

5 Material und Methoden

5.1 Materialliste und Bezugsquellen

5.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
100 bp DNA Längenstandard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
[γ -P32]-ATP	Amersham Biosciences Buckinghamshire England
Acrylamid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Appligene Oncor, Illkirch Graffenstaden, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bacto Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto Hefeextrakt	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto Tryptone	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Biomax X-ray Film	Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland
Bisacrylamid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
dNTPs	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ficoll	Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland

Substanz	Hersteller
Harnstoff	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hepes	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) (50mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Petrischalen (Kunststoff)	Greiner GmbH, Pleidelsheim, Deutschland
Random Hexanukleotid Mix (10x)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Random Primer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
RNasin (40 U/μL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Salpetersäure (HNO ₃) 65%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat (AgNO ₃)	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdocecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tris	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
X-Gal	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

5.1.2 Lösungen und Puffer

Hybridisierungslösung

1,25 L	PEG 8000
2,5 L	SDS-Lösung 20 %
ad 5 L	H ₂ O bidest.

Dehybridisierungslösung

pH 7,5 - 8,0	
2 L	H ₂ O bidest.
10 mL	SDS 20 %
10 mL	20 x SSC

Denaturationslösung

100 mL	NaOH 30 %
600 mL	NaCl 5 M
ad 2 L	H ₂ O bidest.

Glycerollösung

pH 7,4	
50 mM	Zitronensäure
20 mM	NaH ₂ PO ₄
400 mL/L	Glycerol

10 x Tris-Borat-EDTA-Puffer

pH 8,3 - 8,5	
1,0 M	Tris
0,9 M	Borsäure
0,01 M	EDTA

20 x Natriumchlorid-Natrium-Citrat-Puffer

pH 6,9 - 7,1	
3,0 M	NaCl
0,3 M	Natriumcitrat

10 x PCR - Puffer

pH 8,8	
160 mM	Ammonium-sulfat
670 mM	TRIS
0,1%	Tween 20

10 x Erythrozyten-Lysispuffer

pH 7,4	
1,5 M	NH ₄ Cl
100mM	KHCO ₃
10mM	EDTA

5.1.3 Medien

LB-Agar-Platten

pH 7,5

5 g	Hefeextrakt
10 g	BactoTryptone
10 g	NaCl
15 g	Agar
ad 1 L	H ₂ O bidest.

LB-Medium

pH 7,5

5 g	Hefeextrakt
10 g	BactoTryptone
10 g	NaCl
ad 1 L	H ₂ O bidest.

5.1.4 Gele

1 % Agarosegel

100 mL	1 x TBE
1 g	Agarose

SSCP-Gel

Gelstocklösung für 10% Polyacrylamid -Gel (PAA)

245 mL	40% Acrylamid
100 mL	Bisacrylamid
50 mL	10 x TBE
605 mL	H ₂ O bidest.
1 mL	TEMED

Sequenziergel

18 g	Urea pura (reinst.)
23 mL	H ₂ O bidest.
7,5 mL	Acrylamid/Bis-acrylamid-Mischung

5.1.5 Molekularbiologische Kits

Name	Hersteller
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Maxiprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
GalactoLight Kit	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Luziferase Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

5.1.6 Zellkultur

5.1.6.1 Zell-Linien

- murine WEHI3b DSMZ Braunschweig
 - ACC 26, LOT 03 vom 15.09.99
- murine 32D DSMZ Braunschweig
 - ACC 411, LOT 02 vom 16.10.01
- humane HL60 DSMZ Braunschweig
 - ACC 3, LOT 11 vom 27.08.02

5.1.6.2 Zellkulturbedarf

Substanz	Hersteller
12-Loch-Platten	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
6-Loch-Platten	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Zellkulturflaschen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Substanz	Hersteller
Penicillin/Streptomycin	Cambrex Bio Science Verviers S.P.R.L., Belgien
Reporterlysepuffer (5x)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Basal Iscove Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

5.1.6.3 Zellkulturmedien

Zell-Linie: **32d**

Basismedium: RPMI 1640

Zusätze:

1% Penicillin/Streptomycin

1% L-Glutamin (200 mM)

10% FCS

10% konditioniertes Medium WEHI3b

Zell-Linie: **WEHI3b**

Basismedium: Basal Iscove Medium

Zusätze:

1% Penicillin/Streptomycin

1% L-Glutamin (200 mM)

10% FCS

Zell-Linie: **HL60**

Basismedium: RPMI 1640

Zusätze:

1% Penicillin/Streptomycin

1% L-Glutamin (200 mM)

10% FCS

5.1.7 Bakterien

- E.coli (DH5 α) Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

5.1.8 Enzyme

Enzymart	Name	Hersteller	Puffer
Restriktionsenzyme	<i>HindIII</i>	New England BioLabs	NE Puffer 2
	<i>XhoI</i>	New England BioLabs	NE Puffer 2
DNA-Polymerase	Taq	Rapidozym	10 x PCR-Puffer
Ligase	T4 DNA Ligase	Invitrogen	10 x Ligationspuffer
DNase	DNase RQ1	Promega	10 x RQ1-Puffer
Dye Terminator	Cycle Sequenzing Kit	Applied Biosystems	10 x Buffer

5.1.9 Vektoren

Vektorname	Hersteller
pGL3basic	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
pGL3SV40	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
GFP Vector	aus dem Institut für Toxikologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Deutschland
pBluescript II KS(+)	Stratagene, La Jolla, USA
pSV-®-Galaktosidase	Kontrollvektor Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

5.1.10 Geräte

Name	Hersteller
ABI Prism 377 DNA Sequencer	Perkin Elmer
Geldokumentationssystem 5000	Firma UVP

Name	Hersteller
Lumat LB 9501	Berthold
Image Plate Scanner BAS-1500	Fujifilm
PCR-Tetrad PTC 225	Peltier Thermal Cycler
Spektrophotometer UV-VIS 1202	Shimadzu
Superspeed RCL-B	Sorvall
Tischzentrifugen 5417/5402	Eppendorf
Biometra Multigel-Long Typ G 47 PAA Gelsystem	BioRad
PowerSupply Power Pac 300	BioRad
Schüttler Promax 2020	Heidolph
Wasserbäder	Julabo SW 20
Elektrophoresekammern Agagel Maxi	Biometra
Vortexer Nr. 524	Labin
Dot-Kammern, Manifold System	Life Technologies; Gibco
Feinwaage	Fa. Sartorius
pH-meter 761	Calimatic
Gene Pulser	Bio-Rad
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad
Messküvetten für Photometer	Bio-Rad

5.2 Das Patientenkollektiv

5.2.1 Die ECTIM-Studie

Die ECTIM-Studie (**E**tude **C**as-**T**émoins de l'**I**nfarctus **M**yo**C**arde) ist eine retrospektive Fall-Kontrollstudie, bestehend aus Patienten mit Myokardinfarkt und gesunden Kontrollen. Die untersuchten Individuen stammen aus Regionen, deren Bevölkerung von der World Health Organization (WHO) im Rahmen der MONICA-Studie (MONitoring trends and determinants in cardiovascular disease) überwacht und registriert werden. Die ECTIM-Studie wurde das erste mal 1992 von der Arbeitsgruppe um Arveiler und Cambien beschrieben^{62,63}.

Es handelt sich dabei um Patienten aus Straßburg (Frankreich), Belfast (Nordirland) und Glasgow (Schottland), wobei in Frankreich nur männliche Patienten, in Großbritannien dagegen sowohl weibliche wie auch männliche Patienten ausgewählt wurden.

Aus diesem Kollektiv resultierten 990 Fälle mit der Diagnose Myokardinfarkt. Das mittlere Alter war $55,8 \pm 8,1$ Jahre. Der Anteil der Frauen lag bei 26,1 %. Der Altersunterschied der Männer reicht von 25 bis 64 Jahre, der der Frauen von 25 bis 69 Jahren. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 3 bis 9 Monate (2 Jahre für Frauen in Belfast).

Die Kontrollen bestanden aus einem bezüglich Geschlecht und Alter vergleichbaren Kollektiv. Es wurden 904 Kontrollen ausgewählt, die keine klinischen Anzeichen einer koronaren Herzerkrankung aufwiesen. Das mittlere Alter betrug $56,4 \pm 8,3$ Jahre. Davon waren 27,5 % Frauen. In Großbritannien erfolgte die Auswahl aus den Karteien von Allgemeinmedizinern der gleichen Region wie die Fälle. In Frankreich aus einer Wählerliste.

Neben einer detaillierten kardiovaskulären Familienanamnese wurden zusätzlich hämostasiologische und biochemische Plasmaparameter sowie Daten über Cholesterol, Triglyceride, Apolipoproteine und Lipoproteinpartikel in Patienten und Kontrollen erhoben.

Für die PCR-SSCP Analysen wurden aufgrund von Phänotypen und Alter der Patienten bei Auftreten der Erkrankung 95 Hochrisikopatienten (entsprechend 190 Allele) aus der ECTIM-Studie ausgewählt.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Probengewinnung

5.3.1.1 Leukozytenpräparation aus EDTA-Vollblut

10 mL EDTA Blut⁶⁴ werden mit 30 mL Erythrozyten Lysis Buffer versetzt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach werden die Falcon-Röhrchen für 5 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit PBS ohne Kalzium und Magnesium gewaschen. Das Pellet wird anschließend mit 1 mL Glycerollösung versetzt und bei -70°C als so genanntes *Buffy Coat* (Leukozytenkonzentrat) tief gefroren.

5.3.1.2 DNA-Präparation mit Qiagen-Säulen

200 µL des Buffy Coats werden abpipettiert und die DNA-Präparation laut Protokoll der Firma Qiagen durchgeführt.

5.3.2 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann. Um DNA mit Hilfe einer PCR amplifizieren zu können, benötigt man als Starthilfe Oligonukleotid-Primer. Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize sind. Eine DNA-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynucleotid-triphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen, denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Diese DNA-Moleküle liegen am Ende der Reaktion als Doppelstränge vor. Durch wiederholte Denaturierung ermöglicht man eine erneute Anlagerung der im Überschuss vorhandenen Primer und dNTPs. Da die Komplementierung an beiden Strängen der Matrize abläuft, hat man in einem

Zyklus die Zahl der Matrizen-DNA verdoppelt. Jede zusätzliche Strangsynthese bedeutet eine neue Vermehrungsrunde, so dass am Ende eine ausreichende Menge an gewünschten DNA-Strängen vorliegt.

Um optimale Bedingungen für die Synthese gewährleisten zu können, müssen dem Ansatz folgende Reagenzien zusetzen:

- a) Die klassische Polymerase für die PCR ist die Taq-Polymerase, die eine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität besitzt und zudem eine hohe Syntheserate aufweist.
- b) Der PCR-Puffer muss so gewählt sein, dass ein pH-Wert größer 8 vorliegt, da die Polymerase hier ihr Aktivitätsoptimum hat.
- c) Mit Magnesiumchlorid (MgCl_2) kann man die Spezifität und Ausbeute der PCR wesentlich beeinflussen. Zur Optimierung werden Konzentrationen zwischen 1,0 und 4,0 mM MgCl_2 benutzt.
- d) Dimethylsulfoxid (DMSO) wirkt als Synthesebeschleuniger der PCR und wird in Konzentrationen bis zu 10 % verwendet.
- e) dNTPs und die entsprechenden Primer sind notwendige Voraussetzungen für den Start und die komplette Synthese des komplementären DNA-Stranges.

Für ein Reaktionsvolumen von 50 μL werden 25 ng genomische DNA sowie 25 pmol der Upper- und Lowerprimer, 200 μM dNTPs, 2fach PCR-Puffer, entsprechende Mengen von MgCl_2 , DMSO und doppelt destilliertes autoklaviertes Wasser zugefügt. Zum Schluss wird dem Ansatz 0,2 Einheiten (U) Taq-Polymerase zugesetzt.

5.3.2.1 Das PCR Programm

1. Zyklus	95°C	für 5 min	Denaturierung
2. Zyklus	95°C	für 1 min	Denaturierung
3. Zyklus	Temp. variabel	für 1 min	Annealing (Primeranlagerung)
4. Zyklus	72°C	für 1 min	Taq-Polymerase (Extension)
5. Zyklus	72°C	für 10 min	Proofreading (Extension)
6. Zyklus	15°C	für 2 min	Cooldown
Zyklus 2-4 wiederholen sich 34 mal → Σ 35 Zyklen			

Protokoll 1: genomische PCR

5.3.2.2 Das Primerdesign

Zur Auswahl der Nukleotidsequenz der einzelnen Primer wurde eine detaillierte Datenbankrecherche der publizierten genomischen Sequenz in der GenBank auf dem Server des National Centers for Biotechnology (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov.) durchgeführt.

Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden danach in das Programm PrimerExpress® (Applied Biosystems) eingelesen. Zur Berechnung der idealen Nukleotidsequenz der Primerpaare wurden folgende Optionen benutzt:

1. Fragmentgröße zwischen 170 bp und 400 bp
2. Primerlänge mindestens 18 bp und maximal 25 bp
3. Differenz der Schmelztemperatur zwischen Upper- und Lowerprimer maximal 4°C
4. Die Primerpaare dürfen an ihren 3'-Enden weder inter- noch intramolekular komplementär sein, um die Bildung von Primerdimeren zu verhindern.

Die vorgeschlagenen Sequenzen wurden mittels des Softwareprogramms BLAST des NCBI auf Spezifität, Kreuzreaktivität und Identität geprüft. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma GENSET/Proligo.

5.3.2.3 Primer und Bedingungen für α -Fibrinogen

Auf der Grundlage der Sequenz: Human fibrinogen alpha chain gene

ACCESSION M64982, 458553

wurden mittels der PrimerExpress® Software die Primerpaare in der Tabelle 1 ermittelt. Nach Eingang der Primer wurden diese auf eine Konzentration von 25 μ M verdünnt. Die Optimierung der einzelnen Primerpaare brachte folgende Ergebnisse:

Fragment-Nr. Größe in bp	Primer Name	Sequenz 5' → 3'	Sequenz- start	Annealing Temperatur °C	MgCl ₂ Konz. mM	DMSO Konz. %
Fragment 1	Afib 1U	ACCCTTAGAAAAGATGTTTT	18	45	2	5
173	Afib 1L	TAGAGCAGGTAGACTCTGAC	191			
Fragment 2	Afib 2U	CATTGCTGTTGCTCTCTTTT	1110	50	2	5
243	Afib 2L	CAATCAGGTCAGCCTGTGAG	1333			
Fragment 3	Afib 3U	GAGATAGATCCTTACTGTAA	1699	45	2	0
310	Afib 3L	GTCATAGATATAAGCGGATA	1989			
Fragment 4	Afib 4U	ACTTCAATAACCATATTTTC	3027	45	2	5
285	Afib 4L	ATGGATATAACACTTTTCTC	3292			
Fragment 5	Afib 5U	GAACCTAATAGACGTAGTTTAT	3718	50	2	0
257	Afib 5L	AACCAAGTCTGGAAGTGGT	3956			
Fragment 6	Afib 6U	CATTGCCAAAGACTTACTTC	3896	55	2	0
224	Afib 6L	CTGATCCGGTTCATAAGAG	4100			
Fragment 7	Afib 7U	GAGTAATCTCATTCCACCA	4067	52	2	0
283	Afib 7L	TCCGGTACTACCAGGTCTAG	4330			
Fragment 8	Afib 8U	AAAACCCTGGGAGCCCTAGA	4315	55	2	0
267	Afib 8L	AAGTGACCAGTTTTTCTGTGTG	4560			
Fragment 9	Afib 9U	GTCCAGGGACAAGGAGAGAG	4537	50	2	0
245	Afib 9L	GCCAGACAATGTGCCTAAAT	4762			
Fragment 10	Afib 10U	CCGAAGATGGTTCTGACTGT	4729	50	2	0
295	Afib 10L	AATTGTTTGCTGTAACCTTGA	5004			
Fragment 11	Afib 11U	CACCCTGGGATAGCTGAATT	4965	50	2	0
321	Afib 11L	AATGACGTGTAACAGAGAGTTA	5264			
Fragment 12	Afib 12U	ACTTCTTCCAACCAGCTTAA	5839	50	2	0
230	Afib 12L	CGAAACCTCTCTTGTAGTCT	6049			
Fragment 13	Afib 13U	GCAAAGAATGGATGGATCAC	6007	55	2	0
279	Afib 13L	CCCTCAATCAGAGCATCACC	6266			
Fragment 14	Afib 14U	CCCTCCAAGTCTCCTCCTAT	6324	55	2	0
271	Afib 14L	ACCACTCCATTCTCAATCTC	6485			
Fragment 15	Afib 15U	CTATGACCCAAGGAATAACA	6457	55	2	0
279	Afib 15L	ATGTCTCAGGTACATTTAGC	6716			

Tabelle 1: Primersequenzen und Amplifikationsbedingungen für das Gen α -Fibrinogen

5.3.2.4 Primer und Bedingungen für γ -Fibrinogen

Auf der Grundlage der Sequenz: Human fibrinogen gamma chain gene.

ACCESSION NT_016606, 37540362

wurden mittels PrimerExpress Software folgende Primerpaare ermittelt und bei der Firma Proligo/Genset bestellt. Nach Eingang der Primer wurden diese auf eine Konzentration von 25 μ M verdünnt. Die Optimierung der einzelnen Primerpaare brachte folgende Ergebnisse:

Fragment-Nr. Größe in bp	Primer Name	Sequenz 5' → 3'	Sequenz- start	Annealing Temperatur °C	MgCl ₂ Konz. mM	DMSO Konz. %
Fragment 1 274	Gfib 1U Gfib 1L	GCTTACATAAAGGGACAATT TGTCTCTGGTAGCAACATAC	1718 1972	47	4	0
Fragment 2 236	Gfib 2U Gfib 2L	GGAAAATAAACAGATAATAA ATTAAGAAAAATAGGTA AAC	1919 2134			
Fragment 3 206	Gfib 3U Gfib 3L	GGTTTTACCTATTTTTCTTA CTGTTTGACTTCTGATGTTT	2133 2319	47	4	0
Fragment 4 195	Gfib 4U Gfib 4L	TATCAAACCAAAGTAGACAA CAAAGA ACTTCACAGATTA	2255 3430			
Fragment 5 233	Gfib 5U Gfib 5L	AAAATAAGACTACTGACCA AGCAAATTA AACAAAAATC	2396 2609	52	4	5
Fragment 6 273	Gfib 6U Gfib 6L	TTATTTTTGTCTTCTTATTT TTTCTCCTTACACTTA	4109 4382			
Fragment 7 256	Gfib 7U Gfib 7L	TTCAAACCACAGTAAAAGTC GTTCA CAAGGTGCTTAGAAA	4609 4845	52	4	0
Fragment 8 276	Gfib 8U Gfib 8L	ATTTTCTCCTTTTGCTCTTGC TGCACATTCCAGGCAATCTT	5723 5979			
Fragment 9 209	Gfib 9U Gfib 9L	CAGCATGTGATGGTTGTATT TGTCCCAGGTA CTGAACTGC	7393 7582	53	2	0
Fragment 10 247	Gfib 10U Gfib 10L	CCTAGTGACAAGTTTTTTCAC TATTCTTCATTTCTTCATATC	7547 7773			
Fragment 11 279	Gfib 11U Gfib 11L	TAGACTTGCAGAGGTAAAAA AGGGTAAAGTGAGTCATATT	9281 9540	53	2	5
Fragment 12 302	Gfib 12U Gfib 12L	AATGGAGAAAATTATGTCTT TTAATGGTCAATAAAGGTAC	9999 10281			

Tabelle 2: Primersequenzen und Amplifikationsbedingungen für das Gen γ -Fibrinogen

5.3.2.5 Primer und Bedingungen für ELA2

Auf der Grundlage der Sequenz: Human bone marrow serine protease gene (medullasin), leukocyte neutrophil elastase gene

ACCESSION Y00477, 34529

wurden mittels PrimerExpress Software folgende Primerpaare ermittelt und bei der Firma Proligo/Genset bestellt. Nach Eingang der Primer wurden diese auf eine Konzentration von 25 μ M verdünnt. Die Optimierung der einzelnen Primerpaare brachte folgende Ergebnisse:

Fragment-Nr. Größe in bp	Primer Name	Sequenz 5' → 3'	Sequenz- start	Annealing Temperatur °C	MgCl ₂ Konz. mM	DMSO Konz. %
Fragment 1 239	NE 1U NE 1L	AGCTGGTGTCCAGGGACTGA CAAACAGGAACCCTGGGAAG	14 233	62	4	5
Fragment2 342	NE 2U NE 2L	GCCCTTGACGTGCTCAGTTCC GGATAAACAGAGGCAGGCGA	212 534			
Fragment 3 330	NE 3U NE 3L	GACCAGAGAAGTGCCTATTG CATCAAGTCCCTCAGGTCTA	253 563	62	2	0
Fragment 4 233	NE 4U NE 4L	CATCAAGTCCCTCAGGTCTA CAGCACTCTGGGAGGTGAGG	563 776			
Fragment 5 392	NE 5U NE 5L	AAACCCCGTCTCTACTAAAA AATCACTTGAACCTGGGAGGC	714 935	61	2	2,5
Fragment 6 463	NE 6U NE 6L	CAAAAATTAGCCGGGAGTGG TTCTCCCCCTTTTCATCAAC	870 1360			
Fragment 7 256	NE 7U NE 7L	TGTGCATCCTGAATTTTGTC TCTTTTCCTCGCCTGTGTCCT	1077 1313	60	4	5
Fragment 8 303	NE 8U NE 8L	GCCCCAGCCCCACCATGACCC GCGGGAGGTTGACTCAAAA	1273 1360			
Fragment 9 368	NE 9U NE 9L	AGGCTCCTTGGCAGGCACTC CCCCACCCACCTCACAGACC	1740 1988	65	2	10
Fragment 10 169	NE 10U NE 10L	TCGCCGGATGGGGACGACAA ATGCGCTGCACGGCGAACAC	2091 2240			
Fragment 11 306	NE 11U NE 11L	CTGGGAGCCATAACCTCTC CGGGTATTTCCCGTTTCAC	2198 2484	57	2	2,5
Fragment 12 168	NE 12U NE 12L	TGACGCGCTGACGATCTGTC GCTGGCGATCCCACGGTTCC	4452 4600			
Fragment 13 265	NE 13U NE 13L	ACGGGTCCGGCCACCATCAAC GAGCGGGTGGGGAGCAGAGG	4489 4734	62	4	10
Fragment 14 183	NE 14U NE 14L	CAGCTTCCCCACCTTGCTG CCTCGGAGCGTTGGATGATA	4853 5016			
Fragment 15 232	NE 15U NE 15L	TGCCCCGGTGGCACAGTTTG TTTTCAACACCCAATCACACAG	4980 5211	65	4	2,5

Tabelle 3: Primersequenzen und Amplifikationsbedingungen für das Gen ELA2

5.3.3 Die Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die einfachste und effektivste Methode, DNA-Fragmente voneinander zu trennen und zu identifizieren. Hierbei interkaliert Ethidiumbromid mit der DNA und wird durch Anregung im UV-Licht sichtbar gemacht.

Dadurch lässt sich der Erfolg der zuvor beschriebenen PCR kontrollieren. Man löst Agarose in 1 x TBE durch Erhitzen, fügt 10 µL Ethidiumbromid pro 100 mL Gel hinzu und gießt daraus mit Hilfe eines Kammes ein Gel mit Taschen. Eine geringe Menge (5 µL) des PCR-Produktes wird mit dem SSCP-Loadingbuffer versetzt und nach Erkalten des Gels in die Taschen pipettiert. Das beladene Gel wird in einer mit 1 x TBE befüllten Gelelektrophoresekammer einem definierten elektrischen Strom

ausgesetzt. Hierbei benutzte man die allgemeine Formel, das Gel für eine halbe Stunde (je nach Größe der Fragmente) bei 5 Volt pro cm Elektrodenabstand laufen zu lassen. Als molekularer Größenstandard wurde ein 100 bp-DNA-Größenmarker verwendet. Die so aufgetrennten PCR-Produkte wurden fotografiert und dokumentiert.

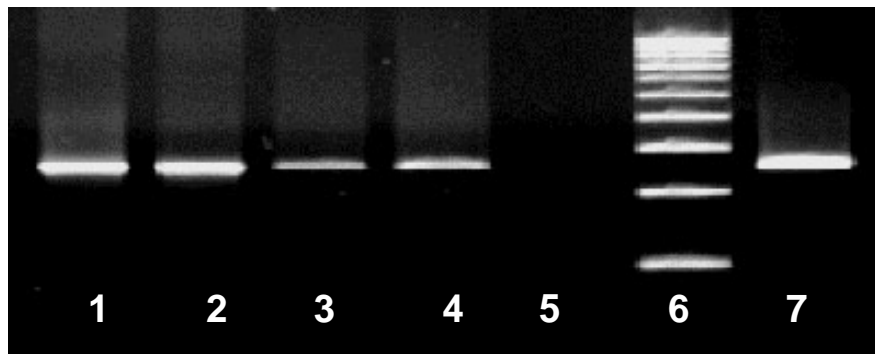


Abb. 7: Beispiel für PCR und Agarosegelelektrophorese.
 Spalten 1-4 und 7 zeigen PCR-Produkte mit einer Größe von etwa 260 bp in unterschiedlicher Intensität.
 Spalte 5 zeigt eine Wasserprobe als Kontrolle und Spalte 6 stellt einen Größenmarker dar.

5.3.4 Die SSCP-Analyse (Single Strand Conformation Polymorphism)

Die SSCP ist ein Ansatz der Gelelektrophorese, mit der sich Mutationen und Polymorphismen nachweisen lassen. Sie beruht auf dem Prinzip, dass die elektrophoretische Beweglichkeit eines Moleküls in der Gelmatrix von seiner Größe, Ladung und Form abhängt⁶⁵.

Schon ein einziger Unterschied in der Basensequenz zweier Nukleotideinzelstränge führt zu einer Änderung der Konformation und damit zu unterschiedlichen Laufeigenschaften.

Nach PCR-Amplifikation der einzelnen Fragmente wurde dem Ansatz ein Formamidhaltiger Ladepuffer zugesetzt. Die so vorbereiteten Proben werden bei 95°C für fünf Minuten erhitzt, wodurch eine Denaturierung der DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen erfolgt.

Die Vorbereitung der Gele erfolgte mit dem BioRad MultiLong System und der oben beschriebenen Gelstocklösung, die mit APS versetzt wird, welches zum Polymerisieren der Gele dient. Für ein Gel wurden 300 µL APS-Lösung 10%ig und 15 mL Gelstocklösung verwendet. Die fertige Mischung wird zwischen zwei mit

Isopropanol gesäuberte und zusammengesetzte Glasplatten gegossen. Nach der Polymerisation der Gele werden die Glasplatten in die zugehörigen Kammern eingesetzt. Diese werden mit 0,5 x TBE, der als Laufpuffer dient, befüllt.

Später werden die Gele mit den vorbereiteten Proben beladen. Die Elektrophorese wird jeweils mit 60 Volt parallel bei Raumtemperatur und 4°C für 16 Stunden durchgeführt.

Nach durchgeführter Gelelektrophorese erfolgt eine Silberfärbung der Gele. Hierbei macht man sich zu nutze, dass die positiv geladenen Silberionen mit der negativ geladenen DNA interagieren⁶⁶.

Durch Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber werden die Banden der DNA sichtbar gemacht.

Die Färbung erfolgt durch folgende Schritte in Glasschalen auf dem Schüttler:

- (1) Gele vorsichtig aus den Glasplatten lösen und in Ethanol für ca. 5 Minuten einlegen.
- (2) Ethanol absaugen und Gele in Salpetersäure für ca. 2 Minuten einlegen.
- (3) Salpetersäure absaugen und Gele in Silbernitratlösung für ca. 30 Minuten inkubieren.
- (4) Danach Gele dreimal kurz mit Aqua bidest. waschen.
- (5) Gele mit der Na₂CO₃/Formaldehyd-Mischung (600 mL/300 µL) zweimal ganz kurz (etwa 10 Sekunden) und einmal so lange waschen, bis die Banden gut sichtbar sind.
- (6) Lösung absaugen und mit Essigsäure für ca. 10 Minuten fixieren.
- (7) Die gefärbten Gele werden in Saran-Folie verpackt, beschriftet und ausgewertet sowie archiviert.

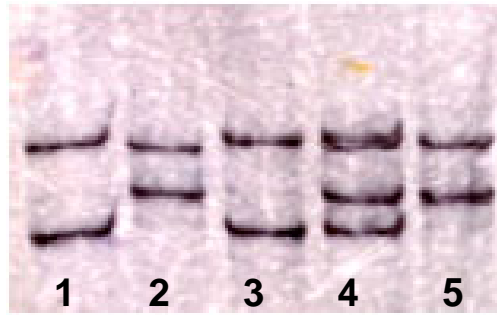


Abb. 8: Exemplarische SSCP-Analyse nach Silbernitratfärbung von 5 Patienten

- 1 und 3: homozygot mutierter Träger
- 2 und 5: homozygot nicht-mutierter Träger
- 4: heterozygoter Träger

5.3.5 Die Sequenzierung

Um mögliche Polymorphismen genau zu lokalisieren, bedient man sich der Sequenzierung. Dazu werden die Fragmente, die in der SSCP-Analyse unterschiedliches Migrationsverhalten zeigten, reamplifiziert. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden mit dem QiaQuick PCR-Purification Kit aufgereinigt.

Aufgereinigtes PCR-Produkt wird mit Primer (je einmal lower- und upper-Primer), bidest. Wasser und BigDye versetzt. Die Sequenzierung erfolgt nach dem Kettenabbruchprinzip nach Sanger. Dabei werden Didesoxynukleotide mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, mit dem gewünschten PCR-Produkt versetzt und einer zweiten PCR unterzogen. Der Einbau von ddNTP's führt zu einem zufälligen Abbruch der Sequenzierungsreaktion. Es entstehen unterschiedlich lange DNA-Ketten, die alle mit einer fluoreszenzmarkierten Base enden. Der Ansatz wird mittels Ethanolfällung aufgereinigt. Anschließend werden die DNA-Ketten in einer hochauflösenden, denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden während der Elektrophorese mittels Laser angeregt und können so gemessen und mit einer speziellen Software der Firma Applied Biosystems ausgewertet werden. Das Ergebnis der Sequenzierung erhält man dann in Form eines vierfarbigen Ausdruckes, eine Farbe für jede Base.

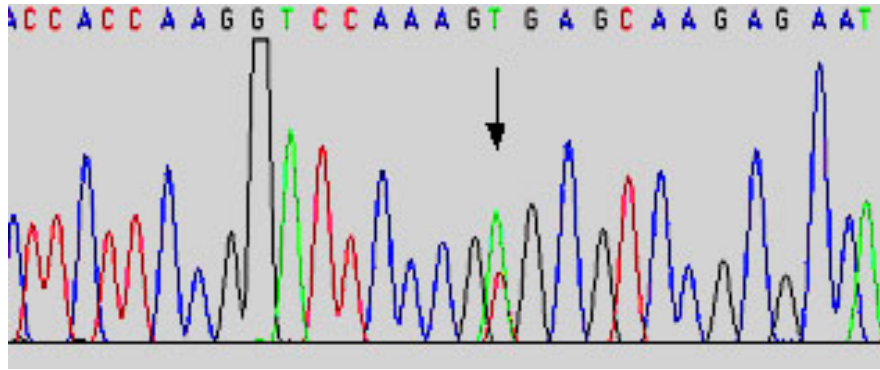


Abb. 9: Exemplarische Sequenzanalyse
Lokalisierung eines substitutiven Polymorphismus (T/C) mittels Sequenzierung.

5.3.6 Die Allel spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung

5.3.6.1 Dot-Blotting von PCR-Produkten zur Genotypisierung

Um die Häufigkeit der gefundenen Polymorphismen in den verschiedenen Studien festzustellen, bedient man sich der Dot-Blot-Analyse und der Hybridisierung mit allelspezifischen Oligonukleotiden. Für eine Dot-Blot-Analyse fixiert man denaturierte PCR-Amplikons auf einer Nylonmembran.

Zunächst wird das Fragment, welches den zu quantifizierenden Polymorphismus beinhaltet, in den einzelnen Studienpopulationen mittels PCR vervielfältigt. Danach erfolgt eine stichprobenartige Qualitätskontrolle der Amplikons mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese.

Im Anschluss werden 20 µL des PCR-Produktes mit 130 µL Denaturationslösung, versetzt mit Bromphenolblaulösung, vermischt. Die vorbereiteten und mit Denaturationslösung benetzten Nylonmembranen werden in die Dot-Kammern eingelegt. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde ein Vakuum aufgebaut, über welches die vorbereiteten 96 Proben punktförmig auf die Membran aufgebracht werden. Die fertig DNA-hybridisierten Membranen werden für mindestens 5 Minuten in 2 x SSC-Puffer neutralisiert und über Nacht zwischen Whatman-Papier getrocknet. Am nächsten Tag werden die Membranen bei 1200 kJ im Stratalinker dem UV-Licht ausgesetzt. Dadurch wird die DNA kovalent an die Membran gebunden.

5.3.6.2 Die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Ein allelspezifisches Oligonukleotid (Sonde) ist ein ca. 17 bp großes Oligonukleotid, das völlig komplementär zu einem der beiden Allele ist. Um bei der Allel spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung (ASO) festzustellen, ob die Sonde an der komplementären DNA gebunden hat, wird diese zuvor radioaktiv markiert. Dazu benutzt man eine T4-Polynukleotid-Kinase. Diese katalysiert den Transfer von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ an das 5'-Ende der dephosphorylierten DNA.

Um die Kinasierung durchzuführen wird folgender Standardansatz von 50 μL verwendet:

1 μL Primer (Sonde) 25 pM (17 bp)
5 μL 10 x Polynukleotid-Kinase Puffer
3 μL Polynukleotid-Kinase
5 μL $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$
36 μL Aqua bidestilliert

Protokoll 2: Kinasierung

Nachdem die angegebenen Substanzen vermischt wurden, folgt die Kinasereaktion in einem Wasserbad bei 37°C für 30 min. Die Reaktion wird dann in einem weiteren Wasserbad bei 65°C beendet.

5.3.6.3 Die Hybridisierung mit Allel-spezifischen Oligonukleotiden

Die zuvor vorbereiteten Membranen werden in der mit dem Kinasierungsansatz versetzten Hybridisierungslösung für mindestens 5 Stunden hybridisiert. Dies erfolgte im Schüttelwasserbad bei der wie folgt berechneten Temperatur:

$$T_m = [(G+C) \times 4 + (A+T) \times 2]$$

$$\text{Hybridisierungstemperatur} = T_m - 5^\circ\text{C}$$

Nach erfolgter Hybridisierung werden die Membranen zweimal mit 1 x SSC bei Raumtemperatur und einmal bei $T_m - 3^\circ\text{C}$ mit 0,5 x SSC gewaschen. Zur Auswertung werden die Membranen in einer Röntgenkassette mit einem Kodak BioMax-Film für 1 bis 12 Stunden (je nach Signalstärke des Counters) bei -80°C exponiert.

Zum Entfernen der radioaktiven Sonde auf der Membran wird diese einer Dehybridisierung unterworfen. Hierzu werden die Membranen in die 80°C heiße Dehybridisierungslösung gelegt und für 30 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert. Zum Entfernen der Dehybridisierungslösung werden die Membranen mit 0,1 x SSC-Puffer gewaschen.

Anschließend werden die Membranen mit der entsprechend nicht-mutierten Sonde hybridisiert.

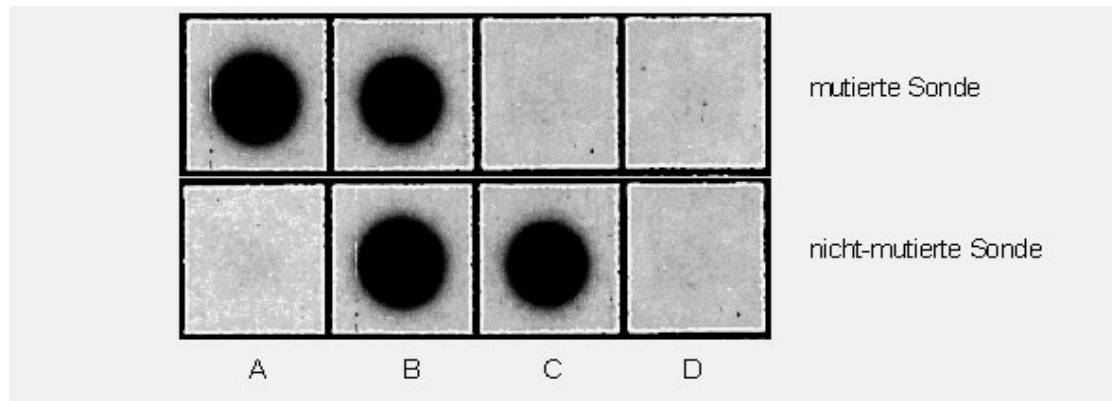


Abb. 10: Exemplarische ASO von 3 Patienten

- A: homozygot mutierter Träger
- B: heterozygot mutierter Träger
- C: homozygot nicht-mutierter Träger
- D: Wasserkontrolle.

5.3.7 Statistische Analyse

Die Daten wurden mittels statistical analysis software (SAS Institute Inc., Cary, N.C.) ausgewertet. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde mit einem χ^2 -Test und einem Freiheitsgrad in jeder Untergruppe überprüft. Genotyp und Allelfrequenzen wurden zwischen Patienten und Kontrollen sowie zwischen den einzelnen Studienzentren verglichen, ebenfalls mittels eines χ^2 -Tests.

Paarweise Kopplungsungleichgewicht-Koeffizienten wurden für die Kontrollgruppe mittels log-linearer Modell-Analyse²⁴ geschätzt.

Koeffizienten wurden als Verhältnis der nicht-standardisierten Koeffizienten zu deren minimalen/maximalen Werten ($|D'|$)^{67,68} angegeben. Das Vorzeichen vor dem jeweiligen Koeffizienten zeigt an, ob das Kopplungsungleichgewicht positiv (weniger frequente Allele vorzugsweise miteinander assoziiert) oder negativ (weniger frequente Allele vorzugsweise mit frequenten Allelen assoziiert) war.

Allel-Frequenzen wurden von Genotyp-Frequenzen abgeleitet. Genotyp- und Allel-Frequenzen wurden zwischen Patienten und Kontrollen in Frankreich und Nordirland

mittels eines χ^2 -Tests verglichen. Odds Ratios (ORs) und deren 95% Konfidenz-Intervalle (CI) wurden stets angegeben, die Homogenität der OR zwischen Frankreich und Nordirland, unter Berücksichtigung potentieller Interaktionsvariablen, welche in die jeweilige logistische Regression miteinbezogen wurden, geprüft.

5.3.8 Subklonierungen

Um unterschiedlich allele Promotoren der Neutrophilen Elastase zu amplifizieren wurde eine PCR von genomischer DNA der verschiedenen Patienten durchgeführt. Dabei handelte es sich um sogenannte Ankerprimer, die mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *XhoI* am 5'-Primer und *HindIII* am 3'-Primer konstruiert worden waren, um die Effizienz der sich anschließenden Subklonierung zu steigern. Das amplifizierte Fragment umfasst 1088 bp bzw. 1141 bp des bekannten Promotors bis zum Translationsstartpunkt. Der Amplifikationszyklus umfasste bei 95°C die übliche Denaturierung, Primeranlagerung bei 68°C und Extension mit einem abschließenden Syntheseschritt von 10 min. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchlaufen.

```

ELA2_prom upper 191CGCTCGAGCACTCGGAGCTCCTGGGGGA
                  Erkennungssequenz für XhoI

ELA2_prom lower 1279CGAAGCTTCTGGGGCTCCGGGGTCTCTG
                  Erkennungssequenz für HindIII

```

Abb. 11: Prinzip der DNA-Amplifikation mittels Ankerprimer

Die Anker beinhalten das Erkennungsmotiv der Restriktionsenzyme; der Überhang wird zur richtigen Anlagerung des Enzyms benötigt.

5.3.8.1 Subklonierung in den pGL3basic-Luziferase-Reportervektor

Um festzustellen, ob sich unterschiedlich allelen Promotoren in ihren Aktivitäten unterscheiden, wird sich Reportervektoren bedient. Bei einem Reportervektor handelt es sich um ein Plasmid, welches u. a. für ein Enzym, hier Luziferase, kodiert, das quantitativ eine Farbreaktion umsetzen kann. Ob und in welcher Menge in einer Zelle Luziferase synthetisiert wird, hängt linear von der Stärke des Promotorfragmentes ab, welches in der Subklonierung vor das Luziferase-Gen eingebracht wird. Da die Aktivität der Luziferase mittels einer enzymatischen Reaktion quantifiziert werden kann, bietet dieses System eine Möglichkeit, ein genomisches Fragment auf seine

fragliche Promotoraktivität hin zu prüfen. Dazu muss die zu untersuchende Sequenz zunächst in die zuvor linearisierte Vektor-DNA eingebaut werden. Dies erfolgt mittels einer DNA-Ligase unter Bildung einer Phosphodiesterbindung und wird als Ligation bezeichnet. Das genomische Fragment, welches nun Bestandteil des Plasmids ist, bezeichnet man als Insert. In einem zweiten Schritt werden die Plasmide in Bakterienzellen überführt. Dies wird als Transformation bezeichnet und dient dazu, durch Vermehrung des Gastbakteriums einen, hinsichtlich der Basenabfolge stabilen, Klon des interessierenden DNA-Abschnittes in großer Quantität zu erzeugen.

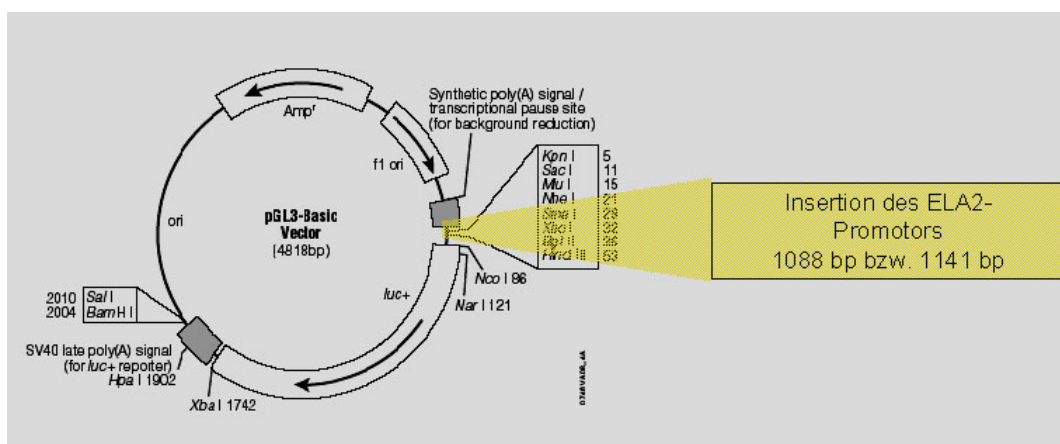


Abb. 12: Aufbau des Reportergens mit der Schnittstelle für das Promotorfragment
Dargestellt ist der pGL3-Basic Vector mit den zum Ausschneiden benötigten Enzymen sowie die Größe der einzubringenden Promotoren des ELA2 Gens

5.3.8.2 PCR und Verdau

Im Einzelnen wird zunächst die vorangegangene genomische PCR mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits von Qiagen nach den Herstellerangaben aufgereinigt und mit 30 μ L H₂O eluiert. Im Anschluss werden das PCR-Produkt und der pGL3-Reportervektor mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *HindIII* verdaut.

Danach erfolgt die Ligation zwischen PCR-Produkt und linearisiertem Plasmid.

5.3.8.3 Subklonierung der aufgereinigten DNA in den pGL3basic Vektor

8 μ L PCR-Amplifikat
+ 1 μ L *Xho*I
+ 1 μ L *Hind*III
+ 1 μ L Puffer 2
+ 0,1 μ L BSA
über Nacht Inkubation, 37°C

Protokoll 3: Verdau

1 μ L pGL3basic Vektor
+ 7 μ L PCR-Produkt
+ 1 μ L T4-DNA-Ligase
+ 1 μ L 10x Ligationspuffer
1. Inkubation über Nacht, 4°C
2. 10 min Ligase-Inaktivierung, 70°C

Protokoll 4: Ligation

5.3.8.4 Transformation von E. coli Bakterien

Die kommerziell erworbenen E. coli-Bakterien DH5 α sind bereits kompetent und werden bei -80°C aufbewahrt. In sterilen 1,5 mL-Reaktionsgefäßen werden 50 μ L Bakteriensuspension mit 1 μ L des Ligationsansatzes versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 20 Sekunden bei 37°C. Nach Zugabe von 900 μ L LB-Medium werden die Zellen mindestens eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wird in einer Menge von 100 μ L und 300 μ L auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

5.3.8.5 Plasmid-DNA Präparation im kleinen Maßstab (Mini-Prep)

Zur Isolation kleinerer DNA-Mengen, z.B. zum Nachweis der Klone mittels Enzymverdau, werden jeweils 10 Klone pro Agarplatte steril isoliert und in 3 mL LB-Medium in vorbereiteten Greiner-Röhrchen überführt.

Diese Vorkulturen werden bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. 2 mL der Zellsuspension werden abgenommen und bei 9000 g zentrifugiert. Die

anschließende DNA-Isolierung erfolgte gemäß dem Protokoll mit dem QiaSpin Miniprep-Kit.

Die gewonnene DNA wurde mittels UV-Spektrophotometer quantifiziert.

5.3.8.6 Plasmid-DNA Präparation im großen Maßstab (Maxi-Prep)

Ist das Ergebnis des Restriktionsverdau der Mini-Prep erfolgreich, wird eine Großkultur mit ca. 300 mL LB-Medium unter Zugabe von ca. 2 mL Starterkultur über Nacht bei 37°C im Schüttler angesetzt. Die anschließende DNA-Isolierung erfolgt gemäß dem Protokoll der Fa. Qiagen für das QiaSpin Maxiprep-Kit. Die gewonnene DNA wurde mittels UV-Spektrophotometer quantifiziert.

5.3.8.7 Restriktionsverdau von DNA

Die Verifizierung der DNA-Sequenzen der gewonnenen Plasmide erfolgte durch einen Enzym-Restriktionsverdau. Je nach Enzym werden 1 bis 5 Einheiten pro µg DNA eingesetzt. Der Verdau wird in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer, teilweise unter Zugabe von bovinem Serumalbumin (BSA), angesetzt und je nach Enzym bei 37°C oder 65°C über Nacht inkubiert.

Die entstandenen Fragmente werden durch Auftrennung über ein Agarosegel anhand der Größe qualifiziert.

5.4 Zellkultur

Die Zellen wurden in den entsprechenden Medien (s.o.) in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt. Bei allen benutzten Zelllinien fand das Wachstum adhärent statt. Zur Ernte wurden die Zellen mechanisch vom Boden der Kulturflasche gelöst.

5.4.1 Passagieren von Zellen

Das Medium wurde nach Ablösen der Zellen mit einem Zellschaber von der Flaschenwand abgesaugt und die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 50 mL Röhrchen überführt.

Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur (800 U/min, 5 min) wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 mL Medium resuspendiert. Im Anschluss fand eine Zählung der Zellen statt. Die Suspension wurde daraufhin auf mehrere Kulturflaschen so verteilt, dass eine Endkonzentration von $0,5 \times 10^5$ Zellen pro mL vorlag. Der Medienwechsel erfolgt alle zwei Tage.

5.4.2 Gewinnung von konditioniertem Medium für die murine Zell-Linie 32d

Die murine Zell-Linie 32d benötigt zum Wachstum murines Interleukin-3 (IL-3). Um dieses zu erhalten, wurde die WEHI3b Zell-Linie kultiviert, die IL-3 in das umliegende Medium abgibt.

Die WEHI-3B Feeder-Zellen wurden bis drei Tage nach Konfluenz weiter kultiviert. Das überstehende Medium wurde bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand steril filtriert. Diese Lösung wurde in einer Gesamtmenge von 10 % zu dem RPMI1640 Medium für die Kultivierung der 32d Zell-Linie hinzugefügt. Hierzu wurde eine Dosis-Findungskurve durchgeführt.

5.4.3 Transfektion mittels Elektroporation

Um die Aktivität der unterschiedlich allelen Promotoren des ELA2 Gens in eukaryontischen Zellen zu bestimmen, wurden in die oben genannten Zellen die Reportergenkonstrukte mit dem Ziel eingebracht, dass die unter Kontrolle des Promotors synthetisierte Luziferase in den Zielzellen exprimiert wird. Nach intensiver Literaturrecherche wurde der Elektroporationsansatz favorisiert, da mit allen anderen verfügbaren Methoden keine ausreichenden Transfektionseffizienzen bei den verwendeten Zelllinien zu erwarten waren.

Prinzipiell gilt, dass Zellen, die einem elektrischen Feld ausgesetzt sind, Poren in der Zellmembran öffnen, wobei die Plasmide zunächst ins Zytoplasma und daraufhin durch die Kernporen in den Zellkern gelangen, wo sie transkribiert werden können.

Die Zellen wurden gleichzeitig mit den Luziferase- und dem pSV-Galaktosidasevektor transfiziert. Mit dieser Methode wird die Luziferaseaktivität standardisiert und der systematische Fehler durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen eliminiert.

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen bei $0,5 \times 10^6$ Zellen/mL ausgesät und kultiviert, so dass sich am Tag der Transfektion die Zellen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befanden.

Die aufgenommene Zellsuspension wurde bei 600 g zentrifugiert und das überstehende Medium abgenommen. Anschließend wurde einmal mit PBS gewaschen und eine Zellzählung durchgeführt.

Die Zellen wurden mit zusatzfreiem Medium auf eine Endkonzentration von 2×10^7 Zellen/mL gebracht.

400 μ L dieser Zellsuspension wurde jeweils in eine sterile Elektroporationsküvette überführt und mit 15 μ g Plasmid-DNA sowie 15 μ g Kontrollplasmid versetzt. Die Küvette wurde mit einem Deckel verschlossen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Elektroporation bei 0,3 kV und 975 μ F.

Nach Beendigung der Transfektion wurde die Küvette nochmals 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin in eine 12-Well-Platte ausplattiert. Pro Well wurden 600 μ L komplettes Medium hinzugefügt und 24 Stunden im Brutschrank kultiviert.

5.4.4 Zellernte

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturplatten gelöst. Es folgte die Zentrifugation bei 14.000 U/min und 4°C für 2 min sowie die Übertragung des Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß. Anschließend konnte die Luziferase- oder Galaktosidaseaktivität gemessen werden.

5.4.5 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz wurde durch Transfektion der entsprechenden Zellen mit green fluorescent protein (GFP)-Plasmid bestimmt. Dabei werden die Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das grün fluoreszierende Farbe emittiert. Die Messung dieses Proteins fand im Fluorescence activated cell sorting (FACS-Scan) statt.

5.4.6 Bestimmung der Galactosidase-Aktivität

Die Zellen aus dem Transfektionsversuch wurden in ein steriles Reaktionsgefäß aufgenommen und bei 40 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 x Reporter Lysis-Puffer versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur vollständigen Lyse wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und wieder aufgetaut.

Das Zellysate wurde 50 Minuten bei 48°C inkubiert und 10 µL des so vorbereiteten Lysates wurden mit Galacton 70 µL versetzt sowie 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Daraufhin erfolgt die Messung unter automatischer Zugabe von 100 µL Accelerator im Luminometer.

Prinzip der Aktivitätsbestimmung von Galaktosidase: Galacton wird enzymatisch durch Galaktosidase gespalten. Bei dieser Umwandlung wird Licht emittiert und gemessen.

5.4.7 Bestimmung der Luziferase-Aktivität

Die Zellen aus dem Transfektionsversuch wurden in ein steriles Reaktionsgefäß aufgenommen und bei 40 g zentrifugiert. Anschliessend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 x Reporter Lysis-Puffer versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur vollständigen Lyse wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und wieder aufgetaut.

20 µL des gewonnenen Zellysates werden in ein Messröhrchen gegeben. Die Messung erfolgt unter automatischer Zugabe von 100 µL Luciferase Assay Substrate im Luminometer.

Prinzip der Aktivitätsbestimmung von Luziferase: Luziferin wird enzymatisch durch die aus dem Leuchtkäfer gewonnene Luziferase gespalten. Bei dieser Umwandlung wird Licht emittiert, das gemessen werden kann (Abb. 13).

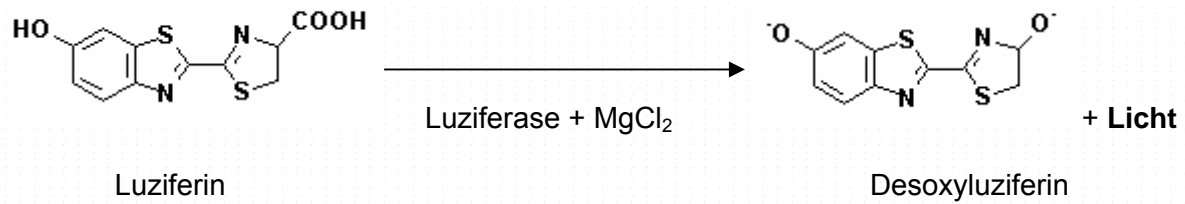


Abb. 13: Prinzip der Lichtemission von Luziferin

Bei der Zugabe von Luziferase und $MgCl_2$ zu Luziferin findet eine enzymatische Umsetzung zu Desoxyluziferin und Licht statt. Die Menge des Lichts ist proportional zur Menge der Luziferase und kann quantitativ gemessen werden.

Relative Luziferaseaktivität: Die Transfektionseffizienz wurde durch die Kotransfektion mit einem β -Galaktosidaseplasmid pro Ansatz standardisiert.

5.5 RNA-Experimente

5.5.1 RNA-Isolierung aus HL60 Zellen

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus den kultivierten Zellen erfolgte mittels RNeasy Mini Kit nach Herstellerprotokoll. Die RNA-Integrität wurde mit Hilfe der Elektrophorese in einem Agarosegel kontrolliert. Konzentration und Reinheit wurden im Spektrophotometer bestimmt. Für die Konzentration der RNA gilt dabei:

Extinktion bei 260 nm x Verdünnungsfaktor x 40/1000 x $\mu g/\mu L$ = μg RNA/ μL .

Einen Anhalt über die Reinheit der RNA erhält man durch den Quotienten aus den Absorptionen bei A260 nm / A280 nm, der zwischen 1,7 und 1,9 liegen sollte.

5.5.2 Synthese von cDNA durch reverse Transkription

Dazu wurden zunächst 5 μg RNA einem DNase-Dau zugeführt, um die Verunreinigung durch genomische DNA möglichst gering zu halten (Protokoll 5). Danach folgte die eigentliche reverse Transkription, d.h. die Synthese eines DNA-Moleküls anhand einer RNA-Matrize (Protokoll 6).

x µL	= 5 µg RNA	Inkubation im Wasserbad:
2,50 µL	10 x RQ1-Puffer	1. 37°C, 15 min
1,25 µL	MgCl ₂ (50 mM)	2. 65°C, 10 min
0,25 µL	DNase RQ1	
ad 25 µL	DEPC-H ₂ O	

Protokoll 5: DNase-Dau

25,00 µL	DNase-Verdau	Reaktionsbedingungen:	
1,25 µL	RNasin (40 U/µL)	1. 20°C	10 min
10,00 µL	5 x First Strand Puffer	2. 37°C	60 min
5,00 µL	DTT (100 mM)	3. 95°C	5 min
5,00 µL	dNTPs (10 mM)	4. 4°C	5 min
2,50 µL	Hexamer Primer (100 mM)		
1,00 µL	SuperScript Reverse Transkriptase (200 U/µL)		
0,25 µL	DEPC-H ₂ O		

Protokoll 6: Reverse Transkription

Die in der reversen Transkription generierte cDNA wurde im Anschluß mittels PCR auf die Existenz eines ELA2-spezifischen Transkriptes überprüft. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese im 1%igen Agarosegel aufgetrennt, die DNA-Banden mittels Anregung im UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert. Intronüberspannende Primer und ein RT-Minus-Ansatz (RT-), d.h. ein RT-Ansatz ohne Zugabe der reversen Transkriptase, schlossen dabei eine mögliche DNA-Kontamination aus. Falsch positive PCR-Banden wurden durch eine H₂O-Probe ermittelt.

Die eingesetzten Primer

Sense 5'-CTGGGAGCCCATAACCTCTC-3'

Antisense 5'-GCTGGCGATCCCACGGTTCC-3'

überspannen ein Intron und ergeben ein genomisches Signal von 2402 bp. Auf der RNA ergibt sich ein Amplifikat von 250 bp.

5.6 Nomenklatur identifizierter Polymorphismen

- a) Polymorphismen in der *5' Region* werden ab dem Translationsstartpunkt rückwärts gezählt. Bsp.: G-761A betrifft einen Austausch von G nach A in der 761. Base aufwärts vom ATG.
- b) Polymorphismen in *translatierten Exons* werden ausgewiesen als Codonnummer und der ausgetauschten Aminosäure. Bsp.: Arg50His betrifft dabei einen Austausch von Arginin nach Histidin im 50. Codon.
- c) Polymorphismen in *Introns* werden beziffert durch ein Positivzeichen vom Start des Introns aus. Bsp.: C+29/In3T betrifft also die 29. Base im Intron 3.