

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen I

I. Einleitung 1

I.1. Molekulare Grundlagen der Tumorentstehung 1

I.2. Das Glioblastoma multiforme 3

I.3. *LGII*, ein potentielles Kandidatengen für Tumorsuppression?5

I.4. Das Kandidaten-Tumorsuppressorgen *hZAC*6

I.5. Zielsetzung der Arbeit8

II. Material und Methoden 10

II.1. Material 10

II.1.1. Chemikalien..... 10

II.1.2. Allgemeine Materialien 12

II.1.3. Allgemeine Puffer und Lösungen..... 12

II.1.4. Lösungen für die Bakterienkultur..... 13

II.1.5. Eingesetzte Vektoren..... 14

II.1.6. Lösungen für die eukaryotische Zellkultur 14

II.1.7. Verwendete Zelllinien 15

II.2. Methoden..... 15

II.2.1. Ribo- bzw. Desoxyribonukleinsäurenisolation 15

II.2.1.1. Isolierung von messenger RNA 15

II.2.1.2. Generierung von cDNA..... 17

II.2.1.3. Gewinnung von genomischer DNA aus Zellen..... 17

II.2.2. DNA-Analysemethoden 18

II.2.2.1. Polymerasekettenreaktion 18

II.2.2.2. Agarosegelelektrophorese 19

II.2.2.3. Sequenzierung nach Sanger..... 19

II.2.2.4. Polyacrylamidgelelektrophorese 19

II.2.3. Konstruktion von Expressionsvektoren..... 20

II.2.3.1. Klonierung von PCR-Fragmenten..... 20

II.2.3.2. Restriktion 21

II.2.3.3. Isolation von DNA aus Agarosegelen 21

II.2.3.4.	Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung	22
II.2.3.5.	Dephosphorylierung	22
II.2.3.6.	Ligation	23
II.2.4.	Kultur von Prokaryoten	23
II.2.4.1.	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	23
II.2.4.2.	Minipräparation von Plasmiden	24
II.2.4.3.	Maxipräparation von Plasmiden.....	25
II.2.5.	Eukaryotische Zellkultur	27
II.2.5.1.	Kultivierung der zu transfizierenden Zelllinien	27
II.2.5.2.	Kultur von Zelllinien	27
II.2.5.3.	Transfektion mittels Calciumphosphat.....	27
II.2.5.4.	Transduktion.....	29
II.2.5.5.	Transduktion zur Titrierung infektiöser retroviraler Partikel	30
II.2.6.	Phänotypische Untersuchungen	30
II.2.6.1.	Proliferationsassay.....	30
II.2.6.2.	Bestimmung des Zellzyklus	32
II.2.6.3.	Untersuchung von Apoptose	33
II.2.6.4.	Induktion der Apoptose	34
II.2.6.5.	Kultur im semisoliden Medium.....	35
II.2.6.6.	Migrationsassay	35
II.2.6.7.	Induktion von Streß durch Serumminimierung.....	36
II.3.	Statistische Berechnungen der Meßwerte	37
III.	Ergebnisse	38
III.1.	Reexpression von <i>LGII</i> in Zelllinien	38
III.1.1.	Konstruktion der Expressionsvektoren	38
III.1.2.	Transfektion der Zelllinien.....	39
III.1.3.	Transduktion der Zielzellen.....	39
III.2.	Expression des transferierten Gens in den Zielzellen	39
III.2.1.	Intrinsische mRNA- und Proteinexpression von <i>LGII</i> in Zelllinien.....	39
III.2.2.	Nachweis von mRNA nach reverser Transkription und cDNA Amplifikation in den transduzierten Zellpopulationen	40
III.2.3.	Expressionsanalyse des eGFP-Markerproteins	43
III.3.	Phänotypische Analysen der transduzierten Zellen.....	45

III.3.1.	Analyse der Zellproliferation	45
III.3.2.	Bestimmung der Zellzyklusphase	46
III.3.3.	Analyse des Migrationsverhaltens.....	48
III.3.4.	Induktion von Stress durch Serumminimierung.....	49
III.4.	Reexpression von <i>hZAC</i> und seinen Fragmenten.....	52
III.4.1.	Transfer des Gens bzw. dessen Fragmente in die Zelllinien.....	52
III.4.1.1.	Klonierung von <i>hZAC</i> und seinen Fragmenten	52
III.4.1.2.	Konstruktion der Expressionsvektoren	53
III.4.1.3.	Transfektion der Zelllinien.....	54
III.4.1.4.	Transduktion der Zielzellen.....	55
III.5.	Expression des transferierten Gens bzw. der transferierten Genfragmente in den Zielzellen	55
III.5.1.	Intrinsische mRNA- und Proteinexpression von <i>hZAC</i> in den Zelllinien	55
III.5.2.	Integrationskontrolle der retroviralen Expressionsvektoren in das Zielgenom.....	56
III.5.3.	Expressionsanalyse des eGFP-Markerproteins	58
III.6.	Phänotypische Analyse der transduzierten Zellen.....	61
III.6.1.	Analyse der Zellproliferation unter Selektionsbedingungen.....	61
III.6.2.	Kolonieformation im semisoliden Medium	63
III.6.3.	Untersuchung der Proliferation der transduzierten Zellen	64
III.6.4.	Bestimmung des Zellzyklus	66
III.6.5.	Induktion der Apoptose	68
III.6.6.	Quantifizierung von apoptotischen Zellen	69
IV.	Diskussion.....	71
IV.1.	Ein retrovirales Expressionssystem.....	71
IV.2.	Analyse der transduzierten Zellpopulationen.....	72
IV.3.	<i>LGII</i> , ein Kandidatengen für Tumorsuppression?	74
IV.4.	Das Kandidatengen-Tumorsuppressorgen <i>hZAC</i>	76
V.	Zusammenfassung	83
VI.	Literaturverzeichnis	85

VII. Anhang 100

VII.1. Kodierende Sequenz von *LGII* 100

VII.2. Kodierende Sequenz von *hZAC* 105

VII.3. Vektorkarten 111

VII.4. Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse 115

Erklärung

Danksagung

Thesen