

Expressionsanalyse von Säugergenen im isolierten Zinkmangel mittels cDNA- und Oligonukleotid-Arrays

Heike tom Dieck, Hannelore Daniel, Hans-Peter Roth, Michael Pfaffl* und Frank Döring
Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie, Technische Universität München und

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

Einleitung

Zink erfüllt als essentieller Mikronährstoff vielfältige Funktionen im Intermediärstoffwechsel sowie in übergeordneten Hormonsystemen und bei Immunprozessen. Zwangsweise sind daher im Zinkmangel sehr viele physiologische und biochemische Vorgänge beeinträchtigt [1/2]. Während die Symptome eines drastischen Zinkmangels bei Säugern bekannt sind, ist die sichere Diagnose einer marginalen Zinkversorgung jedoch nach wie vor schwierig. In seiner Cofaktorfunktion von Transkriptionsfaktoren greift Zink unmittelbar auch in die Kontrolle der Genexpression ein [3]. Damit könnten „zink-sensitive“ Gene als Biomarker zur Beurteilung der Zinkversorgung dienen. Ausgehend von dieser Hypothese haben wir im tierexperimentellen Ansatz geprüft, inwieweit globale Änderungen der Genexpression im selektiven Zinkmangel mittels Genchip-Technologie die Identifizierung von spezifischen Markergenen erlaubt. [4/5].

Methoden

Erzeugung des Zn-Mangels *in-vivo* und Gesamt-RNA-Isolierung

24 Sprague-Dawley Ratten (♂=121 g) wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Alle Tiere erhielten eine halbsynthetische Diät (AIN 93G) viermal täglich per Schlundsonde verabreicht. Die Diät der Kontrollgruppe enthielt 25 mg Zn/kg Diät, die der Mangelgruppe 1,3 mg Zn/kg Diät. Nach 11 Tagen wurden die Tiere nach Narkose dekapiert und das Blut für biochemische Analysen konserviert. Die entnommenen Gewebe wurden schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Gesamt-RNA aus der Leber wurde für beide eingesetzten Arraysysteme mittels modifizierter Guanidinothiocyanat/ Phenol-/ Chloroform-extraktionen isoliert.

Prozessierung der cDNA- und Oligonukleotid-Arrays

Für das Screening auf „zink-sensitive“ Gene wurden zwei verschiedene Arraysysteme eingesetzt. Es handelte sich um die cDNA-Nylon-Arrays Atlas™ Rat 1.2 Arrays (Clontech, Palo Alto) mit 1176 einfach gespoteten cDNAs und die Pan® Rat Liver Oligonukleotidarrays mit 1353 genspezifischen Oligonukleotiden (MWG Biotech, Ebersberg) auf Glasslides (Abb. 1). Die Synthese der genspezifischen [α -³²P]-markierten bzw. fluoreszenzmarkierten (Cy3/Cy5) cDNA-Sonden erfolgte in beiden Fällen nach dem Herstellerprotokoll.

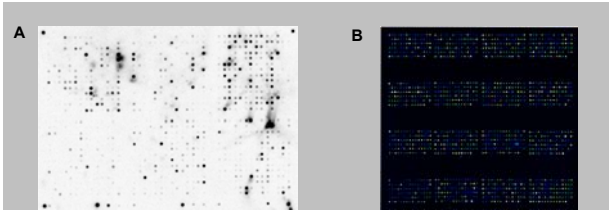


Abb. 1: (A) cDNA-Array: Atlas™ Rat 1.2 Array (B) Oligonukleotid-Array: Pan® Rat Liver Array

Die [α -³²P]-cDNA-Sonden gewaschen und 96h auf einem Phosphorimager-Screen exponiert. Die quantitative Auswertung erfolgte nach Background-Abzug durch Vergleich der Signalstärke zwischen Kontroll- (Zn+) und Mangeltieren (Zn-). Für die Normalisierung wurde sowohl auf Kontrollgene als auch auf die Gesamtintensität Bezug genommen. Auf den Oligonukleotid-Arrays (n=4) wurde die Hybridisierung des Cy5/Cy3-Sondengemisches in Hybridisierungskammern durchgeführt. Nach den anschließenden Waschstritten wurden diese Arrays trocken eingescannt (Affymetrix® 428™ Array Scanner). Die quantitative Auswertung erfolgte mittels der ImaGene™ 4.2-Software (BioDiscovery, Inc.). Die Gene wurden als potentiell „zink-sensitiv“ klassifiziert, wenn sich die Signalstärke als Quotient Zn-/Zn+ um den Faktor 1,8 respektive 0,5 unterschied.

Verifizierung mittels Northernblot und quantitativer Realtime RT-PCR

Zur Verifizierung der beobachteten Expressionsänderung wurde die Northern-Kapillarblotting-Methode gewählt. Die [α -³²P]-Sondenherstellung erfolgte aus PCR-Produkten des offenen Leserahmens der zu überprüfenden Gene. Zusätzlich wurde für einige Gene eine Verifizierung mittels quantitativer Realtime RT-PCR (LightCycler, Roche) durchgeführt. Die hierzu notwendigen genspezifischen Primer wurden basierend auf den Sequenzinformationen von Clontech synthetisiert. Im Realtime-PCR-Lauf wurde zur Online-Detektion SYBR-Green als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt. Die Überprüfung der Endprodukte erfolgte über Schmelzkurvenanalyse und native Gelelektrophorese.

Ergebnisse II

Mittels cDNA-Arrays konnten 38 und mittels Oligonukleotid-Arrays 18 potentiell „zink-sensitive“ Gene identifiziert werden. Für 31 ausgewählte Gene erfolgte eine Überprüfung der veränderten mRNA-Spiegel mittels Northern Blot-Analyse. Die veränderte Expression wurde für 23 Gene eindeutig bestätigt, während fünf Gene nicht verifizierbar waren. Die Transkripte von 3 Genen waren nicht detektierbar. Zusätzlich erfolgte für fünf der identifizierten Gene eine Quantifizierung mittels Realtime RT-PCR (Tab. 1). Für die im Northern Blot bestätigten Gene ergab sich somit eine 84 %ige Übereinstimmung mit den cDNA-Array-Daten und eine 89 %ige Übereinstimmung bei den Oligonukleotid-Arrays. Abb. 3 zeigt beispielhaft den Nachweis der Regulation anhand Northern Blot-Analyse.

Tab. 1: Identifizierte Gene (* = Atlas™ Rat 1.2 Array, ** = Pan® Rat Liver Array; ^a = Northern Blot, ^b = quantitative Realtime RT-PCR)

Gen	GenBank Acc #	Regulation im Mangel	Verifizierung	Funktion
Fettstoffwechsel				
3-keto thiolase Acyl-CoA	M32801 *	-2.17 x		Fettsäureabbau
delta2, delta3 enoyl-CoA Isomerase	000729 **	-1.82 x	bestätigt ^a	Fettsäureabbau
Carboxylesterase	AF171640 **	-1.75 x	bestätigt ^a	Fettsäureabbau
ATP-citrat lyase	05210 **	2.29 x		Fettsäuresynthese
Glycerol kinase	U16102 **	1.81 x	bestätigt ^a	Fettsäuresynthese
Fatty acid transport protein	U89529 **	-2.83 x		Fettsäureaufnahme
Phospholipase	O63895 *	-3.45 x		Phospholipidabbau
Collipase precursor	M68370 *	-2.56 x	bestätigt ^a	Triacylglycerinabbau
Proteinstoffwechsel				
Ubiquitin-like protein	AF095740 **	1.79 x	revers ^a	Proteinabbau
Acyl-peptide hydrolase	U04733 **	-5.26 x	bestätigt ^a	Proteinabbau
Serine dehydratase	U10752 **	-1.85 x	bestätigt ^a	Aminosäureabbau
Cytosolic aspartate aminotransferase	000252 **	-1.56 x	bestätigt ^a	Transaminierung
Energiemetabolismus u.a.				
SU of FOF1-ATP Synthase	O13127 **	1.8 x	bestätigt ^a	ATP-Synthese
Alcohol dehydrogenase A SU	M15327 **	-1.89 x	bestätigt ^a	Ethanoloxidation
5-aminoovalate synthase	U03190 **	-2.27 x	bestätigt ^a	Porphyrynsynthese
Ceruloplasmin	L33969 *	2.10 x		Eisen(II) Oxidation
similar NAD(P)H Ubiquinone	**	1.71 x		Elektronentransfer
Fremdstoffwechsel/ Stressantwort				
Cyp4A locus, cytochrome P-450 (CYP4A3)	M33936 **	-2.13 x	bestätigt ^a	Phase1-Enzym
NAD(P)-cytochrome P450 reductase	M12516 *	-2.13 x	bestätigt ^{a,b}	Phase1-Enzym
Cytochrome P-450 2C23	954646 *	-1.76 x		Phase1-Enzym
Liver aldehyde oxidase	AF110477 **	-1.64 x	bestätigt ^a	Fremdstoffoxidation
Metallothionein-1 and 2	M11794 **	-12.5 x	bestätigt ^a	Stressantwort
AP endonuclease	O44495 *	1.76 x		DNA-Reparatur
Glutathione S-transferase subunit 5 theta	867654 *	3.81 x		Entgiftung (ROS)
similar glutathione transferase	**	2.18 x		Entgiftung (ROS)
Hormonstoffwechsel				
Insulin-like growth factor binding protein, compl acid-labile	S146785 *	-1.41 x	bestätigt ^a	Wachstum
Insulin-like growth factor binding protein 1	M89791 *	-2.50 x	bestätigt ^{a,b}	Wachstum
Insulin-like growth factor binding protein 2	J04486 *	-2.33 x	bestätigt ^{a,b}	Wachstum
Epidermal growth factor receptor	M37394 *	-1.82 x	bestätigt ^a	Wachstum
Hepatic product spot 14	H01934 **	2.09 x	bestätigt ^a	Thyroidantwort
Neuropeptide Y	M03073 *	-1.92 x	bestätigt ^{a,b}	Neuropeptid
Interleukin 2	M22899 *	-4.55 x		autok. Wachstumsfaktor
Trafficking/Signaltransduktion				
Syntaxin 4	U20821 *	-2.13 x	bestätigt ^a	Trafficking
Epinorphin, Syntaxin 2	U20823 *	-2.76 x		Trafficking
Brain fatty acid-binding protein	U02096 *	2.76 x		Trafficking
Syntaxin	M07925 *	-3.13 x	bestätigt ^a	Trafficking
Rac-related protein	U22968 *	-2.17 x		Signaltransduktion
P2U guanine nucleotide binding protein	U09402 *	-1.89 x		Signaltransduktion
G protein coupled receptor	U65417 *	2.70 x		Signaltransduktion
Prostaglandin F2 alpha-receptor	U47287 **	1.86 x		Signaltransduktion
B2 bradykinin receptor	U26173 **	2.34 x		Signaltransduktion
Calphostin III	U43630 *	1.82 x		intrazell. Signal-Pathway
Arrestin 2	U30629 *	-2.00 x	bestätigt ^{a,b}	Rezeptoraktivität-Regulator
Anderes				
Transcriptional repressor NAB1	U17253 **	-1.64 x		Transkriptionskontrolle
Galactose-1-phosphate uridylyl transferase	U05541 **	1.67 x		Kohlenhydratstoffwechsel
Plasma proteinase inhibitor alpha-1-inhibitor III	U39552 *	1.95 x		Alaruphaseprotein
Voltage gated K+ channel protein	M69980 *	-3.3 x		Energienutzung
Serlyl-sulfatase	U37138 *	-1.81 x		Steroidhormonaktivierung

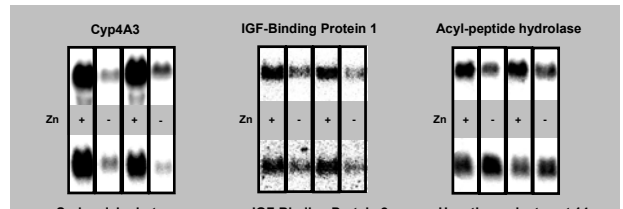


Abb. 3: Bestätigung der identifizierten Gene mittels Northern Blot-Analyse mit Gesamt-RNA aus der Leber von Kontroll- und Zinkmangeltieren (10 µg/Lane)

Ergebnisse I

Der selektive Zinkmangel konnte anhand der durchschnittlichen Gewichtszunahme der Tiere, der Serumzinkkonzentration, der Aktivität der alk. Phosphatase im Serum und der mRNA-Spiegel von Metallothionein im Lebergewebe demonstriert werden (Abb. 2).

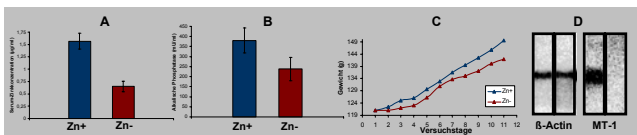


Abb. 2: (A) Serumzinkkonzentration (B) Serum-AP-Aktivität (C) ♂-Gewichtszunahme (D) Metallothionein1-mRNA-Expression bei Kontroll- und Mangeltieren

Zusammenfassung

Zur Identifizierung „zink-sensitiver“ Gene wurde im Tierexperiment ein isolierter Zinkmangel erzeugt und mittels DNA-Array-Technologie die Änderung der mRNA-Expression in der Leber untersucht. Dabei wurden 56 Gene gefunden, deren mRNA-Spiegel erhöht bzw. erniedrigt waren. Die zink-abhängige Modulation der Expression wurde für 23 Gene mittels Northern Blot-Analyse und/oder Realtime RT-PCR bestätigt. Die identifizierten Genprodukte sind dem Fett-, Protein-, Hormon- und Fremdstoffwechsel, Stressantworten, dem Energiemetabolismus, Trafficking- und Signaltransduktionsprozessen zuzuordnen. Übereinstimmend mit der Retardierung des Wachstums im Zinkmangel [6] finden sich unter den identifizierten Transkripten mit veränderter Expression vor allem auch solche, die in die STH-Achse und Wachstumsfaktor-peptidklassen einzuordnen sind. Die Arraytechnologie ist als Screening-System geeignet, eine begrenzte Zahl von Kandidatengen zu identifizieren, deren veränderte Expression jedoch durch unabhängige, quantitative Methoden bestätigt werden muß.

Literatur

- Shay, N.F., Cousins, R.J., J.Nutr., 1993, 123, 35-41
- Cousins, R.J., Am. J. Med., 1999, 106 (1A), 20S-23S
- Blanchard, R.K. and Cousins, R.J., Proc. Natl. Acad. Sci., 1996, 93, 6863-6868

- Blanchard, K., Moore, J.B., Green, C.L., Cousins, R.J., Proc. Natl. Acad. Sci., 2001, 98, 13507-13513
- Lee, C., Klopff, R.G., Weindrich, R., Prolla, T.A., Science, 1999, 285, 1390-1393
- Kirchgessner, M., Roth, H.-P., Weigand, E., Trace Elements in Human Health and Disease, 1976, Vol.1, 189 ff