achse, dass mit dem zur Verifizierung der *Array*-Daten eingesetzten System keine oder nur eine sehr geringe ($\pm 1,1$) Regulation nachgewiesen werden konnte. Bei Datenpunkten im II. und IV. Quadranten wird mit der Verifizierungsmethode (*Northern Blot* oder *Real time RT-PCR*-Analyse) eine zu den *Array*-Befunden gegensätzliche Regulation gefunden. Datenpunkte auf der Geraden weisen übereinstimmende Regulationswerte auf. Abweichungen von der Geraden zur y-Achse zeigen eine stärkere Regulation als auf *Array*-Ebene an, bei Abweichungen zur x-Achse eine geringere. Ein Vergleich der Befunde der Verifizierungsmethoden (Abb. 4.25 C) zeigt nur für 2 Transkripte eine gegenläufige Regulation an (VI).

A



B



C

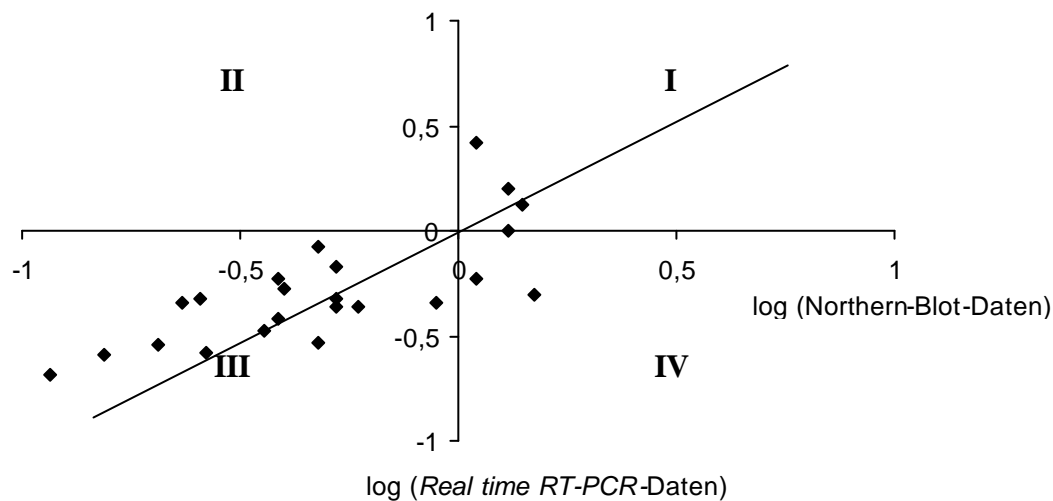
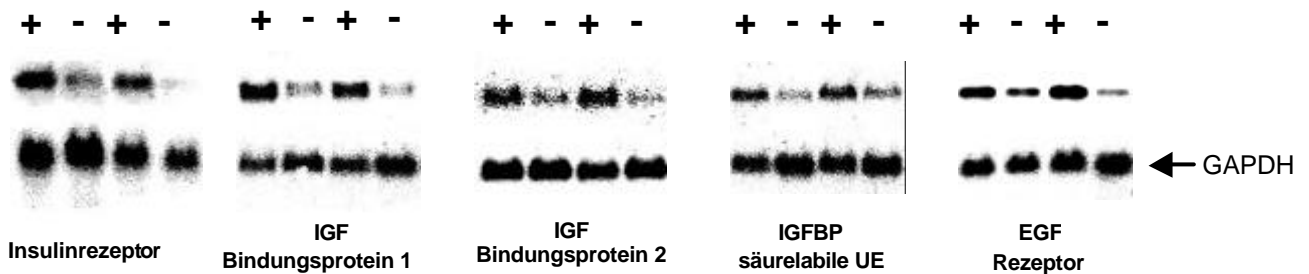


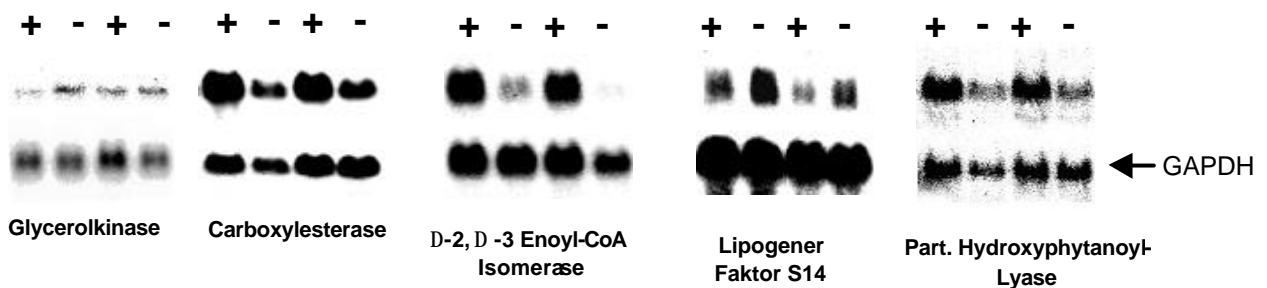
Abb. 4.25: Vergleich der Array-, Northern Blot- und Real time RT-PCR-Daten in logarithmischer Darstellung des Quotienten ($Zn/Zn+$); (A) Vergleich Array/Northern Blot, (B) Vergleich Array/Real time RT-PCR, (C) Vergleich Real time RT-PCR/ Northern Blot

Für die *Array*-generierten Daten von Lebergenen mit Beteiligung am Wachstum liessen sich alle ausgewählten Transkripte mit *Northern Blot*-Analyse bestätigen und zeigen übereinstimmend eine Reduktion der Transkriptmenge im Mangelzustand (Abb. 4.26 A). Transkripte aus dem Lipidstoffwechsel weisen eine vermehrte Expression jener mRNAs auf, die Proteine der Fettsäure- und Triglyceridbiosynthese kodieren und eine Verminderung der Genexpression von Proteinen im Lipidabbau und der β -Oxidation (Abb. 4.26 B). Genprodukte, deren Proteine Funktionen in Fremdstoffstoffwechsel und in der Stressantwort wahrnehmen, v.a. Cytochrome, zeigen eine Herabregulation im Zinkmangel (Abb. 4.26 C). Der Einfluß eines Zinkmangels auf den Stickstoffstoffwechsel zeigt sich sowohl für Transkripte mit Beteiligung an Stoffwechselwegen einzelner Aminosäuren als auch des Proteinumsatzes (Abb. 4.26 D). Den Einfluß der Zinkversorgung auf Transkripte ganz unterschiedlicher funktioneller Wege in der Leber zeigen die *Northern Blot*-Analysen von RNA-Proben der Bereiche u.a. der Signaltransduktion, der Transkriptionskontrolle, des Energiemetabolismus und der Porphyrinsynthese u.a. (Abb. 4.26 E).

A



B



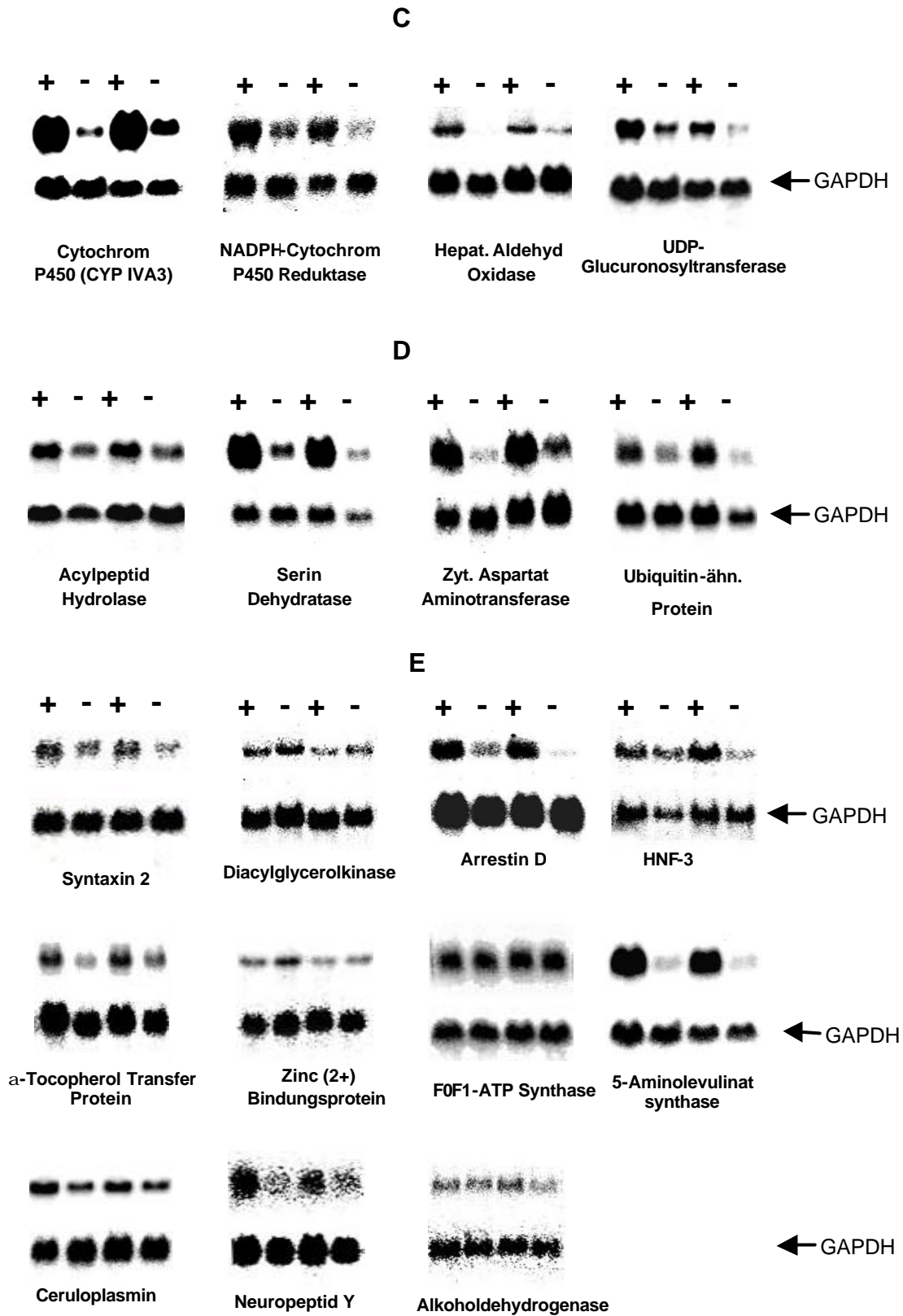


Abb. 4.26: Regulation der RNA-Spiegel von ausgewählten Transkripten des Bereichs (A) „Wachstum“, (B) „Lipidstoffwechsel“, (C) „Biotransformation und Stressantwort“, (D) „Stickstoffstoffwechsel“ und (E) „Transkription und Andere“ im Zinkmangel ermittelt durch Northern Blot-Analyse, Auftrag: 15 µg Gesamt-RNA; IGF = insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor, EGF = epidermaler Wachstumsfaktor; (+ = Kontrolle, - = Zinkmangel)

Für einige der ausgewählten zink-sensitiven Kandidatengene konnte die Regulation mittels *Northern Blot* oder *Real time RT-PCR* nicht bestätigt werden. Bereits die *Array*-Daten zeigten, beispielsweise für die UDP-Glucuronosyltransferase mit zweimal erhöhter und einmal verminderter Expression, inkonsistente Befunde. Die *Northern Blot*-Analyse konnte nur eine starke Verminderung des Phase II-Enzym-Transkripts detektieren. Auch für die Transkripte des Ubiquitin-ähnlichen Proteins und des Ceruloplasmins wurde eine, den *Array*-Daten entgegenlaufende Regulation nachgewiesen. Ein Vergleich der Transkriptmengen der Kreatinkinase in Kontroll- und Zinkmangeltieren war aufgrund zu geringer Expressionshöhe in der Leber nicht möglich.

4.4 Bestätigung ausgewählter *Array*-Befunde mittels *Northern Blot* (Gehirn)

Mit der *Northern Blot* Analyse zur Verifizierung der mittels *Array*-Analyse im Gehirn identifizierten Transkripte konnte von acht untersuchten Zielsequenzen für fünf eine Regulation im Zinkmangel bestätigt werden (Abb. 4.27). Die verbleibenden drei Kandidatengene wiesen in der Überprüfung zwar eine gut detektierbare Expression auf, eine Regulation konnte aber nicht bestätigt werden.

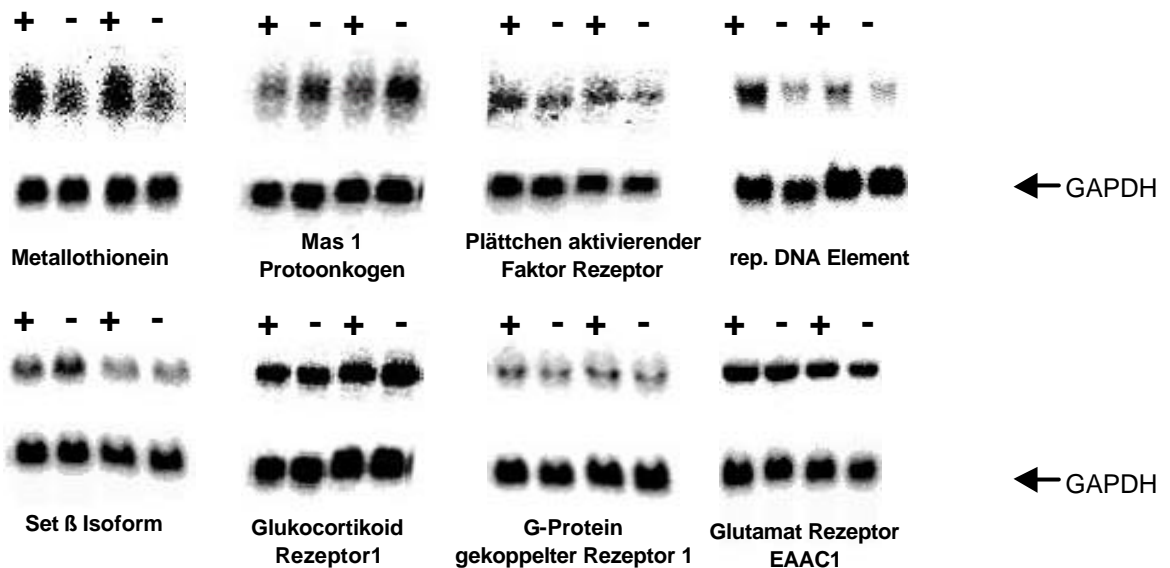


Abb. 4.27: *Northern Blot*-Analyse von Transkripten des Hirngewebes zur Verifizierung der Regulation in Abhängigkeit vom Zinkstatus ermittelt anhand der *Array*-Analyse; Auftrag: 15 µg Gesamt-RNA; (+ = Kontrolle, - = Zinkmangel)

Tabelle 4.9 zeigt die ermittelten Befunde zur Regulation im Zinkmangel für die acht ausgewählten Kandidatengene. Die stärkste nachzuweisende Regulation war für Metallothionein mit Faktor $-1,5$ im Zinkmangel zu detektieren. Diese geringe Regulation des Zinkmangelmarkers weist auf eine gute Abschirmung des Gehirns gegenüber dem sonst ausgeprägten Mangel hin.

Gen	System	Kodiertes Protein*	Array	Northern Blot
M11794	R	metallothionein-2 and metallothionein-1	-1,5	-1,5
J03823	A	Mas 1 proto-oncogene	1,9	1,3
U04740	A	Platelet activating factor receptor	-2,7	-1,4
X07686	R	L1Rn B6 repetitive DNA element	-1,7	-1,4
S68987	A	Set β isoform	2,2	1,2
M14053	A	Glucocorticoid receptor	-4,5	-1,1
U65417	A	G protein-coupled receptor	-2,9	1
U39555	A	EAAC1 glutamate transporter	-3,8	-1,1

Tab. 4.9: **Northern Blot-Analyse im Gehirn zur Verifizierung der Regulation ausgewählter Transkripte im Zinkmangel** identifiziert mittels Array-Analyse; Auftrag: 15 μ g Gesamt-RNA; * Namen werden in Anlehnung an die Bezeichnung in der Datenbank in der Tabelle in englischer Sprache beibehalten

4.5 Bestätigung der Regulation ausgewählter Transkripte in der Leber eines *Pair fed*-Zinkmangelversuchs mittels *Northern Blot*

Zur Überprüfung, ob die identifizierten Gene auch auf einen ohne Zwangsfütterung erzeugten Zinkmangel mit einer Regulation reagieren, wurden zusätzliche *Northern Blot*-Analysen mit Leber-RNA-Proben aus einem *Pair fed*-Zinkmangelversuch durchgeführt. Hier kann eine veränderte Expression nicht ausschließlich auf fehlendes Zink zurückgeführt werden, da sich die *Pair fed* Gruppe aufgrund schnell verzehrter aber geringer Futtermengen in einer extremen Hungerstoffwechsellage befinden kann (Schülein *et al.*, 1992). Ausgewählte zink-sensitive Gene sollten aber auch unter *Pair fed*-Design als reguliert zu bestätigen sein.

Alle fünf überprüften Transkripte wiesen auch in der Leber von *Pair fed*-Zinkmangeltieren eine Expression auf und in vier von fünf Fällen war eine Regulation in Abhängigkeit von der Zinkversorgung nachweisbar (Abb. 4.28).

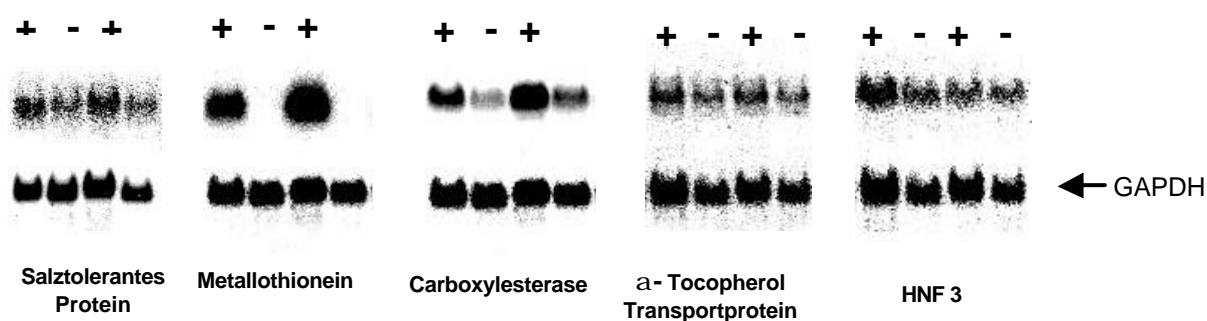


Abb. 4.28: Northern Blot-Analyse des Lebergewebes von Kontroll- und Pair Fed-Zinkmangel-tieren zur Verifizierung der Regulation ausgewählter Transkripte im Pair fed-Zink-mangelversuch; Auftrag: 15 µg Gesamt-RNA; (+ = Kontrolle, - = Zinkmangel)

Die Stärke der Antworten fiel für alle untersuchten Transkripte jedoch geringer aus, als im Schlundsondenversuch. Die dort beobachtete Veränderung des Transkriptionsfaktors HNF 3 bestätigte sich jedoch im Pair fed-Zinkmangelversuch nicht. Die stichprobenartige Analyse zeigt generell aber eine gleichgerichtete Regulation zu den Veränderungen im isolierten Zinkmangel nach Zwangsernährung (Tab. 4.10).

Gen	Codiertes Protein	Northern Analyse: „Schlundsonde“	Northern Analyse: „Pair-Fed“
M11794	Metallothionein	>-100	- 60
AF171640	Carboxylesterase	-1,9	-1,7
D16339	α-Tocopherol transfer protein	-1,9	-1,6
L13202	HNF 3	-1,7	-1,1
AB006914	Salt-Tolerant Protein	-1,7	-1,6

Tab. 4.10: Regulation ausgewählter Transkripte aus dem Pair fed-Zinkmangelversuch im Vergleich zur Regulation im Schlundsonden-Zinkmangelversuch, Veränderungen angegeben als: x-fach reguliert im Zinkmangel; * Namen werden in Anlehnung an die Bezeichnung in der Datenbank in der Tabelle in englischer Sprache beibehalten

4.6 Bestätigung der Zinkabhängigkeit der Proteinexpression auf Transkriptebene mittels *Northern Blot*

Für ausgewählte durch 2D-Elektrophorese und MALDI-TOF-MS-Analyse identifizierte Proteine mit zinkabhängiger Regulation, wurde für ihre korrespondierenden Transkripte die Regulation untersucht. Die zinkabhängige Regulation ließ sich hier generell auch auf Transkripteben bestätigen, allerdings war der Nachweis der Transkriptmengen schwierig, da sie nur gering oberhalb der Detektionsgrenze der *Northern Blot*-Analyse lagen (Abb. 4.29).

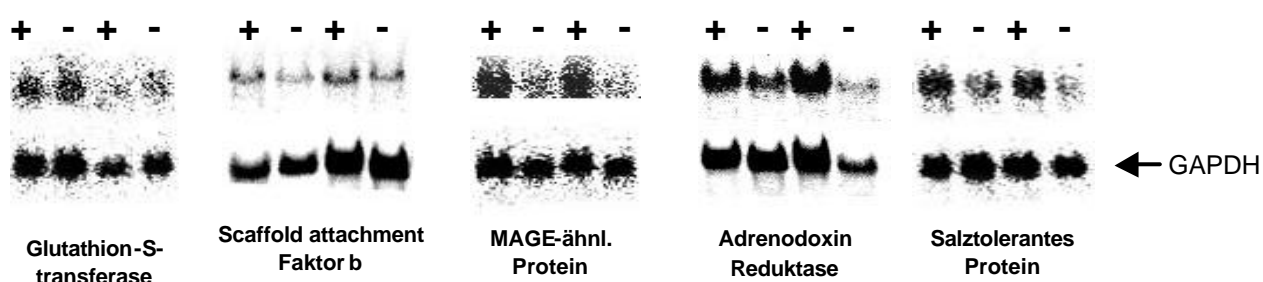


Abb. 4.29: *Northern Blot*-Analyse des Lebergewebes von Zinkmangel- und Kontrollratten zur Verifizierung der mittels 2D-Elektrophorese ermittelten regulierten Proteine auf transkriptioneller Ebene; Auftrag: 15 µg Gesamt-RNA; (+ = Kontrolle, - = Zinkmangel)

Die Stärke der Regulation in Abhängigkeit von der Zinkversorgung war auf mRNA-Ebene für alle untersuchten Kandidaten geringer als auf Proteinebene. Für die Mehrzahl der identifizierten Proteine existierte auf dem *Array* zwar für das korrespondierende Transkript ein applizierter Fänger, ein Signal der hybridisierten Probe über Hintergrundsignal konnte aber nicht detektiert werden (Tab. 4.11).

Protein Bank Nr.	Identifiziertes Protein	Regulation 2D	Regulation N. B.	Regulation Array	Gene Acc.Nr.
AAA41287	Glutathion-S-transferase	+3,3	+1,5	+2,75	X67654
O88453	Scaffold Attachment Factor B	-2,4	-2,1	n.a.	AF056324
Q9EPI7	Putative Mage-Like Protein	-2,5	-1,34	n.a.	AJ293617
BAA23759	adrenodoxin reductase prec.	-2,3	-2,1	+1,1	D63761
JC5261	Salt-tolerant protein	-2,5	-1,7	n.a.	AB006914
S28061	Synaptonemal chrom. SCP1	-2,8	n.b.	n.a.	AF020295

Tab. 4.11: **Stärke der zinkabhängigen Regulation von Proteinen bzw. ihrer korrespondieren Transkripte in Lebergewebe von Zinkmangel- und Kontrollratten** ermittelt durch 2D-Elektrophorese (=2D), *Northern Blot* Analyse (=N.B.) bzw. DNA-Arrayscreening (=Array); n.a.=nicht auswertbar, Signalintensität zu gering; n.b.= nicht bestimmt; * Namen werden in Anlehnung an die Bezeichnung in der Datenbank in der Tabelle in englischer Sprache beibehalten

4.7 Verifizierung der veränderten Expression ausgewählter Gene mit dem elektronischen Array-System

Auch wenn für die direkte Identifizierung eines Zinkmangelzustandes basierend auf einer Mustererkennung für das elektronische *Array*-System mit derzeitiger *Software*- und *Hardware*-Ausstattung keine hinreichend valide Methode entwickelt werden konnte, wurde geprüft, inwieweit das System geeignet ist, die zink-sensitiven Metallothioneinexpression zu detektieren.

Nach Generierung genspezifischer verkürzter RNA-Spezies ließ sich die Regulation von Metallothionein im Zinkmangel auf dem NanoChip™ (Nanogen, San Diego, CA, USA) nachweisen. Die Herstellung der genspezifischen Proben aus den zu untersuchenden Poly(A)⁺-Gemischen erfolgte in parallelen „Multiplex“-Ansätzen. Metallothionein und GAPDH-Amplifikate wurden dazu in einem einzigen Reaktionsgefäß, parallel für Kontroll- und Zinkmangelzustand, erzeugt. Hierfür wurde in einer spezifischen RT-PCR-Reaktion und linearer Amplifikation GAPDH und Metallothionein im parallelen Ansatz für Proben aus Mangel- und Kontrollgruppe angereichert. Nach der folgenden *in vitro*-Transkriptionsreaktion wurden die zu vergleichenden Amplifikate von Kontroll- und Zinkmangelprobe auf einem *Chip* unter Anwendung der aktiven Hybridisierung analysiert. Die Detektion erfolgte sowohl mit enzymatischem *Reporting* (Abb. 4.30), als auch mit spezifischen markierten Reportersonden gegen Metallothionein und GAPDH (Abb. 4.32). Es ist gelungen, die Expressionsveränderung im Zinkmangel für das stark zink-sensitive Gen Metallothionein mit dieser Methode nachzuweisen.

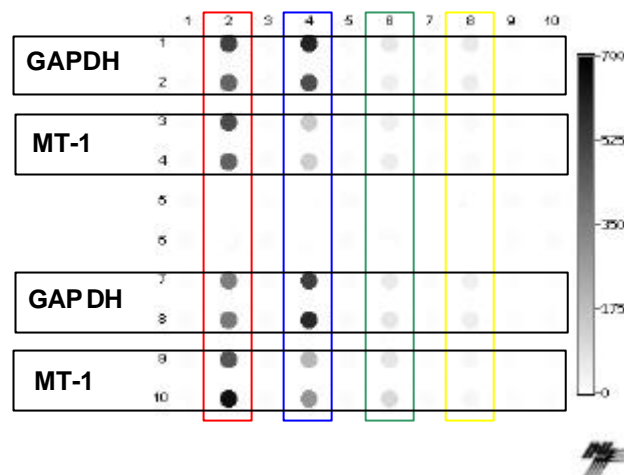


Abb. 4.30: Metallothionein-Expression in Lebergewebe von Zinkmangel- und Kontrollratten untersucht mittels NanoChip[®] des elektronischen Array-Systems und detektiert durch enzymatisches „Reporting“; rot = Kontrolle 1:4, blau = Zinkmangel 1:4, grün = Kontrolle 1:40, gelb = Zinkmangel 1:40

Der Expressionsvergleich wies mit steigender Verdünnung der zu untersuchenden Probe eine Erhöhung der Sensitivität auf. Die Expressionsunterschiede von Metallothionein, normalisiert durch Bezug auf die konstitutionelle Genexpression von GAPDH, zeigten ab einer Verdünnung von 1:4 keine Steigerung mehr. Bereits bei einer 1:2 Verdünnung ließ sich eine 1,6-fache Herabregulation im Zinkmangel dokumentieren. Die Verdünnungen 1:4 und 1:40 wiesen den linearen Bereich der Methode nach, denn eine Steigerung über den Regulationsfaktor 3,8 war nicht zu erreichen (Abb. 4.31).

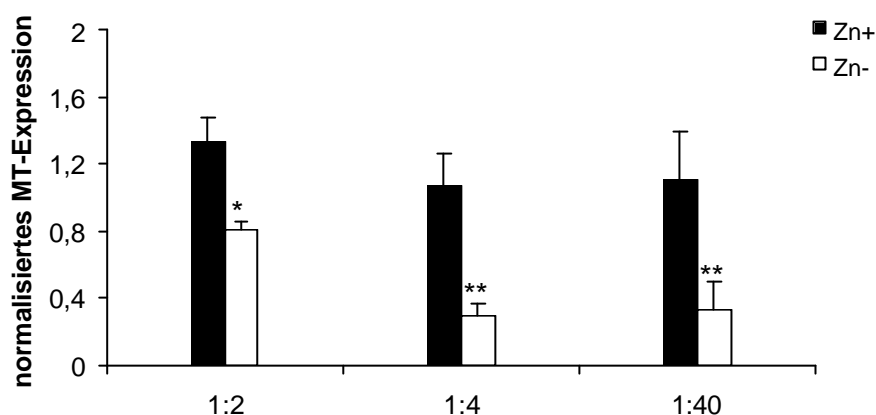


Abb. 4.31: Metallothionein-Expression in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten untersucht mit elektronischem Array-System; Detektion: enzymatisches „Reporting“; Normalisierung auf GAPDH-Expression; elektronische Adressierung: 500 nM Fängeroligonukleotid in 50 mM Histidin, 60 s, 2 Volt; elektronische Proben-Hybridisierung: Analytverdünnung: 1:2, 1:4 und 1:40 in 50 mM Histidin, 2 min, 2 Volt, Niedrigsalzpufferdiskriminierung: 10 min, 37 °C, 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0; Unterschiede der Zinkmangelgruppe zur Kontrolle sind mit * ($P < 0,05$) bzw. ** ($P < 0,01$) angegeben, $n=3$

Eine Markierung mit genspezifischem Reporteroligonukleotid führt zu einer einzigen Markierung pro hybridisierter Zielsequenz und geringerem Hintergrundsignal (Abb. 4.32).

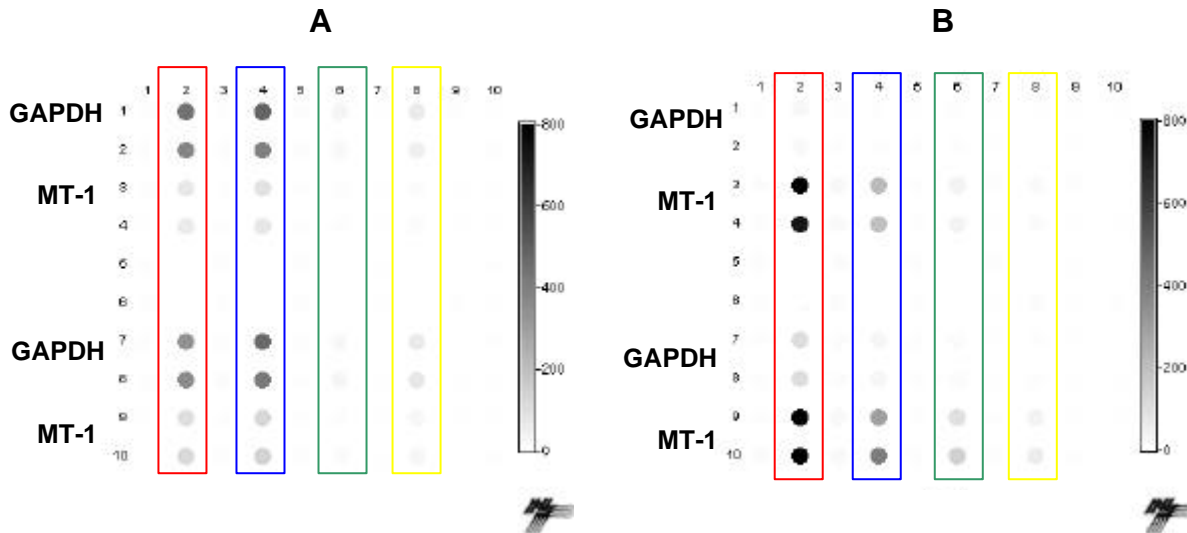


Abb. 4.32: Metallothionein-Expression in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten untersucht mittels NanoChipä detektiert mit (A) Cy3-markiertem GAPDH-Reporter-oligonukleotid und (B) Cy5-markiertem Metallothionein-Reporteroligonukleotid. rot = Kontrolle 1:4, blau = Zinkmangel 1:4, grün = Kontrolle 1:40, gelb = Zinkmangel 1:40

Die Auswertung der zwei Verdünnungsstufen detektiert mit sequenzspezifischen Reporteroligonukleotiden ergab eine 4,5- bzw. eine 8,4-fache Herabregulation der Metallothioneinexpression in Proben der Zinkmangeltiere. Der lineare Messbereich war hier noch nicht erreicht (Abb. 4.33). Bei richtig gewählter Verdünnung dürfte zwischen den Verdünnungsstufen kein signifikanter Unterschied in der Regulationshöhe mehr detektiert werden.

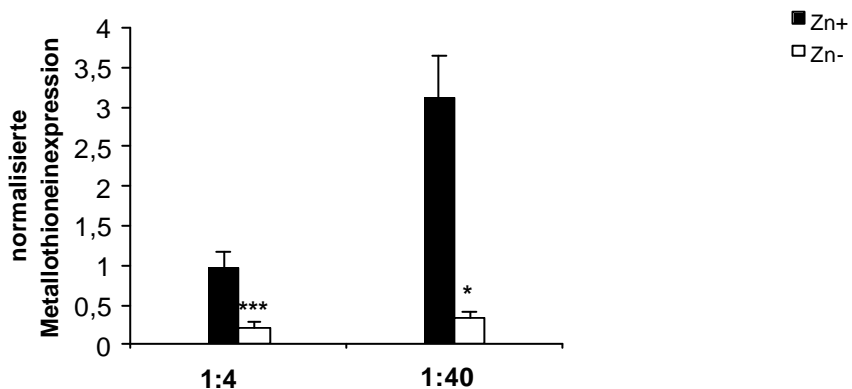


Abb. 4.33: Metallothionein-Expression in Lebergewebe von Kontroll- und Zinkmangelratten untersucht mit elektronischem Array-System; Detektion mit Cy-markiertem spezifischem Reporteroligonukleotid; Normalisierung auf GAPDH-Expression; elektrisch getriebene Adressierung: 500 nM Fängeroligonukleotid in 50 mM Histidin, 60 s, 2 Volt; elektrisch getriebene Proben-Hybridisierung: Analyseverdünnung: 1:2, 1:4 und 1:40 in 50 mM Histidin, 2 min, 2 Volt, Nidrigsalzpufferdiskriminierung: 10 min, 37 °C, 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0; Reporterlösung: 500 nM in Hochsalzpuffer 3 min RT, n=3-), signifikante Unterschiede der Zinkmangelgruppe zur Kontrollgruppe sind mit * (P<0,05) bzw. *** (P<0,001) gekennzeichnet

4.8 Vergleichende Gewebeexpressionsanalyse

Neben der Analyse des Hirngewebes wurden auch andere Gewebe auf zink-spezifische Änderungen der Genexpression untersucht. Für identifizierte Transkripte der Leber wurde auch eine Analyse in Nieren-, Darm- und Muskelgewebe von Zinkmangel- und Kontrolltieren durchgeführt. Die gewebespezifische Expression der ausgewählten Transkripte, deren Gene in der Leber als zink-sensitiv identifiziert wurden, erfolgte im ersten Schritt auf einem Gewebemisch-Northern Blot (Leber, Gehirn, Darm, Muskel, Niere). Bei einer nachweisbaren Expression wurde in Folge ein organspezifischer Blot (n= 5-7) erstellt. Alle Gene ohne nachweisbare Expression auf dem gemischten Blot wurden keiner weiteren Untersuchung unterzogen.

4.8.1 Niere

In der Niere war für 21 von 25 der in der Leber zink-sensitiven Genen eine Expression nachweisbar (84 %). Nicht nachweisbar waren die Transkripte des gastroinhibitorischen Peptids, der Serin Dehydratase, der hepatischen Aldehyd Oxidase und von Neuropeptid Y. Abbildung 4.34 zeigt exemplarisch den Nachweis ausgewählter mRNAs mittels Northern Blot-Analyse.

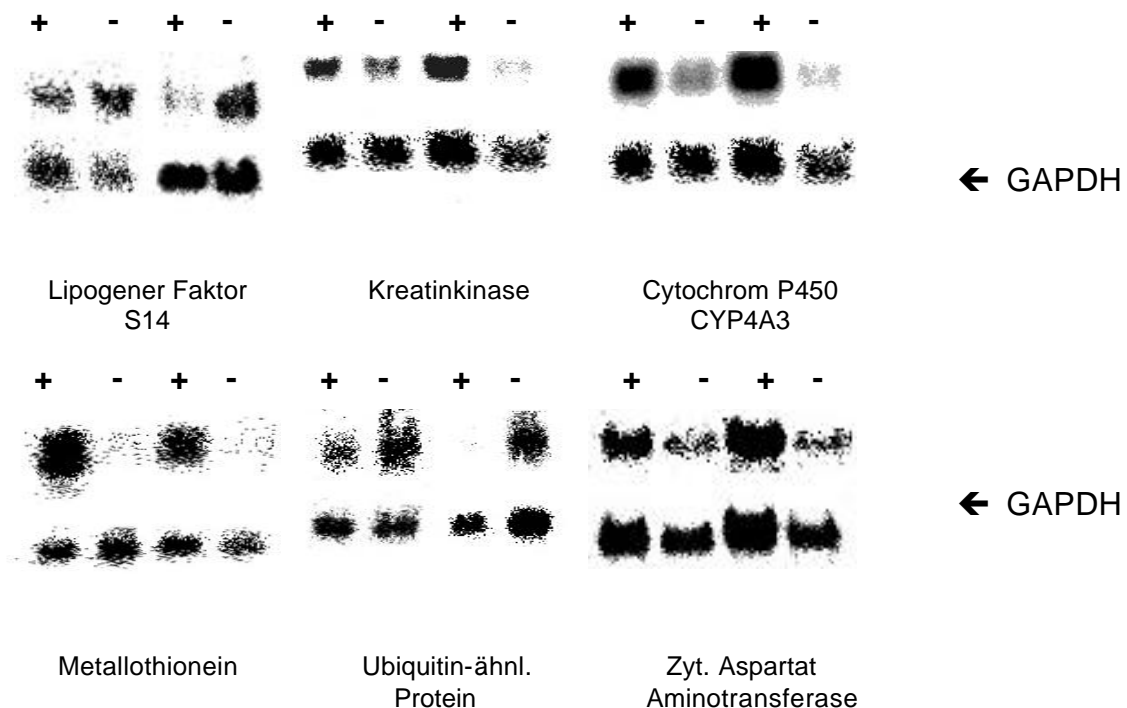


Abb. 4.34: Nierenspezifische Expression verschiedener zink-sensitiver Gene in Kontroll- (+) und Zinkmangeltieren (-) untersucht mittels Northern Blot-Analyse in 15µg Gesamt-RNA, Detektion mit ³²P-dATP radioaktiv markierter cDNA

IGFBP1, IGFBP2, IGFBP säurelabile UE, Ceruloplasmin und der Insulinrezeptor wiesen in der Niere eine detektierbare Expression auf. Im Gegensatz zur Leber bestand aber keine oder nur sehr geringe (-1,2) Abhängigkeit vom Zinkstatus. Das Transkript der Kreatinkinase zeigte eine leicht verminderte Expression in der Niere von Zinkmangeltieren. In der Leber war das Transkript dagegen kaum nachweisbar. Einen gegenteiligen Einfluß im Vergleich zur Leber hat ein Zinkmangel in der Niere auf die Expression der Carboxylesterase, UDP-Glucuronosyltransferase, Ubiquitin-ähnliches Protein und die Alkohol Dehydrogenase UE. Bei vorliegender gleichartiger Regulation war die Amplitude der Veränderung verglichen mit der hepatischen Antwort in den überwiegenden Fällen geringer. Die Übersicht (Abb. 4.35) gibt die unterschiedliche Zinkversorgung induzierten Veränderungen der Expression wieder. Transkripte ohne Änderung werden nicht gelistet.

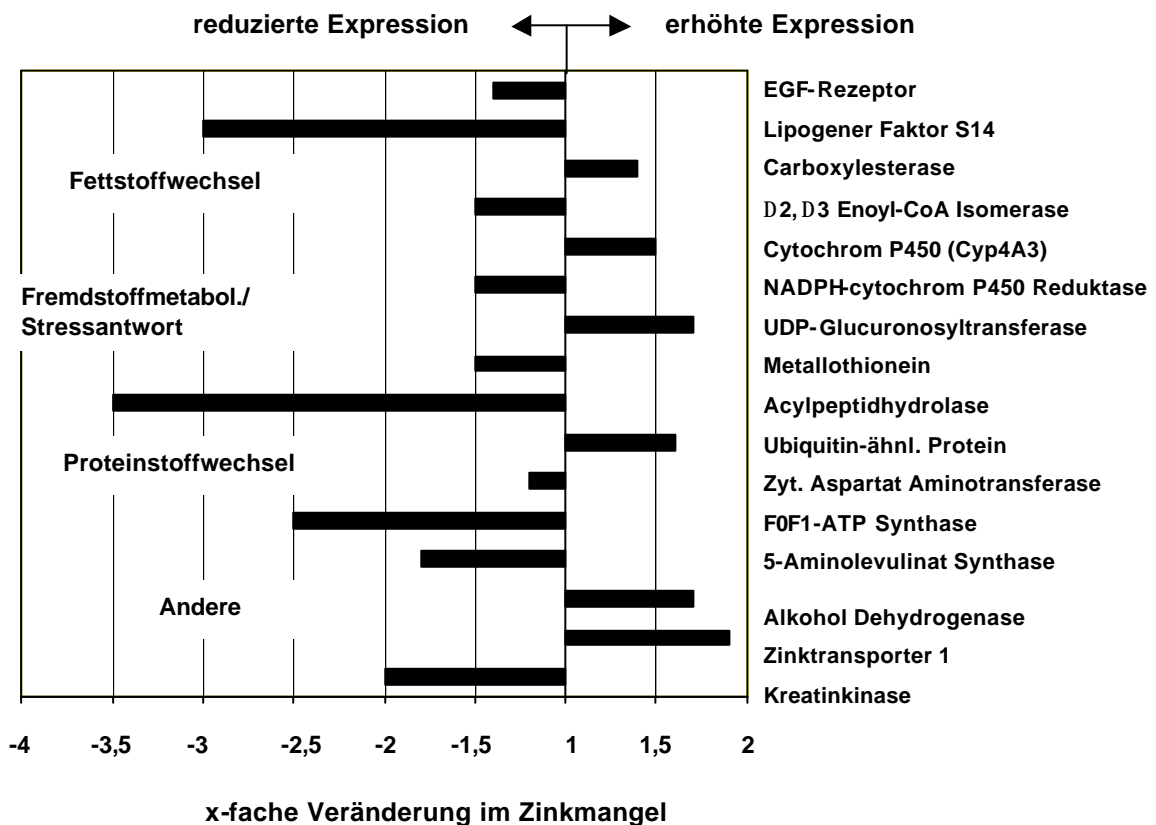


Abb. 4.35: Änderung der Genexpression im Zinkmangel in Nierengewebe. Die Ergebnisse wurden aus der Northern Blot-Analyse bezogen auf das House keeping-Gen GAPDH ermittelt.

4.8.2 Muskel

Im Muskelgewebe war nur für 36 % (9 von 25) der untersuchten Transkripte eine Expression nachweisbar. 16 der hepatisch regulierten Transkripte wurden nicht exprimiert. Abbildung 4.36 zeigt beispielhaft den Nachweis der mRNA von drei im Muskel regulierten und zwei nicht regulierten Genen mittels *Northern Blot*-Analyse.

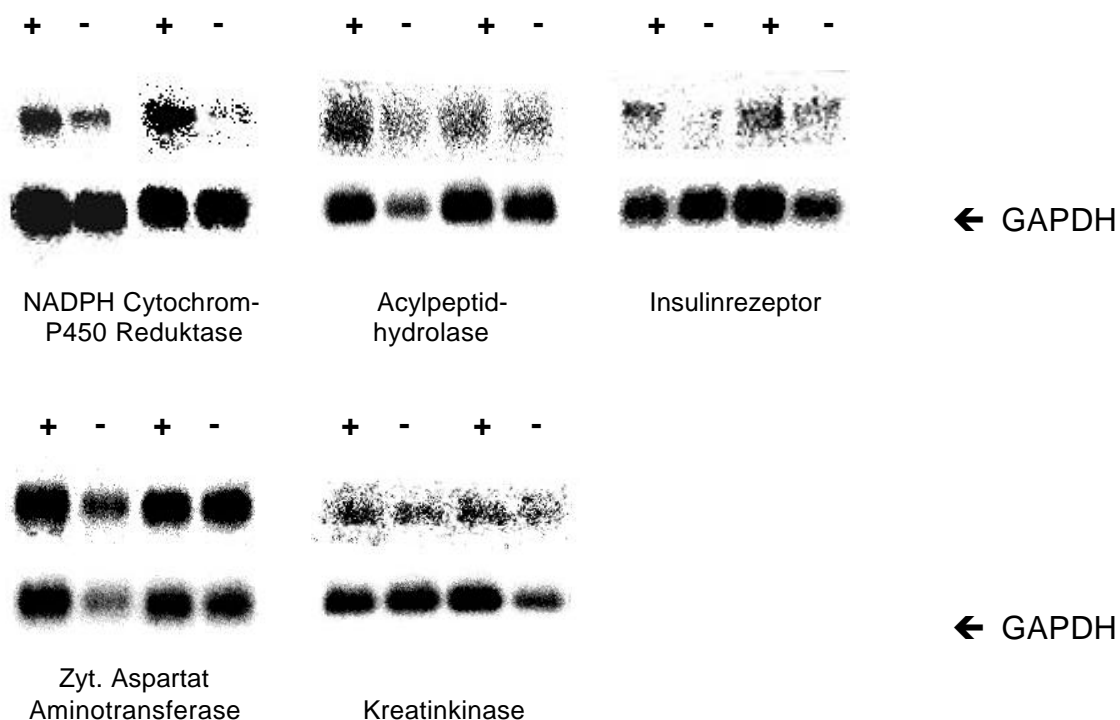


Abb. 4.36: Muskelspezifische Expression verschiedener zink-sensitiver Gene in Kontroll- (+) und Zinkmangeltieren (-) untersucht mittels Northern Blot-Analyse in 10µg Gesamt-RNA mit ³²P-dATP radioaktiv markierter cDNA

Insulinrezeptor, Acylpeptidhydrolase, NADPH-Cytochrom P450 Reduktase und die $\Delta 3$, $\Delta 2$ -Enoyl-CoA Isomerase wiesen in Übereinstimmung mit der Leberregulation eine Verminderung der Transkriptmenge im Zinkmangel auf. Auch im Muskel, wie bereits bei der Niere, lagen die Werte der Regulationshöhe aber unter denen der Leber. Für den Zinktransporter war eine leichte Erhöhung des Transkriptspiegels, im Gegensatz zur Reduktion in der Leber zu beobachten. Für die Kreatinkinase, 5-Aminolevulinat-Synthase, F0F1-ATP-Synthase UE c und die zytosolische Aspartat Aminotransferase war eine Expression, aber keine Zinkabhängigkeit der Regulation im Muskel nachweisbar.

Abbildung 4.37 fasst die Veränderung in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Zinkversorgung der untersuchten Transkripte noch einmal graphisch zusammen.

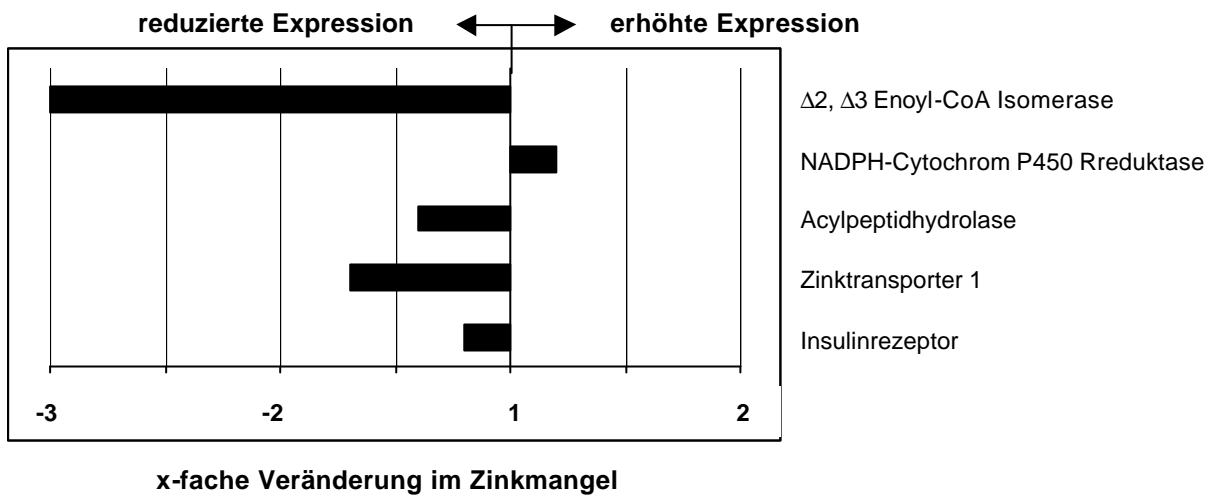


Abb. 4.37: **Änderung der Genexpression im Zinkmangel in Muskelgewebe.** Die Ergebnisse wurden aus der Northern Blot-Analyse bezogen auf das House keeping- Gen GAPDH ermittelt.

4.8.3 Darm

Eine Expression von 10 der 25 untersuchten zink-sensitiven Gene war im Darm detektierbar, von denen für acht eine Regulation nachgewiesen wurde. Abbildung 4.38 zeigt beispielhaft den Nachweis der mRNA von drei regulierten Genen mittels Northern Blot-Analyse.

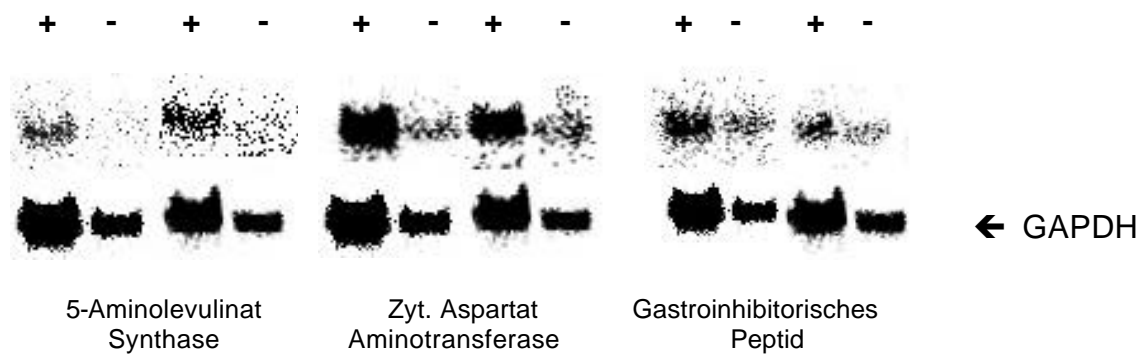


Abb. 4.38: **Darmspezifische Expression verschiedener zink-sensitiver Gene in Kontroll- (+) und Zinkmangeltieren (-)** untersucht mittels Northern Blot-Analyse in 15µg Gesamt-RNA mit ³²P-dATP radioaktiv markierter cDNA

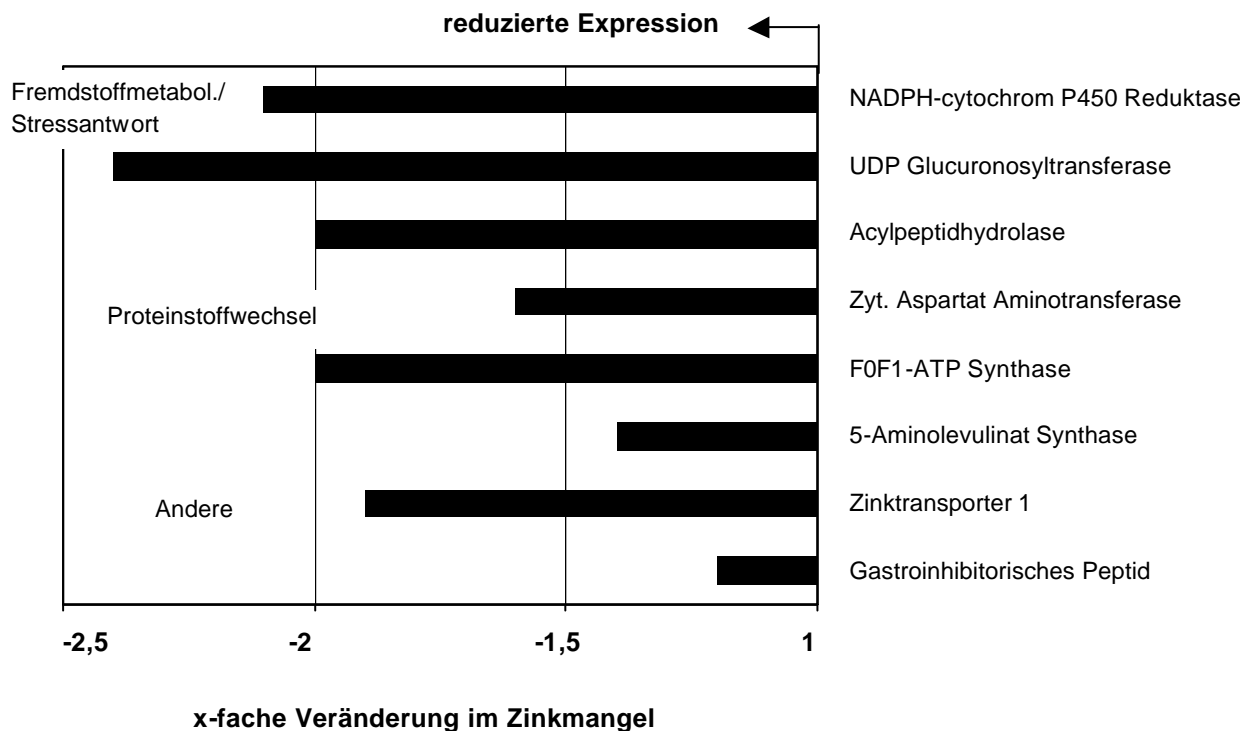


Abb. 4.39: Änderung der Genexpression im Zinkmangel in Darmgewebe. Die Ergebnisse wurden aus der Northern Blot-Analyse bezogen auf das House keeping- Gen GAPDH ermittelt.

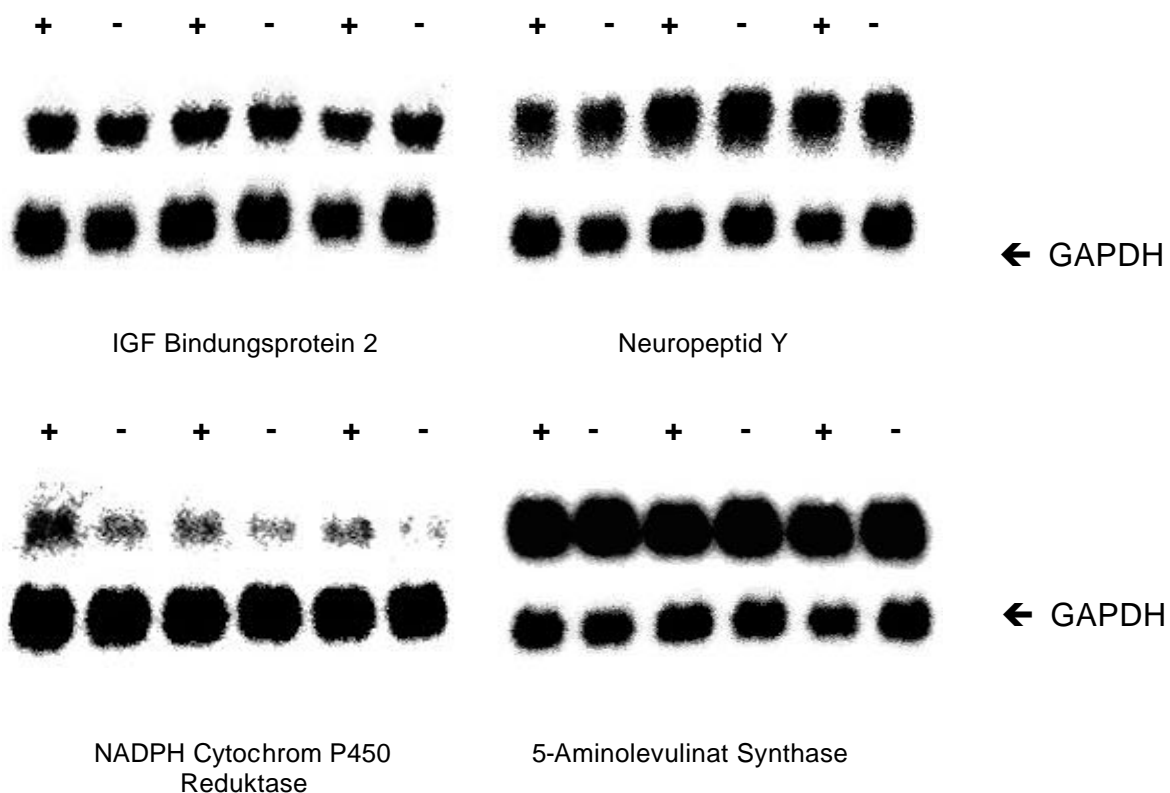
Für die ausgewählten zink-sensitiven Gene der Wachstumsachse und des Fettstoffwechsels konnte im Dünndarmepithel keine Expression nachgewiesen werden. Der Zinkmangel zeigte aber einen Einfluß auf Gene des Fremdstoffstoffwechsels (NADPH-Cytochrom P450 Reduktase, UDP Glucuronosyltransferase), des Proteinstoffwechsels (Acylpeptidhydrolase, zyt. Aspartat Aminotransferase) und andere wie F0F1-ATP Synthase (UE c), Zinktransporter 1, gastroinhibitorisches Peptid und 5-Aminolevulinat Synthase. Für Metallothionein war die nachgewiesene Expression so gering, dass eine Auswertung nicht möglich war.

4.8.4 Gehirn

Die Analysen wurde mit RNA aus Gesamtgehirngewebe durchgeführt und die Proben entsprachen daher einem Gemisch von RNA-Spezies verschiedenster Hirnregionen und Zelltypen.

Im Gehirn wurden 11 der 25 untersuchten zink-sensitiven Gene exprimiert. Im Falle von Metallothionein war die Expression zu gering, um sie auf dem Gewebemisch-*Blot* nachweisen zu können.

Die Expression der anderen detektierten Transkripte wies außer in einem Fall keine Regulation in Abhängigkeit von der Zinkversorgung auf. Für die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase konnte im Zinkmangel dagegen, wie in allen anderen Geweben, eine veränderte Expression nachgewiesen werden. Die unveränderte Expression der anderen Transkripte war gut detektierbar, wie in Abbildung 4.40 dokumentiert.



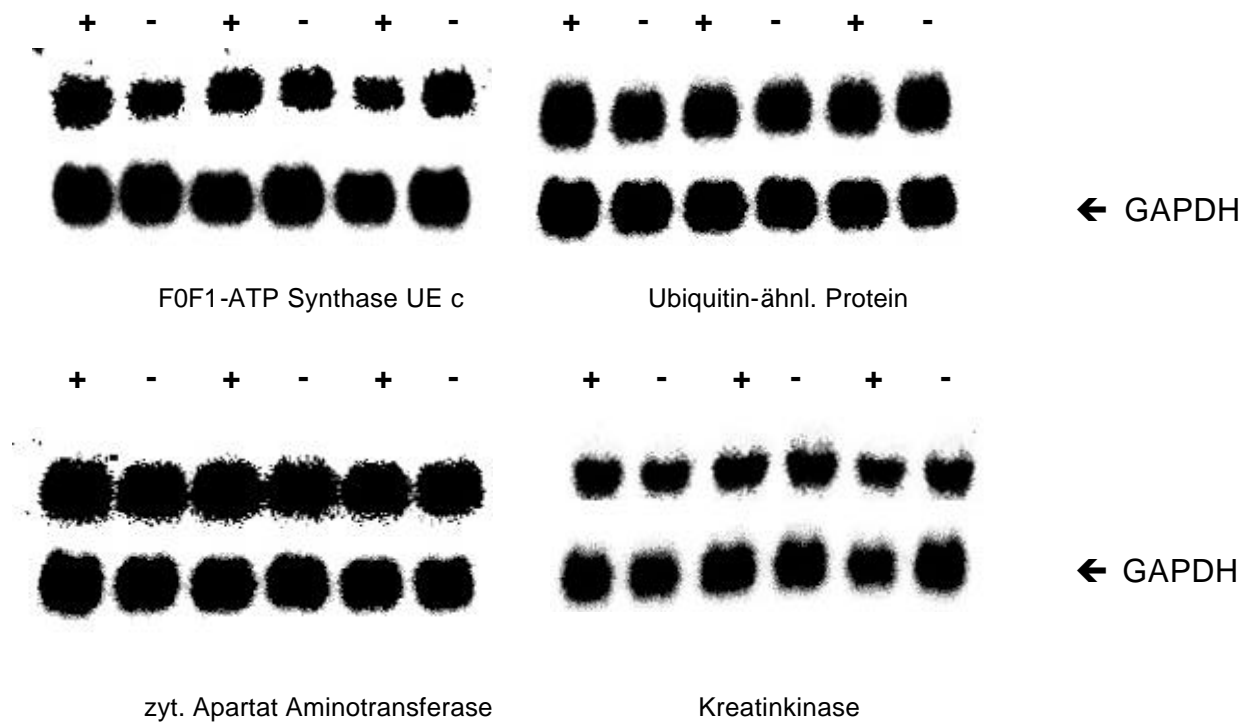


Abb. 4.40: Hirnspezifische Expression verschiedener zink-sensitiver Gene in Kontroll- (+) und Zinkmangeltieren (-) untersucht mittels Northern Blot-Analyse in 15µg aufgetragener Gesamt-RNA mit ³²P-dATP radioaktiv markierter cDNA

Die Befunde der Regulation im Gehirn sind in der folgenden Gesamtübersicht im Vergleich der Organe (Abb. 5.40) dargestellt.

Generell zeigte die gewebespezifische Expression der untersuchten Kandidaten, je nach untersuchtem Organ, starke Unterschiede in der Antwort auf den Zinkmangel. Es erwies sich, dass die Reaktion der Niere auf den Zinkmangel für die ausgewählten Transkripte der Leberantwort am ähnlichsten war.

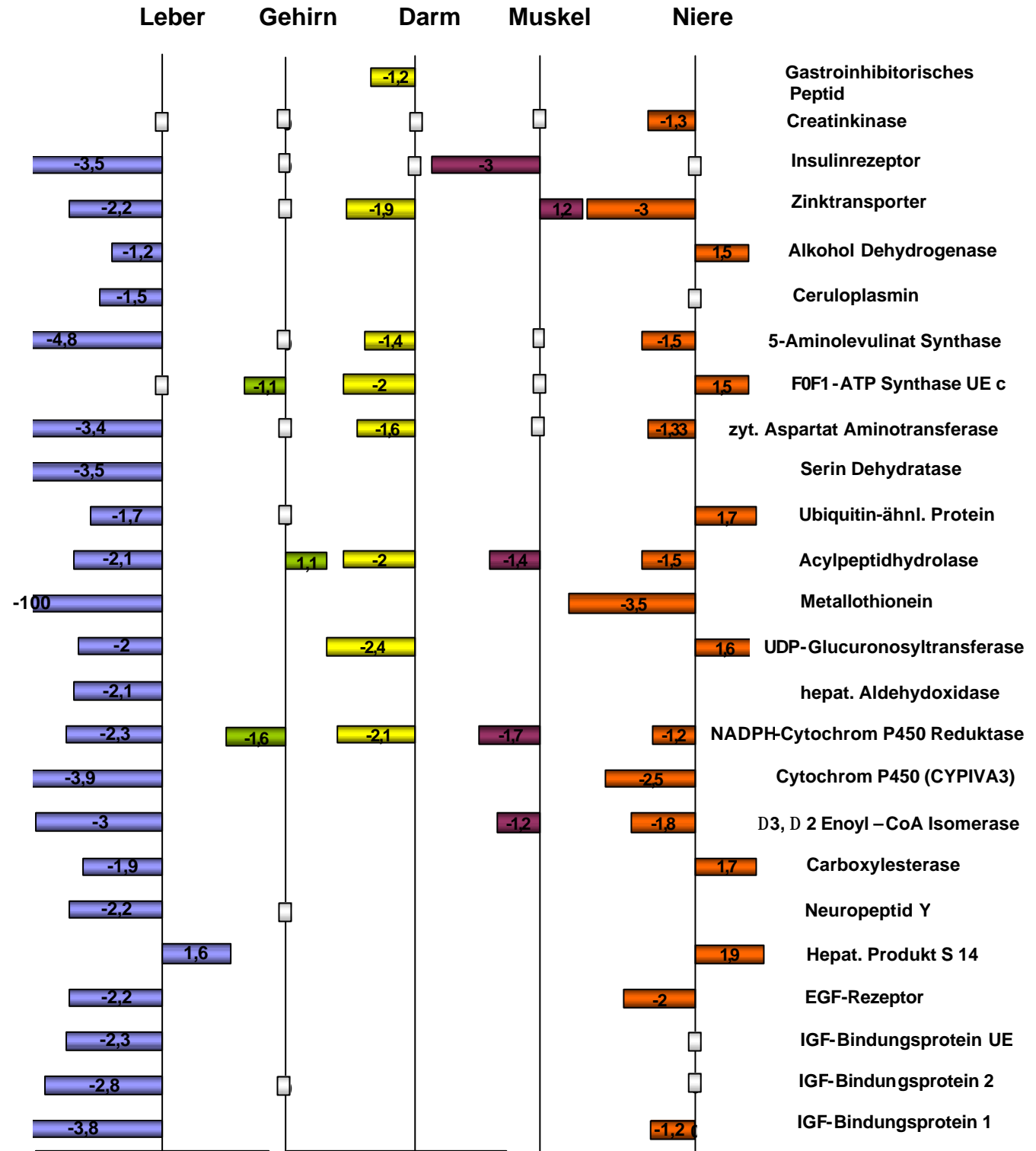


Abb. 4.41: **Organspezifische Änderung der Genexpression im Zinkmangel**, □ = exprimiert aber nicht reguliert; Daten aus der Northern Blot-Analyse der Gewebe; IGF= insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor

4.9 Bestimmung der Proteinexpression für ausgewählte Transkripte

Für ausgewählte Genprodukte, beispielsweise abgeleitet aus regulierten Genen des *Array-Screenings* oder bekannten zinkabhängigen Stoffwechselwegen, erfolgte eine Bestimmung der Proteinexpression mit der *Western Blot*-Analyse in Leber- und Nierengewebe.

4.9.1 Proteinexpression von ausgewählten Transkripte der Leber

Generell ließ sich die veränderte Poly(A)⁺-RNA-Expression in Zinkmangel- und Kontrolltieren auf Proteinebene nur in wenigen Fällen bestätigen (Abb. 4.42).

Die gleichmäßige Proteinbeladung des *Blots* wurde in allen Fällen mit Ponceau-S-Färbung des transferierten Proteins auf der Membran sichergestellt.

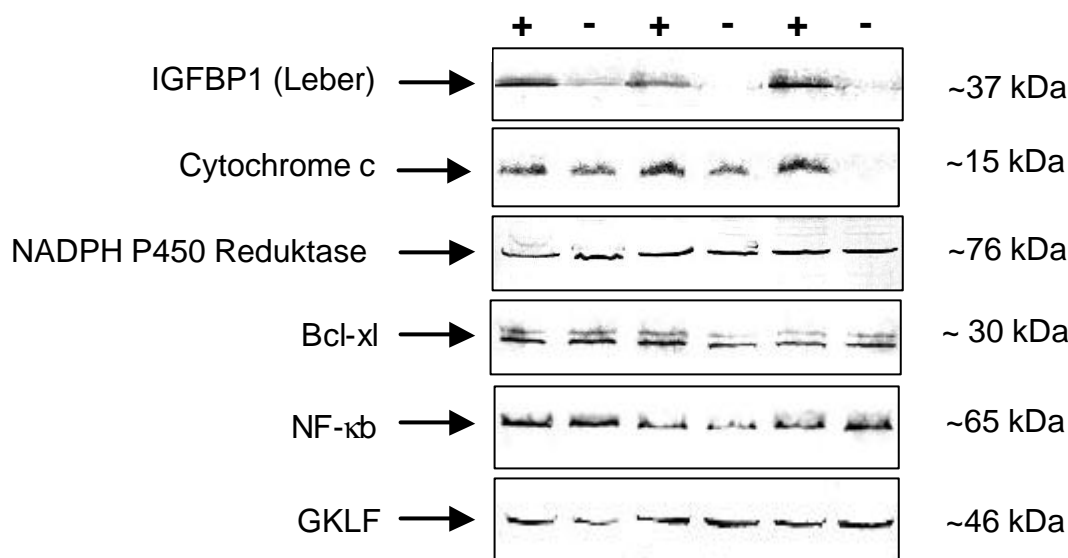


Abb. 4.42: Western Blot-Analyse ausgewählter Genprodukte in Lebergewebe von Kontroll- (+) und Zinkmangelratten (-); Auftrag: 50 µg Protein; 1. Antikörper: 1:500-Verdünnung; 2. Antikörper Anti-Ig-goat (Dianova) 1:1000-Verdünnung, gleichmäßige Proteinladung durch Ponceau-S-Färbung des Blots gesichert, GKLF = Kruppel-ähnlicher Faktor 4, (+ = Kontrolle, - = Zinkmangel)

Auf Proteinebene konnte für IGFBP1 in Übereinstimmung mit den Befunden der *Array*-Analyse eine Reduktion der Proteinmenge in der Leber nachgewiesen werden (Abb. 4.42). Auch für Cytochrom c zeigte sich eine Reduktion des Proteinspiegels im Zinkmangel. Das Protein der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase, dessen korrespondierendes Transkript in allen untersuchten Geweben eine Reduktion im Zinkmangel aufwies, zeigte sich in seiner Menge jedoch als unverändert. Alle weiteren untersuchten Genprodukte, der Transkriptionsfaktor Kruppel-ähnlicher

Faktor 4 (GKLF) und bcl-xl und NF-κB mit Funktion in der Apoptoseregulation, zeigten in der *Western Blot*-Analyse keine Veränderung des „*steady state levels*“ in Abhängigkeit vom Zinkstatus.

4.9.2 Proteinexpression von ausgewählten Transkripten der Niere

Auch in der Niere von Zinkmangel- und Kontrolltieren dokumentiert die Analyse ausgewählter Proteine wenige Veränderungen (Abb. 4.43).

Für β-Aktin konnte in der Niere unbeeinflusst vom Zinkstatus der Tiere eine gleichbleibende Expression des konstitutionellen *House Keeping*-Genprodukts nachgewiesen werden. Unabhängig davon erfolgte zusätzlich für alle *Blots* eine Überprüfung der Beladung und des Transfers durch Ponceau-S-Färbung.

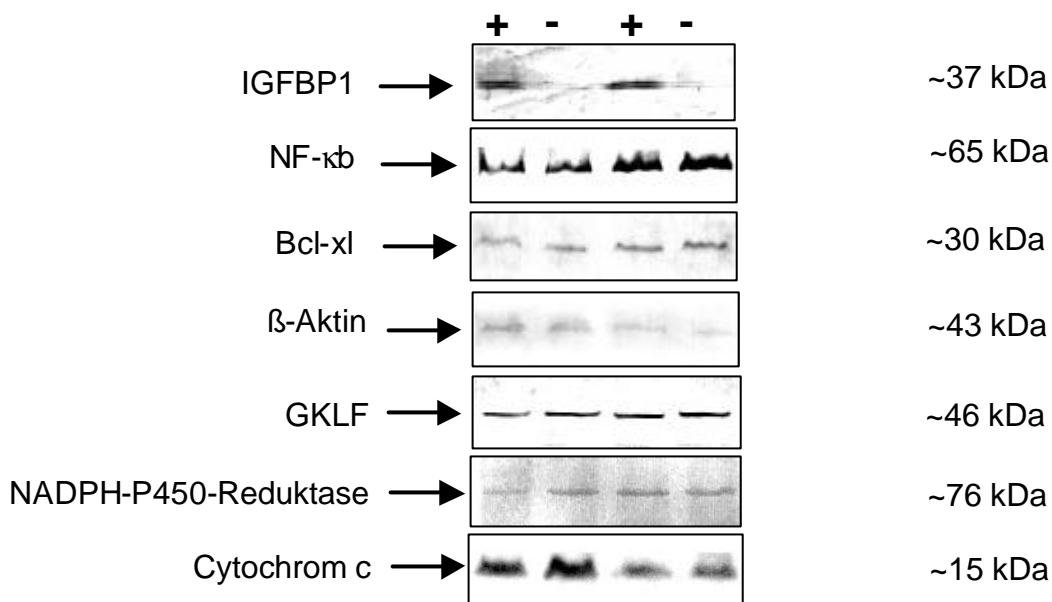


Abb. 4.43: *Western Blot*-Analyse ausgewählter Genprodukte in Nierengewebe von Kontroll- (+) und Zinkmangelratten (-); Auftrag: 50 µg Protein; 1. Antikörper: 1:500-Verdünnung; 2. Antikörper Anti-Ig-goat (Dianova) 1:1000-Verdünnung, gleichmäßige Proteinladung durch Ponceau-S-Färbung des Blots gesichert; GKLF = Kruppel-ähnlicher Faktor 4; , (+ = Kontrolle, - = Zinkmangel)

IGFBP1, für das auf transkriptioneller Ebene in der Niere eine vernachlässigbar schwache Verminderung (1,2) nachzuweisen war, zeigte in Übereinstimmung mit den Leberdaten eine deutlich verminderte Proteinmenge in Gewebe von Zinkmangelratten. Cytochrom c wies im Gegensatz zur Leber eine leichte Erhöhung der Proteinmenge. Für alle anderen untersuchten Proteine war keine Veränderung der Spiegel nachweisbar.

4.10 Einfluß des Zinkmangels auf den hepatischen Lipidmetabolismus

Die folgenden Studien dienten dem Nachweis metabolischer Veränderungen des hepatischen Stoffwechsels basierend auf den Befunden der Genregulation der Leber im Zinkmangel. Dazu wurde der Triglyceridgehalt und das Fettsäuremuster im Lebergewebe in Abhängigkeit von der Zinkversorgungslage bestimmt.

4.10.1 Bestimmung des Triglyceridgehaltes in der Fettfraktion der Leber

In der in Anlehnung an die Hexan-Isopropanol-Methode nach Hara und Radin (1978) gewonnenen Fettfraktion der Leber konnte nach enzymatischer Bestimmung ein erheblicher Unterschied im Triglyceridgehalt zwischen den Geweben der beiden Tiergruppen festgestellt werden. Die Zinkmangelgruppe zeigte eine signifikante Erhöhung der Triglyceridwerte bezogen auf das Leberfrischgewicht (38,7%) und bezogen auf die gewonnene Fettfraktion (44,9%) aus Lebergewebe (Abb. 4.44).

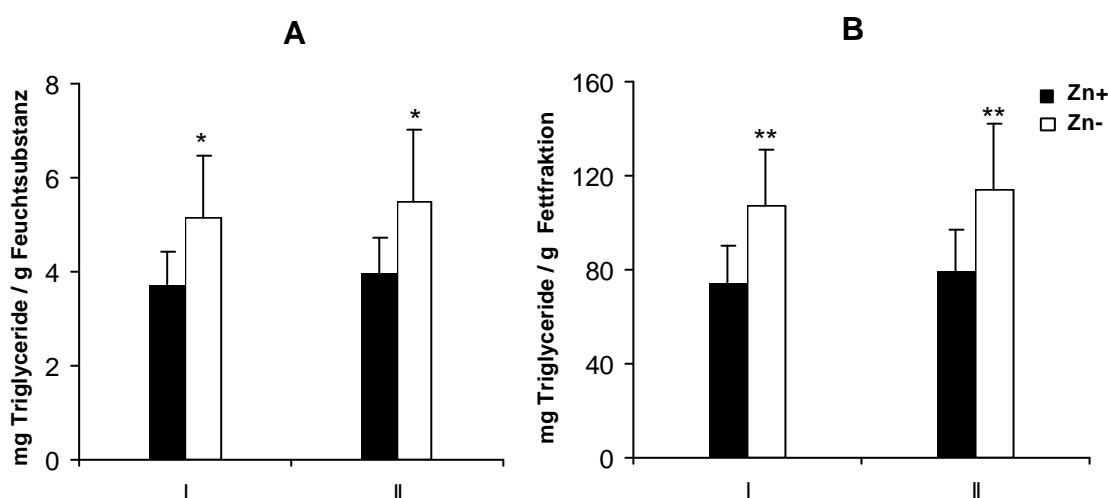


Abb. 4.44: Triglyceridgehalt in Lebergewebe von Kontroll- (Zn+) und Zinkmangeltieren (Zn-) (A) bezogen auf Leberfrischmasse (enzymatische Bestimmung, n=8, I= Standard Olivenöl, II= Standard Sonnenblumenöl; *(P<0,05)) und (B) bezogen auf extrahierte Fettfraktion der Leber (enzymatische Bestimmung, n=8, I= Standard Olivenöl, II= Standard Sonnenblumenöl; -), signifikante Unterschiede der Zinkmangelgruppe zur Kontrollgruppe sind mit * (P<0,05) bzw. ** (P<0,01) gekennzeichnet

4.10.2 Gaschromatographische Fettsäureanalyse der hepatischen Fettfraktion

Neben der Veränderung des Gesamttriglyceridgehaltes wurde auch das Fettsäuremuster der Leberfettfraktion von Kontroll- und Zinkmangeltieren bestimmt. Die Analyse des Fettsäuremusters von Kontroll- und Zinkmangeltieren zeigte signifikante Veränderungen sowohl in der Fraktion der Hauptfettsäuren (>1% an Gesamtfettsäuren) als auch in der Minorfettsäurefraktion (<1% an Gesamtfettsäuren). Vor allem der Gehalt ungesättigter Fettsäuren unterlag demnach einer Veränderung im Zinkmangel.

In der Analyse der Fettsäurezusammensetzung wurde zur Identifizierung über die Retentionszeit ein Standard mit 21 gängigen Fettsäuren eingesetzt. Abbildung 4.45 zeigt exemplarisch erhaltene GC-Chromatogramme von Kontroll- und Zinkmangeltieren.

Die Analyse der Fettsäuremuster dokumentiert für 5 Fettsäuren der Hauptfettsäurefraktion, wie auch für 7 Fettsäuren der Minorfettsäurefraktion eine signifikante Veränderung (Abb. 4.46). Neben den geänderten Triglyceridgehalten der Leber ließ sich in der Lipidfraktion also auch eine qualitative Veränderung durch den Zinkmangel nachweisen. Im Zinkmangel wurde der Gehalt an Stearinsäure und Arachidonsäure signifikant reduziert, wohingegen ein vermehrtes Vorkommen von X13, cis-9-Ölsäure, cis-11-Ölsäure, bei den Minorfettsäuren X2, X3, Capryl-, Linolensäure und Eicosapentaensäure nachgewiesen wurde.

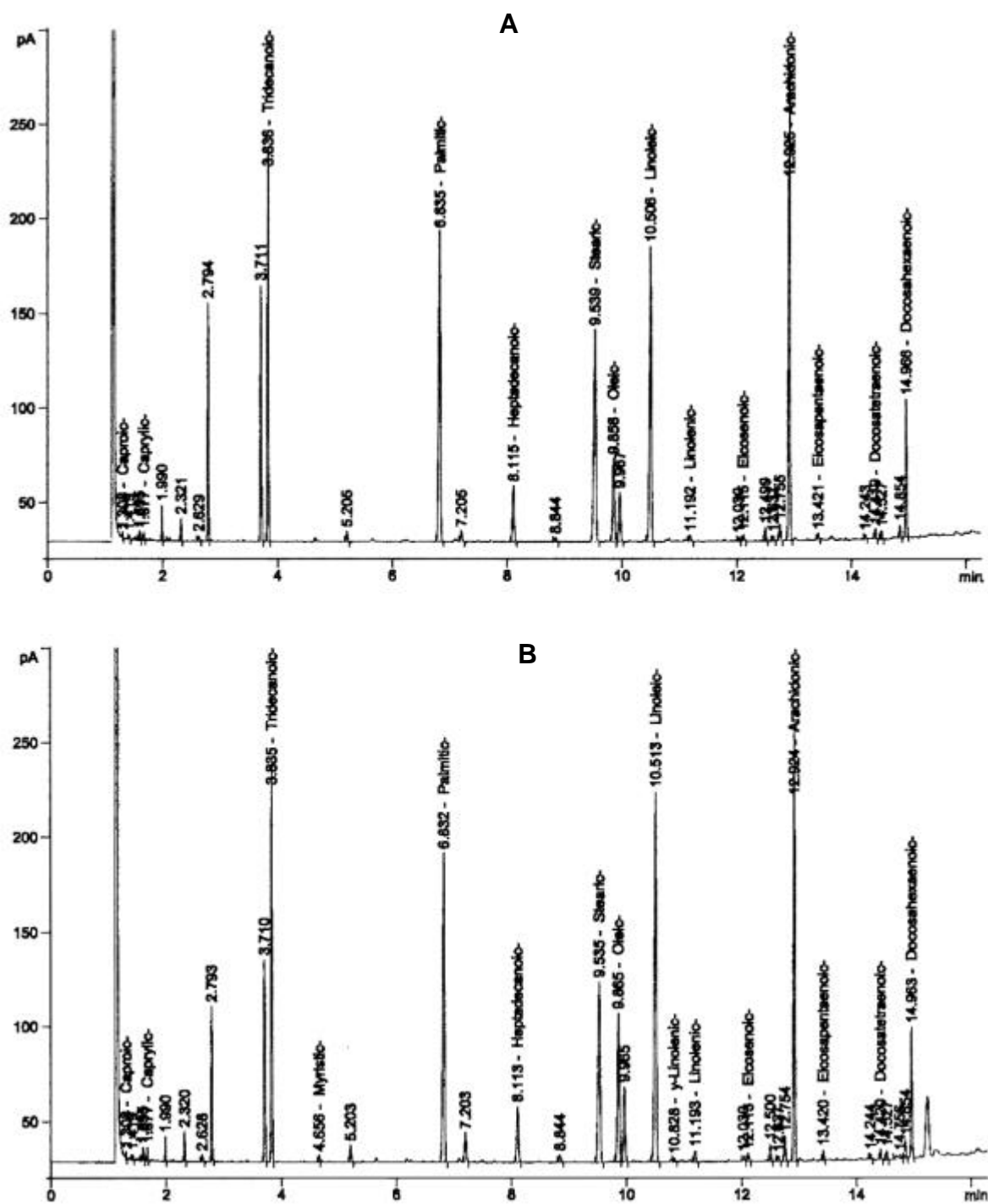


Abb. 4.45: Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der Leberfettfraktion im (A) Kontrolltier und (B) Zinkmangeltier

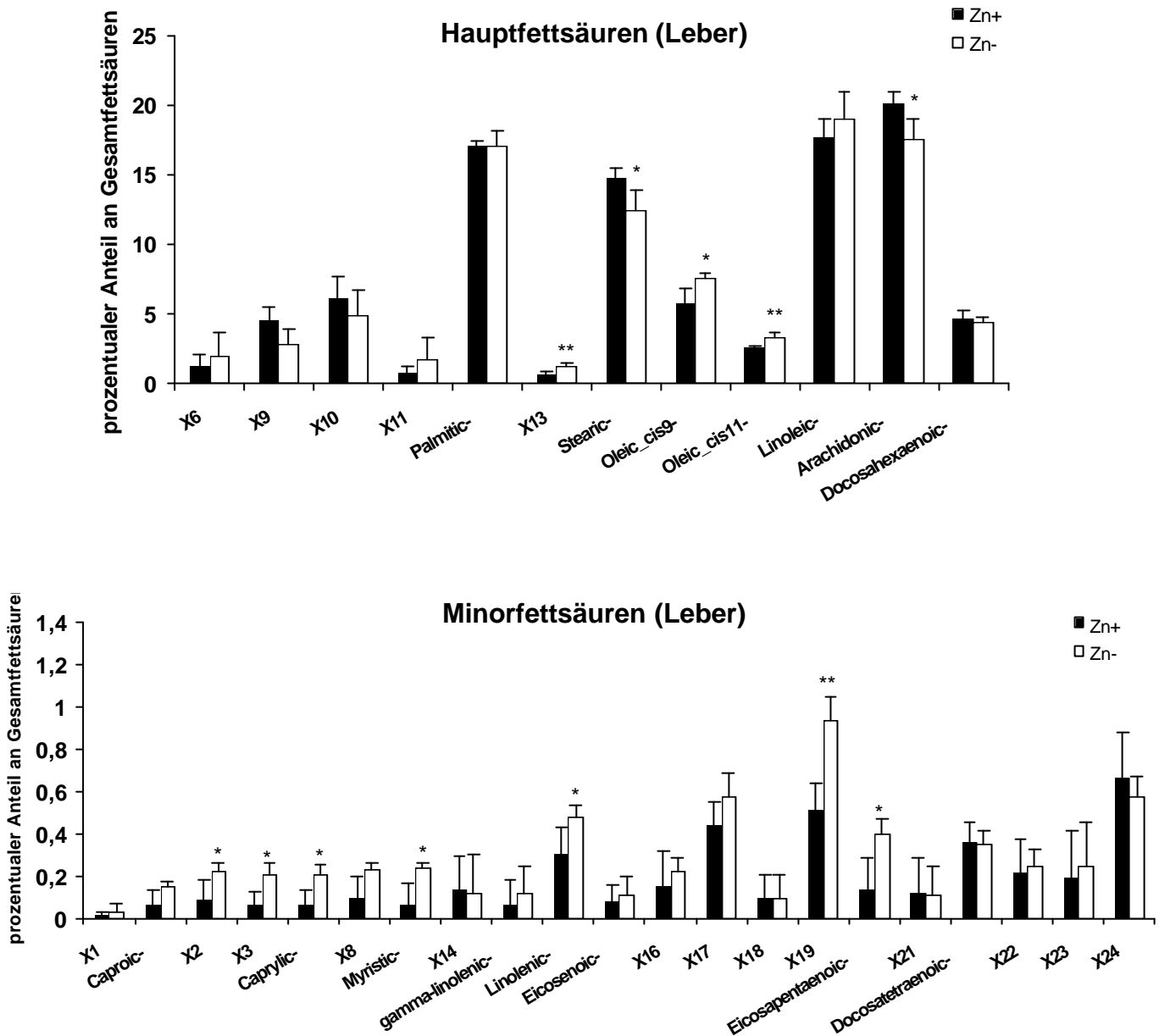


Abb. 4.46: Fettsäurezusammensetzung der Leberfettfraktion von Kontrolltieren (Zn+) und Zinkmangeltieren (Zn-), gaschromatographische Analyse, (n=6), Signifikante Unterschiede der Zinkmangelgruppe zur Kontrolle sind mit * (P<0,05) bzw. ** (P<0,01) angegeben; (Hauptfettsäuren = Anteil >1% an Gesamtfettsäuren; Minorfettsäuren = Anteil <1% an Gesamtfettsäuren) -, signifikante Unterschiede der Zinkmangelgruppe zur Kontrollgruppe sind mit * (P<0,05) bzw. ** (P<0,01) gekennzeichnet, X1-X24=Fettsäure im Standard nicht enthalten = Identität nicht bekannt

4.11 Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der Aktivitäten zinkabhängiger aber auch zinkunabhängiger Enzyme kann Aufschluß über den Zinkversorgungszustand des Organismus geben. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten fand im Serum, im Leberrohhomogenat und - aufgrund des ähnlichen Expressionsmusters - auch im Nierenrohhomogenat statt. Bestimmt wurden in Leber und Niere die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP), der Kreatinkinase (CK), der Aspartat-Aminotransferase (GOT) und der Laktatdehydrogenase (LDH). Die Auswahl der Enzymmessungen erfolgte unter den Gesichtspunkten der Überprüfung eines möglichen Einflusses von Zink über die Änderung der Genexpression (GOT, CK) oder da Zink ein essentieller Bestandteil des Enzyms für dessen Katalyse ist (LDH und AP).

4.11.1 Aktivität der alkalischen Phosphatase

Für das zinkabhängige Enzym alkalische Phosphatase konnte im Zinkmangelzustand, neben verminderter Aktivität im Serum, auch im Leber- und Nierenrohhomogenat eine signifikante Aktivitätsabnahme nachgewiesen werden (Abb. 4.47). Auffällig war die um ein Vielfaches höhere basale Aktivität im Nierengewebe.

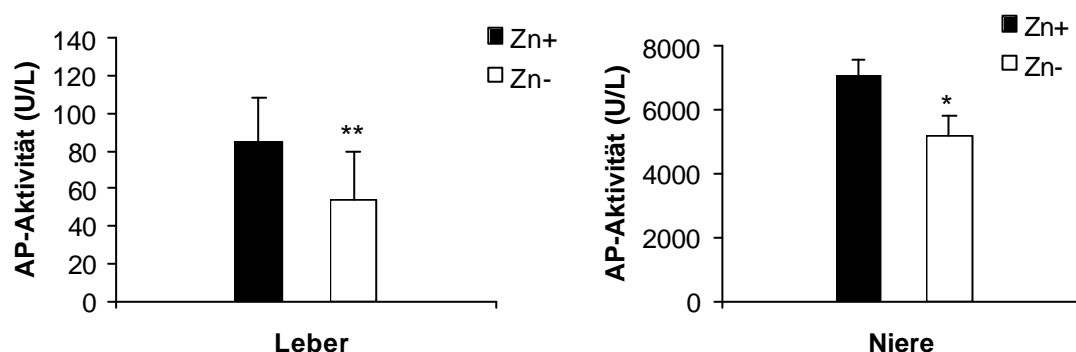


Abb. 4.47: Aktivität der alkalischen Phosphatase in Rohhomogenaten der Leber ($n=4$) und der Niere ($n=3$) von Kontroll ($Zn+$)- und Zinkmangeltieren ($Zn-$), signifikante Unterschiede der Zinkmangelgruppe zur Kontrollgruppe sind mit ** ($P<0,01$) gekennzeichnet

4.11.2 Aktivitäten der Aspartat Aminotransferase, der Kreatinkinase und der Laktat-Dehydrogenase

Das Transkript der Aspartat Aminotransferase (GOT) zeigte sowohl in der *Array*- als auch in der *Northern Blot*-Analyse eine Verminderung der Expression in der Leber. In der Niere von Zinkmangelratten war die Expression dagegen nur schwach vermindert (-1,33). Die Enzymaktivität der GOT war im Leberrohhomogenat am höchsten und wies eine signifikante Verminderung in Zinkmangeltieren auf. Die Aktivität des Enzyms in Nierenrohhomogenat und Serum zeigte sich dagegen vom Zinkstatus fast unbeeinflusst (Abb. 4.48 A).

Das Transkript der mitochondrialen Kreatinkinase zeigte in der *Array*-Analyse eine Regulation im Lebergewebe. Mittels *Northern Blot*-Analyse war eine Verifizierung aufgrund zu geringer Expression jedoch nicht eindeutig möglich. Die Enzymaktivitäten in Serum und Leberrohhomogenat waren signifikant reduziert, die in der Niere blieb im Zinkmangel aber unverändert. Die Aktivität des Enzyms in der Niere wies keine signifikante Veränderung in Abhängigkeit von der Zinkversorgungslage auf. Die Kreatinkinase-Aktivität im Serum dient als Indikator einer Gewebeschädigung und die Bestimmung im Serum erfasst somit die Gesamt-Kreatinkinase-Aktivität aller ins Serum übergetretenen Isoformen. Die Kreatinkinase zeigte eine im Vergleich zu den Organen hohe Aktivität mit einer signifikant verminderten Aktivität im Zinkmangelzustand (Abb. 4.48 B).

Das zinkabhängige Enzym Laktat-Dehydrogenase wies in der *Array*-Analyse eine erhöhte Expression (+1,7) auf, welche mittels *Northern Blot* jedoch nicht bestätigt wurde. Abbildung 4.48 C zeigt, dass in keinem der untersuchten Gewebe eine signifikante Veränderung der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität unter den gewählten Versuchsbedingungen beobachtet werden konnte und somit hier die funktionellen Daten die der Expression bestätigen und daher der *Array*-Befund als falsch-positiv bewertet werden muß.

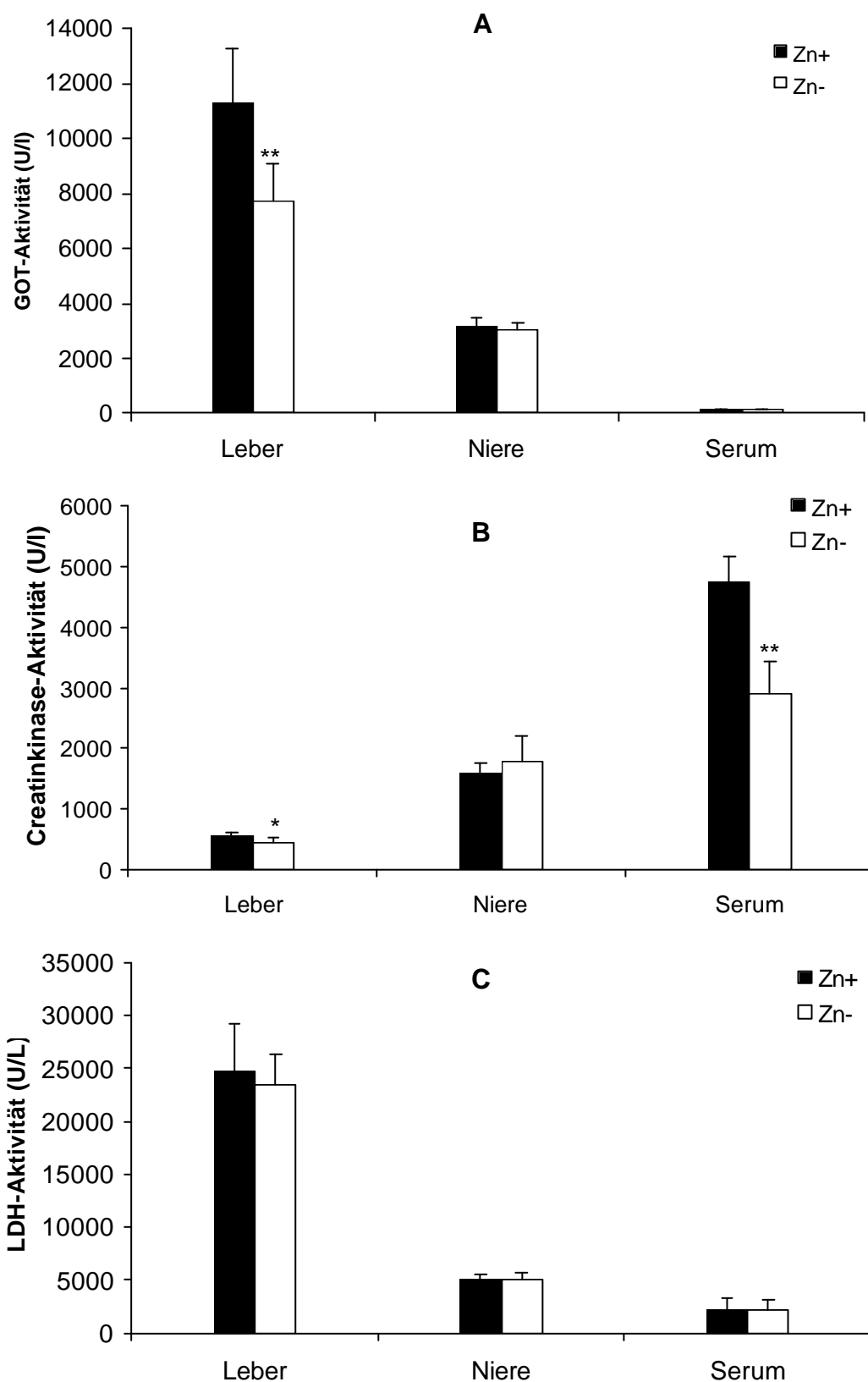


Abb. 4.48: *Aktivität der (A) Aspartat-Amino-Transferase in Rohhomogenaten der Leber (n=7) und Niere (n=5) und im Serum (n=3); (B) der Kreatinkinase in Rohhomogenaten der Leber (n=7) und Niere (n=6) und im Serum (n=3) und (C) der Laktat-Dehydrogenase in Rohhomogenaten von Leber (n=8), und Niere (n=6) und im Serum (n=5) von Kontroll- (Zn+) und Zinkmangeltieren (Zn-), signifikante Unterschiede der Zinkmangelgruppe zur Kontrollgruppe sind mit * (P<0,05) bzw. ** (P<0,01) gekennzeichnet*

4.12 Einfluß des Zinkmangels auf die Konzentration anderer zweiwertiger Kationen im Lebergewebe

Die Analyse der Kalzium- bzw. Magnesiumgehalte in der Leber von Zinkmangeltieren sollte einen Hinweis auf eine mögliche Beeinflussung der Homöostase anderer Mineralstoffe im Zinkmangel geben. Indizien, dass die Kalzium-Homöostase im Zinkmangel verändert ist, lieferten bereits Studien von Browning und O'Dell (1994), wonach die Kalziumaufnahme in Neuronen/Synaptosomen im Zinkmangel gestört ist. Es ist ebenso bekannt, dass eine Magnesium-Mangelversorgung den Zinkstatus beeinflusst (Hurley *et al.*, 1976). So führte der Magnesiummangel zu einem verminderten Zinkgehalt in Föten von schwangeren Zinkmangeltieren.

Die hier vorgelegte Analyse des Lebergewebes zeigte für Magnesium eine signifikante Verringerung der Konzentration im Zinkmangel, während die Kalziumkonzentration dagegen unverändert blieb (Abb. 4.49).

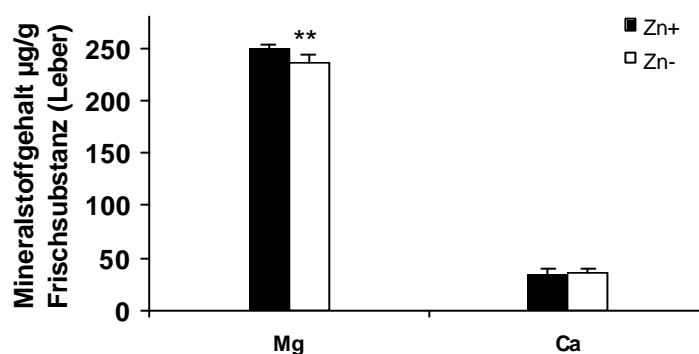


Abb. 4.49: *Magnesium- und Kalziumgehalte in Lebergewebe* von Kontroll- (Zn+) und Zinkmangeltieren (Zn-) ermittelt durch AAS-Analyse, $n=6$, signifikante Unterschiede der Zinkmangelgruppe zur Kontrollgruppe sind mit ** ($P<0,01$) angegeben

5 Diskussion

Dem essentiellen Spurenelement Zink wird aufgrund seiner vielfältigen Stoffwechseleffekte schon seit mehreren Jahrzehnten großes Interesse entgegen gebracht. Während die klinisch-manifesten Zinkmangel-Phänomene recht gut verstanden werden, fehlen für das präklinische Stadium verlässliche Diagnosemethoden und valide Biomarker. Darüber hinaus sind die molekularen Mechanismen, über die Zink seine Wirkungen auf sehr viele Stoffwechselprozesse ausübt, bisher nur unzureichend verstanden. Dem Nachweis spezifischer, vom Zinkversorgungszustand regulierter Gene, dienten in der Vergangenheit v.a. klassische Hybridisierungsverfahren für einzelne Genprodukte oder wenige Transkripte im parallelen Ansatz (*Differential Display, Subtracted Library Hybridisation*). Die modernen Hochdurchsatz-Techniken der Biologie eröffnen dagegen erstmals die Möglichkeit, globale Änderungen der Gen- und Proteinexpression in Abhängigkeit von der Nährstoffversorgung zu analysieren.

5.1 Screening-Methoden zur Genexpressionsanalyse

Vorherrschendes Ziel der experimentellen Studien der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung zink-sensitiver Gene durch Einsatz unterschiedlicher *DNA-Array*-Techniken und die Validierung der Befunde durch *Real time RT-PCR*, *Northern Blot* sowie Proteomanalyse. Bevor ausgewählte Ergebnisse und Erkenntnisse dargestellt werden, soll eine kritische Würdigung der eingesetzten Techniken vorgenommen werden, da damit auch die Beurteilung der erhobenen Befunde verbunden ist.

5.1.1 Mustererkennung mittels elektronischem *Array*-System

Ziel dieses Projektteils war es, mittels eines definierten Fängersatzes die vollständige Verteilung aller mRNA-Spezies einer Probe (Gewebeproben aus dem Zinkmangel und von Kontrolltieren) auf dem elektronisch adressierbaren *Array* zu erreichen. Das Fängerdesign sah vor, dass der invariable Oligo-(dT)-Bereich dazu genutzt werden kann, die Poly(A)⁺-Enden der mRNA zu binden, während der anschließende dreibasige variable Bereich alle Variationsmöglichkeiten abdeckt und die mRNA-Spezies komplementär dazu sortieren kann. Kernproblem dieses experimentellen Ansatzes

war die unspezifische Bindung der mRNA-Moleküle v.a. an Fängermoleküle mit einer hohen Thymin-Anzahl in den endständigen drei Basen.

Die Erklärung, warum unter den gewählten und vielfach variierten Versuchsbedingungen eine Mustererkennung mittels des elektronischen *Array*-Systems nicht gelang, muß somit in spezifischen molekularen Interaktionen gesucht werden, die mit dem Design und dem Hybridisierungsverfahren dieses speziellen *Microarray*-Systems verbunden sind.

Die Diffusionsgeschwindigkeit der zu hybridisierenden Probenmoleküle war dabei nicht die limitierende Größe, da eine Konzentrierung der Probe über dem Fängermolekül durch den elektrischen Feldgradienten erfolgt. Vielmehr erwies sich die Spezifität der Hybridisierung als kritischer Faktor. Die Spezifität einer Bindung zeichnet sich durch stabile Duplexbildung aus. Die Bildung eines Duplex beginnt an einer kleinen Kernstelle, bedingt durch die spezifische Interaktion weniger Basen. In der Folge schwankt der Prozess, je nach äußeren Bedingungen, zwischen Paarung und Separation. Basen, frei verfügbar zur Basenpaarung, treiben dabei die Duplexbildung voran. Bei nicht-komplementären Basen oder wenn stabile inhibierende Strukturen vorhanden sind, kann dies zu einem Zerfall des „Reißverschluß“-Komplexes führen, d.h. Duplexstabilität und Duplexmenge hängen von der Stabilität des Startkernkomplexes ab. Wenn nun, wie hier beim elektronischen *Array*-System, Fängermoleküle sehr kurz und Probenmoleküle sehr lang sind, beginnt die Initiierung der Duplexbildung an internen Stellen der langen Proben. Die Verfügbarkeit von Komplexbildungsstellen in der Probe wird durch die Sekundärstruktur determiniert, da intramolekulare Basenpaarungen unter den wenig stringenten Bedingungen der Hybridisierung an kurze Oligomere relativ stabil sind. Der Effekt der Probenstruktur bei der Hybridisierung an längere *PCR*-Produkte erscheint dagegen weniger bedeutsam als bei Oligonukleotidfängern, da die Hybridisierung bei diesem *Array*-System unter stringenteren Bedingungen durchgeführt werden kann, die mit einem Aufschmelzen der meisten Sekundärstrukturen verbunden ist. Diese Parameter sind jedoch von ebenso großer Bedeutung bei Hybridisierungsvorgängen auf Oligonukleotid-basierenden *Arrays* (Southern *et al.*, 1999).

Generell erscheint es daher sinnvoller, die Sequenzkomplexität für das Erlangen einer spezifischen Hybridisierung in angemessener Hybridisierungszeit zu reduzieren, wie sie u.a. bei den ebenfalls eingesetzten *cDNA*-*Arrays* durch ziel-

sequenzspezifische cDNA-Probensynthese realisiert ist. Für die Mustererkennung mittels elektronischem *Array* wurde die Proben-RNA deshalb auf eine Länge gekürzt, die weitgehend der der Oligonukleotidfänger entsprach. *Mismatches* im endständigen Bereich wirkten, im Gegensatz zu *Mismatches* im Zentrum eines Oligonukleotids, kaum destabilisierend und sind somit schwierig durch Hybridisierung zu diskriminieren. Im gewählten Ansatz zum Fangen aller vorkommenden mRNA-Spezies (Poly(A)⁺-RNA-Spezies) beruhte das Konzept allerdings auf einer endständigen Diskriminierung, genauer in einem *Mismatch* der terminalen drei Basen am 3'-Ende des Fängers. Zur Umgehung des Problems der endständigen *Mismatch*-Diskriminierung wurde eine Detektion mittels reverser Transkription durchgeführt, da die Polymerase an endständigen nicht-komplementären Basen normalerweise nicht verlängernd wirkt. Allerdings wurden durch die Wahl dieser Markierungsmethode auch ausgebildete Sekundärstrukturen der langen Proben für die Kettenverlängerung durch die Polymerase genutzt, was zur Generierung artifizieller Signale führte. Es ist daher anzunehmen, dass die hohe Bindungseigenschaft des LNA-haltigen Oligo-d(T)-Bereichs des Fängers des ersten Fängerdesigns gegenüber des Poly(A)⁺-Endes der Probe überwog, verglichen mit der spezifischen sehr kurzen variablen und sortierenden Sequenz im Anschluß. Die Beobachtung, dass hohe Signalintensitäten an Besetzungsplätzen mit Fängern detektiert wurden, bei denen auch im dreibasigen diskriminierenden Bereich das Nukleotid Thymin vorkommt, lässt den Schluß zu, dass *Mismatches* der übrigen Basen eine Bindung z.B. einer reinen Poly(A)⁺-Sequenz der Probe an den Fänger nicht verhindern, d.h. das Poly(A)⁺-Ende der Probe band meist unspezifisch an den Fänger.

Der Semikonduktor-*Chip* besitzt darüber hinaus im Gegensatz zu den kommerziell verfügbaren Glasträger-*Arrays* durch seine Permeationsschicht eine poröse Oberfläche, in die lange Probenmoleküle bei elektrophoretisch getriebener Hybridisierung eingedrungen und verblieben sein können. Die Detektion möglicher Sekundärstrukturen dieser eingefangenen Moleküle durch die enzymatische Verlängerung führte zudem zu einem hohen Hintergrundsignal und reduzierte damit die Trennschärfe der Detektion. Eine moderate Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses konnte durch Anlegen einer Gegenspannung erreicht werden, da locker in der Permeationsschicht verfangene Moleküle dabei wohl entfernt wurden. Diese Probleme wurden auch vom Hersteller des *Array*-Systems erkannt und sollen durch veränderte Materialien für die Oberflächenbeschichtung behoben werden.

Auch die zur vollständigen Verteilung des Transkriptoms notwendige Teilung der Fängersequenzen in einen invariablen, fangenden (Oligo-dT) und einen variablen, diskriminierenden Bereich (alle möglichen Kombinationen einer dreibasigen Sequenz) stellt noch ein großes Problem dar. Zwar ist damit die Länge aller Fänger identisch, ein Angleichen der Schmelztemperatureigenschaft der Fänger ist dadurch jedoch nicht möglich. Neben diesen molekularen Aspekten schien aber vor allem die Kürze der diskriminierenden Sequenz nach dem invariablen Part des Fängers ausschlaggebend gewesen zu sein. Die geringe erreichte Auflösung ließe sich durch die Entwicklung eines größeren *Array*-Formats und damit der Möglichkeit zur Verlängerung des diskriminierenden Bereichs beheben. Verbesserte Protokolle zum Anlegen einer Wechsellspannung zur Verminderung unspezifischer Bindung und die Verbesserung der Auslesetechnik durch kumulative Detektion der Fluoreszenz lassen eine bessere Sensitivität und Detektierbarkeit erwarten. Auch die Untersuchungen mit veränderten Fängern deuten darauf hin, dass eine Erhöhung der Spezifität der Bindung erreicht werden kann und durch Einsatz von LNA-Molekülen im Bereich der diskriminierenden Basen weitere Optimierungsmöglichkeiten gegeben sind. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es im Rahmen dieses Vorhabens nicht gelungen ist, das elektronische *Array*-System trotz seiner grundsätzlichen überzeugenden Vorzüge auch zur Expressionsprofilierung durch Mustererkennung nutzbar zu machen.

5.1.2 Kommerzielle *Array*-Systeme zur Hochdurchsatz-Expressionsanalyse

Ziel der Anwendung der *Array*-Techniken war, ein möglichst umfassendes Bild zink-abhängiger Genexpression zu erhalten und neue Marker für den Versorgungszustand zu finden. Unter Einsatz verschiedener *Array*-Typen (Nylon-*Macroarray* und Glasträger-*Microarray*) ist es gelungen, vor allem in der Leber eine Vielzahl regulierter Gene zu identifizieren. Die eingesetzte Methode erwies sich generell als geeignet, wenngleich die Deutungsmöglichkeit der erhaltenen Befunde noch begrenzt ist. Die intensiv und weltweit geführte Diskussion über Nutzen und Grenzen *Array*-generierte Datenmengen wurde zum Anlass genommen, auch hier eine kritische Betrachtung der Methoden vorzunehmen. Im folgenden soll deshalb auf einige Probleme bei der Anwendung der *Screening*-Methoden näher eingegangen werden.

Sensitivität

Die Fragestellung ließ eine hohe Anzahl durch einen Zinkmangel regulierter Gene erwarten. Mittels beider *Array*-Verfahren wurden zahlreiche Veränderungen im Transkriptom detektiert, wenngleich die geringe Stärke der Expressionsveränderung überraschte. Letztlich erwies sich das seit längerer Zeit zur Diagnostik des Zinkmangels bestimmte Transkript des Metallothioneingens auch hier als am stärksten reguliert. Auch O'Shaughnessy *et al.* (2000) wiesen in ihren *Microarray*- und Proteomanalysen von humanen Epidermal-Stammzellen und differenzierteren Tochterzellen auf die sehr geringen Unterschiede der Expressionshöhe hin. Sie berichten, dass sich die RNA-Spiegel differentiell exprimierter Gene selten mehr als um den Faktor zwei unterschieden.

Diese geringe Stärke der Veränderung der Transkriptspiegel könnte einerseits bedeuten, dass Effekte auf Ebene des Phänotyps nicht notwendigerweise eine sehr starke Expressionsänderung benötigen. Andererseits könnte die geringe Amplitude der Änderung durch die eingesetzte Technik, z.B. durch eine unzureichende Sensitivität der Methoden bedingt sein. So finden Taniguchi *et al.* (2001) bei einer systematisch vergleichenden Analyse von *Array*- und *Northern Blot*-Daten durchweg höhere Unterschiede der Expression beim Nachweis einzelner Transkripte. Auch in den hier vorliegenden Studien zeigten die Befunde aus dem *Northern-Blotting* in der überwiegenden Zahl der Fälle (65%) eine stärkere Veränderung der Expressionshöhe als beim Einsatz der *Arrays*. Möglicherweise auch Folge der geringen Sensitivität der *Array*-Technik ist der Befund, dass Gene (u.a. Apolipoprotein AI, Aldolase B, Transthyretin), für die eine starke Regulation durch Zink bereits nachgewiesen wurde, mittels *Array* nicht erfasst werden konnten (Wu *et al.*, 1998; Shay und Cousins, 1993; Kimball *et al.*, 1995). Die Nachweisempfindlichkeit der *Array*-Techniken ist gegenüber den klassischen Expressionsnachweismethoden geringer, was jedoch zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Zahl regulierter Gene und ihrer Regulationshöhe führen könnte.

Die Tatsache, dass die überwiegende Anzahl der Transkripte im experimentellen Zinkmangel der Ratte eine reduzierte Expressionshöhe aufwies, wirft die Frage nach einem Einfluss der Nachweismethode auf. Allerdings ließ sich dies mit beiden *Array*-Systemen unabhängig voneinander nachweisen, also mit radioaktiver wie fluoreszenzoptischer Markierung. Weiterhin bestätigte die *Northern Blot*-Analyse in der Mehrzahl der Fälle die Verminderung der RNA-Spiegel. Damit scheint dieser

Befund nicht durch die Methodik bedingt zu sein. Ein Einfluss der *Array*-Hybridisierung auf den selektiven Nachweis könnte jedoch dadurch gegeben sein, dass Transkripte mit sehr hohem Vorkommen in der Zelle bei gleichzeitig erhöhter Expression durch das Erreichen der Sättigungsgrenze des Systems nicht mehr verlässlich erfasst werden können. Auch im umgekehrten Fall, d.h. bei einer basal sehr geringen Expressionshöhe eines Transkriptes (unterhalb der Detektionsgrenze des Systems) würde bei einer weiteren Verminderung des RNA-Spiegels das Signal unterhalb der Detektionsgrenze bleiben und damit nicht als reguliert identifiziert werden können. Dieses Problem besteht bei Analyse einzelner Transkriptspiegel, beispielsweise durch *Northern Blot*-Analyse, praktisch nicht, da hier die Auslesezeit des Signals optimal an das jeweilige Transkript angepasst werden kann. Soll aber die Expressionshöhe mehrerer tausend Gene gleichzeitig erfasst werden, bleibt das intrinsische Problem, dass bei der Vielzahl von Transkripten, ihrem stark variierendem Konzentrationsbereich und einer gegebenen Sensitivität, nicht alle Gene gleichermaßen gut erfasst werden können.

Eine weitere Bestätigung dafür, dass die Mehrheit der identifizierten Transkripte im Zinkmangel tatsächlich geringer exprimiert wird, lieferte eine unabhängige Auswertungsmethode der *Array*-Daten. Hierbei wurde eine Normalisierung unabhängig von einzelnen Bezugsgrößen (z. Bsp. *House keeping*-Gene), auf die Gesamtintensität der *Array*-Signale nach Hintergrundabzug vorgenommen. Unter der Annahme, dass > 80 % der Zielsequenzen keiner Veränderung unterliegen und somit die Summe der Signalintensitäten repräsentativ für die aufgetragene Probenmenge ist, kann eine relativ robuste Methode zur Normalisierung angewendet werden (Kroll und Wölfl, 2002). Eine Konstanz des Expressionsniveaus fand sich bei den vorliegenden Versuchen bei weit mehr als 90% der untersuchten Genen. So ließen sich in der Leber nur 6,5 % der exprimierten Gene als differentiell reguliert bestimmen. In Übereinstimmung mit anderen Befunden an metabolisch aktiven Geweben, konnten vergleichbare Anteile regulierter Gene nachgewiesen werden (Toulouse *et al.*, 2000). Nicht einsetzbar ist die globale Normalisierungsmethode bei *Arrays*, die eine kleinere Auswahl spezifischer, auf eine Fragestellung (z. B. auf die Analyse bestimmter Signalketten) ausgerichteter Gene, mit zu erwartenden starken Veränderungen der Expressionshöhe, nutzt. Für die vorliegenden *Array*-Befunde war der gewählte Rahmen der Zielsequenzen jedoch so groß, dass eine globale Normalisierung vorgenommen werden konnte.

Kreuzhybridisierungsprobleme

Die *Array*-Analyse ergab auch nachweislich falsch-positive Ergebnisse. So ließen sich z. B. bei Transkripten von Genen häufiger *Array*-Signale detektieren, für die eine Expression in den untersuchten Geweben nicht beschrieben ist. Dies beruht mit großer Wahrscheinlichkeit auf möglichen Kreuzhybridisierungen homologer Sequenzen. Eine Kreuzhybridisierung kann aus verwandten/homologen bzw. repetitiven Sequenzen über einen großen Bereich oder aus zufälliger hoher Sequenz-Übereinstimmung über einen relativ kurzen Bereich resultieren. Diese Effekte können bereits ab homologen DNA-Bereichen von 20 bp beobachtet werden (http://innovation.swmed.edu/expression_microarray_cross.htm). Entscheidende Einflußgrößen sind dabei die Länge der Fänger, der Hybridisierungspuffer in seiner Zusammensetzung, eine Kongruenz der Hybridisierung am Fänger und die Spezifität der Bindungsereignisse (Ganesan *et al.*, 2002; Southern *et al.*, 1999). Die Hybridisierungsbedingungen auf dem *Array* können nicht auf jede einzelne Zielsequenz angepasst werden, sondern stellen immer einen Kompromiß dar. Der Nachweis von Kreuzhybridisierung für eine gegebene Sequenz ist nicht einfach zu führen, da das Vorkommen einer potentiellen kreuzhybridisierenden Nukleotidsequenz nicht bekannt ist und je nach Expressionshöhe unterschiedlich ist. Ein zentrales Problem der *Array*-Nachweise ist daher die Standardisierung der Hybridisierungsbedingungen. Eine Diskriminierung von homologen Sequenzen über die Größe der detektierten Bande ist mittels *Array*, im Gegensatz zur *Northern Blot*- und *Southern Blot*-Analyse, nicht möglich (Nielsen und Knudsen, 2002). Hybridisierungssignale auf dem *Array* an Stellen mit Fängern komplementär zu Transkripten, die nicht im untersuchten Hauptgewebetyp des Organs exprimiert werden, können auch durch die Bindung hochexprimierter Transkripte aus Minorzelltypen des Gewebeverbands erklärt werden. Die Heterogenität eines Organverbandes kann zur Folge haben, dass beispielsweise Transkripte aus Neuronen zur Innervierung der Leber (Neuropeptid Y) oder aus Zellen des Immunsystems (Interleukin-2) sowie aus Gefäßzellen (arterielles Calponin) bei hoher Expressionsrate detektiert werden können.

Im Vergleich der beiden hier eingesetzten *Array*-Systeme zeigt die Verifizierung der Befunde mittels *Northern-Blot* eine vergleichbare Verlässlichkeit von cDNA- und Oligonukleotid-*Arrays*. Nur für 16 % der Gene (5 von 31) konnte die aufgrund der *Array*-Daten vermutete Regulation nicht nachgewiesen werden. Ob die beobachtete

Veränderung der mRNA-Spiegel jedoch auf eine verminderte Transkriptionsrate und/oder auf veränderte Transkriptstabilität zurückzuführen ist, kann in keinem Falle mit diesen Methoden erfasst werden.

In Anbetracht der anhaltenden und kontrovers geführten Diskussion über die Aussagekraft *Array*-generierter Daten, beispielsweise bezüglich notwendiger Wiederholungen (Lee *et al.*, 2000), den Normalisierungsmethoden (Tsodikov *et al.*, 2002; Kepler *et al.*, 2002; Kroll und Wöfl, 2002,) und dem Versuchsdesign (Schulze und Downward, 2000), scheint eine Verifizierung der Befunde mit unabhängigen Methoden auf dem jetzigen Stand der Technologie unerlässlich (Schulze und Downward 2001; Southern *et al.*, 1999). *Array*-Methoden sind gut geeignet zur initialen Charakterisierung (*Screening*) eines veränderten Transkriptoms, erfordern aber aus den oben genannten Gründen stets den unabhängigen Nachweis z. B. mittels *Northern Blot*-Analyse und *Real time RT-PCR*. Der Vorteil der *Northern Blot*-Analyse ist, dass dabei eine mögliche Verfälschung der cDNA-Daten durch genomische DNA ausgeschlossen werden kann. *Real time RT-PCR* basiert dagegen auf dem gleichen Konzept, das dem *Array* zugrunde liegt - der Detektion der Transkripthöhe nach Umschreiben in eine cDNA. Es zeigte sich in der vorliegenden Studie jedoch, dass beide Methoden für die Mehrzahl der untersuchten Transkripte zu gleichen Befunden führten und die Änderungen der Transkriptspiegel aus dem *Array-Screening* bestätigen konnten. Trotz der angedeuteten Einschränkungen erfüllte damit die eingesetzte *Array*-Technik ihren Zweck, nämlich eine möglichst große Anzahl potentieller Kandidatengene zu identifizieren.

5.1.3 Vergleich der Befunde aus Transkriptom- und Proteomanalyse

Als weiteres *Screening*-System wurde hier die *Proteom*-Analyse zur Detektion von Veränderungen auf der Proteinebene angewandt. Dies diente sowohl der Ergänzung der Kandidatensuche als auch einem Methodenvergleich. Dabei sind Befunde zur Änderung der Proteinexpression vermutlich aussagekräftiger als die aus der Transkriptomanalyse, wenn es um die Beurteilung metabolischer Konsequenzen geht. Eine Literaturrecherche zeigt, dass ein vergleichbarer Ansatz für die Untersuchungen der Änderung in Transkriptom und Proteom im Zinkmangel bisher nicht angewendet wurde und auch bezogen auf andere Fragestellungen sich bisher selten findet.

Bisher durchgeführte, vergleichende Untersuchungen von Transkriptom- und Proteomanalyse beschränken sich fast ausschließlich auf prokaryotische Organis-

men (Eymann *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2001; Mäder *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2000; O'Shaughnessy *et al.*, 2000). So zeigte der Expressionsvergleich von *Bacillus subtilis*-Wildtyp und Mutanten, dass eine weitaus geringere Zahl veränderter Proteine mittels 2D-Elektrophorese detektierbar war, als mit der angewendeten *DNA-Makroarray*-Technik veränderte Transkriptspiegel identifiziert wurden (Eymann *et al.*, 2002). Auch Yoshida *et al.* (2001) sehen diese Ausprägungen bei ihren Analysen zur Glucose-abhängigen Gensuppression in *Bacillus subtilis*.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigte auch hier die Analyse des Lebergewebes von Kontroll- und Zinkmangeltieren nur eine geringe Anzahl identifizierter Proteine mit signifikant verändertem Spiegel im Vergleich zur Zahl der veränderten Transkripte. Da der größte eingesetzte *Array* nur ca. 5500 Zielsequenzen aufwies und damit nur ein Teil des Rattengenoms abdeckte, erscheint die geringe Kandidatenzahl aus der Proteomanalyse umso auffälliger. Dies lässt sich jedoch prinzipiell mit der geringen Auflösung der 2D-Elektrophorese und der Sensitivität des Proteinnachweises im Gel erklären. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit eine verfeinerte Auftrennung in der ersten Dimension durch eine Aufteilung des pH-Gradienten vorgenommen und durch die vergrößerte Trennstrecke eine siebenfache Erhöhung der Zahl der Kandidatenproteine erreicht.

Beurteilt man die Daten der Transkriptom- und Proteom-Analysen insgesamt, konnte nur für wenige Proteine und ihre korrespondierenden Transkripte eine übereinstimmende Regulation nachgewiesen werden (Tab. 5.1). Die Mehrzahl der im Protein-*Screening* detektierten Kandidaten wies auf den ersten Blick keine Deckungsgleichheit mit den *Array*-Daten auf. Im qualitativen Vergleich berichten auch Pratt *et al.* (2002) von häufig fehlender Kongruenz beim Vergleich der *Screening*-Analysen von Transkriptom und Proteom. Der Vergleich von Proteom- und Transkriptomanalyse zeigte hier, dass bei gleichgerichteter Regulation von Protein und Transkript die detektierte Stärke der Änderung auf Proteinebene durchweg höher war. Tabelle 5.1 zeigt in der Zusammenstellung die Veränderungen von Spiegeln identifizierter Proteine und die entsprechenden Veränderungen der Transkripthöhe des jeweiligen Gens aus dem *Arrayscreening*. Bedingt durch die gesetzten Grenzen für die Regulation auf mRNA-Ebene mag die Mehrzahl der Transkripte als nicht reguliert identifiziert worden sein, so dass angenommen werden könnte, dass sich eine nur moderate Regulation auf mRNA-Ebene recht stark auf der Proteinebene ausprägt bzw. posttranslationale Faktoren einen maßgeblichen Einfluß haben.

Tab. 5.1: Vergleich der Regulation von mRNA- und Proteinspiegeln im Zinkmangel anhand der Array- und Proteomics-Daten; Υ = Expression erhöht im Zinkmangel, β = Expression vermindert im Zinkmangel, $\bar{\cup}$ = Expression im Zinkmangel nicht oder nur leicht verändert, - = Transkript nicht detektierbar, n.e. = Zielsequenz nicht auf Array enthalten; * Namen werden in Anlehnung an die Bezeichnung in der Datenbank in der Tabelle in englischer Sprache beibehalten

Name des Proteins*	2D-Elektrophorese	DNA-Array
Glutathion-S-transferase	↑↑	↑↑
Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	↓↓	↓↓
Acetyl-CoA acyltransferase	↓↓	↓↓
Fatty acid binding protein	↓↓	↑↑
Methionin adenosyl-transferase	↓↓	↓↓
Adrenodoxin reductase	↓↓	↔
Myosin	↓↓	↔
Proteosomal ATPase	↓↓	↔
Carbonic anhydrase III	↓↓	↔
Arginiosuccinate synthetase	↓↓	↔
Actin-beta	↓↓	↔
Pyruvate dehydrogenase	↓↓	↔
Biliverdin reductase	↓↓	↔
Phosphotyrosin protein phosphatase	↓↓	↔
Ca ²⁺ -ATPase	↓↓	↔
Superoxiddismutase Cu/Zn	↓↓	↔
Thyroid hormone receptor β	↓↓	↔
L-3-Hydroxy acyl CoA dehydrogenase	↓↓	↔
VDAC-1	↓↓	↔
Kinesin	↓↓	↔
Apolipoprotein E	↓↓	↔
Putative mage-like protein	↓↓	-
Scaffold attachment factor	↓↓	-
Salt-tolerant protein	↓↓	-
Vimentin	↓↓	-
Tubulin	↓↓	-
SMC-protein	↓↓	-
Tropomyosin	↓↓	-
Bamacan	↓↓	-
SCP1 protein	↓↓	-
GAP-43-protein	↓↓	-
6-phosphate fructo bisphosphate 2-phosphatase	↓↓	-
3-OH CoA dehydrogenase type II	↓↓	-
L-iditol-2-dehydrogenase	↓↓	-
Protein disulfid isomerase	↓↓	-
N-Hydroxy-arylammin sulfotransferase	↓↓	n.e.
UBF transcription factor	↓↓	n.e.
Tubulin beta-7	↑↑	n.e.
3-Methyl,2-oxobutanoat dehydrogenase	↓↓	n.e.
Senescence marker protein SMP-30	↓↓	n.e.
Hydroxy-methyl-CoA synthase	↓↓	n.e.

Auffällig im Vergleich der beiden *Screening*-Methoden wurde, dass die Detektion von Proteinen mittels Coomassie-Färbung offenbar ausreichend war, um spezifische Proteine zu erfassen, deren korrespondierende Transkripte nur ein geringes Vorkommen aufwiesen, d.h. der Nachweis bestimmter Proteine im Gel mittels Coomassiefärbung war auch dann möglich, wenn auf dem *Microarray* die Signale der korrespondierenden Transkripte unterhalb der Detektionsgrenze lagen. Im *Array-Screening* entgehen diese Transkripte daher der Analyse. Die hohe Sensitivität der Proteindetektion zeigte auch die Verifizierung der gefundenen Proteine durch Untersuchung der korrespondierenden Transkripte mittels *Northern Blot*-Analyse. Der Nachweis der Transkripte gestaltete sich hier häufiger problematisch, da die Signale der spezifischen cDNA-Sonden auch nach langer Expositionszeit für die Mehrzahl der korrespondierenden Transkripte kaum zu detektieren waren, d.h. eine geringe Expressionshöhe vorlag.

Da die Sensitivität der MALDI-TOF-MS-Analyse sehr hoch ist (nachweisbar 1 atomol), und wie gezeigt, die Sensitivität der Coomassiefärbung (0,1-2 µg/Spot) ausreichend war, kann als Ursache für die geringe Anzahl identifizierter regulierter Proteine nur eine unzureichende Trennungsleistung im Gel als limitierend identifiziert werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Proteomanalyse als *Screening*-Werkzeug eine hohe Sensitivität aufweist. Die geringe Zahl der identifizierten Proteine kann sowohl durch die Proteinisolierungsmethode als auch durch die begrenzte Trennleistung der 2D-Elektrophorese für das Proteingemisch bedingt sein.

5.2 Pleiotrope Effekte des Zinkmangels

Für Zink sind sowohl in *in vitro*- (Fanzo *et al.*, 2001; Prasad *et al.*, 1996) als auch *in vivo*-Modellen (Shay und Cousins, 1993; Xu *et al.*, 2001) Einflüsse auf die Genexpression nachgewiesen. Um die Wirkungen von Zink auf das Transkriptom zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche *Screening*-Verfahren, v.a. auf RNA-Ebene, eingesetzt. Ziel war es, zink-sensitive Gene zu identifizieren und damit sowohl aussagekräftige Marker für einen Zinkmangel zu erhalten, als auch ggf. regulierte Gennetzwerke zu identifizieren, die eine Erklärung für die umfangreichen metabolischen Konsequenzen eines Zinkmangels liefern.

5.2.1 Tiermodell und Organauswahl

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Identifizierung regulierter Transkripte im experimentellen Zinkmangel *in vivo* ein bereits gut charakterisiertes Tiermodell mit Ratten (nach Schülein *et al.*, 1992) eingesetzt.

Ein alimentärer Zinkmangel führt bei Ratten zu einer verminderten und zyklischen Futteraufnahme (Davies und Nightingale, 1975; Williamson *et al.*, 2002). Die Versuchstiere reagieren bei *ad libitum*-Fütterung einer zinkarmen Diät mit einer starken Einschränkung der Futteraufnahme bereits nach wenigen Tagen (Chesters und Quarterman, 1970). Die Auswirkungen eines Zinkmangels *per se* lassen sich somit nicht mehr von den Folgen einer reduzierten Futteraufnahme unterscheiden. Aus diesem Grund wird eine sogenannte *Pair fed*-Gruppe mitgeführt, denen die Diät der Kontrollgruppe (Zn+) in der Menge verabreicht wird, die von den Mangeltieren am Tag zuvor verzehrt wurde. Jedoch geraten dabei sowohl Depletions- und *Pair fed*-Tiere wegen der verminderten Futteraufnahme in einen allgemeinen Energie- und Nährstoffmangel (Schülein *et al.*, 1992). Außerdem verzehren die hungernden *Pair fed*-Tiere das ihnen vorgesetzte Futter innerhalb kürzester Zeit („Mahlzeitenesser“) während die Zinkmangeltiere ihre Diät langsam über den Tag verteilt („Nippler“) aufnehmen (Roth *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu herkömmlichen Fütterungsversuchen wurden die Tiere in der vorliegenden Arbeit daher mit Hilfe einer von Schülein *et al.* 1992 entwickelten Schlundsondentechnik künstlich ernährt. Die künstliche Ernährung bietet den Vorteil, dass sich sowohl Kontroll- als auch Depletionstiere mit gleichen, energetisch ausreichenden Futtermengen synchron versorgen lassen. Gerade bei Parametern, die abgesehen von der Zinkversorgung auch auf eine unterschiedliche Energieaufnahme reagieren, kommen Zinkmangel-effekte dadurch besser zum Vorschein. Insbesondere die Genexpression, reguliert durch eine Vielzahl von Rückkopplungsmechanismen, wird durch die Änderung einer Stoffwechsellage besonders stark beeinflusst. Die Wahl dieser Fütterungstechnik sollte daher diese ungewollten Effekte möglichst minimieren. Für das *Screening* zink-sensitiver Gene wurden nur ausgewählte Organe betrachtet.

Die Leber wurde aufgrund ihrer zentralen Stellung im Stoffwechsel und ihrer Verteilerfunktion im Organismus gewählt. Gleichzeitig ist die Leber auch Empfängerorgan (u.a. GH) und Signalgeber von Hormonen (u.a. IGF's) und beeinflusst somit auch periphere Gewebe. Im Gegensatz dazu wurde mit dem Gehirn

ein Organ analysiert, welches durch seine spezifische Anatomie weniger stark von metabolischen und nutritiven Veränderungen betroffen ist.

Für die durchgeführten Analysen wurde jeweils das Gesamtgewebe genutzt. Es erfolgte keine Differenzierung in verschiedene Organbereiche und damit wurde eine Vielzahl verschiedener Zelltypen erfasst. Dem heterogenen Gemisch von Zelltypen und damit der Vielzahl zellspezifischer Transkripte kann bei der Transkriptomanalyse nur dadurch Rechnung getragen werden, dass *in situ* Hybridisierungs- oder *single-cell PCR*-Techniken zur Bestätigung der lokalen Expressionsänderung eingesetzt werden, wenn zellspezifische Transkripte erfasst werden sollen. Zinkversorgungsabhängige Veränderungen von Transkripten mit hoher Expressionsrate in Zellen mit geringer Dichte im Gewebeverband (z.B. Nervenzellen, Gefäßzellen oder Kupferzellen der Leber) können damit jedoch detektiert werden.

Die Spurenelementanalyse zeigte, dass sich der Zinkmangel im Rattenmodell auch in der Leber manifestiert hat, und bestätigte damit Befunde von Jackson *et al.* (1982). Studien zur Metallverteilung innerhalb des Leberparenchyms (u.a. für Kupfer) zeigten keine ausgeprägten Unterschiede, wie sie für die metabolische Zonierung bekannt sind (Cockell *et al.*, 1999). Die Autoren schlossen daraus, dass die Kompartimentierung der Leber im Hinblick auf die Spurenelementgehalte vernachlässigbar ist.

Bei den RNA-Isolierungen wurden parallel jeweils aus Kontroll- und Zinkmangeltier, sowohl gleiche Mengen, als auch gleiche Regionen eines Gewebes eingesetzt. Zusätzlich erwies sich dabei auch das Verhältnis des *House keeping*-Gens GAPDH zur Probenkonzentration als reproduzierbar. Auch das Hirngewebe repräsentierte eine Mischung vieler spezifischer Regionen und vieler verschiedener und hochspezialisierter Zelltypen. Da für die *Array*-Analyse jedoch eine bestimmte Menge an Probe notwendig ist und gerade aus kleinen Hirnarealen die Gesamtausbeuten an RNA zu gering sind, wurde Gesamtgehirn eingesetzt.

5.2.2 Allgemeine Aspekte der Genexpression im Zinkmangel

Unter Einsatz des *Array-Screenings* ist es gelungen, vor allem in Lebergewebe aber auch in Hirngewebe Zielsequenzen zu identifizieren, die offenbar einer stärkeren Regulation in Abhängigkeit von der Zinkversorgungslage unterliegen. Die Analysen ergaben, dass in der Leber ca. 73 % und im Gehirn ca. 89 % der als reguliert identifizierten Transkripte eine verminderte Expressionshöhe aufweisen. Studien zum Verhalten einzelner Transkripte im Zinkmangel belegen in Übereinstimmung mit den

hier erhobenen Befunden damit fast ausschließlich eine Reduktion der Expressionshöhe (Shay und Cousins, 1993; siehe auch Tab. 1.1). Auch die *Northern Blot*-Analysen ausgewählter Transkripte bestätigte dieses Ergebnis. Möglicherweise bedingt der Zinkmangel eine verminderte Zinkfingerfunktion und/oder verringerte Zink-Protein-Protein Interaktion, was zur verminderten Expression führen könnte. Dabei bleibt im Falle der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren fraglich, ob diese wirklich überwiegend aktivierender Natur sind und ein Funktionsverlust deshalb mit einer verminderten Expression eines Gens einhergeht.

Die Vermutung, dass das als interne Bezugsgröße dienende *House-keeping* Gen GAPDH im Zinkmangel verstärkt exprimiert wird und damit die darauf bezogenen Transkripte eine Herabregulation zeigen, konnte durch Nachweis von β -Aktin als interner Kontrolle und durch Ethidiumbromfärbung des Agarosegels und damit Sicherstellung einer gleichen Beladung des Gels für die *Northern Blot*-Analyse ausgeschlossen werden. Die β -Aktin-Expression korrelierte gut mit der von GAPDH. Wegen der deutlicheren Signale wurde nach anfänglich paralleler Bestimmung von β -Aktin und GAPDH nur noch letzteres als Bezugskontrolle für die Beladung des Gels in der *Northern Blot*-Analyse eingesetzt. Für Ubiquitin, ein weiteres häufig als Bezugsgröße definiertes Transkript und häufig auf *cDNA-Arrays* genutzte Probe, sind im Zinkmangel jedoch markante Veränderungen beschrieben, so dass es sich hier nicht als Kontrollgen eignete.

Auf das Problem von Kreuzhybridisierungen auf dem *Array* wurde bereits hingewiesen. So ist beispielsweise das Signal für die pankreatische Lysophospholipase-mRNA (M15893) vermutlich als resultierender Artefakt anzusehen. Ein BLAST-Vergleich der Sequenz zeigt einen kleinen Bereich an Sequenzübereinstimmung mit der Cholesterolesterase/Carboxylesterase, einem Enzym, dessen Regulation in Abhängigkeit vom Zinkstatus hier mittels *Northern Blot*-Analyse gezeigt wurde. Auch das plazentale Präpro-Wachstumshormon-Ausschüttungshormon weist über 294 und 49 Basenpaare eine 100 %ige Übereinstimmung mit dem Wachstumshormon-Ausschüttungshormon (NM_031577) auf. Weitere Beispiele sind die Homologien im wachstumsinhibitorischen Faktor (S65838) und Metallothionein, der Colipase und einem Zinkfinger-Protein der B-Zellen beschrieben, und bei Calponin besteht eine große Homologie zu Calmin, ein Faktor für die Epithelentwicklung (Ishisaki *et al.*, 2001).

Schwankungen in den Ergebnissen paralleler Experimente, beispielsweise für die UDP-Glucuronosyltransferase und auch Syntaxin-Isoformen nachgewiesen, könnten durch interindividuelle Unterschiede der Versuchstiere bedingt worden sein. So wies die UDP-Glucuronosyltransferase sowohl gegenläufige Regulation auf dem *Array*, als auch in den anderen Nachweisverfahren auf. Diese nicht konsistenten Ergebnisse oder gar gegenläufig regulierte Expression in den verschiedenen Experimenten kommen möglicherweise durch schwankende Basislevel der untersuchten Zielsequenzen - unabhängig vom Zinkmangel - zustande. Gene mit zirkadianer oder anders bedingter rhythmischer Expression bedingen ebenfalls interindividuelle Unterschiede.

So sind zum Beispiel für Neuropeptid Y und die T3-Achse sowohl Zinkeinflüsse als auch davon unabhängige dynamische Basislevel beschrieben (Selvais *et al.*, 1997; Akabayashi *et al.*, 1994; Freaque *et al.*, 2001; Weeke und Gunderson, 1978). Die Zinkwirkungen in solchen Prozessen müssten daher zumindest in einer zeitabhängigen Analyse erfolgen, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich war. Gleiches gilt auch für Transkripte aus der hepatischen Stressantwort und der Biotransformation. Eine hinreichende Synchronisation aller Versuchstiere auf diese schnell ansprechenden und individuell unterschiedlichen Stressantworten ist kaum zu realisieren. Für die Mehrzahl der Transkripte ist jedoch ein weitgehend konstanter „*steady state level*“ zu vermuten, und damit führt die *Array*-Technik hier zu aussagekräftigen Ergebnissen.

5.2.3 Organspezifische Ausprägung der Regulation zink-sensitiver Gene

Leber- und Hirngewebe der Tiere wurden vergleichend auf Veränderungen der mRNA-Spiegel unter Betrachtung von ca. 6200 Genen mittels *DNA-Arrays* untersucht. In der Leber wurde eine Vielzahl zink-sensitiver Gene identifiziert, und diese Veränderungen konnten in der Mehrheit mit unabhängigen Methoden bestätigt werden. Das Gehirn erwies sich dagegen in seiner Antwort auf den Zinkmangel als weitgehend unbeeinflusst. Nur 0,5 % der erfassten Transkripte wiesen im Zinkmangel eine leicht veränderte Expressionsantwort auf. Für die identifizierten zink-sensitiven Gene des Lebergewebes erfolgte eine gezielte Expressionsanalyse in anderen Organen, um mögliche homöostatische Regelmechanismen aufdecken zu können. Dabei zeigten sich im Vergleich der Expression ausgewählter Gene in Niere, Muskel, Gehirn und Darm sehr starke Unterschiede in der Antwort der Organe.

Das Nierengewebe erwies sich dabei in seiner Antwort auf den Zinkmangel der Reaktion des Lebergewebes in Zahl und Richtung der Regulation am ähnlichsten. Auch hier waren für die untersuchten Transkripte im Hirngewebe kaum Veränderungen in Abhängigkeit von der Zinkversorgungslage detektierbar. Nur für ein Transkript (NADPH Cytochrom P450 Reduktase) konnte hier ein veränderter Spiegel im Zinkmangel nachgewiesen werden. Die Sonderstellung des Gehirns lässt sich am ehesten durch die anatomischen Gegebenheiten und die extrem geringe Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erklären. Damit scheint es gegenüber einem Zinkmangel besonders unempfindlich zu sein.

Die Zinkhomöostase in einer Zelle wird durch die Aufnahme mittels spezifischer Transporter in der Plasmamembran und die intrazelluläre Distribution in Kompartimente und Cytosol gesteuert (Gaither und Eide, 2001). Intrazellulär wird die Zinkverteilung sowohl über zinkbindende Faktoren (beispielsweise MT) als auch über membranständige Transporter (beispielsweise ZnT2 und ZnT3) in den Organellen erreicht (Cousins und McMahon, 2000). Auch die Regulation des Efflux von Zink aus der Zelle, beispielsweise über den ubiquitären MTF1-regulierten Zink-Efflux-Transporter ZnT1, spielt für die Zinkbeladung und die Ausprägung eines Zinkmangels eine wichtige Rolle (Davis *et al.*, 1998). Zellen können damit ihre Zinkkonzentration normalerweise in relativ engen Bereichen aufrecht erhalten. Trotzdem können physiologisch relevante Veränderungen in der Konzentration freier Zinkionen oder Veränderungen des am Liganden gebundenen oder in Vesikeln sequestrierten Zinks ohne starke Veränderungen des zellulären Gesamtzinkgehalts auftreten. Für die Feinregulation sind zumindest partiell die Zinktransporter und nicht zuletzt ihre gewebespezifische Expression verantwortlich (Cousins und McMahon, 2000). Da die Mechanismen zur Zinkhomöostase in den betrachteten Organen unterschiedlich regulierend wirken, könnten die erhaltenen unterschiedlichen Expressionsmuster damit erklärt werden.

Die wenigen detektierbaren Änderungen der Transkriptspiegel im Hirngewebe sprechen für dessen Abschirmung vor einem systemischen Mangel und/oder zeigen eine spezifische homöostatische Gegenregulation an. Dies wird durch Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Zink und dessen Verteilungs- und Aufnahmeverhalten im Gehirn von Zinkmangelratten (Karsarskis *et al.*, 1984) gestützt. Die Barriere-

systeme des Gehirns mit der Blut-Hirn-Schranke sowie dem Choroid-Plexus als Schranke der Blut-Zerebrospinalflüssigkeit sind für die Zinkhomöostase im Gehirn von zentraler Bedeutung. Beide Schranken sind für Zink reguliert durchlässig. Ein hoher Anteil des Zinks findet sich in Zinkmetalloproteinen von Neuronen und Gliazellen. Etwa 10 % des gesamten Zinks im Gehirn, wahrscheinlich in ionischer Form, ist in synaptischen Vesikeln der Neuronen zu finden und fungiert dort möglicherweise als endogener Neuromodulator der synaptischen Neurotransmission. Der Umsatz von Zink im Gehirn ist wesentlich langsamer als in peripheren Geweben, beispielsweise der Leber. Karsarski *et al.* (1984) dokumentierten mit ⁶⁵Zink, dass unter Zinkmangelbedingungen die Netto-Zinkaufnahme ins Gehirn erhöht ist. Maximale Aufnahmeraten der insgesamt aber langsamen Zinkaufnahme in das Gehirn finden sich v.a. zwischen Tag 5-14 des Mangelversuchs. In einigen Bereichen wirkt sich aber eine Zinkunterversorgung - wenn auch geringer ausgeprägt als in der Peripherie - auf die Zinkhomöostase des Gehirns aus. Besonders Regionen reich an zinkhaltigen Vesikeln, wie der Hippocampus, sprechen auf einen Zinkmangel an, was bekanntermaßen zu zerebraler und olfaktorischer Dysfunktion führt (Takeda, 2001). Auch für den Hypothalamus sind bereits Effekte eines Zinkmangels auf die Genexpression, u.a. von Galanin und Neuropeptid Y, beschrieben (Selvais *et al.*, 1997). Der Hirnstamm zeigt im Zinkmangel initial die höchste Zinkaufnahme und vermeidet weitgehend einen Mangelzustand (Karsarski *et al.*, 1984). Diese regionale Ausprägung des Zinkmangels im Gehirn mag die insgesamt geringen Effekte auf die Genexpression erklären.

Die Rolle der verschiedenen Zinktransportsysteme in der organspezifischen Regulation der Zinkversorgung ist noch weitgehend unbekannt. Sie scheinen lokal aber für eine sehr spezifisch regulierte Zinkverteilung verantwortlich zu sein. Inwieweit neben einer unterschiedlichen Zinkbeladung der Organe im Zinkmangel aber auch eine organspezifische Transkriptionskontrolle vorliegt, müsste für jedes einzelne Gen in Promotor-Analysen geprüft werden. Darüber hinaus wären auch indirekte Effekte auf die Expression im Gehirn, beispielsweise durch Rückkopplungsmechanismen hervorgerufen durch zinkmangelbedingte Veränderungen in peripheren Organen, denkbar.

5.2.4 Effekte des Zinkmangels auf ausgewählte Gengruppen

Aufgrund der essentiellen Rolle von Zink als Bestandteil von Transkriptionfaktoren (Redemann *et al.*, 1988) wurde ein starker Einfluss des Zinkmangels auf die Transkriptspiegel erwartet. Die Fülle der erhaltenen Daten erlaubt es nicht, hier alle Veränderungen vorzustellen und zu interpretieren. Einige der als reguliert vorgefundenen Gengruppen werden eingehender betrachtet, besonders ausführlich die Transkripte des Lipidmetabolismus. Andere Gruppen müssen in der Diskussion vernachlässigt werden oder werden nur kurz gestreift. Für die Mehrheit der identifizierten Transkripte ist ein netzwerkartiger Zusammenhang nicht offenbar, so dass sich die Befunde nur mit Literaturdaten vergleichen und sich nur im Kontext bekannter metabolischer Veränderungen im Zinkmangel diskutieren lassen.

Zusammenfassend ließen sich durch die *Array*-Analyse der Leber etwa 66% der Zielsequenzen über Hintergrund detektieren, was mit anderen Studien von metabolisch aktiven Geweben unter Einsatz von DNA-Technologie korreliert (Toulouse *et al.*, 2000). Von 4100 exprimierten Genen wurden hier in der Leber 268 und im Gehirn 36 als reguliert identifiziert. Zur Verifizierung der *Array*-Daten wurden 31 bzw. 8 ausgewählte Gene einer unabhängigen Verifizierung mittels *Northern Blot* unterzogen. 25 bzw. 5 konnten dabei als reguliert bestätigt werden. Gene mit veränderten Expressionen wurden für die Leber in 13 *Cluster* und eine Gruppe mit diversen Transkripten eingeteilt. Der größte *Cluster* umfasst dabei 43 Transkripte, die vor allem für Proteine der hepatischen Stressantwort kodieren. Diese Befunde lassen vermuten, dass der hepatische Fremdstoffstoffwechsel mit seinen verschiedensten CYP-Enzymen ein Ziel des Zinkmangels ist und belegen die angenommene hepatoprotektive Rolle von Zink. Zusätzlich weisen die Daten in Übereinstimmung mit biochemisch identifizierten Veränderungen des hepatischen Fettstoffwechsels und erhöhter Fetteinlagerung, 37 veränderte Transkripte in diesem Bereich auf. Weiterhin ist die Expression von Genen kodierend für Proteine des Stickstoffmetabolismus, des Kohlenhydratstoffwechsels, der Strukturgebung, der Wachstumsfaktorverfügbarkeit, der intrazellulären Signaltransduktion, für Transkriptions- und Translationskontrolle, sowie des Nukleinsäurestoffwechsels im Zinkmangel verändert. Die Befunde liefern damit zumindest teilweise die molekulare Basis für die pleiotropen Effekte eines Zinkmangels in verschiedenen Stoffwechselprozessen.

Fremdstoffmetabolismus

Für eine Reihe von Isoformen der Cytochrom P450-Enzyme, zentrale Proteine in der Reaktion auf Hepatotoxizität, wurde im Zinkmangel eine Veränderung der Expressionsspiegel beobachtet. Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass eine Zinksupplementation sowohl eine metallothioneinabhängige, als auch eine metallothioneinunabhängige Protektion gegenüber hepatotoxischen Xenobiotika und Alkohol verleiht (Cagen und Klaassen, 1979a, 1979b; McMillan und Schnell, 1985; Cabre *et al.*, 1995). Die mRNA-Spiegel von 15 CYP450-Enzymen und der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase wiesen eine verminderte Expression im Zinkmangel auf. Der Einfluß eines Zinkmangels auf die hepatische CYP450 Expression wurde auch kürzlich in postpubertalen männlichen Ratten aufgezeigt und ein Wachstumshormon-regulierter Signaltransduktionsweg in der Kontrolle der CYP Expression postuliert (Xu *et al.*, 2001, Waxman *et al.*, 1996). Die mögliche hepatoprotektive Rolle von Zink wird weiterhin dadurch unterstützt, dass die Kollagenbiosynthese eine wichtige Rolle in der Ethologie der hepatischen Fibrogenese spielt und im Zinkmangel Veränderungen aufweist (Camps *et al.*, 1992). In Übereinstimmung damit konnte allein für 11 Transkripte mit Beteiligung an der Strukturgebung, davon 4 direkt aus dem Kollagenstoffwechsel (L-Ascorbinsäure-abhängige Prolyl-4-Hydroxylase, Kollagen- α Typ III und IV und Kollagen Bindungsprotein), eine modulierte Expression abhängig vom Zinkstatus beobachtet werden. Zusammenfassend kann damit die angenommene hepatoprotektive Rolle von Zink wenigstens partiell durch Veränderungen der Genexpression von Transkripten des Xenobiotika- und Kollagenstoffwechsels erklärt werden.

Peptidhormon-Stoffwechsel

Für das von der Nahrungsaufnahme abhängige Peptidhormon Neuropeptid Y wurde hier im peripheren Nervensystem eine Verminderung der Expression im Zinkmangel, sowohl auf dem *Array* als auch mittels *Northern Blot*-Analyse, nachgewiesen. Diese Beobachtung lässt sich mit der im Zinkmangel beobachteten Anorexie und verminderten Futteraufnahme in Verbindung bringen. Möglicherweise fehlt durch die verminderte Expression von Neuropeptid Y ein wichtiger Stimulus für die normale Futteraufnahme von Zinkmangeltieren. Da durch das gewählte Versuchdesign eine veränderte Futterzufuhr ausgeschlossen wurde, kann die Reduktion der Expression von Neuropeptid Y nur ein spezifischer Zinkmangeleffekt sein. Im Gegensatz dazu

wurde jedoch in anderen Studien im Hypothalamus eine Erhöhung der Neuropeptid Y-Expression im Zinkmangel nachgewiesen (Selvais *et al.*, 1997). Bedingt durch das dort eingesetzte *Pair fed*-Design können jedoch metabolische Effekte durch verändertes Freßverhalten dabei nicht ausgeschlossen werden. Es zeigte sich auch keine zu erwartende erhöhte Futteraufnahme und der Zinkmangel-typische zyklische Rhythmus der Nahrungsaufnahme blieb erhalten. Die Autoren vermuten deshalb eine Neuropeptid Y-Resistenz im System.

Neben diesen kleinen funktionell assoziierten Gengruppen bzw. einzelnen Transkripten, treten innerhalb der Daten der *Array*-Analyse auch Transkripte zusammenhängender Stoffwechselwege in Erscheinung. Allerdings lassen auch hier als gleichartig reguliert identifizierte Gruppen nicht *a priori* einen Rückschluss auf die Organisation regulatorischer Elemente zu (Schulze und Downward, 2000). Zwei solcher *Cluster* von Genen, die gleichsinnige und gleichartige Regulation erkennen liessen, werden nachfolgend beschrieben und im Kontext der metabolischen Veränderungen diskutiert.

Wachstumsfaktoren

Effekte von Zink auf das Wachstum von Säugern sind v.a. auf klinischer, aber auch teilweise auf molekularer Ebene gut verstanden und werden zumindest partiell durch Veränderungen des verfügbaren IGF-I auf die somatotrope Achse zurückgeführt (Droke *et al.*, 1993; Ninh *et al.*, 1996). Korrespondierend zur sichtbaren Wachstumsverzögerung im Zinkmangel sind die hier identifizierten Transkripte mit verändertem Transkriptspiegel Ziele der Wachstumsregulation in der Leber. Dies beinhaltet IGF-I, IGFBP-1, IGFBP2 und eine Untereinheit von IGFBP. Hierbei dürfen die Transkripte nicht alleine betrachtet werden, sondern müssen im Kontext der komplexen Wachstumsregulation gesehen werden. Es wurde hier gezeigt, dass der Zinkmangel die Expression der IGFBP-mRNA vermindert, was im *Western Blot* zusätzlich auch auf Proteinebene belegt werden konnte. Damit übereinstimmend zeigen auch Freake *et al.* (2001) eine Reduktion für die IGFBP2-Proteinmenge in *Pair fed*-Zinkmangelratten und Ninh *et al.* (1998 a,b) weisen in *Pair fed* Zinkmangeltieren eine verminderte zirkulierende Menge des IGFBPs im Serum nach. Somit scheint nicht nur eine Verminderung der zirkulierenden Menge an IGF-Bindungsproteinen, sondern auch eine verminderte Expression im Zinkmangel vorzuliegen (Clegg *et al.*, 1995).

Im Gegensatz dazu sind die Befunde zu Veränderungen von IGF-I im Zinkmangel widersprüchlich. So weisen Ninh *et al.* (1998 a,b) und Lefebvre *et al.* (1998) im Gegensatz zu den hier betrachteten Untersuchungen eine verminderte mRNA-Expression in der Leber von *Pair fed*-Zinkmangelratten nach. Auch eine Reduktion des zirkulierenden Serum-IGF-I wird dabei in Übereinstimmung mit Befunden von Roth und Kirchgessner (1994) in zwangsernährten Ratten beobachtet.

In vivo konnten Lefebvre *et al.* (1998) in einem isolierten Zinkmangel in Hepatocytenculturen von Ratten keine Verminderung der IGF-I Expression nachweisen, beobachteten aber bei hoher Zinkgabe eine Verminderung der IGF-mRNA-Spiegel. McNall *et al.* (1995) fanden verminderte Transkriptspiegel für IGF-I mit einer Größe von 7,5 kb und 0,8-1,2 kb in *Pair fed*- und Zinkmangelratten im Vergleich zu *ad libitum* gefütterten Kontrolltieren, für das IGF-I-1,8 kb-Transkript ließ sich jedoch keine Veränderung dokumentieren. Die hier vorliegenden Befunde weisen mittels *Array-Daten* eine leicht erhöhte Expression des Wachstumsfaktors nach. Allerdings entspricht die mRNA Menge nicht zwangsläufig auch der sezernierten Menge an IGF-I. Für die recht unterschiedlichen Ergebnisse mag auch das unterschiedliche Versuchsdesign verantwortlich sein. Zwangsfütterung mit 4 Mahlzeiten versus *Pair-feeding* könnte einige der Unterschiede erklären, da lange Hungerperioden im *Pair-feeding* durchaus auf die Wachstumsfaktorachse anders wirken könnten. Generell sind Transkripte mit einer zyklischen/zirkadianen (z.B. Wachstumshormon) oder dynamischen, beispielsweise fütterungsabhängigen oder altersabhängigen Transkriptionsrate schwerlich in Abhängigkeit eines einzigen Faktors zu erfassen (Breier *et al.*, 1986; Chernausk and Turner, 1989; Buzzelli *et al.*, 1993; Bauer und Parvizi, 1996). So fließen Zeitpunkt der letzten Fütterung und der Tötung sowie der Stoffwechsellzustand der Tiere mit ein und können die widersprüchlichen Ergebnisse bedingen. Da die IGF-I-Expression sowohl durch Insulin unabhängig vom ZNS positiv als auch durch das Wachstumshormon in Abhängigkeit vom ZNS reguliert wird, erscheint das Szenario noch komplexer (Jones und Clemmons, 1995).

So weisen Roth und Kirchgessner (1994) im Serum von Zinkmangelratten verminderte Insulinspiegel nach. Auch die *Array*-Analyse bestätigte hier eine Verminderung der Transkriptspiegel dieser Achse (u.a. Insulin-Rezeptor, Präproinsulin II, Wachstumshormon-Rezeptor und Wachstumshormon-Bindungsprotein). In Schlundsonden-gefütterten Tieren ließ sich dagegen sogar eine erhöhte Wachstumshormonkonzentration im Serum nachweisen. Gestützt durch die

vorliegenden Ergebnisse mit verminderten Spiegeln von Wachstumshormon-Rezeptor und Wachstumshormon-Bindungsproteinen ist zu vermuten, dass die Wachstumsretardierung im Zinkmangel wenigstens partiell auf eine gestörte Wachstumshormon-Rezeptor-vermittelte Wirkung zurückzuführen ist. Auch McNall *et al.* (1995) belegen eine signifikante Verminderung der Transkriptmengen an Wachstumshormon-Rezeptor und Wachstumshormon-Bindungsprotein in *Pair fed*-Zinkmangelratten. Normalerweise beeinflusst das Wachstumshormon auch die Expression der IGFBP's und somit rückwirkend auch deren Verfügbarkeit im Serum oder besser die Kapillarpermeabilität von IGF-I (Zapf *et al.*, 1985). Eine verminderte Wachstumshormonwirkung könnte damit auch die verminderten Expressionspiegel der IGFBP's im Zinkmangel erklären.

Unter Einbeziehung der ausgeprägten Rückkopplungsmechanismen, die innerhalb der Wachstumsachse existieren, könnte die im Zinkmangel erhöhte Konzentration des Wachstumshormons aus einer regulierten Gegensteuerung resultieren. Da die vermittelnden Glieder (Wachstumshormonrezeptor, Wachstumshormon-Bindungsprotein) jedoch im Zinkmangel in ihrer Funktion beeinträchtigt zu sein scheinen, bleiben die Effekte aus. Dies könnte auch die im Zinkmangel ungewöhnliche und z.T. gegenteilige Regulation verschiedener Transkripte im Gehirn erklären. So scheinen Veränderungen dort eher aus den Wechselwirkungen mit veränderten Signalen aus der Peripherie zu resultieren als durch eine lokale, direkte Wirkung eines Zinkmangels.

Auch die Schilddrüsenhormonachse unterliegt bekanntermaßen Rückkopplungsmechanismen. So führt ein erhöhter Spiegel an zirkulierendem Triiodo-L-Thyronin T3 zu einer verminderten Expression des TSH-Gens. Da auch die Thyroidhormonachse an der Regulation des Wachstums beteiligt ist, wird vermutet, dass Zink auch die biologische Wirkung dieses Hormons und seines Rezeptors beeinflusst. Der Mechanismus, durch den Zink die Thyroidhormonfunktion verändert, wird noch kontrovers diskutiert (Freake *et al.*, 2001). Im vorliegenden Versuch zeigte sich eine erhöhte Expression des Thyroxin-Deiodinase Typ I-Transkripts, dessen korrespondierendes Protein die Dejodierung von Thyroxin (T4) ins metabolisch aktive Trijod-L-Thyronin (T3) in der Leber und Niere katalysiert. Auch Oliver *et al.* (1987) beobachteten eine signifikant erhöhte hepatische Monodeiodinaseaktivität in Zinkmangelratten. Dies lässt in Konsequenz eine erhöhte Thyroidhormonfunktion

vermuten. Andererseits gibt es auch Hinweise, dass der Zinkmangel das *Signaling* des Thyroidhormons durch eine verminderte Rezeptorbindung oder DNA-Interaktionen verändert (Miyamoto *et al.*, 1991), was dann in der Folge die Genexpression der „*down stream*“- Zielsequenzen moduliert (Oliver *et al.*, 1987). Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass sich die Genexpression des T3-abhängigen S14-Gens, dessen Expression normalerweise durch T3 unterdrückt wird, hier im Zinkmangel erhöhte. Obwohl der S14-Promotor auch auf andere regulierende Elemente anspricht, beispielsweise auf Glucose und mehrfach ungesättigte Fettsäuren und negativ kontrolliert wird durch PPAR (*Peroxisome Proliferator-activated Receptor*), wird S14 als Indikator der T3-Funktion herangezogen (Freake *et al.*, 2000). Es zeigt sich damit, dass auch die Expression von T3-Zielgenen im Zinkmangel signifikant verändert wird. Die Wachstumsretardierung im Zinkmangel könnte somit neben der Beeinflussung der somatotropen Achse durch eine Beeinträchtigung der Schilddrüsenhormon-Funktion erklärt werden.

Generell werden Wachstum und Differenzierung eukaryotischer Zellen durch Wachstumshormon und Wachstumsfaktoren reguliert, die intrazelluläre Signalkaskaden steuern. Nach Beyersmann und Haase (2001) spielt Zink auf allen Ebenen der Transduktion dieser Kette eine Rolle, ob als struktureller oder regulatorischer Faktor oder beides. Dies beinhaltet Hormonrezeptoren, intrazelluläre *second messenger*, Kaskaden von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen sowie Transkriptionsfaktorbindung an Promotoren. Viele der hier vorgefundenen regulierten Transkriptgruppen des *Array-Screenings* lassen sich mit diesen Prozessen in Verbindung bringen.

Lipidmetabolismus

Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass der Zinkmangel bei Ratten mit Veränderungen des Lipidstoffwechsels einhergeht (Koo und Turk, 1977; Roth und Kirchgessner, 1977; Eder und Kirchgessner, 1993; 1994 a,b,c,d; 1995 a). Viele der Symptome eines Zinkmangels ähneln dabei denen eines Mangels an essentiellen Fettsäuren, beziehungsweise Zinkmangel-Symptome werden von Letzterem noch verstärkt (Bettger *et al.*, 1979). Deshalb richtete sich das Interesse auf die veränderte Fettsäurezusammensetzung der Lipidfraktion in Abhängigkeit vom Zinkstatus. Um die Rolle von Zink im Stoffwechsel essentieller Fettsäuren zu klären, wurde daher in

mehreren Studien die Fettsäurezusammensetzung in verschiedenen Geweben untersucht (Eder *et al.*, 1994 a,b,c,d). Die meisten Hinweise gibt es dabei für einen Einfluss des Zinkversorgungsstatus auf den Grad der Sättigung. Die Studien weisen aber z.T. widersprüchliche Ergebnisse auf, beispielsweise für die Öl-, Arachidon- und Linolsäuregehalte, die in Abhängigkeit der $\Delta 5$ -, $\Delta 6$ - und $\Delta 9$ -Desaturasen vom Zinkstatus moduliert werden können. Eder und Kirchgessner (1994 b, 1995 b) konnten jedoch experimentell keine wesentlichen Veränderungen der $\Delta 5$ - und $\Delta 6$ -Desaturasen-Aktivitäten im Zinkmangel nachweisen. Auch die vorliegenden *Array*-Daten zeigen auf Transkriptebene zwar eine Expression der mRNA der Desaturasen, aber nur eine leichte Regulation der Transkriptspiegel. Auf Expressionsebene lässt sich somit die beobachtete Änderung der Fettsäurezusammensetzung der Lipidfraktion verschiedener Gewebe im Zinkmangel nur anhand vereinzelter regulierter Transkripte belegen.

Unsere Analyse der Fettsäurezusammensetzung der Lipidfraktion der Leber belegt jedoch auch die Befunde zur qualitativen Veränderung der Leberfette im Zinkmangel. Sie zeigt in Übereinstimmung mit Befunden von Eder und Kirchgessner (1993) eine Verminderung des Arachidonsäuregehaltes und eine leichte Erhöhung des Linolsäuregehaltes. Der Gehalt an Stearinsäure war signifikant vermindert und die einfach ungesättigte Ölsäure signifikant erhöht. Damit im Einklang ist die beobachtete Verminderung der Expression der $\Delta 3$, $\Delta 2$ -Enoyl-CoA-Isomerase, als essentielles Enzym für den Abbau der Ölsäure.

Neben diesen qualitativen Veränderungen stützen die Befunde der *Array*-Analyse aber auch die Hypothese einer quantitativen Veränderung des Fettgehaltes der Leber von Zinkmangelratten. Im Zinkmangel kommt es unter bestimmten Bedingungen zu drastisch erhöhten Leberfettgehalten (Eder und Kirchgessner, 1993). Dabei führt der Zinkmangel bei einer gleichzeitig erhöhten Futterzufuhr (Eder und Kirchgessner, 1993) oder einer bestimmten Fettart (Kokosfett mehr als Leinöl) (Eder und Kirchgessner, 1994 d) zu einer Fettleber. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich das Phänomen der erhöhten Fettinfiltration jedoch bereits bei normalen Futtermengen und routinemäßig eingesetztem Maiskeimöl als Fettquelle. Parallel zu diesen metabolischen Veränderungen zeigten sich in der Leber von Zinkmangeltieren reproduzierbar starke Veränderungen für Transkripte von Proteinen mit Beteiligung am Fettstoffwechsel. Auffällig war dabei die gegenläufige Regulation von

anabol und katabol wirkenden Genprodukten. Für alle Transkripte dieser Gengruppen wurde die Regulation auf Transkriptebene mit jeweils einer unabhängigen Methode bestätigt.

Es ist auch beschrieben, dass die Aktivität lipogener Enzyme (Acetyl-CoA Carboxylase und Fettsäure-Synthase) in Zinkmangeltieren deutlich erhöht ist (Eder und Kirchgessner, 1995 a). Die Rolle von Zink ist hier aber weiterhin ungeklärt. Nach Eder und Kirchgessner (1993) muss einer vermehrten Triglyceridsynthese demnach ein verminderter Abbau bzw. Abtransport der Triglyzeride entgegenstehen, was zu einer Fettanhäufung in der Leber führt. Die Befunde aus der vorliegenden Arbeit stützen diese Annahme eines Ungleichgewichts zwischen Lipacidogenese bzw. Lipogenese und Lipolyse bzw. Fettsäureoxidation im Zinkmangel.

Die Befunde aus der *Array*-Analyse belegen einen Einfluß des Zinkmangels auf die Transkripte der Enzyme der Lipogenese der Leber. Allein 37 zink-sensitive Transkripte lassen sich mit dem Fettstoffwechsel in Verbindung bringen und unterliegen z.T. beträchtlichen Veränderungen im Zinkmangel. Die Zusammenstellung der regulierten Transkripte in ihrem Bezug zu den betroffenen Stoffwechselwegen macht dies besonders deutlich (Abb. 5.1). Hinter der Übereinstimmung von erhöhter Lipogenese (Fettsäuresynthese) bzw. verminderter Lipolyse (β -Oxidation) könnten Gemeinsamkeiten auf transkriptioneller Ebene und damit ein gemeinsamer Einfluss des Zinkmangels auf die Kontrolle der Genexpression vermutet werden.

Für die Regulation einer Reihe von Genen des hepatischen Lipidstoffwechsels (u.a. Acyl-CoA Oxidase, Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA Hydratase) ist eine Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor PPAR- α (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) beschrieben (Gustafsson *et al.*, 1994; Dana *et al.*, 2001). PPAR reguliert im ausgeprägten Maße sowohl den mitochondrialen als auch den peroxisomalen Fettsäurenstoffwechsel durch Transkriptionskontrolle (Latruffe *et al.*, 2000). Bei den PPARs handelt sich um Rezeptoren der Steroidrezeptor-Superfamilie, und die PPAR-Genstruktur weist in der Sequenz im Bereich der DNA-Bindungsregion, wie viele andere transkriptionsbeeinflussende Proteine, mindestens 2 Zinkfingerdomänen auf (Gearing *et al.*, 1994 a,b). Zink als strukturgebendes Element ist deshalb für die Funktion dieser Proteine essentiell. Nach der Aktivierung durch spezifische Liganden binden diese Rezeptoren an das DNA-„Response Element“ PPRE, welches eine direkte Wiederholung (DR-1) der Konsensus-Sequenz TGACCT x TGACCT darstellt. Dieser Mechanismus führt zu einer Transkriptionsaktivierung der Zielgene. PPAR fungiert dabei als Heterodimer, meist mit RXR (*9-cis Retinoic Acid X Receptor*). Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor benötigt für seine Funktion weitere nukleäre Co-Aktivatoren bzw. –Repressoren. PPAR- α reguliert dabei, aktiviert durch hypolipidämisch wirkende Liganden oder Leukotriene, nicht nur Gene des Lipidmetabolismus sondern auch die Gene detoxifizierender Enzyme (Latruffe *et al.*, 2000; Barclay *et al.*, 1999; Rushmore und Kong, 2002).

Von den drei bekannten Isoformen α , β oder δ und γ des Transkriptionsfaktors PPAR ist für die α -Isoform ein besonders hohes Vorkommen in Leber und auch Niere beschrieben. PPAR- δ ist dagegen in den meisten Zelltypen nur in geringer Menge vertreten. PPAR- γ kommt mengenmäßig überwiegend im Fettgewebe vor (Smith, 2001). Für das Gehirn ist für PPAR- α ein Vorkommen nahe der Nachweisgrenze nur in eng begrenzten Regionen, wie Zellen des Zerebellums und des *Gyrus dentatus*, belegt (Kainu *et al.*, 1994, Cullingford *et al.*, 1998).

Ausgehend vom hohen Vorkommen von PPAR- α im Lebergewebe könnte seine Beeinflussung weitreichende Folgen auf die Expression der ihm unterstellten Gene haben. Eine detaillierte Betrachtung der funktionellen Wirkungen von PPARs zeigt einen engen Bezug zu den hier identifizierten Transkripten aus dem *Array-Screening* der Leber auf. Da die im Zinkmangel veränderten Transkriptmengen eine

gegenteilige Beeinflussung zu den vor allem von PPAR- α hervorgerufenen Effekten aufweisen (Schoonjans *et al.*, 1996; Latruffe *et al.*, 2000), lässt sich eine mögliche Funktionseinschränkung von PPAR- α im Zinkmangel postulieren. Die nachfolgend aufgeführten metabolischen Veränderungen sind unter Beteiligung von PPAR- α belegt:

- Induktion der peroxisomalen und mitochondrialen β -Oxidation (Fettutilisation) (Latruffe *et al.*, 2000; Reddy und Mannaerts, 1994; Clarke und Jump, 1997)
- Verminderte Triglyceridsynthese und Sekretion (Lindén *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 1996; Clarke und Jump, 1997)
- Höhere peroxisomale Thermogenese (Kelly *et al.*, 1998)
- Aktivierung antioxidativer Enzyme (SOD) (Yoo *et al.*, 1999)
- Positive Veränderung des Cholesterinmetabolismus u.a. durch Erhöhung von Lipid-Bindungsproteinen, Apolipoproteinen (Apo A) (Vu-Dac *et al.*, 1995 ; Lindén *et al.*, 2001; Schoonjans *et al.*, 1996)
- Regulation der Ketogenese (Latruffe und Vamecq, 1997; Lawrence *et al.*, 2001; Hegardt, 1998)
- Erhöhte Detoxifikation durch vermehrte Expression der Cytochrome P450 (Barclay *et al.*, 1999; Rushmore und Kong, 2002)
- Verminderte Insulinresistenz, Plasmaglucoosespiegel und Plasmatriglyceridspiegel (Ye *et al.*, 2001, 2003; Kraegen *et al.*, 2001)
- Verminderte Entzündung (Fruchart *et al.*, 2001, Staels *et al.*, 1998)
- Erhöhung des Gallensäuremetabolismus (Hunt *et al.*, 2000)
- Vermehrte Expression der $\Delta 5$ - und $\Delta 6$ -Desaturasen (Matsuzaka *et al.*, 2002)

Darüber hinaus sind Wirkungen von PPAR- γ u.a. auf die Adipocytendifferenzierung (MacDougald und Lane, 1995), die Fettdeposition (Elangbam *et al.*, 2001), die Insulin-ähnliche Aktivität (MacDougald und Lane, 1995, Kim *et al.*, 2000), den Schutz von Inselzellen (Buckingham *et al.*, 1998) und die Verminderung arteriosklerotischer Plaques (Pasceri *et al.*, 2000) beschrieben worden.

Diese Zusammenstellung der durch PPAR-Aktivität beeinflussten Gene zeigt, dass diese Transkriptionsfaktoren pleiotrope Wirkungen haben und nicht nur den Lipidstoffwechsel maßgeblich mit beeinflussen. So zeigen sich auch bei den *Array*-Befunden starke Effekte auf die hepatische Expression der Cytochrom-P450 Enzyme, die möglicherweise im Kontext der Stressantwort auch unter Kontrolle von PPARs reguliert werden.

Eine Betrachtung der Transkriptions-Kontrollelemente der identifizierten Transkripte zeigt für eine Vielzahl der Kandidaten, sowohl des Lipidmetabolismus als auch anderer Stoffwechselwege, tatsächlich eine Abhängigkeit der Genexpression von PPARs (Tab. 5.2). Zusätzlich konnte, wenn auch mit schwacher Signalveränderung, eine verminderte PPAR-Expression im Zinkmangel nachgewiesen werden. Dies läßt vermuteten, dass hier ein zentrales Steuerelement der Transkriptionskontrolle der Leber vorliegt, wenngleich natürlich eine Vielzahl weiterer regulatorischer Faktoren an der Kontrolle der Transkription beteiligt ist.

Die Regulation des Lipidstoffwechsels der Leber ist Ausdruck eines komplexen Zusammenspiels vieler direkt wirkender Faktoren wie PPARs oder SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*), als auch indirekt wirkender Effektoren und Parameter wie z. Bsp. die Wechselwirkungen bei der Rezeptor-Heterodimerbildung (Duplus und Forest, 2002). So wird u.a. die Entwicklung einer Fettleber im Kupfermangel auf eine veränderte Expression der SREBP-kontrollierten Fettsäuresynthase zurückgeführt (Tang *et al.*, 2000).

Tabelle 5.2 zeigt einige der regulierten Transkripte und ihre Abhängigkeit von den bekanntesten, den Lipidmetabolismus regulierenden Transkriptionsfaktoren (PPAR und SREBP).

Tab. 5.2: *Identifizierte Transkripte des Lipidmetabolismus und ihre Beziehung zu PPAR/PPRE oder SREBP. PP= Peroxisome Proliferator; PPAR= Peroxisome proliferator-activated receptor; PPRE= PPAR response element; TR= Thyroid receptor; RXR= retinoid X receptor; SREBP= Sterol regulatory element binding protein, * Namen werden in Anlehnung an die Bezeichnung in der Datenbank in der Tabelle in englischer Sprache beibehalten*

Transkript*	PPAR-Abhängigkeit	SREBP-Abhängigkeit	Literatur
Carboxylesterase	PPAR α	-	Poole et al. 2001
3-Keto thiolase acyl-CoA	PPAR α , PPRE	-	Latruffe et al. 1999, Marcus et al. 1993
$\Delta 3, \Delta 2$ -Enoyl-CoA isomerase.	PP induziert PPAR α	-	Hakkola et al. 1994
Acetyl-CoA acyltransferase 2	PPAR α , PPRE	-	Latruffe et al. 1999, Marcus et al. 1993
Phytanoyl-CoA hydroxylase	PPAR α	-	Zomer et al. 2000
Mitochondrial long-chain enoyl-CoA hydratase	PPRE	-	Zhang et al. 1993, Marcus et al. 1993
Carnitine palmitoyltransferase I	PPRE, PPAR α indirekt	-	Mascaro et al. 1999, Louet et al. 2001 a, b Duplus und Forest, 2002
Acyl-CoA synthetase	PPAR α	-	Fruchart et al. 1999, Martin et al. 1997
Long-chain acyl-CoA synthetase	PPAR α	-	Fruchart et al. 1999
ATP-Citrate Lyase	PP hemmen	SREBP	Karbowska et al. 2000, Sato et al. 2000
Glycerol kinase	PPAR γ		Guan et al. 2002
Lipogenic factor (S14 gene)	PP hemmen	SREBP1	Mater et al. 1999, Ren et al. 1996, Jump et al. 1995
Fatty acid transporter	PPAR α und γ , indirekt	-	Motojima et al. 1998 Cha et al. 2001, Sato et al. 2002
Fatty acid-binding protein	PPAR α	-	Poirier et al. 1997, Wolfrum et al. 1999
Acyl-coA oxidase; acyl-CoA oxidase	PPRE, PPAR α	-	Kassam et al. 2001, Latruffe et al. 2000
Peroxis. Enoyl-CoA :hydrotase-3-hydroxyacyl-CoA	PPRE, PPAR α	-	Latruffe et al. 2000

Neben den Transkripten von Proteinen des Lipidstoffwechsels lassen sich hier Proteine der Stressantwort, des Kohlenhydrat- und Gallensäurestoffwechsel finden. Darüber hinaus wird für die als zink-sensitiv identifizierten Cytochrome der Gruppe Cyp2C und Cyp4A eine Funktion im peroxisomalen Abbau ungesättigter Fettsäuren belegt (Coward *et al.*, 2002) Für letztere ist eine PPAR-Abhängigkeit ebenfalls nachgewiesen (Ripp *et al.*, 2002; Waxman, 1999).

Die nachfolgend beschriebenen Transkripte sind alle mittels *Array* als zink-sensitiv identifiziert worden. Neben weiteren Cytochrom-P450 Enzymen, vorwiegend der Stressantwort (Latruffe *et al.*, 2000; Barclay *et al.*, 1999), unterliegt auch die UDP-

Glucuronosyltransferase (Barbier *et al.*, 2003), die HMG-CoA-Synthase (Lawrence *et al.*, 2001), die Katalase (Girnun *et al.*, 2002), Enzyme der Gallensäurebiosynthese (Hunt *et al.*, 2000) und des Gallensalztransports (Jung *et al.*, 2002) einer PPAR-abhängigen Regulation. Für die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase ist weiterhin der Effekt von einem peroxisomalen Proliferator experimentell belegt (Wu *et al.*, 1989). Die Regulation der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase wird dagegen sowohl mit PPAR als auch mit SREBP in Verbindung gebracht (Cassuto *et al.*, 1999; Chakravarty *et al.*, 2001), ebenso wie für CYP51 (Yamashita *et al.*, 2000). Auch weitere Transkripte des Kohlenhydratmetabolismus, so u.a. der Glucosetransporter GLUT2, weisen PPAR bzw. SREBP-Abhängigkeit der Expression auf (Kim *et al.*, 2000). Auch die höhere Aktivität lipogener Enzyme, wie z.B. Fettsäuresynthase und Acetyl-CoA-Carboxylase, lässt sich möglicherweise mit dieser Regulation in Zusammenhang bringen. So ist u.a. auch für die Desaturasen eine SREBP-1 und eine PPAR-Abhängigkeit der Expressionskontrolle beschrieben (Matsuzaka *et al.*, 2002).

Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass verminderte Aktivität der PPAR-abhängigen Kontrollelemente im Zinkmangel zu einer vermehrten Anhäufung von Fett in der Leber führt sowie vermutlich eine reduzierte antioxidative Abwehr, eine verminderte DNA-Reparaturleistung und eine beeinträchtigte Proteinsynthese bedingt. Metabolisch sind entsprechende Veränderungen im Zinkmangel belegt. Möglicherweise sind diese Veränderungen auch auf der Ebene der Transkripte ursächlich mit dem Funktionsverlust bzw. der -beeinträchtigung der PPAR-Zinkfinger verbunden. Zu prüfen bleibt, ob PPARs selbst eine metallaktivierte Komponente in ihrer eigenen Promotorregion besitzen.

Auch die Schilddrüsenhormonachse und deren Funktion auf den Lipidstoffwechsel bzw. den Energieumsatz im Organismus mag unter Beteiligung von PPAR und der Heterodimerisierung mit RXR beruhen. So zeigte sich, dass die Wirkungen von PPAR- α und T3-bindenden Thyroidhormon-Rezeptoren (TR) in Abhängigkeit vom Dimerisierungspartner RXR wechselseitig inhibiert werden (Chu *et al.*, 1995; Green, 1995). Ein erhöhtes Vorkommen des aktiven Hormons T3, beispielsweise durch die erhöhte Monodeiodinase im Zinkmangel, könnte eine vermehrte Ligandenbindung von T3 am Rezeptor nach sich ziehen und die folgende Dimerisierung mit RXR induzieren. Dies würde für PPAR den Titer des aktivierenden Partners senken. Der

fehlende T3-Effekt auf die Transkription könnte dabei durch fehlendes Zink im DNA-bindenden Zinkfinger hervorgerufen sein. Damit könnte der Rezeptor seine T3-Bindungsaffinität im Zinkmangel beibehalten, während die Interaktion mit den Zielgenen vermindert ist (Miyamoto *et al.*, 1991).

Obwohl auch hier im Zinkmangel bei Ratten ganze Gengruppen als reguliert erkannt wurden, ist die Organisation von regulatorischen Elementen hier wesentlich komplexer als in Prokaryoten oder einfachen Eukaryoten wie Hefen. Eine Übertragung von ähnlichen Mustererkennungsmethoden zur Identifikation gemeinsamer Motive in Promotoren wie bei Bakterien und Hefen bleibt daher hier eine Herausforderung (Schulze und Downward, 2000). Auch Duplus und Forest (2002) weisen auf ein außerordentlich komplexes Regulon des Lipidmetabolismus hin.

Abb. 5.2. fasst das zentrale Paradigma für die veränderte Expression einer Vielzahl hepatischer Gene und Gengruppen unter Beteiligung von PPAR zusammen. Es sei kurz am Mechanismus der Genexpressionskontrolle des S14-Gens erklärt. Für dieses Gen ist eine Beteiligung der beiden Transkriptionsregulatoren PPAR und SREBP sowie eine Abhängigkeit von T3 beschrieben (Mater *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 1996; Jump *et al.*, 1995; Freake *et al.*, 2000). Unter der Annahme, dass das Zinkfingerprotein PPAR- α durch den Zinkmangel einen Funktionsverlust erfährt, entfällt die normalerweise durch PPAR auf S14 ausgeübte Hemmung der Transkription. Das Gen kann nun vermehrt transkribiert werden. SREBP ist zumindest strukturell in seiner DNA-bindenden Region als zink-unabhängig ausgewiesen. Im Bereich der DNA-bindenden Domäne finden sich bei SREBP *Leucin-Zipper-* und *Helix-Loop-Helix-*Motive, und SREBP ist als Aktivator der S14-Transkription bekannt. Die normalerweise vorhandene T3-Wirkung auf S14 mag durch die verminderte Rezeptorbindung an die RE-Sequenz ebenfalls vermindert sein, hat aber wahrscheinlich auch durch konkurrierende Wechselwirkungen mit PPAR um den Dimerisierungspartner RXR weiterhin eine Wirkung auf die PPAR-vermittelte Antwort. In der Konsequenz könnte damit ein Zinkmangel zu der erhöhten Expression von S14 führen (Abb. 5.2).

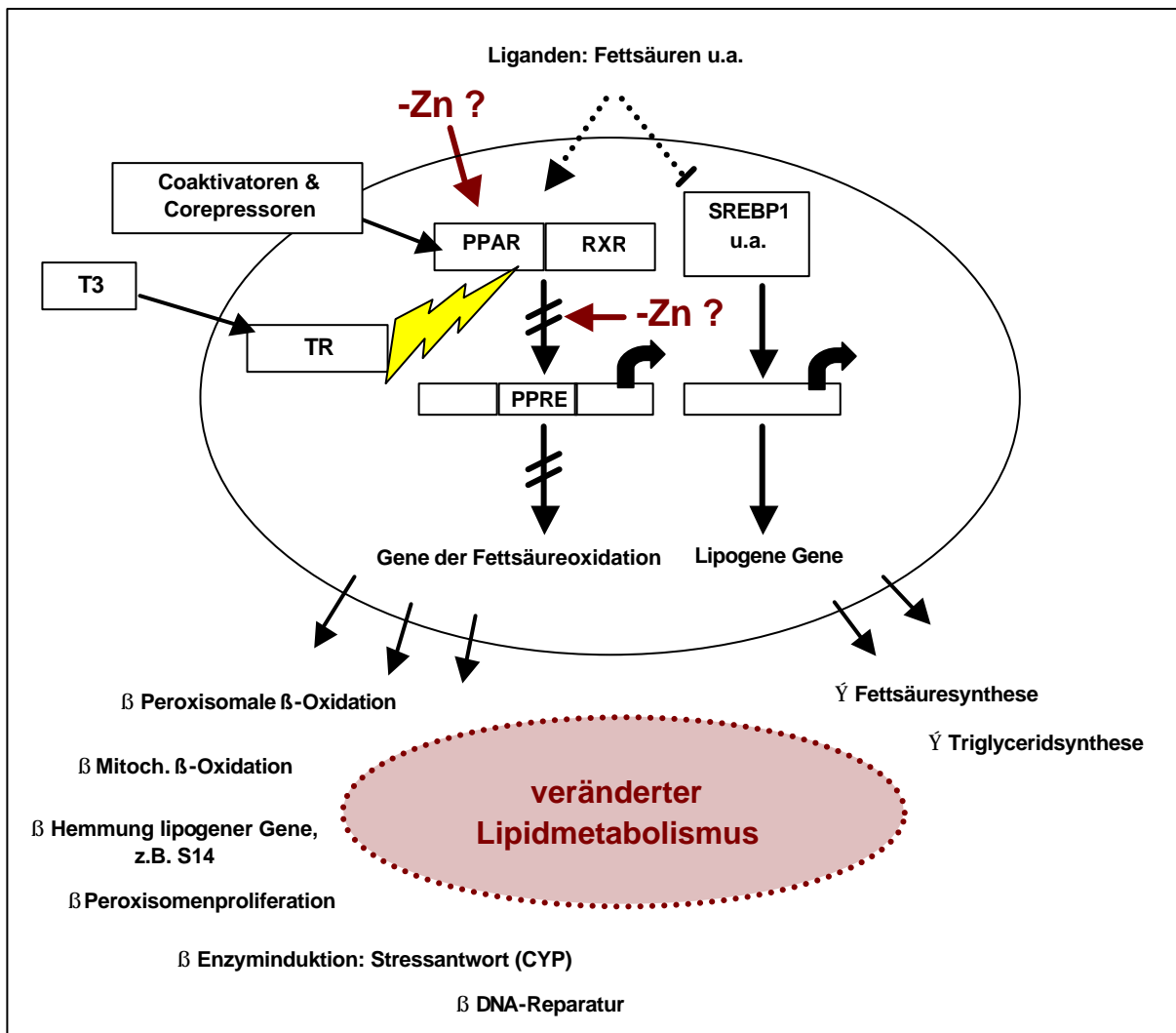


Abb. 5.2: *Postulierter Mechanismus zum Einfluß eines Zinkmangels auf Transkripte des hepatischen Lipidstoffwechsels*, PPAR= Peroxisome proliferator-activated receptor; PPRE= PPAR response element; TR= Thyroid receptor; RXR= Retinoid X receptor; SREBP= Sterol regulatory element binding protein

Durch fehlende Wirkungen übergeordneter Hormone oder hormonähnlicher Substanzen wird wahrscheinlich, dass die erhöhte Lipogenese bei Zinkmangeltieren möglicherweise auf einer Ebene unterhalb der PPAR-Expression, also beispielweise einem Funktionsverlust des Zinkfingers hervorgerufen wird. So inhibiert das Wachstumshormon normalerweise die Lipogenese, während Insulin diese stimuliert (Kersten, 2001). In zwangsernährten Ratten zeigt sich jedoch eine erhöhte Menge zirkulierenden Wachstumshormons und eine verminderte Menge von Insulin (Roth und Kirchgessner, 1994). Die daraus eigentlich resultierende verminderte Lipogenese lässt sich aber experimentell nicht belegen. In ähnlicher Weise mag auch die alkoholinduzierte Fettleber auf einem sekundär erworbenen Zinkmangel beruhen (You *et al.*, 2002; Prasad, 1985 a,b).

6 Zusammenfassung

Ein schwerer Zinkmangel geht sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen mit ausgeprägten phänotypischen Veränderungen im Stoffwechsel einher. Die auffällige Symptomatik eines Zinkmangels ließ starke Veränderungen auch auf Ebene des Transkriptoms und Proteoms erwarten, doch gab es dazu bisher keine umfassenden Analysen. Ziel der Untersuchung war es, zink-sensitive Gene als Biomarker für die Beurteilung der Zinkversorgung eines Organismus zu identifizieren und Ansätze zur Erklärung der Pathophysiologie eines Zinkmangels auf molekularer Grundlage zu geben. Zur Identifizierung des „Zinkregulons“ wurde das Transkriptom von Leber- und Hirngewebe im experimentellen Zinkmangel der Ratte mittels *DNA-Array*-Technologie untersucht. Hierfür wurde einerseits ein von der Firma Nanogen für die SNP-Analyse entwickeltes elektronisch adressierbares *Array*-System mit entsprechenden Modifikationen eingesetzt, sowie zwei kommerziell erhältliche *DNA-Array*-Formate angewendet. Ein *Screening* von Veränderungen des Proteoms unter Einsatz von 2D-Elektrophorese und MALDI-TOF-MS-Analyse ergänzte die Untersuchung der Veränderungen des Lebergewebes im Zinkmangel.

Mittels *Array*-Technologie wurden ca. 66 % der 6200 untersuchten Zielsequenzen sowohl in Leber als auch in Hirngewebe als exprimiert nachgewiesen. Im Lebergewebe wiesen 268 Transkripte, im Hirngewebe dagegen nur 36 signifikante Veränderungen der mRNA-Spiegel im Zinkmangel auf. Dabei überwog in beiden Geweben die Zahl vermindert exprimierter Transkripte. Die im Lebergewebe auffällig stark betroffenen Transkriptgruppen ließen sich den Bereichen der Wachstumsregulation, des Lipidmetabolismus, des Fremdstoffstoffwechsel und der Stressantwort sowie der Signaltransduktion und des intrazellulären *Trafficking* zuordnen. Die größten *Gencluster* umfassten dabei 43 bzw. 37 Transkripte, die vor allem für Proteine der hepatischen Stressantwort und des Lipidstoffwechsels kodieren.

Die sich an die globale Expressionsanalyse der Leber anschließende Analyse der Expressionsänderung ausgewählter Gene mittels *Northern Blot* in Niere, Gehirn, Darm und Muskel belegte die ausgeprägte Organspezifität der Antwort des Organismus auf den Zinkmangel, wobei die Reaktion des Nierengewebes der des Lebergewebes am ähnlichsten war. Mittels 2D-Elektrophorese wurden darüber hinaus für insgesamt 158 Proteine im Lebergewebe veränderte Spiegel im Zinkmangel nachgewiesen, wovon 36 Proteine mittels MALDI-TOF-MS Analyse identifiziert werden konnten. Eine Korrelationsanalyse der Befunde der *Proteom*- und *Transkriptom*-Analyse ließ aber bemerkenswerter Weise kaum einen Zusammenhang erkennen.

Die Veränderungen der mRNA-Spiegel einer Vielzahl von Proteinen des hepatischen Fettstoffwechsels ließ vermuten, dass daraus eine verminderte Fettsäureverwertung und eine vermehrte Fettspeicherung bzw. Fettinfiltration der Leber resultiert. So konnten tatsächlich auch biochemisch erhöhte Triglyceridgehalte und Veränderungen im Fettsäurenmuster des Lebergewebes von Zinkmangeltieren nachgewiesen werden. Diese Befunde belegen, dass die eingesetzten *Screening*-Methoden netzwerkartige Zusammenhänge mit entsprechenden metabolischen Konsequenzen aufdecken können. Darüber hinaus wurde eine Vielzahl neuer Zielgene eines experimentellen Zinkmangels identifiziert, die für weitere Studien als Marker dienen können.

7 Abstract

Zinc deficiency is accompanied by severe phenotypical changes in animal models as well as in humans. The remarkable symptomatology caused by a zinc-deficiency suggested major changes in the transcriptome that should also allow to identify zinc-responsive genes. However, such a molecular analysis of zinc-deficiency in a mammalian system was lacking. The goal of the investigations presented here was therefore, to identify zinc-sensitive genes as putative biomarkers for the assessment of the zinc status as well as to try to explain the pathophysiology of zinc deficiency on basis of the changes of the transcriptome.

For identification of a “zinc-regulon”, transcriptome analysis of liver and brain tissues of control and zinc-deficient rats was performed by DNA array technology. For this purpose the Nanogen Inc. array system, originally built for SNP analyses, was used after suitable protocol modifications. In addition, two other commercially available DNA-array formats were employed. An additional screening of liver tissue for changes in the protein levels based on 2D electrophoresis and MALDI-TOF-MS analysis was conducted. Around 66% of the 6200 target sequences were found to be expressed in liver as well as brain tissue by means of array technology. The expression level of 268 transcripts changed significantly in the liver as a result of zinc deficiency whereas in brain tissue only 36 transcript levels showed changes. In general, zinc deficiency caused mainly a reduction in the steady state levels of transcripts in both tissues. This was confirmed by independent methods such as *Northern* Blot analysis and Real time RT PCR. Groups of transcripts strongly affected by zinc deficiency could be associated with growth regulation, lipid metabolism, xenobiotic metabolism and stress response as well as signal transduction and intracellular trafficking. The largest clusters identified comprised 43 resp. 37 transcripts, mainly encoding proteins involved in the hepatic stress response and lipid metabolism.

Following global expression analysis of the liver tissue, selected genes were also analyzed by *Northern* Blot in kidney, brain, intestine and muscle tissue showing the organ specific response to zinc deficiency with kidney tissue resembling most closely the changes in liver. 2D electrophoresis revealed 158 proteins with altered expression level in zinc deficiency from which 36 proteins could be identified by MALDI-TOF-MS analysis. However, very weak correlation between proteome and transcriptome data could be observed.

Based on the transcriptome analysis major changes in hepatic fat metabolism including reduced fatty acid oxidation and increased lipid accumulation could be predicted. A biochemical analysis indeed confirmed this by demonstrating increased hepatic triglyceride levels and substantial changes in the fatty acid pattern. The changes in mRNA-levels of gene-clusters identified by the screening methods therefore predicted fairly well the concomitant metabolic consequences.

In summary, the methods employed here proved suitable to identify an impressive number of newly identified “zinc-sensitive” genes involved in a variety of metabolic pathways and may help to design further studies to unravel the molecular changes occurring during zinc deficiency.

8 Anhang

8.1 Material

Die Chemikalien, soweit nicht anders vermerkt, wurden alle in der Qualität *pro analysi* oder *reinst.* bezogen

8.1.1 Feinchemikalien

30% Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	Roth; Karlsruhe	3029.1
Acrylamid, linear	Ambion, Austin, Texas, USA	9520
Agarose	Roth; Karlsruhe	2267.4
Agarose MP	Roche, Masnheim	1 388 983
Ammonium Acetat	Acros Organics, Geel, Belgien	218365000
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth; Karlsruhe	9592.3
Ammoniumsulfat	Roth; Karlsruhe	3746.1
Ammoniumthiocyanat	Sigma, Taufkirchen	A0302
Anti-actin (C-11)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	sc-1615
anti-bcl-xl (H-62)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	sc-7195
anti-cytochrome c (H-104)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	sc-7159
Anti-GKLF (T-16)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	sc-12538
anti-IGFBP1 (M-19)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	sc-6000
anti-NF κ b (C-20)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	sc-372
anti-p450 reductase (C-19)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	sc-8091
Biorad-Reagenz	Bio-Rad, München	500-0006
Bromphenolblau, Natrium-Salz	Roth; Karlsruhe	A512.1
BSA	Roth; Karlsruhe	8076.2
CHAPS	Sigma, Taufkirchen	C5070
Coomassie brilliant Blau (G250)	Serva, Heidelberg	17524.01
dCTP-Cy3	Amersham, Freiburg	PA53521
dCTP-Cy5	Amersham, Freiburg	PA55521
Diethanolamin	Sigma, Taufkirchen	D2286
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth; Karlsruhe	K028.2
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen	D8779
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth; Karlsruhe	P030.2
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen	D9163
Sheared salmon testes DNA	Sigma, Taufkirchen	D7656
dNTP - <i>Mix</i>	Amersham, Freiburg	27-2035-01
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth; Karlsruhe	8043.1
EGTA	Roth; Karlsruhe	3054.3
Ethanol	Roth; Karlsruhe	9065.1
Ethanol absolut	Sigma, Taufkirchen	32205
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth; Karlsruhe	2218.1
Formaldehyd (37%)	Roth; Karlsruhe	4979.1
Formamid	Roth; Karlsruhe	6749.1
Glucose	Roth; Karlsruhe	6887.1
Glycerin >86%	Roth; Karlsruhe	4043.1
Glycin	Roth; Karlsruhe	3908.2
Guanidin-Thiocyanat	Sigma, Taufkirchen	G9277
H ₂ O ₂ 30 %	Roth; Karlsruhe	8070.1
Harnstoff	Roth; Karlsruhe	2317.1
Hefeextrakt	Roth; Karlsruhe	2363.3
Immobiline pH 3-10	Amersham, Freiburg	17-1234-01
Immobiline pH 4-7	Amersham, Freiburg	17-1233-01
Immobiline pH 6-11	Amersham, Freiburg	17-6001-97
Iodacetamid	Merck, Darmstadt	8.04744.0100
Isoamylalkohol	Roth; Karlsruhe	8930.1
Isopropanol	Roth; Karlsruhe	6752.1
Kaliumchlorid	Roth; Karlsruhe	6781.1
L-Histidin	Sigma, Taufkirchen	H-8776

Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Roth; Karlsruhe	2189.1
Mercaptoethanol	Acros Organics, Geel, Belgien	125472500
Methanol	Roth, Karlsruhe	4627.5
Morpholinopropansulfonsäure	Roth, Karlsruhe	6979.4
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe	6773.2
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe	A135.2
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe	3957.1
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe	3580.1
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe	K300.2
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe	4360.2
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe	6771.1
Natriumthiosulfat	Sigma, Taufkirchen	S7026
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Roth, Karlsruhe	P034.2
n-Hexan	Roth, Karlsruhe	4723.1
Nicotinadenindinukleotid (NADH)	Calbiochem, Schwalbach	481915
Pharmalyte	Amersham, Freiburg	17-0456-01
Phenol, kristallin	Roth, Karlsruhe	0040.2
p-Nitrophenolphosphat	Sigma, Taufkirchen	N3254
Roti® Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe	A156.1
Salzsäure 37%	Roth, Karlsruhe	4625.1
t-Butanol	Roth, Karlsruhe	4323.1
Tetramethylethylenediamine	Roth, Karlsruhe	2367.3
Thioharnstoff	Roth, Karlsruhe	9531.1
TMSH	Macherey-Nagel, Düren	
Trehalose	Sigma, Taufkirchen	T-5251
Trichlormethan	Roth, Karlsruhe	3313.4
Tris	Roth, Karlsruhe	4855.2
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen	T 8787
Tween® 20	Roth, Karlsruhe	9127.1

8.1.2 Radiochemikalien

³² P-dATP (3000 Ci/mmol)	ICN, Eschwege	390101X
³³ P-dATP(3000 Ci/mmol)	ICN, Eschwege	58200

8.1.3 Verbrauchsmaterial

5K Rat Oligonukleotidarray	MWG Biotech, Ebersberg	2250000000
cDNA CLONTECH Atlas™ Rat 1.2	Clontech, Palo Alto, CA, USA	7854-1
Einmal Küvetten aus PMMA 1,5 ml	Roth, Karlsruhe	P951.1
Gel-Blotting-Paper, GB-002	Schleicher&Schuell, Dassel	10426693
Hybond-N ⁺	Amersham, Freiburg	RPN303B
NanoChip Cartridges H1	Nanogen Inc., San Diego, CA, USA	605033
Pan® Rat Liver Oligonukleotidarray	MWG Biotech, Ebersberg	2150000000
Phase Lock Gel Tubes	Eppendorf, Hamburg	32005.055
Protran® Nitrocellulose	Schleicher & Schuell, Dassel	10401196
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml safe lock)	Eppendorf, Hamburg	0030120.086 0030120.094
Schwarzbandfilter	Schleicher & Schüll, Dassel	589/1
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel	10426694

8.1.4 Sonstiges

Olivenöl	Italien, Lidl
Pflanzenöl	Ölmühle , Hamm, Aldi

8.1.5 Kits und Enzyme

Bsp143 I Restriktionsenzym	MBI Fermentas, St. Leon-Rot	ER0781
BstX1 Restriktionsenzym	MBI Fermentas, St. Leon-Rot	ER1022
Creatinekinase NAC-activated Test	Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA	PG147-K
DNA Ligase	NEB, Frankfurt	M205S
DNA Polymerase I	NEB, Frankfurt	M210L
DNase I, RNase free	Invitrogen, San Diego, CA, USA	18047-019
Dye Terminator Cycle Sequencing Kit – Thermo Sequenase™ Cy™ 5	Amersham, Freiburg	27-2682-01
E. coli DNA Ligase	NEB, Frankfurt	205L
E. coli DNA Polymerase I Holoenzym	NEB, Frankfurt	209L
E.Z.N.A Plasmid Mini Kit I	Peqlab, Erlangen	12-694200
Eco RI Restriktionsenzym	MBI Fermentas, St. Leon-Rot	ER0271
Express Hyb™ Solution	CLONTECH, Palo Alto, CA, USA	8015-2
FlexiPrep™ Kit	Amersham, Freiburg	27-928-01
GOT Optimized Test	Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA	DG 158-K
Lämmli-Probenladungspuffer	BioRad, München	161-0737
LDH Optimized Test	Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA	DG 1340-K
Mega Prime Labelling Kit	Amersham, Freiburg	RPN1605
Mega Short Script™ T7 Kit	Ambion, Austin, Texas, USA	1354
NorthernMax™ Formaldehyde Load Dye	Ambion, Austin, Texas, USA	8552
Oligotex mRNA Mini Kit	Qiagen, Hilden	70022
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden	28104
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden	12145
Qia-quick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden	28704
Ready-To-Go™ RT-PCR Beads	Amersham, Freiburg	27-9267-01
Retroscript™ Kit	Ambion, Austin, Texas, USA	1710
Ribonukleaseinhibitor	Invitrogen, San Diego, CA, USA	15518-012
RNase H	Invitrogen, San Diego, CA, USA	18021-071
RNAWiz	Ambion, Austin, Texas, USA	9736
Superscript II RT-Kit	Invitrogen, San Diego, CA, USA	18064-014
Tiglyceride GPO-PAP Ecoline 25	Merck, Darmstadt	1.14856.0001

8.1.6 Geräte

2D-Elektrophoresekammer	Amersham Freiburg
ALFexpress™ DNA Sequencer	Amersham, Freiburg
Atomabsorptions-Spektralphotometer 930	Perkin-Elmer, Modell 5100; Norwalk, CT, USA
Blotting-Apparatur Mini-Trans-Blot®Cell	Bio-Rad, München
Counter 1450 Microbeta Trilux	EGRG Wallace, Turku, Finnland
DNA-Elektrophoresekammer Sub Cell GT	Bio-Rad, München
Ettan Dalt II Gel caster	Amersham, Freiburg
Ettan Dalt II large vertical system	Amersham, Freiburg
Ettan Dalt II staining tray set	Amersham, Freiburg
FlexiClamps	Amersham, Freiburg
Gaschromatograph HP 6850 mit Flammenionisationsdetektor (FID).	Agilent Technologies, Hewlett Packard, Waldbronn
Gelbond PAGfilm	Amersham, Freiburg
Geldokumentation Syngene	Syngene, Antwerp, Belgien
Glasplatte mit 0,5 mm U-frame (200 x 260 mm ²)	Amersham, Freiburg
Handmonitor UMO LB123	EG&G Berthold, Badwildbach
Heizkammer	Jouan, Unterhaching
Homogenisator RW.20	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik
Hybridisierungsöfen	Bio-Rad, München
ImageScanner	Amersham, Freiburg
IPG cup loading strip holder	Amersham, Freiburg
IPGphor	Amersham, Freiburg
Lightcycler	Roche, Mannheim

MALDI-TOF-MS	Bruker, Leipzig
NanoChip™ Molecular Biology Workstation	Nanogen Inc., San Diego, CA, USA
Photometer Specord 200	Analytik Jena, Jena
Photometer Uvikon Spectrophotometer	Kontron Instruments, Watford, UK
Proteinelektrophoresekammer, Mini-PROTEAN	Bio-Rad, München
Reswelling Tray	Amersham, Freiburg
Robocycler Gradient 96	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Rotationverdampfer Rotavapor	Büchi, Essen
Schüttler HS 250 basic	Kika Labortechnik
Spannungsgeber Power-Pac 200	Bio-Rad, München
Taumler Polymax 104	Heidolph, Schwabach
Tischkühlzentrifuge 4K 15 C	Sigma, Taufkirchen
Tisch-Photometer BLOphotometer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge A 14	Jouan, Unterhaching
Tischzentrifuge A14	Jouan, Unterhaching
Tischzentrifuge B 4	Jouan, Unterhaching
Tischzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge BR4	Jouan, Unterhaching
Ultra Turrax T25	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Ultrazentrifuge Himoc CP 65 β	Hitachi, Wiesbaden

8.1.7 Oligonukleotide/Primer

Die *Primer*-Sequenzen für die Sondensynthese der Northern-Analyse wurden von der MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen. Die Sequenzen der einzelnen Vorwärts-*Primer* (FP) und Rückwärts-*Primer* (BP) der mRNA von den untersuchten Genen lauten wie folgt:

8.1.7.1 Oligonukleotide/Primer der Verifizierung (Leber)

Kodiertes Protein	Gen Acc. Nr.	Forward Primer (FP), Backward Primer (BP)	Position	[bp]
Δ2,Δ3 enoyl CoA-Isomerase	D00729	FP: 5' TCC GAG GTG TCA TCC TCA CTT 3' BP: 5' GAC TTC TGG ATG GAG TCT CTG 3'	341-931	591
5-aminolevulinate synthase	J03190	FP: 5' ACT CTG ATT CCG GGA ACC ATG 3' BP: 5' GCA TTC AGC TGC CGA ATG TGG 3'	1021-1850	830
Acyl-peptide hydrolase	J04733	FP: 5' GAA GGA GCA GTC TGT GTC ATG 3' BP: 5' ACT CCA TAC CCT GCT TGA AGG 3'	1331-2061	731
Alcohol dehydrogenase A SU	M15327	FP: 5' GTG GTA GAT GAC ATA GCG GTG 3' BP: 5' TCA GGA CGG TAC GGA TAC TCT 3'	491-1157	667
Annexin	D38224	FP: 5' ACA GTG CTG TAT GAC GTG CAG 3' BP: 5' CTG TAG TCT CCA GAA GTG TCG 3'	259-923	665
Arrestin D	U03629	FP: 5' CTC TCT GTC TCC TTG ACT GAC 3' BP: 5' ACC ACC ACG GCA AGA AAT CAC 3'	22-207	186
Carboxylesterase	AF171640	FP: 5' GTG TTA TCT CCT CTG GCC AAG 3' BP: 5' ACC ATG GTC TCC GAT CAC TGT 3'	691-1401	711
Ceruloplasmin	L33869	FP: 5' GAT AAT ATC AGA ATG TTC ACA 3' BP: 5' TGT GAA CGA GGT TGC AAC GGT 3'	1840-2550	711
Colipase Precursor	M58370	FP: 5' TCT GCT TGT AAC CCT CGT TGC 3' BP: 5' TGT TGG TGA TGG CGC CAA TGA 3'	76-353	278
Creatine Kinase	X59737	FP: 5' GAG ATG AGG AGA CCT ATG AGG 3' BP: 5' ACC TAG CTG AAC CGT TCA GTC 3'	441-1247	807
Cytochrom P450 (Cyp4A3)	M33936	FP: 5' ATG GAG GAT GGG AAG AGC TTG 3' BP: 5' TAG CTT CTT GAG ACG CAG CTG 3'	901-1510	610
Cytosolic aspartate aminotransferase	D00252	FP: 5' GAT CTG GAG AAT GCT CCT GAG 3' BP: 5' ACC GCT CGG CAT CAG ATA GAT 3'	571-1200	630
Epidermal growth factor receptor	M37394	FP: 5' TCA CCG TGT GGG AAC TGA TGA 3' BP: 5' AGA AGT CCT GCT GGT AGT CAG 3'	2861-3679	818
GAPDH	XM_006959	FP: 5' GAC CAC AGT CCA TGA CAT CAT T 3' BP: 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG 3'	600-1052	453

Kodiertes Protein	Gen Acc. Nr.	Forward Primer (FP), Backward Primer (BP)	Position	[bp]
Gastroinhibitory peptide	X66724	FP: 5' GAA GAG GTT GAG TTC GCA TCC 3' BP: 5' TCA GTC GAC AGA GCT CTG CTT 3'	174-531	358
Hepatic product spot 14 (Lipogenic factor)	K01934	FP: 5' CTA CTG AAG GTC ATG GAT CGG 3' BP: 5' GGT AAG GAT GTG ATG GAG GCT 3'	351-701	351
IGF binding protein 1	M89791	FP: 5' ATC CTC CTG TCC TTC CAG GTT 3' BP: 5' GCT CTG TAG AGA CCT ACC TCT 3'	160-830	671
IGF binding protein 2	J04486	FP: 5' ACA GCA GGT TGC AGA CAG TGA 3' BP: 5' GTT GAC ACT GTT CGT ACC GGA 3'	635-997	363
IGFBP complex acid labile SU	S46785	FP: 5' CAA CCA GAT CAC TGA GGT CAG 3' BP: 5' ACA GAG TAA GAA TTG TCT TAT 3'	1141-1887	747
Liver aldehyde oxidase	AF110477	FP: 5' AAT GCA TCT GGA GGC TCT GTG 3' BP: 5' GGA TCC AGG TTC ATC TCT TGG 3'	3300-4040	741
Metallothionein	M11794 /J00750	FP: 5' TGC GGC TGC AAG AAC TGC AAA 3' BP: 5' CAC ATG CTC GGT AGA AAA CGG 3'	124-366	243
NADPH-cytochrome P450 reductase	M12516	FP: 5' CTC ACC TAC TAC CTG GAC ATC 3' BP: 5' TCC CTG TCT CTC TTC AGA AGG 3'	1151-1881	731
Neuropeptid Y	M20373	FP: 5' ACA AAC GAA TGG GGC TGT GTG 3' BP: 5' CCA CAT GGA AGG GTC TTC AAG 3'	62-342	271
Protein kinase C	NM_017175	FP: 5' GAG AGC CTG ATG TGT GAG AAG 3' BP: 5' CTC CTC ATC GAA GTT GCT GAC 3'	2109-2830	722
Serine dehydratase	Y00752	FP: 5' ACG TGA CAG CAT GGC ATT GTC 3' BP: 5' GCT CCA CCA GGA TCT TCT CAT 3'	187-950	764
SU of FOF1-ATP synthase	D13127	FP: 5' GTG CGG AGT TTC AGC ACA TCT 3' BP: 5' ATG GCC TTG CTG AGC TTC TGA 3'	41-630	590
Ubiquitin-like protein	AF095740	FP: 5' GTG AAG ACG CTG ACT GGA AAG 3' BP: 5' ACC ACC TCC TCT AAG AGC CAA 3'	71-298	228
UDP Glucuronosyltransf. ZnT1	J02589 U17133	FP: 5' TAG CTT CTC TCC AGG CCA CAA 3' BP: 5' GCT TCA TAG GCT GGT CAT GGT 3' FP: 5' CTT TAC ACG ACG TAC CCA CTG 3' BP: 5' AAT CTC TAT CAC CAC AGC GGG 3'	551-1401	851
Insulin receptor	M29014	FP: 5' GTC TTC GAG AAC GGA TCG AGT 3' BP: 5' CTC CAT CTC CAG CTC TTC ACT 3'	3541-4310	780
Glycerol kinase	D16102	FP: 5' ATG TGC TTC CAG GAT GGA CAG 3' BP: 5' CCT CAG GTT CAA GAC TCC AGA 3'	901-1531	631
2-Hydroxy-phytanoyl-CoA-lyase	AJ245707	FP: 5' AGT GCC TTT GGA TTT TCC G 3' BP: 5' GAG GGA TTG TTG TAG CAG TTC C 3'	103-262	160
Syntaxin 5	L20822	FP: 5' GGA GAA GCT AAC AAT CCT GGC 3' BP: 5' TTG ACC ATG AGC CAC CGA TTG 3'	303-980	678
Diacylglycerolkinase	D78588	FP: 5' TCA GTC TGG GCT TTG ATG C 3' BP: 5' ATT CCG TCA CAC ACT ACT CGG 3'	1535-1715	181
HNF3	L13202	FP: 5' TCT TAC ATC GCG CTC ATC AC 3' BP: 5' TTG ACG AAG CAG TCG TTG AG 3'	19-188	170
Alpha-Tocopherol transfer protein	D16339	FP: 5' CTA CCA TGG AGT TCT GAG GTC C 3' BP: 5' TTC CGT TGA GTT TCC ACC TC 3'	369-527	159
Zn (2+) binding protein	X16481	FP: 5' TCG GAG AAG AGC GTG GAG 3' BP: 5' CGC TTC ATC CTC CTC TTC AG- 3'	119-382	264

8.1.7.2 Oligonukleotide/Primer der Verifizierung (Gehirn)

Kodiertes Protein	Gen Acc.Nr.	Forward Primer (FP), Backward Primer (BP)	Position	[bp]
Mas 1 proto-oncogene	J03823	FP: 5' GGC TAC AAC ACA GGC CTC TAT 3' BP: 5' GCC TAG GTT GCA TCT CGT CTT 3'	370-957	588
Platelet activation factor receptor	U04740	FP: 5' GGA TGG CTC AGG TAA CAT CAC 3' BP: 5' AGT CTG GTT GGC TGG CAT CAT 3'	611-1121	511
L1Rn B6 repetitive DNA element	X07686	FP: 5' AGA CTA CAT GGC ACC ATC GGA 3' BP: 5' TTG TGA CTC CTC TCT ATG GGC 3'	1399-1711	312
Set β isoform	S68987	FP: 5' ACC ATC CAC AAG TGT CTG CAC 3' BP: 5' TCG TCT TCT TCA CCT TCG TCC 3'	371-890	520

Kodiertes Protein	Gen Acc.Nr.	Forward <i>Primer</i> (FP), Backward <i>Primer</i> (BP)	Position	[bp]
Glucocorticoid receptor	M14053	FP: 5' CAC TGC AGG AGT CTC ACA AGA 3' BP: 5' TCA ACC ACC TCA TGA ATG GAG 3'	1634-2311	678
G-protein-coupled receptor	U65417	FP: 5' TCC AGA TCT ACG TGC TGC TCT 3' BP: 5' GAA CTG GTC GTG ATG GTG TAG 3'	331-970	640
EAAC1 glutamate transporter	U39555	FP: 5' CGT AGT GCT GCC ACT GAT CTA 3' BP: 5' AGG TCT GAG TGA ACG AGA TGG 3'	1070-1740	671

8.1.7.3 „Eberwine“-Oligo d(T) / T7-Primer

Benennung	Sequenz
T7-„Eberwine“	5'-AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC T ₁₅ -3'

8.1.7.4 Oligonukleotide für die Systemevaluierung

8.1.7.4.1 Linker-Primer für Poly(A)-RNA Herstellung

Benennung	Sequenz	Besonderheiten
„Match“-	B: 5'-GAT CTT GGA (AAA) ₉ -3'	GAPDH (human/rat)
„Mismatch“-	B: 5'-GAT CAT GCA (AAA) ₉ -3'	2 Mismatches
Gegenstück	F: 5'-AGC TAA TAT (TTT) ₉ -3'	komplementär

8.1.7.4.2 Mismatch-Detektion mit Desoxyribonukleotidfängern

Benennung	Sequenz	Besonderheiten
„Match“-Fänger	Biotin-5' -TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CCA A-3'	GAPDH (human)
„Mismatch“-Fänger	Biotin-5' -TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GCA T-3'	„mismatches“
„Match“-DNA-Probe	Cy5-5' -TTG GAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA-3'	
„Match“-RNA-Probe	Cy5-5' -rUrUrG rGrArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA-3'	

8.1.7.4.3 Mismatch-Detektion mit LNA-haltigen Oligonukleotiden

Mit T= LNA-Nukleotid; T= Desoxyribonukleotid

Benennung	Sequenz	Besonderheiten
„Match“-Fänger	Biotin-5' -TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CCA A-3'	GAPDH (human)
„Mismatch“-Fänger	Biotin-5' - TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GCA T-3'	„mismatch“
„Match“-Riboprobe	Cy5-5' -rUrUrG rGrArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA rArArA-3'	

8.1.7.5 Fängersequenzen der „Mustererkennung“

T= Desoxyribonukleotid; T= LNA-Nukleotid

Benennung	Fänger-Sequenz
1	5' Biotin-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT -AAA
2	5' Biotin-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT -AAG
3	5' Biotin-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT -AAC
4	5' Biotin-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT -AAT
5	5' Biotin-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT -AGA
6	5' Biotin-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT -AGG

7	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -AGC
8	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -AGT
9	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -ACA
10	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -ACG
11	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -ACC
12	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -ACT
13	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -ATA
14	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -ATG
15	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -ATC
16	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -ATT
17	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GAA
18	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GAG
19	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GAC
20	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GAT
21	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GGA
22	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GGG
23	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GGC
24	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GGT
25	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GCA
26	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GCG
27	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GCC
28	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GCT
29	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GTA
30	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GTG
31	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GTC
32	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -GTT
33	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CAA
34	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CAG
35	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CAC
36	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CAT
37	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CGA
38	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CGG
39	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CGC
40	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CGT
41	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CCA
42	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CCG
43	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CCC
44	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CCT
45	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CTA
46	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CTG
47	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CTC
48	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -CTT
49	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TAA
50	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TAG
51	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TAC
52	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TAT
53	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TGA
54	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TGG
55	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TGC
56	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TGT
57	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TCA
58	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TCG
59	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TCC
60	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TCT
61	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TTA
62	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TTG
63	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TTC
64	5'Biotin- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -TTT

8.1.7.6 Primer für die Herstellung von MT- und GAPDH-RNA-Amplifikaten

Am T7-Vorwärts-Primer ist am 5'-Ende die T7-Erkennungssequenz enthalten; (T7)= 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA-3'

Benennung	Sequenz
MT-1 T7-Vorwärts	5'-(T7)-TAA TTT CCG GAC CAA CTC CAG AG-3'
MT-1 Rückwärts	5'-CTC GGT AGA AAA CGG GGT TTA G-3'
MT-1 Fänger	5'-Biotin-AGT AAA CTG GGT GGA GGT GTA-3'
GAPDH T7-Vorwärts	5'-(T7)-CTA CCC ACG GCA AGT TCA ATG -3'
GAPDH Rückwärts	5'-GGG TTT CCC ATT GAT GAC CAG-3'
GAPDH Fänger	5'-Biotin-GCT TCC CAT TCT CAG CCT TGA-3'

8.1.8 Diät, Puffer und Lösungen

8.1.8.1 Zusammensetzung der experimentellen Diät AIN-93 G

Komponente	Anteil %
Casein	20
Maisstärke	30
Saccharose	32,3
Maiskeimöl ¹	8,7
Zellulose	3
Mineralienmischung ²	4
Vitaminmischung ³	2

¹: Hauptbestandteile: 10,5% Palmitinsäure, 28,5% Ölsäure, 1,3 % Linolensäure, 1,7 % Stearinsäure, 56,6 % Linolsäure (Gnauck, 1995);

²: Zugabe pro kg Diät (in g): NaCl, 1,148; NaHCO₃, 1,224; CaCO₃, 4,4; Ca(C₃H₅=₃)₂x5H₂O, 8,7; Ca₅(PO₄)₃xOH, 6,0; MgSO₄ x 7H₂O, 4,04; KH₂PO₄, 10,247; Na₂PO₄ x H₂O, 3,84; (in mg): FeCl₃ x 6 H₂O, 257; KI, 3,6; MnCl₂ x 4 H₂O, 36,03; NaF, 2,21; Na₂SeO₃ x 5 H₂O, 0,5; Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,5; CrCl₃ x 6 H₂O, 1,02; CuSO₄ x 5 H₂O;

³: Zugabe per kg Diät (in mg): Retinol, 8; Cholecalciferol, 0,6; dl-alpha-Tocopherol Acetat, 30; Menadion-Na-Bisulfit, 5,0; Thiamindichlorid, 5,0; Riboflavin, 10,0; Pyridoxin-Hydrochlorid, 6,0; Ca-D-Pantothenat, 50,0; Nikotinsäure, 20,0; Cholinchlorid, 1000,0; Folsäure, 200µg

8.1.8.2 HIP-Lösung

3 v/v Hexan
2 v/v Isopropanol
mit 50 mg BHT/l versetzen

8.1.8.3 Internal Standard Solution

Gemisch von C13- und C17-Fettsäuremethylestern (Sigma, Taufkirchen) 2 g/L bzw. 0,5 g/L gelöst in *tert.* Butylmethylether:

Systematischer Name der Fettsäuren	Trivialname	C	Artikelnummer
Trisdekan-	Trisdekan-	13:0	T 0627
Heptadekan-	Margar-	17:0	H4515

8.1.8.4 FAME-Mix

Gemisch von Fettsäuremethylestern folgender Fettsäuren (Sigma, Taufkirchen) je 1 mg/ml gelöst in *tert.* Butylmethylether:

Systematischer Name der Fettsäuren	Trivialname	C	Artikelnummer
Hexan-	Capron-	6:0	C 5049
Oktan-	Capryl-	8:0	C3375
Dekan-	Caprin-	10:0	C2125
Didekan-	Laurin-	12:0	L7272
Tetradekan-	Myrestin-	14:0	M 3378
Tetradeken-	Myrestolin-	14:1	M 3650
Pentadekan-	Pentadekan-	15:0	P6250
Hexadekan-	Palmitin-	16:0	P5177
Oktadekan-	Stearin-	18:0	S5376
Oktadeken-	Öl-	18:1	O4754
Oktadeken-, cis-11	cis-Vaccen-	18:1	V0384
Oktadekadien-	Linoleaidic-	18:2	L2251
Oktadekadien	Linol-	18:2	L1876
Oktadekatrien-	Gamma-Linolen-	18:3	L6503
Oktadekatrien-	Linolen-	18:3	L2626
Eikosan-	Arachidon-	20:0	A3881
Eikosen-	Gondon-	20:1	E6885
Eikosatrien-	Eicosatrien-	20:3	E6001
Eikosatetraen-	Arachidonic-	20:4	A9298
Eikosapentaen-	Eicosapentaen-	20:5	E5506
Docosatetraen-	Docosatetraen-	22:4	D3534
Docosahexaen-	Docosahexaen-	22:6	D2659

8.1.8.5 10 x Zweitstrangpuffer

200	mM	Tris pH 6,9
900	mM	KCl
46	mM	MgCl ₂
1,5	mM	Nicotinadenindinukleotid (Calbiochem) 481915
100	mM	(NH ₄) ₂ SO ₄

8.1.8.6 SOC-Medium

0,5	%	(w/v) Hefeextrakt
2	%	(w/v) Trypton
10	mM	NaCl
2,5	mM	KCl
10	mM	MgCl ₂
20	mM	MgSO ₄
20	mM	Glucose

8.1.8.7 LB-Amp-Medium

1	%	(w/v) Trypton
1	%	(w/v) NaCl
0,5	%	(w/v) Hefeextrakt

pH mit 0,1 N NaOH oder 0,1 N HCl auf 7,0 einstellen, Ampicillin zugeben auf 50 µg/ml, für festes Medium werden 15g Agar /L Medium zugegeben

8.1.8.8 50 x TAE-Puffer pH 8,5

242 g Tris-Base
57,1 ml Eisessig
37,2 g Na₂EDTA x 2H₂O
ad 1l Wasser

8.1.8.9 TAE-Agarosegel

0,8 g Agarose
1,0 µl 1%ige Ethidiumbromidlösung
ad 80 ml mit 1 x TAE (siehe 8.1.8.8)

8.1.8.10 10 x TBE-Puffer

121,1 g Tris-Base
61,3 g Borsäure
3,72 g EDTA
bidestilliertes Wasser ad 1l

8.1.8.11 TE-Puffer

10 mM Tris
1,0 mM EDTA
pH-Wert auf 7,5 einstellen

8.1.8.12 Polymerase-Reaktionspuffer

10 mM Tris-HCl pH 8,8
50 mM KCl
1,5 mM MgCl₂

8.1.8.13 X-Gal-Lösung

40 mg X-Gal
ad 1 ml mit DMF auffüllen

8.1.8.14 IPTG-Lösung

50 mg IPTG
ad 2 ml mit bidestilliertem Wasser auffüllen

8.1.8.15 1 %iges denaturierendes Agarosegel

0,8 g Agarose
65,4 ml DEPC-Wasser
8 ml 1 x MOPS (siehe 8.1.8.20)
6,6 ml Formaldehyd (37%ig)

8.1.8.16 Blockierungslösung

40 ml 20 x SSC
10 ml 10% SDS
40 ml 5 %BSA
110 ml ddH₂O

8.1.8.17 Niedrigsalz-Puffer (Nanogen)

50 mM NaPO₄, pH 7.0
mit 0,2 µm Filter sterilfiltrieren

8.1.8.18 Hochsalz-Puffer (Nanogen)

50 mM NaPO₄, pH 7.4
500 mM NaCl
mit 0,2 µm Filter sterilfiltrieren

8.1.8.19 20/20-Puffer (Nanogen)

20 mM Tris Base
20 mM Na₂HPO₄
mit 0,2 µm Filter sterilfiltrieren

8.1.8.20 10 x MOPS

0,2 M MOPS (3-[Morpholino]propansulfonsäure)
0,05 M Natrium-Acetat
0,01 M EDTA, pH 7,0

8.1.8.21 20 x SSC

175,3 g NaCl
88,2 g Natrium-Citrat
im 800 ml DEPC-Wasser lösen, pH mit 10 N NaOH auf 7,0 einstellen, autoklavieren

8.1.8.22 20% SDS

200 g Sodium Dodecylsulfat
mit DEPC-Wasser auf 1 l auffüllen

8.1.8.23 EGTA-Puffer

5 M EGTA
0,3 M Mannitol
0,012 M Tris-Base
pH 7,5

8.1.8.24 Diethanolaminpuffer

1,02 M Diethanolamin
0,51 mM MgCl₂
pH mit Tris-Base 9,8 einstellen

8.1.8.25 Trenngel (10%ig) SDS-Page für 4 Minigele

8,08 ml aqua dest.
5,00 ml 1,5 M Tris pH 8,8
6,6 ml 30 % Acrylamid
200 µl 10 % SDS (siehe 8.1.8.22)
34 µl 30 % Ammoniumpersulfat (APS)
10 µl TEMED

8.1.8.26 Sammelgel 5 %ig

7,00 ml aqua dest.
1,25 ml 1,5 M Tris pH 8,8
1,5 ml 30 % Acrylamid
100 µl 10 % SDS
33,5 µl 30 % Ammoniumpersulfat (APS)
5 µl TEMED

8.1.8.27 10 x Transferpuffer

58 g Tris
29 g Glycin
3,7 g SDS
ad 1 L mit bidestilliertem Wasser auffüllen

8.1.8.28 1 x Transferpuffer

100 ml 10x Transferpuffer (siehe 8.1.8.27)
200 ml Methanol
mit bidestilliertem Wasser ad 1L

8.1.8.29 Ponceau-S-Färbung

0,2 % w/v Ponceau S
3 % w/v Sulfosalicylsäure
0,1 % Essigsäure

8.1.8.30 TBST-Puffer

8 g NaCl
0,2 g KCl
3 g Tris-Base
0,05 % Tween 20
pH mit HCl auf 7,4 einstellen

8.1.8.31 Denaturierungslösung

50 mM NaOH
10 mM NaCl

8.1.8.32 Neutralisierungslösung

100 mM Tris pH 7,5

8.1.8.33 Equilibrierungslösung

10 x SSC (siehe 8.1.8.21)

8.1.8.34 TrisCl1,5 M Tris
pH mit HCl auf 8,8 einstellen**8.1.8.35 SDS-Equilibrierungspuffer**50 mM TrisCl (1.5 M, pH 8,8)
6 M Harnstoff
30 % (v/v) Glycerol (87%)
2 % (w/v) SDS
Bromphenolblau**8.1.8.36 1x SDS-Laufpuffer**25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS**8.1.8.37 Verdrängungslösung**0,375 M TrisCl, pH 8,8
50 % (v/v) Glycerol
Bromphenolblau**8.1.8.38 Lysepuffer 1**7 M Harnstoff
2 M Thioharnstoff
2 % CHAPS
0,8 % Pharmalyte pH 3-10
1 % DTT
5 mM Proteaseinhibitor**8.1.8.39 Trenngel 2D-Gelelektrophorese [Laemmli, 1970] :**

Substanz	Volumen [ml]
Acrylamid (30 %)/ Bisacrylamid (0,8 %)	375
1,5 M TrisCl, pH 8,8	225
SDS (20 %)	4,5
APS (10 %)	9
TEMED (10 %)	1,24

8.1.8.40 Rehydrationspuffer

8 M Harnstoff
0,5 % CHAPS
15 mM DTT
0,5 % IPG Puffer
etwas Bromphenolblau

8.1.8.41 Equilibrierungspuffer 1

6 M Harnstoff
0,05 M TrisCl, pH 8,8
30 % (v/v) Glycerol
2 % (w/v) SDS
1 % DTT
Bromphenolblau

8.1.8.42 Equilibrierungspuffer 2

6 M Harnstoff
0,05 M TrisCl, pH 8,8
30 % (v/v) Glycerol
2 % (w/v) SDS
4 % Iodacetamid
Bromphenolblau

8.1.8.43 Agaroselösung

0,5 % Agarose
in 1x SDS-Laufpuffer

8.1.8.44 PBS (Polyphosphatgepufferte Kochsalzlösung)

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
0,5 mM MgCl₂
1,5 mM KH₂PO₄
4 mM Na₂HPO₄, pH 7,4

8.1.8.45 Coomassie-Färbelösung

10 % (NH₄)₂SO₄
2 % H₃PO₄
500 ml MetOH
1.25 g Coomassie
auf 2 l mit A. bidest

8.2 Anhang zu Ergebnissen

Tab: Zinkabhängige Veränderung der Proteinexpression in Rattenleber von Kontroll- und Zinkmangelratten untersucht mit 2D-Elektrophorese und anschließender MALDI-TOF-Analyse und Datenbankvergleich (Mascot);(n=3); 1.Dimension pH 311, je 300 µg Protein; Detektion mittels Coomassiefärbung; D = x-fache Volumenänderung (Zn-/Zn+) im Mangel als Mittelwert aller durchgeführten Einzelversuche.

Spotnr.	D	MW (kDa)	Ip	Protein ID	MS-Analyse
53	-2,76	3,5	9,6	-	
29	-2,22	15	7,5	-	
30	-2,42	15	6,5	-	
37	-2,08	5	6,8	-	
52	-2,17	2	6,9	-	
1	-3,04	40	8,2	-	
10	-2,35	40	8,4	-	
22	-2,00	40	9,2	-	
50	-2,13	35	8,1	-	
66	+3,28	30	8,8	AAA41287	Glutathion-S-transferase
48	-2,19	35	7,8	-	
18	-2,38	40	6,5	B O88453	Scaffold Attachment Factor
29	-2,50	37	6,9	Q9EPI7	Putative Mage-Like Protein
45	+2,06	37	7,3	-	
80	-2,27	31	7,6	D63761NID BAA23759	Prec. adrenodoxin reductase.
73	-2,52	100	7,8	JC5261	Salt-Tolerant Protein
306	-2,41	97	6,1	-	

Tab: Untersuchung der zinkabhängigen Veränderung der Proteinexpression in Rattenleber von Kontroll- und Zinkmangelratten mittels 2D-Gelelektrophorese und anschließender MALDI-TOF-Analyse nach Auftrennung der ersten Dimension in die pH-Bereiche 47 und 6 11;(n=3), D = x-fache Volumenänderung (Zn-/Zn+) im Mangel als Mittelwert aller durchgeführten Einzelversuche.

Spotnr.	D-	MW (kD)	Bereich	iP	Protein-ID	MS-Analyse
470	-2,38	90	4-7	5,6		
502	-2,65	88	4-7	6,6		
516	-2,07	78	4-7	6,6		
553	-3,30	87	4-7	5,3		
563	-2,04	76	4-7	6,9		
565	-2,02	87	4-7	5,5		
569	-2,82	87	4-7	5,4		
570	-2,44	87	4-7	5,6	AAA60743	Thyroid hormone receptor β
635	-2,63	75	4-7	5,9		
642	-2,53	75	4-7	6,0		
648	-7,50	84	4-7	5,2		Tubulin-beta 7
649	+2,11	75	4-7	6,5		
674	-4,32	74	4-7	6,9		
675	-3,23	75	4-7	6,1		
683	-2,67	83	4-7	5,1		
686	-6,82	83	4-7	5,0	CAA44722	Vimentin
687	-2,83	73	4-7	5,0	A25113	Tubulin beta chain;
691	+2,26	74	4-7	5,9		
692	-2,09	73	4-7	5,9		
698	-2,93	73	4-7	6,0		
743	-2,72	72	4-7	5,8		
746	-7,16	81	4-7	5,2		
762	-5,87	81	4-7	5,9		
768	-2,90	71	4-7	6,1	CAA3754	Methionine Adenosyltransferase
769	-2,09	71	4-7	6,0		
770	-2,31	70	4-7	6,9		
783	-3,43	80	4-7	5,3		
794	-2,03	69	4-7	5,7		
812	-3,53	79	4-7	6,1	BAA09339, RATMSS1A	Protosomal ATPase NID, PRS7_RAT
825	-2,01	69	4-7	6,3		
827	-2,65	78	4-7	5,3		
836	-3,56	78	4-7	5,5		
841	-2,47	77	4-7	4,9		

Spotnr.	D-	MW (kD)	Bereich	iP	Protein-ID	MS-Analyse
845	-4,06	77	4-7	6,4	AAA40811	3-Methyl-2oxobutanoat
849	-2,55	77	4-7	6,6	CAA78146	Pyruvate dehydrogenase;
882	-2,23	76	4-7	6,7		
885	-2,36	67	4-7	6,1	AAA42252	Brain alpha-Tropomyosin (TMBr-1)
887	-2,42	65	4-7	5,4	ATRTC	Actin-beta
933	-2,17	75	4-7	5,6		
945	-3,41	65	4-7	6,0		
970	-4,43	74	4-7	6,2		
973	-2,15	72	4-7	6,6		
997	-2,40	64	4-7	6,7		
1003	-2,96	72	4-7	5,3		
1030	-3,68	72	4-7	5,5		
1042	-2,53	62	4-7	6,1		
1052	-2,26	63	4-7	5,9		
1067	-2,59	70	4-7	6,0		
1109	+2,22	69	4-7	5,9		
1147	-2,04	60	4-7	6,7		
1175	-2,80	67	4-7	5,0		
1177	-2,72	66	4-7	5,9		
1182	-4,36	57	4-7	5,1		
1193	-2,96	66	4-7	5,3	S34588	Senescence marker protein SMP-30
1199	-2,38	58	4-7	5,6		
1205	+2,44	65	4-7	6,5		
1208	-2,18	67	4-7	5,8		
1213	-2,89	57	4-7	5,9	AAA41336	Hydroxymethyl-CoA synthase
1227	-2,19	56	4-7	6,5	A49098	N-Hydroxy-arylamine sulfotransferase HAST-I
1238	-2,16	55	4-7	5,2		
1276	-2,02	62	4-7	6,2	AAA40830	Biliverdin reductase
1475	-2,74	55	4-7	5,0		
1484	-2,06	55	4-7	5,6		
1512	-4,94	54	4-7	6,2		
1601	-2,06	44	4-7	6,8		
1788	-2,43	44	4-7	6,5		
1806	+3,00	38	4-7	6,8		
2146	-2,65	29	4-7	6,1	CAA06377	SMC-Protein
2247	-2,33	26	4-7	6,2		Phosphotyrosine protein phosphatase ACP-1 ACP-2
2341	-2,02	24	4-7	5,8	AAA40785	Ca ²⁺ ATPase
2343	-2,05	24	4-7	6,0		
2404	-3,22	25	4-7	6,5	AAA42160	Superoxidedismutase Cu/Zn
2527	-3,53	19	4-7	6,2		
2575	-3,57	20	4-7	6,0		
2605	-3,33	19	4-7	5,2		
2606	-2,06	19	4-7	4,9		
2689	-2,42	14	4-7	6,3		
2728	-2,75	13	4-7	6,4		
2861	-2,09	10	4-7	6,9		
2874	-2,07	10	4-7	6,8	AAA41191	GAP-43-Protein
2893	-2,38	9	4-7	5,1		
4266	-2,39	73	4-7	5,8		
4283	-2,64	89	4-7	6,7		
4287	-2,06	72	4-7	6,7		
4289	-3,43	78	4-7	6,7		
4294	-2,03	74	4-7	6,7		
4302	-11,96	76	4-7	6,6		
4308	-2,56	81	4-7	6,5	AAB96342	Basement membrane-associated chondroitin proteoglycan bamacan
4309	-2,83	75	4-7	6,5		
4319	-2,67	76	4-7	6,9		
4323	-2,25	53	4-7	6,4	AAA41132	6-phosphatefructo bisphosphate 2 phosphatase
4327	-6,33	5	4-7	5,2		
4343	-3,87	74	4-7	4,8	A40439	UBF transcription factor, long form;
4358	+7,52	63	4-7	5,5		
163	-6,06	90	6-11	7,3		
195	-3,96	86	6-11	7,2		
203	-2,77	86	6-11	7,3		
213	-28,66	89	6-11	6,8		
214	-2,57	84	6-11	7,1		
216	-3,45	84	6-11	6,9		
221	-4,62	83	6-11	6,9		
227	-5,56	82	6-11	7,4		

Spotnr.	D-	MW (kD)	Bereich	iP	Protein-ID	MS-Analyse
228	-2,86	82	6-11	6,7		
249	-3,23	80	6-11	6,8		
259	-2,93	77	6-11	7,3		
268	-10,25	76	6-11	7,1		
276	-2,76	75	6-11	8,1	S28061	SCP1 protein
284	-7,62	75	6-11	7,0		
285	-2,82	75	6-11	6,6		
287	-4,13	74	6-11	7,2		
291	-5,86	72	6-11	8,7		
307	-2,73	73	6-11	7,8		
311	-7,81	72	6-11	7,2		
312	-2,18	72	6-11	8,1		
314	-3,09	71	6-11	7,0	CAA52670	L-iditol-2-dehydrogenase
317	-2,67	71	6-11	6,5		
322	-3,18	71	6-11	7,2		
323	-3,77	71	6-11	7,4		
346	-5,46	67	6-11	7,1		
363	-2,15	64	6-11	9,0	A59289, AA38840, MY 5B	Unconventional myosin heavy chain;
377	-5,84	63	6-11	7,5		
379	-3,47	61	6-11	8,6		
387	-54,25	65	6-11	6,9		
397	-3,28	62	6-11	7,5		
404	+2,62	61	6-11	6,6		
406	-5,20	61	6-11	7,1		
414	-2,28	60	6-11	7,5		
415	-4,03	60	6-11	7,6		
420	-3,32	58	6-11	8,1	AAD42162	L-3-Hydroxy acyl CoA dehydrogenase
423	-2,37	58	6-11	7,		
424	-2,57	62	6-11	7	AAB47777	VDAC1
425	-3,10	58	6-11	8,5		
433	-3,74	58	6-11	7,9		
481	-3,55	50	6-11	7,4		
488	-3,50	48	6-11	7,1	HDC 2	3-OH CoA dehydrogenase type II
493	-3,46	49	6-11	8,4		
496	-2,01	47	6-11	7,9		
507	-2,90	44	6-11	6,9		
522	-2,90	43	6-11	7,9		
587	-2,43	25	6-11	7,9		
615	-2,70	21	6-11	7,9		
616	-2,38	20	6-11	8,0		
728	-2,10	3	6-11	9,0		
740	-2,24	3	6-11	8,8		
1151	-2,88	79	6-11	7,0		
234	-4,56	81	6-11	7,2		
1156	-3,13	83	6-11	7,2		
1158	-3,03	81	6-11	7,5	AAA4163	Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase
1162	-3,27	73	6-11	7,5	AAA40771	Argininosuccinate synthetase
1172	-4,52	51	6-11	7,3	P14141	Carbonic anhydrase III
1173	-2,04	63	6-11	8,0		
1174	-3,58	6	6-11	7,6		
1176	-3,61	6	6-11	7,9	AAA41135	Fatty acid binding protein
1178	-6,35	5	6-11	8,2		
1180	-3,98	6	6-11	9,0	AAA40755	Apolipoprotein E1
1184	-3,48	74	6-11	8,1	XURT, CAA28952, THIM_RAT	Acetyl-CoA-Acyltransferase, mitochondrial
1189	-16,14	62	6-11	8,4		

9 Abkürzungen

μS	Mikrosiemens
2D	zweidimensional
A	Adenin (im Nukleotid enthaltene Base)
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb	Abbildung
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
ACN	Acetonitril
AE	<i>Acrodermatitis enteropathica</i>
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bcl-x _L	B-Zell-Lymphom-2-Mediator X Lang
BHT	Butylhydroxytoluol
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin (im Nukleotid enthaltene Base)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	<i>special cDNA synthesis</i>
CHAPS	3-[(3-Chloramidopropyl)dimethyl-amino]-1-Propansulfat
Ci	Curie
CK	<i>Creatine kinase</i> bzw. Kreatinkinase
cpm	<i>counts per minute</i>
cRNA	komplementäre RNA
Cy	Fluoreszenzfarbstoff, Cyanine Dye
Cy3	Fluoroprobe Emission 570, <i>Cyanine Dye</i>
Cy5	Fluoroprobe Emission 670, <i>Cyanine Dye</i>
CYP	Cytochrom P450
Cys ₂	zwei Cysteinreste
dA	Desoxyribonukleotid mit Adenin als Base
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (<i>dATP, dCTP, dGTP, dTTP</i>)
DR	<i>direct repeat</i>
ds-cDNA	doppelsträngige komplementäre DNA
dT	Desoxyribonukleotid mit Thymin als Base
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminitetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
E _p	Extinktion der Probe
FAME-Mix	Fettsäuremethylester-Gemisch

G	Guanin (im Nukleotid enthaltene Base)
G6PDH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
GAL4	Transkriptionsfaktor, Galaktosestoffwechsel von <i>S. cerevisiae</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GH	Wachstumshormon
GK	Glycerinkinase
Glu Rec	Glukocortikoidrezeptor
GOT	Aspartat Aminotransferase
GPO	Glycerinphosphatoxidase
h	Stunde
HCCA	Hydroxycyanozimtsäure
HIP	Hexan Isopropanol
His ₂	zwei Histidinreste
HK	Hexokinase
IEF	Isolelektrische Fokussierung
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IGFBP	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Bindungsprotein
iP	Isolelektrischer Punkt
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid
kD	Kilodalton
LacZ-Gen	β-Galaktosidase Gen
LB	Luria-Bertani
LDH	Laktatdehydrogenase
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>
M	molar; mol/l
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MDH	Malatdehydrogenase
min	Minute
MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
M _r	Relatives Molekulargewicht
MRE	<i>Metal response element</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MT	Metallothionein
MT-1	Metallothionein-1
MTF-1	<i>Metal response element-binding transcription factor-1</i>
n	Probenzahl
NAD	Nicotinamid-adeninukleotid
NADPH	Nicotinamid-adeninukleotidphosphat
nAmp	Nanoampere
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
Oligo-d(T)	Oligodesoxythymidinphosphat
p.M.	persönliche Mitteilung
p53	Tumorsuppressionsgen p53
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIC	Phenol Isoamylalkohol Chloroform-Gemisch
p.M.	Persönliche Mitteilung

Poly(A) ⁺	polyadenyliert
PP	<i>Peroxisome Proliferator</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</i>
PPRE	<i>PPAR response element</i>
HMG-CoA	β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA
rA	Ribonukleotid mit Adenin als Base
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
rU	Ribonukleotid mit Uracil als Base
RXR	Retinsäure X Rezeptor
s	Sekunde
S14	hepatisches Produkt <i>Spot 14</i> (lipogener Faktor)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> = Einzelnukleotid Polymorphismus
SOC	hoch nahrhaftes Medium
SOD	Superoxiddismutase
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
SSC	Natriumcitrat-Natriumchlorid-Puffer
SU	Untereinheit
T	Thymin (im Nukleotid enthaltene Base)
T3	Triiodthyronin
T4	Tetraiodthyronin
T7	T7-Polymerase
Tab	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA-Puffer
TAE	Tris Acetat EDTA
Taq	Thermostabile DNA Polymerase aus <i>thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris Borat EDTA
TBS (T)	Tris-gepufferte Kochsalzlösung, (mit Tween 20 versetzt)
TF IIIA	Transkriptionsfaktor IIIA, <i>Xenopus</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor β
TGF- α	transformierender Wachstumsfaktor α
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TOF	<i>time of flight</i>
TR	Thyroid Rezeptor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TSH	Thyreoidin stimulierendes Hormon
U	<i>Unit</i> = Einheit
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-Galactosid
Zn	Zink
Zn-	Zinkmangelgruppe
Zn+	Kontrollgruppe
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZnT	Zinktransporter

10 Literatur

Aaronson JS, Eckman B, Blevins RA, et al. Toward the development of a gene index to the human genome: an assessment of the nature of high-throughput EST sequence data. *Genome Res.* 1996; **6**:829-845.

Abbasi A, Shetty K. [Zinc: pathophysiological effects, deficiency status and effects of supplementation in elderly persons--an overview of the research]. *Z Gerontol Geriatr.* 1999; **32 Suppl 1**:175-179

Akabayashi A, Levin N, Paez X, Alexander JT, Leibowitz SF. Hypothalamic neuropeptide Y and its gene expression: relation to light/dark cycle and circulating corticosterone. *Mol Cell Neurosci.* 1994; **5**:210-218.

Andrews GK, Gallant KR, Cherian MG. Regulation of the ontogeny of rat liver metallothionein mRNA by zinc. *Eur J Biochem.* 1987; **166**:527-531

Andrews GK, Geiser J. Expression of the mouse metallothionein-I and -II genes provides a reproductive advantage during maternal dietary zinc deficiency. *J Nutr.* 1999; **129**:1643-1648.

Andrews GK. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol.* 2000; **59**:95-104.

Appel RD, Bairoch A, Hochstrasser DF. A new generation of information retrieval tools for biologists : the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem Sci.* 1994; **19**:258-260.
<ftp://ftp.expasy.org/databases/swiss-3dimage/IMAGES/JPEG/S3D00404.jpg>

Arst HNJ, MacDonald DW. A gene cluster in *Aspergillus nidulans* with an internally located cis-acting regulatory region. *Nature.* 1975; **254**:26-31.

Barbier O, Villeneuve L, Bocher V, et al. The UDP-glucuronosyltransferase 1A9 enzyme is a peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma target gene. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 13975-13983.

Barceloux DG. Zinc. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1999; **37**(2):279-92.

Barclay TB, Peters JM, Sewer MB, Ferrari L, Gonzalez FJ, Morgan ET. Modulation of cytochrome P-450 gene expression in endotoxemic mice is tissue specific and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha dependent. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; **290**:1250-1257.

Batteiger B, Newhall WJ, Jones RB. The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J Immunol Methods.* 1982; **55**:297-307.

Bauer M, Parvizi N. Pulsatile and diurnal secretion of GH and IGF-I in the chronically catheterized pig fetus. *J Endocrinol.* 1996; **149**:125-133.

Bettger WJ, Reeves PG, Moscatelli EA, Reynolds G, O'Dell BL. Interaction of zinc and essential fatty acids in the rat. *J Nutr.* 1979; **109**:480-488.

Bettger WJ, O'Dell BL. A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sci.* 1981; **28**:1425-1438.

Bettger WJ. Zinc and selenium, site-specific versus general antioxidation. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993; **71**:721-724.

Beyersmann D, Haase H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometales.* 2001; **14**:331-341.

Blakesley RW, Boezi JA. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem.* 1977; **82**:580-582.

Blanchard RK, Cousins RJ. Differential display of intestinal mRNAs regulated by dietary zinc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;**93**:6863-6868.

Blanchard RK, Cousins RJ. Upregulation of rat intestinal uroguanylin mRNA by dietary zinc restriction. *Am J Physiol*. 1997;**272**:G972-G978

Blanchard RK, Cousins RJ. Regulation of intestinal gene expression by dietary zinc: induction of uroguanylin mRNA by zinc deficiency. *J Nutr*. 2000;**130**:1393S-1398S.

Blanchard RK, Moore JB, Green CL, Cousins RJ. Modulation of intestinal gene expression by dietary zinc status: effectiveness of cDNA arrays for expression profiling of a single nutrient deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;**98**:13507-13513.

Bode JC, Hanisch P, Henning H, Koenig W, Richter FW, Bode C. Hepatic zinc content in patients with various stages of alcoholic liver disease and in patients with chronic active and chronic persistent hepatitis. *Hepatology*. 1988;**8**:1605-1609.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;**72**:248-254.

Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med*. 1990;**8**:281-291.

Breier BH, Bass JJ, Butler JH, Gluckman PD. The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status on pulsatile release of growth hormone and circulating concentrations of insulin-like growth factor 1. *J Endocrinol*. 1986;**111**:209-215.

Briefel RR, Bialostosky K, Kennedy-Stephenson J, McDowell MA, Ervin RB, Wright JD. Zinc intake of the U.S. population: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J Nutr*. 2000;**130**:1367S-1373S.

Browning JD, O'Dell BL. Low zinc status in guinea pigs impairs calcium uptake by brain synaptosomes. *J Nutr*. 1994;**124**:436-443.

Buckingham RE, Al-Barazanji KA, Toseland CD, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, protects against nephropathy and pancreatic islet abnormalities in Zucker fatty rats. *Diabetes*. 1998;**47**:1326-1334.

Buzzelli G, Dattolo P, Pinzani M, Brocchi A, Romano S, Gentilini P. Circulating growth hormone and insulin-like growth factor-I in nonalcoholic liver cirrhosis with or without superimposed hepatocarcinoma: evidence of an altered circadian rhythm. *Am J Gastroenterol*. 1993;**88**:1744-1748.

Cabre M, Folch J, Gimenez A, et al. Influence of zinc intake on hepatic lipid peroxidation and metallothioneins in alcoholic rats: relationship to collagen synthesis. *Int J Vitam Nutr Res*. 1995;**65**:45-50.

Cagen SZ, Klaassen CD. Hepatotoxicity of carbon tetrachloride in developing rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1979a;**50**:347-354.

Cagen SZ, Klaassen CD. Protection of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by zinc: role of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1979b;**51**:107-116.

Camps J, Bargallo T, Gimenez A, et al. Relationship between hepatic lipid peroxidation and fibrogenesis in carbon tetrachloride-treated rats: effect of zinc administration. *Clin Sci (Lond)*. 1992;**83**:695-700.

Cao J, Bobo JA, Liuzzi JP, Cousins RJ. Effects of intracellular zinc depletion on metallothionein and ZIP2 transporter expression and apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2001;**70**:559-566.

Car N, Car A, Granic M, Skrabalo Z, Momcilovic B. Zinc and copper in the serum of diabetic patients. *Biol Trace Elem Res*. 1992;**32**:325-329.

- Carninci P, Nishiyama Y, Westover A, et al. Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;**95**:520-524.
- Casey J, Davidson N. Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. *Nucleic Acids Res*. 1977;**4**:1539-1552.
- Cassuto H, Aran A, Cohen H, Eisenberger CL, Reshef L. Repression and activation of transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene during liver development. *FEBS Lett*. 1999;**457**:441-444.
- Cha BS, Ciaraldi TP, Carter L, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and retinoid X receptor (RXR) agonists have complementary effects on glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Diabetologia*. 2001;**44**:444-452.
- Chakravarty K, Leahy P, Becard D, et al. Sterol regulatory element-binding protein-1c mimics the negative effect of insulin on phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription. *J Biol Chem*. 2001;**276**:34816-34823.
- Chernausek SD, Turner R. Attenuation of spontaneous, nocturnal growth hormone secretion in children with hypothyroidism and its correlation with plasma insulin-like growth factor I concentrations. *J Pediatr*. 1989;**114**:968-972.
- Chesters JK, Quarterman J. Effects of zinc deficiency on food intake and feeding patterns of rats. *Br J Nutr*. 1970;**24**:1061-1069.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;**162**:156-159.
- Choo Y, Klug A. Selection of DNA binding sites for zinc fingers using rationally randomized DNA reveals coded interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;**91**:11168-11172.
- Chu R, Madison LD, Lin Y, et al. Thyroid hormone (T3) inhibits ciprofibrate-induced transcription of genes encoding beta-oxidation enzymes: cross talk between peroxisome proliferator and T3 signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;**92**:11593-11597.
- Chvapil M. New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sci*. 1973;**13**:1041-1049.
- Clarke SD, Jump D. Polyunsaturated fatty acids regulate lipogenic and peroxisomal gene expression by independent mechanisms. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1997;**57**:65-69.
- Clegg MS, Keen CL, Donovan SM. Zinc deficiency-induced anorexia influences the distribution of serum insulin-like growth factor-binding proteins in the rat. *Metabolism*. 1995;**44**:1495-1501.
- Cockell KA, Fischer PW, Belonje B. Elemental composition of anatomically distinct regions of rat liver. *Biol Trace Elem Res*. 1999;**70**:251-263.
- Coto JA, Hadden EM, Sauro M, Zorn N, Hadden JW. Interleukin 1 regulates secretion of zinc-thymulin by human thymic epithelial cells and its action on T-lymphocyte proliferation and nuclear protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;**89**:7752-7756.
- Cousins RJ. A role of zinc in the regulation of gene expression. *Proc Nutr Soc*. 1998;**57**:307-311.
- Cousins RJ. Nutritional regulation of gene expression. *Am J Med*. 1999;**106**:20S-23S.
- Cousins RJ, McMahon RJ. Integrative aspects of zinc transporters. *J Nutr*. 2000;**130**:1384S-1387S.
- Cowart LA, Wei S, Hsu MH, et al. The CYP4A isoforms hydroxylate epoxyeicosatrienoic acids to form high affinity peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem*. 2002;**277**:35105-35112.

- Cui L, Blanchard RK, Coy LM, Cousins RJ. Prouroguanylin overproduction and localization in the intestine of zinc-deficient rats. *J Nutr.* 2000;**130**:2726-2732.
- Cui L, Blanchard RK, Cousins RJ. Dietary zinc deficiency increases uroguanylin accumulation in rat kidney. *Kidney Int.* 2001;**59**:1424-1431.
- Cui L, Schoene NW, Zhu L, Fanzo JC, Alshatwi A, Lei KY. Zinc depletion reduced Egr-1 and HNF-3beta expression and apolipoprotein A-I promoter activity in Hep G2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;**283**:C623-C630
- Cui L, Blanchard RK, Cousins RJ. The permissive effect of zinc deficiency on uroguanylin and inducible nitric oxide synthase gene upregulation in rat intestine induced by interleukin 1alpha is rapidly reversed by zinc repletion. *J Nutr.* 2003;**133**:51-56.
- Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S, Dolphin CT, Patel R, Clark JB. Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem.* 1998;**70**:1366-1375.
- Dana SL, Hoener PA, Bilakovics JM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor subtype-specific regulation of hepatic and peripheral gene expression in the Zucker diabetic fatty rat. *Metabolism.* 2001;**50**:963-971.
- Davies NT, Nightingale R. The effects of phytate on intestinal absorption and secretion of zinc, and whole-body retention of Zn, copper, iron and manganese in rats. *Br J Nutr.* 1975;**34**:243-258.
- Davis SR, McMahon RJ, Cousins RJ. Metallothionein knockout and transgenic mice exhibit altered intestinal processing of zinc with uniform zinc-dependent zinc transporter-1 expression. *J Nutr.* 1998;**128**:825-831.
- Davis SR, Cousins RJ. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr.* 2000;**130**:1085-1088.
- Dhiman N, Bonilla R, O'Kane DJ, Poland GA. Gene expression microarrays: a 21st century tool for directed vaccine design. *Vaccine.* 2001;**20**:22-30.
- Diezel W, Kopperschlager G, Hofmann E. An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. *Anal Biochem.* 1972;**48**:617-620.
- DiSilvestro RA. Zinc in relation to diabetes and oxidative disease. *J Nutr.* 2000;**130**:1509S-1511S.
- Droke EA, Spears JW, Armstrong JD, Kegley EB, Simpson RB. Dietary zinc affects serum concentrations of insulin and insulin-like growth factor I in growing lambs. *J Nutr.* 1993;**123**:13-19.
- Duplus E, Forest C. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochem Pharmacol.* 2002;**64**:893-901.
- Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, et al. Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;**89**:3010-3014.
- Eder K, Kirchgessner M. [The effect of zinc depletion on the fat content and fatty acid composition of the liver and brain in forcibly fed rats]. *Z Ernahrungswiss.* 1993;**32**:187-197.
- Eder K, Kirchgessner M. The effect of zinc deficiency on erythrocyte membrane lipids of force-fed rats receiving a diet containing coconut oil or fish oil. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 1994a;**8**:63-73.
- Eder K, Kirchgessner M. Levels of polyunsaturated fatty acids in tissues from zinc-deficient rats fed a linseed oil diet. *Lipids.* 1994b;**29**:839-844.
- Eder K, Kirchgessner M. [The effect of zinc deficiency on heart and brain lipids in rats force-fed with coconut oil or fish oil diets]. *Z Ernahrungswiss.* 1994c;**33**:136-145.

- Eder K, Kirchgessner M. Dietary fat influences the effect of zinc deficiency on liver lipids and fatty acids in rats force-fed equal quantities of diet. *J Nutr.* 1994d;**124**:1917-1926.
- Eder K, Kirchgessner M. Zinc deficiency and activities of lipogenic and glycolytic enzymes in liver of rats fed coconut oil or linseed oil. *Lipids.* 1995a;**30**:63-69.
- Eder K, Kirchgessner M. Activities of liver microsomal fatty acid desaturases in zinc-deficient rats force-fed diets with a coconut oil/safflower oil mixture of linseed oil. *Biol Trace Elem Res.* 1995b;**48**: 215-229.
- Eder K, Kirchgessner M. Zinc deficiency and the desaturation of linoleic acid in rats force-fed fat-free diets. *Biol Trace Elem Res.* 1996;**54**:173-183.
- Edman CF, Raymond DE, Wu DJ, et al. Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips. *Nucleic Acids Res.* 1997;**25**:4907-4914.
- Elangbam CS, Tyler RD, Lightfoot RM. Peroxisome proliferator-activated receptors in atherosclerosis and inflammation--an update. *Toxicol Pathol.* 2001;**29**:224-231.
- Eymann C, Homuth G, Scharf C, Hecker M. Bacillus subtilis functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *J Bacteriol.* 2002; **184**:2500-2520.
- Falchuk KH. The molecular basis for the role of zinc in developmental biology. *Mol Cell Biochem.* 1998;**188**:41-48.
- Fanzo JC, Reaves SK, Cui L, et al. Zinc status affects p53, gadd45, and c-fos expression and caspase-3 activity in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;**281**:C751-C757
- Faure P, Corticelli P, Richard MJ, et al. Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketotic patients: influence of insulin therapy. *Clin Chem.* 1993;**39**:789-793.
- Faure P, Benhamou PY, Perard A, Halimi S, Roussel AM. Lipid peroxidation in insulin-dependent diabetic patients with early retina degenerative lesions: effects of an oral zinc supplementation. *Eur J Clin Nutr.* 1995;**49**:282-288.
- Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983;**132**:6-13.
- Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.* 1982;**28**:2077-2080.
- Fraker PJ, Gershwin ME, Good RA, Prasad A. Interrelationships between zinc and immune function. *Fed Proc.* 1986;**45**:1474-1479.
- Fraker PJ, King LE, Laakko T, Vollmer TL. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *J Nutr.* 2000;**130**:1399S-1406S.
- Freake HC, Govoni KE, Guda K, Huang C, Zinn SA. Actions and interactions of thyroid hormone and zinc status in growing rats. *J Nutr.* 2001;**131**:1135-1141.
- Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1999;**10**:245-257.
- Fruchart JC, Staels B, Duriez P. PPARs, metabolic disease and atherosclerosis. *Pharmacol Res.* 2001;**44**:345-352.
- Gabrielson E, Berg K, Anbazhagan R. Functional genomics, gene arrays, and the future of pathology. *Mod Pathol.* 2001;**14**:1294-1299.

- Gaither LA, Eide DJ. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals*. 2001;**14**:251-270.
- Ganesan K, Jiang L, Rathod PK. Stochastic versus stable transcriptional differences on Plasmodium falciparum DNA microarrays. *Int J Parasitol*. 2002;**32**:1543-1550.
- Gearing KL, Crickmore A, Gustafsson JA. Structure of the mouse peroxisome proliferator activated receptor alpha gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994a;**199**:255-263.
- Gearing KL, Gottlicher M, Widmark E, et al. Fatty acid activation of the peroxisome proliferator activated receptor, a member of the nuclear receptor gene superfamily. *J Nutr*. 1994b;**124**:1284S-1288S.
- Girnun GD, Domann FE, Moore SA, Robbins ME. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Mol Endocrinol*. 2002;**16**:2793-2801.
- Gobom J, Schuerenberg M, Mueller M, Theiss D, Lehrach H, Nordhoff E. Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Anal Chem*. 2001;**73**:434-438.
- Gorg A, Postel W, Domscheit A, Gunther S. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients of leaf proteins from barley (*Hordeum vulgare*): method, reproducibility and genetic aspects. *Electrophoresis*. 1988;**9**:681-692.
- Gorg A, Boguth G, Obermaier C, Posch A, Weiss W. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis*. 1995;**16**:1079-1086.
- Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000;**21**:1037-1053.
- Green S. PPAR: a mediator of peroxisome proliferator action. *Mutat Res*. 1995;**333**:101-109.
- Gross C, Kelleher M, Iyer VR, Brown PO, Winge DR. Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J Biol Chem*. 2000;**275**:32310-32316.
- Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM, Lazar MA. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med*. 2002;**8**:1122-1128.
- Gustafsson JA, Gearing K, Widmark E, et al. Effects of fatty acids on gene expression mediated by a member of the nuclear receptor supergene family. *Prog Clin Biol Res*. 1994;**387**:21-28.
- Hakkola EH, Hiltunen JK, Autio-Harmainen HI. Mitochondrial 2,4-dienoyl-CoA reductases in the rat: differential responses to clofibrate treatment. *J Lipid Res*. 1994;**35**:1820-1828.
- Hanas JS, Hazuda DJ, Bogenhagen DF, Wu FY, Wu CW. Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene. *J Biol Chem*. 1983;**258**:14120-14125.
- Hara A, Radin NS. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem*. 1978;**90**:420-426.
- Hegardt FG. Transcriptional regulation of mitochondrial HMG-CoA synthase in the control of ketogenesis. *Biochimie*. 1998;**80**:803-806.
- Heller MJ. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2002;**4**:129-153.
- Hillier LD, Lennon G, Becker M, et al. Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags. *Genome Res*. 1996;**6**:807-828.

Ho E, Ames BN. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;**99**:16770-16775.

http://innovation.swmed.edu/expression_microarray_cross.html; 13.02.03

<http://www.nutrition.org/nutinfo/content/zinc.shtml>; 28.01.03

http://us.expasy.org/cgi-bin/pi_tool; 18.12.02

Hunt MC, Yang YZ, Eggertsen G, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) regulates bile acid biosynthesis. *J Biol Chem*. 2000;**275**:28947-28953.

Hurley LS, Cosens G, Theriault LL. Magnesium, calcium and zinc levels of maternal and fetal tissues in magnesium deficient rats. *J Nutr*. 1976;**106**:1261-1264.

Ishisaki Z, Takaishi M, Furuta I, Huh N. Calmin, a protein with calponin homology and transmembrane domains expressed in maturing spermatogenic cells. *Genomics*. 2001; **74**:172-179.

Iwata M, Takebayashi T, Ohta H, Alcalde RE, Itano Y, Matsumura T. Zinc accumulation and metallothionein gene expression in the proliferating epidermis during wound healing in mouse skin. *Histochem Cell Biol*. 1999;**112**:283-290.

Jackson MJ, Jones DA, Edwards RH. Tissue zinc levels as an index of body zinc status. *Clin Physiol*. 1982;**2**:333-343.

Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*. 1995;**16**:3-34.

Jump DB, Ren B, Clarke S, Thelen A. Effects of fatty acids on hepatic gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1995;**52**:107-111.

Jung D, Fried M, Kullak-Ublick GA. Human apical sodium-dependent bile salt transporter gene (SLC10A2) is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem*. 2002;**277**:30559-30566.

Kainu T, Wikstrom AC, Gustafsson JA, Peltto-Huikko M. Localization of the peroxisome proliferator-activated receptor in the brain. *Neuroreport*. 1994;**5**:2481-2485.

Karbowska J, Kochan Z, Swierczynski J. Differential effect of clofibrate on acetyl-CoA carboxylase mRNA level in rat white and brown adipose tissue. *Life Sci*. 2000;**66**:545-552.

Kasarskis EJ. Zinc metabolism in normal and zinc-deficient rat brain. *Exp Neurol*. 1984;**85**:114-127.

Kassam A, Capone JP, Rachubinski RA. The short heterodimer partner receptor differentially modulates peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated transcription from the peroxisome proliferator-response elements of the genes encoding the peroxisomal beta-oxidation enzymes acyl-CoA oxidase and hydratase-dehydrogenase. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;**176**:49-56.

Keeling PW, Ruse W, Bull J, Hannigan B, Thompson RP. Direct measurement of the hepatointestinal extraction of zinc in cirrhosis and hepatitis. *Clin Sci (Lond)*. 1981;**61**:441-444.

Kelly LJ, Vicario PP, Thompson GM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. *Endocrinology*. 1998;**139**:4920-4927.

Kennedy KJ, Rains TM, Shay NF. Zinc deficiency changes preferred macronutrient intake in subpopulations of Sprague-Dawley outbred rats and reduces hepatic pyruvate kinase gene expression. *J Nutr*. 1998;**128**:43-49.

- Kepler TB, Crosby L, Morgan KT. Normalization and analysis of DNA microarray data by self-consistency and local regression. *Genome Biol.* 2002;**3**:RESEARCH0037
- Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2001;**2**:282-286.
- Kiillerich S, Dietrichson O, Loud FB, et al. Zinc depletion in alcoholic liver diseases. *Scand J Gastroenterol.* 1980;**15**:363-367.
- Kim HI, Kim JW, Kim SH, Cha JY, Kim KS, Ahn YH. Identification and functional characterization of the peroxisomal proliferator response element in rat GLUT2 promoter. *Diabetes.* 2000;**49**:1517-1524.
- Kimball SR, Chen SJ, Risica R, Jefferson LS, Leure-duPree AE. Effects of zinc deficiency on protein synthesis and expression of specific mRNAs in rat liver. *Metabolism.* 1995;**44**:126-133.
- Kirchgessner M, Roth HP. [Relationship between clinical deficiency symptoms and enzyme activity in zinc deficiency]. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1975;**22**:14-26.
- Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* 1975;**26**:231-243.
- Koo SI, Turk DE. Effect of zinc deficiency on intestinal transport triglyceride in the rat. *J Nutr.* 1977;**107**:909-919.
- Koshkin AA, Wengel J. Synthesis of Novel 2',3'-Linked Bicyclic Thymine Ribonucleosides. *J Org Chem.* 1998;**63**:2778-2781.
- Kraegen EW, Cooney GJ, Ye J, Thompson AL. Triglycerides, fatty acids and insulin resistance--hyperinsulinemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;**109**:S516-S526
- Kroll TC, Wolfl S. Ranking: a closer look on globalisation methods for normalisation of gene expression arrays. *Nucleic Acids Res.* 2002;**30**:e50
- Kudo H, Doi Y, Nishino T, Nara S, Hamasaki K, Fujimoto S. Dietary zinc deficiency decreases glutathione S-transferase expression in the rat olfactory epithelium. *J Nutr.* 2000;**130**:38-44.
- Kukral HW, Kirchgessner M, Roth HP. [Effect of marginal zinc deficiency on humoral immunity in rats]. *Z Ernährungswiss.* 1988;**27**:126-136.
- Kumar R, Singh SK, Koshkin AA, Rajwanshi VK, Meldgaard M, Wengel J. The first analogues of LNA (locked nucleic acids): phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA. *Bioorg Med Chem Lett.* 1998;**8**:2219-2222.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;**227**:680-685.
- Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem.* 2000;**275**:34803-34809.
- Lansdown AB. Metallothioneins: potential therapeutic aids for wound healing in the skin. *Wound Repair Regen.* 2002;**10**:130-132.
- Latruffe N, Vamecq J. Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie.* 1997;**79**:81-94.
- Latruffe N, Nicolas-Frances V, Dasari VK, Osumi T. Studies on regulation of the peroxisomal beta-oxidation at the 3-ketothiolase step. Dissection of the rat liver thiolase B gene promoter. *Adv Exp Med Biol.* 1999;**466**:253-259.

Latruffe N, Malki MC, Nicolas-Frances V, Clemencet MC, Jannin B, Berlot JP. Regulation of the peroxisomal beta-oxidation-dependent pathway by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and kinases. *Biochem Pharmacol.* 2000;**60**:1027-1032.

Lawrence JW, Li Y, Chen S, et al. Differential gene regulation in human versus rodent hepatocytes by peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha. PPAR alpha fails to induce peroxisome proliferation-associated genes in human cells independently of the level of receptor expression. *J Biol Chem.* 2001;**276** :31521-31527.

Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science.* 1999;**285**:1390-1393.

Lee ML, Kuo FC, Whitmore GA, Sklar J. Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;**97**:9834-9839.

Lee RG, Rains TM, Tovar-Palacio C, Beverly JL, Shay NF. Zinc deficiency increases hypothalamic neuropeptide Y and neuropeptide Y mRNA levels and does not block neuropeptide Y-induced feeding in rats. *J Nutr.* 1998;**128**:1218-1223.

Lee RG, Rains TM, Tovar-Palacio C, Beverly JL, Shay NF. Zinc deficiency increases hypothalamic neuropeptide Y and neuropeptide Y mRNA levels and does not block neuropeptide Y-induced feeding in rats. *J Nutr.* 1998;**128**:1218-1223

Lefebvre D, Beckers F, Ketelslegers JM, Thissen JP. Zinc regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I), growth hormone receptor (GHR) and binding protein (GHBP) gene expression in rat cultured hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;**138**:127-136.

Lichtlen P, Schaffner W. The "metal transcription factor" MTF-1: biological facts and medical implications. *Swiss Med Wkly.* 2001;**131**:647-652.

Linden D, Alsterholm M, Wennbo H, Oscarsson J. PPARalpha deficiency increases secretion and serum levels of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Lipid Res.* 2001;**42**:1831-1840.

Liuzzi JP, Blanchard RK, Cousins RJ. Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *J Nutr.* 2001;**131**:46-52.

Louet JF, Le May C, Pegorier JP, Decaux JF, Girard J. Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids. *Biochem Soc Trans.* 2001a;**29**: 310-316.

Louet JF, Chatelain F, Decaux JF, et al. Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-independent pathway. *Biochem J.* 2001b;**354**:189-197.

Luo L, Salunga RC, Guo H, et al. Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nat Med.* 1999;**5**:117-122.

Lusky M, Berg L, Weiher H, Botchan M. Bovine papilloma virus contains an activator of gene expression at the distal end of the early transcription unit. *Mol Cell Biol.* 1983;**3**:1108-1122.

Lyons TJ, Gasch AP, Gaither LA, Botstein D, Brown PO, Eide DJ. Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;**97**:7957-7962.

MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem.* 1995;**64**:345-373.

Mader U, Homuth G, Scharf C, Buttner K, Bode R, Hecker M. Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression modulated by amino acid availability. *J Bacteriol.* 2002;**184**:4288-4295.

Marcus SL, Miyata KS, Zhang B, Subramani S, Rachubinski RA, Capone JP. Diverse peroxisome proliferator-activated receptors bind to the peroxisome proliferator-responsive elements of the rat hydratase/dehydrogenase and fatty acyl-CoA oxidase genes but differentially induce expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;**90**:5723-5727.

Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem*. 1997;**272**:28210-28217.

Mascaro C, Acosta E, Ortiz JA, et al. Characterization of a response element for peroxisomal proliferator activated receptor (PPRE) in human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I. *Adv Exp Med Biol*. 1999;**466**:79-85.

Mater MK, Thelen AP, Pan DA, Jump DB. Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription. *J Biol Chem*. 1999;**274**:32725-32732.

Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, et al. Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha. *J Lipid Res*. 2002;**43**:107-114.

Maughan NJ, Lewis FA, Smith V. An introduction to arrays. *J Pathol*. 2001;**195**:3-6.

McDonald WH, Yates JR. Proteomic tools for cell biology. *Traffic*. 2000;**1**:747-754.

McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem*. 1983;**29**:538-542.

McMahon RJ, Cousins RJ. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;**95**:4841-4846.

McMahon RJ, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters. *J Nutr*. 1998;**128**:667-670.

McMillan DA, Schnell RC. Amelioration of bromobenzene hepatotoxicity in the male rat by zinc. *Fundam Appl Toxicol*. 1985;**5**:297-304.

McNall AD, Etherton TD, Fosmire GJ. The impaired growth induced by zinc deficiency in rats is associated with decreased expression of the hepatic insulin-like growth factor I and growth hormone receptor genes. *J Nutr*. 1995;**125**:874-879.

Mills CF, Quarterman J, Chesters JK, Williams RB, Dalgarno AC. Metabolic role of zinc. *Am J Clin Nutr*. 1969;**22**:1240-1249.

Miyamoto T, Sakurai A, DeGroot LJ. Effects of zinc and other divalent metals on deoxyribonucleic acid binding and hormone-binding activity of human alpha 1 thyroid hormone receptor expressed in *Escherichia coli*. *Endocrinology*. 1991;**129**:3027-3033.

Moore JB, Blanchard RK, McCormack WT, Cousins RJ. cDNA array analysis identifies thymic LCK as upregulated in moderate murine zinc deficiency before T-lymphocyte population changes. *J Nutr*. 2001;**131**:3189-3196.

Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem*. 1998;**273**:16710-16714.

Moynahan EJ The +Lancet, volume ii, 1974: Acrodermatitis enteropathica: a lethal inherited human zinc-deficiency disorder. by E.J. Moynahan. *Nutr Rev*. 1982;**40**:84-86.

Muga SJ, Grider A. Partial characterization of a human zinc-deficiency syndrome by differential display. *Biol Trace Elem Res*. 1999;**68**:1-12.

- Nassir F, Blanchard RK, Mazur A, Cousins RJ, Davidson NO. Apolipoprotein B mRNA editing is preserved in the intestine and liver of zinc-deficient rats. *J Nutr.* 1996;**126**:860-864.
- Nelson PS, Han D, Rochon Y, et al. Comprehensive analyses of prostate gene expression: convergence of expressed sequence tag databases, transcript profiling and proteomics. *Electrophoresis.* 2000;**21**:1823-1831.
- Nevins JR. Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. *Cell.* 1981;**26**:213-220.
- Nielsen HB, Knudsen S. Avoiding cross hybridization by choosing nonredundant targets on cDNA arrays. *Bioinformatics.* 2002;**18**:321-322.
- Ninh NX, Thissen JP, Maiter D, Adam E, Mulumba N, Ketelslegers JM. Reduced liver insulin-like growth factor-I gene expression in young zinc-deprived rats is associated with a decrease in liver growth hormone (GH) receptors and serum GH-binding protein. *J Endocrinol.* 1995;**144**:449-456.
- Ninh NX, Thissen JP, Collette L, Gerard G, Khoi HH, Ketelslegers JM. Zinc supplementation increases growth and circulating insulin-like growth factor I (IGF-I) in growth-retarded Vietnamese children. *Am J Clin Nutr.* 1996;**63**:514-519.
- Ninh NX, Maiter D, Lause P, et al. Continuous administration of growth hormone does not prevent the decrease of IGF-I gene expression in zinc-deprived rats despite normalization of liver GH binding. *Growth Horm IGF Res.* 1998a;**8**:465-472.
- Ninh NX, Maiter D, Verniers J, Lause P, Ketelslegers JM, Thissen JP. Failure of exogenous IGF-I to restore normal growth in rats submitted to dietary zinc deprivation. *J Endocrinol.* 1998b;**159**:211-217.
- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975;**250**:4007-4021.
- O'Shaughnessy RF, Seery JP, Celis JE, Frischauf A, Watt FM. PA-FABP, a novel marker of human epidermal transit amplifying cells revealed by 2D protein gel electrophoresis and cDNA array hybridisation. *FEBS Lett.* 2000;**486**:149-154.
- Oliver JW, Sachan DS, Su P, Applehans FM. Effects of zinc deficiency on thyroid function. *Drug Nutr Interact.* 1987;**5**:113-124.
- Ott ES, Shay NF. Zinc deficiency reduces leptin gene expression and leptin secretion in rat adipocytes. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001;**226**:841-846.
- Pallauf J, Kirchgessner M. [Experimental zinc deficiency in growing rats. 2. Zinc metabolism in the animal organism]. *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd.* 1971a;**28**:128-139.
- Pallauf J, Kirchgessner M. [Concentration and distribution of zinc in the organism. 1. Zinc metabolism in the animal organism]. *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd.* 1971b;**28**:121-128.
- Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation.* 2000;**101**:235-238.
- Poirier H, Braissant O, Niot I, Wahli W, Besnard P. 9cis-retinoic acid enhances fatty acid-induced expression of the liver fatty acid-binding protein gene. *FEBS Lett.* 1997;**412**:480-484.
- Poole M, Bridgers K, Alexson SE, Corton JC. Altered expression of the carboxylesterases ES-4 and ES-10 by peroxisome proliferator chemicals. *Toxicology.* 2001;**165**:109-119.
- Prasad AS, Halstead JA, Nadimi. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am J Med.* 1961,**31**:532-546
- Prasad AS, Miale A, Farid Z, Sandstead HH, Schuler AR. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, dwarfism and hypogonadism. *J Lab Clin Med.* 1963a,**61**:537-548

- Prasad AS, Miale A, Farid Z, Sandstead HH, Schulert AR, Darby WJ. Biochemical studies on dwarfism, hypogonadism and anemia. *Arch Intern Med.* 1963b; **3**:407-427
- Prasad AS, Oberleas D. Zinc deficiency in man. *Lancet.* 1973; **1**:1520-1521.
- Prasad AS. Clinical, endocrinologic, and biochemical effects of zinc deficiency. *Spec Top Endocrinol Metab.* 1985; **7**:45-76.
- Prasad AS. Clinical and biochemical manifestation zinc deficiency in human subjects. *J Pharmacol.* 1985; **16**:344-352.
- Prasad AS, Meftah S, Abdallah J, et al. Serum thymulin in human zinc deficiency. *J Clin Invest.* 1988; **82**:1202-1210.
- Prasad AS. Zinc: an overview. *Nutrition.* 1995; **11**:93-99.
- Prasad AS, Beck FW, Endre L, Handschu W, Kukuruga M, Kumar G. Zinc deficiency affects cell cycle and deoxythymidine kinase gene expression in HUT-78 cells. *J Lab Clin Med.* 1996; **128**:51-60.
- Prasad AS. Zinc and immunity. *Mol Cell Biochem.* 1998; **188**:63-69.
- Prasad AS, Bao B, Beck FW, Sarkar FH. Zinc enhances the expression of interleukin-2 and interleukin-2 receptors in HUT-78 cells by way of NF-kappaB activation. *J Lab Clin Med.* 2002; **140**:272-289.
- Pratt JM, Petty J, Riba-Garcia I, et al. Dynamics of protein turnover, a missing dimension in proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2002; **1**:579-591.
- Quarterman J, Williams RB, Humphries WR. An apparatus for the regulation of the food supply to rats. *Br J Nutr.* 1970; **24**:1049-1051.
- Reaves SK, Fanzo JC, Wu JY, et al. Plasma apolipoprotein B-48, hepatic apolipoprotein B mRNA editing and apolipoprotein B mRNA editing catalytic subunit-1 mRNA levels are altered in zinc-deficient rats. *J Nutr.* 1999; **129**:1855-1861.
- Reaves SK, Wu JY, Wu Y, et al. Regulation of intestinal apolipoprotein B mRNA editing levels by a zinc-deficient diet and cDNA cloning of editing protein in hamsters. *J Nutr.* 2000; **130**:2166-2173.
- Reddy JK, Mannaerts GP. Peroxisomal lipid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1994; **14** :343-370.
- Redemann N, Gaul U, Jackle H. Disruption of a putative Cys-zinc interaction eliminates the biological activity of the Kruppel finger protein. *Nature.* 1988; **332**:90-92.
- Ren B, Thelen A, Jump DB. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha inhibits hepatic S14 gene transcription. Evidence against the peroxisome proliferator-activated receptor alpha as the mediator of polyunsaturated fatty acid regulation of s14 gene transcription. *J Biol Chem.* 1996; **271**:17167-17173.
- Riordan JF. Biochemistry of zinc. *Med Clin North Am.* 1976; **60**:661-674.
- Ripp SL, Fitzpatrick JL, Peters JM, Prough RA. Induction of CYP3A expression by dehydroepiandrosterone: involvement of the pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos.* 2002; **30**(5): 570-5.
- Roth HP, Kirchgessner M. [Influence of zinc deficiency on lipid metabolism]. *Int J Vitam Nutr Res.* 1977; **47**:275-283.
- Roth HP, Schülein A, Kirchgessner M. Auswirkungen eines alimentären Zinkmangels auf die Zn-Verwertung und die Nährstoffverdaulichkeit bei zwangsernährten Ratten. *J Anim Phys Anim Nutr.* 1992, **68**: 136-145

Roth HP, Kirchgessner M. Influence of alimentary zinc deficiency on the concentration of growth hormone (GH), insulin-like growth factor I (IGF-I) and insulin in the serum of force-fed rats. *Horm Metab Res.* 1994;**26**:404-408.

Roth HP, Kirchgessner M. [Diagnosis of zinc deficiency]. *Z Gerontol Geriatr.* 1999;**32 Suppl 1**:155-163

Roth VH. [Nitrogen detoxification in artificially-fed zinc-deficient rats]. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2001;**85**:158-163.

Rushmore TH, Kong AN. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab.* 2002;**3**:481-490.

Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, et al. Zinc status and immune system relationship: a review. *Biol Trace Elem Res.* 2000;**76**:193-205.

Sandstead HH, Prasad AS, Schulert AR, et al. Human zinc deficiency, endocrine manifestations and response to treatment. *Am J Clin Nutr.* 1967;**20**:422-442.

Sandstead HH. Nutritional role of zinc and effects of deficiency. *Curr Concepts Nutr.* 1982;**11**:97-124.

Sandstead HH. Zinc deficiency. A public health problem? *Am J Dis Child.* 1991;**145**:853-859.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;**74**:5463-5467.

Sato O, Kuriki C, Fukui Y, Motojima K. Dual promoter structure of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes and unique transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands. *J Biol Chem.* 2002;**277**:15703-15711.

Sato R, Okamoto A, Inoue J, et al. Transcriptional regulation of the ATP citrate-lyase gene by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem.* 2000;**275**:12497-12502.

Satre MA, Jessen KA, Clegg MS, Keen CL. Retinol binding protein expression is induced in HepG2 cells by zinc deficiency. *FEBS Lett.* 2001;**491**:266-271.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1996;**1302**:93-109.

Schülein A, Kirchgessner M, Roth HP. Auswirkungen eines alimentären Zinkmangels bei zwangsernährten Ratten auf Wachstum, Zinkstatus und Serumkonzentrationen von Insulin und Glucagon. *J Anim Phys Anim Nutr.* 1992;**67**:157-169

Schulze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nat Cell Biol.* 2001;**3**:E190-E195

Selvais PL, Labuche C, Nguyen XN, Ketelslegers JM, Deneff JF, Maiter DM. Cyclic feeding behaviour and changes in hypothalamic galanin and neuropeptide Y gene expression induced by zinc deficiency in the rat. *J Neuroendocrinol.* 1997;**9**:55-62.

Shay NF, Cousins RJ. Cloning of rat intestinal mRNAs affected by zinc deficiency. *J Nutr.* 1993;**123**:35-41.

Smith SA. Peroxisome proliferator-activated receptors and the regulation of mammalian lipid metabolism. *Biochem Soc Trans.* 2001;**30**:1086-1090.

Sosnowski RG, Tu E, Butler WF, O'Connell JP, Heller MJ. Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;**94**:1119-1123.

Southern E, Mir K, Shchepinov M. Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet.* 1999;**21**:5-9.

- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975;**98**:503-517.
- Staels B, Koenig W, Habib A, et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature.* 1998;**393**:790-793.
- Stallard L, Reeves PG. Zinc deficiency in adult rats reduces the relative abundance of testis-specific angiotensin-converting enzyme mRNA. *J Nutr.* 1997;**127** :25-29.
- Sybre M, Hanschmann G, Heber R. Derivatisierungstechniken in der Rückstandsanalytik. *GIT Fachz Lab.* 1996;**11**:1121-1128.
- Takeda A. Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain. *Biometals.* 2001;**14**:343-351.
- Tang Z, Gasperkova D, Xu J, Baillie R, Lee JH, Clarke SD. Copper deficiency induces hepatic fatty acid synthase gene transcription in rats by increasing the nuclear content of mature sterol regulatory element binding protein 1. *J Nutr.* 2000;**130**:2915-2921.
- Taniguchi M, Miura K, Iwao H, Yamanaka S. Quantitative assessment of DNA microarrays--comparison with Northern blot analyses. *Genomics.* 2001;**71**:34-39.
- Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;**77**:5201-5205.
- Todd WR, Elvehjem CA, Hart EB. Zinc in the nutrition of the rat. *Am J Physiol.* 1934,**107**:146-156.
- Toulouse A, Loubeau M, Morin J, Pappas JJ, Wu J, Bradley WE. RARbeta involvement in enhancement of lung tumor cell immunogenicity revealed by array analysis. *FASEB J.* 2000;**14**:1224-1232.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;**76**:4350-4354.
- Tsodikov A, Szabo A, Jones D. Adjustments and measures of differential expression for microarray data. *Bioinformatics.* 2002;**18**:251-260.
- Vallee BL, Coleman JE, Auld DS. Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;**88**:999-1003.
- Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;**87**:1663-1667.
- Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B, Auwerx J. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest.* 1995 Aug;**96**(2):741-50
- Wang FD, Bian W, Kong LW, Zhao FJ, Guo JS, Jing NH. Maternal zinc deficiency impairs brain nestin expression in prenatal and postnatal mice. *Cell Res.* 2001;**11**:135-141.
- Warren L, Glick MC, Nass MK. Membranes of animal cells. I. Methods of isolation of the surface membrane. *J. Cell Physiol.* 1966,**68**:269-288
- Waxman DJ, Zhao S, Choi HK. Interaction of a novel sex-dependent, growth hormone-regulated liver nuclear factor with CYP2C12 promoter. *J Biol Chem.* 1996;**271**:29978-29987.
- Waxman DJ. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys.* 1999;**369** :11-23.

- Weeke J, Gundersen HJ. Circadian and 30 minutes variations in serum TSH and thyroid hormones in normal subjects. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1978;**89**:659-672.
- Westin G, Schaffner W. A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. *EMBO J*. 1988;**7** :3763-3770.
- Williamson PS, Browning JD, Sullivan MJ, O'Dell BL, Macdonald RS. Neuropeptide Y fails to normalize food intake in zinc-deficient rats. *Nutr Neurosci*. 2002;**5**:19-25.
- Wolfrum C, Ellinghaus P, Fobker M, et al. Phytanic acid is ligand and transcriptional activator of murine liver fatty acid binding protein. *J Lipid Res*. 1999;**40**:708-714.
- Wu HQ, Masset-Brown J, Tweedie DJ, et al. Induction of microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P-450IVA1 (P-450LA omega) by dehydroepiandrosterone in rats: a possible peroxisomal proliferator. *Cancer Res*. 1989;**49**:2337-2343.
- Wu JY, Reaves SK, Wang YR, Wu Y, Lei PP, Lei KY. Zinc deficiency decreases plasma level and hepatic mRNA abundance of apolipoprotein A-I in rats and hamsters. *Am J Physiol*. 1998;**275**:C1516-C1525
- Xu Z, Kawai M, Bandiera SM, Chang TK. Influence of dietary zinc deficiency during development on hepatic CYP2C11, CYP2C12, CYP3A2, CYP3A9, and CYP3A18 expression in postpubertal male rats. *Biochem Pharmacol*. 2001;**62**:1283-1291.
- Yamashita C, Kudo M, Ishida H, Noshiro M, Aoyama Y, Yoshida Y. Insulin is the essential factor maintaining the constitutive expression of hepatic sterol 14-demethylase P450 (CYP51). *J Biochem (Tokyo)*. 2000;**128**:93-99.
- Yanagisawa H, Moridaira K, Wada O. Zinc deficiency further increases the enhanced expression of endothelin-1 in glomeruli of the obstructed kidney. *Kidney Int*. 2000;**58**:575-586.
- Ye JM, Doyle PJ, Iglesias MA, Watson DG, Cooney GJ, Kraegen EW. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats: comparison with PPAR-gamma activation. *Diabetes*. 2001;**50**:411-417.
- Ye JM, Iglesias MA, Watson DG, et al. PPARalpha /gamma ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat-fed rats in the absence of hepatomegaly. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;**284**:E531-E540
- Yoo HY, Chang MS, Rho HM. Induction of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene through the peroxisome proliferator-responsive element by arachidonic acid. *Gene*. 1999; **234**:87-91.
- Yoshida K, Kobayashi K, Miwa Y, et al. Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*. 2001;**29**: 683-692.
- You M, Fischer M, Deeg MA, Crabb DW. Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). *J Biol Chem*. 2002;**277**:29342-29347.
- Zapf J, Schoenle E, Froesch ER. In vivo effects of the insulin-like growth factors (IGFs) in the hypophysectomized rat: comparison with human growth hormone and the possible role of the specific IGF carrier proteins. *Ciba Found Symp*. 1985;**116**:169-187.
- Zhang B, Marcus SL, Sajjadi FG, et al. Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the gene encoding rat peroxisomal enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;**89**:7541-7545.
- Zomer AW, Jansen GA, Van Der Burg B, et al. Phytanoyl-CoA hydroxylase activity is induced by phytanic acid. *Eur J Biochem*. 2000;**267**:4063-4067.

Lebenslauf

Name tom Dieck
Vorname Heike
Geburtsort Frankfurt am Main
Geburtstag 20.01.1975

Schulbildung

1981-1985 Ludwig-Frahm-Grundschule, Hamburg
1985-1991 Klasse 5-10, Gymnasium Harksheider Straße, Hamburg
1991-1994 Klasse 11-13, Gymnasium Kaiserin-Friedrich-Schule, Bad Homburg, Hessen
14.06.1994 Abitur

Studium

1994-1999 Ernährungswissenschaft (Diplom) an der Justus-Liebig-Universität, Gießen, mit Zusatzfach Produktions- und Qualitätsmanagement

August 1998-April 1999 Anfertigung der experimentellen Diplomarbeit am Institut für Ernährungswissenschaft -Professur für Lebensmittelwissenschaften - Justus-Liebig-Universität Gießen

18.10.1999 Hauptdiplom

seit Januar 2000 Anfertigung der Doktorarbeit am Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie der Technischen Universität München in Kooperation mit SKW Biosystems GmbH/Degussa BioActives GmbH

seit März 2003 Angestellte (Manager Nutritional Science) der Degussa BioActives GmbH/Degussa Food Ingredients GmbH, Freising

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikation:

tom Dieck H, Doering F, Roth HP, Daniel H. **Changes in rat hepatic gene expression in response to zinc deficiency as assessed by DNA arrays.** *J Nutr.* 2003 Apr; **133**(4):1004-10.

Vortrag:

Heike tom Dieck, Hannelore Daniel, Hans-Peter Roth und Frank Döring. **Transkriptomanalyse bei isoliertem Zinkmangel mittels DNA-Arrays.** DGE-Kongress 2002, Jena

Posterbeiträge:

Heike tom Dieck, Hannelore Daniel, Hans-Peter Roth, Michael Pfaffl und Frank Döring. **Expressionsanalyse von Säugergenen beim isolierten Zinkmangel mittels cDNA- und Oligonukleotid-Arrays.** *Status-Seminar Chiptechnologien*, Januar 2002, Dechema, Frankfurt

Heike tom Dieck, Frank Döring, Hans-Peter Roth, Michael Pfaffl und Hannelore Daniel. **Identification of genes with altered expression in zinc-deficient rats by use of DNA microarrays.** *First International Nutrigenomics Conference*, Februar 2002, Noordwijk aan Zee, Niederlande

Über Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurde in der Tagespresse (FAZ) berichtet:

Jochachim Müller-Jung. Schlucken, was das Genom hergibt. Der aktuelle Kongressbericht. Frankfurter Allgemeine Zeitung. Sonderseiten Natur und Wissenschaft. 9. April 2003:84, N1-N2

Basierend auf dem Vortrag von:

Frank Döring. Nutrigenomics- An innovative Approach for Nutrition Research and Industry. V166, Forum Life Science, April 2003, TUM, Garching, in dem u.a. über Ergebnisse dieser Arbeit berichtet wurde.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit

**Identifizierung molekularer Marker zur
Charakterisierung pleiotroper Effekte eines experimentellen Zinkmangels
*in vivo***

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt haben. Die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Freising,

Heike tom Dieck