

**Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler**

**(Direktor: Professor Dr. Maser)**

**im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel**

**an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

*Titel*

**EINFLUSS DER HUMANEN ALDO-KETO REDUKTASE AKR1B10 AUF DIE  
ÜBERLEBENSFÄHIGKEIT PEROXID-BEHANDELTER CACO-2- UND V-79  
ZELLEN**

**INAUGURALDISSERTATION**

**ZUR**

**ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE**

**der Medizinischen Fakultät**

**der Christian-Albrechts Universität zu Kiel**

**Vorgelegt von ELVIRA BÜCKERT aus Sotschi /Kiel 2012**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. sc. hum. Peter Gohlke

2. Berichterstatter: PD. Dr. med. Juraj Culman

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2012

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.01.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>HINTERGRUND</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>ANTIOXIDATIONSSYSTEME</b>	<b>3</b>
<b>1.3</b>	<b>DIE SUPERFAMILIE DER AKR-PROTEINE</b>	<b>6</b>
1.3.1	ALLGEMEINER ÜBERBLICK	6
1.3.2	DIE STRUKTUR DER ALDO-KETO REDUKTASE 1B10	6
1.3.3	SUBSTRATE DER AKR1B10	8
1.3.4	ÜBEREXPRESSION IN TUMOREN UND CHEMOTHERAPEUTISCHE RESISTENZ	9
<b>2.</b>	<b><u>AUFGABENSTELLUNG</u></b>	<b>10</b>
<b>3.</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>11</b>
3.1.1	MATERIALIEN	11
3.1.2	GRÖßENMARKER	12
3.1.3	ENZYME	12
3.1.4	KITS	13
3.1.5	PLASMID UND BAKTERIEN	13
3.1.6	VERBRAUCHSMATERIALIEN	13
3.1.7	GERÄTE	14
<b>3.2</b>	<b>PLASMIDE UND BAKTERIENSTÄMME</b>	<b>15</b>
3.2.1	PCI-NEO MAMMALIAN EXPRESSION VECTOR	15

## II

3.2.2	XL1-BLUE	16
<b>3.3</b>	<b>MIKROBIOLOGISCHE VERFAHREN</b>	<b>17</b>
3.3.1	STERILISATION	17
3.3.2	KULTIVIERUNG DER BAKTERIEN	18
3.3.3	HERSTELLUNG KOMPETENTER ZELLEN	18
3.3.4	TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN	19
<b>3.4</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE VERFAHREN</b>	<b>20</b>
3.4.1	AMPLIFIKATION DER AKR1B10 MITTELS POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	20
3.4.2	AGAROSE-GEL-ELEKTROPHORESE	24
3.4.3	HERSTELLUNG DES AGAROSE-GEL UND DURCHFÜHRUNG DER ELEKTROPHORESE	25
3.4.4	REINIGUNG DER DNA	26
3.4.5	KONZENTRATION-UND REINHEITSBESTIMMUNG DER DNA	26
3.4.6	RESTRIKTIONSVERDAU VON INSERT UND EXPRESSIONSVEKTOR	27
3.4.7	DEPHOSPHORYLIERUNG DES VEKTORS	29
3.4.8	LIGATION VON INSERT UND VEKTOR	29
3.4.9	KOLONIE-PCR	30
3.4.10	PRÄPARATION VON PLASMID-DNA	31
3.4.11	SEQUENZIERUNG DER DNA	32
<b>3.5</b>	<b>ZELLKULTURMETHODEN</b>	<b>34</b>
3.5.1	MATERIALIEN	34
3.5.2	KULTURMEDIEN	35
3.5.3	TRANSFEKTION VON V-79 LUNGENFIBROBLASTEN UND HUMANEN CaCo-2-ZELLEN MIT DEM AKR1B10- EXPRESSIONSPLASMID PCI-NEO	35
3.5.4	KULTIVIERUNG DER ZELLEN	37

### III

3.5.5	TESTSUBSTANZEN	38
3.5.6	VERSUCHSAUFBAU DER TOXIZITÄTSBESTIMMUNG	38
3.5.7	DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE	44
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>ERGEBNISSE DER GENTECHNISCHEN VERFAHREN</b>	<b>45</b>
4.1.1	AMPLIFIKATION DES AKR1B10 – INSERTS	45
4.1.2	ANFÜGEN DER SCHNITTSTELLEN FÜR DIE LIGATION	46
4.1.3	VORBEREITUNG DES EXPRESSIONSVEKTORS	46
4.1.4	LIGATION UND TRANSFORMATION	46
4.1.5	SEQUENZIERUNG DER DNA	48
<b>4.2</b>	<b>ERGEBNISSE DER ZELLKULTUR</b>	<b>49</b>
4.2.1	TRANSFEKTION	49
4.2.2	ZYTOTOXIZITÄT VON PEROXIDEN	49
4.2.3	EINFLUSS VON CUMOLHYDROPEROXID AUF DIE ZELLVITALITÄT VON V79 - LUNGENFIBROBLASTEN	51
4.2.4	EINFLUSS VON TERTIÄREM BUTYLHYDROPEROXID AUF DIE ZELLVITALITÄT VON V79 - LUNGENFIBROBLASTEN	54
4.2.5	EINFLUSS VON CUMOLHYDROPEROXID AUF DIE ZELLVITALITÄT VON HUMANEN CaCo-2 ZELLEN	57
4.2.6	EINFLUSS VON TERTIÄREM BUTYLHYDROPEROXID AUF DIE ZELLVITALITÄT VON CaCo-2 ZELLEN	59
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>61</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURREFERENZ</b>	<b>70</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>77</b>

<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>88</b>
-----------	--------------------	-----------

---

<b>10.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>90</b>
------------	-------------------	-----------

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Struktur der AKR1B10 .....	7
Abbildung 2 - pCI neo Mammalian Expressionsvektor .....	16
Abbildung 3 - Zeitliche Darstellung des Zellversuchs .....	41
Abbildung 4 - 96-well-Mikrotiterplatten mit Inkubationsschema der toxischen Substanz .....	42
Abbildung 5- 96-well-Mikrotiterplatten mit Inkubationsschema für Tetrazoliumsalz (MTT) .....	43
Abbildung 6 - Amplifikation des Inserts AKR1B10.....	45
Abbildung 7 - Ergebnis des Restriktionsverdaus.....	47
Abbildung 8 - Ergebnis der Kolonie-PCR.....	48
Abbildung 9 - Strukturformeln von tertiärem Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid.....	50
Abbildung 10 - 4 Konzentrationswirkungskurven von Cumolhydroperoxid (V-79 Zellen) .....	51
Abbildung 11 - 4 Konzentrationswirkungskurven von tertiärem Butylhydroperoxid (V-79 Zellen) .....	54
Abbildung 12 - 3 Konzentrationswirkungskurven von Cumolhydroperoxid (humane CaCo-2 Zellen).....	57
Abbildung 13 - 4 Konzentrationswirkungskurven von tertiärem Butylhydroperoxid (CaCo-2 Zellen).....	59

Abbildung 14 - Ergebnis der Sequenzierung von vier Plasmidpräparationen des Vektors  
pCI-neo mit einklonierter AKR1B10..... 87



## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 - Materialien.....	11
Tabelle 2 - Größenmarker.....	12
Tabelle 3 - Enzyme.....	12
Tabelle 4 - Kits.....	13
Tabelle 5 - Plasmid und Bakterien.....	13
Tabelle 6 - Geräte.....	14
Tabelle 7 - Zusammensetzung des LB-Medium.....	17
Tabelle 8 - Zusammensetzung der LB-Medium-Agarplatte.....	17
Tabelle 9 - Puffer TFBI und TFBI zur Herstellung kompetenter Zellen.....	18
Tabelle 10 - Einfacher PCR-Ansatz für die AKR1B10.....	21
Tabelle 11 - Primer für die PCR von AKR1B10.....	22
Tabelle 12 - Temperaturprogramm für die PCR (Gerät: Biometra, Göttingen).....	22
Tabelle 13 - PCR-Ansatz für die AKR1B10 mit Primer für die Schnittstellen.....	23
Tabelle 14 - Primer mit Schnittstellen.....	23
Tabelle 15 - Für die Agarose Gelelektrophorese benötigte Lösung.....	25
Tabelle 16 - Ansatz für den Restriktionsverdau des pCI-neo Vektor.....	28
Tabelle 17 - Ansatz für den Restriktionsverdau des Insert.....	28
Tabelle 18 - Schnittstellen der Restriktionsenzyme Sma I und Xho I.....	28
Tabelle 19 - Ansatz zur Dephosphorylierung des Vektors.....	29
Tabelle 20 - Ansatz für die Ligation.....	30

## VIII

Tabelle 21 - Ansatz für eine Kolonie-PCR.....	31
Tabelle 22 - Temperaturprogramm der Kolonie-PCR (Pfu-Polymerase-Programm).....	31
Tabelle 23 - Mitgesandte Primer zur Sequenzierung (Schnittstellen fettgedruckt) .....	32
Tabelle 24 - PCR-Ansatz zur Eigenkontrolle .....	33
Tabelle 25 - Materialien .....	34

## Abkürzungsverzeichnis

AKR	Aldo-Keto Reduktasen
ALDH	Aldehyddehydrogenase
CAT	Katalase
CHP	Cumolhydroperoxid
dNTP's	Desoxynukleotid-Triphosphate
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
GSTA5	Glutathion-S-Transferase A5
µl	mikroliter
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
QR	Chinone-Reduktasen
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
SCC	squamous cell carcinoma
SDR	Kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen
SOD	Superoxiddismutase
t-BuOOH	tertiäres Butylhydroperoxid

## 1. Einleitung

### 1.1 Hintergrund

Oxidativer Stress und Akkumulation von reaktiven Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species: ROS) oder ein Defekt eines antioxidativen Systems spielen eine gravierende und relevante Rolle in der Pathogenese multipler Krankheiten wie der Entstehung atherosklerotischer Plaques, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer (VALKO et al. 2007; HALLIWELL 1996; ZARKOVIC 2003).

Reaktive Sauerstoffradikale können biologische Moleküle schädigen indem sie Zellwände instabilisieren. Durch Modifizierung der Moleküle der Zellmembran zerfallen diese daraufhin und bilden Elektrophile. Die Elektrophile binden DNA und Proteine und verändern sie und ihre Zellfunktion. Reaktive Sauerstoffradikale werden durch ungepaarte Einzelelektronen charakterisiert, die sehr reaktiv sind. Daraufhin streben die Moleküle nach einem Elektron eines anderen Moleküls, um wieder Stabilität zu erlangen. Somit vermisst das andere Molekül sein zweites Elektron und verwandelt sich selbst in ein reaktives Radikal mit einem einzelnen Elektron.

Diese Kettenreaktion kann nur dann beendet werden, wenn zwei Radikale ihren Weg kreuzen und sich als Resultat neutralisieren. Sauerstoffradikale bevorzugen den Angriff an ungesättigten Verbindungen wie sie in Molekülen der Zellmembran vorkommen, reagieren aber auch mit Proteinen (HALLIWELL 1996; ESTERBAUER 1993; Fang et al. 2002). Reaktionen, die durch reaktive Sauerstoffradikale induziert werden, zerstören die Funktion von Proteinen und Lipiden der Zellmembran und initiieren viele entzündliche Prozesse (VALKO et al. 2007; Dröge 2002).

Ein Angriff auf ungesättigte Kohlenwasserstoffe wie Arachidonsäure und Linolensäure resultiert in der Bildung von instabilen Lipidperoxiden, die zu

4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE), 4-Oxo-2-nonenal (4-ONE), Acrolein und andere zerfallen (ESTERBAUER et al. 1991; GIROTTI 1998).

Lipidperoxide besitzen nicht die Fähigkeit, die Zellmembran integer zu halten. 4-HNE und 4-ONE müssen entgiftet werden, da sie mit den Basen der DNA interagieren und so als Mutagen wirken (HALLIWELL 1996).

Unser Organismus synthetisiert kontinuierlich reaktive Sauerstoffradikale und besitzt die Kompetenz ihre Schädlichkeit zu reduzieren solange die normale Reparatur- und Entgiftungsfunktion der Zelle nicht überfordert ist (GOGVADZE & ZHUKOVA 1991).

Moleküle, die oxidativen Stress verursachen, können in zwei Gruppen unterteilt werden: reaktive Sauerstoffradikale (ROS) und reaktive Stickstoffradikale (RNS) (VALKO 2007).

Reaktive Sauerstoffradikale sind Hydroxyl ( $\text{HO}\cdot$ ), Peroxyl ( $\text{RO}_2\cdot$ ), Alkoxyl ( $\text{RO}\cdot$ )- and Hydroxyperoxyl ( $\text{HO}_2\cdot$ )- Radikale, während reaktive Stickstoffradikale Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}\cdot$ )- und Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2\cdot$ ) beinhalten (FANG et al. 2002). Eine hohe endogene Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen entsteht durch die mitochondriale Atmungskette. Elektronen werden erst auf Cytochrome und anschließend auf Sauerstoff übertragen (VALKO et al. 2007; FANG et al. 2002).

Reaktive Sauerstoffradikale und reaktive Stickstoffradikale schädigen DNA und es kann zu einer Veränderung der Basenabfolge, Deletion oder Insertion kommen. Aus der Aktivierung oder Inhibierung von Signalwegen kann Apoptose oder Nekrose resultieren (FANG et al. 2002; VALKO 2007).

Zusammenfassend kann oxidativer Stress als Verschiebung eines Verhältnisses verstanden werden. Die Relation von Prooxidantien/Antioxidantien verschiebt sich zu Gunsten der Prooxidantien und kann potentiell zu Schäden führen (SIES 1997).

Dies demonstriert, dass ein Anstieg von oxidativem Stress Abfall von Antioxidantien und/oder durch einen Anstieg von Oxidantien verursacht werden kann (VALKO et al. 2007).

Antioxidantien können als Moleküle definiert werden, die die Oxidation eines Substrates verzögern, verhindern oder rückgängig machen (CHAUDIÈRE & FERRARI-ILLIOU 1999).

Um experimentell oxidativen Stress in Zellen zu induzieren, werden Hydroperoxide genutzt (CHANCE et al. 1979). Sie sind dazu geeignet, pathologische Vorgänge in Zellen zu rekonstruieren. Bei der Reduktion von Hydroperoxiden entstehen oxidierte Formen: GSSG und  $\text{NADP}^+$ . Sie können akkumulieren und die Ionenpermeabilität der Mitochondrienmembran beeinflussen (BELLOMO et al. 1982). Nach BELLOMO et al. (1984) aktiviert tertiäres Butylhydroperoxid in Hepatozyten die Phosphorylase a, die eine Mobilisierung von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  bewirkt. GOGVADZE & ZHUKOVA (1991) zeigten jedoch, dass eine hohe Konzentration von Cumolhydroperoxid eine erhöhte Akkumulation von Lipidperoxidationsprodukten hervorruft, aber nicht mit einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe verbunden ist. In diesem Zusammenhang diskutieren SPATZ & BLOOM (1992) eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung von Proteasen durch ROS, die Zelldegeneration hervorrufen.

## 1.2 Antioxidationssysteme

Antioxidantien können in enzymatische und nicht-enzymatische Gruppen eingeteilt werden. Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören unter anderem Vitamin A, Vitamin E und Ubichinon (SIES 1997). Endogene enzymatische Antioxidantien wie die Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Katalase und andere wie Chinon-Reduktasen, kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen und Aldo-Keto Reduktasen weisen auf einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffradikalen hin (OPPERMANN 2007; SIES 1997; HINO et al. 1987).

Bei oxidativem Stress kommt es oft zur Lipidperoxidation (TRIBBLE et al. 1987). Nach einem Zerfall von Lipidhydroperoxiden entstehen reaktive Verbindungen, unter anderem Aldehyde. Einige sind hoch reaktiv, verteilen sich und bilden kovalente Addukte mit Zellbestandteilen. Die am besten erforschten sind 4-Hydroxy-2-nonenal und Malondialdehyd (ESTERBAUER et al. 1991). Aldehyde sind Elektrophile und reagieren intrazellulär mit nukleophilen Strukturen. Sie können ein potentes Zytotoxin sein (FANG et al. 2002). 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) und 4-Oxo-2-nonenal (4-ONE) sind als bifunktionale Elektrophile bekannt, da sie sowohl zur Bildung von Michael-Addukten als auch Schiff'schen Base fähig sind. Dies kann in einem Protein-Cross-Link resultieren, d. h. Vernetzungen zwischen zwei Proteinen (JIN & PENNING 2007).

Die Mehrzahl der Aldo-Keto Reduktasen ist als Protein mit 34-37 kDa beschrieben. Sie beschleunigen die Reduktion von Aldehyden und Ketonen zu primären und sekundären Alkoholen. Umgesetzt werden physiologische Substrate wie Lipide, Steroide und Retinale (JIN & PENNING 2007). Von exogen zugeführte Substrate beinhalten Substanzen, die an chemischer Karzinogenese beteiligt sind: NNK (4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon), polyzyklische und aromatische Kohlenwasserstoffe, trans-Dihydrodirole, und Aflatoxindialdehyd. Die Umsetzung der erwähnten Substrate führt entweder zu Aktivierung oder ihrer Entgiftung. Durch Anfügen von funktionellen Gruppen (-OH-, -SH) werden hydrophobe Substrate funktionalisiert. Des Weiteren führt anschließende Bindung an wasserlösliche Moleküle (Konjugation) zur Ausscheidung über die Niere.

Einige Aldo-Keto Reduktasen und kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen sind Phase I metabolisierende Enzyme (JIN & PENNING 2007).

In der Studie von BURCZYNSKI et al. (2001) wurde eine  $20\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase (AKR1C1) als Antioxidationsmechanismus identifiziert, die durch reaktive Sauerstoffradikale in menschlichen Darm- und Leberzelllinien induziert wird. 4-Hydroxy-

2-nonenal (4-HNE) und andere ungesättigte Aldehyde werden durch AKR1C1 mit hoher katalytischer Effizienz reduziert. Obwohl Progesteron als physiologisches Substrat der AKR1C1 bekannt ist, reduziert die AKR1C1 4-HNE mit ähnlich guter katalytischer Effizienz. AKR1B1 und AKR1B10 katalysieren die Reduktion von 4-HNE und 4-Methylpentanal (4-MP) mit hoher Effizienz. 4-Methylpentanal (4-MP) entsteht bei der Steroidgenese. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Aldo-Keto Reduktasen in der Entgiftung von Aldehyden eine nennenswerte Rolle spielen (MARTIN & MASER 2009).



## 1.3 Die Superfamilie der AKR-Proteine

### 1.3.1 Allgemeiner Überblick

Aldo-Keto Reduktasen gehören zur Superfamilie der NAD(P)H gebundenen Oxidoreduktasen, welche aus 15 Familien mit 151 Mitgliedern bestehen (PENNING et al. 2007). Mitglieder einer Familie besitzen mindestens 40% Sequenzidentität, Mitglieder einer Subfamilie mindestens 60%. Gemäß eines von JEZ, FLYNN & PENNING (1997) entwickelten Nomenklatur-Systems erhalten alle Mitglieder das Kürzel "AKR" gefolgt von einer arabischen Ziffer als Zeichen für die Familie (z.B. AKR1). Der nachfolgende große Buchstabe steht für die Subfamilie, gefolgt von einer weiteren arabischen Ziffer, die das spezielle Protein bezeichnet (z. B. AKR1B10) (<http://www.med.upenn.edu/akr/>).

Drei Familien repräsentieren menschliche Aldo-Keto Reduktasen: AKR1, AKR6 und AKR7. AKR1 stellt die größte Familie der Superfamilie dar und beinhaltet menschliche Aldehydreduktasen (AKR1A), menschliche Aldosereduktasen (AKR1B), Hydroxysteroiddehydrogenasen (AKR1C),  $\Delta^4$ -3-Ketosteroid-5 $\beta$ -Reduktasen (AKR1D). AKR7 erfasst Aflatoxin-Aldehydreduktasen und AKR6 kontrolliert die Kaliumkanal - Leitfähigkeit (JIN & PENNING 2007; HYNDMANN et al. 2003; JEZ et al. 1997).

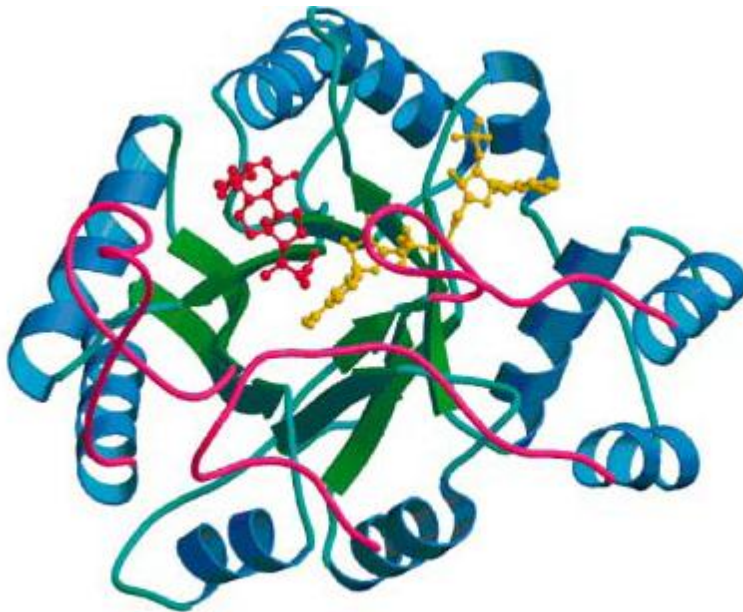
### 1.3.2 Die Struktur der Aldo-Keto Reduktase 1B10

Die AKR1B10 wurde von der Forschungsgruppe CAO et al. (1998) zeitgleich mit HYNDMAN & FLYNN (1998) erstmals beschrieben und erhielt den Namen aldose reductase-like-1 protein, denn Sie zeigt eine zu 71% identische Aminosäuresequenz mit der Aldose-Reduktase AKR1B1. Die AKR1B10 ist verwandt mit orthologen Aldose-Reduktase-like Proteinen wie dem mouse vas deferens protein (81%), fibroblast growth factor-regulated protein (82%) und Chinese hamster ovary reductase (83%).

Die strukturellen Merkmale der Aldo-Keto Reduktase zeigen eine zylindrische ( $\alpha$ ,  $\beta$ )<sub>8</sub> Faltstruktur, TIM barrel-fold genannt (Triose Isomerase). 8 Alpha-Helices alternieren mit

8 Beta-Faltblättern, während die Beta-Faltblätter als Stützpfiler der Faszstruktur dienen und die Schleifen (Abbildung 1 - Struktur der AKR1B10) im Hintergrund die Bindungsseite für die Liganden reservieren (JIN & PENNING 2007). Im Vergleich zu den Aldo-Keto Reduktasen zeigt die Kristallstruktur der SDR's (short-chain-dehydrogenases/reductases) einen Rossmann-Fold: Beta-Faltblätter werden von Alpha-Helices an jeder Seite umrahmt (OPPERMANN et al. 2003; FILLING et al. 2002).

Obwohl AKR1B1 und AKR1B10 ähnliche Aminosäuresequenz und Substratspezifität haben (CAO et al. 1998; ENDO et al. 2009), unterscheiden sie sich in ihrem Expressionsmuster. Das deutet auf eine unterschiedliche physiologische Funktion hin (CAO et al. 1998).



**Abbildung 1 - Struktur der AKR1B10**

Aus Jin, Y. Penning, T. M. (2007): Aldo-Keto reductases and bioactivation /detoxification  
Annual Review Pharmacology Toxicology, 47, 263–92

### 1.3.3 Substrate der AKR1B10

Aufgrund seiner Flexibilität (3 Schleifen), ist das Enzym fähig, ein breites Spektrum an Substraten wie Nitrobenzaldehyden, Glyceraldehyden, Lipidaldehyden, Steroidhormone oder Prostaglandine umzusetzen. Ihre favorisierten Substrate sind all-trans Retinaldehyde (GALLEGO et al. 2007; CROSAS et al. 2003). Das Enzym AKR1B10 ist in der Katalyse von all-trans-Retinaldehyden in vitro ( $K_m = 0.6 \pm 1 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat} = 27 \pm 01 \text{ min}^{-1}$ ) noch 100-fach aktiver als die AKR1B1. Diese sind somit das physiologische Substrat (RUIZ et al. 2009). Die katalytische Aktivität mit 9-cis-Retinaldehyd ist im Vergleich zu all-trans-Retinaldehyd 35-fach geringer. Daher ist die AKR1B10 genau genommen eine all-trans-Retinaldehyd-Reduktase (GALLEGO et al. 2007).

Retinaldehyd ist ein äußerst wichtiges Molekül im Syntheseweg der Retinsäure. Retinsäure ist an vielen biologischen Prozessen beteiligt, die von der Zellproliferation und Differenzierung bis zur fetalen Entwicklung reichen (BLANER & OLSON 1994).

Die Bildung von Retinol zu Retinal ist reversibel, ebenso wie die Oxidation von Retinal zu Retinsäure irreversibel ist. Retinal ist an vielen Regulationsprozessen beteiligt und seine zelluläre Menge muss daher kontrolliert sein (RUIZ et al. 2009). Die Funktion der AKR1B10 besteht in der Reduzierung des Retinal zum Retinol. Es wird angenommen, dass eine Hochregulierung der AKR1B10 in Tumoren mit einer Verringerung von Retinsäure und folgend zu einem Verlust der Tumordifferenzierung führt (ZU et al. 2009; PENNING 2005).

#### 1.3.4 Überexpression in Tumoren und chemotherapeutische Resistenz

Die AKR1B10 wird in Leberkarzinom (Plattenepithel-, und Adenokarzinom) (CAO et al. 1998; FUKUMOTO et al. 2005), sowie in Ösophagus-, und Uteruskarzinom überexprimiert (YOSHITAKE et al. 2007; BRETON et al. 2008). Ihre Funktion in Leberkarzinomen ist bisher nicht ausreichend erforscht (CAO et al. 1998). AKR1B10 wurde ebenfalls in Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (27 von 32 = 84.4%) sowie in Plattenepithelkarzinom (Squamous Cell Carcinoma) und Adenomkarzinom (19 von 65 = 29.2%) hochreguliert. Von Fall zu Fall werden die Enzyme in Metaplasien, einer präkanzerösen Vorstufe des Plattenepithelkarzinoms gefunden (FUKUMOTO et al. 2005). Das Plattenepithelkarzinom wird mit Tabakkonsum in Verbindung gebracht. Daher wird dem Enzym eine potentielle Rolle als Tumormarker vorgeschlagen (PENNING 2005). Kürzlich ist die AKR1B10 in ihrer nativen Form aus humanen Leberzytosol aufgereinigt worden (MARTIN et al. 2006). Als Substrate sind Xenobiotika wie Dolasetron (5-HT<sub>3</sub> Rezeptorantagonist), Daunorubicin (Chemotherapeutikum bei Lungenkarzinom) und Oracin (Chemotherapeutikum) und 4-Methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone, ein Lungenkanzerogen aus Tabak, identifiziert worden. Es wird vermutet, dass die Inaktivierung von Chemotherapeutika durch AKR1B10 eine Ursache für Therapieresistenz ist (MARTIN et al. 2006).

Andere Ergebnisse lieferten LOEFFLER et al. (2009) in der Erforschung von Bortezomib in kolorektalen Tumorzellen. Der Proteasom-Inhibitor, eingesetzt bei Multiplen Myelom, induzierte die Hochregulierung der AKR1B10 und RNAi-vermittelte Reduzierung des Enzyms machte die Zellen für die Bortezomibtherapie empfänglich.

## 2. Aufgabenstellung

Bisherige Forschungsergebnisse legen nahe, dass AKR1B10 eine Funktion als Phase-I-Enzym besitzt, indem es reaktive Aldehyde zu weniger reaktionsfreudigen Alkoholen metabolisiert. In einem Zellkultursystem konnte gezeigt werden, dass Zellen, die AKR1B10 überexprimieren, vor der Toxizität des ungesättigten Aldehyds Acrolein geschützt sind (ZU et al. 2007). Gegenüber dem Wildtyp bildeten diese Zellen mehr Klone in Softagar und zeichneten sich durch schnelleres Wachstum in Anwesenheit von Acrolein aus.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Expression von AKR1B10 einen Schutz vor oxidativem Stress darstellt. Dazu soll die codierende Sequenz des menschlichen Gens AKR1B10 in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert und damit eine stabil transfizierte Zelllinie gewonnen werden. Die AKR1B10-überexprimierenden Zellen sollen zunächst mit organischen Peroxiden (Cumolhydroperoxid und tertiärem Butylhydroperoxid) inkubiert werden, um deren Lebensfähigkeit mit dem Wildtyp zu vergleichen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Materialien

Chemikalien	Erworben von:
Agar	Sigma, Steinheim
Agarose NEEP Ultra Qualität	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Ammoniak 25 %	Merck, Darmstadt
Biozym Plaque GP Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue	Serva, Heidelberg
dNTPs	Fermentas, Darmstadt
EDTA	Sigma, Steinheim
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Glycerin 87 %	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Sigma, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Steinheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	LAB-SCAN, Irland
MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure)	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Promega, USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SYBR Safe TM DNA Gel Stain	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tris Base	Sigma, Steinheim
Trypanblaulösung	Sigma, Steinheim
Trypsin-EDTA 0,2 %	PAA, Cölbe
Trypton	Sigma, Steinheim

**Tabelle 1 - Materialien**

## 3.1.2 Größenmarker

Größenmarker	Erworben von:
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas, Darmstadt
6 x Loading Dye	Fermentas, Darmstadt

**Tabelle 2 - Größenmarker**

## 3.1.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Erworben von:
Sma I (20000 U/ml)	New England BioLabs GmbH, Ffm
Xho I (20000 U/ml)	New England BioLabs GmbH, Ffm
Polymerasen	Erworben von:
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Andere Enzyme	Erworben von:
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Antarctic Phosphatase	New England BioLabs GmbH, Ffm

**Tabelle 3 - Enzyme**

## 3.1.4 Kits

Kits	Erworben von:
QIAEX II Agarose Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini und Maxi Kit	Qiagen, Hilden

**Tabelle 4 - Kits**

## 3.1.5 Plasmid und Bakterien

Plasmid und Bakterien	Erworben von:
E. coli XL1-Blue	Stratagene, USA
Plasmid pCI neo Mammalian Expression Vector	Promega, USA

**Tabelle 5 - Plasmid und Bakterien**

## 3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Das Verbrauchsmaterial wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Probengefäße, PCR-Tubes, Cups mit 1,5ml und 2ml Inhalt, Petrischalen und Einmal-Küvetten stammte von der Firma Sarstedt, Nürnberg.



## 3.1.7 Geräte

Geräte	Erworben von:
Autoklav Systec tuttnauer 2540EL	Systec, Wettenberg
Brutschrank Herasafe	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Geltrockner Slab Gel Dryer SGD2000	Savant, USA
ImageMaster® VDS + FujiFilm Thermal Imaging	Pharmacia Biotech, Freiburg System FTI-500
Laborschüttler VF2 IKA®-Labortechnik	Janke & Kunkel, Staufen
Laborschüttler IKA®-VIBRAX-VXR	Janke & Kunkel, Staufen
Mikrowellengerät R-208	Sharp
PCR-Thermocycler T-Gradient	Biometra, Göttingen
PCR-Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Photometer UVIKON® 860	Kontron Analytic GmbH, Schweiz
Schüttelinkubator Incubator IS-K	noctua, Österreich
Spannungsgeber Power Pack 35/60	Phase Lübeck
Spektrophotometer GeneQuant II	Pharmacia, Biotech, Freiburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Sonorex Super RK510H	Badelin, Berlin
Ultraschallstab Labsonic 1510	B. Braun, Melsungen

**Tabelle 6 - Geräte**

## 3.2 Plasmide und Bakterienstämme

### 3.2.1 pCI-neo Mammalian Expression Vector

Mit dem Begriff Gentechnik werden jegliche Prozesse zusammengefasst, die das Einbringen von Fremd-DNA in eine Empfängerzelle mit darauf folgender Expression der fremden genetischen Information ermöglicht (LÖFFLER 2003). Die fremde DNA wird mit Hilfe von Vektoren als Transportvehikel in die Zelle eingebracht. Dafür wird zuvor über einen Klonierungsvorgang die Fremd-DNA in den Vektor inseriert, wodurch rekombinante DNA hergestellt wird. Viele Bakterien tragen zusätzlich zu ihrer chromosomalen DNA Plasmide, die ihnen über ihre normalen Lebensfunktionen hinaus Selektionsvorteile vermitteln. Bei Plasmiden handelt es sich um zirkuläre DNA, die einen eigenen Replikationsursprung (origin of replication) aufweist und daher autonom repliziert werden kann. Plasmide kommen sehr häufig als Vektoren in der Gentechnik zum Einsatz.

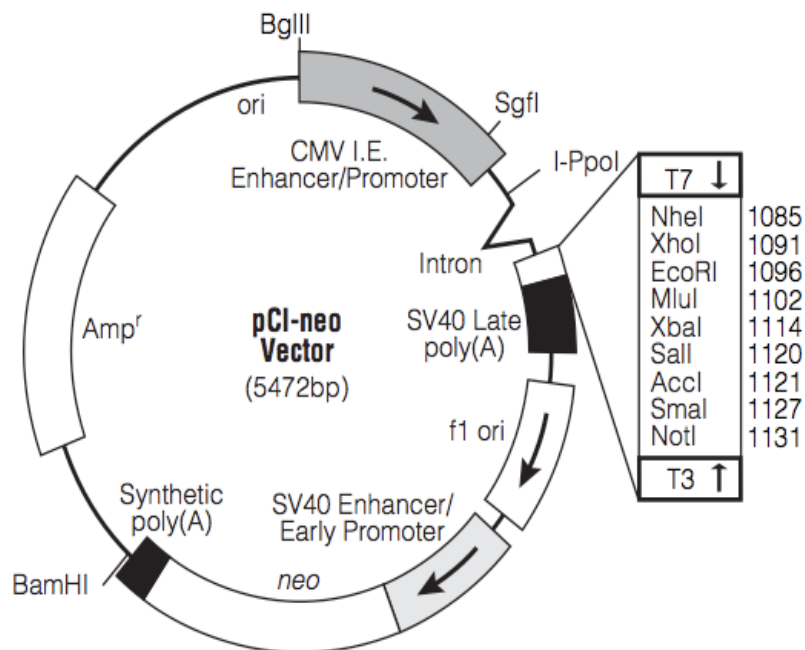
Für dieses Experiment wurde das Plasmid pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega, USA) ausgewählt (siehe Abbildung 3.1). Er kann sowohl für die transiente Expression als auch für die stabile Expression eingesetzt werden.

Seine Grundsequenz basiert auf dem high copy Plasmid pGEM®-3Zf(+) Vektor mit einem Replikationsursprung des Filament-Phagen f1. Der pCI-neo Vektor kommt daher in *E. coli* in einer hohen Kopiezahl vor, was hohe Ausbeuten bei Plasmidpräparationen sicherstellt. Der pCI-neo Vektor verfügt über eine großzügig angelegte multiple Klonierungsregion (multiple cloning region), zwei Antibiotikaresistenzgene (Ampicillin- und Neomycinresistenzgene) als Selektionsmarker und die Promotorsequenz des menschlichen Cytomegalievirus als enhancer/promotor region, welche eine starke konstitutive Expression in verschiedenen Zelltypen fördert (Promega, USA). Die multiple cloning region weist Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme auf. Durch

Verwendung desselben Restriktionsenzym für Vektor und Fremd-DNA ergeben sich komplementäre Enden (*sticky ends*) und das zu exprimierende Gen kann in den Vektor eingefügt werden. Der pCI-neo Mammalian Expression Vektor enthält als Selektionsmarker ein  $\beta$ -Lactamase-Resistenzgen. Alle Bakterien mit Vektor können somit auf Ampicillin-haltigen Agarplatten selektioniert werden. Ein zusätzliches Neomycin Phosphotransferasegen verleiht eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G-418 (Aminoglykosid: Streptomycin).

### 3.2.2 XL1-Blue

Erst nach vorausgegangener Ligation des Inserts mit dem Vektor ist die Voraussetzung für eine Transformation gegeben. Die Vervielfältigung der AKR1B10 im pCI-neo Mammalian Expression Vector wurde in kompetenten Bakterien vom *E. coli*-Stamm XL1-Blue ausgeführt. Kompetente XL1-Blue-Zellen wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abbildung 2 - pCI neo Mammalian Expressionsvektor**

### 3.3 Mikrobiologische Verfahren

#### 3.3.1 Sterilisation

Der Umgang mit DNA erfordert eine keimfreie und DNase-freie Umgebung.

Pipettenspitzen, PCR-Tubes und Cups wurden vom Hersteller für den sofortigen Gebrauch sterilisiert.

Eine Keimfreiheit für gläsernen Utensilien und LB-Medien erfolgte durch Erhitzen im Autoklaven (Systec tuttner 2540EL). Lösungen, die aufgrund ihrer thermischen Instabilität (z.B. Antibiotika) nicht autoklaviert werden können, wurden mit Hilfe eines handelsüblichen Sterilfilters filtriert. Um Kontamination zu vermeiden, fanden alle mikrobiologischen Abläufe zusätzlich neben der Bunsenbrennerflamme unter der Sterilbank statt.

Bakterien benötigen ein geeignetes Medium, um sich zu vermehren. Als Kulturmedium hat sich das flüssige LB-Medium (Lysogeny Broth) bewährt. Für die Kultur und Selektion von Einzelkolonien wurden LB-Agarplatten mit nachstehender Zusammensetzung verwendet (Tabelle 7 und 8).

NaCl	10 g
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
1N NaOH (je Liter)	1 ml
<u>Aqua bidest.</u>	<u>ad 1000 ml</u>

**Tabelle 7 - Zusammensetzung des LB-Medium**

NaCl	10 g
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Agar	15 g
<u>Aqua bidest.</u>	<u>ad 1000 ml</u>

**Tabelle 8 - Zusammensetzung der LB-Medium-Agarplatte**

### 3.3.2 Kultivierung der Bakterien

Zur Kultivierung wurden die Nährmedien mit den Bakterien angeimpft und bei 37 °C im Trockenschrank (Agarplatten) bzw. im Schüttelinkubator bei 200 rpm (Flüssigkulturen) inkubiert. Zur positiven Selektion von Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, wurde dem Nährmedium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

### 3.3.3 Herstellung kompetenter Zellen

Transformationskompetente Zellen werden dadurch charakterisiert, dass sie bei der Transformation ringförmige Fremd-DNA in ihr Zytoplasma aufnehmen können. Die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte nach der von MÜLHARDT (2006) beschriebenen Methode. Dafür benötigt man die in Tabelle 9 aufgeführten Puffer TFB I und TFB II, die nach Herstellung steril zu filtrieren sind. Über Nacht wurde eine Vorkultur (10ml LB-Medium) aus dem XL1-Blue-Stamm angelegt. Mit 1ml dieser Kultur wurden 500 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD600 von 0,4-0,7 bei 37 °C und 200 rpm wachsen gelassen. Die entsprechende Menge Ampicillin (100 µl/ml) wurde zugegeben und die Bakterien 5 min bei 4000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 ml TFB I resuspendiert und anschließend 15 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation konnte das Bakterienpellet in 20 ml TFB II resuspendiert werden. Die Bakterienzellen wurden aliquotiert (100 µl/Cup), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

	<u>TBF I</u>		<u>TBF II</u>
RbCl	100 mM	MOPS pH 7,0	10 mM
MnCl <sub>2</sub>	50 mM	RbCl	10 mM
Kaliumacetat	30 mM	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM		
<u>Glycerin, 87%</u>	<u>15 % (m/V)</u>	<u>Glycerin, 87%</u>	<u>15% (m/V)</u>

**Tabelle 9 - Puffer TFB I und TFB II zur Herstellung kompetenter Zellen**

### 3.3.4 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Unter Transformation versteht man die Übertragung gereinigter, ringförmiger DNA in Bakterienzellen. *E. coli*-Bakterien besitzen von Natur aus keine Fähigkeit, fremde DNA aufzunehmen. Der Nobelpreisträger in Physiologie und Medizin (1986), Stanley Cohen, entdeckte, dass Calciumchlorid bakterielle Zellwände und Membranen für DNA durchlässig macht (HELSINKI et al. 1973). Somit kann ein Plasmid mit Resistenzgenen in ein nicht-resistentes Bakterium eingeführt werden. Das Antibiotikum dient der Selektion auf Antibiotika-haltigem Nährboden. Bei der Durchführung der Transformation fand die Hitzeschock-Methode Anwendung. Die Hitzeschock-Methode gilt bei präziser Einhaltung der Zeitangaben als verlässlich. Es wurden 100 µl einer Suspension kompetenter XL1-Blue-Zellen vorsichtig mit 5 µl des Ligationsansatzes (siehe Abschnitt 3.4.8) zusammengebracht und für 30 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen für genau 90 Sekunden bei 42 °C inkubiert. Zur Abkühlung wurden die Bakterien erneut für 3 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss mit 500 µl LB-Medium versetzt. Zur Regeneration wurden die Zellen nachfolgend für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl des Transformationsansatzes entnommen, auf einen Ampicillin-haltigen Nährboden mit dem Drigalski-Spatel verteilt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

## 3.4 Molekularbiologische Verfahren

### 3.4.1 Amplifikation der AKR1B10 mittels Polymerase Chain Reaction (PCR)

Mit dieser Methode wird ein definierter Genabschnitt exponentiell vervielfältigt.

Erforderlich sind dafür eine Template-DNA, ein Paar synthetischer Primer in Form von Oligonukleotiden, eine hitzebeständige DNA-Polymerase, Puffer, Mononukleotide und PCR-Thermocycler (MÜLHARD 2006). In diesem Experiment entstammte die Template-DNA einem Amplifikat der AKR1B10. Die Primer bestimmen die Spezifität der Amplifikationsreaktion, denn ihre Basensequenz ist zu der amplifizierenden Zielsequenz komplementär. Für die PCR verschiedener Zielsequenzen müssen daher unterschiedliche Primerpaare synthetisiert werden. Primer sollten möglichst eine Länge von 18-30 Basen mit einem Cytosin und Guaningehalt von 40-60 % haben. Bei der Wahl der Basenabfolge der Primer muss außerdem beachtet werden: Mehr als 4 gleiche Basen hintereinander können frameshifts und Fehlhybridisierungen verursachen, während die Ausbildung von hair pins zu einer reduzierten Anlagerung der Primer an die DNA führt.

Eine Polymerase-Ketten-Reaktion besteht aus 3 Schritten: einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Elongationsschritt. Der Denaturierungsschritt enthält die Auftrennung der beiden Stränge der Template-DNA bei 94 °C. Dieser Schritt wird möglichst kurz gehalten, da langfristig alle Reaktionskomponenten bei großer Hitze denaturieren. In der Annealingphase kühlt die aufgetrennte DNA auf eine Temperatur zwischen 50 °C und 60 °C ab. Der Temperaturabfall bewirkt ein Anlagern der Primer an die einzelsträngige Template-DNA. Die optimale Annealingtemperatur hängt vom Cytosin- und Guanin-Gehalt der Primer ab.

Nach dem Annealing der Primer wird die Temperatur auf 72 °C, dem Temperaturoptimum der Polymerase, erhöht. Sie knüpft solange Nukleotide an das 3'-Ende der Primer bis ein Doppelstrang entsteht, welcher der Ausgangs-DNA gleicht.

Dieser Zyklus kann bis zu 40mal wiederholt werden bis ein Vielfaches der Ausgangs-DNA vorhanden ist.

<i>Pfu</i> -Puffer (10x)	5 µl
5'-Primer (1 pmol/ µl)	1 µl
3'-Primer (1 pmol/ µl)	1 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/ µl)	0,5 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
DNA-Template	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	41 µl
<u>Gesamt</u>	<u>50 µl</u>

**Tabelle 10 - Einfacher PCR-Ansatz für die AKR1B10**

Tabelle 10 zeigt den einfachen Ansatz für die PCR. Dieser wurde in 3-facher Menge für 3 Reaktionsansätze angesetzt, um 50 µl pro Cup (Reaktionsgefäß) zu erhalten. Die Sequenzen der beiden 5'-, und 3'-Primer sind in Tabelle 11 dargestellt.



5'-Primer	ATG GCC ACG TTT GTG GAG
3'-Primer	CCT CAA TAT TCT GCA TCG AAG G

**Tabelle 11 - Primer für die PCR von AKR1B10**

- |     |  |                        |
|-----|--|------------------------|
| (1) | 5 min                                    | 95,0°C                 |
| (2) | 1 min                                    | 95,0°C                 |
| (3) | 1 min                                    | 50,0°C, 55,0°C, 60,0°C |
| (4) | 1 min                                    | 72,0°C                 |
|     | 30 x Wiederholung der Schritte (2) – (4) |                        |
| (5) | 10 min                                   | 72,0°C                 |
|     |  | 4,0°C bis zur          |
| (6) | danach                                   | Probeentnahme          |

**Tabelle 12 - Temperaturprogramm für die PCR (Gerät: Biometra, Göttingen)**

Zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur wurden drei Ansätze gewählt und bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen inkubiert (50 °C, 55 °C, 60 °C). Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 12 dargestellt.

Eine zweite PCR wurde bei der als optimal ermittelten Annealingtemperatur von 50 °C durchgeführt (Ansatz siehe Tabelle 3.4). Um die erhaltene AKR1B10-cDNA in den pCI-neo Mammalian Expression Vector ligieren zu können, mussten in einer weiteren PCR mit geeigneten Primern neue Schnittstellen (für die Restriktionsenzyme *Xho* I und *Sma* I) an das cDNA-Insert angefügt werden. Die Sequenz der Primer ist in Tabelle 14 abgebildet, die Schnittstellen sind markiert.

Pfu-Puffer (10x)	5 µl
5´-SmaI-Primer (10pmol/ µl)	1 µl
3´-XhoI-Primer (10pmol/ µl)	1 µl
Pfu-Polymerase (2,5 U/ µl)	0,5 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
DNA-Template	0,5 µl
H2O	41 µl
<u>Gesamt</u>	<u>50 µl</u>

**Tabelle 13 - PCR-Ansatz für die AKR1B10 mit Primer für die Schnittstellen**

3´-1B10-SmaI-Primer    5´-GTA TAG CCC' GGG TCA ATA TTC TGC ATC G-3´  
 5´-1B10-XhoI-Primer    5´-CCT AAT CTC' GAG ATG GCC ACG TTT GTG GA-3´

**Tabelle 14 - Primer mit Schnittstellen**

### 3.4.2 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese ermöglicht die physikalische Trennung von geladenen Molekülen, indem in einem flüssigen elektrolythaltigen Medium (Puffer) ein Stromfluss durch eine Gel-Matrix (Agarose) erzeugt wird. DNA-Fragmente (Restriktions- und PCR-Fragmente) wandern aufgrund ihrer negativen Ladung während der Elektrophorese durch die Poren des Agarose-Gels in Richtung Anode (positiver Pol). Dabei hängt die Laufgeschwindigkeit von der Größe und Form der Moleküle und der Dichte der Gel-Matrix ab. Die Größenbestimmung der linearen Fragmente erfolgte durch Vergleich der Laufstrecken mit einer ebenfalls im Gel aufgetragenen DNA bekannter Größe (im vorliegenden Fall der 100 bp Größenmarker). Um die DNA zu visualisieren, wurde dem Gel vor der Elektrophorese ein Fluoreszenz-Farbstoff (SYBR SAFE) zugefügt. Dabei lagert sich der bei Bestrahlung mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm fluoreszierende Farbstoff in den DNA-Doppelstrang ein und ermöglicht so die Visualisierung der DNA-Fragmente.

### 3.4.3 Herstellung des Agarose-Gel und Durchführung der Elektrophorese

Aus 70 ml TAE-Puffer wurde eine 1,2 % Agarose-Lösung hergestellt: 840 mg Agarose wurden in einen Erlenmeyerkolben trocken eingewogen und mit 70 ml TAE-Puffer unter Schwenken gemischt. Die Suspension wurde in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach einer kurzen Abkühlzeit wurde dem Gemisch 7 µl SYBR SAFE hinzugefügt. Dann wurde die Agarose-Lösung in den abgedichteten und mit einem Kamm versehenen Gelschlitten gegossen. Der Schaft des Kamms sollte oberhalb des Gels liegen. Nach Erstarren des Gels konnte der Kamm gezogen werden und die entstandenen Vertiefungen wurden mit Probenpuffer und den DNA-Proben befüllt.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese erfolgte bei konstantem Stromfluss von 60-100mA. Für analytische Gele wurde Agarose NEEO Ultra Qualität verwendet, für präparative Zwecke kam Biozym Plaque GP Agarose zum Einsatz.

1	1x TAE-Puffer Tris/ Acetat-Puffer EDTA	40 mM 1 mM pH 8,0
2	6x Loading Dye Tris-HCl-Puffer (6x Probenpuffer) Bromphenolblau Xylene-Cyanol FF Glycerin EDTA	10 mM 0,03 % 0,03 % 60% 60 mM
3	Agaroselösung 1,2 % Agarose NEEO Ultra Qualität 1x TAE-Puffer	840 mg 70 ml
4	Größenmarker GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus GeneRuler 1kb DNA Ladder	
5	SYBR SAFE (10.000 fach)	5-7 µl

**Tabelle 15 - Für die Agarose Gelelektrophorese benötigte Lösung**

#### 3.4.4 Reinigung der DNA

Nach gelungener Abtrennung des gewünschten DNA-Abschnitts im Agarose-Gel erfolgte seine Extraktion gemäß des QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol.

Dieses Protokoll wurde für die Extraktion von 40 bp bis 50 kb langen DNA-Fragmenten aus leicht schmelzender Agarose oder aus TAE-Puffer etabliert. Vor der Extraktion wurde die entsprechende Bande mit einem sauberen, scharfen Skalpel aus dem Gel geschnitten, gewogen und in ein kleines farbloses Cup (Reaktionsgefäß) gefüllt. Die DNA enthaltende Gelmasse wurde mit einer Menge an Hochsalzpuffer (QX1) versetzt, die dem 3-fachen ihres Gewichts entsprach, und eine halbe Minute gemischt. Der Hochsalzpuffer löste das Agarose-Gel auf. Im Anschluss wurde Glasmilch beigelegt, welche als Anionenaustauscher fungiert und in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze spezifisch DNA bindet (MÜLHARDT 2006). Das Gemisch wurde für 10 min bei 50 °C inkubiert, um den Bindungsvorgang zu intensivieren. Die Probe wurde zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet mit Puffer mehrfach gewaschen, um es dann für 30 min an der Luft zu trocknen. Danach wurde die DNA wieder in Lösung gebracht (20 µl, 10 mM Tris-Puffer, pH 8,5 je Cup) und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 3.4.5 Konzentration-und Reinheitsbestimmung der DNA

Die Konzentrations-und Reinheitsbestimmung der DNA erfolgte mit dem Photometer UVIKON®860. Durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm wird die DNA-Konzentration ermittelt (Mülhardt 2006). Für die Bestimmung der Reinheit der Präparation wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Bei 280 nm absorbieren die aromatischen Aminosäuren der Proteine, vor allem Tryptophan. Liegt der Quotient aus OD260 und OD280 über 1,8, deutet das auf eine hohe Reinheit der

DNA-Präparation hin und eine starke Verunreinigung durch Proteine kann ausgeschlossen werden.

### 3.4.6 Restriktionsverdau von Insert und Expressionsvektor

Der Preisträger des Lemelson-MIT Preises (1996), Herbert Boyer, präsentierte 1972 auf Hawaii, dass Restriktionsenzyme DNA an bestimmten Sequenzen schneiden können (HELSINKI et al. 1973). Um das Insert in den pCI-neo Mammalian Expression Vector einzufügen zu können, müssen zuvor Insert und Expressionsvektor mit Restriktionsenzymen geschnitten werden. Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA an bestimmten symmetrischen 4-8 Basen langen Erkennungssequenzen indem sie die Zucker-Phosphat-Bindung in beiden Strängen zwischen bestimmten Basen spalten. Sie benötigen dazu geeignete Pufferbedingungen (Salze, pH) und Magnesiumionen. Ringförmige Plasmid-DNA-Moleküle werden durch Einwirkung von Restriktionsendonukleasen in lineare Moleküle zerlegt. Einige dieser Enzyme erzeugen Fragmente mit stumpfen Enden (blunt ends), bei anderen steht ein Einzelstrang am Ende des Fragments etwas über (sticky ends). Je nach verwendetem Enzym ist die DNA-Sequenz des Überhanges unterschiedlich. Das Restriktionsenzym *Xho* I hinterlässt sticky ends, während *Sma* I blunt ends erzeugt (Tabelle 18). Die Ansätze für den Restriktionsverdau sind in den folgenden Tabellen aufgeführt (Tabelle 16 und 17). Beide Ansätze wurden für 75 min bei 37°C inkubiert. Eine Probe von Vektor und Insert wurde anschließend jeweils in verdauter und unverdauter Form auf Agarose aufgetragen und bei 254 nm belichtet. Da ein linearisiertes Plasmid eine andere Wanderungsgeschwindigkeit besitzt als ein zyklisches Plasmid, kann so überprüft werden, ob der Vektor geschnitten wurde.

Vektor DNA (4 µg)	4 µl
<i>Xho</i> I (20000 U/ml)	1 µl
<i>Sma</i> I (20000 U/ml)	2 µl
Puffer 4	2 µl
BSA (10 x)	2 µl
H <sub>2</sub> O	9 µl
<u>Gesamt</u>	<u>20 µl</u>

**Tabelle 16 - Ansatz für den Restriktionsverdau des pCI-neo Vektor**

Insert DNA (4 µg)	40 µl
<i>Xho</i> I (20000 U/ml)	1 µl
<i>Sma</i> I (20000 U/ml)	2 µl
Puffer	6 µl
BSA (10x)	6 µl
H <sub>2</sub> O	5 µl
<u>Gesamt</u>	<u>60 µl</u>

**Tabelle 17 - Ansatz für den Restriktionsverdau des Insert**

<i>Sma</i> I	<i>Xho</i> I
5'... <b>CCC GGG</b> ...3'	5'... <b>C TCGAG</b> ...3'
3'... <b>GGG CCC</b> ...5'	3'... <b>GAGCT C</b> ...5'

**Tabelle 18 - Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Sma* I und *Xho* I**

### 3.4.7 Dephosphorylierung des Vektors

Der geschnittene Vektor weist komplementäre Enden auf, wenn er nur von einem Enzym geschnitten wird. Daher besteht die Möglichkeit einer Religation des Vektors. Durch Dephosphorylierung der Vektor-DNA mit *Antartic Phosphatase* aus Kälberdarm von Bio Labs (15 min Inkubation bei 37 °C) wird diese Möglichkeit verringert. Die Phosphatase wird anschließend inaktiviert (5 min bei 65 °C). Das Insert wird dagegen nicht dephosphoryliert und kann daher problemlos in den Vektor ligiert werden.

### 3.4.8 Ligation von Insert und Vektor

Der Begriff Ligation bezeichnet die Bildung von Phosphodiesterbindungen katalysiert durch eine Ligase zwischen benachbarten 5`Phosphat- und 3`Hydroxyenden von doppelsträngigen DNA-Fragmenten und wird daher bei molekularbiologischen Arbeiten häufig für die Ligation von Vektor und Insert verwendet. Das Insert wurde im dreifach- bis fünffach-molaren Überschuss gegenüber den Vektormolekülen eingesetzt. Der gesamte Ligationsansatz (Tabelle 20) wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Mit 5 µl des Ligationsansatzes erfolgte eine Transformation in 100 µl kompetenten Zellen vom E.coli-Stamm XL1-Blue (siehe Abschnitt 3.3.5).

Vektor DNA (25 ng/ µl)	2 µl
Antarctic Phosphatase (5000U/ ml)	1 µl
10x Alkalische Phosphatase Puffer	5 µl
H <sub>2</sub> O	42 µl
<u>Gesamt</u>	<u>50 µl</u>

**Tabelle 19 - Ansatz zur Dephosphorylierung des Vektors**



Vektor DNA (25 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Insert DNA (20 ng/ $\mu$ l)	15 $\mu$ l
Puffer NEB 4	2 $\mu$ l
T4-DNA-Ligase	1 $\mu$ l
<u>Gesamt</u>	<u>20 <math>\mu</math>l</u>

**Tabelle 20 - Ansatz für die Ligation**

### 3.4.9 Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR wurde durchgeführt, um zu bestimmen, welche Bakterienklone das Plasmid mit dem AKR1B10-Insert enthielten. Hierfür wurde jeweils eine kleine Menge von 12 Bakterienklonen der LB-Agarplatte aufgenommen und getrennt in Ampicillinhaltiges (100  $\mu$ l/ ml) LB-Medium (25 ml) überführt. Diese Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Für jede Vorkultur wurde am Folgetag ein PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l pipettiert (Tabelle 21). Mit einer Impföse wurde jeweils ein wenig Vorkultur in einen PCR-Ansatz überführt. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz ohne Bakterienzellen. Es wurde hier die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet.

Im Anschluss an die PCR wurden die Proben und die Negativkontrolle wie beschrieben aufbereitet und zusammen mit dem DNA-Größenmarker auf ein analytisches 1 % Agarose-Gel (Agarose NEEO) aufgetragen (Temperaturprogramm, Tabelle 22). Klone, die das korrekte Plasmid trugen, gaben eine scharfe Bande von ca. 950 bp.

Template aus Bakterienkultur	Impföse
Taq Puffer	2 $\mu$ l
5'-Primer (1 pmol/ $\mu$ l)	0,4 $\mu$ l
3'-Primer (1 pmol/ $\mu$ l)	0,4 $\mu$ l
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
dNTP-Mix (10 mM)	0,4 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	16,6 $\mu$ l
<u>Gesamt</u>	<u>20,0 <math>\mu</math>l</u>

**Tabelle 21 - Ansatz für eine Kolonie-PCR**

1	2 min	95,0 °C
2	1 min	94,0 °C
3	1 min	50,0 °C
4	1 min	72,0 °C
5	10 min	72,0 °C
6	danach	4,0 °C

Die Schritte (2) bis (4) wurden 30mal durchlaufen

**Tabelle 22 - Temperaturprogramm der Kolonie-PCR (Pfu-Polymerase-Programm)**

### 3.4.10 Präparation von Plasmid-DNA

Je Klon wurden 500  $\mu$ l Kultur in Ampicillin-haltiges (100  $\mu$ g/ml) LB-Medium (40 - 50 ml) überführt und in einer Übernachtskultur auf dem Schüttler bei 37 °C angesetzt.

Nach Zentrifugation der Kulturen für 15 min bei 6000 rpm, 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet gemäß QIAGEN Plasmid Midi & Maxi Protocol aufbereitet. Diese Methode basiert auf der alkalischen Lyse (BIRNBOIM & DOLY 1979).

DNA, RNA und große Proteine wurden mit Puffern hoher pH-Werte bei Raumtemperatur denaturiert und nachfolgend mit Neutralisationspuffer ausgefällt.

Aufgrund ihrer geringen Größe bleibt die Plasmid-DNA in Lösung und wegen ihrer negativ geladenen Phosphatreste bindet sie an eine Anionenaustauschersäule. Zuvor wurden Kontaminationen aus vorherigen Präparationen mit Puffern geringer Salzkonzentration zweimal von der Säule gewaschen. Die DNA wurde mit einem Puffer hoher Salzkonzentration von der Säule eluiert, mit Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft bei Zimmertemperatur für 10 min getrocknet. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA in Tris-HCl-Puffer (10 mM, pH 7.4) aufgenommen. Die verdünnten DNA-Konzentrationen der Präparationsansätze von vier Klonen wurden einzeln bestimmt (2 µl Plasmid + 18 µl H<sub>2</sub>O).

#### 3.4.11 Sequenzierung der DNA

Um die korrekte Ligation des AKR1B10-Inserts in den pCI-neo Mammalian Expression Vector zu verifizieren, wurden je Klon 200 ng/µl der Plasmidpräparation zur Sequenzierung an die Firma SeqLab gesandt. Die dabei verwendeten Primer werden in Tabelle 23 aufgeführt.

3'-1B10-SmaI-Primer      5'-GTA TAG **CCC'GGG** TCA ATA TTC TGC ATC G-3'

5'-1B10-XhoI-Primer      5'-cct aat **CTC'GAG** ATG GCC ACG TTT GTG GA-3'

**Tabelle 23 - Mitgesandte Primer zur Sequenzierung (Schnittstellen fettgedruckt)**

Zur Eigenkontrolle, ob die Amplifizierung in den Bakterien ordnungsgemäß verlaufen ist, wurde Klon 9 erneut in kompetenten Zellen zum Wachsen über Nacht angesetzt. Anschließend wurde die DNA mit Qiagenplasmid Maxi-Protokol aus den Zellen gelöst

und eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Zur Ermittlung der Basenpaare erfolgte eine PCR in nicht-präparativem Gel (Tabelle 24).

DNA (2 µg)	2 µl
Puffer NEB 4	2 µl
Sma I (20000 U/ml)	0,5 µl
Xho I (20000 U/ml)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	15 µl
<u>Gesamt</u>	<u>20,0 µl</u>

**Tabelle 24 - PCR-Ansatz zur Eigenkontrolle**

### 3.5 Zellkulturmethoden

#### 3.5.1 Materialien

Chemikalien	Erworben von:
DMEM ( <b>D</b> ulbecco's <b>M</b> odified <b>E</b> agle <b>M</b> edium) (High Glucose 4,5g/l mit Phenolrot, ohne Pyruvat)	PM-13-S, c.c.pro GmbH, Oberdorla
DMSO (Dimethylsulfoxid)	PAA Laboratories GmbH
FCS inaktiviert ( <b>F</b> etal <b>B</b> ovine <b>S</b> erum)	S0115, BIOCHROM AG Berlin.
L-Glutamin (200 mM)	Z-10-M, c.c.pro GmbH, Oberdorla
MTT 5 mg/ ml sterilfiltriert in PBS 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma: M-2128
NEAA ( <b>N</b> on- <b>E</b> ssential- <b>A</b> mino- <b>A</b> cids)	PAA Laboratories GmbH
PBS steril (mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	Merck, Darmstadt
PBS ( <b>P</b> hosphate <b>b</b> uffered <b>s</b> aline nach Dulbecco)	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA (0,2%)	Produkt – Nr. R-L5101-H, CELL CONCEPTS, Umkirch
Trypanblau	
25 cm <sup>2</sup> Kulturflaschen	Sarstedt AG, Nümbrecht
75 cm <sup>2</sup> Kulturflaschen	Sarstedt AG, Nümbrecht
35 mm Zellkulturschalen	Sarstedt AG, Nümbrecht
6-well-Mikrotiterplatten, steril	Falcon
96-well-Mikrotiterplatten, steril	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Antibiotika	Erworben von:
G418	Gibco Invitrogen Ltd., Paisley, UK Ampicillin (1000-fach konzentriert)
Peroxide	Erworben von:
CHP (Cumolhydroperoxid) Luperox CU 90 88%	Sigma-Aldrich, Steinheim
t-BuOOH (Tertiäres Butylhydroperoxid 70%)	Sigma-Aldrich, Steinheim

**Tabelle 25 - Materialien**

Chinese hamster lung fibroblast cell line V-79 und die humanen Zelllinien A549, HAT-29, Caco-2, SW-480 wurden erworben von Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland).

### 3.5.2 Kulturmedien

Das Kulturmedium DMEM wurde unter keimfreien Bedingungen mit 5 ml Glutamin, 5 ml NEAA und 50 ml fetalem Rinderserum angereichert und vor Gebrauch auf 37 °C angewärmt. Zum Kultivieren der Zellen war PBS steril (**P**hosphate **b**uffered **s**aline nach Dulbecco) erforderlich. Es fand in folgender Zusammensetzung Anwendung (NaCl: 8 g/ l, KCl: 0,2 g/ l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:1,15 g/ l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,2 g/ l ad 1 L H<sub>2</sub>O lösen und steril filtrieren, pH-Wert 7,4). Für die stabile Transfektion eukaryotischer Zellen mit Nanofectin wurden V79-Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters sowie humane Colon-Karzinomzellen (CaCo-2) verwendet. In ihnen fand die Expression des rekombinanten Enzyms AKR1B10 statt.

### 3.5.3 Transfektion von V-79 Lungenfibroblasten und humanen CaCo-2-Zellen mit dem AKR1B10-Expressionsplasmid pCI-neo

Transfektion von Zellen beschreibt einen Gentransfer von Fremd-DNA in die Zelle ohne Transportvehikel. Die Expressionsmuster können transient oder stabil sein (SCHMITZ 2007). Für die Transfektion wurden V-79 Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters und humane Kolonkarzinom-2 Zellen als Passage (+1) im Mai 2008 aufgetaut. Die V-79 Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters und die humanen CaCo-2 Zellen wurden in einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  und  $4 \times 10^5$  in 2 ml Medium pro Vertiefung in einer Platte mit 6 Vertiefungen ausgesät. Die geringe Menge Medium diente der Erhöhung der Transfektionseffizienz.

Das Herstellen der DNA-Lösung und der Nanofectin-Lösung erfolgte nacheinander in getrennten Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Pro Vertiefung wurden 3,3 µl Plasmid-DNA (0,9 µg/ µl) und 9,6 µl Nanofectin (entsprechend für 3 µg DNA) eingesetzt. Sowohl die Plasmid-DNA als auch Nanofectin wurden einzeln jeweils auf 100 µl NaCl-Lösung (150 mM) ergänzt, sanft gemischt und kurz zentrifugiert. Im Anschluss wurden 100 µl der Nanofectin-Lösung zu der 100 µl DNA-Lösung gegeben, beides wurde sofort vermischt, kurz zentrifugiert und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine tropfenweise Zugabe des DNA-Nanofectin-Gemisches (200 µl je well) zum FCS-haltigen Kulturmedium. Durch Schwenken der Gewebekulturplatte wurde alles vorsichtig gemischt. Zwei Stunden nach der Transfektion wurden weitere 2 ml Medium in jede Vertiefung gegeben, und die Zellen wurden für zusätzliche 24 h im Brutschrank inkubiert. Zur Selektion erfolgreich transfizierter Zellen fand Geneticin (G418), ein Aminoglycosid-Antibiotikum, Anwendung. Der pCI-neo-Vektor verfügt über das *neo*-Gen als Selektionsmarker, welches für die Aminoglycosid-Phosphotransferase kodiert. Dieses Enzym verleiht den Zellen, die den Vektor aufgenommen hatten eine Resistenz gegen den Translationshemmer G418 und können sich daher ungehemmt vermehren. Die effektive Dosis variiert in Abhängigkeit von Zelllinie, Aussaatdichte, proliferativem Status und Medium (Schrimpf 2002). Nach 24-48 h wurde das Medium abgesaugt und mit dem Selektionsmedium (600 µg/ ml G418) ersetzt. Das Selektionsmedium wurde anschließend jeden 2.-3. Tag erneuert, eine Woche nach der Transfektion wurde die G418-Konzentration auf 200-400 µg/ ml gesenkt. Resistente Zellklone zeigten sich nach 2-5 Wochen. Zur Kontrolle der Effektivität der Antibiotika-Selektion wurde eine nicht-transfizierte Kontrolle mit Selektionsmedium mitgeführt. Nicht-transfizierte Zellen starben nach 3-9 Tagen nach Zugabe des Antibiotikums ab.

Nach stabiler Transfektion wurden die V-79 Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters und humane CaCo-2 Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 3.5.4 Kultivierung der Zellen

Für die Versuche wurden die transfizierten Zelllinien aufgetaut und kultiviert. Pro Zelllinie wurden zwei Erhaltungskulturen in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen angelegt und abgestimmt auf den Versuchsbeginn in der Dichte variierend, in 10 ml Kulturmedium ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach Bedarf erfolgte eine Erneuerung des Kulturmediums und bei Subkonfluenz von ca. 70 % wurde passagiert, um einer starken Ausdifferenzierung der Zellen vorzubeugen. Zum Passagieren wurde zuerst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 3-4 ml PBS steril gespült und durch eine gleichmäßige Benetzung des Monolayers mit 1-3 ml Trypsin-EDTA (0,2 %) vom Flaschenboden abgelöst. Danach wurden die Zellen für 1-2 min im Brutschrank inkubiert, bis sie sich abkugelten und von der Flaschenwand lösten. Es erfolgte eine Resuspendierung der zuvor in 10 ml Medium aufgenommenen Zellen in 50 ml Röhrchen. Dieses wurde bei 500 xg bei Raumtemperatur für 4 min zentrifugiert, der Überstand im Anschluss abgesaugt und das Pellet erneut in 10 ml Kulturmedium durch Auf- und Abpipettieren homogen aufgenommen. 10-15 ml Kulturmedium wurden in der neuen Kulturflasche vorgelegt und 1 ml der Zellsuspension zugefügt (Split-Verhältnis von 1:10).



### 3.5.5 Testsubstanzen

Peroxide führen aufgrund ihrer toxischen Eigenschaft in Abhängigkeit von Konzentration und Wirkdauer zum Zelltod. Für die Versuche wurden sie direkt im Kulturmedium als homogene 10 mM Lösung hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden weitere Konzentrationen angesetzt (5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM, 0,625 mM, 0,312 mM, 0,156 mM, 0,078 mM). und in jede Vertiefung 200 µl der entsprechenden Testsubstanz und Konzentration pipetiert. Die Lagerung der Testsubstanzen Cumolhydroperoxid und tertiäres Butylhydroperoxid erfolgte lichtgeschützt im Kühlschrank.

### 3.5.6 Versuchsaufbau der Toxizitätsbestimmung

Die Versuchskultur wurde in 96-well-Mikrotiterplatten angelegt und jedes well mit 200 µl Kulturmedium befüllt. Die Dichte der Aussaat der V-79 Hamsterfibroblasten betrug  $1 \times 10^4$  /well, bei den humanen CaCo-2 Zellen betrug sie  $2 \times 10^4$  /well, wobei die Zellen zuvor unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Thoma Zählkammer ausgezählt wurden. Dazu wurde 100 µl Zellsuspension mit 100 µl Trypanblau-Lösung in einem Eppendorf-Hütchen verdünnt (1:2).

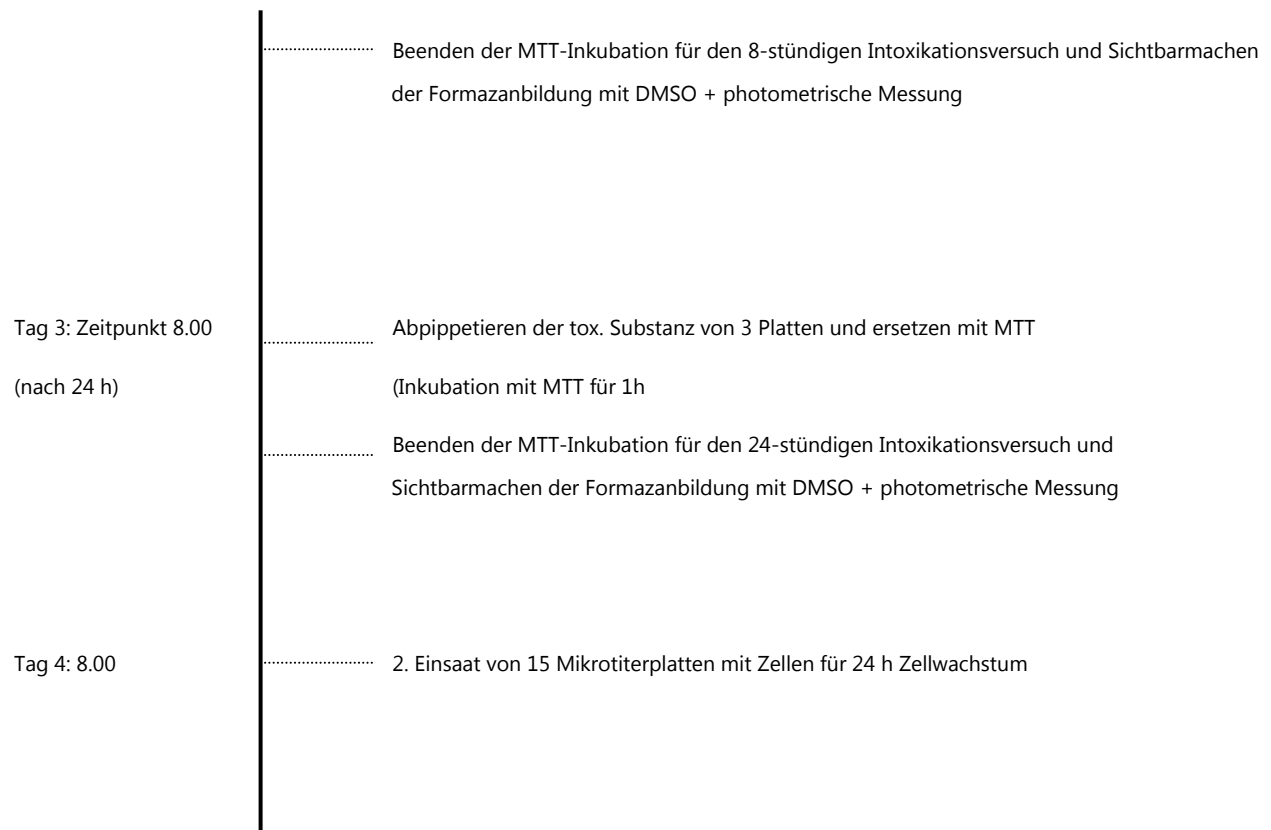
*Zellen/ ml Ausgangszellsuspension = ermittelte Zellzahl x Verdünnungsfaktor /  $4 \times 10^{-6}$  x gezählte Gruppenquadrate*

Nach Auszählen von 2 x 16 Feldern wurde aus der Zellzahl das arithmetische Mittel gebildet und mit dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert. Davon ausgehend wurde die Zellzahl/ ml errechnet, indem mit dem Volumen eines einzelnen Gruppenquadrats 250.000 (Kehrwert von  $4 \times 10^{-6}$ ) und mit der Anzahl der Gruppenquadrate 0,0625 (Kehrwert von 16) multipliziert wurde.

Je nach gewünschter Aussaatdichte, wurde das entsprechende Volumen entnommen. Jeder Versuchsansatz erforderte die Aussaat der transfizierten Zelllinie im direkten Vergleich mit dem Wildtyp. Dazu wurden an 2 verschiedenen Tagen je 15 Mikrotiterplatten eingesät: 1. Tag: 10 x Wildtyp, 5 x Transfizierter Typ; 2. Tag: 10 x Transfizierter Typ, 5 x Wildtyp. Aufgrund von Verdunstungsgefahr wurden alle äußeren wells mit Kulturmedium befüllt und die Spalten 2-11 für die Zellaussaat verwendet.

Im Anschluss erfolgte ein 24-stündiges Zellwachstum im Brutschrank. Nach erfolgreichem Zellwachstum von 24 Stunden der am Vortag ausgesäten Zellen in 15 Mikrotiterplatten konnte die Inkubation der vorliegenden Zelllinie mit der jeweiligen Testsubstanz erfolgen. Der transfizierte Zelltyp und der Wildtyp wurden parallel mit einer Testsubstanz getestet. Das Testmedium wurde direkt vor dem Versuchsbeginn angesetzt und nach Absaugen des alten Kulturmediums mit einer Multipipette steril auf die Zellen aufgetragen (200  $\mu$ l/ well) und inkubiert. Die Kontrolle blieb ohne jegliche Testsubstanz und erhielt nur einen erneuten Wechsel des Kulturmediums. Die Spalten 3- 10 wurden mit der Testsubstanz ersetzt. Ein Versuch mit einer Testsubstanz in einer Zellart wurde folgend durchgeführt, siehe dazu Abbildung 3 – Abbildung 5.

Tag 1: Zeitpunkt 8.00	1. Einsaat von 15 Mikrotiterplatten mit Zellen für 24 h Zellwachstum
Tag 2: Zeitpunkt 8.00	Austausch von Zellmedium mit der toxischen Substanz in allen Platten
nach 1 h	Abpipetieren der tox. Substanz von 3 Platten und ersetzen mit MTT (Inkubation mit MTT für 1h)
nach 2 h	Abpipetieren der tox. Substanz von 3 Platten und ersetzen mit MTT (Inkubation mit MTT für 1h)  + Beenden der MTT-Inkubation für den 1-stündigen Intoxikationsversuch und Sichtbarmachen der Formazanbildung mit DMSO + photometrische Messung
nach 3 h	Beenden der MTT-Inkubation für den 2-stündigen Intoxikationsversuch und Sichtbarmachen der Formazanbildung mit DMSO + photometrische Messung
nach 4 h	Abpipetieren der tox. Substanz von 3 Platten und ersetzen mit MTT (Inkubation mit MTT für 1h)  Beenden der MTT-Inkubation für den 4-stündigen Intoxikationsversuch und Sichtbarmachen der Formazanbildung mit DMSO + photometrische Messung
nach 8 h	Abpipetieren der tox. Substanz von 3 Platten und ersetzen mit MTT (Inkubation mit MTT für 1h)



**Abbildung 3 - Zeitliche Darstellung des Zellversuchs**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
B	DMEM	Ko 1	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	Ko 2	DMEM
C	DMEM	Ko 1	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	Ko 2	DMEM
D	DMEM	Ko 1	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	Ko 2	DMEM
E	DMEM	Ko 1	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	Ko 2	DMEM
F	DMEM	Ko 1	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	Ko 2	DMEM
G	DMEM	Ko 1	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	Ko 2	DMEM
H	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM

**Abbildung 4 - 96-well-Mikrotiterplatten mit Inkubationsschema der toxischen Substanz**

**DMEM:** Testmedium **D**ulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium, Ko 1 und Ko 2: Kontroll-Zellen in Testmedium DMEM, Spalte 3- 10 (B-G):Testsubstanz (mM) der Verdünnungen 1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1: 64; 1:128)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
B	DMEM	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	DMEM
C	DMEM	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	DMEM
D	DMEM	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	DMEM
E	DMEM	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	DMEM
F	DMEM	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	DMEM
G	DMEM	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	DMEM
H	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM

**Abbildung 5- 96-well-Mikrotiterplatten mit Inkubationsschema für Tetrazoliumsalz (MTT)**

**DMEM:** Testmedium **D**ulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium,

Spalte 2- 11 (B-G): Tetrazoliumsalz (MTT) in  $\mu$ l

Nach Inkubation der Zellen mit der Testsubstanz (1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h) wurde das Medium der Zellen führenden wells durch 200 µl MTT (5 mg/ ml PBS-Puffer, steril) pro well ersetzt und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Zur Visualisierung von vitalen Zellen wird das Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) verwendet, welches in lebenden Zellen durch Oxidoreduktasen zu blau färbenden, nicht wasserlöslichem Formazan reduziert wird, dessen Absorption nach Zusetzen einer organischen Solubilisierungslösung im Photometer gemessen werden kann (MOSMANN 1983).

Die Menge des gebildeten Formazan entspricht der Viabilität der Zellen und der Mitochondrien. Die Reaktion wurde nach der Inkubationszeit durch Absaugen des Mediums gestoppt, mit 100 µl DMSO/ well aufgefüllt und mit einem dünnem Plastikspatel vorsichtig umgerührt, um das gelöste Formazan im Mikrotiterplatten-Photometer bei 540 nm und Referenzwellenlänge 690 nm zu messen. Die Wells 1 A-D und 12 A-D erhielten DMSO für den Blindwert, woraus ein Mittelwert gebildet und von den erhaltenen Messwerten subtrahiert wurde. Ein Anstieg der Absorbtionswerte bedeutete eine Umsetzung von Tetrazoliumsalz zu nicht-wasserlöslichem Formazan durch funktionsfähige Mitochondrien (MOSMANN 1983).

### 3.5.7 Darstellung der Ergebnisse

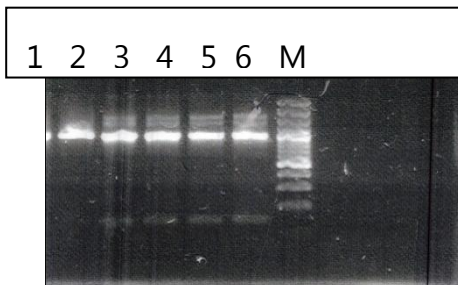
Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Prism for Windows, Version 4.3. Angegeben sind die Anzahl der Versuche (n) sowie die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der gentechnischen Verfahren

#### 4.1.1 Amplifikation des AKR1B10 – Inserts

Wie unter Abschnitt 3.4.1 beschrieben, wurden zur Bestimmung einer geeigneten Annealing-Temperatur drei Ansätze bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen gewählt (50 °C, 55 °C, 60 °C). Anschließend wurden Teilproben auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 6 ). Bei allen Temperaturen zeigte sich eine Bande der Größe ca. 950bp, wobei zur weiteren Verwendung die Probe der stärksten Bande ausgewählt wurde.



**Abbildung 6 - Amplifikation des Inserts AKR1B10**

M: Größenmarker; 1+2: 50°C, 3+4: 55°C; 5+6: 60°C

Die Proben 3 und 4 zeigten die stärksten Banden auf und dienten folglich als Template für die 2. PCR. Bande 1 ist nicht vollständig abgebildet.



#### 4.1.2 Anfügen der Schnittstellen für die Ligation

Durch eine 2. PCR wurde die AKR1B10 um die Schnittstellen SmaI und XhoI ergänzt, um eine Ligation in den pCI-neo Mammalian Expression Vector durchzuführen. Das um die Schnittstellen ergänzte Template wurde nach Auftragen auf präparatives Analysegel ausgeschnitten und aus der Agarose aufgereinigt. Ein Verdau mit den beiden Restriktionsenzymen sorgte für die notwendigen überhängenden Enden für die Ligation.

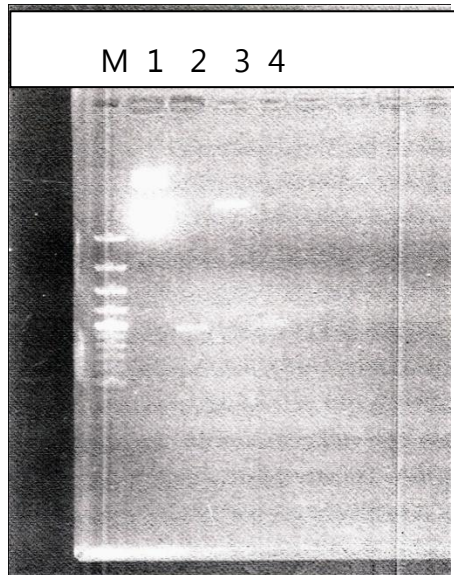
#### 4.1.3 Vorbereitung des Expressionsvektors

Der pCI-neo Mammalian Expression Vector wurde wie in Abschnitt 3.4.6 beschrieben mit den Restriktionsenzymen SmaI und XhoI bearbeitet und über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Anschließend wurde er mit der Antarctic Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert (siehe Abschnitt 3.4.7). Zur Gegenprobe wurden Vektor + Restriktionsenzyme (SmaI und XhoI); Insert + Restriktionsenzyme (SmaI und XhoI) sowie Vektor pur und Insert pur im Gel aufgetragen. Aus Abbildung 7 ist ersichtlich, dass alle Banden die korrekte Größe aufweisen. Es ist davon auszugehen, dass das korrekte Plasmid in reiner Form vorhanden ist.

#### 4.1.4 Ligation und Transformation

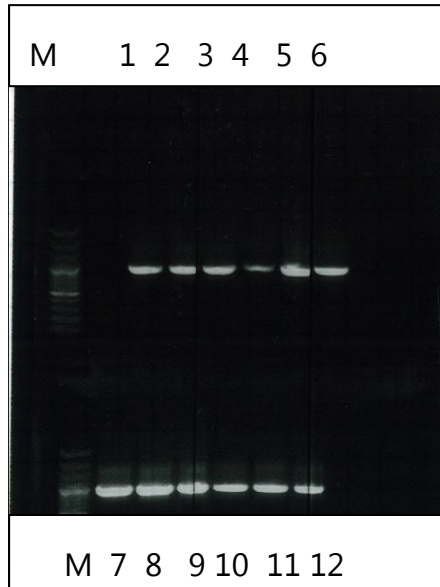
Nach Ligation von Vektor und Insert über ihre komplementären Enden (siehe Abschnitt 3.4.8) erfolgte die Transformation in kompetenten Zellen (siehe Abschnitt 3.3.6). Die Bakterien wurden auf einem Ampicillin-haltigen Nährboden aufgetragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden 12 der gewachsenen Klone von der Platte gepickt und in Vorkulturen angesetzt. Für jede Vorkultur wurde am Folgetag ein PCR-Ansatz pipettiert. Die Kolonie-PCR war bei allen Klonen erfolgreich und zeigte bei Klon 7, 8, 9 und 10 die dickste Bande (siehe Abbildung 8). Von Klon 7, 8, 9 und

10 wurden 200-ml-Kulturen angesetzt und Plasmide gewonnen. Das Plasmid mit Insert besitzt eine Größe von 6422 bp (5472 bp + 950 bp).



**Abbildung 7 - Ergebnis des Restriktionsverdaus**

**M:** Größenmarker; **1:** Vektor + Restriktionsenzyme (SmaI und XhoI); **2:** Insert + Restriktionsenzyme (SmaI und XhoI) ; **3:** Vektor pur; **4:** Insert pur



**Abbildung 8 - Ergebnis der Kolonie-PCR.**

**M:** Größenmarker; **1:** Negativkontrolle; **2-13:** von der Agarplatte gepickte Klone

#### 4.1.5 Sequenzierung der DNA

Zur endgültigen Gegenprobe wurden die Plasmide der Kolonie-PCR 7, 8, 9 und 10 zur Sequenzierung eingesandt. Die Sequenz von AKR1B10 ist im Anhang (siehe Anhang: Abbildung 14) dargestellt, Positionen identischer Nucleotide zur ersten Sequenz sind durch einen Punkt dargestellt.

## 4.2 Ergebnisse der Zellkultur

### 4.2.1 Transfektion

Die Transfektion von V-79 Lungenfibroblasten und humanen CaCo-2 Zellen mit dem AKR1B10-Expressionsplasmid pCI-neo wurde anhand des Antibiotikums Geneticin (G418) erfolgreich selektioniert. Nach 2 – 3 Wochen zeigten sich resistente Zellklone mit internalisiertem Plasmid unter Geneticin. Frau Dr. B. Ebert führte die in 3.5.3 beschriebene Transfektion durch (3.5.3 Transfektion von V-79 Lungenfibroblasten und humanen CaCo-2-Zellen mit dem AKR1B10-Expressionsplasmid pCI-neo).

### 4.2.2 Zytotoxizität von Peroxiden

Peroxide nehmen aufgrund ihrer zytotoxischen Eigenschaft Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Zellen. Durch ihre lipophile Eigenschaften wirken sie vermutlich an der Zellmembran und führen zu ATP-Mangel und intrazellulären Calciumanstieg (LE et al. 1994; Persoon-Rothert et al. 1992)

Das Ausmaß der Toxizität lässt sich mit dem MTT-Verfahren durch eine Farbreaktion ableiten.

Es wurde eine Sechsfachbestimmung pro Konzentration angesetzt und daraus ein Mittelwert gebildet. Der Mittelwert der Extinktion der einzelnen Konzentrationen stand jeweils in Bezug zum Mittelwert der platteneigenen Kontrolle, aus einer Zwölfachbestimmung gemittelt und in 100 % (Lebensfähigkeit der Kontrolle) gegen die einzelne Substanzkonzentration aufgetragen (Konzentrationswirkungskurve).



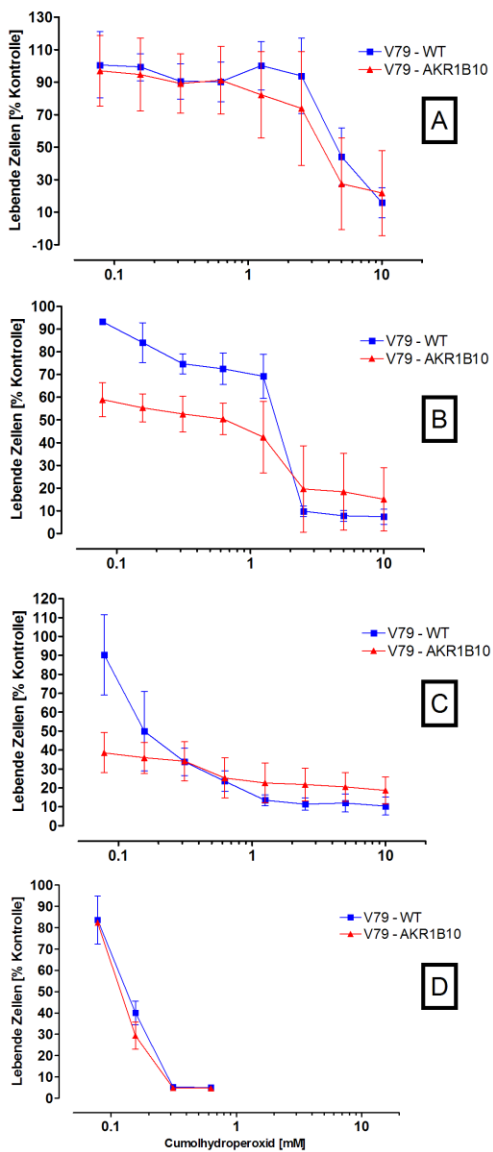
**Abbildung 9 - Strukturformeln von tertiärem Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid**

Links: tertiäres Butylhydroperoxid

Rechts: Cumolhydroperoxid

### 4.2.3 Einfluss von Cumolhydroperoxid auf die Zellvitalität von V79 - Lungenfibroblasten

In Abbildung 10 ist die Überlebensfähigkeit von V79-Wildtypzellen und AKR1B10-transfizierten V79-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen Cumolhydroperoxid dargestellt.



**Abbildung 10 - 4 Konzentrationswirkungskurven von Cumolhydroperoxid (V-79 Zellen)**

A, B, C, D repräsentieren die Inkubationszeiten A= 2 h, B= 4 h, C= 8 h, D= 24 h

Die Konzentrationswirkungskurven sind im  $\log_{10}(x)$  dargestellt und zeigen Mittelwerte  $\pm$  SD von n= 3 unabhängigen Experimenten, V79-Wildtypzellen und AKR1B10-transfizierte V79-Zellen

Abszissenachse: Konzentration von Cumolhydroperoxid in mM

Ordinatenachse: Lebende Zellen in Prozent der Kontrolle

Erste Effekte der toxischen Substanz zeigen sich nach 2 h bei 5 mM und 10 mM. Die Lebensfähigkeit bei höchster Konzentration liegt bei den transfizierten V-79 Fibroblasten bei 22 %, beim Wildtyp bei 16 %. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen.

Nach 4 h Inkubation mit CHP werden bei 2,5 mM bis 10 mM Effekte sichtbar. Die Lebensfähigkeit bei höchster Konzentration liegt bei den transfizierten V-79 Fibroblasten bei 15 %, beim Wildtyp bei 7,5 %. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen.

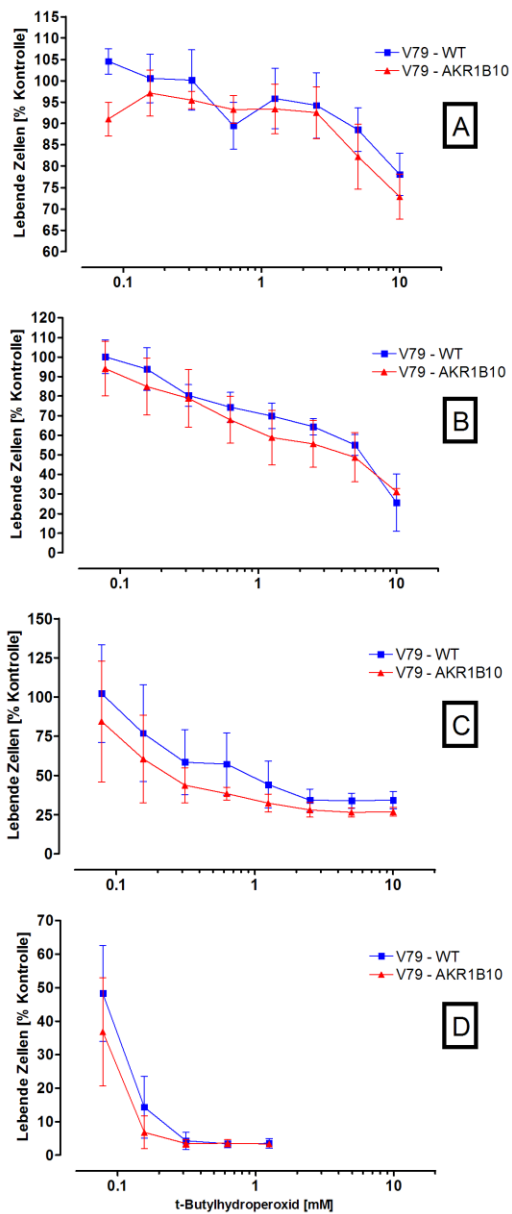
Nach 8 h Inkubation lassen sich Effekte zwischen 0,625 mM bis 10 mM ablesen. Die Lebensfähigkeit bei höchster Konzentration liegt bei den transfizierten V-79 Fibroblasten bei 19 %, beim Wildtyp bei 10,5 %. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen.

Nach 24 h Inkubation zeigen sich Veränderungen zwischen 0,312 mM bis 0,625 mM. Die Lebensfähigkeit bei höchster Konzentration liegt bei transfizierten V-79 Fibroblasten und beim Wildtyp bei 5 %. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen.



#### 4.2.4 Einfluss von tertiärem Butylhydroperoxid auf die Zellvitalität von V79 - Lungenfibroblasten

In Abbildung 11 ist die Überlebensfähigkeit von V79-Wildtypzellen und AKR1B10-transfizierten V79-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen t-Butylhydroperoxid dargestellt.



**Abbildung 11 - 4 Konzentrationswirkungskurven von tertiärem Butylhydroperoxid (V-79 Zellen)**

A, B, C, D repräsentieren die Inkubationszeiten A= 2 h, B= 4 h, C= 8 h, D= 24 h

Die Konzentrationswirkungskurven sind im  $\log_{10}(x)$  dargestellt und zeigen Mittelwerte  $\pm$  SD von n= 3 unabhängigen Experimenten, V79-Wildtypzellen und AKR1B10-transfizierte V79-Zellen

Abszissenachse: Konzentration von tertiärem Butylhydroperoxid in mM

Ordinatenachse: Lebende Zellen in Prozent der Kontrolle

Erste Effekte der toxischen Substanz sind nach 2 h bei 5 mM und 10 mM zu sehen. Die Lebensfähigkeit bei höchster Konzentration liegt bei den transfizierten V-79 Fibroblasten bei 73%, beim Wildtyp bei 78 %. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen.

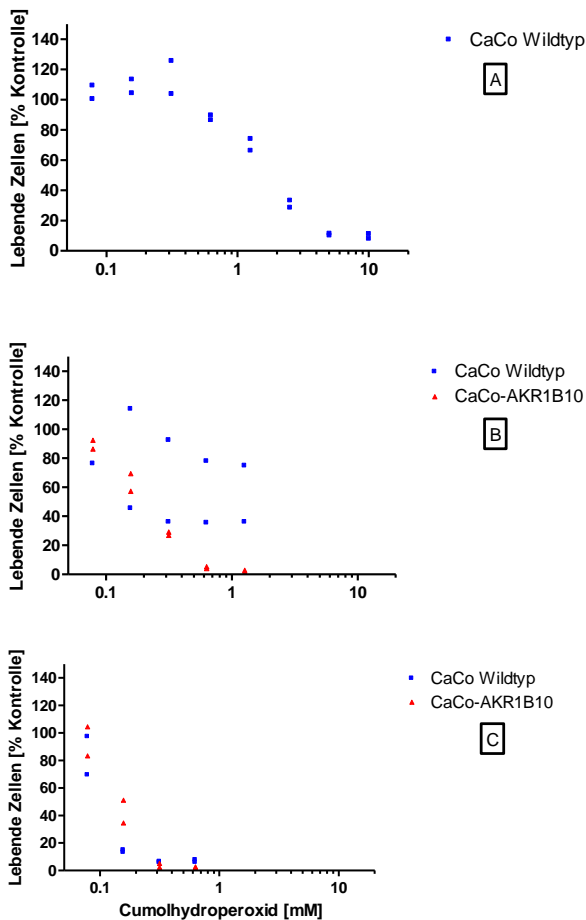
Nach 8 h Inkubation t-BuOOH sind bei 5 mM und 10 mM Effekte zu sehen. Die Lebensfähigkeit bei höchster Konzentration liegt bei den transfizierten V-79 Fibroblasten bei 31%, beim Wildtyp bei 26 %. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen.

Nach 8 h Inkubation mit t-BuOOH lassen sich vorrangig Effekte zwischen 2,5 mM und 10 mM ablesen. Die Lebensfähigkeit bei höchster Konzentration liegt bei den transfizierten V-79 Fibroblasten bei 27 %, beim Wildtyp bei 34 %. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen.

Nach 24 h Inkubation zeichnen sich Effekte bei allen Konzentrationen ab. Die Lebensfähigkeit bei höchster Konzentration liegt bei den transfizierten V-79 Fibroblasten und dem Wildtyp bei 4 %. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen.

#### 4.2.5 Einfluss von Cumolhydroperoxid auf die Zellvitalität von humanen CaCo-2 Zellen

In Abbildung 12 ist die Überlebensfähigkeit von CaCo-Wildtypzellen und AKR1B10-transfizierten CaCo-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen Cumolhydroperoxid dargestellt.



**Abbildung 12 - 3 Konzentrationswirkungskurven von Cumolhydroperoxid (humane CaCo-2 Zellen)**

A, B, C repräsentieren die Inkubationszeiten A= 2 h, B= 8 h, C= 24 h

Die Konzentrationswirkungskurven sind im log<sub>10</sub> (x) dargestellt und zeigen einzelne Werte von 2 unabhängigen Experimenten. (Da sich beim 1. Experiment keine großen Unterschiede gezeigt haben, wurde ein 2. Experiment zur Kontrolle angesetzt. Dabei hat

sich ein 3. Experiment erübrigt.)

Abszissenachse: Konzentration von Cumolhydroperoxid in mM

Ordinatenachse: Lebende Zellen in (Prozent der Kontrolle)

Erste Effekte der toxischen Substanz sind nach 2 h bei 5 mM und 10 mM zu sehen. Die Lebensfähigkeit bei höchster Konzentration liegt beim Wildtyp bei 10 %.

Aufgrund vorangegangener nicht signifikanter Ergebnisse wurde die Testung der transfizierten CaCo-2 Zellen unterlassen.

Nach 8 h zeigen sich erste Effekte der toxischen Substanz bei 0,625 mM und 1,25 mM. Die Lebensfähigkeit bei höchster Konzentration liegt bei den transfizierten CaCo-2 Zellen bei 3 %, beim Wildtyp bei 56 %. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen.

Nach 24 h Inkubation lassen sich Effekte zwischen 0,312 mM bis 0,625 mM ablesen. Die Lebensfähigkeit bei höchster Konzentration liegt bei transfizierten CaCo-2 Zellen bei 3 % und beim Wildtyp bei 7 %. Bei einer Konzentration von 0,156 mM liegt die Lebensfähigkeit der transfizierten CaCo-2 Zellen bei 43 %, die des Wildtyps bei 14 %. Bei Konzentration 0,156 mM besteht ein signifikanter Unterschied.

#### 4.2.6 Einfluss von tertiärem Butylhydroperoxid auf die Zellvitalität von CaCo-2 Zellen

In Abbildung 13 ist die Überlebensfähigkeit von CaCo-Wildtypzellen und AKR1B10-transfizierten CaCo-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen t-Butylhydroperoxid dargestellt.

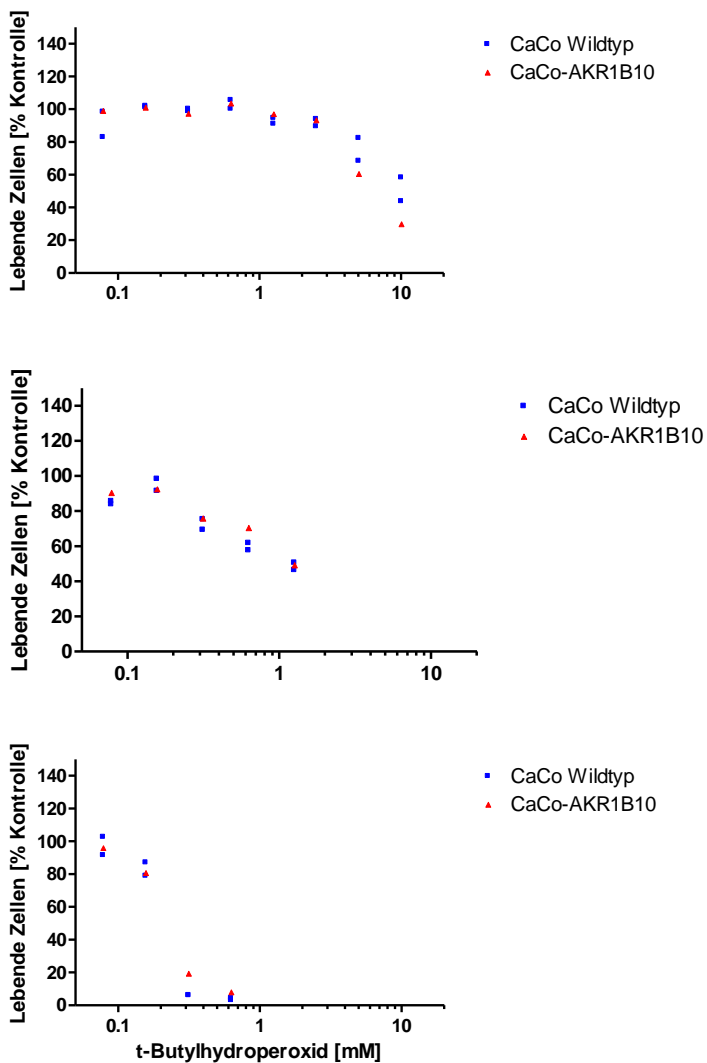


Abbildung 13 - 4 Konzentrationswirkungskurven von tertiärem Butylhydroperoxid (CaCo-2 Zellen)

**A, B, C** repräsentieren die Inkubationszeiten **A**= 2 h, **B**= 8 h, **C**= 24 h

Die Konzentrationswirkungskurven sind im  $\log_{10}(x)$  dargestellt und zeigen einzelne Werte von 2 unabhängigen Experimenten. (Da sich beim 1. Experiment keine großen Unterschiede gezeigt haben, wurde ein 2. Experiment zur Kontrolle angesetzt. Dabei hat sich ein 3. Experiment erübrigt.)

Abszissenachse: Konzentration von tertiärem Butylhydroperoxid in mM

Ordinatenachse: Lebende Zellen in (Prozent der Kontrolle)

Erste Effekte der toxischen Substanz sind nach 2 h bei 5 mM und 10 mM zu sehen. Die Lebensfähigkeit bei höchster Konzentration liegt bei den transfizierten CaCo-2 Zellen bei 30 %, beim Wildtyp bei 51 %. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen.

Nach 8 h Inkubation mit t-BuOOH sind bei 0,625 mM und 1,25 mM Effekte zu sehen. Die Lebensfähigkeit bei höchster Konzentration liegt bei den transfizierten CaCo-2 Zellen und dem Wildtyp bei 49 %. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen

Nach 24 h Inkubation zeichnen sich Effekte bei 0,312 mM und 0,625 mM ab Die Lebensfähigkeit bei höchster Konzentration liegt bei den transfizierten CaCo-2 Zellen bei 8% und dem Wildtyp bei 4 %. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen.

## 5. Diskussion

Die Aldo-Keto-Reduktase 1B10 (AKR1B10) ist Mitglied einer Proteinfamilie, die zur Superfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen gehört. Die Unterfamilie (AKR1B) ist durch eine Sequenzidentität der einzelnen Mitglieder von über 60% gekennzeichnet ([WWW.MED.UPENN.EDU/AKR/NOMENCLATURE/HTML](http://WWW.MED.UPENN.EDU/AKR/NOMENCLATURE/HTML)).

Die Aldo-Keto-Reduktase 1B10 reduziert bevorzugt Aldehyde und Ketone zu wasserlöslichen Komponenten. Eine Reduktion zu OH-Gruppen oder SH-Gruppen erhöht die Wasserlöslichkeit der Verbindungen. Der entstehende Alkohol ist einfacher zu konjugieren und beschleunigt eine Eliminierung über die Niere. Hier stellen Hormone, Prostaglandine, Lipidderivate, Xenobiotika neben all-trans Retinalen als physiologische Substrate ein ausgedehntes und überlappendes Substratspektrum (PENNING et al. 2007).

Die AKR1B10 wird vornehmlich in Dünndarm und Kolon exprimiert. Daher stammt der Name intestine-like aldose reductase. Geringe Mengen RNA lassen sich in der Leber nachweisen (CAO et al. 1997). Das Expressionsmuster und ihre Vorliebe für bestimmte Substrate verleihen der AKR1B10 eine Entgiftungsfunktion (CAO et al. 1997).

Das Ziel des Experiments bestand darin, die AKR1B10 neben ihrer Funktion als Retinalreduktase auf Eigenschaften als entgiftendes fremdstoffmetabolisierendes Enzym zu überprüfen. Dazu wurde die cDNA der AKR1B10 mittels PCR-Verfahren vervielfältigt, in einen geeigneten Vektor kloniert, in Bakterienzellen transformiert, vervielfältigt und aufgereinigt. Um das cDNA-Insert komplikationslos in das Plasmid pCI-neo Mammalian Expression Vector zu ligieren, wurde dieser mit Restriktionsenzymen geschnitten. Die Einfügung des Inserts in den Vektor verlief erfolgreich. Nachfolgend konnte das rekombinante Plasmid in Bakterienzellen vermehrt und aufgrund seiner Gene für Antibiotikaresistenzen selektioniert werden. Ein  $\beta$ -Lactamase-Resistenzgen und die damit



verbundene Ampicillinresistenz dienen der Selektion transformierter Bakterien während das neo-Gen für Neomycin-Phosphotransferasen kodiert und der Selektion stabil transfizierter Zellen durch G418 (Aminoglykosid: Geneticin) dient.

Um zu gewährleisten, dass die AKR1B10-cDNA korrekt in das Plasmid ligiert wurde, wurde das erhaltene Konstrukt zur Sequenzierung eingeschickt. Der Erhalt eines Konstrukts aus der Sequenz der AKR1B10-cDNA im pCI-neo mammalian Expressionsvektor wurde bestätigt.

Ein weiterer Schritt bestand darin, die Überlebensrate der getesteten Zellen nach der Inkubation mit Lipidperoxidation-auslösenden Substanzen zu bestimmen. Dazu erfolgte die Transfektion des Plasmids in V-79 Hamsterfibroblasten und humane CaCo-2 Zellen mit Nanofectin. DNA und Nanofectin wurden im 1:3 Verhältnis eingesetzt. Die Selektion stabil transfizierter Zellen war erfolgreich.

Cumolhydroperoxid und tertiäres Butylhydroperoxid wurden in den transfizierten und un-transfizierten Zellen über die Messung der Aktivität mitochondrialer Reduktasen auf ihr zytotoxisches Potential hin untersucht. Erfasst wurde die Umsetzung von MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenoltetrazoliumbromid), einem Tetrazoliumsalz, zu Formazan-Kristallen in blau-violetter Farbe. Zur Bestimmung der Menge vitaler Zellen wurde das nicht wasserlösliche Formazan in Dimethylsulfoxid gelöst und seine Konzentration photometrisch gemessen. Die Aktivitätsbestimmung der mitochondrialen Reduktasen verlief erfolgreich.

Die erwähnten Peroxide wurden in toxischer Konzentration von 0,078 mM -10 mM für die Dauer von 1 h, 2 h, 4 h, 8 h bzw. 24 h zu den Zellen gegeben. Die transfizierten V-79 Fibroblasten zeigten sowohl nach der Inkubation mit CHP als auch mit t-BuOOH unter Beachtung der Streuung der Meßwerte im Vergleich zur un-transfizierten Zelllinie keine

deutlich veränderte Lebensfähigkeit. Überraschenderweise zeigte sich sogar eine verringerte Lebensfähigkeit der transfizierten Zellen.

Einige wichtige Kriterien zur Beurteilung der Validität der Konzentrations-Wirkungs-Kurven zeigen die sigmoidale Kurvenform und die Ermittlung des EC<sub>50</sub>-Wertes (Effective Concentration). Hier wird zur Bestimmung des EC<sub>50</sub>-Wertes der Wendepunkt der sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Kurve verwendet. Er entspricht der Peroxidkonzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet werden kann. In diesem Fall ist das die Peroxidkonzentration, die eine Verringerung der Überlebensrate um 50 % gegenüber dem un-transfizierten Wildtyp bewirkt.

Ergeben die Messwerte eine verschobene Kurve, gekennzeichnet durch einen nach rechts verlagerten Wendepunkt, weist dies auf einen höheren EC<sub>50</sub>-Wert. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven zeigten in V-79 Fibroblasten keinen sigmoidalen Verlauf, ein EC<sub>50</sub>-Wert konnte folglich nicht bestimmt werden.

Die humanen CaCo-2 Zellen zeigten eine heterogene Reaktion auf die toxischen Substanzen. Wurde tertiäres Butylhydroperoxid als Substrat eingesetzt, zeigte sich kein deutlicher Unterschied zu un-transfizierten Zellen. Ein EC<sub>50</sub>-Wert ließ sich aufgrund fehlender sigmoidaler Kurve nicht ermitteln.

Besonders auffällig ist der sigmoidale Kurvenverlauf bei der Inkubation von Cumolhydroperoxid in CaCo-2 Wildtypzellen nach 2 h. Der EC<sub>50</sub>-Wert liegt bei 1,9 mM. Vergleichend zu C6-Gliomzellen (EC<sub>50</sub>-Wert von 59 +/-9 µM) sind die CaCo-2 Zellen resistenter gegenüber dem Peroxid (LINDEN et al. 2008).

Die Lebensfähigkeit von transfizierten humanen kolorektalen Tumorzellen nach Inkubation mit Cumolhydroperoxid war überraschenderweise sehr gering im Vergleich zu un-transfizierten Zellen: Nach 8 h überlebten bei einer Konzentration von 1,25 mM 56

% der Wildtypzellen, aber nur 3 % der transfizierten Zellen. Bei geringeren Konzentrationen wurden ähnliche Werte gemessen, allerdings war bei einer Konzentration von 0,156 mM der Abfall der Lebensfähigkeit weniger drastisch.

Bei einer Konzentration von 0,156 mM und einer Inkubationsdauer von 24 h wurde ebenfalls ein offensichtlicher Unterschied zu un-transfizierten Zellen gemessen. In diesem Fall waren die transfizierten CaCo-2 Zellen resistenter gegen die toxische Substanz als die Wildtypzellen. Vermutlich besteht ein Unterschied bei der Behandlung von CaCo-2 Zellen mit Cumolhydroperoxid für 8 h und 24 h, dennoch kann sich der Unterschied zwischen dem transfizierten und dem un-transfizierten Zelltyp aus der geringen Versuchsanzahl ( $n=2$ ) ergeben. Zur Absicherung sind weitere Experimente nötig.

Allgemein wirkt Cumolhydroperoxid stärker toxisch als tertiäres Butylhydroperoxid. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von LINDEN et al. (2008): nach 2 h induzierten Cumolhydroperoxid und tertiäres Butylhydroperoxid Zelltod mit  $EC_{50}$ -Werten von  $59 \pm 9 \mu\text{M}$  und  $290 \pm 30 \mu\text{M}$ .

Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche wurde beobachtet, dass beide transfizierten Zelllinien keine hohen Konzentrationen an Cumolhydroperoxid und tertiärem-Butylhydroperoxid tolerieren. Mit diesem Versuchsaufbau ist keine Schutzwirkung durch AKR1B10 erzielt worden.

Es stellt sich die Frage, ob dieses System zur Beantwortung der Hypothese geeignet ist. Die einfache und klare Struktur dieses Experiments ist für die Testung von Zellen gut geeignet. Mit dem MTT-Verfahren lässt sich die Überlebensfähigkeit von Zellen relativ schnell messen und über vitale Mitochondrienaktivität gut erfassen. Der Testaufbau ist unter anderem angelehnt an die Herangehensweise von YANG et al. (2003) und ZHONG et al. (2009), die damit Erfolg erzielten. Ebenso besteht ein klarer Vorteil darin, dass hier

kein reines in-vitro Experiment vorliegt. Es lässt sich schlussfolgern, dass dieses System zur Beantwortung der Hypothese gut geeignet ist.

Einen anderen Experimentaufbau zeigt Zu et al. 2007. Gemessen wurden die Wachstumsrate und die Zahl der Klone im Softagar nach Inkubation mit Acrolein bei einer mit AKR1B10 transfizierten humanen Nierenzelllinie (293T). Acrolein ist ein  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigter Aldehyd, der endogen während Lipidperoxidation und bei unvollständiger Verbrennung von Holz, Benzin und Tabak entsteht.

Acrolein ist sehr elektrophil und besitzt hohes Reaktionspotential gegenüber Aminosäuren, Proteinen und DNA (Kehrer et al. 2000). In den transfizierten Zellen zeigte sich bei 5  $\mu$ M Acrolein gesteigertes Wachstum in Kulturen gegenüber nicht-transfizierten Zellen und 3-facher Anstieg der Anzahl von Klonen im Softagar. Zusätzlich wurde bei 50  $\mu$ M Acrolein im Vergleich zu den-Kontrollzellen ein um die Hälfte verringerter Anstieg von LDH (Lactatdehydrogenase) verzeichnet. Im Gegensatz zu den transfizierten CaCo-2 Zellen und V-79 Zellen zeigte die transfizierte humane Nierenzelllinie (293T) deutliche Unterschiede der Überlebensrate (Zu et al. 2007). Ähnliche Ergebnisse werden in einer AKR1B10-transfizierten humanen embryonalen Nierenzelllinie durch ZHONG et al. (2009) mit 4-HNE beschrieben ( $K_m = 30,9 \pm 7,1 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat} = 120,7 \pm 6,5 \text{ min}^{-1}$ ). Wie lassen sich die Ergebnisse mit CHP und t-BuOOH in CaCo-2 Zellen und V-79 Zellen vor dem Hintergrund erklären, dass andere Arbeitsgruppen gegenteilige Ergebnisse vorweisen? Ein grundsätzlicher Nachteil ergibt sich durch die verschiedenen Konditionen in der Zellkultur.

Aufgrund der nicht-protektiven Eigenschaften der AKR1B10 in CaCo-2 Zellen und V-79 Zellen entsteht die Frage, ob gegebenenfalls zu wenig Carbonylverbindungen bei der Inkubation mit CHP und t-BuOOH entstanden sind, als dass sie vom Enzym umgesetzt werden konnten.

LINDEN et al. (2008) zeigten aber, dass Cumolhydroperoxid und tertiäres Butylhydroperoxid in C6-Gliomazellen oxidativen Stress erzeugen. Ein Anstieg der Werte von Thiobarbitursäure, Malondialdehyd und Hexanal bei 10-50  $\mu\text{M}$  Cumolhydroperoxid bestätigten dies. Ebenso wurden Lipidperoxidationsprodukte wie Thiobarbitursäure und Malondialdehyd bei 100  $\mu\text{M}$  t-BuOOH gemessen. Überraschenderweise löste Wasserstoffperoxid keine Lipidperoxidation aus. Möglicherweise ist die Transfektion in diesen Zelllinien zu hinterfragen.

CaCo-2 Wildtyp Zellen zeigen geringe Mengen von AKR1B10 auf mRNA-, aber nicht auf Proteinebene. In V-79 Wildtyp-Zellen gibt es das Gen nicht, dafür exprimieren sie das orthologe Enzym AKR1B9. Die CHO-Reduktase wird in dem Chinesischen Hamster gebildet und weist über 60% Sequenzidentität mit AKR1B10 auf. AKR1B9 reduziert wie die AKR1B10 Glycerinaldehyd ( $k_{\text{cat}} = 36 \pm 1 \text{ min}^{-1}$ ) (RUIZ et al. 2009). Eventuell setzt die AKR1B9 auch einige Peroxid-Folgeprodukte um, so dass die Transfektion der AKR1B10 für V-79 Zellen nicht geeignet ist.

Aufgrund dieser Erkenntnisse sind weitere Experimente mit dem Enzym AKR1B10 nötig. Zunächst könnten erwiesene Substrate der AKR1B10 4-HNE und 4-ONE in AKR1B10-transfizierten CaCo-2 Zellen und V-79 Zellen ausgetestet werden. Die zytosolische AKR1B10 katalysiert die Reduktion von 4-HNE ( $K_m = 0,3 \text{ mM}$ ,  $k_{\text{cat}} = 43 \text{ min}^{-1}$ ) mit hoher Effizienz (MARTIN & MASER 2009). Allerdings sind 4-HNE und 4-ONE relativ instabile Substanzen. Eine Testung von Acrolein in AKR1B10-transfizierten V-79 Zellen und in CaCo-2 Zellen ist ebenfalls eine mögliche Variante. Ebenso ist es auch denkbar, die toxischen Substanzen CHP und t-BuOOH in einer mit AKR1B10-transfizierten humanen Nierenzelllinie (T293) auszuprobieren. Insgesamt ist es in zukünftigen Versuchen nötig, die qualitative und quantitative Proteinbildung der Aldo-Keto Reduktase 1B10 nach

stabiler Transfektion in Zelllinien zu ermitteln. Mehrere Forschungsergebnisse zur Untersuchung der Schutzfunktion des Enzyms AKR1B10 bei oxidativem Stress sind vielversprechend (ZU et al. 2007; MARTIN & MASER 2009; ZHONG et al. 2009). Grundsätzlich sind die unterschiedlichen Konditionen in Zellkultur-Laboren hierbei jedoch nicht außer Acht zu lassen. Auch wenn die Versuche in vitro und in vivo den gewünschten Erfolg zeigten, bleibt es offen, ob sich diese Ergebnisse auch auf den ganzen Organismus übertragen lassen.

## 6. Zusammenfassung

In einem in-vitro Modell wurden die Auswirkungen von Peroxiden vorgestellt, die oxidativen Stress in Form einer Prooxidantien/Antioxidantien-Verschiebung auslösen und zu Schäden führen können. Untersucht wurde das potentiell antioxidativ-wirkende Enzym AKR1B10, welches zur Proteinfamilie der Aldo-Keto Reduktasen gehört. Im menschlichen Körper wird die Aldo-Keto Reduktase 1B10 vor allem in Dünndarm und Kolon gebildet. Auffällig ist die starke Sequenzhomologie zur Aldose-Reduktase AKR1B1, welche zudem ähnliche Substrate umsetzt. Aldehyde und Ketone wie z.B.

Steroidhormone, Lipidaldehyde, Prostaglandine und Retinale, sowie Xenobiotika umfasst das breite Spektrum ihrer Substrate. Die menschliche AKR1B10 reduziert hauptsächlich all-trans-Retinaldehyd. Dies ist z.B. im Zusammenhang mit der Synthese von Retinsäure von Relevanz. Eine Verringerung von Retinsäure und nachfolgend ein Verlust von Tumordifferenzierung durch die Aktivität der AKR1B10 stehen möglicherweise in kausalem Zusammenhang. Durch ihre breite Substratspezifität kann sie auch eine Rolle im Fremdstoffmetabolismus als Phase-I Enzym übernehmen.

Ihre Schutzfunktion vor oxidativem Stress basiert auf der Reduktion von instabilen Lipidperoxiden-Folgeprodukten wie 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE), 4-Oxo-2-nonenal (4-ONE) und Acrolein zu weniger reaktiven Metaboliten.

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der menschlichen Aldo-Keto Reduktase AKR1B10 auf ihre Funktion als Schutzfaktor vor oxidativen Stress ausgelöst durch Cumolhydroperoxid und tertiäres Butylhydroperoxid. Hierfür wurde das Gen der AKR1B10 in den pCI-neo Expressionsvektor kloniert, um mit diesem eukaryotische Zellen zu transfizieren (CaCo-2 Zellen und V79-Fibroblasten). Die AKR1B10-überexprimierenden Zellen wurden mit den organischen Peroxiden Cumolhydroperoxid und tertiärem

Butylhydroperoxid inkubiert und ihre Überlebensrate im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen gemessen.

Über Mitochondrienaktivität in CaCo-2 Zellen und V79-Fibroblasten gelang mittels MTT-Assay die Ermittlung der Lebensfähigkeit. Die Wirkung der genannten organischen Peroxide in eukaryotischen Zellen wurde anschließend mit den Ergebnissen der Literatur verglichen.

Für die benutzten Konzentrationen beider Substanzen wurde in beiden Zelltypen keine deutlich veränderte Lebensrate der AKR1B10-transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle bestimmt. Die analysierten Ergebnisse konnten die für Acrolein gezeigte Schutzwirkung gegenüber Peroxid-induziertem oxidativen Stress nicht bestätigen.



## 7. Literaturreferenz

**Bellomo, G.,** Jewell, S. A., Thor, H., Orrenius, S.(1982): Regulation of intracellular calcium compartmentation: studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide.

Proc Natl Acad Sci U S A. 79 (22), 6842-6

**Bellomo, G.,** Thor, H., Orrenius, S.(1984a): Increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration during t-butyl hydroperoxide metabolism by isolated hepatocytes involves NADPH oxidation and mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. FEBS LETT. 168 (1), 38-42

**Birnboim, H. C., Doly, J.** (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res, 7 (6), 1513-23

**Blaner, W. S., Olson, J. A.** (1994): Retinol and retinoic acid metabolism. In Sporn, M.B., Roberts, A. B., Goodman, D.S.: Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine. Raven Press, New York, NY, pp. 229–255

**Breton, J.,** Gage, M. C., Hay, A. W., Keen, J. N., Wild, C .P., Donnellan, C., Findlay, J. B., Hardie, L. J. (2008). Proteomic screening of a cell line model of esophageal carcinogenesis identifies cathepsin D and aldo-keto reductase 1C2 and 1B10 dysregulation in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. J Proteome Res, 7 (5), 1953-62

**Burczynski, M. E.,** Sridhar, G. R., Palackal, N. T., Penning, T. M. (2001): The reactive oxygen species and Michael acceptor-inducible human aldo-keto reductase AKR1C1 reduces the alpha, beta-unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal to 1, 4-dihydroxy-2-nonene. J Biol Chem; 276 (4), 2890-7

**Cao D.,** Fan, S. T., Chung, S. S. (1998): Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. J Biol Chem, 273 (19), 11429-35

**Chance, B.,** Sies, H., Boveris, A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.

Physiol Rev., 59(3), 527-605

**Chaudière, J., Ferrari-Iliou, R.** (1999): Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanism. Food Chem. Toxicol., 37 (9-10), 949-62. Review

**Crosas, B.,** Hyndman, D.J., Gallego, O., Martras, S., Parés, X., Flynn, T.G., Farrés, J. (2003): Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. Biochem J, 373 (Pt 3), 973-9

**Dröge, W.** (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev, 82 (1), 47-95

**Endo, S.,** Matsunaga, T., Mamiya, H., Ohta, C., Soda, M., Kitade, Y., Tajima, K., Zhao, H. T., El-Kabbani, O., Hara, A. (2009): Kinetic studies of AKR1B10, human aldose reductase-like protein: endogenous substrates and inhibition by steroids. Arch Biochem Biophys, 487 (1), 1-9

**Esterbauer, H.,** Schauer, R. J., Zollner, H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic. Biol. Med, 11, 81-128

**Esterbauer, H.** (1993): Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products.

Am J Clin Nutr, 57 (5 Suppl), 779S-785S; discussion 785S-786S

**Fang, Y.Z.,** Yang, S., Wu, G. (2002): Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition, (10), 872-9

**Filling, C.,** Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jörnvall, H., Oppermann, U. (2002): Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/ reductases. J Biol Chem, 277 (28), 25677-84

**Fukumoto, S.,** Yamauchi, N., Moriguchi, H., Hippo, Y., Watanabe, A., Shibahara, J., Taniguchi, H., Ishikawa, S., Ito, H., Yamamoto, S., Iwanari, H., Hironaka, M., Ishikawa, Y., Niki, T., Sohara, Y., Kodama, T., Nishimura, M., Fukayama, M., Dosaka-Akita, H., Aburatani,

H. (2005): Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res*, 11 (5), 1776-85

**Gallego, O.**, Ruiz, F. X., Ardèvol, A., Domínguez, M., Alvarez, R., de Lera, A. R., Rovira, C., Farrés, J., Fita, I., Parés, X. (2007): Structural basis for the high *all-trans*-retinaldehyde reductase activity of the tumor marker AKR1B10. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (52), 20764–20769

**Girotti, A. W.** (1998): Lipidhydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res*, 39 (8), 1529-42

**Gogvadze, V. G.**, Zhukova, A. A. (1991): The role of lipid peroxidation products in cumene hydroperoxide-induced Ca<sup>2+</sup> efflux from mitochondria. *FEBS Lett.* 287(1-2), 139-41

**Halliwell, B.** (1996): Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res.*, 25, 57-74

**Helinski, D. R.**, Cohen, S. N., Tomoeda, M.(1973): Bacterial Plasmids. *Science*. 1973 Aug 3;181(4098):471-472

**Hino, Y.**, Ishio, S., Minakami, S.(1987): Glucose-6-phosphate oxidation pathway in rat-liver microsomal vesicles. Stimulation under oxidative stress. *Eur J Biochem.* 165 (1), 195-9

**Hyndmann, D. J., Flynn, T. G.** (1998): Sequence and expression levels in human tissues of a new member of the aldo-keto reductase family. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1399, 198-20

**Hyndman, D.**, Bauman, D. R., Heredia, V. V., Penning, T. M. (2003): The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem Biol Interact*, 143-144, 621-31

**Jez, J. M.**, Flynn, T. G., Penning, T. M. (1997): A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem Pharmacol*, 54 (6), 639-47

**Jin, Y., Penning, T.M. (2007):** Aldo-keto reductases and bioactivation/ detoxication.

*Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 263-92

**Kehrer, J. P., Biswal, S. S. (2001):** The molecular effects of acrolein. *Toxicol. Sci*, 57, 6–15

**Le, C. T., Hollaar, L., Van der Valk, E. J., Van der Laarse, A. (1994):** Desferrioxamine protects myocytes against peroxide-induced myocyte damage without affecting glutathione redox cycle turnover. *Journal Mol. Cell. Cardiol.*, 26, 877-87

**Lee, K. W., Ko, B. C., Jiang, Z., Cao, D., Chung, S. S. (2001):** Overexpression of aldose reductase in liver cancers may contribute to drug resistance. *Anticancer Drugs*, 12, 129–132

**Li, D., Hinshelwood, A., Gardner, R., McGarvie, G., Ellis, E. M. (2006):** Mouse aldo-keto reductase AKR7A5 protects V79 cells against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis. *Toxicology*, 226 (2-3), 172-80

**Linden, A., Gülden, M., Martin, H. J., Maser, E., Seibert, H. (2008):** Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells. *Toxicol In Vitro*, 22 (5), 1371-6

**Löffler, G. (2003):** Basiswissen Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag

**Loeffler-Ragg, J., Mueller, D., Gamerith, G., Auer, T., Skvortsov, S., Sarg, B., Skvortsova, I., Schmitz, K. J., Martin, H. J., Krugmann, J., Alakus, H., Maser, E., Menzel, J., Hilbe, W., Lindner, H., Schmid, K. W., Zwierzina, H. (2009):** Proteomic identification of aldo-keto reductase AKR1B10 induction after treatment of colorectal cancer cells with the proteasome inhibitor bortezomib. *Mol Cancer Ther*, 8 (7), 1995-2006

**Martin, H. J., Maser, E. (2009):** Role of the human Aldo-Keto Reductase AKR1B10 in the protection against toxic aldehydes. *Chemico-Biological Interactions*, 178, 145–150

**Martin, H. J.**, Breyer-Pfaff, U., Wsol, V., Venz, S., Block, S., Maser, E. (2006): Purification and characterization of akr1b10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug Metab Dispos*, 34 (3), 464-70

**Mosmann, T.** (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.

**Mülhardt, C.** (2006): *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. 5. Auflage. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag München

**Oppermann, U.**, Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., Jörnvall, H. (2003): Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact*, 143-144, 247-53

**Oppermann, U.** (2007): Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 293-322

**Penning, T. M.** (2005): AKR1B10: a new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers. *Clin Cancer Res*, 11 (5), 1687-90

**Persoon-Rothert, M.**, Egas-Kenniphaas, J. M., van der Valk-Kokshoorn, E. J., van der Laarse, A. (1992): Cumene hydroperoxide induced changes in calcium homeostasis in cultured neonatal rat heart cells. *Cardiovasc Res.*, 26, 706-12

**Ruiz, F. X.**, Gallego, O., Ardèvol, A., Moro, A., Domínguez, M., Alvarez, S., Alvarez, R., de Lera, A. R., Rovira, C., Fita, I., Parés, X., Farrés, J. (2009): Aldo-keto reductases from the AKR1B subfamily: retinoid specificity and control of cellular retinoic acid levels. *Chem Biol Interact*, 178 (1-3), 171-7.

**Schrimpf, G.** (2002) *Gentechn.Methoden: Bestimmung der Geneticin-Toleranzdosis*, 3. Auflage, Spektrum Verlag Heidelberg

**Schmitzt, S.** (2007): Der Experimentator: Zellkultur. 1. Auflage. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag München

**Sies, H.** (1997): Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Academic Press, London; XV-XXII

**Spatz, L.,** Bloom, A. D.(1992): Biological Consequences of Oxidative Stress: Implications for Cardiovascular Disease and Carcinogenesis. Oxford University Press, Oxford

**Tribble, D. L.,** Aw, T. Y., Jones, D. P. (1987): The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. Hepatology. 7 (2), 377-86

**Valko, M.,** Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol, 39 (1), 44-84

**Wang, C.,** Yan, R., Luo, D., Watabe, K., Liao, D. F., Cao, D. (2009): Aldo-keto reductase family 1 member B10 promotes cell survival by regulating lipid synthesis and eliminating carbonyls. J Biol Chem, 284, 26742-8

**[www.med.upenn.edu/akr/nomenclature/html](http://www.med.upenn.edu/akr/nomenclature/html)**

**[www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)**

**Yan R,** Zu X, Ma J, Liu Z, Adeyanju M, Cao D. (2007): Aldo-keto reductase family 1 B10 gene silencing results in growth inhibition of colorectal cancer cells: Implication for cancer intervention.. Int J Cancer. 121, 2301-6.

**Yang, X. D.,** Tang, D. N., Wang, J., Cao, D. (2003): Screening of the drug resistance-associated gene in HepG2 cell line transfected with aldose reductase like gene-1 (ARL-1). Ai Zheng, 22, 1289-95

**Yoshitake, H.**, Takahashi, M., Ishikawa, H., Nojima, M., Iwanari, H., Watanabe, A., Aburatani, H., Yoshida, K., Ishi, K., Takamori, K., Ogawa, H., Hamakubo, T., Kodama, T., Araki, Y. (2007): Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 17 (6), 1300-6

**Zarkovic, K.** (2003): 4-Hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol. Aspects Med*, 24, 293–303

**Zhong, L.**, Liu, Z., Yan, R., Johnson, S., Zhao, Y., Fang, X., Cao, D. (2009): Aldo-keto reductase family 1 B10 protein detoxifies dietary and lipid-derived alpha, beta-unsaturated carbonyls at physiological levels. *Biochemical Biophys. Res. Commun.*, 387, 245-50

**Zu, X.**, Yan, R., Robbins, S., Krishack, P. A., Liao, D. F., Cao, D. (2007): Reduced 293T cell susceptibility to acrolein due to aldose reductase-like-1 protein expression. *Toxicol Sci*, 97 (2), 562-8

**Zu, X.**, Yan, R., Ma, J., Liao, D. F., Cao, D. (2009) AKR1B10: A potential target for cancer therapy. *Bioscience Hypotheses*, 2, Issue 1, 31-33

## 8. Anhang

	-10	0	10	20	30	40	50	60	70	80
<b>akr1b10_NM_020299.3</b>	-----	ATGG	CCACGTTTGTGG	AGCTCAGTACCAAAGCCAAGATGCCCATTTGTGGGCCTGGGCAC	TTGGAAGTCTCCTCTTGGCAAAGTGAAA					
		M	A T F V	E L S T K A K M P I V G L G T W K S P L G K V K						
<b>1B10_pCIneo_73</b>	NTAGCCTCGAG	...	A	.....	N.N-	.....	C	.....	N	.....
<b>1B10_pCIneo_83</b>	CTAGCCTCGAG	...	-	.....	G	.....				
<b>1B10_pCIneo_93</b>	CTAGCCTCGAG	...	-	.....	-	.....				
<b>1B10_pCIneo_13</b>	CTAGCCTCGAG	...	-	.....	-	.....				
<b>1B10_pCIneo75</b>	-----	C	NNNN	NNT	.....	-				
<b>1B10_pCIneo85</b>	-----	CNNTGG	.....	-						
<b>1B10_pCIneo95</b>	-----	CNNNGGN	.....	-						
<b>1B10_pCIneo105</b>	-----	CNNNNGGCA	.....	-						





190 200 210 220 230 240 250 260 270 280

|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...

akr1b10\_NM\_020299.3 TCCAAGAGAAGGCTGTGAAGCGGGAGGACCTGTTTCATCGTCAGCAAGTTGTGGCCCACTTCTTTGAGAGACCCCTTGTGAGGAAAGCCTTTGAGAAGAC

I Q E K A V K R E D L F I V S K L W P T F F E R P L V R K A F E K T

1B10\_pCIneo\_73

.....

1B10\_pCIneo\_83

.....

1B10\_pCIneo\_93

.....

1B10\_pCIneo\_13

.....

1B10\_pCIneo75

.....

1B10\_pCIneo85

.....

1B10\_pCIneo95

.....

1B10\_pCIneo105

.....

290 300 310 320 330 340 350 360 370 380

|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...

akr1b10\_NM\_020299.3 CCTCAAGGACCTGAAGCTGAGCTATCTGGACGTCTATCTTATTCACCTGGCCACAGGGATTCAAGTCTGGGGATGACCTTTTCCCCAAAGATGATAAAGGT

L K D L K L S Y L D V Y L I H W P Q G F K S G D D L F P K D D K G

1B10\_pCIneo\_73 .....T.....

1B10\_pCIneo\_83 .....T.....

1B10\_pCIneo\_93 .....T.....

1B10\_pCIneo\_13 .....T.....

1B10\_pCIneo75 .....T.....

1B10\_pCIneo85 .....T.....

1B10\_pCIneo95 .....T.....

1B10\_pCIneo105 .....T.....

390 400 410 420 430 440 450 460 470 480

|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...

**akr1b10\_NM\_020299.3** AATGCCATCGGTGGAAAAGCAACGTTCTTGGATGCCTGGGAGGCCATGGAGGAGCTGGTGGATGAGGGGCTGGTGAAAGCCCTTGGGGTCTCCAATTCA

N A I G G K A T F L D A W E A M E E L V D E G L V K A L G V S N F

1B10\_pCIneo\_73

.....

1B10\_pCIneo\_83

.....

1B10\_pCIneo\_93

.....

1B10\_pCIneo\_13

.....

1B10\_pCIneo75

.....

1B10\_pCIneo85

.....

1B10\_pCIneo95

.....

1B10\_pCIneo105

.....

490 500 510 520 530 540 550 560 570 580

|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...

**akr1b10\_NM\_020299.3** GCCACTTCCAGATCGAGAAGCTCTTGAACAAACCTGGACTGAAATATAAACCCAGTGACTAACCCAGGTGAGTGTACCCATACCTCACACAGGAGAACT

S H F Q I E K L L N K P G L K Y K P V T N Q V E C H P Y L T Q E K L

1B10\_pCIneo\_73

.....

1B10\_pCIneo\_83

.....

1B10\_pCIneo\_93

.....

1B10\_pCIneo\_13

.....

1B10\_pCIneo75

.....

1B10\_pCIneo85

.....

1B10\_pCIneo95

.....

1B10\_pCIneo105

.....



690 700 710 720 730 740 750 760 770 780

|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...

**akr1b10\_NM\_020299.3** GAGGATCCCAAGATTAAAGGAGATTGCTGCAAAGCACAAAAAACCGCAGCCCAGGTTCTGATCCGTTCCATATCCAGAGGAATGTGATTGTCATCCCCA

E D P K I K E I A A K H K K T A A Q V L I R F H I Q R N V I V I P

1B10\_pCIneo\_73

.....

1B10\_pCIneo\_83

.....

1B10\_pCIneo\_93

.....

1B10\_pCIneo\_13

.....

1B10\_pCIneo75

.....

1B10\_pCIneo85

.....

1B10\_pCIneo95

.....

1B10\_pCIneo105

.....

790 800 810 820 830 840 850 860 870 880

|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...

akr1b10\_NM\_020299.3 AGTCTGTGACACCAGCACGCATTGTTGAGAACAATTCAGGTCTTTGACTTTAAATTGAGTGATGAGGAGATGGCAACCATACTCAGCTTCAACAGAAACTG

K S V T P A R I V E N I Q V F D F K L S D E E M A T I L S F N R N W

1B10\_pCIneo\_73

.....

1B10\_pCIneo\_83

.....

1B10\_pCIneo\_93

.....

1B10\_pCIneo\_13

.....

1B10\_pCIneo75

.....

1B10\_pCIneo85

.....

1B10\_pCIneo95

.....

1B10\_pCIneo105

.....



890 900 910 920 930 940 950 960

|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...

akr1b10\_NM\_020299.3 GAGGGCCTGTAACTGTGCAATCCCTCTCATTGGAAGACTATCCCTTCGATGCAGAAATATGA-----

R A C N V L Q S S H L E D Y P F D A E Y \*

1B10\_pCIneo\_73 .....CCCGGG

1B10\_pCIneo\_83 .....CCCGGG

1B10\_pCIneo\_93 .....CCCGGG

1B10\_pCIneo\_13 .....CCCGG-

1B10\_pCIneo75 .....CCCGGG

1B10\_pCIneo85 .....CCCGGG

1B10\_pCIneo95 .....CCCGGG

1B10\_pCIneo105 .....CCCGGG

**Abbildung 14 - Ergebnis der Sequenzierung von vier Plasmidpräparationen des Vektors pCI-neo mit einklonierter AKR1B10**

Die AKR1B10 mRNA-Sequenz (NCBI Reference Sequence: NM\_020299.3) steht im Alignment an erster Position, darunter die daraus übersetzte Proteinsequenz. Positionen identischer Nucleotide zur ersten Sequenz sind durch einen Punkt dargestellt. An Position 371 im Alignment (Position 369 der mRNA-Sequenz) findet sich ein C →T Austausch gegenüber der hinterlegten Sequenz in der Datenbank, der aber keine Auswirkungen auf die Proteinsequenz hat. Danksagung

## 9. Lebenslauf

Elvira Bueckert

### Persönliche Daten

Geburtsdatum	13. April 1977
Geburtsort	Sotschi
Anschrift	Holtenuerstraße 73 24105 Kiel

### Ausbildung

Dezember 2010 **Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

Abschluss: Staatsexamen

### Promotion

Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel

Professor Dr. Maser

Einfluss der humanen Aldo-Keto-Reduktase AKR1B10 auf die Überlebensfähigkeit

Peroxidbehandelter CaCo-2- und V79-Zellen

Voraussichtlicher Abschluss: Sommer 2011

2009 – 2010 **Praktisches Jahr:**

1. Terial: Chirurgie, Universitätsklinikum Kiel
2. Terial: Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus Kiel
3. Terial: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Carmel Hospital Haifa, Israel

2004 – 2010 **Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

Erwerb des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung (Physikum)

Weiterführung des Klinischen Studiums der Humanmedizin

2002 – 2004 **Berufliche Schule am Schützenpark in Kiel**

Abschluss: Abitur

## 10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Professor Dr. Maser danke ich für die ausgezeichnete Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Martin für die Überlassung des interessanten Themas. Ich danke für seine geduldige und hilfreiche Unterstützung beim Erstellen der Arbeit in angenehmer Atmosphäre.

Weiteren Dank schulde ich Frau Dr. Bettina Ebert und Sabine Seibert für Ihre sachlichen Hinweise und Ratschläge im Labor.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Michael Kisiela und Sigrid Ulrich für Ihre Hilfsbereitschaft und wertvollen Denkanstöße bedanken.

Claudia Gehring danke ich für das Korrekturlesen. Ebenso danke ich Eyal Meir für seine Hilfsbereitschaft beim Layout der Arbeit.