

## 3. Methoden

### 3.1. DNA-Präparation

Plasmidisolierungen werden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim, H.C. and Doly, J.; 1979) mit dem QIAprep<sup>®</sup> Kit von Qiagen durchgeführt. Um bakterielle Endotoxine, die eine Transfektion stören können, auszuschließen, wird DNA für Transfektionen mit dem Endofree QIAprep<sup>®</sup> Kit von Qiagen präpariert.

Genomische DNA wird mit der Phenol/Chloroform Methode (Sambrook, J. et al., 1989) aus Zellkernen extrahiert. Dazu wird vorher ein RNA-Verdau mit RNaseA (20 µg/ml Endkonzentration) für 30 Minuten bei 37°C durchgeführt, und der Ansatz mit ProteinaseK (50 µg/ml Endkonzentration) und SDS (0.25 %) über Nacht bei 37°C inkubiert.

Das Probenvolumen wird mit 1 x TE auf 100 µl aufgefüllt, zweimal mit einem Volumen Phenol und einmal mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Die entstehenden Phasen werden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 12000 g getrennt. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc und 3 Volumen -20°C-kaltem 100 % Ethanol wird die DNA für mindestens eine Stunde bei -20°C ausgefällt. Durch Zentrifugation bei 17000 g für 20 Minuten bei 4°C wird die DNA pelletiert und kann anschließend in 100 µl 10 mM Tris/HCl, pH > 7.0 resuspendiert werden. Lagerung der DNA Lösung ist bei 4°C möglich.

### 3.2. DNA-Analyse

#### 3.2.1. Messung der DNA-Konzentration und Restriktionsverdau

Die Photometrie ist eine Möglichkeit, um DNA-Konzentrationen bestimmen zu können (Sambrook, J. et al., 1989). Hierzu wird die optische Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt, bei der Wellenlänge, wo DNA ein Absorptionsmaximum besitzt. Die DNA-Menge von 1 OD<sub>260 nm</sub> beträgt 50 µg/ml. Aus dem Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm lassen sich Rückschlüsse auf die Güte der DNA ziehen. Eine Protein- und Phenol-freie Nukleinsäure-Lösung zeigt ein

Verhältnis  $OD_{260\text{ nm}} : OD_{280\text{ nm}}$  von 1,8 - 2,0.

Eine andere Methode stellt der direkte Vergleich auf einem Agarosegel dar. Hierzu wird die zu bestimmende DNA-Probe mit einer DNA-Menge bekannter Konzentration aufgetragen. Nach Ethidiumbromid-Färbung wird die unbekannte Probe mit der bekannten verglichen und die Konzentration abgeschätzt.

Mit 10 - 20 U Restriktionsenzym werden 1 - 2  $\mu\text{g}$  DNA (10  $\mu\text{g}$  bei genomischer DNA) in einem Volumen von 30  $\mu\text{l}$  bei  $37^\circ\text{C}$  in 1 - 2 Stunden oder über Nacht inkubiert. Der Restriktionspuffer richtet sich nach den Angaben der Vertriebsfirmen. Beim Doppelverdau können die Restriktionsenzyme nacheinander oder zusammen inkubiert werden. Dabei ist auf einen kompatiblen Puffer zu achten. Sind die Restriktionsbedingungen für zwei Restriktionsenzyme nicht kompatibel, so wird die DNA nach dem ersten Verdau wie unter 3.1. beschrieben ausgefällt und für den zweiten Verdau resuspendiert.

Die DNA wird mit Hilfe von horizontalen Agarosegelen aufgetrennt, wobei sich die Konzentration der Agarose nach Größe der zu trennenden DNA-Moleküle richtet. Als Laufpuffer wird 1 x TAE verwendet. Das Gel wird mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid (Endkonzentration) versetzt, um die DNA-Moleküle unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt für etwa 1 - 2 Stunden bei 50 V (bei genomischer DNA über Nacht). Anschließend wird das Gel auf einer *digit-STORE duo* UV-Photoanlage der Firma INTAS photographiert und dokumentiert.

### 3.2.2. Southern Blot

Die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente werden zweimal für 20 Minuten in Denaturierungspuffer depuriniert. Die Nylonmembran, auf die die DNA übertragen werden soll, wird 5 Minuten in Denaturierungslösung äquillibriert. Der Southern Blot wird wie folgt aufgebaut (Abb. 5):

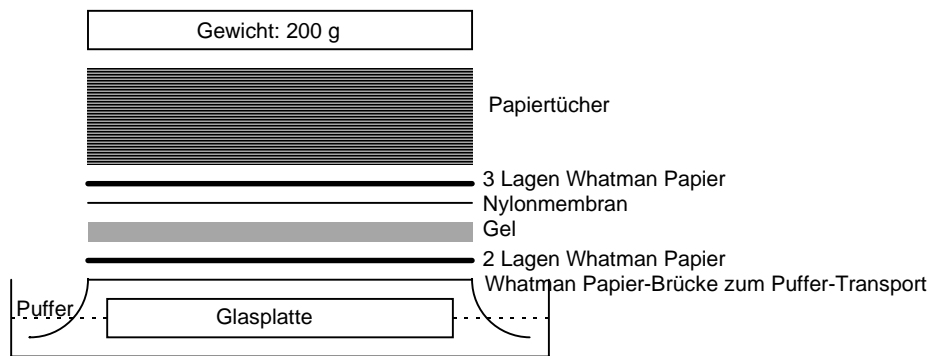


Abb. 5: Southern Blot (aus Sambrook *et al.*, 1989)

Nach dem Transfer (über Nacht) wird die Nylonmembran 5 Minuten in Neutralisierungslösung neutralisiert und für 30 Minuten auf Whatman-Papier getrocknet. Durch Bestrahlen mit UV-Licht ( $160 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) wird die DNA an die Membran fixiert.

### 3.2.3. Radioaktive Markierung und Hybridisierung

Die „Random prime“-Methode beruht auf der Neusynthese an Zufallsprimern, wobei die neuen DNA-Moleküle über  $\alpha\text{-}^{32}\text{-P}$  - dNTPs radioaktiv markiert werden (Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.; 1983). Die Markierung wird mit dem *Megaprime-labelling Kit* von Amersham/Pharmacia Biotech durchgeführt.

Um die nicht eingebauten Nukleotide abzutrennen, wird eine DNA-Fällung durchgeführt. Die Fällung erfolgt mit  $170 \mu\text{g}/\text{ml}$  tRNA (Hefe) als Co-Präzipitat,  $10 \text{ mM}$  EDTA und  $50 \text{ mM}$  NaOAc in  $70 \%$  Ethanol für 30 Minuten bei  $-20^\circ\text{C}$ . Die ausgefallene Nukleinsäure wird für 20 Minuten bei Raumtemperatur und  $12000 \text{ g}$  zentrifugiert. In  $200 \mu\text{l}$   $1 \times \text{TE}$  wird das Pellet aufgenommen und für 5 Minuten bei  $95^\circ\text{C}$  denaturiert. Die Probe wird für Hybridisierungen sofort verwendet.

Hybridisiert wird über Nacht bei  $65^\circ\text{C}$  in rotierenden Glasflaschen. Der Blot wird etwa 4 - 5 Stunden in PSB-Puffer bei  $65^\circ\text{C}$  vorhybridisiert und äquillibriert. Die unspezifischen Hybridisierungen werden mit einer Waschlösung ( $0.5 \times \text{SSC}$ ,  $0.1 \%$  SDS) bei  $65^\circ\text{C}$  entfernt. Bei Bedarf wird dieser Waschvorgang mehrmals wiederholt, stringenter Bedingungen mit  $0.3 \times \text{SSC}$  oder  $0.2 \times \text{SSC}$  können, falls

erforderlich, verwendet werden. Der gewaschene Blot wird in Klarsichtfolie eingeschlagen und auf einem Röntgenfilm (Kodak, Xomat) exponiert. Je nach Strahlungsintensität zwischen mehreren Stunden bis mehreren Tagen oder Wochen. Um bestimmte Strahlungsintensitäten quantifizieren zu können, wird der eingeschlagene Blot auf einer Phosphoimager-Platte exponiert und mit einem Phosphoimager (Fuji, BASImager) ausgewertet.

Bei der Endmarkierungsmethode wird mit Hilfe der Polynukleotidkinase die endständige Phosphatgruppe des ATP auf das 5'-Phosphatende des Oligonukleotids übertragen.

Ansatz:	50 ng	Oligonukleotid
	1,0 µl	Kinase (10 U/µl)
	1,5 µl	10x Kinase Puffer
	2,5 µl	$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP
	ad 15 µl	steriles Wasser

Inkubation erfolgt bei 37°C für eine Stunde. Für 5 Minuten bei 65°C wird die Kinase inaktiviert. Die Oligos werden über *MicroSpin<sup>TM</sup>G-25* Säulen von Amersham/Pharmacia Biotech gereinigt.

#### 3.2.4. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wird nach der Didesoxymethode (Sanger, F. et al., 1977) mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Primern (Smith, L.M., et al., 1986) durchgeführt. Eine DNA-Polymerase verlängert die Primer mit den vier dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) entlang einer einzelsträngigen Matrize in einer Sequenzreaktion. Der zufällige Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) führt zu einem Kettenabbruch, und es entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge, die auf einem Gel für alle vier Nukleotide aufgetrennt und mit einem Automaten ausgewertet werden.

Mit dem *LI-COR DNA Sequencer 4200* von MWG Biotech, München, wurde

sequenziert und mit dem *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* von Amersham Pharmacia Biotech wird die Sequenzreaktion mittels PCR und Sequenzierprimern (T7-800 und U19-800) durchgeführt.

PCR Bedingungen:	95°C	2 Minuten	
	95°C	15 Sekunden	30x
	60°C	15 Sekunden	
	70°C	20 Sekunden	
	4°C	unbegrenzt	

Auf einem denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel werden die Proben aufgetrennt. Denaturierung der Proben vor dem Auftragen erfolgt für 3 Minuten bei 70°C.

Polyacrylamidgel:	21 g	Harnstoff (Endkonzentration: 12,3 mM)
	28 ml	destilliertes Wasser
	5 ml	10 x TBE (LI-COR)
	7,5 ml	RapigGel™-XL-40%-Konzentrat (USB)
	500 µl	DMSO (99,9 %)
	→ Steril filtrieren und entgasen	
	Nach Zugabe von 50 µl TEMED und 350 µl APS (10%) wird die Lösung mit einer Spritze aufgenommen und durch einen Sterilfilter (0,45 µm) das Gel gegossen.	

### 3.2.5. Zellkern-Präparation und DNaseI-Verdau

Die Präparation erfolgt nach dem beschriebenen Prinzip von Enver et al. 1985. Pro Ansatz werden  $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  Säugerzellen geerntet, für 5 Minuten bei 1500 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird einmal in dem jeweiligen Zellkulturmedium ohne Zusatz von fötalem Kälberserum gewaschen. Resuspendierung des Zellpellets erfolgt in 720 µl eiskaltem Lyse-Puffer und wird in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Der lysierte Ansatz wird für 15 Minuten bei 0°C und 2900 g zentrifugiert. Mit 800 µl eiskaltem Puffer A wird das Pellet resuspendiert und bei 0°C und 1000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Resuspendierung des Kernpellets erfolgt in eiskaltem Puffer A, so daß eine Konzentration von  $1 \times 10^4$  Kerne/µl entsteht.

Pro Ansatz werden  $1 \times 10^6$  Kerne mit verschiedenen Konzentrationen von DNaseI (10 U/µl) behandelt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Abbruch des DNaseI-Verdau erfolgt durch Zugabe von EDTA (10 mM Endkonzentration).

Nach DNA-Präparation und Restriktionsverdau werden die Proben auf einem Agarosegel aufgetrennt.

### 3.3. Klonierung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte werden mit dem „Perfectly blunt cloning“ Kit (Novagene) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip dieses Kits liegt in dem Verdau und der Prozessierung der überhängenden Enden, die bei einer PCR entstehen, so werden alle PCR-Fragmente in einer „End-conversion“ Reaktion zu Blunt-End-Fragmenten und können kloniert werden.

Um bereits klonierte DNA-Vektor-Konstrukte zu transformieren, werden kompetente Bakterien wie folgt hergestellt:

Mit einer frischen Kolonie des gewünschten Bakterienstammes impft man 5 ml TYM-Medium an und schüttelt (200-250 rpm) es für zwei Stunden bei 37°C. Damit werden 100 ml TYM-Medium angeimpft und für weitere 2 - 3 Stunden geschüttelt, bis eine Optische Dichte  $OD_{600 \text{ nm}}$  von 0.5 erreicht ist. Durch

Zentrifugation bei 1500 g für 5 Minuten und bei 4°C werden die Bakterien pelletiert. Das Pellet wird in 20 ml Tfb1-Medium resuspendiert und für 20 - 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Inkubationsdauer entscheidet über die Transformationseffizienz und ist bei verschiedenen Bakterien unterschiedlich. Die Zellen werden bei 1500 g für 5 Minuten und bei 4°C zentrifugiert und in 4 ml eiskaltem Tfb2-Medium mit eiskalten Pipettenspitzen resuspendiert und auf Trockeneis in Aliquots abgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

Für die Transformation werden 100 µl kompetente Bakterien mit etwa 100 ng Plasmid in ein vorgekühltes Röhrchen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert, damit die DNA an die Zellen adsorbieren kann. Für die aktive Aufnahme der DNA in die Zellen wird ein Hitzeschock bei 42°C für 5 Minuten durchgeführt, anschließend werden die Zellen mit 1 ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium versetzt. Der Ansatz wird für 30 - 45 Minuten bei 37°C geschüttelt (200-250 rpm), um den Resistenzmarker auszubilden. Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum werden mit 30 µl IPTG (20 mg/ml) und 30 µl X-Gal (20 mg/ml) ausgestrichen. Die Bakterien werden ausplattiert und bei 37°C über Nacht kopfüber inkubiert. Damit sich der blaue Farbstoff besser ausbilden kann, werden die Agarplatten für ein paar Stunden auf 4°C gestellt.

### 3.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur Anreicherung großer Mengen spezifischer DNA-Fragmente mit definierter Länge und Sequenz aus einer kleinen Menge eines komplexen Gemisches. Die gewünschte DNA-Sequenz wird durch Erhitzen in die Einzelstränge zerlegt und mit Hilfe von Primern, Desoxyribonukleotiden und einer DNA-Polymerase enzymatisch kopiert. Die so erhaltene DNA wird in sich wiederholenden Reaktionszyklen erneut als Matrize für eine DNA-Synthese eingesetzt (Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1988; Mullis und Faloona, 1987).

#### 3.4.1. PCR-Bedingungen

Für einen PCR-Ansatz werden 100 ng DNA, 25 pmol jedes Primers, 100 pmol jedes Nukleotids und der jeweilige 5 x oder 10 x PCR-Puffer mit sterilem Wasser auf 49 µl aufgefüllt. Es wird 5 Minuten bei 94°C denaturiert, anschließend zentrifugiert und auf Eis 1 - 2 U Taq-Polymerase hinzugefügt. Die PCR wird in verschlossenen PCR-Reaktionsgefäßen (Biozym) und einer PCR-Maschine von Perkin-Elmer 2900 durchgeführt.



## PCR-Programme:

PCR für Exon 2 von <i>ε-Globin</i> :  1. 30 Sek. 94°C 2. 1 Min. 55°C 3. 1 Min. 72°C 4. 30 Zyklen (1-3) 5. 7 Min. 72°C 6. ∞ 4°C	PCR für 133 bp Promotor P1 Fragment:  1. 30 Sek. 94°C 2. 1,5 Min. 57°C 3. 1,5 Min. 72°C 4. 30 Zyklen (1-3) 5. 5 Min. 72°C 6. ∞ 4°C
PCR für RACE mit zwei <i>LMO2</i> spezifischen Primern (MR12 und MR10):  1. 1 Min. 94°C 2. 1,5 Min. 58°C 3. 1,5 Min. 72°C 4. 35 Zyklen (1-3) 5. 7 Min. 72°C 6. ∞ 4°C	PCR für RACE mit SMART und <i>LMO2</i> spezifischen Primer (MR10):  1. 1 Min. 94°C 2. 1,5 Min. X°C (X = 45°C - 68°C) 3. 1,5 Min. 72°C 4. 35 Zyklen (1-3) 5. 7 Min. 72°C 6. ∞ 4°C
PCR für RACE mit SMART und <i>LMO2</i> spezifischen Primer (MMP2_long oder MMP1_long):  1. 1 Min. 94°C 2. 1,5 Min. 61°C 3. 1,5 Min. 72°C 4. 35 Zyklen (1-3) 5. 7 Min. 72°C 6. ∞ 4°C	PCR für RACE mit SMART und <i>Cathepsin D</i> spezifischen Primer (BRP4):  1. 1 Min. 94°C 2. 1,5 Min. 59°C 3. 1,5 Min. 72°C 4. 35 Zyklen (1-3) 5. 7 Min. 72°C 6. ∞ 4°C
PCR für Aktin  1. 1 Min. 94°C 2. 1,5 Min. 59°C 3. 1,5 Min. 72°C 4. 35 Zyklen (1-3) 5. 7 Min. 72°C 6. ∞ 4°C	

Andere PCR-Bedingungen richten sich nach den Angaben des Herstellers der verwendeten PCR-Kits.

### 3.4.2. RT-PCR und RACE (*Rapid amplification of cDNA ends*)

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase lassen sich mRNA-Moleküle in cDNA-Moleküle umschreiben, die dann in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden können. Um Sekundärstrukturen in der mRNA auszuschließen, die eine reverse Transkription inhibieren können, wird diese Reaktion bei 55°C und 60°C durchgeführt. Die Aktivität der Reversen Transkriptase wird durch eine hohe Zuckerkonzentration (hier Trehalose) im Ansatz bei diesen hohen Temperaturen, nach einem bis heute unbekanntem Mechanismus, aufrechterhalten (Carninci, P. et al., 1998)

Reverse Transkription: 1 µg Poly(A)-mRNA oder 10 µg Gesamt-RNA  
 100 nmol p(dN)<sub>6</sub> (Hexadesoxynukleotide)  
 Trehalose (0.6 M Endkonzentration)  
 Mit DEPC-behandeltem Wasser auf 10 µl auffüllen

Der Ansatz wird 10 Minuten bei 65°C zum Denaturieren inkubiert und dann wird auf Eis folgendes hinzugefügt: 2 µg BSA, 20 U RNasin, 200 nmol DTT, 10 nmol dNTPs, 5 x Puffer (Gibco BRL) und 200 U Superskript II Enzym (Gibco BRL). Auf insgesamt 20 µl wird mit DEPC-behandeltem Wasser aufgefüllt.

Anschließend wird für 5 Minuten bei 37°C inkubiert, damit die Primer binden können und dann für 5 Minuten bei 45°C. Der Ansatz wird nun in einer PCR-Maschine (Perkin Elmer 2900) nach folgendem Programm inkubiert:

2 Minuten bei 60°C

2 Minuten bei 55°C, das Ganze wird 10 x wiederholt.

Die so erhaltene cDNA kann für PCR-Analysen eingesetzt werden.

Mit Hilfe des SMART™ PCR-cDNA-Amplification Kit (Clontech) lassen sich 5'- und 3'-RACE's (*Rapid amplification of cDNA ends*) durchführen. Zur Identifizierung unbekannter 5'- oder 3'- Enden von Genen ist diese Methode besonders hilfreich. In einer reversen Transkription werden nicht die o. a. p(dN)<sub>6</sub>-

Primer verwendet, sondern spezifische Anker-Primer die an das Poly(A)-Ende der mRNA binden, oder an das (dC)<sub>3</sub>-Ende, das durch die Terminale-Transferase-Aktivität der Reversen Transkriptase an den Erststrang synthetisiert wird. Dabei entstehen spezifische Enden, die in einer PCR mit Gen-spezifischen Primern und Primern für die Anker-Sequenz an den jeweils zu interessierenden Enden amplifiziert werden.

Die RACE wurde wie im Kit vom Hersteller beschrieben durchgeführt, abweichend wurde in Anwesenheit von 0.6 M Trehalose gearbeitet. Als Reverse Transkriptase wurde die Superskript II von Gibco BRL (200 U) mit dem Hersteller-Puffer verwendet.

Für die PCR wird der G/C-PCR Kit (Clontech) verwendet, in dem ein spezielles Taq-Polymerase-Gemisch und ein spezieller Puffer mitgeliefert wird, der Sekundärstrukturen, hervorgerufen durch G/C-reiche Sequenzen, unterdrückt. Die PCR-Bedingungen richten sich nach Angaben des Herstellers.

Zur Puffer-Optimierung wird der PCR-Optimizer-Kit von Invitrogen verwendet. Mit ihm ist es möglich, z. B. Mg<sup>2+</sup>-Konzentration und pH-Wert zu optimieren.

Der auch verwendete Marathon-Ready™ cDNA Kit (Clontech) besitzt bereits eine fertige cDNA-Bibliothek, an denen die Anker angekoppelt sind. Diese cDNA-Bibliothek kann sofort in eine PCR-Reaktion eingesetzt werden. Die Anker-Primer sind mitgeliefert.

### 3.5. EMSA und Supershift-Assay

Einer der wichtigsten Punkte in der Kontrolle der Genexpression ist die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische Stellen im Promotor oder anderen regulatorischen Elementen der Gene (Dyanan, W.S. and Tjian, R., 1985). DNA-Sequenzen, die *in vitro* von Proteinen aus Zellkern-Extrakten gebunden werden, können mittels EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*) identifiziert werden, basierend auf dem Prinzip, daß Protein-DNA-Komplexe ein anderes Laufverhalten im Gel zeigen als DNA Fragmente allein (Fried, M. and Crothers, D.M., 1981; Henninghausen, L. and Lubon, H., 1987; Varshavsky, A., 1987).

In einem Reaktionsgefäß werden 1 - 2 ng radioaktiv markiertes Oligonukleotid oder DNA-Fragment mit 1 µg Poly dI\*dC und 10 µg Kernprotein-Extrakt oder 1 - 10 ng gereinigtes Protein auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Mit Bindepuffer (EMSA) wird das Reaktionsvolumen auf 30 µl aufgefüllt.

Auf einem nativen Polyacrylamidgel werden die DNA-Protein-Komplexe aufgetrennt. Ein sogenannter „Käfig-Effekt“ innerhalb der Gelmatrix verhindert, daß sich die Komplexe voneinander lösen (Fried, M. and Crothers, D.M., 1981; Varshavsky, A., 1987). Die Unterschiede in der Migration der Protein-DNA-Komplexe im Vergleich zur DNA allein lassen sich schwer vorhersagen, da sie abhängig sind von der Masse der Proteine und der DNA, der Ladung der Proteine, mögliches „bending“ der DNA und der Gelzusammensetzung und Konzentration (Lane, D. et al., 1992).

Trenngel (5 %):	6,25 ml Acrylamid/Bis-acrylamid (29:1) 40 %
	2,5 ml 10 x TBE (EMSA)
	375 µl APS (10 %)
	41,4 ml steriles Wasser
	10 µl TEMED

Eine Gelspur wird mit DNA-Ladepuffer versehen, um einen Anhaltspunkt zu haben, wie weit die Komplexe gewandert sind. Die Komplexe selbst werden nicht angefärbt, da mögliche Veränderungen in den Protein-DNA-Bindungen nicht ausgeschlossen werden können. Aufgetrennt wird mit 120 V bei 4°C für etwa 2 -

3 Stunden, bis der blaue Farbstoff des Ladepuffers das untere Drittel des Gels erreicht hat. Anschließend wird das Gel herausgenommen, in einem Geltrockner unter Vakuum getrocknet und auf einem Röntgenfilm exponiert.

Mit spezifischen Antikörpern können einige Proteine, die an der im EMSA untersuchten Interaktion beteiligt sind, identifiziert werden. Dieser sog. Supershift-Assay wurde beispielsweise für c-Fos und Jun-D (Li, Y. and Jaiswal, A.K., 1994), CREB, ATF2 und Rel-A (Xu, X. et al., 1996) und SP1 (Kao, W.Y. et al., 1997) erfolgreich gezeigt.

Dazu werden in einem Reaktionsgefäß 1 - 2 ng radioaktiv markiertes Oligonukleotid oder DNA-Fragment mit 1 µg Poly dI\*dC und 10 µg Protein-Extrakt auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Mit Bindepuffer (EMSA) wird das Reaktionsvolumen auf 30 µl aufgefüllt. Anschließend werden 1 - 5 µl spezifischer Antikörper dazugegeben und für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Die Proben werden auf einem nativen Gel (wie für EMSAs beschrieben) aufgetrennt.

### 3.6. RNA-Präparation

Zwei verschiedene RNA-Präparationen werden durchgeführt, die Poly(A)-mRNA-Extraktion mit dem „QuickPrep<sup>®</sup> *Micro* mRNA Purification“-Kit (Amersham/Pharmacia) und der Gesamt-RNA-Präparation nach Chirgwin et al., 1979.

Beim Poly(A)-mRNA-Extraktions-Kit werden  $1 \times 10^7$  Zellen bei 1500 g für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und in einem Extraktionspuffer resuspendiert, wobei die Zellen mit Guanidinthiocyanat aufgeschlossen werden. Die mRNA-Moleküle werden über ihre Poly(A)-Enden an Oligo(dT)-Cellulose gebunden. Anschließend werden durch verschiedene Waschpuffer mit abnehmenden Salzkonzentrationen alle überschüssigen Zellbestandteile entfernt. Über eine Säule mit einem Elutionspuffer werden die mRNA-Moleküle eluiert und können durch Zugabe von 10 µl Glycogen, 40 µl KOAc (1 M) und 1000 µl 100 % EtOH (-20°C), Ü/N bei -20°C ausgefällt werden. Pelletiert wird bei 12000 g für 30

Minuten und 4°C. Das Pellet wird in DEPC-behandeltem Tris/Cl, pH 7.8 aufgenommen und bei -80°C gelagert.

Für die Gesamt-RNA-Extraktion werden  $5 \times 10^8$  -  $1 \times 10^9$  Zellen in ein 50 ml-Gefäß überführt und 10 Minuten bei 1500 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird einmal in 1 x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen werden in 25 ml Guanidinthiocyanat (4 M) resuspendiert und in einen eisgekühlten Homogenisator transferiert. Für 30 Sekunden werden die Zellen homogenisiert, um die DNA zu zerkleinern, das Homogenisat läßt sich sonst nicht pipettieren. In einem 38.5 ml Ultra-Clear™-Tube (Beckmann) werden 8 ml CsCl-Lösung vorgelegt und anschließend der Überstand vorsichtig darauf transferiert. Die CsCl-Lösung darf nicht verwirbeln. Die Gefäße werden vor dem Zentrifugieren sorgfältig austariert. Die Zentrifugation erfolgt für mindestens 16 Stunden bei 20000 rpm und 20°C in einem SW 27 Rotor (Beckmann).

Nach der Zentrifugation ergeben sich mehrere Phasen (Abb. 6)

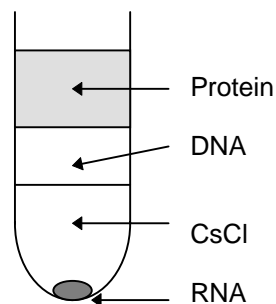


Abb. 6: Phasen nach der Ultrazentrifugation von Gesamt-RNA.

Die Proteinphase wird vorsichtig in kreisförmigen Bewegungen abgenommen bis die Lösung viskos wird, dort beginnt die DNA-Phase. Protein- und DNA-Phase können bei -80°C im Ethanol/Trockeneisbad eingefroren werden, wobei die DNA-Phase mit 1 x TE auf 25 ml aufgefüllt wird. Die CsCl-Lösung wird entsorgt. Das Röhrchen wird vorsichtig innen abgetrocknet, ohne die RNA zu berühren. Das RNA-Pellet wird mit 1 ml 70 % Ethanol (DEPC) (-20°C) gewaschen, ohne das Pellet zu lösen. Die RNA wird in 500 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc (DEPC) pH 5.0 und

2 Volumen Ethanol (100%) wird die RNA bei -20°C über Nacht ausgefällt. Durch Zentrifugation bei 12000 g für 30 Minuten wird die RNA bei 4°C pelletiert. Abhängig von der Pelletgröße wird die RNA in 100 µl oder mehr 1 x TE (DEPC) resuspendiert. Die OD-Messung wird in Wasser durchgeführt und wie folgt berechnet:

$$OD_{260/280} = 1.8-2.0 \qquad \frac{OD_{260} \times \text{Verdünnung}}{24} = c_{\text{RNA}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

### 3.7. Formaldehyd-Gel, Northern Blot und Hybridisierung

In der Mikrowelle werden 1,5 g Agarose in 132 ml DEPC-behandeltem Wasser und 15 ml 10 x MOPS-Puffer aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hat (1,0 % Agarose). Nachdem diese auf etwa 50°C abgekühlt ist, werden 2,4 ml Formaldehyd (37 %, 12,3 M, pH >4) und 15 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) dazugegeben (Endkonzentrationen: 200 mM Formaldehyd, 1 µg/ml Ethidiumbromid) und das Gel vorsichtig gegossen.

Gleiche Mengen RNA (10 µg bei Gesamt-RNA, 2 µg bei Poly(A)-RNA in 5 µl Volumen) werden gemischt mit 15 µl Formamid, 1 µl Formaldehyd, 3 µl 10 x MOPS-Puffer und 6 µl RNA-Ladepuffer. Formaldehyd quervernetzt Proteine und inaktiviert damit auch RNasen im Gel, Formamid bricht Wasserstoffbrücken auf und erschwert die Bildung von Sekundärstrukturen. Die Proben werden 15 Minuten bei 65°C denaturiert, schnell auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wird 1 x MOPS-Puffer verwendet. Die Auftrennung erfolgt über Nacht bei 4°C und 20 - 40 V, bis die Bromphenolblau-Bande das untere Drittel des Gels erreicht hat. Unter UV-Licht können die Banden der 28 S und 18 S ribosomalen RNA (rRNA) identifiziert werden. Sie geben Auskunft über die Qualität der RNA-Präparation und die Genauigkeit der Konzentrationsabschätzung.

Das Gel mit den zu transferierenden RNA-Proben wird 5 Minuten in sterilem Wasser geschüttelt und anschließend über Nacht mit 10 x SSC auf die Membran

(Schleicher und Schüll) transferiert. Der Aufbau des Blots erfolgte nach Frisch et al., 1989.

Nachdem die Membran mit den RNA-Proben vom restlichen Gel befreit wurde, erfolgt eine UV-Bestrahlung der RNA-Seite der Membran ( $0,16 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ), um die Proben kovalent zu fixieren. Ein zweistündiges Backen des Blots bei  $80^\circ\text{C}$  vertreibt das überschüssige Formaldehyd.

Zum Hybridisieren wird eine DNA-Probe wie unter 3.2.3. beschrieben radioaktiv markiert und denaturiert. Die Membran wird in einer rotierenden Glasflasche für 4 - 5 Stunden bei  $65^\circ\text{C}$  in Hybridisierungslösung (Northern) vorhybridisiert und äquillibriert. Nach Proben-Zugabe wird über Nacht hybridisiert und die unspezifischen Hybridisierungen werden mit einer Waschlösung ( $0.5 \times \text{SSC}$ ,  $0.1\%$  SDS) bei  $65^\circ\text{C}$  entfernt. Die Waschdauer und eine mögliche stärkere Stringenz richten sich nach der Strahlungsintensität.

### 3.8. Kernprotein-Präparation und Dialyse

Für die Kernprotein-Präparation (modifiziert nach Dignam, J.D. et al., 1983 und Briggs, M.R. et al., 1986) werden alle Arbeiten auf Eis oder bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt. Dazu schabt man etwa  $10^7 - 10^8$  Zellen von der Kulturplatte ab (bei adherenten Zellen) oder gibt sie direkt (bei Suspensionszellen) in ein 50 ml-Gefäß. Anschließend werden die Zellen für 10 Minuten bei 1500 g zentrifugiert und das Pellet einmal mit  $1 \times \text{PBS}$  gewaschen und erneut zentrifugiert.

Resuspendierung des Pellets erfolgt in 4 ml Puffer H und man läßt die Zellen 30 Minuten auf Eis anschwellen. Danach werden die Zellen im „Dounce“ Homogenisator (Pistil B) mit 20 Schlägen geöffnet. Die so erhaltenen Zellkerne pelletiert man für 10 Minuten bei 2500 g. Eine Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$  ist möglich.

Zur Gewinnung der Kernprotein-Extrakte nimmt man die Kerne in 1 ml Puffer D auf und überführt sie in ein 2 ml-Reaktionsgefäß. Der Reaktionsansatz wird 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  langsam aber stetig gewendet. Anschließend überführt man die lysierten Kerne in ein Ultrazentrifugenröhrchen und zentrifugiert eine Stunde bei 24000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  in einem SW 27 Rotor (Beckmann). Der Überstand wird gemessen und das Volumen notiert. Das Pellet wird verworfen. Das Einfrieren des



Überstandes erfolgt in einem Trockeneis/Ethanol-Bad und kann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Für Proteingele kann der Ansatz über Dialyse auch entsalzt werden.

Vor Beginn der Dialyse werden die Dialyseschläuche vorbereitet, indem sie 10 Minuten in 100 mM Na-EDTA-Lösung (pH 7,0) gekocht und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht in 10 mM Na-EDTA-Lösung (pH 7,0) inkubiert werden. Gelagert werden sie in 50 % Ethanol und sind vor der Verwendung mit destilliertem Wasser zu reinigen.

Proteine langsam auf Eis auftauen lassen, zwischenzeitlich den gereinigten Dialyseschlauch unten abklemmen. Proteinlösung einfüllen und Schlauch oben abklemmen. Über Nacht unter Rühren in einem Liter Dialysepuffer im Kühlraum ( $4^{\circ}\text{C}$ ) dialysieren. Den dialysierten Extrakt in ein 15 ml-Gefäß überführen und abzentrifugieren. Volumenänderung (vor und nach der Dialyse) notieren, und den Überstand im Ethanol/Trockeneisbad aliquotieren und einfrieren bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.9. Zellkultur

#### 3.9.1. Säugerzellen in Kultur, Mycoplasmandetektion und Färbung

Die HEK293-Zellen sind immortalisierte, humane, embryonale Nierenzellen (Epithelzellen), die NIH3T3-Zellen sind immortalisierte Mausepithelzellen und die COS-7-Zellen sind immortalisierte Affennierenzellen, die als Monolayer wachsen. Sie werden in Dulbecco's MEM, 10 % fötales Kälberserum, 1 x Glutamin und 1 x Penicillin/Streptomycin bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in einem feuchten Brutschrank gezüchtet. Zum Umsetzen werden sie durch Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturschale gelöst.

Die HEL-Zellen sind humane erythroide Leukämie-Zellen und die K562-Zellen sind humane CML (Chronisch myeloide Leukämie) -Zellen. Sie werden in RPMi-Medium, 10 % fötales Kälberserum, 1 x Glutamin und 1 x Penicillin/Streptomycin bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in einem feuchten Brutschrank gezüchtet. Die immortalisierten humanen B-Zellen wachsen in Iscove's MEM, 10 % fötales Kälberserum, 1 x Glutamin und 1 x Penicillin/Streptomycin bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in einem feuchten Brutschrank.

Da Mycoplasmen die Zellkultur nachhaltig schädigen können, werden alle verwendeten Zelllinien mit dem Mycoplasma-PCR-ELISA-Kit von Roche untersucht. Dazu wird eine Probe aus dem Zellüberstand genommen und ein PCR-Test durchgeführt. Als Positivkontrolle dient mitgelieferte Mycoplasmen-DNA.

Um Suspensionszellen fixieren zu können, müssen sie vor dem Ausstreichen für 5 Minuten bei 1500 g und 4°C pelletiert werden. Das Pellet wird in einem kleinen Volumen (50 - 250 µl) fötalen Kälberserums aufgenommen und ein Ausstrich auf einen Glas-Objektträger gemacht. Nachdem die Zellen kurz angetrocknet werden, stellt man den Objektträger in eine Glas-Küvette mit -20°C kaltem Aceton für etwa 10 Minuten und inkubiert bei -20°C. Anschließend wird der Objektträger getrocknet. Nachdem der Objektträger einmal 1 Minute in bidestilliertem Wasser gewaschen wurde, kann er im trockenen Zustand bei Bedarf mit Entellan (Roth) eingedeckt und mit einem Deckgläschen verschlossen werden.

### 3.9.2. Transfektion

Für die transienten Transfektionen von COS-7-Zellen und NIH3T3-Zellen werden Plasmid-DNA-Präparationen verwendet, die mit dem QIAGEN „Endotoxin Free Plasmid Maxi“ Kit präpariert sind. Die Durchführung der Transfektionen erfolgt nach der Methode von Graham und Van der Eb (modifiziert nach Graham, F.L. and Van der Eb, A.J., 1973).

Am ersten Tag werden  $3 \times 10^5$  Zellen pro 60 mm ( $\varnothing$ ) Zellkulturschale in Transfektionsmedium angesetzt. Transfektionsmedium für COS-7-Zellen ist das Optimem, für NIH3T3-Zellen das Dulbecco's MEM.

Am zweiten Tag wird die zu transfizierende DNA verdünnt auf 40  $\mu\text{g/ml}$  mit HBS-Lösung pro Zellkulturschale. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 1.25 M  $\text{CaCl}_2$  präzipitiert die DNA über ihre Phosphatgruppen mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Der Ansatz wird kurz gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die präzipitierte DNA wird kurz mit einer Pipette resuspendiert und 20  $\mu\text{g}$  DNA werden zu jeder Zellkulturschale gegeben, um sich an die Zellen zu heften. Nach einer Inkubation von 3 - 6 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  wird das DNA-Präzipitat abgeschüttet und die Zellen werden mit 5 ml Dulbecco's MEM (ohne Zusätze) gewaschen. Für die Glycerol-Behandlung werden 4 ml HBS mit 10 % Glycerol auf die Zellen gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die optimale Glycerol-Konzentration und Inkubationszeit muß für jede Zelllinie ausgetestet werden (10 % Glycerol und 20 Minuten bei NIH3T3-Zellen, 15 % Glycerol und 10 Minuten für COS-7-Zellen). Anschließend wird alle Flüssigkeit von der Zellkulturschale abgesaugt. Etwa 5 ml Dulbecco's MEM (ohne Zusätze) werden auf die Zellen gegeben und unter dem Mikroskop sind die Zellrundungen nach etwa 10 - 20 Minuten zu identifizieren. Die Zellen nehmen nun die DNA auf, da die Zellmembran durch die Anschwellung porös wird. Nach Entfernen der Flüssigkeit wird frisches Dulbecco's MEM (10 % FKS, 1 x P/S, 1 x Glutamin) auf die Zellen gegeben und bei  $37^\circ\text{C}$  für 48 Stunden inkubiert.

### 3.9.3. Reporter-Gen/Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay wird mit dem „Firefly Luciferase“-Kit von Promega durchgeführt.

Bei Kombination mit einem zweiten Reporter-Gen (hier  $\beta$ -Galaktosidase) wird der Reporter-Lyse-Puffer verwendet. Eine Standard-Kurve wird mit verschiedenen Konzentrationen von  $\beta$ -Galaktosidase erstellt.

Für den Standard-Assay (60 mm Zellkulturschale) wird das Zellkultur-Medium entfernt und die transfizierten Zellen zweimal mit 1 x PBS vorsichtig gespült. Auf die Zellen werden 400  $\mu$ l 1 x Reporter-Lyse-Puffer gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden mit einem Zellschaber (Greiner) abgeschabt und in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß transferiert. Nach 10 - 15 Sekunden Vortexen wird für zwei Minuten bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß gegeben. Der Extrakt kann bis zur weiteren Verwendung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Für den Assay werden 20  $\mu$ l vom Zellextrakt bei Raumtemperatur mit 100  $\mu$ l Luciferase-Reagenz gemischt. Muß der Extrakt auf Eis gemischt werden, nimmt die Luciferase-Aktivität um bis zu 10 % ab. Die Probe wird sofort in einem Luminometer vermessen. Die Lichtmessung sollte zwischen 10 Sekunden und 5 Minuten erfolgen, da die Halbwertszeit des Produktes bei 5 Minuten liegt.

Die Co-Transfektion mit  $\beta$ -Galaktosidase dient als interner Standard und gibt später Auskunft über die Transfektionseffizienz im direkten Vergleich mit der Luciferase-Aktivität. Für den  $\beta$ -Galaktosidase-Assay werden alle Komponenten aufgetaut und vor dem Gebrauch gut durchmischt. Der  $\beta$ -Galaktosidase-Assay-2x-Puffer wird eiskalt verwendet. Eventuell müssen die Zellextrakte (je nach Transfektionseffizienz und exprimiertem Reporter-Gen) in 1 x Reporter-Lyse-Puffer verdünnt werden. Bis zu 150  $\mu$ l Zellextrakt können verwendet werden. Als Negativkontrolle werden Zellextrakte verwendet, die nicht mit  $\beta$ -Galaktosidase transfiziert wurden. In die Reaktionsgefäße werden 150  $\mu$ l Zellextrakt (oder Verdünnung) vorgelegt und nach Zugabe von 150  $\mu$ l Assay-2x-Puffer schnell

gemischt. Es erfolgt nun eine Inkubation bei 37°C für 30 Minuten, bis sich eine feine gelbe Färbung entwickelt. Die Farbentwicklung dauert bis zu 3 Stunden an. Wenn die Enzymaktivität gering ist, können die Proben auch über Nacht inkubiert werden. Der Reaktionsstop erfolgt mit 500 µl 1 M Natriumcarbonat. Die Absorption wird bei 420 nm gemessen.

Mit dem käuflichen β-Galaktosidase-Enzym (Promega) wird eine Standard-Kurve zwischen 1 mU und 10 mU Enzymaktivität angelegt. Die Ansätze für die Standardkurve werden wie die Proben behandelt.

#### 3.9.4. *Sense-/Decoy-Assay* mit PTOs

Die Phosphothioate (PTOs) werden vor ihrer Verwendung durch „Annealing“ doppelsträngig gemacht. Dazu werden 25 µg jedes PTOs in 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0 gelöst. Der Ansatz wird nun 10 Minuten bei 95°C denaturiert und über Nacht bei der jeweiligen „Annealing“-Temperatur renaturiert. Alle Arbeiten werden im Dunkeln durchgeführt.

Vor der PTO-Behandlung werden  $1 \times 10^7$  Zellen pro Ansatz in eine Zellkulturflasche gegeben, in der sich RPMi-Medium ohne FKS befindet. Nach einer Stunde Äquillibrierung werden die doppelsträngigen PTOs in den erforderlichen Konzentrationen zu den Zellen gegeben. Die Zellen werden nach 5 Stunden Inkubation bei 37°C mit 1 ml FKS versetzt. Eine Poly(A)-mRNA-Präparation erfolgt nach Beendigung des Experimentes.

Die Transfektion der PTOs mit FuGENE (Roche), DAC-30 (Eurogenetech) und Transfectam (Promega) wird in Gegenwart von Serum nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Für jeden Ansatz von 2 ml Zellkultur verwendet man 1 - 2 µg DNA, das Volumen der DNA-Lösung sollte zwischen 0.5 und 10 µl liegen. Inkubation erfolgt je nach Dauer des Experiments bei 37°C.

### 3.10. Bioinformatik

Die sequenzierten genomischen DNA-Fragmente (BamHI/BglII, BamHI/NcoI, BglII/BglII und BglII/KpnI) aus dem P1-Bereich von *LMO2* wurden mit verschiedenen Computerprogrammen untersucht.

Die Rohsequenz wird mit dem BCM Search Launcher (Smith, R.F. et al., 1996) auf bereits bekannte Sequenzen hin untersucht und mit dem MatInspector (Quandt, K. et al., 1995) auf potentielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen analysiert.