

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Es wurden folgende Zellkulturmedien verwendet:

- RPMI 1640, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS (v/v)
- DMEM mit Glutamax, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS (v/v)

Sämtliche Arbeiten mit den Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Fetales Kälberserum (FCS) wurde vor Gebrauch hitzeinaktiviert (30 min, 56 °C). Entweder wurden die verwendeten Materialien vor ihrer Benutzung in einem Autoklav bei 120 °C mit Wasserdampf sterilisiert oder es wurden steril verpackte Einwegartikel verwendet. Wenn man eine definierte Zelldichte brauchte, wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zelldichte eingestellt. Alle Suspensionszellen (K562, HL60, THP1 und U937) wurden im RPMI Medium (mit Zusätzen) kultiviert. Alle 2–3 Tage wurde das Zellkulturmedium der Suspensionszellen erneuert. Nach 5 min Zentrifugation bei 100 × g wurde das Medium gewechselt oder die Zellen wurden, nachdem sie im PBS gewaschen worden waren, für weitere Versuche verwendet. Adhärenz wachsende Zellen (HT29B6 und HepG2) wurden entsprechend im RPMI- und DMEM-Medium (mit Zusätzen) kultiviert. Beide Zelllinien besitzen eine epitheliale Morphologie und wachsen als Monolayer auf unbeschichteten Gewebekulturplatten. Nach der Ausbildung der vollständigen Monolayer, wurde das Kulturmedium alle 3–4 Tage gewechselt. Weil Trypsin den Transferrinrezeptor am Arg 121 spaltet (Turkewitz *et al.*, 1988), wurde auf dessen Einsatz beim Passagieren der adhärenz Zellen verzichtet. Stattdessen wurden die Zellen durch eine Inkubation für 3–5 min im PBS w/o Ca²⁺ / Mg²⁺ im Brutschrank bei 37 °C vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Das Zellpellet wurde entweder in frischem Medium resuspendiert und auf neue Gewebekulturplatten aufgeteilt oder nach dem Waschen mit PBS für weitere Experimente verwendet.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfriermedium: 40 % v/v RPMI oder DMEM-Medium, 40 % v/v FCS, 20 % v/v DMSO

Zum Einfrieren wurden $\sim 10^7$ Zellen in 10 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen, pelletiert (5 min bei $100 \times g$) und wieder in Zellkulturmedium (0,5 ml) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Einfriermedium und Überführung in 2-ml-Kryoröhrchen wurden die Zellen mittels eines Zelleinfriergerätes (Air Liquide) eingefroren (45 min – Stufe 3, 15 min – Stufe 9).

Zur Rekultivierung wurden die Zellen schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert (5 min, $100 \times g$). Nach dem Resuspendieren in frischem Zellkulturmedium wurden die Zellen in Gewebekulturflaschen oder Gewebekulturplatten überführt und weiterkultiviert.

3.1.3 Stabile Transfektion von K562-Zellen mittels Nukleofektion

Die Transfektion von K562-Zellen mit Plasmiden erfolgte nach dem Protokoll zur Nukleofektion der K562-Zellen mittels *Cell Line Nucleofector™ Kit V* (Amaxa Biosystems). Dazu wurden 10^6 Zellen 10 min bei $200 \times g$ abzentrifugiert und in $100 \mu\text{l}$ *Nucleofector™ Solution V Reagent* resuspendiert. Danach wurden Präprohepcidin-cDNA-pcDNA-Plasmide oder pcDNA3-Plasmid (als Kontrolle) in Mengen, die in der Tabelle 3.1 aufgeführt sind, dazugegeben.

Tab. 3.1: Ansätze zur Transfektion der K562-Zellen im *Cell Line Nucleofector™*.

Ansatz	Plasmid	Menge des Plasmids im Ansatz (μl)	Menge des Plasmids im Ansatz (μg)	Plasmid-DNA-Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1	Hepcidin-cDNA-pcDNA3-2	2,0	1,18	0,59
2	Hepcidin-cDNA-pcDNA3-2	4,0	2,36	0,59
3	Hepcidin-cDNA-pcDNA3-20	1,0	1,04	1,04
4	Hepcidin-cDNA-pcDNA3-20	2,0	2,08	1,04
5	pcDNA3	0,5	2,65	5,29
6	pcDNA3	1,0	5,29	5,29

Nach der Transfektion wurde die Zelldichte auf 5×10^5 Zellen pro ml FCS freies RPMI 1640 Medium mit 100 U/ml Penicillin und $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin eingestellt und die Zellen wurden 24 Stunden kultiviert. Danach wurde zum Zellkulturmedium der Transfektanten oder der nichttransfizierten Kontrollzellen 10 % FCS zugegeben. Zur Selektion wuchsen Zellen in

der Anwesenheit von 500 µg/ml Geneticin (G-418). Alle zwei Tage wurde das Selektionsmedium erneuert und die Zelldichte immer auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Nach zehn Tagen waren alle Kontrollzellen gestorben und nach weiteren elf Tagen wurden die Transfektanten in Medium ohne G-418 überführt. Aus allen sechs Ansätzen (darunter zwei pcDNA3-Kontrollen) wurden transfizierte Zellen selektiert und entweder für weitere Versuche verwendet oder eingefroren.

3.1.4 Kultivierung von Transfektanten und Kontrollzellen

In Versuchen zum Einfluss der Überexpression von Präprohepcidin auf den Eisenstoffwechsel in K562-Zellen, wurde die Zelldichte der Präprohepcidin-cDNA-pcDNA3 und pcDNA3-Transfektanten exakt auf 5×10^5 Zellen/ml im FCS freien Medium eingestellt und die Zellen wurden für 72 Stunden kultiviert. Dies sollte ausschließen, dass unterschiedliche Bedingungen der Zellkultur auf den Eisenmetabolismus in der Präprohepcidin-cDNA-pcDNA3 und pcDNA3-Transfektanten Einfluss nehmen. Schließlich wurde die Zahl der Zellen bestimmt (Neubauer- Kammer). Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen für weitere Experimente verwendet.

3.1.5 Differenzierung der K562-Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)

PMA-Stammlösung :	2 mM PMA in DMSO
Bisindolylmaleimid I (GF 109203X)-Stammlösung:	1 mM GF 109203X in DMSO
Ferri-Tf-Stammlösung:	50 mg/ml Ferritransferrin in PBS
FAC-Stammlösung:	50 mg/ml FAC in PBS
FeNTA-Stammlösung:	5 mM FeCl ₃ / 1 mM NTA, pH 7,3
DMSO-Stammlösung:	14,08 M DMSO

In allen Differenzierungsexperimenten wurden K562-Zellen in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml im Zellkulturmedium ohne FCS bis zu 72 Stunden kultiviert. Differenzierungsstudien mit Ausnahme jener, die in Kap. 3.1.5.1 und 3.1.5.2 beschrieben sind, wurden mit der Endkonzentration von 100 nM PMA im Zellkulturmedium durchgeführt (Aro *et al.*, 2002). Kontrollzellen wuchsen unbehandelt, während DMSO-Kontrollzellen in der Anwesenheit von 0,7 mM DMSO kultiviert wurden. Diese Konzentration entspricht der Endkonzentration von

DMSO in der Zellkultur, nachdem 2 mM PMA (in DMSO) in die Zellkultur zugegeben wurde. In manchen Experimenten zur Rolle der Proteinkinase C (PKC) in der megakaryozytären Differenzierung wurde 1 μM des PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimid I zusammen mit 100 nM PMA zum Zellkulturmedium der K562-Zellen für maximal 72 Stunden zugegeben (Jacquel *et al.*, 2006). Kontrollzellen wuchsen bis zu 72 h ohne PMA und mit GF 109203X im Zellkulturmedium. Nach der Stimulation wurden adhärent gewordene Zellen durch Inkubation für 3–5 min in PBS w/o Ca^{2+} / Mg^{2+} im Brutschrank vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Kammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für weitere Versuche verwendet.

3.1.5.1 Experimente zum Einfluss verschiedener PMA- und DMSO-Konzentrationen auf die Proliferation der K562-Zellen und die HFE-Proteinexpression

Um festzustellen, welchen Einfluss verschiedene PMA-Konzentrationen auf das Wachstumsverhalten der K562-Zellen oder die Expression des HFE-Proteins besitzen, wurden K562-Zellen mit steigenden Konzentrationen von PMA (5–1000 nM) behandelt. Nach 24 Stunden wurden jeweils $1,25 \times 10^7$ Zellen als Aliquots abgenommen, lysiert und als Proben für Versuche zur Abhängigkeit der HFE-Proteinexpression von der PMA-Konzentration verwendet. Nach 72 Stunden wurde die Zellzahl in der Neubauer Kammer bestimmt. Weil DMSO (Lösungsmittel von PMA und GF 109203X) selbst Differenzierungsprozesse in höheren Konzentrationen hervorrufen kann (Tsiftoglou *et al.*, 2006, *review*), wurde auch dessen Einfluss auf die Proliferation der K562-Zellen untersucht. Dazu wurden diese Zellen mit steigenden Konzentrationen von DMSO (0,035–7 mM) für 72 Stunden behandelt und danach wurde die Zellzahl bestimmt (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Verschiedene PMA- und DMSO-Konzentrationen, die für Versuche zum Einfluss von PMA oder DMSO auf die Proliferation der K562-Zellen und die HFE-Proteinexpression benutzt wurden.

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PMA (nM)	0	5	10	20	40	80	160	320	640	1000
DMSO (mM)	0	0,035	0,07	0,14	0,28	0,56	1,12	2,24	4,48	7

3.1.5.2 Experimente mit Beladung der proliferierenden oder differenzierenden

K562-Zellen mit FAC, FeNTA oder Ferri-Tf

- 1) Zur Feststellung der Regulierbarkeit der HFE-Proteinexpression durch Eisen in K562-Zellen wurden diese Zellen 24 h in Anwesenheit von 25, 50, 100, 200 oder 400 μM FeNTA im Zellkulturmedium kultiviert.
- 2) Um festzustellen, unter welchen Bedingungen die Kultivierung der K562-Zellen in Anwesenheit von FAC oder Ferri-Tf die Analyse der Regulation des Eisenstoffwechsels durch den eisenabhängigen posttranskriptionalen Feedback-Mechanismus ermöglicht, wurden proliferierende K562-Zellen mit 100 μM FAC für 48 Stunden oder mit 4 mg/ml Ferri-Tf für 120 Stunden kultiviert (diese Konzentration von Ferri-Tf entspricht der vierfachen physiologischen Konzentration von Holo-Tf im humanen Blut).
- 3) Für Untersuchungen zur Rolle des Eisens in der Regulation des Eisenstoffwechsels während der megakaryozytären Differenzierung wurden K562-Zellen mit:
 - a) 100 μM FAC während der 48 oder 72 Stunden langen megakaryozytären Differenzierung mit 100 nM PMA behandelt. FAC und PMA wurden zur gleichen Zeit, am Anfang des Experiments in die Zellkultur zugegeben. Zum Vergleich wurden K562-Zellen während der Proliferation mit 100 μM FAC beladen und für 48 oder 72 Stunden ohne PMA kultiviert.
 - b) 100 μM FAC für 48 Stunden vor dem Beginn der megakaryozytären Differenzierung mit PMA behandelt. Danach wurden diese Zellen dreimal mit RPMI-Medium gewaschen, in frisches Zellkulturmedium aufgenommen und mit 100 nM PMA für 72 Stunden stimuliert. Zum Vergleich wurden K562-Zellen 72 Stunden ohne PMA kultiviert.
- 4) Für Untersuchungen zum Ausmaß der transferrinabhängigen Eisenaufnahme während der megakaryozytären Differenzierung wurden K562-Zellen mit 4 mg/ml Ferri-Tf während 72 Stunden der megakaryozytären Differenzierung behandelt. Ferri-Tf und PMA wurden zur gleichen Zeit, am Anfang des Experiments in die Zellkultur zugegeben. Zum Vergleich wurden K562-Zellen mit Ferri-Tf beladen und für weitere 72 Stunden ohne PMA kultiviert.
- 5) Für Untersuchungen zur Messung der Absorption bei 413 nm (A413) in verschiedenen Zelllinien wurden 5×10^5 Zellen/ml von K562, HL60, THP1 und HepG2 Zellen im Zellkulturmedium mit 10 % FCS (v/v) kultiviert. Manche Kulturen der K562-Zellen wurden

nach 24 Stunden mit 100 μ M FAC versetzt. Nach 72 Stunden erfolgte die Zellzahlbestimmung und nach Waschen in PBS (dreimal) wurden die Zellen lysiert und in den Überständen der Zellysaten wurde die Absorption bei 413 nm gemessen (Kap. 3.1.11).

3.1.6 Lyse von Zellen

Lysepuffer:	PBS, 1 % Triton X-100, PIC 5 % (v/v)
PIC („Protease-Inhibitor-Cocktail“):	je 1 mg/ml Antipain, Leupeptin, Pepstatin, Chymostatin

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, für 5 min bei $100 \times g$ und 4 °C abzentrifugiert, in Lysepuffer aufgenommen und 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Durch die Zentrifugation der Lysate (15 min, $20\,000 \times g$, 4 °C) wurden Zellreste pelletiert und in den Überständen wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Methode bestimmt.

3.1.7 Vitalitätsassay mit Fluoresceindiacetat (FDA)

FDA-Stammlösung:	10 mg/ml Fluoresceindiacetat im DMSO
FDA-Lösung:	FDA-Stammlösung im vorgewärmten (37 °C) PBS ⁺⁺ (1:1000)

Zur Messung der Vitalität der K562-Zellen nach der Behandlung mit PMA und (oder) FAC wurde ein von Larsson und Nygren beschriebener Fluoresceindiacetatassay (FDA-Assay) verwendet (Larsson und Nygren, 1989). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Tatsache, dass in stoffwechselaktiven Zellen das Fluoresceindiacetat von kurzlebigen cytoplasmatischen Esterasen zu Fluorescein hydrolysiert wird. Das entstehende farbige (gelb-grüne) Fluorescein lässt sich im Überstand der Zellen mittels Photospektrometrie quantitativ bestimmen. Die für den jeweiligen Versuch erforderliche Zellzahl wurde in einem Volumen von 200 μ l in eine frisch zubereitete FDA-Lösung zugegeben. Nach einer 45-minütigen Inkubation im Brutschrank (37 °C) und einer 5-minütigen Zentrifugation bei $100 \times g$ wurde die Emission bei 538 nm in den Überständen bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm gemessen (SpectraMax Gemini Fluoreszenzlesegerät für Mikroplatten). Von diesem Wert wurde die Emission in zellfreien Kontrollansätzen (Blanc) abgezogen und als Wert für die Fluoreszenz angegeben.

3.1.8 Zellorganellenfraktionierung

3.1.8.1 Homogenisation von Zellen

$1-2 \times 10^8$ Zellen wurden für 5 min bei $100 \times g$ abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und in 10 ml 10 % PBS aufgenommen. Nach 30 min Inkubation auf Eis (osmotische Lyse) erfolgte unter Kühlung die Homogenisation der Zellen im Potter-Homogenisator. Die Zellen wurden in den kapillaren Spalt zwischen Glasgefäß und rotierendem Teflonstempel hineingepresst und durch die auftretenden Scherkräfte fragmentiert. Dabei blieben Kerne, Mitochondrien, Lysosomen und weitere Organellen unversehrt.

3.1.8.2 Differentielle Zentrifugation und Membranpräparation

Die Zellorganellen wurden durch Differentialzentrifugation voneinander abgetrennt. Die im Homogenisat suspendierten Partikel besitzen einen unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten und können deshalb durch die Zentrifugation voneinander getrennt werden. Zuerst wurde für 15 min bei 4°C und $500 \times g$ zentrifugiert, um die Zelltrümmer und Zellkerne zu pelletieren. Danach erfolgte die Zentrifugation bei $2600 \times g$, 15 min, 4°C , um vor allem Mitochondrien und Lysosomen zu pelletieren. Der Überstand wurde schließlich eine Stunde bei $100\,000 \times g$ in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Pellet, das vor allem aus der Plasmamembran und ER-Fragmenten besteht (die mikrosomale Membranenfraktion), wurde in 1–2 ml PBS aufgenommen und bei $14\,800 \times g$ abzentrifugiert (Kaup *et al.*, 2002b). Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die mikrosomale Membranen, je nach Größe des Pellets, in 250–750 μl PBS aufgenommen, um eine Proteinkonzentration von $\sim 2-5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu erhalten. In auf diese Weise vorbereiteten Proben wurde die Proteinkonzentration gemessen und Proben wurden für weitere Experimente verwendet.

3.1.9 Isolierung der Exosomen aus dem Zellkulturmedium der K562-Zellen

Das FCS-freie Medium der K562-Zellen, die mit PMA 72 Stunden stimuliert wurden, und das Medium der ohne PMA kultivierten Kontrollzellen wurde 20 min bei $20\,800 \times g$ zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu pelletieren. Nach der Sterilfiltrierung des Mediums durch einen $0,22\text{-}\mu\text{m}$ -Filter, wurden die Exosomen durch eine 60-minütige Ultrazentrifugation unter Kühlung bei $100\,000 \times g$ pelletiert (Savina *et al.*, 2002). Schließlich wurden die Exosomen in 50 μl PBS aufgenommen und nach der Proteinbestimmung für weitere Versuche verwendet.

3.1.10 Bestimmung der Hämoglobinkonzentration

Die Konzentration von Hämoglobin wurde spektrophotometrisch durch Messung der Absorption in Zelllysaten bei 413 nm bestimmt (Smith *et al.*, 2000). Die Abb. 3.1A zeigt ein Absorptionsspektrum von Hämoglobin im Bereich von 340 bis 620 nm, das aus Lysaten der K562-Zellen aufgenommen wurde. Dazu wurden Zellen dreimal mit PBS gewaschen, in H₂O resuspendiert und eine Stunde bei Raumtemperatur lysiert (osmotische Lyse). Nach dem Pelletieren der Zellreste (5 min bei 15 700 × g) wurde in Überständen (100 µl) die Absorption bei 413 nm gemessen. Als Werte wurden die Differenzen der Absorption in den Proben und des zellfreien Ansatzes (H₂O) angegeben. Die Absorption bei 413 nm entspricht der Absorption der Hämgruppe (Eisen(II)-Protoporphyrin-IX) des Hämoglobins (Abb. 3.1B).

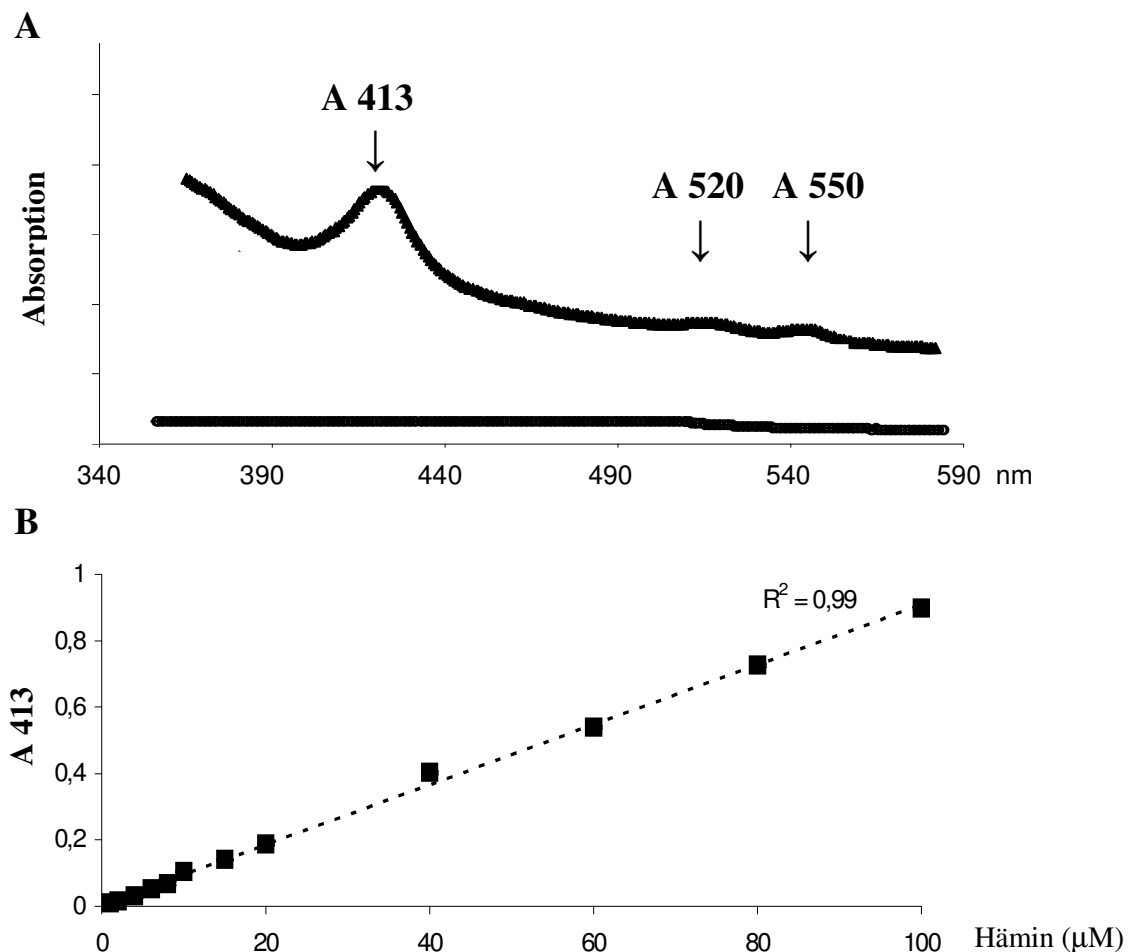


Abb. 3.1: (A) Ein Absorptionsspektrum des Hämoglobins im Bereich von 340–620 nm; als Probe wurde ein Überstand des Zelllysates der K562-Zellen (obere Linie) oder Wasser (untere Linie) verwendet. (B) Die Abhängigkeit der Absorption bei 413 nm von der Häminkonzentration (1–100 µM) in der Probe; die aufgetragenen Werte entsprechen den Mittelwerten, die in vier unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. Die Standardabweichungen der Mittelwerte sind so gering, dass sie innerhalb der Symbole liegen; R^2 – Bestimmtheitsmaß.

3.1.11 Bestimmung der Masse der K562-Zellen

Nach 24–72 h der megakaryozytären Differenzierung wurden $2,5 \times 10^7$ K562-Zellen 5 min bei $100 \times g$ abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen, in PBS resuspendiert und in die zuvor eingewogenen Eppendorf-Gefäße überführt. Nach Zentrifugation von 5 min bei $100 \times g$ wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zellen in den Eppendorf-Gefäßen wurden auf der Feinwaage abgewogen.

3.1.12 Kolorimetrische Eisenbestimmung

Lösung A: 0,6 N HCl, 2,25 % (w/v) KMnO_4 (0,142 M)

Lösung B: 6,5 mM Ferrozin, 13,1 mM Neocuproin, 2 M Ascorbinsäure, 5 M Ammoniumacetat

Zur Bestimmung der Eisenkonzentration wurde die Ferrozin-Methode verwendet (Fish, 1988). Als Proben wurden Überstände der Lysate von K562-Zellen eingesetzt, die genauso wie die im Kap. 3.1.10 beschriebenen Lysate zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration vorbereitet wurden. Die Überstände der Lysate wurden mit der Lösung A (*Iron-Releasing Reagent*) versetzt (1:2 v/v) und zwei Stunden bei 60°C inkubiert, um Eisen aus den Proteinkomplexen zu befreien. Danach wurde die Lösung B (*Iron-Reducing and -Chelating Reagent*) zugegeben (1:15 v/v). Ascorbinsäure reduziert Fe^{3+} zu Fe^{2+} , das durch den Eisenchelator Ferrozin komplexiert wird. Die Zugabe des Kupferchelators Neocuproin verhindert die Bindung von freien Kupferionen an Ferrozin und die daraus resultierende Verfälschung der Ergebnisse. Die Proben wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Die Quantifizierung erfolgte nach der Vorbereitung der Kalibrierungskurve mit 1–400 μM FeCl_2 .

3.1.13 Bestimmung der Acetylcholinesteraseaktivität (AChE-Assay)

Acetylthiocholiniodid-Stammlösung: 1,5 mM Acetylthiocholiniodid in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer

5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoessäure)-Stammlösung: 1,2 mM 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoessäure) in 0,1 M Kaliumphosphat Puffer

Für die Bestimmung der Aktivität der Acetylcholinesterase (AChE) wurde die spektrophotometrische Methode nach Ellman verwendet (Ellman *et al.*, 1961). Die Acetylcholinesterase katalysiert nicht nur die Hydrolyse von Acetylcholin zur Cholin und Acetat, sondern auch von deren Analogon Acetylthiocholin, wobei in diesem Fall Thiocholin freigesetzt wird. Das Thiocholin reagiert mit 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoat wodurch 5-Thio-2-nitrobenzoat gebildet wird. Die gelbe Farbe dieser Substanz ermöglicht ihre spektrophotometrische Quantifizierung durch die Messung der Absorption bei 405 nm, welche die Aktivität der Acetylcholinesterase widerspiegelt. Für jeden Versuch wurde die angegebene Zellzahl in jeweils 0,5 ml der Acetylthiocholiniodid und 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)-Stammlösung resuspendiert und 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Proben abzentrifugiert (5 min, 100 × g) und in den Überständen wurde die Absorption bei 405 nm gemessen. Als Werte wurden die Differenzen der Absorption in den Proben und in der negativen Kontrolle (H₂O) angegeben.

3.1.14 Färbung der Zellen nach Pappenheim

May-Grünwald-Lösung

Giemsa-Lösung

Die Färbung der K562-Zellen mit der May-Grünwald- und Giemsa-Lösung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich-Fluka). Diese Färbung nach Pappenheim ist eine allgemein verwendete Färbung für Blutausstriche. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die sauren und basischen Farbstoffe im unterschiedlichen Ausmaß mit den einzelnen Zellbestandteilen reagieren, die unterschiedliche Oberflächenladungen besitzen. Methylblau ist z. B. ein positiv geladener (saurer) Farbstoff, während Eosin eine negativ geladene (basische) Substanz ist, die zur Gegenfärbung dient und für die azidophilen Rottöne verantwortlich ist. Die Zellkerne werden rötlich-violett angefärbt, während Cytoplasma der erythroiden Zellen nach der Färbung eine rosa Farbe annimmt. Alle Farbstoffe beider Lösungen sind in der Tab. 3.3 aufgeführt.

Tab. 3.3: Farbstoffe der May-Grünwald- und Giemsa-Lösung.

Lösung	Farbstoff			
May- Grünwald	Eosin	Methylenblau		
Giemsa	Eosin	Methylenblau	Methylenazur	Methylenviolett

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach dem von Pierce entwickelten *BCA protein assay*. Bei dieser kolorimetrischen Methode wird die Tatsache berücksichtigt, dass Proteine in einem alkalischen Milieu Cu^{2+} zu Cu^{1+} -Ionen reduzieren, die mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex ausbilden. Das Absorptionsmaximum dieses Komplexes bei 562 nm kann spektrophotometrisch bestimmt werden. Das ermöglicht die Ermittlung des Proteingehalts in der Probe. Die Verwendung der Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen (z. B. Albumin) macht die Quantifizierung des Proteingehalts in der Probe möglich. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurden 10 μl der Proben (meist verdünnt) oder der Proteinstandards mit 100 μl der Färbelösung (Puffer A und B, 50:1 v/v) gemischt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption bei 562 nm am Mikroplattenphotometer gemessen.

3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

APS:	10 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ in H_2O
Acrylamidmix:	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris / HCl, pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris / HCl, pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS
Elektrophoresepuffer:	20 mM Tris / HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
4 × SDS-Probenpuffer (reduzierend):	250 mM Tris / HCl, pH 6,8, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau, 8 % (v/v) β -Mercaptoethanol

Die Trennung der Proteine erfolgte mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Diese Methode, deren Bezeichnung sich von der Verwendung eines diskontinuierlichen pH-Wertes ableitet, ermöglicht die Trennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse. Das negativ geladene Detergenz SDS lagert sich so an die Aminosäuren, dass ein Protein ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis besitzt. Nach der Reduktion der Disulfidbrücken durch das im reduzierenden Probenpuffer enthaltenen β -Mercaptoethanol

und der Denaturierung der Proteine durch SDS, besitzt die Form des Proteins keinen Einfluss mehr auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld. In der großporigen Polyacrylamidmatrix des Sammelgels mit einem pH von 6,8 werden die Proteine angereichert und schließlich im Trenngel mit einem pH von 8,8 voneinander getrennt. Die Polyacrylamidmatrix ist ein Heteropolymer, das aus Acrylamid und N'-N'-Methylen bis(acrylamid) besteht und dessen Polymerisation durch Zugabe von TEMED (Katalysator) und APS (Radikalstarter) initiiert wurde. Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen ist in Tab. 3.4 dargestellt. Probengemische wurden mit 1/3 des Probenvolumens an $4 \times$ Probenpuffer (unter nicht-reduzierenden Bedingungen ohne β -Mercaptoethanol) versetzt und 5 min im Wasserbad bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese der Gele erfolgte im Laufpuffer unter Wasserkühlung (14 °C) bei 30 mA und 160 V. Sobald die Lauffront das untere Ende des Gels erreichte, wurde die Elektrophorese gestoppt und die Proteine wurden entweder im Gel direkt detektiert (Coomassiefärbung) oder nach ihrem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran indirekt immunologisch nachgewiesen (Westernblot).

Tab. 3.4: Ansätze für Trenngele und 4,5 %iges Sammelgel.

Reagens	7,5 % Trenngel	10 % Trenngel	12 % Trenngel	4,5 % Sammelgel
ELIX-Wasser	3,0 ml	2,5 ml	2,1 ml	720,0 μ l
Trenngelpuffer	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	300,0 μ l
Acrylamidmix	1,5 ml	2,0 ml	2,4 ml	180,0 μ l
10 % APS	30,0 μ l	30,0 μ l	30,0 μ l	10,0 μ l
TEMED	3,0 μ l	3,0 μ l	3,0 μ l	3,0 μ l

3.2.3 Coomassiefärbung und Trocknen von Gelen

Coomassielösung: 0,1 % (w/v) Coomassie brilliant blue R250, 10 % Essigsäure, 40 % Methanol, filtriert

Entfärber: 10 % Essigsäure, 20 % Ethanol

Nach der Abtrennung des Sammelgels vom Trenngel wurden die Proteine im Trenngel 30 min in Coomassielösung fixiert. In dieser Zeit kam es zur Ausbildung farbiger Komplexe zwischen hydrophoben Proteinbereichen und dem Coomassiefarbstoff. Der überschüssige Farbstoff wurde durch intensives Waschen des Gels im Entfärber entfernt, so dass Proteinbanden sichtbar werden konnten. Mit dieser Methode kann man 0,1 μ g Protein pro Bande nachweisen. Zum Trocknen von SDS-Polyacrylamidgelen nach der Färbung wurden

diese Gele in eingeweicherter Cellophanfolie luftblasenfrei eingelegt und bei Unterdruck und 80 °C 2 h im Gelrockner getrocknet.

3.2.4 Westernblot

<i>Semidry-Blotpuffer:</i>	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % (v/v) Ethanol, 0,04 % SDS
PBSB_{0,2}:	PBS mit 0,2 % (w/v) Brij 58
Magermilchlösung:	PBS mit 1,5 % (w/v) Magermilchpulver
<i>Stripping-Puffer:</i>	62,5 mM Tris / HCl, pH 6,7, 2 % (w/v) SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol

3.2.4.1 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Das *semidry*-Blotverfahren ermöglicht den Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel im *Semi-Dry*-Blotpuffer 10 min equilibriert und danach auf die gleichgroße Nitrozellulosemembran gelegt. Anschließend wurden Gel und Nitrozellulosemembran zwischen je zwei feuchten Filterpapieren in der Blotkammer positioniert, in welcher der Proteintransfer für 1 h mit 1000 mA und 80 V durchgeführt wurde.

3.2.4.2 Immunoblot

Der Immunoblot ermöglicht den immunologischen Nachweis der auf der Nitrozellulosemembran fixierten Proteine. Zunächst wurde die Membran 30 min in 1,5 % Magermilchlösung in PBS auf einem Kippschüttler inkubiert, um die nichtspezifischen Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Nach dem Abgießen der Magermilchlösung wurden die Primärantikörper 1833538, OKT9, A 5441 oder sc-18807 in PBSB_{0,2} verdünnt (Tab. 3.5) und die Membran wurde auf einem Kippschüttler bei 4 °C 24 Stunden inkubiert (sc-18807: 48 h). In TST 0,1 % Tween 20-Puffer verdünnt (Tab. 3.5) wurden dagegen Antikörper ab662 und BM-75.2 ohne vorherige Blockierung mit Magermilchpulver den Membranen zugesetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert. Danach wurden die Membranen dreimal 30 min mit PBSB_{0,2} oder TST 0,1 % Tween 20 gewaschen, um die nicht an das Zielprotein gebundenen Antikörper von der jeweiligen Membran vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Sekundärantikörper in PBSB_{0,2} oder in TST 0,1 % Tween 20 auf dem Kippschüttler mit der Membran 30 min inkubiert (Tab. 3.5). Die nicht an die Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörper wurden durch drei halbstündige

Waschschritte mit PBSB_{0,2} oder TST 0,1 % Tween 20 entfernt. Schließlich wurden die Membranen mit jeweils 0,5 ml der beiden *enhanced chemi-luminescence*-Reagenzien für eine Minute versetzt um die Detektion der immunoreaktiven Banden zu ermöglichen. Je nach der Stärke der Signale erfolgte die Filmentwicklung zwischen 15 Sekunden bis 24 Stunden.

Tab. 3.5: Verwendete Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper, die in Immunoblots eingesetzt wurden.

Antigen	Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
TfR1	OKT9	1:3000	RAM*	1:5000
HFE	sc-18807	1:1000	Sc2768*	1:5000
Integrin α2b/β3	Ab662	1:1000	RAM*	1:5000
α-Aktinin	BM-75.2	1:1000	A8786*	1:5000
PARP	1833538	1:1000	SAR*	1:5000
β-Aktin	A 5441	1:1000	RAM*	1:5000

Bei Bedarf konnten primäre und sekundäre Antikörper durch *stripping* vollständig von der Membran entfernt werden, um andere auf der Nitrozellulosemembran fixierte Proteine nachweisen zu können. Dazu wurden die Membranen 30 min bei 50 °C im *stripping*-Puffer inkubiert und dreimal 30 min in PBSB_{0,2} gewaschen.

3.2.5 Transferrin-Sepharose-Affinitätschromatographie und semiquantitative sTfR-Bestimmung

Die Methode der Transferrin-Sepharose-Affinitätschromatographie macht sich die Tatsache zunutze, dass sTfR ähnlich wie TfR1 mit hoher Affinität an Transferrin bindet (Fuchs und Geßner, 2002). Die Bindung des sTfR an die Transferrin-Sepharose ermöglicht seine Isolierung aus dem Zellkulturmedium und danach eine Semiquantifizierung im Immunoblot. Die Transferrin-Sepharose wurde durch die Kopplung von Apotransferrin an die aktivierte Cyanbromid-Sepharose (CNBr-Sepharose) und anschließende Sättigung der Transferrin-Eisenbindungsstellen mit 0,1 % FAC in PBS erstellt. Diese Methode der Transferrin-Sepharose-Synthese wurde bereits früher in der Arbeitsgruppe etabliert (Wandzik, 2003). Für die semiquantitative sTfR-Bestimmung wurden 100 μ l Transferrin-Sepharose in PBS zu 50 ml Medium der K562-Zellen (ohne FCS) zugegeben (Zellkulturmedien wurden vorher 20 min bei 20 800 \times g und 4 °C abzentrifugiert, um Zellreste zu entfernen). Die Proben wurden nachfolgend 12 Stunden auf dem Überkopfschüttler im Kühlraum geschüttelt um die Bindung des sTfR aus dem Zellkulturmedium an die Transferrin-Sepharose zu ermöglichen.

Danach wurde die Sepharose (mit gebundenem sTfR) durch eine 5-minütige Zentrifugation bei $100 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pelletiert, dreimal mit 5 ml PBS gewaschen und schließlich in 50 μl PBS aufgenommen. Die Ablösung des sTfR von der Transferrin-Sepharose erfolgte durch kurzes Aufkochen der Proben (5 min). Nach 5-minütiger Zentrifugation unter Kühlung bei $100 \times g$ wurden 10 μl des Überstandes (mit sTfR) als Probe für SDS-PAGE und Immunoblot mit dem OKT9 Antikörper verwendet.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Gesamt-RNA-Isolierung aus Zellkulturzellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus K562-, HepG2-, THP1- und HT29B6-Zellen wurde mittels *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) oder *NucleoSpin® RNA / Protein Kit* (Macherey-Nagel) nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Nach der spektrophotometrischen RNA-Konzentrationsbestimmung wurden die Proben entweder für Reverse Transkription verwendet oder bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Integrität der RNA wurde zudem durch den Nachweis der 28S- rRNA-Banden überprüft (Abb. 3.3).

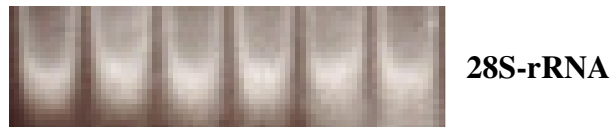


Abb. 3.3: Agarosegelelektrophorese (s. Kap. 3.3.9) einer Gesamt-RNA-Präparation. Als Proben wurden 1,3 μg Gesamt-RNA verwendet; 28S-rRNA wurde als 5-kb-Bande detektiert.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und der Reinheitsgrad der isolierten RNA- und DNA-Lösungen wurde spektrophotometrisch in Quarzküvetten bestimmt. Weil eine Absorption von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doppelsträngiger DNA oder von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ einzelsträngiger RNA entspricht, erfolgte die Berechnung nach folgenden Formeln:

- Konzentration der RNA [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] = $(A_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{Verdünnung}) / 1000$,
- Konzentration der DNA [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] = $(A_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{Verdünnung}) / 1000$.

Der Grad der Verunreinigung wurde über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm beurteilt. Reine DNA oder RNA soll einen $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ Quotienten von 1,8–2,0 besitzen (Ausubel *et al.*, 1997).

3.3.3 RT-PCR

Reverse Transkription ist ein Vorgang, bei dem nicht DNA, sondern mRNA als Matrize für die Transkription benutzt wird. Infolge einer derartigen Umschreibung entsteht die komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA). Diese Synthese wird durch die Reverse Transkriptase durchgeführt, die an der Replikation der Retroviren beteiligt ist. Sie synthetisiert den ersten Strang der cDNA, und dank ihrer RNase-H-Aktivität baut sie teilweise den RNA-Strang des RNA-DNA-Hybridmoleküls ab. Die verbleibenden RNA-Fragmente dienen dann als Primer für die Zweitstrangsynthese. Für die molekularbiologischen Experimente wird oft die *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, *Rnase H Minus Point Mutant* (M-MLV RT (H-)) verwendet, die keine RNase-H-Aktivität besitzt und besonders für die *first strand synthesis* der langen cDNAs geeignet ist. *Second strand synthesis* erfolgt dann durch die Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Für die in diesem Kapitel dargestellten Experimente wurde jedoch nicht nur diese *two-step RT-PCR* durchgeführt (Tab. 3.7), sondern auch die *one-step RT-PCR* (Tab. 3.6) mit der Hilfe des *OneStep RT-PCR Kits* (Qiagen). Die im *OneStep RT-PCR Enzyme Mix* enthaltenen, rekombinant hergestellten Enzyme – *Omniscript Reverse Transkriptase* und *Sensiscript Reverse Transkriptase* ermöglichen die Reverse Transkription, während die *HotStarTaq DNA Polymerase* (modifizierte Taq-Polymerase) für die DNA-Amplifikation mit den sequenzspezifischen Primern in der PCR-Reaktion verantwortlich ist.

Tab. 3.6: *One-step RT-PCR:* Die Zusammensetzung eines Ansatzes (A) und ein allgemeines Protokoll zur Durchführung (B); x – Menge der Gesamt-RNA, y – Annealingtemperatur, die abhängig von der Schmelztemperatur der Primer ausgewählt wurde, X – Länge der Denaturierungsphase, Y – Länge der Annealingsphase, Z – Länge der Extensionsphase.

A

Reagens	Menge
5 × RT-Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Forward Primer (20 µM)	2 µl
Reverse Primer (20 µM)	2 µl
Gesamt-RNA	x µl
<i>OneStep RT-PCR Enzyme Mix</i>	2 µl
RNase-freies Wasser	ad 50 µl

B

Schritt	Bedingungen
RT	50 °C 30 min
<i>denaturing</i>	95 °C 15 min
35 Zyklen von:	
<i>denaturing</i>	94 °C X min
<i>annealing</i>	y °C Y min
<i>extension</i>	72 °C Z min
<i>final extension</i>	72 °C 10 min

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine Methode zur *In-vitro*-Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten (Mullis *et al.*, 1986). Ein PCR-Reaktionszyklus besteht aus der Denaturierungsphase der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge bei 94 °C, der Annealingsphase, in welcher bei spezifischen Temperaturen die Bindung von oligonukleotiden, sequenzspezifischen Forward und Reverse Primern an die DNA stattfindet, und der Extensionsphase (72 °C), in der die einzelsträngige DNA unter dNTP-Verbrauch und Primerverlängerung durch die Taq-Polymerase zu Doppelsträngen komplementiert wird. Vor der mehrmaligen Wiederholung dieses Reaktionszyklus findet die 2-minütige initiale Denaturierung statt und nach dem letzten Zyklus erfolgt die 10-minütige finale Extension bei 72 °C. Die Länge der Denaturierungs-, Annealings- und Extensionsphase richtet sich vor allem nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Sie liegt normalerweise zwischen 30 und 120 Sekunden. Die PCR-Reaktion kann man aufgrund der Kinetik der Zunahme der Amplifikatenmenge in zwei Phasen unterteilen. Während in der ersten, linearen Phase die direkte Proportionalität zwischen den Mengen des eingesetzten DNA- oder cDNA-*templates* und des gebildeten Amplifikates besteht, wird in der zweiten Phase das PCR-Produkt nahezu exponentiell gebildet. Die Reaktion wird schließlich durch den Verbrauch an dNTPs, Oligonukleotiden und Taq-Polymerase limitiert.

Tab. 3.7: *Two-step RT-PCR*: Ein allgemeines Protokoll zur Durchführung der Erststrangsynthese (A) und zur Zweitstrangsynthese mit anschließender PCR (B); für die PCR wurden immer 2 µl von 20 µl des RT-PCR-Ansatzes verwendet; die Bedeutung von x, y, X, Y, Z – siehe Tab. 3.6.

A

RNA	x µl
Reverse Primer (20 µM)	1 µl
RNase freies Wassr	ad 11 µl
70 °C, 5 min	
Eis	
5 × RT-Puffer	4 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
RNase-freies-Wasser	2 µl
37 °C, 5 min	
Raumtemperatur	
Reverse Transkriptase	1 µl
42 °C, 60 min	
70 °C, 10 min	

B

Schritt	Bedingungen
<i>denaturing</i>	95 °C 2 min
35 Zyklen von:	
<i>denaturing</i>	94 °C X min
<i>annealing</i>	y °C Y min
<i>extension</i>	72 °C Z min
<i>final extension</i>	72 °C 10 min

3.3.3.1 Primerauswahl

Als Grundlage für die Auswahl der sequenzspezifischen Primer (*primer design*) wurden cDNA-Sequenzen aus der *Entrez Nucleotide Database* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) herangezogen. Aus diesen cDNA-Sequenzen wurden Primer mit Hilfe des Programms *Tim22175 QuickChange primer evaluator* ausgesucht, die Amplifikationsprodukte mit einer Länge von 138 bis 782 bp einschlossen (Tab. 3.8). Schließlich wurde die Komplementarität der Primersequenzen und der cDNA-Sequenzen mit Hilfe des BLAST-Programmpaketes (Altschul *et al.*, 1997; Tatusova und Madden, 1999) bestätigt. Durch den Vergleich dieser Primersequenzen mit Sequenzen, die in der *Entrez Nucleotide Database* enthalten sind, wurde das Risiko der Amplifikation anderer Gene ausgeschlossen. Primer, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der Tab. 2.1 auf Seite 32 aufgeführt.

Tab. 3.8: Primerauswahl anhand der cDNA-Sequenzen (GI-Nummern der *Entrez Nucleotide Database*) und Größen der RT-PCR-Amplifikate (bp); im Falle von Tfr2-, Fpn1- und ALAS2-Transkripten, die als Produkte des alternativen Spleißens entstehen, ermöglichte die Auswahl der Primer den Nachweis aller bisher nachgewiesenen Isoformen.

mRNA	GI-Nummer	Ampifizierter Bereich der cDNA	Größe des Amplifikates (bp)
CD 61	4457676	556–997	441
γ-globin	28302130	74–291	217
β-Aktin	33988640	867–1202	335
Tfr1	4507456	312–544	232
Tfr2	33589847	80–340	260
L-Ferritin	56682960	198–832	534
H-Ferritin	56682958	516–697	181
Fpn1	7264728	1084–1866	782
FLVCR	7661707	306–688	382
ALAS2	83977441	559–697	138
FECH	24980987	269–907	638
DMT1A	22859167	14–305	291
DMT1B	2911111	31–256	225
Hepcidin-1	18088844	2–144	142
Hepcidin-2	18088844	51–357	306
Hepcidin-3	18088844	s. Abb. 3.6	388

Für die Spezifität und Sensitivität der PCR-Reaktion ist die Auswahl der Primer von entscheidender Bedeutung. Zur Berechnung der Schmelztemperatur der Oligonukleotide (T_m) wurden die allgemein akzeptierten Formeln (Prezioso, 2007, Chan *et al.*, 2003) für *salt adjusted T_m calculation* benutzt:

$$1) T_m = 81,5 + 16,6 \times \log [K^+] + 0,41 \times (\% GC) - 675 / N$$

Unter üblichen PCR-Bedingungen ($[K^+] = 50 \text{ mM}$) vereinfacht sich diese Formel zur folgenden:

$$2) T_m = 59,9 + 0,41 \times (\% GC) - 675 / N$$

(N – Länge des Primers; % GC – prozentualer GC-Gehalt des Oligonukleotides).

Zu den Eigenschaften gut ausgewählter Primer gehören:

- Länge (N) = 25–45
- Ausgleich im A / T- zu G / C-Gehalt (% GC > 40 %)
- Möglichst gleicher Schmelzpunkt für Forward und Reverse Primer
- Keine Dimerbildung weder mit sich selbst oder mit dem zweiten Primer
- Keine Ausbildung der Haarnadelstruktur und ein Ende mit CC oder GG
- Keine langen Basenwiederholungen wie GC-Abschnitte oder poly-A-Bereiche

Die Optimierung der PCR Bedingungen begann immer mit der Auswahl der Annealingstemperatur, die 5 °C niedriger als der nach der Formel 2) berechnete Schmelzpunkt des Primers lag. Bei Bedarf, wenn keine spezifische Amplifikate nachweisbar waren, wurde die Annealingstemperatur in den nächsten RT-PCR-Optimierungsreaktionen um 1–2 °C erhöht, bis spezifische Produkte detektiert wurden.

3.3.3.2 Semiquantitative RT-PCR

Semiquantitative RT-PCR ermöglicht die Erfassung der Veränderung der Mengen einer mRNA-Art im Verhältnis zum gesamten zellulären *RNA-pool*. Es wird davon ausgegangen, dass die mRNA-Mengenverhältnisse in einer Zelle sowohl die Aktivität der entsprechenden Gene als auch die RNA-Stabilität widerspiegeln. Die Semiquantifizierung dieser *target*-mRNAs ist jedoch aus methodischer Sicht nur dann möglich, wenn nach der RT-PCR die Menge des PCR-Produkts der am Anfang der Reaktion vorhandenen Menge an Matrizen-RNA proportional ist. Diese Voraussetzung ist erfüllt, wenn die Menge des Amplifikats während der linearen Phase und nicht während der exponentiellen Phase der Amplifikation der PCR-Reaktion gemessen wird. Deshalb wurden für die RT-PCR-Semiquantifizierungen jeder RNA-Art drei RNA-Konzentrationen für die Reverse Transkription gewählt, die sich um Faktor 5 voneinander unterschieden haben (25 ×, 5 ×, 1 ×). Nach den RT-PCR-Reaktionen

wurden standardmäßig Unterschiede in der Stärke der Amplifikate nach 15, 25 und 35 PCR Zyklen geprüft (mittels Agarosegelelektrophorese mit Ethidiumbromid). Wenn der jeweils fünffachen Abnahme der eingesetzten RNA-Mengen die Abnahme der Stärke der Amplifikation entsprach, wurden diese RT-PCR-Bedingungen (nach zwei Wiederholungen des Versuches) als Bedingungen für die semiquantitative RT-PCR akzeptiert. In der Tab. 3.9 sind die Bedingungen der Semiquantifizierung verschiedener Ziel-RNAs aufgeführt.

Tab. 3.9: Etablierung der Bedingungen für semiquantitative RT-PCR; die Reverse Transkription erfolgte entweder als *one-step RT-PCR*, oder *two-step RT-PCR* (Tab. 3.7).

mRNA	µg RNA (25 ×, 5 ×, 1 ×)	PCR Programm: <i>denaturing</i> <i>annealing</i> <i>extension</i>	mRNA	µg RNA (25 ×, 5 ×, 1 ×)	PCR Programm: <i>denaturing</i> <i>annealing</i> <i>extension</i>
CD61	6,5; 1,3; 0,26	94 °C 1 min 50 °C 1 min 72 °C 1 min	L-Ferritin	1,3; 0,26; 0,052	94 °C 1 min 52 °C 1 min 72 °C 1 min
γ-Globin	6,5; 1,3; 0,26	94 °C 1 min 53 °C 1 min 72 °C 1 min	H-Ferritin	1,3; 0,26; 0,052	94 °C 30 sec 52 °C 30 sec 72 °C 1 min
Hepcidin-1	6,5; 1,3; 0,26	94 °C 1 min 55 °C 1 min 72 °C 1 min	Fpn1	1,3; 0,26; 0,052	94 °C 1 min 52 °C 1 min 72 °C 1 min
Hepcidin-2	6,5; 1,3; 0,26	94 °C 1 min 55 °C 1 min 72 °C 1 min	ALAS2	1,3; 0,26; 0,052	94 °C 1 min 55 °C 1 min 72 °C 1 min
TfR1	1,3; 0,26; 0,052	94 °C 1 min 53 °C 1 min 72 °C 1 min	FECH	1,3; 0,26; 0,052	94 °C 1 min 52 °C 1 min 72 °C 1 min
TfR2	1,3; 0,26; 0,052	94 °C 1 min 55 °C 1 min 72 °C 1 min	FLVCR	6,5; 1,3; 0,26	94 °C 1 min 68 °C 2 min 72 °C 1 min
DMT1A/B	1,3; 0,26; 0,052	94 °C 30 sec 55 °C 30 sec 72 °C 40 sec	β-Aktin	5; 1; 0,2	94 °C 1 min 59 °C 1 min 72 °C 1 min

Die Abb. 3.4 zeigt die Optimierung der Bedingungen für die Semiquantifizierung der TfR1-mRNA.

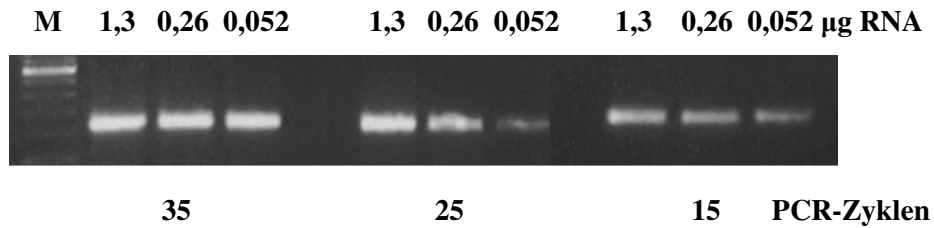


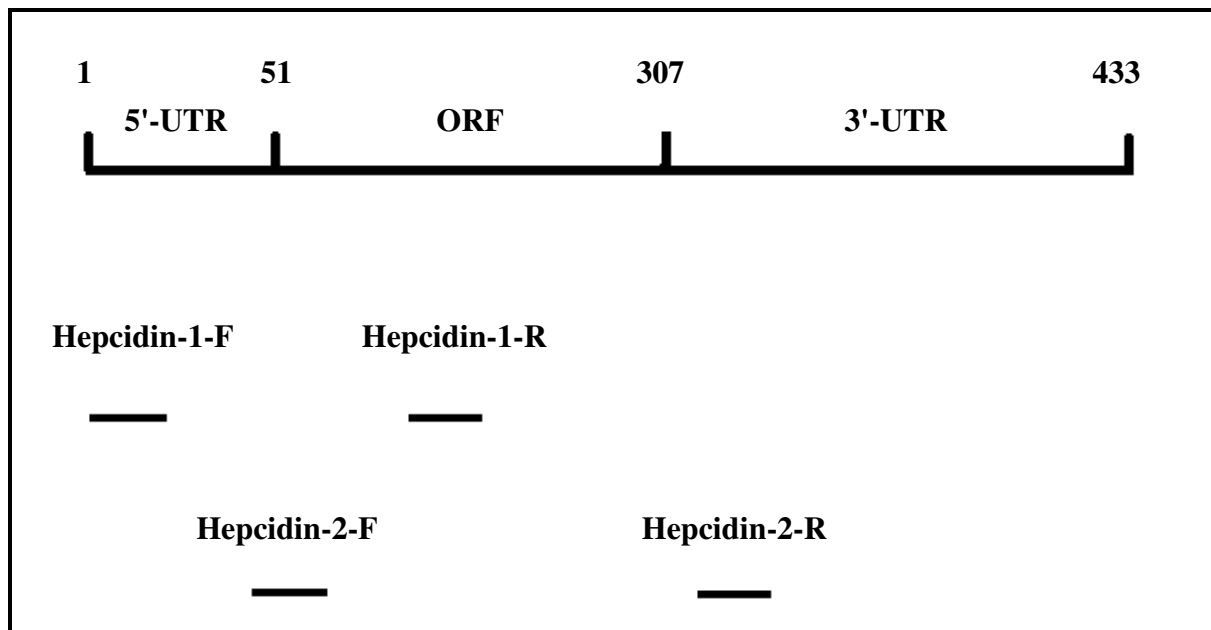
Abb. 3.4: Auswahl der optimalen Zyklenzahl für die semiquantitative RT-PCR von TfR1-mRNA; nach 15 und 25 Zyklen (die lineare Phase der PCR-Reaktion) sind Unterschiede in den Mengen der PCR-Amplifikate je nach Menge der eingesetzten RNA für die Reverse Transkription sichtbar, jedoch sind sie nach 25 Zyklen besser detektierbar; nach 35 Zyklen (exponentielle Phase) sind dagegen keine Unterschiede in den Mengen der TfR1-Amplifikate mit der RT-PCR feststellbar; 1 %ige Agarosegelelektrophorese im TAE Puffer; dem Gel wurde Ethidiumbromid zugemischt, um die Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen; M – Marker.

3.3.3.3 RT-PCR und semiquantitative RT-PCR für Präprohepcidin

3.3.3.3.1 Semiquantitative RT-PCR für „Hepcidin-1“

Zur Analyse der Expression von Präprohepcidin auf RNA-Ebene in K562-Zellen und anderen Zelllinien wurden semiquantitative RT-PCR-Reaktionen mit Hepcidin-1 F / R-Primer durchgeführt. Mit diesen Primern wurden die 5'-UTR und ein Teil des ORF amplifiziert (Abb. 3.5). Dieses Amplifikat wird in dieser Arbeit als „Hepcidin-1“ bezeichnet.

Abb. 3.5: Schematische Darstellung der humanen Präprohepcidin-cDNA und der Primer, die für die RT-PCR zur Amplifizierung von „Hepcidin-1“ und „Hepcidin-2“ benutzt wurde.



3.3.3.3.2 RT-PCR von Präprohepcidin-cDNA („Hepcidin-2-Amplifikat“)

Die 433 bp lange humane cDNA-Sequenz von Präprohepcidin (GI:18088844) besteht aus der 5'-UTR (bp 1–50), dem *open reading frame* (ORF) zwischen den Basen 51–305 und der 3'-UTR (bp 306–433). Die 307 bp lange Präprohepcidin-cDNA (bp 51–357) wurde durch die Reverse Transkription der aus HepG2-Zellen isolierten RNA mittels *OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen) mit den sequenzspezifischen Primern synthetisiert (Hepcidin-2 F / R, Abb. 3.5) und amplifiziert (Tab. 3.10). Dieses Amplifikat, das dem ORF und 51 Basen der 3'-UTR entspricht, wird in dieser Arbeit als „Hepcidin-2“ bezeichnet.

Tab. 3.10: (A) Die Zusammensetzung eines Ansatzes für *One-Step RT-PCR* der Präprohepcidin-cDNA; das Amplifikat („Hepcidin-2“) beinhaltet keine Sequenz, die der 5'-UTR des Präprohepcidins entspricht (bp 1–50); (B) Bedingungen für die Reverse Transkription und Amplifikation des Präprohepcidins.

A		B	
Reagens	Menge	Schritt	Bedingungen
5 × RT-Puffer	5,0 µl	RT	50 °C 30 min
dNTPs (10mM)	2,0 µl	<i>denaturing</i>	95 °C 15 min
Forward Primer (20 µM)	0,5 µl	35 Zyklen von:	
Reverse Primer (20 µM)	0,5 µl	<i>denaturing</i>	94 °C 1 min
Gesamt-RNA (655,2 ng/µl)	1,0 µl	<i>annealing</i>	55 °C 1 min
<i>OneStep RT-PCR Enzyme Mix</i>	1,0 µl	<i>extension</i>	72 °C 1 min
RNase-freies-Wasser	15,0 µl	<i>final extension</i>	72 °C 10 min

Um Präprohepcidin-cDNA *blunt end* in den pCR[®]-Blunt II-TOPO-Vektor einklonieren zu können, wurde das mit der im *OneStep RT-PCR Kit* enthaltenen *HotStarTaq DNA Polymerase* synthetisierte Amplifikat mittels Pwo-Polymerase, die kein *Poly-A*-Überhang synthetisiert, unter den Bedingungen die in der Tab. 3.11 aufgeführt sind, reamplifiziert.

Tab. 3.11: (A) Zusammensetzung eines Ansatzes für die Reamplifizierung des Präprohepcidin-Amplifikates mit der Pwo-Polymerase; (B) PCR-Bedingungen für die Reamplifikation des RT-PCR-Amplifikates von Präprohepcidin; Das Präprohepcidin-cDNA-Reamplifikat wurde *blunt end* in den pCR[®]-Blunt II-TOPO-Vektor einkloniert.

A		B	
Reagens	Menge	Schritt	Bedingungen
10 × Pwo-Polymerase-Puffer	5 µl	<i>denaturing</i>	95 °C 2 min
dNTPs (10mM)	4 µl	35 Zyklen von:	
Forward Primer (20 µM)	1 µl	<i>denaturing</i>	94 °C 1 min
Reverse Primer (20 µM)	1 µl	<i>annealing</i>	55 °C 1 min
cDNA (HotStarTaq-Amplifikat)	1 µl	<i>extension</i>	72 °C 1 min
Pwo-Polymerase	1 µl	<i>final extension</i>	72 °C 10 min
RNase-freies-Wasser	<i>ad</i> 50 µl		

3.3.3.3.3 RT-PCR für „Hepcidin-3“

Das mit den Primern Hepcidin-3F / 2R synthetisierte „Hepcidin-3“-Amplifikat (388 bp) wurde ohne Semiquantifizierung mittels *One-Step RT-PCR* synthetisiert. Für die Reaktion wurden 1,3 µg Gesamt-RNA der mit Präprohepcidin-cDNA-pcDNA3 oder mit pcDNA3-transfizierten K562-Zellen verwendet. In der Tab. 3.12 sind die Bedingungen für diese RT-PCR-Reaktion dargestellt.

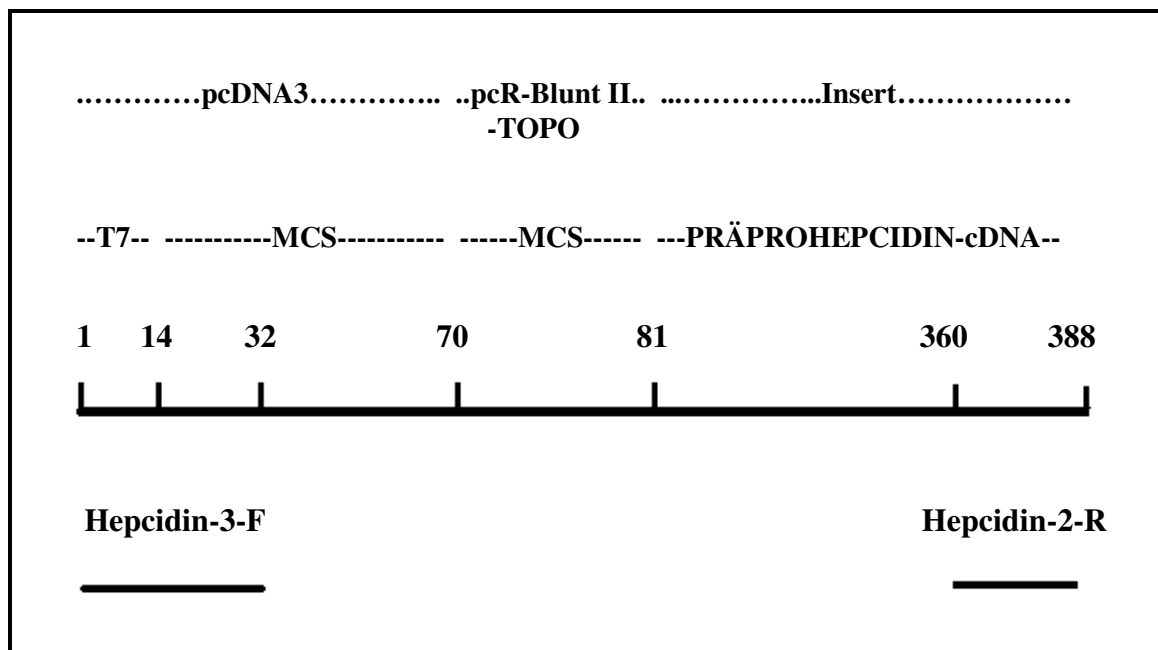
Tab. 3.12: PCR-Bedingungen zur Amplifikation von „Hepcidin-3“.

Schritt	Bedingungen
RT	50 °C 30 min
<i>denaturing</i>	95 °C 15 min
35 Zyklen von:	
<i>denaturing</i>	94 °C 1 min
<i>annealing</i>	55 °C 1 min
<i>extension</i>	72 °C 1 min
<i>final extension</i>	72 °C 10 min

Die Auswahl der Primer für diese RT-PCR ermöglichte in den mit der Präprohepcidin-cDNA-pcDNA3 transfizierten K562-Zellen die Unterscheidung zwischen der Präprohepcidin-mRNA, die durch das Hepcidin-Gen kodiert ist („Hepcidin-1-Amplifikat“) und der Präprohepcidin-mRNA, die durch die Transkription der in den pcDNA3-Vektor einklonierten cDNA („Hepcidin-3-Amplifikat“) entstanden ist (Abb. 3.5 und 3.6). Die Präprohepcidin-cDNA wurde nämlich ohne 5'-UTR in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor einkloniert und in den pcDNA3-Vektor umklontiert (Kap. 3.3.3.3.2). Aus diesem Vektor wird dieses Präprohepcidin-cDNA-Insert mit der vektorspezifischen 5'-UTR transkribiert, weil dem Insert der T7-

Promotor vorgeschaltet ist. Durch den Einsatz eines Forward Primer („Hepcidin-3-F“) der spezifisch für den T7 / MCS-Bereich des pcDNA3-Vektors ist, und eines zur Präprohepcidin spezifischen Reverse Primer („Hepcidin-2-R“), konnten die aus dem Präprohepcidin-cDNA-pcDNA3-Vektor transkribierten Präprohepcidin-mRNAs mittels RT-PCR detektiert werden. Die Sequenz des „Hepcidin-3-Amplifikates“ (Abb. 3.6) beginnt mit dem 32 Basen langen Forward Primer „Hepcidin-3-F“ und entspricht dem Bereich des pcDNA3-Vektors zwischen den Basen 869 und 900. Die ersten 14 Basen des Primers sind gleichzeitig die letzten 14 Basen des T7-Promotors. Die weiteren 18 gehören zu der darauffolgenden MCS-Sequenz des pcDNA3-Vektors, die auch die nächsten 38 Basen des Hepcidin-3-Amplifikates bilden. Diesen Sequenzen folgt das Insert, dessen erste 11 Basen aus der MCS des pCR-Blunt II-TOPO-Vektors bestehen (Basen 326–336). Dieser Bereich des pCR-Blunt II-TOPO-Vektors und das Präprohepcidin-cDNA-Insert wurden über die Eco RI-Schnittstelle in den pcDNA3-Vektor umkloniert. Die letzten 28 Basen des 307 Basen langen Präprohepcidin-cDNA-Inserts entsprechen dem Primer „Hepcidin-2-R“.

Abb. 3.6: Schematische Darstellung der Sequenz des „Hepcidin“-3-Amplifikates (388 bp) und der Primer, die für die RT-PCR zur Amplifizierung von „Hepcidin-3“ benutzt wurden; weitere Erläuterungen im Text.



3.3.4 Ligation von DNA mittels *pCR[®]-Blunt II-TOPO Cloning Kit*

pCR[®]-Blunt II-TOPO Cloning Kit beinhaltet eine mit dem offenen Plasmid verknüpfte Topoisomerase, die ihre Funktion, die Relaxation von DNA-Strängen dadurch realisiert, dass sie Phosphodiesterbindungen spaltet und nach der Entwindung der DNA-Stränge diese wieder

neu ausbildet. Topoisomerase besitzt also auch eine Ligaseaktivität, die kovalente Bindungen zwischen Hydroxylgruppen der DNA-Stränge ausbildet. Wenn man diesem Vektorsystem fremde DNA-Fragmente zusetzt, können diese miteinander ligiert werden, was die Klonierung des Inserts in den pCR[®]-Blunt II-TOPO-Vektor wesentlich erleichtert. Präprohepcidin-cDNA-Amplifikat wurde mittels *QIAQuick Gel Extraktion Kit* (Qiagen) gereinigt und in 40 µl Tris-Cl, pH 8,5 aufgenommen. Dann wurde 4,5 µl davon (~ 90 ng DNA) in der Ligationsreaktion eingesetzt (Tab. 3.13). Der Ligationsansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Tab. 3.13: Zusammensetzung einer Ligationsreaktion des Präprohepcidin-cDNA-Amplifikates mit dem pCR[®]-Blunt II-TOPO-Vektor.

Reagens	Menge
pCR-Blunt II-TOPO-Vektor	0,5 µl
PCR-Produkt (~ 90 ng/µl)	4,5 µl
Salt Solution (aus dem Kit)	1,0 µl

3.3.5 Ligation von DNA mit T4-DNA-Ligase

Das *Fast-LinkTM DNA Ligation Kit* (Epicentre) ermöglicht nicht nur eine schnelle Synthese der Phosphodiesterbindung zwischen zwei DNA-Strängen (Ligation) durch das Enzym T4-DNA-Ligase, sondern auch eine direkte Transformation der kompetenten Bakterien, ohne Reinigung und Isolierung der DNA aus dem Ansatz. Konzentrationen von Vektor- und Insert-DNA wurden anhand der Absorption bei 260 nm spektrophotometrisch gemessen. Die Ligationsreaktionen (Tab. 3.14) wurden 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Um die Effizienz der anschließenden Transformation zu erhöhen, wurde jeder Ansatz 10 min bei 70 °C inkubiert, was die Abdissoziation der Ligase aus dem Ligase-DNA-Komplex zu Folge hatte.

Tab. 3.14: Zusammensetzung der Ligationsansätze mit T4-DNA-Ligase.

Insert / Vektor Verhältnis	0,54	1,08	2,16	4,32	8,64
µl Vektor (114,5 ng/µl)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
µl Insert (124 ng/µl)	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
µl 10 × T4-DNA-Ligasepuffer	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
µl ATP (25 mM)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
µl T4-DNA-Ligase (2 U/µl)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
µl MilliQ-Wasser	9,5	9,0	8,0	6,0	2,0

3.3.6 Transformation und Vermehrung von Bakterien

Molekularbiologisch hergestellte Hybridplasmide können nach deren Aufnahme in transformationskompetenten Bakterienzellen (z. B. *Escherichia coli*) vermehrt werden. In dieser Arbeit wurde Hitzeschock als Transformationsmethode von Bakterien verwendet (Hanahan, 1983). Während der Klonierung von Präprohepcidin-cDNA in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor wurde zu den *OneShot*[®] TOP10F'-kompetenten Zellen (50 µl) der ganze Ligationsansatz zugegeben (6 µl) und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C und sofortiges Abkühlen auf Eis. Anschließend wurde der Ligationsansatz mit 250 µl SOC-Medium gemischt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden 25 oder 225 µl des Transformationsansatzes auf den LB-Agarplatten mit Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Während der Umklonierung der Präprohepcidin-cDNA aus dem pCR-Blunt II-TOPO-Vektor in den pcDNA3-Vektor wurde ebenfalls der ganze Ligationsansatz (15 µl) zu den 100 µl der *OneShot*[®] TOP10F'-Zellen zugegeben und dann 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock von 1 min und kurzer Inkubation auf Eis wurden 750 µl LB-Medium zugegeben. Um die Bakterien zu vermehren, wurde der Transformationsansatz 45 min bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden 750 µl oder 100 µl des Transformationsansatzes auf die LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die einzelnen Bakterienkolonien wurden angepickt und in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Kanamycin oder Ampicillin) 24 h lang vermehrt. Aus 2 ml jeder Bakteriensuspension wurden Plasmide isoliert (modifizierte *Qiagen-Mini*-Präparation). Der Rest (3 ml) wurde nach der Zugabe von Glycerol (1:1 v/v) bei -20 °C gelagert. Bakteriensuspensionen aus denen Hybridplasmide isoliert wurden, die das Insert in richtiger Orientierung beinhalten, wurden wieder aufgetaut und nach Zugabe zu 250 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum 24 h unter ständigem Schütteln bei 37 °C vermehrt. Am nächsten Tag wurden aus diesen Sekundärkulturen mittels *Qiagen Maxi*-Präparation die Hybridplasmide isoliert.

3.3.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Isolierung der DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Kap. 2.5) nach dem Protokoll, das vom Hersteller mitgeliefert wurde.

3.3.8 Restriktionsverdau

Restriktionsverdauansätze wurden stets als ein Einfachverdau mit einer Restriktionsendonuklease durchgeführt. Die Umklonierung von Präprohepcidin-cDNA aus dem pCR-Blunt II-TOPO-Vektor in den pcDNA3-Vektor und die Kontrolle der Anwesenheit der Inserts in Hybridplasmiden erfolgte durch den Verdau mit dem Eco RI-Restriktionsenzym, weil die Eco RI-Schnittstelle in den ORFs von beiden Vektoren vorhanden ist (siehe Anhang). Die Orientierung des Inserts in rekombinanten pcDNA3-Vektoren wurde durch den Restriktionsverdau mit dem Bgl II-Restriktionsenzym geprüft. Hier lag die eine Schnittstelle im Vektor in der Position 12, die andere dagegen im Insert (Position 67), so dass die Größe der ausgeschnittenen Sequenz die Information über die Position der Schnittstelle im Insert lieferte und dadurch die Kontrolle der Orientierung des Inserts ermöglichte. Die Tabelle 3.15 zeigt die Reaktionsbedingungen eines typischen Restriktionsverdaus.

Tab. 3.15: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes und die Durchführung des Restriktionsverdaus der Plasmid-DNA mit den Restriktionsendonukleasen Eco RI oder Bgl II.

Reagens	Menge
präparierte Plasmid-DNA (~ 0,5 µg/µl)	4,0 µl
Restriktionsenzym (10 U/µl)	1,0 µl
10 × Restriktionsenzypuffer	1,0 µl
MilliQ-Wasser	ad 11,0 µl
Inkubation	1 h bei 37 °C
Hitzeinaktivierung	20 min bei 70 °C

3.3.9 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

TAE-Puffer: 40 mM Tris, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,2

Ethidiumbromidlösung: 10 mg/ml

6 × DNA-Ladepuffer: 60 % (w/v) Saccharose, 20 mM EDTA, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau

Nukleinsäuren besitzen negative elektrische Ladung und wandern deshalb in einem elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols. In einem Agarosegel ist die Trennung der Nukleinsäuren anhand ihrer Größe möglich. Um PCR-Produkte oder einen Restriktionsverdau zu analysieren, wurde ein Fünftel des Ansatzes (10 µl) mit 2 µl 6 × Ladepuffer gemischt und auf ein Agarosegel (mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetragen. Wenn PCR-Amplifikate und Produkte des Restriktionsverdaus nach der Agarosegelelektrophorese aus dem

Gel ausgeschnitten werden sollten, wurden die Geltaschen voll beladen. Zum Nachweis der RNA-Integrität (Kap. 3.3.1) nach der Gesamt-RNA-Präparation, wurden die Proben ebenfalls mit Probenpuffer versetzt und in die Probentaschen eingefüllt. Die Größe der aufzutrennenden Nucleinsäuren wurde in 1–2 %igen Agarosegelen durch den Vergleich mit den Banden des 100-bp- oder 1-kbp-Molekulargewichtsmarkers (Kap. 2.6) abgeschätzt. Nach der Elektrophorese (30 min, 100 V) wurden die Gele entweder unter UV-Licht dokumentiert oder die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Hilfe des FujiFilm LAS-1000 Systems.

3.3.10 Sequenzierung von DNA

Die DNA der rekombinanten Plasmide wurde mittels Kettenabbruchmethode sequenziert (Sanger *et al.*, 1977). Dazu wurde das *BigDye Terminator v1.1 Kit* (Kap. 2.5) verwendet. Bei dieser Methode, die auf einer PCR mit einem Primer basiert, kommt es zu einem statistisch zufälligen Abbruch der DNA-Synthese durch 3',5'-Dideoxynukleotide im Reaktionsgemisch, so dass unterschiedlich lange Kettenabbruchprodukte entstehen. Weil diese 3',5'-Dideoxynukleotide verschiedene Fluorophore tragen, können die Kettenabbruchprodukte im Sequenziergerät (Kap. 2.1.6) aufgetrennt und anhand deren Emissionseigenschaften analysiert werden, so dass die Sequenz bestimmt werden kann. Die Zusammensetzung des Sequenzierungsansatzes und der Sequenzierungsreaktionen mit den Sequenzierungsprimern T7 und Sp6 (siehe Anhang) sind in Tabelle 3.16A, B dargestellt. Nach der Zweitstrangsynthese wurden die Ansätze nach dem in Tabelle 3.16C dargestellten Protokoll aufgearbeitet. Die Analyse der Sequenzierungsprodukte erfolgte im ABI-Prism Genetic Analyser 310 der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems.

Tab. 3.16: DNA-Sequenzierung mittels Dideoxy-Methode mit der Verwendung von fluoreszenzmarkierten ddNTPs; (A) Zusammensetzung eines Sequenzierungsansatzes; (B) PCR-basierte Zweitstrangsynthese; (C) die Aufreinigung der DNA nach der Zweitstrang-Synthese.

A		B	
Reagens	Menge	Schritt	Bedingungen
aufgereinigtes Plasmid	0,5–1 µg/µl	<i>denaturing</i>	96 °C 1 min
Primer (10 µM)	0,5 µl	25 Zyklen von:	
5 × Puffer	1,5 µl	<i>denaturing</i>	96 °C 10 sec
MilliQ-Wasser	<i>ad</i> 10,0 µl	<i>annealing</i>	50 °C 5 sec
		<i>extension</i>	60 °C 4 min
		<i>final extension</i>	60 °C 2 min

C

Centriflex-Säulchen	Zentrifugation $800 \times g$, 1 min und die Umsetzung in ein Eppendorf-Gefäß
Sequenzieransatz	Auftragung auf die Centriflex-Säulchen und 1 min Zentrifugation bei $800 \times g$
Durchlauf	15 min Trocknen im Vakuumkonzentrator und Resuspendieren in 20 μl TSR 3 min Denaturierung $96 \text{ }^\circ\text{C}$ und Zentrifugation $800 \times g$ Überführung ins Sequenzierungsrohrchen und die Aufbewahrung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$

3.3.11 Präparation von Plasmid-DNA

Um große Mengen an Plasmid-DNA (bis etwa $500 \mu\text{g}$) aus *E. coli*-Übernachtskulturen zu reinigen, wurden Präparationen mittels *Qiagen Maxi Präp Kit* nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Kleinere Mengen wurden nach einer modifizierten Methode in Anlehnung an das *Qiagen Plasmid Mini Kit*-Protokoll durchgeführt. Dazu wurden Bakterien aus den 2–5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur durch eine 5-minütige Zentrifugation bei $2\,000 \times g$ pelletiert und in 150 μl Puffer P1, P2 und P3 nacheinander resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei $20\,000 \times g$. Zu dem Überstand wurde das doppelte Volumen von absolutem Ethanol zugegeben, um die Plasmid-DNA zu fällen. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und in 40–80 μl MilliQ-Wasser aufgenommen. Die Plasmid-DNA-Konzentrationen wurden spektrophotometrisch bestimmt.

3.4 Statistische Analyse

Die Signifikanzen (t-Tests) wurden mit Hilfe des Computerprogramms *SPSS11 for Mac OS X* analysiert. Zur Berechnung des Bestimmtheitsmaßes wurde *Microsoft Excel (Windows XP)* verwendet.