

Einsatz der cDNA-Array-Technologie zur Identifizierung Zink-sensitiver Gene *in vitro*

Birgit Kindermann, Hannelore Daniel, Michael Pfaffl* und Frank Döring

Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie, Technische Universität München und

*Lehrstuhl für Physiologie, Technische Universität München, D-85350 Freising-Weihenstephan

Einleitung

Zink ist ein essentielles Spurenelement, das als integraler Bestandteil von Proteinen vielfältige biochemische Funktionen im Intermediär-, Nucleinsäure- und Hormonstoffwechsel sowie in der Immunabwehr hat. Trotz zahlreicher - vorwiegend tier-experimenteller - Studien ist eine sichere Beurteilung des Zinkversorgungsstatus *in-vivo* kaum möglich, da spezifische, sensitive und verlässliche Indikatoren hierfür bislang fehlen [1,2]. Da Zink als essentieller Cofaktor von Transkriptionsfaktoren in die Genexpression eingreift [3], könnten Zink-sensitive Gene als Biomarker zur Beurteilung des Versorgungsstatus dienen. Wir nutzten die humane intestinale Epithelzelle HT29 als Reporterzellsystem, um die Auswirkungen einer drastisch veränderten zellulären Zinkkonzentration auf die Genexpression *in vitro* zu untersuchen. Als Screeningverfahren diente die DNA-Array-Technologie, die es ermöglicht, in einem einzigen Experiment die Expression von Tausenden von Genen gleichzeitig zu untersuchen [4, 5].

1

Methoden

Zellkultur

HT29-Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und für 72 h in einem Medium mit erhöhter Zinkkonzentration (10 ppm Zink; Zulage) bzw. einem Medium mit normaler Zinkkonzentration (0,25 ppm Zink; Kontrolle) kultiviert.

Messen der intrazellulären Zinkkonzentration (c(Zn))

HT29-Zellen wurden auf 24-Well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80-90 % wach gelassen. Die Zellen wurden mit dem Zink-sensitiven Farbstoff Newport Green™ DCF Diacetat (Molecular Probes) beladen [6], mit Kontroll- bzw. Zulagemedium versetzt und die Fluoreszenz, die aus der Bindung der intrazellulären freien Zinkionen durch den Farbstoff resultiert, über einen Zeitraum von 48 h gemessen (Fluoroscanner, Labsystems).

RNA-Isolierung, SONDENSYNTHESE, HYBRIDISIERUNG UND AUSWERTUNG DER cDNA-ARRAYS

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde mittels einer modifizierten Phenol-Chloroform-Extraktion lt. Herstellerprotokoll durchgeführt (Clontech). Anschließend erfolgte die Synthese einer ³²P-markierten cDNA-Präparation mit Hilfe genspezifischer Primer gemäß Herstellerprotokoll (Clontech). Nach der Hybridisierung der cDNA-Nylon-Arrays (Atlas™ Human 1.2 Array III, Clontech) mit den radioaktiv markierten cDNA-Sonden wurde ein Phosphorimager-Screen mit den Filtern exponiert und nach 96 h ausgelesen. Zur quantitativen Auswertung wurden die Signalintensitäten der Sonden auf dem Filter (1176) auf die Filter-Gesamtintensität normalisiert. Gene wurden dann als potentiell Zink-abhängig eingestuft, wenn das Verhältnis der Signalintensitäten von Zulage zu Kontrolle in allen Experimenten reproduzierbar > ±1,3 war (n=3).

Northern Blot-Analyse

Gleiche Mengen Gesamt-RNA wurden auf ein 1 %iges Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen (5 µg bzw. 10 µg pro Spur), elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert (Amersham). Die Membranen wurden mit ³²P-markierten Sonden, die unter Verwendung eines random-primed DNA-Labeling-Kits (Amersham) hergestellt wurden, hybridisiert. Nach dem Waschen wurden die Membranen nach Auflegen eines Phosphorimager-Screens ausgelesen.

Real-time RT-PCR

Gesamt-RNA-Proben wurden nach einem Standardprotokoll revers transkribiert und die erhaltenen cDNAs in die real-time PCR eingesetzt. Die Sequenzinformation der genspezifischen Primer für die PCR wurde von Clontech bezogen. Die real-time PCR-Experimente wurden mit einem LightCycler (Roche) unter Verwendung von SYBR-Green (Molecular Probes) als DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt. Die Authentizität der PCR-Produkte wurde durch Schmelzkurvenanalyse und Agarosegelelektrophorese verifiziert.

2

Ergebnisse I

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Zinkkonzentrationen auf HT29-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen für 72 h in zwei verschiedenen Medien kultiviert (Kontrolle: 0,25 ppm Zink; Zulage: 10 ppm Zink). Die experimentellen Bedingungen konnten durch Messen der intrazellulären Zinkkonzentration und durch die Veränderung der Metallothionein-Expression (MT-1) verifiziert werden (Fig. 1/2).

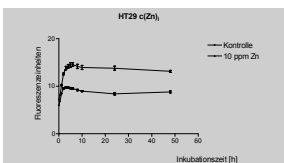


Fig. 1: Änderungen der intrazellulären Zn-Konzentration in HT29-Zellen unter Kultur (Mittelwerte ± SD, n=3)

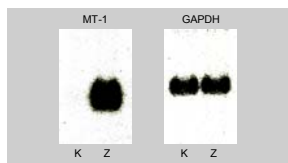


Fig. 2: Northern Blot mit Gesamt-RNA aus HT29 (5 µg/Spur) K = Kontrolle (0,25 ppm Zn), Z = Zulage (10 ppm Zn)

3

Literatur

[1] Pinna, K., Woodhouse, L.R., Sutherland, B., Shames D.M. & King J.C. (2001) J. Nutr. **131**, 2288-2294.
 [2] Cao, J. & Cousins, R.J. (2000) J. Nutr. **130**, 2180-2187.
 [3] MacDonald, R.S. (2000) J. Nutr. **130**, 1500-1508.

Ergebnisse II

Zum Screenen auf Zink-sensitive Gene wurden Arrays genutzt, die mit radioaktiv-markierten cDNAs aus Zellen von Kontroll- und Zulageexperiment hybridisiert wurden (Fig. 3). Die Filter wurden mittels Phosphorimager-Screens ausgelesen. Es konnten 16 Gene identifiziert werden, deren mRNA-Spiegel in HT29-Zellen unter einem erhöhten Zinkangebot verändert sind (Tab. 1). Für ausgewählte Gene konnten die veränderten mRNA-Spiegel mittels Northern Blot-Analyse (Fig. 4) und quantitativer RT-PCR bestätigt werden (Befunde nicht gezeigt). Die so ermittelten Gene sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

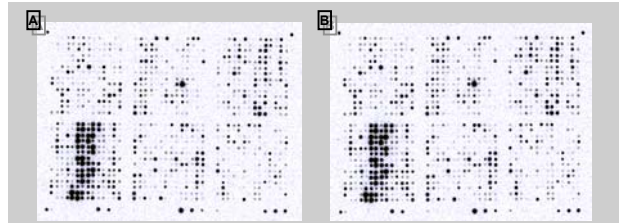


Fig. 3: Ausgewählte cDNA-Arrays (Clontech), hybridisiert mit ³²P-markierten cDNAs aus behandelten HT29-Zellen A: Kontrolle (0,25 ppm Zn), B: Zulage (10 ppm Zn)

Tab. 1: Liste der identifizierten Gene

Genname	GenBank Acc. #	Position	Regulation im Zulageversuch	Funktion
Zinc Finger Protein HSAL2 (Fragment)	X98834	A08h	1,73x	Transkription
Dead Box Protein 3, Y-Chromosomal	AF000985	B02d	3,37x	Transkription
Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein M	L03532	B02g	1,41x	Transkription
Cleavage Stimulation Factor, 64 kD Subunit	M85085	B03a	1,48x	Transkription
Thymoplectin Alpha	L03086	B05i	1,83x	Hormonstoffwechsel
Complement Component C7 Precursor	J03507	B07i	1,50x	Immunsystem
Microfibril-Associated Glycoprotein Precursor	U19718	C02a	1,60x	Matrixprotein
Nuclear Autoantigenic Sperm Protein	M87856	C04b	1,69x	Trafficking
Ferritin Light Chain	M11147	C06a	1,59x	Eisenstoffwechsel
Lamin B Receptor	L25931	E02i	2,04x	Kernlamina
26S Proteasome Regulatory Subunit S14 (P31)	D38047	E13k	1,42x	Proteinabbau
Hypothetical 40.0 kD Protein	D28910	F08i	1,61x	unbekannt
Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1	AF043724	A01f	-1,34x	Oberflächenantigen
Creatine Kinase, Ubiquitous Mitochondrial Precursor	J04469	D01e	-1,52x	Energiestoffwechsel
Gastrointestinal Peptide	AF048700	F01c	-1,64x	Insulinsekretion
Antigen NY-CO-37 (NY-CO-38)	AF039699	F14m	-1,49x	unbekannt

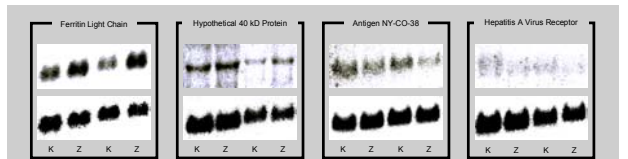


Fig. 4: Bestätigung der identifizierten Gene mittels Northern Blot-Analyse mit Gesamt-RNA aus HT29-Zellen (5 bzw. 10 µg/Spur) in der oberen Reihe jeweils das untersuchte Gen, in der unteren Reihe jeweils die zugehörige Hybridisierung mit GAPDH K = Kontrolle (0,25 ppm Zn), Z = Zulage (10 ppm Zn)

Tab. 2: Liste der bestätigten Gene

Genname	bestätigt mittels	Regulation im Zulageversuch
Zinc Finger Protein HSAL2 (Fragment)	Real-time PCR	1,62x
Ferritin Light Chain	Northern Blot	1,45x
Hypothetical 40.0 kD Protein	Real-time PCR	1,39x
Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1	Northern Blot	1,35x
Gastrointestinal Peptide	Real-time PCR	↓ *
Antigen NY-CO-37 (NY-CO-38)	Northern Blot	-1,28x

*: noch nicht quantitativ bestimmt

4

Zusammenfassung

Auf der Suche nach Zink-sensitiven Genen, die eventuell als Biomarker zur Beurteilung des Zinkversorgungsstatus *in-vivo* dienen könnten, wurde hier zunächst *in vitro* ein Zustand der Zinkübersorgung simuliert. Das Screening mittels cDNA-Arrays zeigte, daß durch die gewählten Versuchsbedingungen etwa 1 % der auf dem Filter repräsentierten Gene (1176) in ihrer Expression verändert sind. Insgesamt konnte die veränderte Expression von sechs Genen mittels Northern Blot bzw. quantitativer Polymerasekettenreaktion unabhängig bestätigt werden. Da die identifizierten Zink-sensitiven Gene unterschiedlichen Funktionsklassen zuzuordnen sind, könnte das Zinküberangebot mehrere Stoffwechselfunktionen gleichzeitig beeinflussen. Insgesamt ist das hier etablierte Reporterzellsystem und die cDNA-Array-Technologie geeignet, Zink-abhängige Gene zu identifizieren die möglicherweise auch den Zinkversorgungsstatus einer Zelle anzeigen.

5

[4] He, Y.D. & Friend, S.H. (2001) Nature Medicine **7**, 658-659.
 [5] Blanchard, R.K., Moore, J.B., Green, C.L. & Cousins, R.J. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 13507-13513.
 [6] Sensi, S.L., Yin, H.Z., Carriedo, S.G., Rao, S.S. & Weiss, J.H. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 2414-2419

6