

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

H9c2-Kardiomyoblasten (ATCC, Rockville, USA) wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (Bio-Whittaker, Verviers, Belgien; mit 4,5 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃, 1mM Natriumpyruvat) unter Zusatz von Penicillin/Streptomycin (Bio-Whittaker, Verviers, Belgien; 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin), 10% fetalem Kälberserum und 4mM L-Glutamin (Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland) kultiviert.

3.2 Rattenembryonen – Herzenlagen

Die isolierten embryonalen Rattenherzanlagen wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. Stefan Klug, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Freie Universität Berlin, zur Verfügung gestellt.

Eine Übersicht über die Zeitpunkte, zu denen die Herzenlagen aus den Rattenembryonen gewonnen wurden, gibt die Tabelle 3.1.

Tab.3.1:Untersuchte Herzenlagen von Rattenembryonen

Versuchs-Nr.	Embryonaltag	Gewebe (in vivo)
K015-99	Tag 10	Herzanlagen (gepoolt)
K026-99	Tag 10,5	Herzanlagen (gepoolt)
K016-99	Tag 11	Herzanlagen (gepoolt)
K032-99	Tag 11,5	Herzanlagen (gepoolt)
K033-99	Tag 12	Herzanlagen (gepoolt)
K034-99	Tag 12,5	Herzanlagen (gepoolt)
K027-99	Tag 13	Herzanlagen (gepoolt)

3.3 Humanes Gewebe

Das kardiale Gewebe wurde intraoperativ von Patienten mit angeborenen Herzfehlern (Tabelle 3.2) gewonnen. Die Erlaubnis zur Bearbeitung des humanen Gewebes wurde durch die Ethikkommission der Humboldt-Universität Berlin erteilt. Die Patienten bzw. deren Eltern hatten zuvor schriftlich ihr Einverständnis erklärt.

Tab. 3.2: Untersuchtes humanes Herzgewebe von Patienten mit angeborenen Herzfehlern

Pat.-Nr.	Alter zum Zeitpunkt der OP	Vitium cordis	Gewebe
1	0 1/12	Hypoplastisches Linksherzsyndrom	Vorhof
2a 2b	0 1/12	PA, Kein VSD, MAPCAs	Vorhof Ventrikel
3	0 1/12	d-TGA, VSD, ISTA (Hypoplasie)	Aortenisthmus
4a 4b	0 5/12	AS, ASD I, ASD II, Trikuspidalkleft	Ventrikel Vorhof
5a 5b	0 7/12	VSD, PFO	Ventrikel Vorhof
6a 6b	0 8/12	VSD	Ventrikel Vorhof
7a 7b 7c	0 9/12	TA, d-TGA, perimembranöser VSD, hypoplastischer Aortenbogen, Tod auf IPS, DHZB	Vorhofseptum Ventrikel Vorhof
8a 8b	0 9/12	VSD	Ventrikel Vorhof
9a 9b	0 10/12	VSD, PS	Ventrikel (Ausflußtrakt) Vorhof
10a 10b 10c	3 1/12	AVSD, PS	Ventrikelendokard Ventrikel Vorhof
11	3 10/12	ASD II	Ventrikel

Pat.-Nr.	Alter zum Zeitpunkt der OP	Vitium cordis	Gewebe
12a 12b	10 5/12	VSD, Infundibulektomie	Ventrikel (Ausflußtrakt) Vorhof
13a 13b	11 4/12	TOF, pulmonale Hypoplasie, MAPCAs	Ventrikel Vorhof
14a 14b	13	DORV, subaortaler VSD, LVSC	Ventrikel Vorhof
15	13 6/12	perimembranöser VSD, subaortale Membran, AI III. Grades	Ventrikel
16	17 3/12	TA, d-TGA, valvuläre PS, rudimentärer RV, ASD II	Ventrikel
17a 17b	20 3/12	perimembranöser VSD ohne Malalignment, ASD II	Ventrikel Vorhof
18a 18b	27 7/12	d-TGA, perimembranöser VSD, ASD II, valvuläre PS, komplette Lungen- venenfehlöffnung in VCI, RCX und LCX aus linkem dorsalem aortalen Sinus	Ventrikel Vorhof
19a 19b	46 9/12	perimembranöser VSD ohne Malalignment, Trikuspidalcleft, subvalvuläre AS	Ventrikel Vorhof

Abkürzungen:

AI – Aortenklappeninsuffizienz; AS – Aortenklappenstenose;
 ASD I/II – Vorhofseptumdefekt vom Primum-/Sekundumtyp; DHZB –
 Deutsches Herzzentrum Berlin; DORV – „Double outlet right ventricle“;
 IPS – Intensivpflegestation; ISTA – Aortenisthmusstenose; LCX/RCX –
 linke/rechte Koronararterie; LVSC – linkspersistierende obere Hohlvene;
 MAPCA – „mean aorto-pulmonal collateral artery“; PA – Pulmonal-
 klappenatresie; PFO – persistierendes Foramen ovale; PS – Pulmonal-
 klappenstenose; TA – Trikuspidalklappenatresie; d-TGA – Transposition
 der großen Gefäße; TOF – Fallotsche Tetralogie; VCI/VCS – Vena cava
 inferior/superior; VSD - Ventrikelseptumdefekt

Zum Vergleich wurde kommerziell erworbene Poly-A+-RNA aus gesunden

adulten und fetalen Herzen (Clontech, Palo Alto, CA 94303, USA) verwendet.

3.4 Gewebepräparation

3.4.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA - sowohl aus Zellkulturen als auch aus menschlichem und Rattengewebe - erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Chromczynski und Sacchi (1987) mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN, HILDEN, DEUTSCHLAND). Die Herzgewebeproben wurden in Puffer RLT (im Kit mitgeliefert) mit einem Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, Deutschland) mechanisch homogenisiert. Die Viskosität der Zellysate wurde dann durch die Benutzung von Mikropistills weiter reduziert.

H9c2-Zellen wurden in Puffer RLT lysiert und mit einer 20-G-Nadel (Insulinspritze) homogenisiert. Die eigentliche RNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des „RNeasy-Mini-Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Gesamt-RNA wurde mit 50 µl sterilem, RNasefreiem Wasser eluiert und anschließend für 15 Minuten bei 37°C mit RQ1 DNase (Promega, Madison, USA) behandelt.

Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA-Menge wurde über die Bestimmung der optischen Dichte (OD) mit einem UV-Spektralphotometer mit festen Wellenlängen (UV-1202, UV-Vis-Spectrophotometer, Shimadzu) gemessen. Die Proben wurden 1:20 bzw. 1:50 in RNasefreiem Wasser verdünnt und die optische Dichte gemessen. Neben der Konzentration der Gesamt-RNA lieferte die photometrische Messung anhand des Verhältnisses der optischen Dichte bei 260 bzw. 280 nm (Verhältnis der RNA- zur Protein-Konzentration) auch ein Maß für die Reinheit der Präparation.

Im Anschluß an die RNA-Präparation wurde ein DNase-Dau von bis zu 5 µg RNA mit 0.5 µl RQ1-DNase (1 U/µl, Promega, Madison, USA), 5 µl 10x PCR-Puffer, 2.5 µl (50 mM) MgCl₂ in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 15 min bei 37°C und anschließend für 10 min bei 65°C (zur Inaktivierung des Enzyms)

durchgeführt.

3.4.2 Protein-Extraktion

Die Zellen wurden in PBS geerntet und in hypotonem Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10% IGEPAL CA-630 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und Zentrifugation wurde der Überstand, der die zytosolischen Proteine enthält, dekantiert. Die Kernproteine wurden anschließend durch Inkubation des Pellets mit hypertonem Puffer und anschließender Zentrifugation isoliert.

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem DC-Protein-Assay (BioRad, München, Deutschland) laut Angaben des Herstellers und dem Mikrotiterplatten-Lesegerät MRX (Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland) bei 750 nm.

Protokoll: Isolierung von zytosolischen und nukleären Proteinen

- Zellen (1 Zellkulturflasche (175 cm²)) mit 25 ml kaltem PBS waschen und in 10 ml eiskaltem PBS abkratzen; 10 min bei 800 U/min bei 4°C zentrifugieren; Überstand absaugen
- für 30-60 min bei -80°C einfrieren und anschließend schnell bei Raumtemperatur auftauen
- Zellen in kaltem P1-Puffer resuspendieren (2 ml pro Zellkulturflasche, (175 cm²)) und 15 min auf Eis inkubieren
- 75 µl 10% IGEPAL CA-630 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) zugeben und 10 s vortexen
- 10 min bei 10.000g bei 4°C zentrifugieren
- den Überstand, der die zytosolischen Proteine enthält abnehmen und bei -80°C einfrieren
- das Pellet, das die Kerne enthält, in 1,0 ml Puffer P1 waschen, um das restliche IPEGAL zu entfernen; 10 min bei 10.000 g bei 4°C zentrifugieren, den Überstand jetzt verwerfen
- das Pellet in 500 µl Puffer P2 vollständig resuspendieren und 90 min bei 4°C schüttelnd inkubieren
- 30 min bei 13.000 g (4°C) zentrifugieren
- den Überstand, der die Kernproteine enthält abnehmen und bei -80°C einfrieren
- Puffer P1 (hypotonischer Puffer, der die Zellen, nicht jedoch die Kerne zum Platzen bringt)

10ml		Endkonzentration:
1000 µl	100 mM Hepes-KOH; pH 7.9	10 mM

10ml		Endkonzentration:
1000 µl	100 mM KCl	10 mM
100 µl	10 mM EGTA, pH 8	0,1 mM
200 µl	50 mM DTT	1 mM
400 µl	Complete Lösung 25x (Proteinaseinhibitor)	1x
7300 µl	H ₂ O	

- **Puffer P2** (Kernextraktionspuffer; hypertotonischer Puffer)

4 ml		Endkonzentration:
400 µl	100 mM HEPES-KOH; pH 7.9	20 mM
500 µl	Glycerin	25%
200 µl	4 M NaCl	400 mM
200 µl	10 mM EGTA	1 mM
40 µl	50 mM DTT	1 mM
80 µl	Complete Lösung 25x (Roche Molecular Biochemicals)	1x
580 µl	H ₂ O	

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT/PCR) ist eines der sensitivsten Verfahren zum Nachweis der Genexpression. Sie dient der Amplifizierung spezifischer RNA-Sequenzen, v.a. zum Nachweis und der Analyse seltener Transkripte. Zunächst wird mit der RNA als Matrize eine cDNA erstellt, die in der sich anschließenden PCR als Matrize dient.

Verwendet wurde das Sensiscript-RT-Kit (QIAGEN, HILDEN, DEUTSCHLAND), das für die cDNA-Synthese nur RNA-Mengen von 30 bis 50 ng benötigt. Die

reverse Transkription wurde hier mit 40 ng Gesamt-RNA bzw. poly-A+-RNA (adultes und fetales Herz; Clontech) durchgeführt.

Protokoll: Reverse Transkription mit dem Sensiscript-RT-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

- RNA (0,04 µg pro Ansatz) bei 65°C 5 min inkubieren, sofort auf Eis stellen
- sog. Mastermix ansetzen:

10x RT-Buffer	2 µl pro Ansatz
dNTP (je 5 mM)	2 µl pro Ansatz
Oligo-dT-Primer (10 mM)	2 µl pro Ansatz
RNasin (10 U/µl)	1 µl pro Ansatz
Sensiscript RT (10 U/µl)	1 µl pro Ansatz
RNAse-freies Wasser	ad 20 µl pro Ansatz (abzüglich des Volumens der RNA)
RNA (0,04 µg)	x µl

- Mastermix auf die Anzahl der benötigten Tubes aufteilen
 - RNA dazu pipettieren, kurz vortexen und zentrifugieren
 - 1h bei 37°C dann 5 min bei 93°C, danach sofort auf Eis stellen
-

3.5.2 PCR mit cDNA als Matrize

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al. 1988) wurde 1987 von Mullis entwickelt und ermöglicht die in vitro-Herstellung von millionenfachen Kopien einer bestimmten Sequenz. So wird schon die Analyse geringster DNA-Mengen ermöglicht.

Das Prinzip der PCR beruht auf einer in vitro-Nachahmung des Ablaufes der natürlichen Replikation, wobei als Startermoleküle synthetisierte DNA-Oligonukleotide (Primer) dienen, die an eine Matrizen-DNA hybridisieren. Von ihrem 3'-Ende aus beginnt die Synthese eines neuen DNA-Doppelstranges durch eine DNA-Polymerase. Durch die Verwendung gegenläufiger Primer – „sense“ - (besitzt die gleiche Basensequenz wie der kodierende Strang der DNA-Doppelhelix) und „antisense“ - (bindet am sense-Strang der DNA-Doppelhelix, ist also komplementär und antiparallel zu diesem) - kann gezielt

die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Entscheidend ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte – Denaturierung der DNA-Doppelstränge, Annealing, d.h. Primerhybridisierung, und Elongation durch die DNA-Polymerase, die zu einer exponentiellen Amplifikation führt. (Abb. 3.1).

Verwendung findet die PCR bei der Vervielfältigung eines spezifischen Sequenzabschnittes zur Klonierung, zum Nachweis einer bekannten Sequenz oder bei der Herstellung von Hybridisierungssonden.

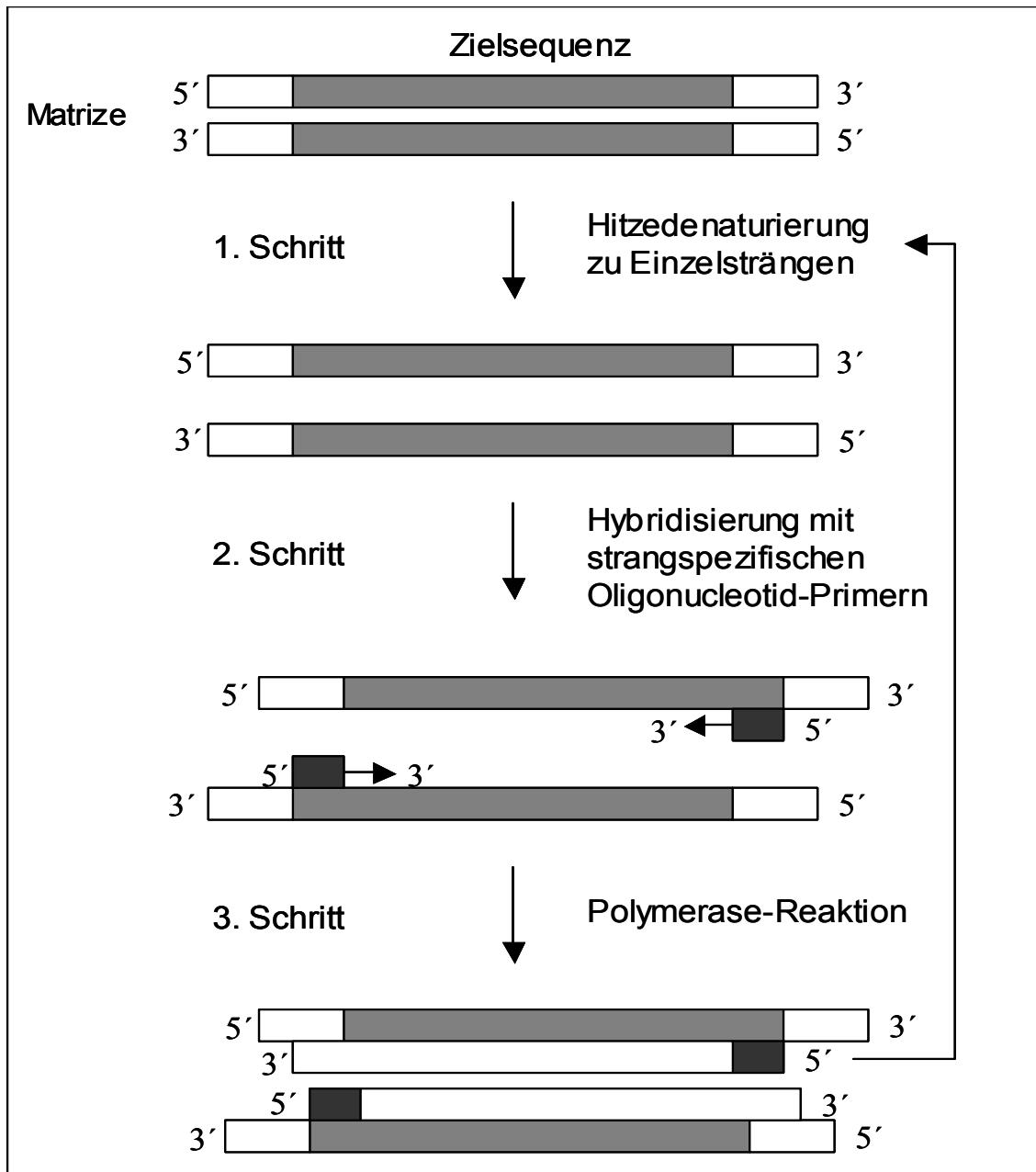


Abb. 3.1: Schematischer Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion.

1. Thermische Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges durch Aufschmelzen bei 90-94°C; es entstehen einzelsträngige DNA-Matrizenmoleküle
2. Annealing/Primerhybridisierung an einzelsträngige DNA durch Senkung der Temperatur auf die Primer-spezifische Annealing-Temperatur
3. Elongation, d.h. Verlängerung der Primer, also DNA-Synthese bei 72°C durch eine Taq-Polymerase, eine hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die eine kontinuierliche Durchführung der PCR-Zyklen ohne Enzymzugabe erlaubt.

Nach: Gassen und Schrimpf, 1999

3.5.2.1 Allgemeine Reaktionsbedingungen

Verwendet wurde HotStarTaq (Qiagen, Hilden, Deutschland) unter Zusatz der im Kit mitgelieferten Q-Solution.

HotStarTaq ist eine modifizierte Form einer rekombinanten 94-kDa DNA-Polymerase ohne Polymerase-Aktivität bei Raumtemperatur. Dadurch kann u.a. die Bildung von Primerdimeren und unspezifischen Polymerisierungsprodukten bei niedrigen Temperaturen verhindert werden. Eine Aktivierung der HotStarTaq-Polymerase erfolgt durch einen 15 minütigen Inkubationsschritt bei 95°C. Die Q-Solution ermöglicht die Amplifizierung schwieriger Matrizen („templates“), indem sie das Schmelzverhalten der DNA modifiziert. Dadurch kommt es zu einer Verbesserung suboptimaler PCR-Reaktionen, v.a. bei der Verwendung von Matrizen („templates“), die einen hohen Grad an Sekundärstrukturen besitzen oder sehr GC-reich sind.

Protokoll: Polymerase-Ketten-Reaktion

- Reaktionsprotokoll:

10x PCR Puffer (enthält 15 mM MgCl ₂)	2,5 µl
5x Q-Solution	5,0 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5 µl
Primer A (10 µM)	1,0 µl
Primer B (10 µM)	1,0 µl
HotStarTaq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl
Destilliertes Wasser	13,875 µl
“Template” cDNA	1,0 µl
Gesamtvolumen	25 µl

- Zyklusbedingungen:

- (1) 95°, 15 min
- (2) 94°, 1 min
- (3) x°, 1 min
- (4) 72°, 1 min
- (5) go to (2) x times
- (6) 94°, 1 min

- (7) x°, 1 min
 - (8) 72°, 10 min
 - (9) Stop
-

3.5.2.2 *Verwendete Primer*

Die Auswahl der Primer bestimmt die Effektivität und Spezifität der Reaktion und die Länge der nachzuweisenden PCR-Produkte. Die Länge des nachzuweisenden PCR-Produktes wird dabei auch durch die Prozessivität der verwendeten DNA-Polymerase limitiert (Newton und Graham 1997; Siebert 1991). Die Primer wurden so konstruiert, daß der Gehalt an den Nukleotiden Guanin (G) und Cytosin(C) ca. 50% betrug, da der G/C-Gehalt die Stabilität und die Annealingtemperatur der entsprechenden Primer bestimmt.

Um zu unterscheiden, ob die amplifizierten Produkte von der cDNA oder von Kontaminationen mit genomischer DNA stammen, wurden die Primerpaare intronüberspannend (d.h. die Sequenzen des Primerpaares liegen auf unterschiedlichen Exonen des Gens) gewählt. Die PCR-Produkte genomischer DNA sind so aufgrund des mitamplifizierten Introns immer größer (Krieg 1996; Newton und Graham 1997; Siebert 1991). Die zur Primerkonstruktion benötigten Gensequenzen wurden von der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (USA) (www.ncbi.nlm.nih.gov) heruntergeladen. Eine zusätzliche Überprüfung der Spezifität der konstruierten Primer konnte durch einen sog. BLAST-Search auf dem Server des National Center for Biotechnology Information mit den konstruierten Oligonukleotidsequenzen durchgeführt werden. Dieses Programm ermöglicht einen Ähnlichkeitsvergleich der Primersequenzen mit den verschiedenen in der Gendatenbank enthaltenen Sequenzen. Das Ergebnis des BLAST-Search zeigt dann alle entsprechenden Sequenzen, an die der Primer hybridisieren kann. So können im voraus mögliche Interaktionen mit genomischen intronischen Sequenzen oder anderen mRNAs überprüft und die Primer gegebenenfalls modifiziert werden. Zusätzlich zeigt das Programm die Bindungsregionen unter genauer Angabe der Basenpaarlänge auf und ermöglicht so die Größe des zu erwartenden PCR-

Produktes zu ermitteln.

Rattenprimer:

- ECE1a: Sense-Primer: 5'- ggt CTC ACg gTC TCg CTg c - 3';
Antisense-Primer: 5'- gAA gAA gTC CTg gCA ggg gt - 3'; Annealing-
Temperatur: 59°C; 35 Zyklen; Fragmentlänge: 282 bp
- ECE1b: Sense-Primer: 5' - gCT ggC CgC TCT ggg gAT - 3';
Antisense-Primer: 5'- gAA gAA gTC CTg gCA ggg gt - 3'; Annealing-
Temperatur: 59°C; 30 Zyklen; Fragmentlänge: 343 bp
- ECE1c: Sense-Primer: 5'- CCT Tag Cgg gAg gTg CAT C -3';
Antisense-Primer: 5'- gAA gAA gTC CTg gCA ggg gt - 3'; Annealing-
Temperatur: 62°C; 35 Zyklen, Fragmentlänge: 379 bp
- Nkx-2.5: Sense-Primer: 5'- CTC ACg TCC ACg CAg gTC - 3';
Antisense-Primer: 5'- CCT TCC CTA CCA ggC TCg - 3'; Annealing-
Temperatur: 62°C; 40 Zyklen, Fragmentlänge: 438 bp
- GAPDH: Sense-Primer: 5' - CAT Tga CCT CAA CTA CAT gg - 3';
Antisense-Primer: 5' - Tgg ACT gTg gTC CAT gAg T - 3'; Annealing-
Temperatur: 58°C, 40 Zyklen; Fragmentlänge: 425 bp

Humane Primer:

- ECE-1a : Sense-Primer: 5'- ACA ggA ggC AgC CCT gAT gC - 3';
Antisense-Primer: 5' - TTC gAg gAg gTg CTT gAT gAT TgC - 3';
Annealing-Temperatur: 61°C, 40 Zyklen; Fragmentlänge: 475 bp
- ECE-1b: Sense-Primer: 5'- CgC CCC CCC ggT gTC CgC CC - 3';
Antisense-Primer: 5' - TTC gAg gAg gTg CTT gAT gAT TgC - 3';
Annealing-Temperatur: 65°C, 36 Zyklen; Fragmentlänge: 481 bp
- ECE-1c: Sense-Primer: 5'- ggA gCT gCg CgA AgC Cgg ggC gg - 3';
Antisense-Primer: 5' - CTg Cag gCC gTT ggg gTA TgC - 3'; Annealing-
Temperatur: 65 C, 40 Zyklen; Fragmentlänge: 302 bp

- Nkx-2.5: Sense-Primer: 5'- CTC ACg TCC ACg CAg gTC - 3';
Antisense-Primer: 5'- CCT TCC CTA CCA ggC TCg – 3'; Annealing-Temperatur: 60°C ; 40 Zyklen; Fragmentlänge: 453 bp
- GAPDH: Sense-Primer: 5' - CAT gTg ggC CAT gAg gTC CAC CAC - 3';
Antisense-Primer: 5' - TgA Agg TCg gAg TCA ACg gAT TTg gT - 3';
Annealing-Temperatur: 60°C, 30 Zyklen; Fragmentlänge: 463 bp

3.5.3 Subklonierung

Unter Subklonierung versteht man den Einbau eines PCR-Produktes in ein Plasmid. Plasmide sind extrachromosomale, ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle mit einer Größe von 3 bis 20 kb, die sich unabhängig vom Chromosom der Wirtszelle vermehren können und in Bakterien vorkommen. In der Gentechnologie spielen sie eine wichtige Rolle, da sie als Vektoren für die Klonierung, Vermehrung und Expression beliebiger DNA-Stücke eingesetzt werden können.

Die PCR-Produkte zur Subklonierung wurden mit einer *Pfu*-Polymerase (aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus*) generiert, deren Vorteil gegenüber den Taq-Polymerasen in einer deutlich geringeren Mutationsrate liegt. Im Anschluß an die PCR wird das PCR-Produkt direkt in den entsprechenden Vektor eingebaut (subkloniert).

Für die Subklonierung muß zunächst das „Zielpasmids“ linearisiert werden. Anschließend werden Insert und Plasmid ligiert, in dem durch eine DNA-Ligase eine Phosphodiesterbindung zwischen einem Ende des PCR-Produktes und einem Ende des Plasmids geknüpft wird. Die Ligationsprodukte werden dann in DH5 α -Zellen transformiert, d.h. die Plasmide werden von kompetenten Zellen (Kompetenz ist die Fähigkeit, Plasmide aufzunehmen) aufgenommen und in diesen vermehrt.

Die Isolation der Plasmid-DNA wurde nach dem QIAprep Miniprep/Maxiprep-Protokoll (QIAGEN, HILDEN, DEUTSCHLAND) durchgeführt. Dieses Protokoll

benutzt die modifizierte alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979). Dabei werden die Bakterien unter alkalischen Bedingungen lysiert, die Lysate umgehend neutralisiert und im gleichen Schritt in Hoch-Salz-Bindungs-Bedingungen überführt. Die DNA wird dann an einer Membran (Silika-Matrix), die selektiv Nukleinsäuren bindet, adsorbiert.

Protokoll: Herstellung von Sonden und Expressionsvektoren:

(1) *Pfu*-PCR zur Blunt-end-Ligation:

<i>Pfu</i> -Puffer (10x)	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase	1 µl
H ₂ O	50 µl
„Template“	1 µl
Sense-Primer (10 µM)	5 µl
Antisense-Primer (10 µM)	5 µl

(2) Subklonierung

1. Blunt-End-Subklonierung in pBluescript II KS (+/-) (Stratagene, La Jolla, USA)
 - Restriktionsverdau des Plasmids:
 - o 2 µl pBluescript II KS (+/-) (1µg/µl), 1 µl Eco R-V (4U/µl), 2 µl Puffer H, H₂O ad 20 µl; Ansatz mindestens 2 h bei 37°C inkubieren
 - Ligation:
 - o 1 µl der *Pfu*-PCR, 1 µl des obigen Daus, 1 µl 10x Ligasepuffer, 1 µl T₄-DNA-Ligase (4 U/µl), H₂O ad 20 µl; über Nacht bei 14°C inkubieren
2. Subklonierung in pGL3-basic-Luziferase-Reportervektor (Promega, Madison, USA). (Ein Reportervektor ist ein Plasmid, das an der 3'-Klonierungsstelle ein Gen enthält, das für eine Luziferase kodiert.)
 - Restriktionsverdau des pGL3-basic-Plasmids:
 - o 2 µl pGL3-Vektor (1 µg/µl), 1 µl Sma-I (8 U/µl), 2 µl Sma-I-Puffer, H₂O ad 20 µl, Ansatz 2 h bei 25°C inkubieren
 - Ligation:
 - o 0,8 µl der *Pfu*-PCR, 0,8 µl pGL3-Restriktionsdau, 1,3 µl T₄-DNA-Ligase (3 U/µl), 1 µl 10x Ligasepuffer, H₂O ad 10 µl; über Nacht bei 14°C inkubieren

(3) Transformation in DH5α-Zellen

Die Transformation wurde unter Verwendung von kompetenten E. coli DH5α

(Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland) nach dem angegebenen Protokoll mit 1 µl der entsprechenden Ligationsreaktion durchgeführt.

(4) Ansetzten sog. „Starterkulturen“

DH5 α -Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze abgenommen und in Reagenzgläser mit 5 ml LB-Ampicillin-Medium (100 µg Ampicillin/ml) überführt. Diese wurden über Nacht bei 37°C und 225 Umdrehungen/min inkubiert.

(5) Isolierung der Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep Miniprep Kit bzw. dem Plasmid maxi Kit (beide Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

(6) Kontrolle der rekombinanten Plasmide

Die Richtigkeit der rekombinanten Plasmide wurde mittels Restriktionsdauer und Sequenzierung überprüft.

3.5.3.1 Sonden für den RNase Protection Assay (RPA)

Nach dem obigen Protokoll wurde mit genspezifischen Primern ein PCR-Produkt generiert, das anschließend in einen Plasmid-Vektor, der zwei Phagenpolymerase-Promotoren (SP6 und T7) besitzt, subkloniert wurde.

Für die humane ECE-1-Sonde wurden folgende Primer - Sense-Primer: 5' - ggA gCT gCg CgA AgC Cgg ggC gg - 3'; Antisense-Primer: 5' - gAC ACA AgC TTC gCT Cag gCA CA - 3' - auf cDNA von humanem fetalen Herzen als Matrize verwendet. Das PCR-Produkt mit einer Länge von 302 Basenpaaren wurde in den pBluescript II KS (+/-)-Vektor (Stratagene, La Jolla, USA) kloniert.

Für die Ratten-ECE-1-Sonde wurden folgende Primer - Sense-Primer: 5' - TgC ggT Cgg AgC gTA gAg CT - 3'; Antisense-Primer: 5' - ACC ACA ggC gTA gCT gAA gAA - 3' - und cDNA vom Rattenherz/Rattenherzanlagen als Matrize verwendet. Das PCR-Produkt mit einer Länge von 439 bp wurde in den pBluescript II KS (+/-)-Vektor (Stratagene, La Jolla, USA) kloniert.

3.5.3.2 Expressionsvektoren

Ein PCR-Produkt (Sense-Primer: 5'- gCC ACC Atg TTC CCC AgC - 3'; Antisense-Primer: 5'- CCT TCC CTA CCA ggC TCg - 3'; 987 bp), das den Leserahmen für humanes Nkx 2.5 umfaßt, wurde in den pCR3.1-Vektor (Invitrogen, Groningen, Holland) subkloniert.

3.5.3.3 Wildtyp-Promotor-Reporter-Konstrukte

Die Promotor-Luciferase-Reporter-Konstrukte dreier alternativer humaner ECE-1-Promotoren wurden wie bei Orzechowski et al. (1997) und Funke-Kaiser et al. (2000) beschrieben in den pGL3basic-Vektor (Promega, Madison, USA) subkloniert. Die Konstrukte umfassen 1206 bp (ECE-1a), 1278 bp (ECE-1b) bzw. 969 bp (ECE-1c) – immer relativ zum spezifischen Translationsstartpunkt - der entsprechenden regulatorischen Region.

3.5.4 Site-directed Mutagenese

Mittels einer zweischrittigen, PCR-basierten Methode (Higuchi et al. 1988) wurden Punktmutationen in die Nkx2.5-bindenden cis-Elemente eingeführt. Im ersten Schritt wurden parallel zwei PCRs ausgeführt, um die Punktmutationen in beide DNA-Stränge einzuführen: die erste mit einem Wildtyp-5'-Sense-Primer und einem mutiertem Antisense-Primer, die zweite mit einem mutierten - dem mutierten Antisense-Primer komplementären - Sense-Primer und einem nicht-mutiertem 3'-gelegenen Antisense-Primer. (Abb.3.2) Als Matrize diente hier humane genomische DNA.

In einem zweiten Schritt wurde eine PCR mit dem Wildtyp-5'-Sense-Primer und dem nicht-mutierten 3'-Antisense-Primer und den PCR-Produkten aus Schritt 1, nach deren Aufreinigung mit QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), durchgeführt. Alle PCR-Schritte wurden mit HotStarTaq (s. 3.5.1) ausgeführt. Das PCR-Produkt wurde anschließend in einen Luciferase-Reporter Vektor, pGL3basic (Promega, Madison, USA), kloniert. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch Sequenzierung bestätigt.

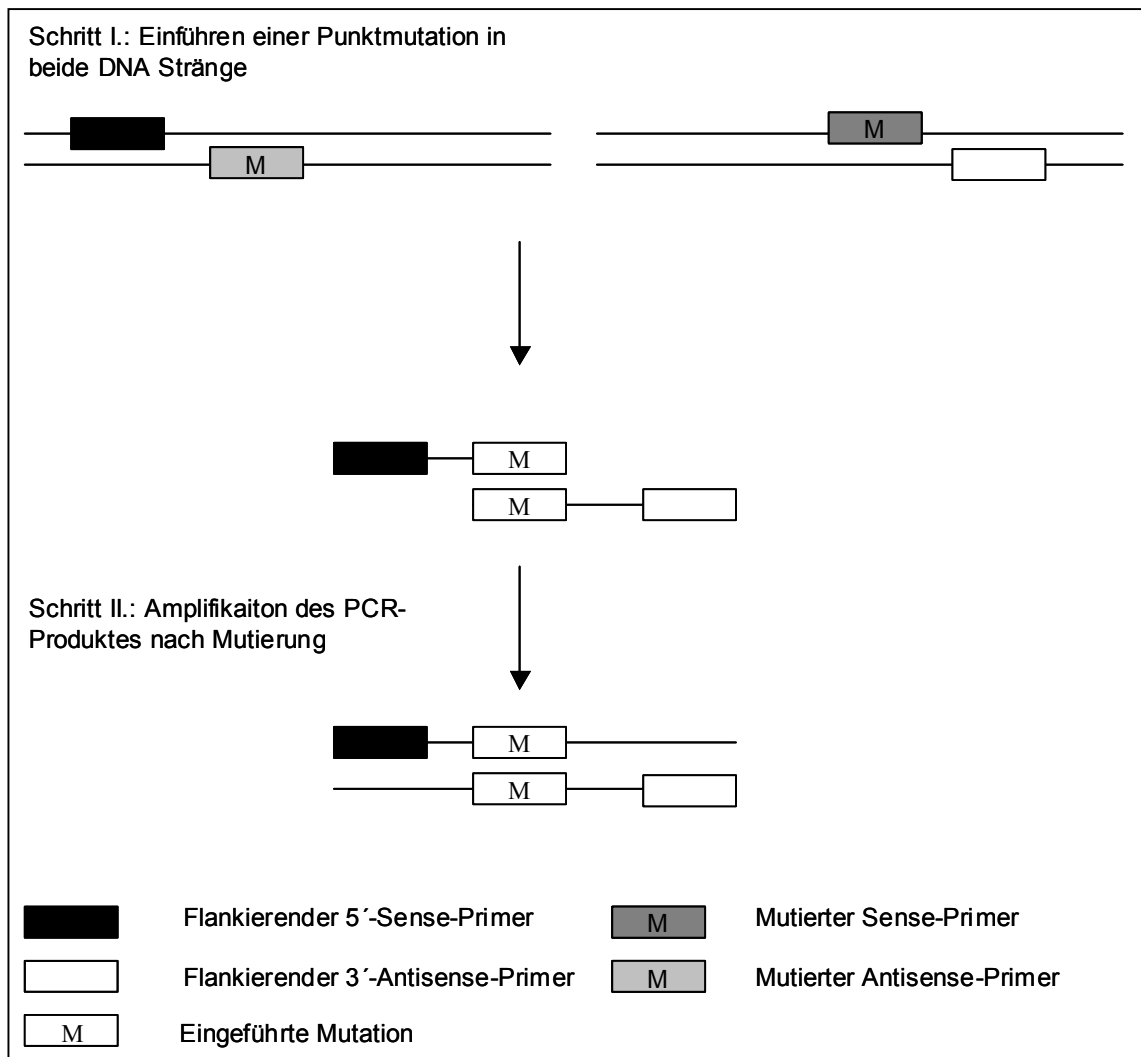


Abb. 3.2: Site-directed Mutagenese

Im ersten Schritt wird in zwei parallelen PCR die Punktmutation in beide DNA-Stränge eingeführt. Dabei wird die eine PCR mit einem Wildtyp-5'-Sense-Primer und einem mutiertem Antisense-Primer, die andere mit einem mutierten - dem mutierten Antisense-Primer komplementärem - Sense-Primer und einem nicht-mutiertem 3'-gelegenen Antisense-Primer ausgeführt.

In einem zweiten Schritt wird eine PCR mit dem Wildtyp-5'-Sense-Primer und dem nicht-mutierten 3'-Antisense-Primer mit den PCR-Produkten aus Schritt I als Template durchgeführt.

Für den ECE-1b-Promotor wurden ein mutierter Sense-Primer (5'-CCT GAC CTC ATG CGA TCT AC-3') an Position -1204 in bezug auf das ECE-1a-isoformspezifische Translationsstartcodon, ein mutierter Antisense-Primer (5'-GTA GAT CGC ATG AGG TCA GG-3') sowie ein flankierender Sense-Primer

an Position –1282 (5'-TGC CAC CAG GCC CAG CTG-3') und ein flankierender Antisense-Primer - unmittelbar 5' des b-isoformspezifischen Translationsstartcodons gelegen (5'-GCT GTG CCC CAG ACG CCT-3') - verwendet. Entsprechend wurden für den ECE-1a-Promotor ein mutierter Sense-Primer (5'-CAG TTT CCT CGC ATG TAA AAA GAA-3') an Position –430 in bezug auf das a-isoformspezifische Translationsstartcodon, ein mutierter Antisense-Primer (5'-TTC TTT TTA CAT GCG AGG AAA CTG-3') sowie ein flankierender Sense-Primer (5'-CTC ATC TTC CCT GAC AGC TTC C-3') an Position –1206 und ein flankierender Antisense-Primer (5'-CAG GGC TGC CTC CTG TCT CAG G-3') - unmittelbar 5' des a-spezifischen Translationsstartcodons gelegen - verwendet.

3.5.5 Ribonuclease-Protection-Assay (RPA)

Der RNase Protection Assay ist eine sensitive Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von RNA (meist mRNA). Für den RPA wird zunächst eine nichtisotopisch oder radioaktiv markierte der zu analysierenden Zielsequenz komplementäre RNA-Sonde synthetisiert.

Zur Sondensynthese wird zunächst das 3'-Ende der Sondensequenz (s. Abschnitt 3.5.2) in Nähe zu einem Phagenpolymerase-Promotor (T3, T7 oder SP6) gebracht - entweder wie hier durch Subklonierung in ein Vektorplasmid oder durch die Verwendung von PCR-Primern, die die Promotorsequenz enthalten. Mit einer entsprechenden DNA-abhängigen RNA-Polymerase (T3-, T7- bzw. SP6-Polymerase) wird dann mittels in-vitro-Transkription ein markiertes Antisense-RNA-Transkript generiert. Die markierte Sonde wird mit der RNA unter Bedingungen, die die Hybridisierung zweier komplementärer Sequenzen begünstigen, inkubiert. Die nicht hybridisierten Abschnitte der Sonde werden durch eine Behandlung mit Ribonuclease verdaut. Die markierte und mit der Ziel-RNA hybridisierte Sonde wird vor dem Ribonuclease-Verdau geschützt und kann in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie oder über sekundäre Visualisierungsverfahren (bei nichtisotopisch-markierten Sonden) sichtbar gemacht werden. Wenn die Sonde

in dem Ansatz im Überschuß vorliegt, ist die Intensität des geschützten Fragmentes direkt proportional zur Menge der Ziel-RNA (Nolau 1989; Friedberg et al., 1990).

Die Vorteile des RPA, bei dem die Hybridisierungsreaktion in Lösung stattfindet, liegen im Vergleich zu Protokollen, in denen die RNA an feste Trägermedien gebunden wird, z.B. Northern Blots, darin, daß geringere Mengen an mRNA nachgewiesen werden können (Frayn et al. 1993; Lee and Costlow 1987). Ein weiterer Vorteil liegt in der Tatsache, daß Bruchstellen außerhalb des nachzuweisenden Bereichs keinen Einfluß auf den RPA haben, während sie im Northern Blot einen Signalverschiebung hin zu kleinerer Molekülgröße bedeuten. Außerdem ist unter den RNA-Nachweismethoden der RPA am besten zum gleichzeitigen Nachweis verschiedener Zielgene innerhalb einer Probe geeignet. Die einzige Voraussetzung für den Nachweis verschiedener Zielgene bzw. verschiedener Isoformen in einem Ansatz ist, daß die Sonde(n) RNA-Fragmente verschiedener Länge schützt (schützen), die dann auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt werden können. Dieser Vorteil des RPA wurde hier ausgenutzt, um die verschiedenen Isoformen des Endothelin-Konvertierungsenzyms (ECE-1a, -1b und -1c) in einer Probe nachzuweisen. (Abb.3.3)

Die hier gezeigten RPAs wurden mit dem MAXIskript T7- und dem RPA II-Kit (beide Ambion, Austin, Texas, USA) durchgeführt.

Die subklonierten RPA-Sonden (s. 3.5.2) wurden über Nacht bei 37°C mit XhoI (2 U/µl) linearisiert und anschließend mit Proteinase K (10 mg/ml) verdaut. Danach erfolgte eine Aufreinigung mit dem PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers und die Elution der linearisierten und aufgereinigten Sonde mit destilliertem Wasser.

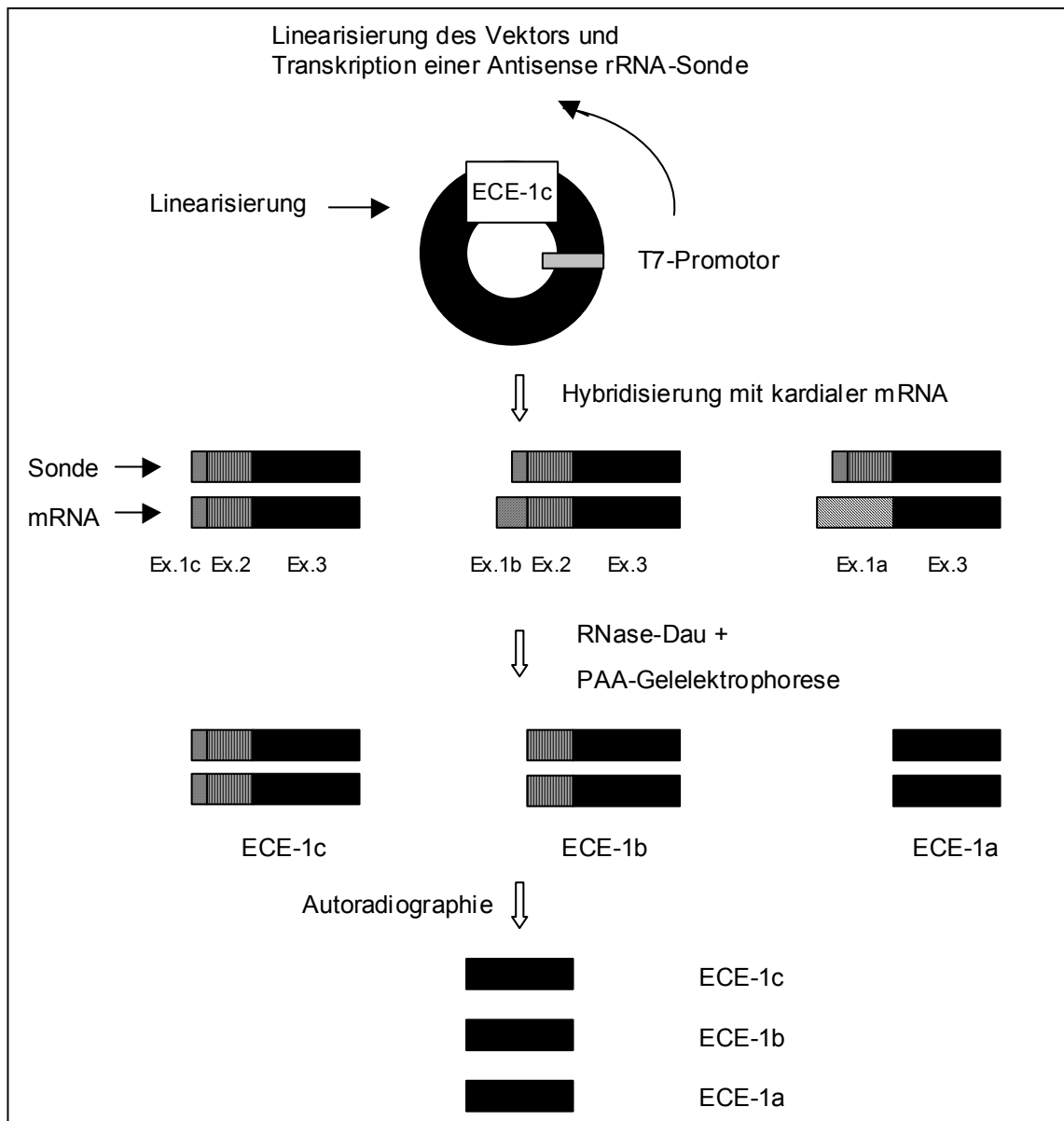


Abb. 3.3: Prinzip des RNase-Protektion-Assay am Beispiel des ECE-1; Auftrennung dreier Isoformen mit nur einer Antisense-rRNA-Sonde

Der Vektor, der die Sondensequenz enthält wird zunächst linearisiert. Die komplementäre und antisense-orientierte RNA-Sonde wird dann durch in-vitro-Transkription mit einer T7-Polymerase generiert. In einem nächsten Schritt wird die Sonde mit der kardialen RNA hybridisiert. Eine RNase baut die nicht hybridisierte RNA ab. Die RNA-RNA-Hybride werden in einem PAA-Gel aufgetrennt. Die protektierten Fragmente werden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Die linearisierten aufgereinigten DNA-Fragmente wurden mittels in-vitro-Transkription unter Verwendung von jeweils 1 µg des linearisierten Vektors und einer T7-Polymerase mit α^{32} Phosphor-rCTP (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) radioaktiv markiert. In Abweichung zum Standardprotokoll wurde nach der einstündigen Transkriptionsreaktion erneut T7-Polymerase zugegeben, um die Effizienz der Reaktion zu verbessern. Die anschließende Zugabe einer DNase erfolgte zur Hydrolyisierung von Vektorsequenzen zur Vermeidung störender Einflüsse nichtmarkierter Sequenzen während der Hybridisierung.

Die Markierung des Längenstandards (Century™ marker template, Ambion, Austin, Texas, USA) wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Protokoll: Linearisierung und Aufreinigung der RPA-Sonden

Dau zur Linearisierung:

- 2 µl Enzym (2 U/µl), 2 µl Puffer H, 16 µl DNA-Eluat, Inkubation für 2 h bei 37°C

Verdau mit Proteinase K:

- gleiches Volumen an Proteinase K (10 mg/ml) zum Dau zugeben, mindestens 30 min bei 50°C inkubieren

Aufreinigung mit PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) laut Protokoll des Herstellers.

Protokoll: In-vitro-Transkription

	Sonde	Längenstandard
„Template“	1 µg linearisierter Vektor	1 µl Century Marker (= 0,5 µg)
ATP (10 mM)	1 µl	1 µl
CTP (10 mM)	0,5 µl	0,5 µl
GTP (10 mM)	1 µl	1 µl
UTP (10 mM)	1 µl	1 µl
α^{32} P rCTP (20 mCi/ml)	4,5 µl	1,5µl
10x-Transkriptionspuffer	2 µl	2 µl

	Sonde	Längenstandard
T7-Polymerase (2x) (10 U/µl + 5 U/µl RNasin)	2 µl	2 µl
nukleasefreies Wasser	ad 20 µl	ad 20 µl

- Cyclor:

- (1) 37°C, 60 min → Transkriptionsreaktion
- (2) „Stop“, + 2 µl T7-Polymerase
- (3) 37°C, 60 min → Transkriptionsreaktion
- (4) „Stop“, + 1 µl DNase (2 U/µl)
- (5) 37°C, 15 min → DNase-Dau
- (6) „Stop“, + 23 µl Gelladepuffer
- (7) 85°-95°C, 4 min → Denaturierung

Direkt im Anschluß an das obige Protokoll wurde die Sonde mittels Gelpurifikation in 5% denaturierenden Polyacrylamidgel aufgereinigt. Nach dem Gellauf wurde die Sonde aus dem Gel ausgeschnitten und über Nacht in 350 µl Puffer eluiert.

Die radioaktive Aktivität der Sonde wurde in einem Szintillationszähler (1219 Rackbeta, Liquid Scintillation Counter; LKB, Wallac) bestimmt.

Für die Hybridisierungsreaktion wurden die RNA und die radioaktiv markierte Sonde (100.000 cpm/10 µg RNA) gemischt, die Salzkonzentration mit 5 M Ammoniumacetat (NH₄OAc) auf 0,5 M eingestellt und RNA und Sonde mittels klassischer Ethanol-fällung ausgefällt. In Abweichung zum Standardprotokoll des Herstellers wurde nach mindestens 15-minütiger Inkubation bei -20°C 30 min bei 4°C (14.000 rpm) zentrifugiert. Die Pellets wurden nach Dekantieren des Ethanolüberstandes in 20 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen und nach einer Denaturierung der RNA bei 95°C über Nacht bei 45°C inkubiert (Hybridisierungsreaktion). Die überschüssige, nicht hybridisierte RNA wurde anschließend mit einem Gemisch aus RNase A und RNase T1 für 60 min bei 37°C verdaut. Nach Inaktivierung der RNasen und Fällung der RNA-RNA-Hybride wurde das Pellet in Ladungspuffer aufgenommen und die Proben in einem 5% denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Für jede Sonde wurden zwei Hefekontrollen (10 µg Hefe-RNA, 100.000 cpm) mitgeführt, wobei einer Kontrolle RNase, der zweiten nur Puffer zugesetzt wurden, um die Effizienz des RNase-Daus zu überprüfen.

Protokoll: RNase-Protection-Assay

- RNA und radioaktiv markierte Sonde (100.000 cpm/10µg RNA) mischen
- pro Sonde zwei Kontrollen mit 2 µl Soln.C (Hefe-RNA, 5 µg/µl) mitführen
- Salzkonzentration mit 5 M NH₄OAc auf 0,5 M einstellen
- 2½ faches Volumen an 100%igem Ethanol hinzugeben und gut mischen (klassische Ethanolfällung)
- 15 min bei -20°C, anschließend 30 min bei 4°C zentrifugieren (mindestens 10.000 x g)
- EtOH-Überstand abgießen, Pellet in 20 µl Hybridisierungspuffer lösen, vortexen und zentrifugieren
- 4 min bei 95°C inkubieren (RNA-Denaturierung), vortexen und zentrifugieren
- zur Hybridisierung der Sonde und der komplementären RNA bei 45°C über Nacht inkubieren

RNase-Verdau:

- pro Reaktion 192 µl RNase-Digestions-Puffer + 8 µl Rnas A/RNase T1-Gemisch (RNase A 2.5 U/µl + RNase T1 10 U/µl) zugeben, vortexen und zentrifugieren
- zur zweiten Hefekontrolle 200 µl RNase-Digestions-Puffer ohne RNasen geben
- bei 37°C für 1 h inkubieren (Verdau ungeschützter Einzelstrang-RNA)
- 300 µl RNase-Inaktivierungs-/Präzipitationsmix + 100 µl 100% Ethanol zugeben, vortexen und zentrifugieren
- 30 min bei -20°C

Separation und Detektion der geschützten Fragmente:

- Präzipitationsprodukte 30 min bei 4°C zentrifugieren (mindest 10.000 x g), Überstand entfernen
- Pellet in 8 µl Gelladepuffer auflösen, vortexen und zentrifugieren
- 4 min bei 95°C inkubieren, vortexen und zentrifugieren; anschließend direkt auf das Gel laden
- Längenstandard auf 25.000 cpm/µl verdünnen, davon 2 µl einsetzen
- ca. 25 V/cm, 2-3h

Die Gele wurden auf „Image Plates“ (BAS-MP 2040S, Fuji, Tokyo, Japan) belichtet und anschließend mit einem „Image Plate Scanner“ eingescannt (BAS-1500, Fuji, Tokyo, Japan).

3.5.6 Western-Blot

Beim Western-Blot werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran überführt und dort einer Nachweisreaktion unterzogen. Die Proteine werden hierbei auf der Membranoberfläche immobilisiert. Die Methode wurde entwickelt, um das Molekulargewicht eines Proteinantigens zu bestimmen oder die Spezifität von Antikörpern gegenüber einem in der Proteinmischung befindlichen Antigen zu prüfen (Towbin et al. 1979; Burnette 1981).

Das Basisprotokoll umfaßt die Proteinauftrennung mittels denaturierender-diskontinuierlicher SDS-Gelelektrophorese, den elektrophoretischen Transfer sowie den immunochemischen Nachweis über Farb- oder Chemilumineszenz-Visualisierung (Towbin et al. 1989; Egger und Bienz 1994). Die eigentliche Nachweisreaktion erfolgt durch die Bindung des primären Antikörpers an eines der transferierten Proteine. Der sekundäre Antikörper, der von einer anderen Spezies als der primäre stammt, ist gegen konstante Bereiche des primären Antikörpers gerichtet und ermöglicht meist über eine Enzymmarkierung (Ramlau 1987; Kricka 1993) mit Meerrettichperoxidase oder alkalischer Phosphatase eine Visualisierung der Antikörper-Proteinbindung. Außerdem bewirkt er eine Signalverstärkung, da mehr als ein Zweit-Antikörper-Molekül an ein Erst-Antikörper-Molekül binden kann. Die Zugabe entsprechender Substrate führt dann zu einem gefärbten oder lichtemittierenden Produkt (Chemilumineszenz), das am Ort der Entstehung ausfällt bzw. Licht ausstrahlt und so die die Position der Nachweisreagenzien sichtbar macht.

Für den hier gezeigten Western-Blot wurden je 20 µg Kernproteine aus H9c2-Zellen in einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Transfer (Blotten) erfolgte mittels eines Semi-Dry-Systems. Die überschüssigen Proteinbindungsstellen der

Membran wurden, um eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu vermeiden, mit 5% Milchpulver gesättigt (sog. „Blocken“).

Die Inkubation mit dem primären Anti-Nkx2.5-Antikörper (Nkx2.5 N-19, Goat-Anti-Human Nkx2.5, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) erfolgte in 1xTBS mit 0,1% Tween und 0,5% Milchpulver über Nacht bei 4°C, gefolgt von einem Waschschrift und der Inkubation mit dem Zweitantikörper (Anti-Ziege-IgG, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) in 1x TBS mit 0,1% Tween und 0,5% Milchpulver bei Raumtemperatur.

Die Detektion der Banden erfolgte über eine Chemolumineszenzreaktion mit Luminol/p-Iodophenol (Sigma, Taufkirchen, Deutschland).

Protokoll: Western-Blot:

(1) Protein-Elektrophorese:

- pro Tasche 20 µg Protein, 10 µl 1x Probenpuffer nach Laemmli mit 10 mM DTT, Aqua dest. ad 25 µl
- Denaturierung bei 95°C für 6 min
- Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (15% PAA, 0,1% SDS) bei 15 V/cm für 90 min in Laufpuffer (Tris-base (25 mM), Glycin (192 mM) und 0,1% SDS))

(2) Transfer auf Nitrocellulosemembran mit einem Semi-Dry-Systems bei 5 mA/cm² für 85 min.

(3) Blockade der unspezifischen Proteinbindungen:

- mit 5% Milchpulver in 1x TBS (2,5-3g milk in 50 ml TBS) für 2-2.5 h

(4) Waschen:

- dreimal mit 1% Tween20/TBS für ca. 10 min
- einmal mit TBS für ca. 10 min

(5) Inkubation mit dem Primärantikörper:

- Anti-Nkx2.5-Antikörper (Verdünnung 1:5.000) in 1x TBS mit 0,1% Tween und 0,5% Milchpulver
- Inkubation über Nacht bei 4°C auf einem langsamen Schüttler bei 4-5 Umdrehungen

(6) Waschen, s. (4)

(7) Inkubation mit dem Sekundärantikörper

- Anti-Ziege-IgG (Verdünnung 1:10.000) in 1x TBS mit 0,1% Tween und 0,5% Milchpulver bei Raumtemperatur

(8) Waschen, s. (4)

(9) Detektionsreaktion:

- die Blots werden auf Whatmanpapier getrocknet und mit ECL-

- Reagenz (10 ml + 20 µl H₂O) 1 min unter Schütteln gefärbt
- Blots kurz trocknen
 - Hyperform für 15 s bis 5 min belichten
-

3.5.7 Bandshift-Analyse (Electromobility Shift Assay [EMSA], Gelshift)

Die Bandshift-Analyse ist heute eine der Standardmethoden zum Nachweis und zur Charakterisierung von Protein-DNA-Wechselwirkungen in-vitro. Der größte Anwendungsbereich umfaßt die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren (Mitchell und Tjian 1989) sowie der von ihnen gebundenen DNA-Elemente (Promotoren, Enhancer, Silencer).

Ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment wird mit Proteinextrakten inkubiert und die gegebenenfalls entstandenen Protein-DNA-Komplexe werden anschließend in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Bei Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes tritt neben dem Signal des nicht komplexierten DNA-Fragmentes eine zusätzliche Bande mit deutlich verändertem Laufverhalten („Bandshift“) auf (Abb. 3.4) (Lane et al. 1992).

Die Identifizierung sequenzspezifischer DNA bindender Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, erfordert Fragmentlängen von 20-35 Basenpaaren, die üblicherweise durch Hybridisierung zweier synthetisch hergestellter komplementärer einzelsträngiger Oligonukleotide gewonnen werden. Zur Vermeidung unspezifischer Proteinbindungen ist es wichtig, daß die verwendeten DNA-Fragmente doppelsträngig und ohne überstehende Enden vorliegen, da an Einzelsträngen oder überstehenden Enden häufig eine unspezifische Bindung erfolgt.

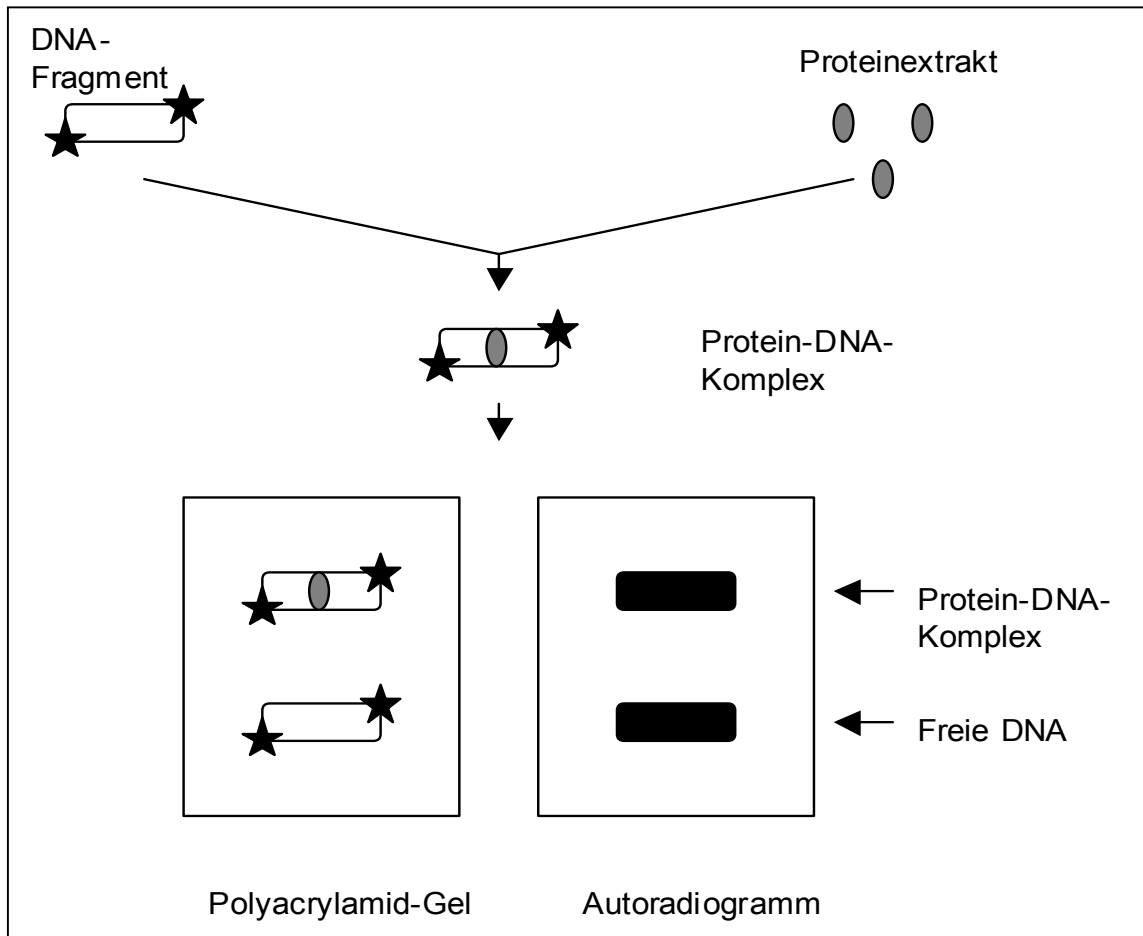


Abb. 3.4: Prinzip der Bandshift-Analyse

Ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment wird mit einem Proteinextrakt inkubiert und die entstandenen Protein-DNA-Komplexe werden in einem Polyacrylamid-Gel von den nichtgebundenen DNA-Fragmenten getrennt.

Nach: Gassen und Schimpf, 1999

Die Spezifität eines Protein-DNA-Komplexes kann anhand von Konkurrenzexperimenten nachgewiesen werden. Hierzu wird der Inkubationslösung zusätzlich zu dem radioaktiv markierten DNA-Fragmenten ein Überschuss an nicht markierten Fragmenten (Kompetitor) zugesetzt. Die Fähigkeit des Kompetitors, das zu untersuchende Protein zu binden, bestimmt dann die Intensität des Signals des Protein-DNA-Komplexes. Bindet der Kompetitor das Protein, nimmt die Signalintensität des spezifischen Bandshiftes ab (homologe Konkurrenz). Wenn die Sequenz des Kompetitors nicht die

gleiche Bindungseigenschaften besitzt, kommt es dagegen zu keiner Abschwächung des spezifischen Bandshift-Signals; man spricht von heterologer Competition. Durch Einführung geeigneter Punktmutationen in das DNA-Fragment kann die Erkennungssequenz des DNA-Bindeproteins gegebenenfalls exakt ermittelt werden. (Abb. 3.5)

Eine weitere Möglichkeit der Überprüfung der Spezifität der DNA-Protein-Bindung bietet die Supershift-Analyse. Die Bandshift-Analyse wird hier in Gegenwart eines gegen ein bereits bekanntes DNA bindendes Protein gerichteten Antikörpers durchgeführt. Eine zusätzliche Bande mit verzögertem Laufverhalten („Supershift“) oder/und eine deutliche Verminderung der Signalintensität des Bandshiftes weisen darauf hin, daß es sich bei dem DNA-Bindeprotein um den bekannten Faktor handelt oder daß dieser Faktor an dem identifizierten Bandshift-Komplex beteiligt ist.

Für die hier gezeigten EMSA wurden doppelsträngige Oligonukleotide (ECE-1b: 5'- CTg ACC TCA AgT gAT CTA CC - 3'; ECE-1a: 5'- gTT TCC TCA CTT gTA AAA Ag - 3') durch Hybridisierung der synthetischen komplementären einzelsträngigen Oligonukleotide generiert.

Eine radioaktive Markierung der DNA-Fragmente wurde durch 5'-Phosphorylierung (Kinasierung) der DNA mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ erreicht. Die radioaktiv-markierten DNA-Fragmente wurden anschließend mit Sephadex-G-25-Säulen (Boehringer Mannheim) von freiem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ getrennt.

Für die Bindungsreaktion (Bandshift-Analyse) wurden 10 μg Proteine bzw. 2 μl der in-vitro-Transkriptions-/Translationsreaktion mit 60.000 cpm doppelsträngiger Oligonukleotide und 2 μg Poly-[d(I-C)] (Boehringer Mannheim) bei 4° (Proteinextrakte) bzw. bei Raumtemperatur (rekombinantes Nkx) inkubiert.

Für die Kompetitionsanalyse wurden die Bindungsreaktionen mit zunehmenden Mengen nicht-markierter doppelsträngiger Oligonukleotide durchgeführt.

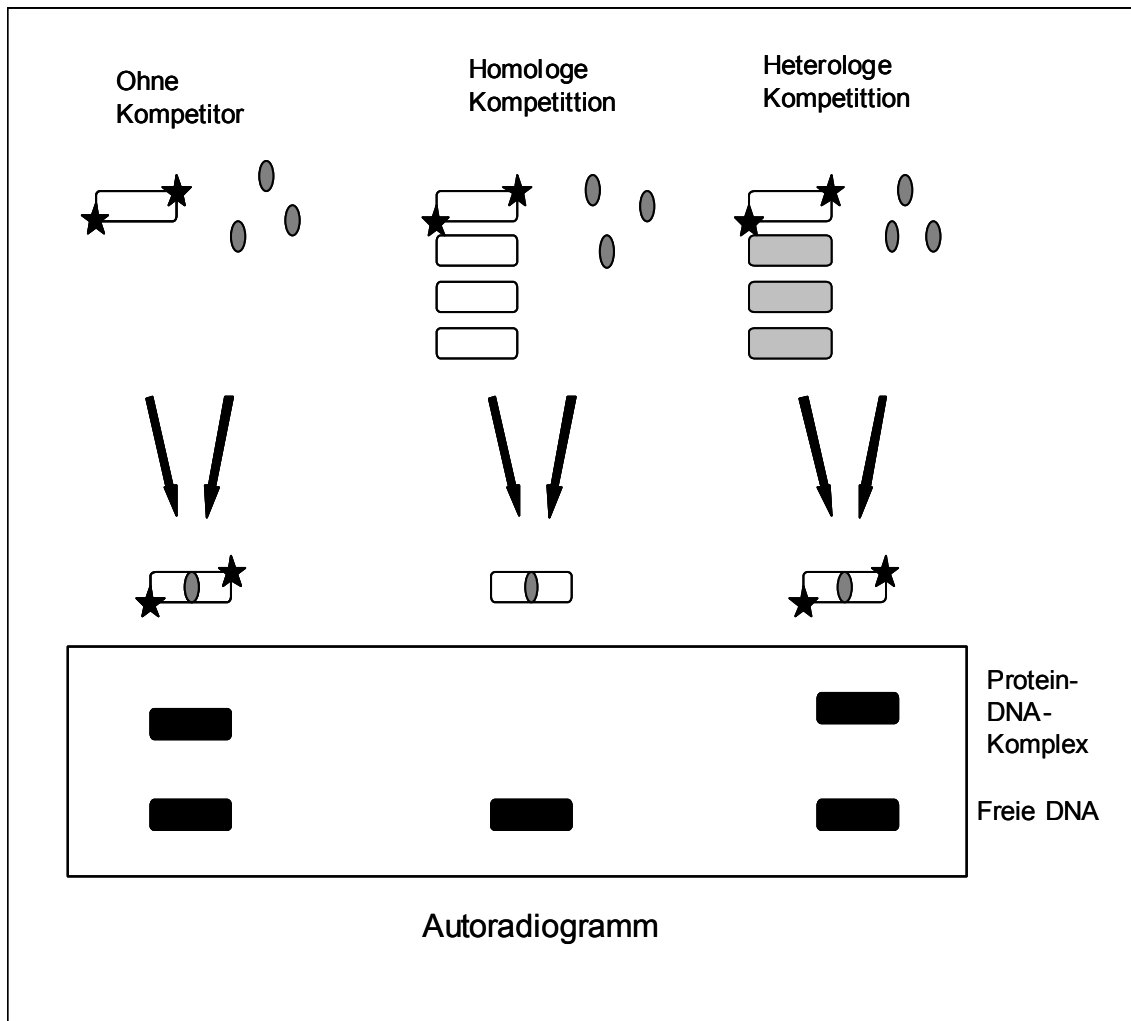
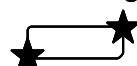

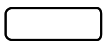



Abb. 3.5.: Bandshift-Analyse in Gegenwart eines homologen oder heterologen Kompetitors

-  : radioaktiv markiertes DNA-Fragment
 : bestimmtes Protein aus einem Proteinextrakt
 : homologer Kompetitor;  : heterologer Kompetitor

Nach: Gassen und Schimpf, 1999

Für die Supershift-Analyse wurden die Proteine mit 6 µg eines Antikörpers gegen humanes Nkx2.5 (Nkx2.5 N-19, Goat-Anti-Human Nkx2.5; Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) bzw. gegen humanes ECE (B61, Rabbit-Anti-Human ECE, Geschenk von Dr. T. Subkowski) als Negativ-Kontrolle bei Raumtemperatur präinkubiert.

Der Nachweis des Bandshiftes bzw. gegebenenfalls des „Supershiftes“ erfolgte durch Auftrennung der einzelnen Bindungsreaktionen in einem 4%igem Polyacrylamidgel. Die Analyse erfolgte nach Exposition der Gele auf „Image Plates“ (BAS-MP-2040S, Fuji, Tokyo, Japan) mittels eines „Image Plate Scanners“ (BAS-1500, Fuji, Tokyo, Japan).

Protokoll: Bandshift-Analyse

- Reannealing der einzelsträngigen (ss) Oligonukleotide zu doppelsträngigen (ds) Oligonukleotide:
 - o 50 µl Oligonukleotid A (100 µM), 50 µl Oligonukleotid B (100 µM)
 - o in kochendes Wasserbad geben und langsam auf Raumtemperatur abkühlen lassen; bei -20°C einfrieren
- Radioaktive Kinasierung:
 - o 1 µl dsOligonukleotid (1pmol/µl), 2.5 µl 10x Kinase-Puffer, 2.5 µl $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (10 µCi/µl; Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK), 1.25 µl $\text{T}_4\text{-Kinase}$ (10 U/µl; Promega, Madison, USA), H_2O ad 25µl \rightarrow 1 h bei 37°C , anschließend 10 min bei 65°C zur Inaktivierung der Kinase
 - o mit H_2O auf 50 µl auffüllen und über Sephadex-G-25-Säulen (Boehringer Mannheim) aufreinigen
 - o Messung des Eluates im $\beta\text{-Counter}$
- Bindungsreaktion:
 - o 10 µg Protein bzw. 2 µl einer in-vitro-Transkriptions-/Translationsreaktion, 1 µl radioaktiv markierte Oligonukleotide (60.000 cpm), 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 300 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 5% Glycerol und 2 µg Poly[(dl-dC)] (Boehringer Mannheim), H_2O ad 25 µl; 1 h bei 4°C (Proteinextrakte) bzw. 1 h bei Raumtemperatur (rekombinantes Protein) inkubieren
 - o Kompetitionsanalyse: ansteigende Mengen nicht-markierter doppelsträngiger Oligonukleotide (0.06 bis 1 pmol pro Reaktion) zur Bindungsreaktion zugeben
 - o Supershift-Analyse: die Proteine mit 6 µg eines Antikörpers gegen humanes Nkx2.5 (Nkx2.5 N-19; Goat $\text{-Anti-Human Nkx2.5}$; Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) bzw. als Negativkontrolle gegen humanes ECE (B61; Rabbit-Anti-Human ECE, überlassen von Dr. T. Subkowski) für 1h bei Raumtemperatur präinkubieren
- Auftrennung der Bindungsreaktionen in einem 4% Polyacrylamidgel (mit mit 0,5x TBE für Proteinextrakte bzw. 1x Tris-Glycerin für rekombinantes Nkx) in einem Laufpuffer mit 0,5x TBE für

- Proteinextrakte bzw. 1x Tris-Glycin für rekombinantes Nkx
- Elektrophorese bei Raumtemperatur mit einer Stromstärke von 10 mA für ca. 4-6 h
 - Analyse nach Exposition der Gele auf Phosphoimagerplatten (BAS-MP-2040S, Fuji, Tokyo, Japan) mittels Phosphoimagerscanner (BAS-1500, Fuji, Tokyo, Japan)
-

3.5.8 Promotor-Reporter-Assays/ Transiente Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen fremder DNA in eine eukaryontische Zelle mit dem Ziel der Expression der fremden Gene in dieser Zelle (Nabel et al. 1994; Maclean 1987).

Um die Reporterplasmide in den Zellen der Zellkultur zu exprimieren, wurde die Transfektion mit Fugene-6 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland), einem komplexen Transfektionsreagenz (= Transfektionsreagenz der dritten Generation, das aus einer komplexen Mischung verschiedener transfektions-fördernder Stoffe besteht (Gassen und Schimpf 1999)), durchgeführt. Der Vorteil dieser Transfektionsreagenzien der dritten Generation besteht in einer hohen Transfektionseffizienz bei nur geringer Toxizität (Budker et al. 1996, Budker et al. 1997).

Die Luziferase-Konstrukte und die Expressionsvektoren wurden unter der Verwendung von Fugene-6 und 1 µg des jeweiligen Plasmids pro Loch transfiziert. Eine Standardisierung wurde durch Kotransfektion mit 1 µg pSV-β-Galaktosidase-Kontroll-Vektor (Promega, Madison, USA) bzw. über die Zellzahl – im Fall der Koexpressionsexperimente – erreicht. Die gleichzeitige Transfektion mit einem Luziferase- und einem Galaktosidasevektor diente der Standardisierung der Luziferaseaktivität und damit der Elimination des systematischen Fehlers der unterschiedlichen Transfektionen.

Weder der Transfektionsvorgang an sich noch die Koexpression mit Nkx 2.5 zeigten lichtmikroskopisch offensichtliche morphologische Veränderungen.

Die Zellen wurden 48 Stunden nach Beginn der Transfektionsreaktion unter der Verwendung von Reporter Lysis Puffer (Promega, Madison, USA) „geerntet“.

Die Luziferase- und Galaktosidaseaktivität wurden in einem Lumat LB 9501 (Laboratorium Prof. Berthold, Bad Wildbach, Deutschland) mit Luciferase Assay Substrate TM (Promega, Madison, USA) und Galacton TM/Light Emission Accelerator TM (Tropix, Bedford, USA) gemessen.

Das Prinzip der Galaktosidasemessung besteht in einer Spaltung des Substrates Galacton durch das Enzym Galaktosidase, das im kotransfizierten Plasmid pSV- β -Galaktosidase kodiert ist. Durch die Spaltung wird Licht emittiert, weshalb man auch von einer Chemolumineszenzreaktion spricht. In einem Luminometer wird die Lumineszenz nach Zugabe eines Akzelerators, der die Galaktosidaseaktivität terminiert und die Lichtemission beschleunigt, gemessen.

Auch bei der Luziferasemessung handelt es sich um eine Chemolumineszenzreaktion. Hier wandelt die Leuchtkäferluziferase, die durch das pGL3-basic-Reporterplasmid kodiert ist, das Substrat Luziferin um, wobei Photonen emittiert werden.

Protokoll: Transiente Transfektion:

Vorbereitung:

- Zellen in 6-Loch-Platten umsetzen
- Medienwechsel am Tag der Transfektion
- Optimem im 37°-Wasserbad vorwärmen
- Fugene vor der Benutzung ca. 10-15 min bei Raumtemperatur stehen lassen

- DNA (je nach Versuchsansatz; s.Tab) in ein Eppendorfgefäß pipettieren

	pro einzelmem Loch	pro einzelmem Loch bei den Kotransfektionen
Ansatz A	- 0,5 μ g Luc-Reporter-Plasmid - 0,5 μ g β -Gal-Plasmid - H ₂ O ad 5 μ l	- 0,5 μ g Luc-Reporter-Plasmid - 0,5 μ g Renilla-Plasmid - 0,5 μ g Expressionsvektor (Nkx2.5 in pCR 3.1) - H ₂ O ad 5 μ l
Ansatz B	- 92 μ l Optimem - 3 μ l Fugene	- 90,5 μ l Optimem - 4,5 μ l Fugene
Gesamtvolumen	100 μ l	100 μ l

- Fugene in Optimem (Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland) verdünnen (s. Tab., Ansatz B); Optimem vorlegen und entsprechende Menge Fugene dazupipettieren); 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
 - das verdünnte Fugene tropfenweise in ein Eppendorfgefäß mit DNA (Luziferase-Reporterplasmid und β -Gal-Plasmid bzw. Luziferase-Reporterplasmid, β -Gal-Plasmid und Expressionsvektor) geben; vorsichtig mischen und 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
 - je 100 μ l der Optimem-Fugene-DNA-Mischung fraktioniert auf ein Loch einer 6-Loch-Platte geben (pro 6-Loch-Platte benötigt man 600 μ l der Optimem-Fugene-DNA-Mischung, bei einem n=6 Versuchsansatz)
 - nach 24 h Medienwechsel
 - nach 48 h Zellernte
 - o Herstellung einer 1x Stammlösung des Reporter-Lysis-Puffers (Promega, Madison, USA)
 - o Medium von den Zellen absaugen
 - o zweimal mit je 2 ml PBS pro Loch waschen, anschließend PBS vollständig absaugen
 - o pro Loch 500 μ l des 1x Reporter-Lysis-Puffers auf die Zellen geben und die Platten schwenken
 - o 15 min bei Raumtemperatur inkubieren, dabei nach 7 min erneut schwenken
 - o Zellen abschaben
 - o Lysate in 1.5 ml Eppendorfgefäße (auf Eis) überführen; für 2 min bei 14.000 U/min bei 4°C zentrifugieren
 - o den Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
 - o Lagerung bei -20°C bzw. Messung der Luziferase-/Galaktosidase-Aktivität
-

3.6 Statistik

Die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Student's t-Test für unverbundene Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.