

7 Material und Methoden

Sofern nicht explizit erwähnt, wurden alle experimentellen Techniken wie z. B. Klonierung von DNA-Fragmenten, PCR, Agarosegele, Sequenzgele, Proteinanalyse, Plasmidisolierung und –reinigung etc. gemäß den Ausführungen in (Sambrook 1989) durchgeführt.

7.1 Materialien und Chemikalien

Zellkulturflaschen (25, 75, 160, 225 cm²) und Zellkulturplatten (96-well) wurden von der Firma Costar (Bodenheim), Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml) von der Firma Falcon (Schering-Materiallager), Plastikpipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml) von der Firma Greiner (Schering-Materiallager), Pipettenspitzen (0,5-10, 10-100, 100-1000 µl) und Reaktionsgefäße (0,7, 1,5, 2 ml) mit Deckel von der Firma Eppendorf (Hamburg) in steriler Form bezogen und verwendet. Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) im Maßstab 0,1 µMol und Reinheitsgrad HPSF bezogen und in der Konzentration 50 pMol/µl verwendet. Radionukleotide wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen und in folgenden spezifischen Aktivitäten und Konzentrationen eingesetzt:

[α -³²P]CTP: 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml,

[γ -³²P]ATP: 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml,

[α -³²P]dCTP: 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml,

Lösungen und Chemikalien wurden im Reinheitsgrad „pro Analysis“ (p.a.) eingesetzt und verwendet. Sofern nicht speziell aufgeführt, wurden alle Reagenzien von den aufgeführten Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), PAA (Österreich), Santa Cruz (Heidelberg), Promega (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach) Stratagene (USA), Roche (Mannheim).

7.2 Zellbiologische Methoden

7.2.1 Kultivierung und Konservierung von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden kommerziell von der Firma DSMZ (Braunschweig) erworben, außer die Zelllinie SK-N-SH, welche von der Firma ATCC (Maryland, USA) stammte und bei Schering schon verwendet wurde. Arbeiten, welche die Zellkultur betreffen, wurden in einer sterilen Werkbank mit sterilisierendem Umluftfilter der Firma Heraeus (Hanau) durchgeführt. Alle Glas- und Metallgeräte wurden vor Gebrauch für 30 min. bei 120 °C und 3 bar Druck sterilisiert (autoklaviert). Stammlösungen wurden, sofern möglich, bei 120°C bei einem Druck von 3 bar für mindestens 20 min autoklaviert oder mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert. PBS wurde von der Firma Gibco BRL (Eggenstein) bezogen. Die Kultivierung von immortalisierten Zelllinien wurde mit supplementierten Medien der Firma Gibco BRL vorgenommen. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus) bei 37°C und 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Das Kulturmedium wurde je nach Dichte der Zellen alle 2-3 Tage ausgetauscht. Zur Bestimmung der vorliegenden Zellanzahl wurden Zellen mit Tryphtanblau-Lösung (*Trypan Blue Stain*, Gibco BRL) angefärbt. Tryphtanblau ist ein Farbstoff, der die Bestimmung der Lebendzellzahl möglich macht. Die Zellmembranen lebender Zellen sind bis zu 10 min undurchlässig für den Farbstoff, während sich das Zytoplasma toter Zellen augenblicklich blau verfärbt. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zellkammer verwendet. Nach Auszählung eines Großquadrats (entspricht 16 Einzelquadrate) errechnet sich diese nach folgender Formel: $V * N * 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$ (N = Zahl der Zellen pro Großquadrat, V = Verdünnungsfaktor mit Tryphtanblau (meistens beträgt der Verdünnungsfaktor 5), 10^4 = Kammerkonstante). Zur Kryokonservierung wurden $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml Einfriermedium in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -70°C in einem mit Isopropanol betanktem Gefäß langsam heruntergekühlt und über 24 h tiefgefroren. Anschließend wurden die Zellen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff (-196° C) überführt. Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen auf RT erwärmt, in 10 ml Medium resuspendiert, 3 min bei 1500 rpm abzentrifugiert, in Kulturmedium aufgenommen und ausgesät.

7.2.2 Medien und Lösungen

Nachfolgend sind die in der Zellkultur verwendeten Medien und Zelllinien aufgeführt (**Tab. 1.1**).

Zelllinien	Nährmedien und Zusätze	Katalog-Nr.
Hep-G2 (humanes Hepatom)	RPMI 1640 mit Glutamax I/II & HEPES, 10 % FCS (PAA)	# 72400-021 (Gmax I) # 82400-029 (Gmax II)
Kelly (humanes Neuroblastom)	RPMI 1640 mit Glutamax I/II & HEPES, 10 % FCS (PAA)	# 72400-021 (Gmax I) # 82400-029 (Gmax II)
SH-SY5Y (humanes Neuroblastom)	MEM & F12 Nutrition Mix & 1x non ess. AS, 10 % FCS (PAA)	# 31095-029 (MEM) # 21765-029 (F12)
SK-N-SH (humanes Neuroepithelioma)	DMEM mit Glutamax I & Pyroval, 10 % FCS (PAA)	# 31966-021 (Gmax I)
SNB-19 (humanes Glioblastom)	Dulbecco's MEM, 10 % FCS (PAA)	# 31965-023
1x PBS 0,15 M NaCl 0,01 M NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	Tryphtanblau-Lösung Lösung A: 0,2 % [w/v] Tryphtanblau (Sigma) Lösung B: 4,5 % [w/v] NaCl in Aqua bidest. gelöst, Verhältnis : 4:1 (A:B).	Einfriermedium 70 % [v/v] Medium 20 % [v/v] FCS 10 % [v/v] DMSO (Roth)

Tabelle 1.1: Zelllinien, Kulturmedien und Puffer in der Zellkultur.

7.2.3 Darstellung der Proteinextrakte (Roh-, Membran- und zytosolische Fraktion)

10-100 Mio. Zellen wurden geerntet und im Rotationshomogenisator mit 3x10 Stößen bei 1500 rpm auf Eis in 1-2 ml 1x PBS aufgeschlossen und mit der entsprechenden Polyproteaseinhibitor *CompleteTM* (Roche) versetzt. Anschließend wurde der Aufschluss bei 4°C und 3300g 15 min zentrifugiert, um Zellkerne und grobe Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand (Rohfraktion) davon wurde bei 4°C und 45000g 1h zentrifugiert, das Pellet in 0,2 ml kaltem RIPA-Puffer aufgenommen (Membranfraktion) und zusammen mit dem verbleibenden Überstand (zytosolische Fraktion) bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Die Proteinmengen wurden anhand einer geeigneten BSA Standardkurve nach der Methode des *BCA Protein Assay ReagentTM*-Kit (Firma Pierce) und dem vorgegebenen Protokoll bestimmt.

7.2.4 SDS-PAGE und Western-Blot Analyse

Als Molekulargewichtskontrolle in der SDS-PAGE wurde der *Kaleidoscope Polypeptide Standard*TM der Firma Biorad verwendet (Blau 216 kDa; Magenta 132 kDa; Grün 78 kDa; Violett 45,7 kDa; Orange 32,5 kDa; Rot 18,4 kDa und Blau 7,6 kDa). Basierend auf dem Laemmli-System (Laemmli 1970) wurden vorgefertigte, 6%ige *Novex® Tris-Glycine* Trenngele der Firma Invitrogen/Novex verwendet und mit dem *Tris-Glycine SDS Running Buffer* sowie dem *Tris-Glycine SDS Sample Buffer* in einer *XCell SureLock*TM *Mini-Cell* (Invitrogen/Novex) gemäß den vorgegebenen Protokollen betrieben. Eingesetzt wurden jeweils 20 µg Protein/Geltasche und die Gelelektrophorese wurde jeweils 1h bei 125 Volt durchgeführt. Die Gele wurden umgehend in einer *Hoefler TE 22 Mighty Small*TM Blotapparatur (Amersham Pharmacia Biotech) gemäß Protokoll mit Towbin-Puffer auf eine PVDF Membran geblottet (~80 Volt, 0.3 Ampere, 1:30 h, eisgekühlt). Die Blots wurden zur getrennten Detektion von β -Actin (interne Mengenkontrolle) und den Trk-Rezeptorbanden auf Höhe von ca. 60 kDa durchschnitten und die Membranen wurden umgehend 1h bei RT mit PBS-T und 5 % Trockenmilch blockiert. Unter Verwendung des *ECU*TM *Western Blotting System* (Amersham Pharmacia Biotech) wurden sowohl die Trk A-C Rezeptoren als auch das β -Actin detektiert. Dazu wurden mit den primären Antikörpern (AK) gegen die Trk-Rezeptoren (je 2µg/ml PBS-T) sowie gegen β -Actin (1:1000 in PBS-T verdünnt) bei 4°C über Nacht inkubiert und mit den entsprechenden zweiten Antikörpern (1:2500 in PBS-T verdünnt) 1h bei RT inkubiert (**Tab. 1.2**). Die Exposition auf den Hyperfilm ECL (Amersham) erfolgte in Intervallen von 30s (30s bis 3 min).

Gellauf	Molekulargewichts-Standard	PBS-T	Blotting Apparatur
<i>XCell SureLock</i> TM <i>Mini-Cell</i> , 1h bei 125 Volt	<i>Kaleidoscope</i> -Standard, Firma Biorad	1x PBS 0,06 % Tween-20 Waschlösung und Inkubationslösung für die Antikörper	<i>Hoefler TE 22 Mighty Small</i> TM 300 mA, ca. 1,5 h
Transfer-Membran PVDF (Invitrogen)	Towbin-Puffer (Transfer)	Blockierungs-Lösung	RIPA Puffer
Film Hyperfilm ECL (Amersham)	192 mM Glycin 25 mM Tris 3,5 mM SDS (0,1 %) 150 ml Methanol ad 1000 ml Aqua dest.	5 % [w/v] Trockenmilch 1x PBS-T, Inkubation 1 h bei RT	1x PBS 1 % Igepal CA-630 0,5 % Natriumdeoxycholat 0,1 % SDS

Primärantikörper Anti β-Actin Hase, # A5060 (Sigma), IgG Fraktion, 1:1000	Primärantikörper Anti TrkA Maus, # GR24 (Oncogene), IgG ₁ Isotyp, 2 μ g/ml, monoklonal.	Primärantikörper Anti TrkB Hase, # PC86 (Oncogene), IgG Isotyp, 2 μ g/ml, polyklonal	Primärantikörper Anti TrkC Hase, # sc-117 (Santa Cruz). IgG Isotyp, 2 μ g/ml, polyklonal
Sekundärantikörper/HRP(horse-redish- peroxidase) Konjugat Maus Ig (ganze Ab) # NXA931(Amersham), 1:2500 in PBS-T verdünnt, Hase Ig (ganze AB) # NA934 (Amersham), 1:2500 in PBS-T verdünnt,		Detektionslsg. ECL (Amersham) Lsg. 1, Lsg. 2 Beide Lsg. vor Gebrauch 1: 1 mischen 0,125 ml Substrat/cm ² Membran, 1 min im Dunkeln mit Substrat inkubieren, mit Folie abdecken und Film 30 s-3 min exponieren	

Tabelle 1.2: Reagenzien in der SDS-PAGE und Western Blot Analyse.

7.3 Molekularbiologische Methoden

7.3.1 Standard-Puffer und Medien

Die verwendeten molekularbiologischen Standard-Puffer sind in **Tab. 1.3** zusammengefasst.

50x TAE 242 g Trisaminomethan 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1000 ml mit Aqua dest.	5x TBE 54 g Trisaminomethan 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1000 ml mit Aqua dest.	STE-Puffer 0,1 M NaCl 10 mM Tris-HCl pH (7,5) 1 mM EDTA (pH 8,0)
20x SSC pH 7,0 3,0 M NaCl 0,2 M Natriumcitrat	TE-Puffer pH 7,5 10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA pH 8	10x DNA-Gelladepuffer 0,25% Bromphenolblau 0,25 % Xylenyanol 30 % Glycerin in Aqua dest.
Formamidladepuffer 98% [v/v] deionisiertes Formamid 10 mM EDTA (pH 8,0) 0,025% Bromphenolblau 0,025% Xylenyanol	LB – Agar 1000 ml LB-Medium 15 g Bacto Agar	LB – Medium 10g Bacto Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl ad 1000 ml Aqua dest.

Tabelle 1.3: Standardpuffer.

7.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Quantifizierung von Nukleinsäuren wurde das *BioPhotometer* der Firma Eppendorf auf Xenon-Spektrallinienbasis verwendet.

7.3.3 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte im hauseigenen Sequenzierlabor auf einem *ABI 310 Genetic Analyser* (Kapillarsequenzierer) der Firma Applied Biosystems unter Verwendung der vorgegebenen Aufreinigungs- und Sequenzierreaktionsprotokolle.

7.3.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurden zunächst unter UV-Licht die entsprechenden DNA Banden aus dem Gel herausgeschnitten. Das Gelfragment wurde bei 13.000 rpm für 20 min in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Fritteneinsatz zentrifugiert, so dass die feste Gelmatrix in der Fritte zurückgehalten wurde und die DNA als wässriges Eluat im Reaktionsgefäß verblieb. Die DNA wurde mit 1/10 Vol 2,5 M NaOAc (pH 7,0) und 2 Vol ml 100 % Ethanol gefällt und bei 15.000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA mit kaltem 70 % Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (15.000 rpm, 15 min). Das Pellet wurde anschließend in der geeigneten Menge Aqua. dest. aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

7.3.5 Darstellung, Amplifizierung und Isolierung rekombinanter DNA

DNA-Fragmente wurden zur Amplifizierung in Plasmidvektoren *Bluescript® II KS/SK* (Stratagene) kloniert. Zur selektiven Vermehrung dieser Trägerplasmide wurde das auf den Vektoren vorhandene Resistenzgen für Ampicillin (amp^r) und ein mit 100 µg/ml Ampicillin versetzter LB-Agar Bakteriennährboden sowie geeignete, nichtresistente Bakterien benutzt. Nach der Transformation in kommerziell erworbene, chemisch kompetente *XL-1 Blue* Bakterien (Stratagene) und anschließender Ausstreichung auf LB-Agar/Ampicillinplatten

wurden diese bei 37°C für ca. 15 h im Brutschrank inkubiert. Die Kolonien wurden am nächsten Tag herausgestochen und zur Vermehrung bei 37°C mit LB/Ampicillin-Selektionsmedium über Nacht geschüttelt. Anschließend wurden die Vektoren mit den *Qiagen® Plasmid Maxi/Mini Kits* (Qiagen) präparativ isoliert.

Transformation und Langzeitkonservierung

Zur Transformation wurden chemisch kompetente *XLI Blue* Bakterien (Stratagene) für 30 min auf Eis mit 1-10 ng Plasmid-DNA oder 1-5 µl Ligierungsansatz inkubiert. Anschließend wurden die Vektoren durch Hitzeschock-Behandlung bei 42°C für 60 s transformiert. Danach wurde der Ansatz 2 min auf Eis inkubiert und anschließend mit ca. 1 ml LB-Medium versetzt. Nach der Inkubation im Rotationsschüttler für 1 h bei 37°C, wurde der Probe auf Ampicillin/LB-Agarplatten (100 µg Ampicillin/ml LB-Agar) ausplattiert. Zur Langzeit-Konservierung wurden ü.N.-Kulturen 1:1 mit autoklaviertem 30 %igem [v/v] Glycerin versetzt und nach Aliquotierung bei -80°C gelagert.

7.3.6 Verwendete Vektoren

Die verwendeten Vektoren sind in nachfolgend dargestellt (**Tab. 1.4**).

Vektor	Herkunft	Verwendungszweck	Bemerkung
Bluescript® II KS	Stratagene	Trägervektor, Amplifizierung	
Bluescript® II SK	Stratagene	Trägervektor, Amplifizierung, RPA	
Bluescript® II SK - <i>tPA</i> (9kb)	Schering	Trägervektor für 9kb der 5'-Promotorregion von <i>tPA</i>	Template für <i>tPA</i> -Luc Konstrukte
pGL3-Basic	Promega	Reportergenvektor für TA	<i>Firefly</i> -Luciferase
pGL3-Control	Promega	Interne Kontrolle gegen <i>Renilla</i> -Luciferase	
pRL-Null	Promega	Reportergenvektor für TA	<i>Renilla</i> -Luciferase
pRL-TK	Promega	Interne Kontrolle gegen <i>Firefly</i> -Luciferase	schwach konstitutiv
pRL-CMV	Promega	Interne Kontrolle gegen <i>Firefly</i> -Luciferase	mäßig konstitutiv
pRL-SV40	Promega	Interne Kontrolle gegen <i>Firefly</i> -Luciferase	stark konstitutiv
Bluescript® II SK- <i>tPA</i>	Schering	Trägervektor der cDNA des <i>tPA</i> Gens (in 3' → 5' Richtung kloniert)	Sondentemplate für den RPA

Tabelle 1.4: Verwendete Vektoren.

7.3.7 PCR und verwendete Primer

PCR Reaktionen wurden entweder mit *Pfu*-Polymerase (Promega), *Taq*-Polymerase (Roche) oder *AmpliTaqGold* (Applied Biosystems) gemäß den dafür vorgegebenen Protokollen in einem *GeneAmp PCR System 2400* (Applied Biosystems/Perkin Elmer) durchgeführt. Primer werden gesondert und Reaktionsspezifika (verwendete Polymerasen, eingesetzte Mengen, Zyklentemperaturen und –zahl, etc.) nur, wenn von den beiliegenden Protokollen abweichend aufgeführt.

7.3.8 Darstellung der NF-κB Deletionsmutanten

Zur Darstellung der NF-κB Deletionsmutanten wurde der *QuickChange™ Site-Directed Mutagenese Kit* von Stratagene mit dem dazugehörigen Protokoll verwendet. Die komplette NF-κB Erkennungssequenz („GGGGATTCCC“) an Position 6498 (entspricht –3081 bp oberhalb des Transkriptionsstarts „+1“, s. Anhang) wurde unter Verwendung der folgenden Primer und der entsprechenden Promotorfragment-tragenden Plasmide eliminiert:

NFΔ-(vorwärts): 5'- ATG GCC CCA GGG CC ----AGT CTA GAT GGA GA – 3'

NFΔ-(rückwärts): 5'- TC TCC ATC TAG ACT ---- GGC CCT GGG GCC AT-3'

(Schmelztemperatur $T_M = 90^\circ \text{C}$).

7.3.9 Transiente Transfektion und Transaktivierungsassay

Als Transfektion bezeichnet man den Transfer von DNA, oft in Form rekombinanter Vektoren, in Säugerzellen. Beim transienten Gentransfer nehmen je nach Zelltyp etwa 5-50 % der transfizierten Zellen vorübergehend die fremde DNA auf, ohne diese aber stabil ins Genom zu integrieren. Sie liegt in Ihnen für kurze Zeit in zufällig in Nukleosomen verpackter Form in einer unregelmäßigen Chromatinstruktur vor. Dieser Zeitraum wird zur Untersuchung des Expressionsverhaltens der eingeschleusten Gene genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde zur transienten Transfektion das *FuGENE™ 6* System (Roche) mit dem dazugehörigen Protokoll verwendet, um die Aktivität der *tPA*-Promotorabschnitte sowohl in verschiedenen Zelllinien als auch unter dem Einfluss verschiedener Mediatoren zu

analysieren. Zur Durchführung eines solchen Transaktivierungsassays wurden die unten aufgeführten *tPA*/Luciferase-Reportergergenkonstrukte verwendet (siehe Tabelle ??), wobei pro well jeweils 0,2 µl *FuGENE* in 9,8 µl serumfreien Medium 100 ng DNA (*tPA*/Luc-Vektor) hinzugefügt wurde, der Reaktionsansatz für 15 min bei RT inkubiert und anschließend auf die vorher in 96-well Platten ausgesäten Zellen ($0,5 \cdot 10^5$ Zellen/well) appliziert und mit Medium (10 % FCS) aufgefüllt wurde. Nach 6 h wurden den Zellen die entsprechenden Mediatoren hinzugegeben und nach weiteren 8 bis zu 48 h wurden die Zellen geerntet, die Reportergergenaktivität gemessen und der Versuch ausgewertet. Als interne Kontrolle wurden die Vektoren pGL3-Control (gegenüber den *Renilla*-Luciferase Konstrukten) sowie die Vektoren pRL-TK, pRL-CMV und pRL-SV40 (gegenüber den *Firefly*-Luciferase Konstrukten) verwendet. Zur Messung der Reportergergenaktivität wurde das Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega) mit dem entsprechenden Protokoll und ein *MLX Microtiter® Plate Luminometer* (Dynex Technologies) verwendet. Die jeweiligen Messwerte wurden gegen diejenigen des jeweilig cotransfizierten Kontrollvektors normalisiert und auf die jeweilige Null- oder Negativkontrolle bezogen in x-fache Induktionswerte umgerechnet.

7.3.10 Klonierung der *tPA*/Luc-Reportergergen Konstrukte

Die unterschiedlich langen *tPA*-Promotorfragmente wurden mit den unten aufgeführten Primern per PCR bei optimierter Schmelztemperatur T_M generiert (**Tab. 1.5**). Die Primer besitzen an ihren Enden jeweils kurze Sequenzabschnitte, welche die Restriktionsschnittstellen der Enzyme Bgl II („A↓GATCT“, Roche), Hind III („A↓AGCTT“, Roche) sowie Kpn I („GGTAC↓C“, Roche) tragen. Die lyophilisierten Primer wurden zu 50 µM in Aqua bidest. resolubilisiert bevor sie in die jeweiligen PCR Reaktionen eingebracht wurden.

Bezeichnung der Primer	Sequenz in 5' → 3' Richtung	T_M (in °C)	Generiertes Promotorfragment (in bp) und resultierende Vektorkonstrukte (bezogen auf T-Start +1)
TPA9080+	GAAGATCTCAGTGGCTACCCCCCT	62	T bis -500
TPA8580+	GAAGATCTGGCCCTGACATGCGTGGC	62	T bis -1000
TPA8080+	GAAGATCTCTCATGACCAGCACTCCC	58	T bis -1500
TPA7580+	GAAGATCTGGGCCCCTGCTAATGATC	58	T bis -2000
TPA7080+	GAAGATCTAATACCCATCCTGCCACCT	58	T bis -2500
TPA6580+	GAAGATCTCCCCTGCAAAGCCAGATG	60	T bis -3000
TPA6380+	GAAGATCTTGGGGAGCGGCTGTAAAC	58	T bis -3200
TPA3580(Bgl)+	GAAGATCTGTTGCCAGGCTGGAG	58	T bis -6000
TPA580(Bgl)+	GAAGATCTAACGGCTGACCTCAAGTGA	58	T bis -9000

TPA9608(Hind)-	GAAAGCTTAGCCCTGGACTCCTGTAGG	62	Reverse Primer an Pos. +12 (T), ⇒ pGL3-Basic/pRL-Null Konstrukte
TPA6461(Bgl)+	GAAGATCTAGGCCACGGACAGATACC	58	99 bp ab Position 6461 (-3118 bp, Bgl II)
TPA6560 (Kpn)-	GAGGTACCATGGGGTAAATGTCATGATGG	60	Reverse Primer an Pos. -3019 bp (Kpn I) ⇒ pRL-SV40 Konstrukt
TPA6461(Kpn)+	GAGGTACCAAGCCACGGACAGATACC	58	99 bp ab Position 6461 (-3118 bp, Bgl II)
TPA6560 (Bgl)-	GAAGATCTATGGGGTAAATGTCATGATGG	60	Reverse Primer an Pos. -3019 bp (Bgl II) ⇒ pGL3-Control Konstrukt
TPA3580(Bgl)+	GAAGATCTGTTGCCCAGGCTGGAG	58	Position -6000 bp (Bgl II Schnittstelle)
TPA580(Bgl)+	GAAGATCTAACGGCTGACCTCAAGTGA	58	Position -9000 bp (Bgl II Schnittstelle)
TPA6580(Kpn)-	GAGGTACCCATCTGGCTTTGCAGGGG	60	Reverse Primer an Pos. -3000 (Kpn I) ⇒ pRL-SV40 Konstrukte
TPA3580(Kpn)+	GAGGTACCGTTGCCCAGGCTGGAG	58	Position -6000 bp (Kpn I Schnittstelle)
TPA580(Kpn)+	GAGGTACCAACGGCTGACCTCAAGTGA	58	Position -9000 bp (Kpn I Schnittstelle)
TPA6580(Bgl)-	GAAGATCTCATCTGGCTTTGCAGGGG	60	Reverse Primer an Pos. -3000 (Bgl II) ⇒ pGL3-Control Konstrukte

Tabelle 1.5: In der Klonierung verwendete Primer („+“: vorwärts, „-“: rückwärts).

Die Restriktionsschnittstellen sind fett hervorgehoben, *tPA*-genspezifische Bereiche sind kursiv gehalten. Die Nummer in den Bezeichnungen geben die Position der ersten genspezifischen Base in 5′-3′ (kodierender Strang) Richtung an (bzw. die Position der letzten genspezifischen Base des Primers bezogen auf den Gegenstrang), der Transkriptionsstart (+1) liegt an Position 9579 (siehe Anhang), der Rückwärtsprimer am T-Start liegt an Position +12 und wird mit „T“ gekennzeichnet. Alle Konstruktbezeichnungen, die auf ein Vielfaches von 10 enden, haben eine Base weniger und sind der terminologischen Übersicht wegen auf volle Zehnerstellen aufgerundet.

Die Generierung der unterschiedlich langen Fragmente wurde nach folgender Rezeptur durchgeführt:

10 µl	2x PCR Puffer (AmpliTaqGold)
1 µl	AmpliTaqGold Polymerase
1 µl	50 µM Primer 1 (vorwärts, Bgl II geschnitten)
1 µl	50 µM Primer 2 (rückwärts, Hind III geschnitten)
1 ng	Bluescript® II SK- <i>tPA</i> (9kb) (Template)
ad 20 µl	H ₂ O.

PCR-Programm (25 Zyklen):

10-12 min	bei 94°C (hot-start),
20 sec	bei 94°C
30 sec	bei X° C (T _M)
1 min/ 1000 bp	bei 72°C
2 min	bei 72°C (Extensionsschritt).

Die Ansätze wurden direkt auf einem Agarosegel (1-2 %) aufgetrennt, die Banden herausgeschnitten, isoliert und gemäß den Protokollen (Roche) einem entsprechenden partiellen Restriktionsverdau mit je nur ½ U Enzym (jeweils für das 5' Ende und das 3' Ende) bei 37°C für 30 min unterworfen. Die Ansätze wurden über ein Agarosegel gereinigt, die richtigen Promotorfragment-DNA herausgeschnitten, isoliert und zu 50 µM in Aqua bidest. resolubilisiert. Die Promotorfragmente wurden in die mit Bgl II und Hind III bzw. Kpn I und Bgl II geschnittenen und gereinigten Vektoren *pGL3-Basic* und *pRL-Null* (Bgl II → Hind III Orientierung) bzw. *pGL3-Control* (Kpn I → Bgl II Orientierung) und *pRL-SV40* (Bgl II → Kpn I Orientierung) ligiert. Über Transformation und Mini- bzw. Maxipräparation wurden die amplifizierten Konstrukte gewonnenen und mit ihren jeweiligen Vorwärtsprimern sequenziert und auf richtige Orientierung hin geprüft. Zur Generierung der Promotorfragmente, die größer als 3,2 kb waren, wurde der *Advantage™-HF PCR Kit* (CLONTECH, Heidelberg) mit einer Fehlerquote von weniger als 1 Base auf 40 kb (Herstellerangabe) verwendet.

7.4 Ribonuklease Protektions Assay (RPA)

Der Ribonuklease Protektions Assay ermöglicht die Detektion von mRNA in einem Zelllysat und bietet gegenüber der Northernblottechnologie den Vorteil der größeren Sensibilität (Nachweis von noch bis zu 4 fg möglich), des besseren Signal/Hintergrundverhältnisses, des Verzichts auf mRNA-Isolierung und ist unempfindlich gegenüber einer potentiellen Degradierung der zu detektierenden mRNA. Eine zur Ziel-RNA komplementäre, radioaktiv markierte RNA-Sonde von kurzer Länge wird im Zelllysat gegen die Ziel-RNA hybridisiert, die überhängenden Einzelstrangenden mit RNase abgebaut, die verbleibende ds-RNA gefällt und in Laufpuffer aufgenommen über ein Polyacrylamidgel laufen gelassen. Zur Durchführung wurden die Systeme *MAXIscript™*, *Direct Protect™* und beiliegende Protokolle mit *RNA Century™*-Größenstandard und *pTRI-β-actin-Human* als interne Kontrolle (Ambion/ams, Wiesbaden) verwendet. Das Template für die Sondengenerierung bestand aus 172 bp des 3' Endes der cDNA von *tPA*, welches in 3'→5' Richtung Xba I/BamH I in den Bluescript® II SK Vektor (T3 Promotorkontrolle) kloniert wurde. Der Vektor wurde vor der Sondengenerierung mit BamH I linearisiert und über NaOAc/Isopropanolfällung gereinigt. Exponiert wurde für 1-12 h auf ein *X-OMAT™AR* Film (Kodak) oder auf einem *PhosphorImager™ SI* (Molecular Dynamics). Zur Klonierung wurde mit den Primern (genspezifische Abschnitte sind kursiv gehalten)

RPA-Xba I: 5'- GCT CTA GAG CGC CCA GAT AGT CCC CAG ATC - 3'

RPA-BamH I: 5'- CGG GAT CCC GTG TCT GAA CGA TGG CCG CAT G - 3'

vom Bluescript® II SK-*tPA* Vektor amplifiziert, aus dem Agarosegel isoliert, mit Xba I/BamH I verdaut, gereinigt und in den mit Xba I/BamH I geöffneten Bluescript® II SK Vektor ligiert.

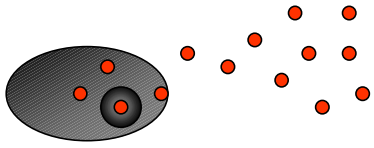
7.5 DNaseI Hypersensitivitätsassay

7.5.1 Prinzip der Methode

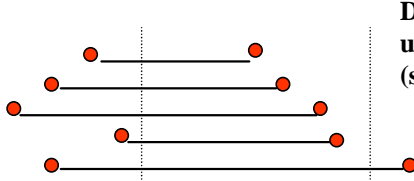
Der DNaseI Hypersensitivitätsassay basiert auf dem Grundgedanken, dass die Chromatinstruktur zunächst aufgelockert (aktiviert) sein muss, bevor Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren sterische Zugänglichkeit erhalten und eine DNA/Protein-Wechselwirkung eingehen können (s. Einleitung). Die Erfahrung hat gezeigt, dass dies zuerst vorzugsweise an regulatorisch wichtigen Sequenzabschnitten der DNA geschieht (z.B. Noll 1974, Fritton 1984, Jantzen 1987, Asenbauer 1996, Asenbauer 1999).

Das Experiment verläuft daher in der Art, dass lebende Zellen zunächst mit L- α -Lysolecithin permeabilisiert und anschließend mit DNaseI behandelt werden. Diese diffundiert in den Zellkern, wo sie an besagten aktiven Sequenzabschnitten DNA abbauen kann und nach Lysis und präparativer Isolierung einen Pool von DNA-Fragmenten von statistisch unterschiedlicher Länge liefert. Diese werden im Anschluss an einer bekannten Restriktionsschnittstelle geschnitten und über ein Agarosegel aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. In einem Southern-Blot werden dann mit einer genspezifischen, markierten Sonde, die unmittelbar an der Restriktionsschnittstelle positioniert ist, der sequenzielle Zielabschnitt detektiert. Als Kontrolle und Positionsreferenz dient eine DNA-Probe, die keiner DNaseI-Behandlung, sondern nur dem Restriktionsverdau unterworfen wurde. Sie liefert ein Fragment bekannter Länge (Die Restriktionsschnittstellen als bekannt vorausgesetzt), anhand dessen eine exakte Positionierung der durch DNaseI verdauten Bereiche möglich wird (**Abb. 4.1**).

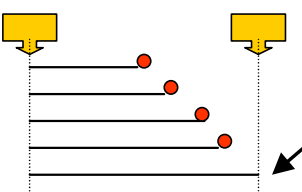
DNaseI Hypersensitivitätsassay

1:  **DNase I, 5-8 min auf lebende Zellen appliziert**
(Zelle ist durch 5% Lysolecithin perphoriert und für DNaseI permeabel)

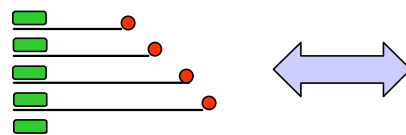
↓
DNA Isolierung und Reinigung

2:  **DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge**
(statistische Verteilung)

↓
Restriktionsverdau an bekannten Positionen, z.B. BamHI

3:  **DNA Fragment bekannter Größe**
(Kontrolle (-))

↓
Gelelektrophorese und Southern Blot mit [α-³²P] dCTP-Sonde

4: 

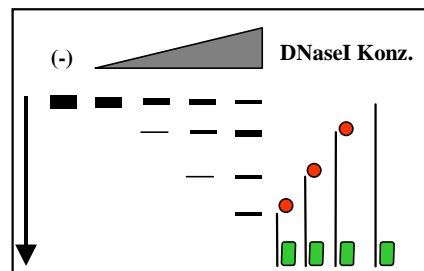
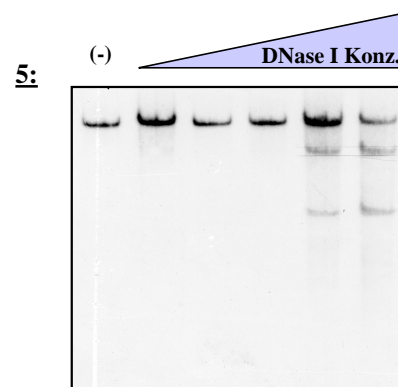


Abbildung 4.1: DNaseI Hypersensitivitätsassay.

DNaseI diffundiert in vorher permeabilisierte Zellen und schneidet dort in aktiven Chromatinregionen DNA (1). Die Lysis und Isolierung ergibt unterschiedlich lange DNA-Fragmente (2). Der Restriktionsverdau an bekannten Positionen (3) und Gelelektrophorese machen die Detektion im Southern-Blot mit einer markierten Sonde (4) möglich. Visualisierung durch Exposition für 1-2 Wochen nach extrem stringentem Waschen auf geeignetem Film (5).

7.5.2 Durchführung

Generierung der Sonden-Templatsequenzen und Sondendarstellung

Die im DNaseI Hypersensitivitätsassay verwendeten Sonden-Templatsequenzen wurden mittels PCR aus je 1 µg genomischer Plazenta-DNA gewonnen. Verwendet wurde *Pfu*-Polymerase mit entsprechendem Protokoll und 33 Zyklen im PCR Programm sowie folgende Primer (**Tab. 2.1**):

Name	Sequenz in 5' → 3' Richtung	Opt. T _M in °C	Template
5948(+)	GGT GCT GTT ACC ACC ATG G	60	Sondentemplate A
6402(-)	CTG TGT TTA CAG CCG CTC C	60	Länge 454 bp
21929(+)	ATC CAG AGC CGG ACC CAG G	72	Sondentemplate B
22527(-)	GGC TTG ACT AGA TGG AGC CG	72	Länge 598 bp
35739(+)	GTA GGC TCT ACC CGG CTC T	65	Sondentemplate C
36332(-)	GCT TTC CTG ACG TCC CCA C	65	Länge 593 bp
28632(+)	AGG CGG AGG TGA AGG TAC A	63	Sondentemplate D
29229(-)	CAC GTG CTC TCA CCT ACT C	63	Länge 597 bp
4445(+)	TTA ACT TGG TAG CCT TGG TTC	60	Sondentemplate E
5101(-)	TCA GTT CCT TTA GTG ATG CTT	60	Länge 656 bp
8462(+)	GCT TCT CTT CCC TCC CTG CG	65	Sondentemplate F
9062(-)	TGG GCT CAC CTG CGG TAG GA	65	Länge 600 bp
13934(+)	CTG AAC CCA GAT ACC AGG	62	Sondentemplate G
14597(-)	GTG ATG CAA AGA CAC AGC T	62	Länge 663 bp
22230(+)	ACC AAA CAT CAT TTG CCT CCC	62	Sondentemplate H
22672(-)	TTA TCC ATT CGT CTG TCA ATG C	62	Länge 442 bp
25736(+)	GAT CTT ACC AAG GTC GGG TG	62	Sondentemplate I
26372(-)	GTT TTG GAC CTG AAG CTG GG	62	Länge 636 bp

Tabelle 2.1: Primer zur Generierung der Sonden-Template im DNaseI Hypersensitivitätsassay.

Die Bezeichnung gibt die Position („+“: vorwärts, „-“,: rückwärts) in der genomischen Sequenz an (vgl. Anhang). Die Schmelztemperatur der Primerpaare wurde mit *Pfu*-Polymerase (Standardprotokoll) und 1 µg Plazenta-DNA, 33 Zyklen, optimiert (Opt. T_M in °C).

Anschließend wurden die Sonden-Template über ein Agarosegel und NaOAc/Isopropanolfällung gereinigt und mit ihren Vorwärtsprimern sequenziert. Um sicherzustellen, dass die Sequenz der Sonden-Template im Genom eindeutig ist, wurden dieselben vor Beginn der Synthese gegen die *NCBI GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html) verglichen und nach Synthese testweise einem Southern-Blot auf einem „Multirestriktions“-Blot unterworfen. Für diesen wurden je 30 µg genomische DNA jeweils mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten, über ein Agarosegel aufgetrennt, auf eine *Zeta-Probe*® Membran (BioRad) geblottet und mit einem *Stratalinker*® UV crosslinker (Stratagene) fixiert. Der klassische Southern-Blot musste nun in jeder Spur eine andere einzelne Bande der richtigen Größe

zeigen, wenn das Sondentemplot eindeutig sequenzspezifisch für den Zielbereich war (**Abb. 4.2**).

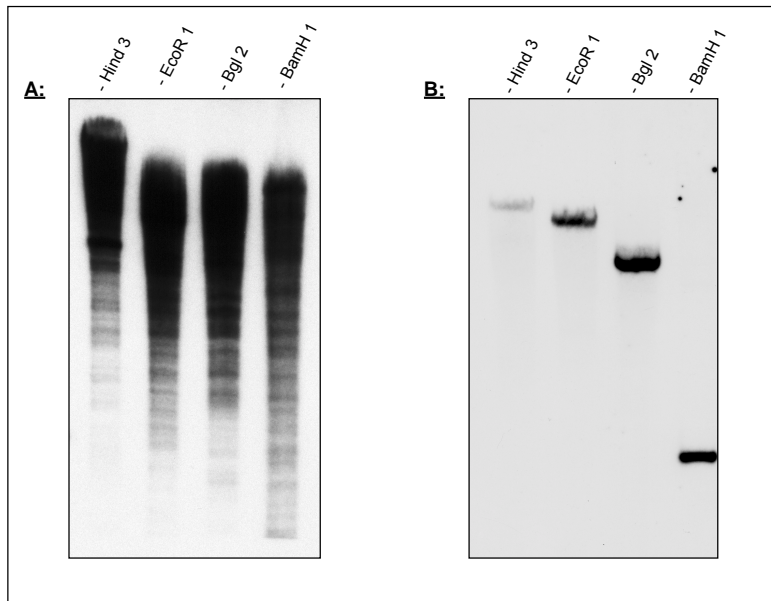


Abbildung 4.2: Testblot der DHA-Sonden.

(A): Beispiel für eine Sonde, die nicht eindeutig sequenzspezifisch für den genomischen Detektionsbereich ist. Der Southern Blot zeigt bei verschiedenen Restriktionsverdauen multiple Hybridisierungsbanden und eine eindeutige Bandendetektion ist nicht möglich. Eine solche Sonde ist für das Experiment ungeeignet. (B): Beispiel für eine Sonde, die eindeutig sequenzspezifisch gegen die einzelnen Banden des Detektionsbereichs in den unterschiedlichen Restriktionsverdauen hybridisiert und für das Experiment geeignet ist.

Zur Darstellung der eigentlichen, markierten Sonden wurde der *Prime-It® II Random Primer labelling* Kit (Stratagene) und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ gemäß beiliegendem Protokoll verwendet. Die Aufreinigung der markierten Sonden erfolgte mit dem *NucTrap® Probe Purification System* (Stratagene) und die spezifische Aktivität wurde anhand von $1\ \mu\text{l}$ Sondeneluat mit einem *Tri-Carb® 1500* Scintillation Analyser (Packard, Frankfurt a. M.) gemessen. Die verwendeten Puffer und Reagenzien sind nachfolgend zusammengefasst (**Tab. 2.2**).

<p>Phenol/Tris (pH 7,5): Phenol, mit 100 mM Tris, 7.5 gesättigt: Phenol (fest) in Tris-Lsg. durch Rühren lösen (ca. 30 min), Tris abnehmen und wiederholen, Phenol auf -20°C halten.</p>	<p>Reagenzien: DNaseI (RNase frei, ca. 10 U/μl; Roche), 5 % Lysolecithin (in H_2O): (Sigma bei -20°C aufbewahren), Proteinase K (Roche, 100 mg/ml, bei 4°C aufbewahren), CHCl_3 (Sigma), 0,4 M NaOH, 0,5 M Tris (pH 7,5).</p>
<p>Puffer I: (50 ml/6 Spaltansätze) 150 mM Saccharose 80 mM KCl 35 mM HEPES, 7.4 5 mM K_2HPO_4 5 mM MgCl_2 0.5 mM CaCl_2</p>	<p>Waschlösung: 4x SSC, 1 % SDS, 1x Denhardtts (ohne SDS).</p> <p>Prähybridisierungslösung: Waschlösung + 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denaturierte (5' 95°C, Eis) Lachs DNA.</p>

Puffer II: (3 ml/6 Spaltansätze) 150 mM Saccharose 80 mM KCl 35 mM HEPES, 7.4 5 mM K ₂ HPO ₄ 5 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂	Stringence Puffer I: 2x SSC, 0.5 % SDS.
	Stringence Puffer II: 0.2x SSC, 0.5 % SDS.
Stop-Lösung (4x) 80 mM EDTA, 8.0 4 % SDS 2,4 mg/ml Proteinase K	

Tabelle 2.2: Im DNaseI Hypersensitivitätsassay verwendete Reagenzien und Puffer.

Verdau und Isolierung der DNA

Vorbereiten der Zellen

Ca. 6×10^7 Zellen wurden trypsinisiert, abzentrifugiert, 2x mit PBS (kalt) gewaschen und auf Eis in 1,5 ml kaltem Puffer I resuspendiert (10^7 Zellen/250 μ l, in einem 50 ml Falcon-Röhrchen).

Lysolecithin-Behandlung

Das 50 ml Falcon wurde im Wasserbad ca. 2 min auf 37°C äquilibriert und dann mit 15 μ l 5 % Lysolecithin (0,05 % Endkonzentration) versetzt und 1 min bei 37° C geschwenkt. Anschließend wurde mit kaltem Puffer I auf 50 ml aufgefüllt, abzentrifugiert (11 min bei 1000 rpm), abdekantiert und auf Eis gehalten.

DNaseI Vorverdünnung (1:100)

12 μ l DNaseI (10 U/ μ l) wurden mit 288 μ l Puffer II zu 0.4 U / μ l verdünnt und auf Eis gehalten.

DNaseI Spaltungsansatz

Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Puffer II resuspendiert und auf 6 Gefäße verteilt (je 250 μ l).

Der Spaltungsansatz wurde auf Eis nach folgendem Schema vorbereitet

Ansatz	Zellen (μ l)	DNaseI (0.4 U/ μ l)	Puffer II (μ l)	Einheiten DNaseI
0	250	-	50	0
1	250	5	45	2
2	250	7,5	42,5	3
3	250	12.5	37,5	5
4	250	25	25	10
5	250	50	-	20

und 8 min bei 25° C inkubiert. Mit 100 µl 4x Stop-Lösung wurde die Reaktion abgebrochen und anschließend 1h bei 55° C inkubiert.

DNA-Präparation

Die DNA-Präparation erfolgte durch zweimaliges Waschen mit 1 Vol. Phenol, gefolgt von zweimaligem Schütteln in je 1 Vol. CHCl₃. Gefällt wurde mit 1/10 Vol. 2,5 M NaOAc (pH 7.0) und 1 Vol. Isopropanol sowie Zentrifugation bei 13.000 rpm für 30 min. Es wurde abdekantiert, in je 150-200 µl TE aufgenommen und 1-2h bei 45° C oder übernacht bei 37°C geschüttelt. Die Proben wurden quantifiziert und der DNaseI-Abbau auf einem Agarosegel kontrolliert.

Southern-Blot und Analyse

Zur Analyse der DNaseI hypersensitiven DNA-Regionen wurden aus jedem Spaltansatz 30-50 µg/Spur DNA mit der geeigneten Restriktionsnuklease gespalten (1,5-2x Ü Enzym in 150µl total), einer Isopropanolfällung unterworfen, abdekantiert, in 50 µl TE aufgenommen und bei 37°C 1h geschüttelt. Die Ansätze wurden dann auf einem 1 % Agarosegel (TAE Puffer) mit einem geeigneten Größenstandard aufgetrennt (Bereich ca. 400 bp – 5000 bp), mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-C Licht mit einem externen Längenstandard (Lineal) fotografiert. Der externe Längenstandard ist wichtig, um den internen Größenstandard zu kalibrieren und hinterher eine exakte Größenidentifizierung der detektierten Banden zu ermöglichen. Das Gel wurde anschließend mit 0,4 M NaOH mittels des Kapillarhubverfahrens über Nacht auf eine *Zeta-Probe*® Membran (BioRad) geblottet. Die Geltaschen wurden sorgfältig auf der Membran markiert und die Membran wurde dann 10-15 min. in 0.5 M Tris (pH 7.5) gewaschen, mittels eines UV-crosslinks fixiert und luftgetrocknet. Aus dem internen und externen Größen- bzw. Längenstandard wurde auf halblogarithmischem Papier eine Abstandslänge von Geltasche/Bandengröße- Standardkurve erstellt anhand derer hinterher die Größenbestimmung der detektierten Banden erfolgte.

Mehrere Blotmembranen wurden bei 68°C in der Waschlösung für 30 Minuten vorgewaschen, übereinander in Hybridisierungszyylinder gelegt und sauber an den Wänden ausgerollt. Die Zylinder wurden mit vorgewärmter Prähybridisierungslösung zu 2/3 gefüllt und bei 68°C für ca. 60 min vorhybridisiert. Pro Zylinder wurden dann 1-1,5 Mio. CPM/ml Hybridisierungslösung markierte und denaturierte Sonde hinzugegeben und bei 68° C über Nacht hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Blots bei 68°C 2x 30 min. in Stringence

Puffer I gewaschen und anschließend ihre Aktivität geprüft. Falls die Aktivität nicht schon fast auf Hintergrundniveau gefallen war wurde noch einmal je 15 min mit Stringence Puffer II bei 68°C gewaschen. Idealerweise war dann kaum noch Aktivität der Blots festzustellen. Die Membranen wurden in Klarsichthülle gewickelt mit einem Fluoreszenzmarker (Stratagene) versehen und bei -70°C 1-2 Wochen auf einem Phosphor-Verstärkerschirm auf einen *BioMax MR* (Kodak) exponiert. Nach der Filmentwicklung wurden die Entfernungen der detektierten Banden von den markierten Böden der Geltaschen auf der Membran gemessen und ihre Größen anhand der zuvor angefertigten Standardkurve bestimmt.

7.6 *In vivo* Footprinting

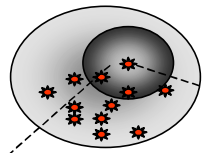
7.6.1 Prinzip der Methode

Die Methode des *in vivo* Footprinting unter Verwendung der sogenannten *Ligierung-mediated* PCR (kurz LM-PCR) wurde 1989 erstmals beschrieben (Pfeifer 1989). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass mögliche Protein/DNA Wechselwirkungen in Bereichen regulatorischer DNA-Elemente in kleinen Populationen intakter, lebender Zellen auf genomischer Ebene untersucht werden können. Dabei werden DNA-Sequenzen, die mit Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung treten, durch diese vor chemischer Modifizierung durch Dimethylsulfat (DMS) geschützt. DMS überträgt als alkylierendes Reagenz eine Methylgruppe auf die Guanosinbasen in der genomischen DNA. Durch Zugabe von Piperidin kann die DNA dann spezifisch an diesen methylierten Guanosinen geschnitten werden. Im Laufe des Experiments erhält man letztlich auf einem Sequenziergel eine Guanosin-„Leiter“, in der die durch Proteine protektierten Areale als Lücke erscheinen und daher als „footprints“ der an die DNA gebundenen Proteine bezeichnet werden. Gegenüber demselben, „nackten“, methylierten DNA-Strang als Referenz lassen sich diese geschützten Bereiche bis auf eine einzelne Base genau identifizieren.

Die Zellen werden für kurze Zeit (5-15 min) mit DMS behandelt. Hierbei diffundiert DMS durch die Zellmembran in den Zellkern und methyliert Guanosine (G) an ihrer N7-Position. Danach wird die DNA isoliert und mit Piperidin bei 90°C verdaut, was zum Einzelstrangbruch an betreffender G-Position führt (Maxam 1977). Die so verdaute DNA wird nun mehreren enzymatischen Reaktionen unterworfen.

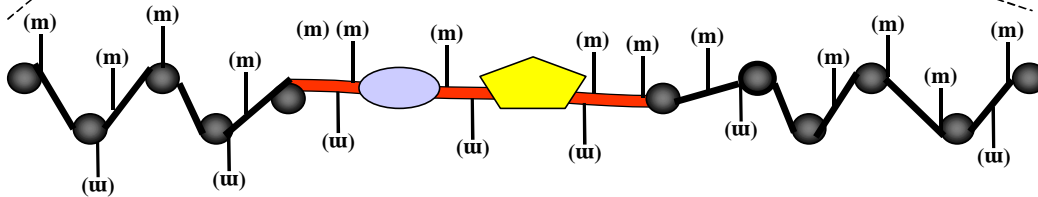
Bei der ersten Reaktion, der sogenannten Erststrangsynthese, werden die unterschiedlich langen Fragmente aus dem zu untersuchenden Bereich durch Annealing eines spezifischen Primers (Primer 1) einer einfachen Gegenstrangsynthese unterworfen und es entstehen DNA-Doppelstränge mit glatten Enden (blunt end). Danach erfolgt die Ligierung eines synthetischen, unidirektionalen Linkers (TAG-Linker) an die glatten Enden der DNA-Fragmente. Bei der sogenannten Zweitstrangsynthese werden die so ligierten, unterschiedlich langen Fragmente des Zielbereichs amplifiziert. Hierbei wird ein genspezifischer Primer (Primer 2, downstream von Primer 1) und ein linkerspezifischer Primer (TAG 3) verwendet. Anschließend wird die amplifizierte DNA mit einem dritten, radioaktiv markierten Primer (Primer 3, downstream von Primer 2) abgelesen und danach in denaturiertem Zustand auf einem Sequenziergel aufgetrennt. Als Referenzkontrolle wird ein Ansatz *in vitro* methylierter, also proteinfrei (ungeschützter), methylierter DNA mitgeführt. Durch Vergleich der Bandenmuster der verschiedenen Ansätze mit der *in vitro* Kontrolle, können *in vivo* protektierte Guanosine identifiziert werden (Lücken im Guanosinbandenmuster), welche die Positionen der Protein/DNA Wechselwirkungen aufzeigen. Zu einem sehr geringen Umfang werden auch die den geschützten Guanosinen benachbarte Adenosine an ihrer N3-Position methyliert (Lawley 1963). Solche sogenannten hyperreaktiven Adenosine sind als Banden sichtbar, die in der Spur mit der *in vitro* methylierten DNA nicht vorhanden sind und sich unmittelbar neben den Footprint-Lücken befinden (**Abb. 4.3**)

In Vivo Footprinting unter Verwendung von LM-PCR

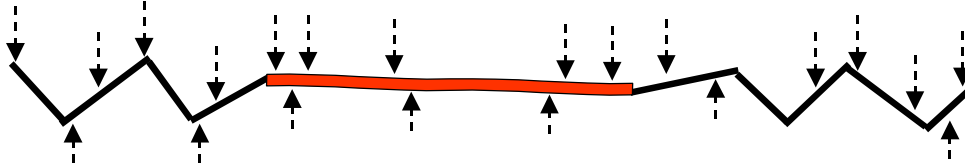


lebende Zellen + DMS

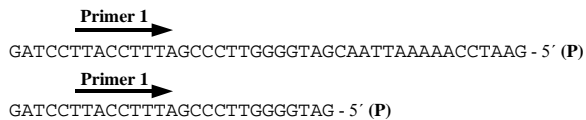
1. Protein/DNA Wechselwirkungen schützen die genom. DNA vor G-methylierung durch DMS



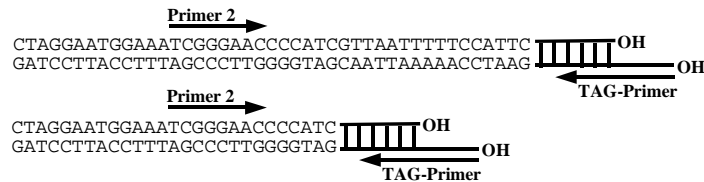
2. Lysis und DNA-Isolierung, EINZELSTRANG-Brüche durch Piperidin-Spaltung an methylierten G^m-Basen



3. Denaturieren, Gegenstrangsynthese



4. Ligierung des TAG-Linkers, PCR mit Primer 2



5. Primer-Extension mit „radioaktivem“ Primer 3

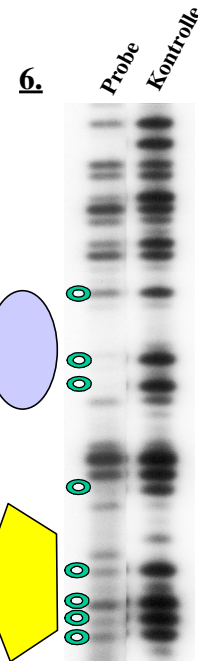
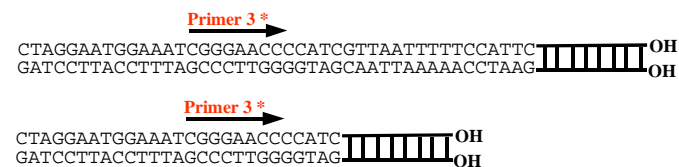


Abbildung 4.3: Prinzip des *in vivo* Footprinting mit LM-PCR.

Nach DMS-Behandlung *in vivo* wird die genomische DNA mit Piperidin an methylierten Guanosinen geschnitten (1+2). Danach erfolgt die Erststrangsynthese mit dem ersten genspezifischen Primer (3). Nach Ligierung eines unidirektionalen Linkers (4) folgt eine PCR-Amplifikation mit dem zweiten genspezifischen Primer und dem Linkerprimer (4). Die Visualisierung erfolgt mit dem dritten, radioaktiv markiertem Primer (5). Schließlich werden die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt auf Film exponiert und entwickelt (6).

7.6.2 Durchführung

Die in der LM-PCR verwendeten Primer-Sätze sind nachfolgend aufgeführt (**Tab. 3.1**).

	Bezeichnung (= Position auf Promotor)	Sequenz (in 5'→3' Richtung)	Optimierte T_M (in °C)
Satz A	5815	GCA AGA ATA AAG ACC TCC TC	60
	5831	CCT CCT ACA GTT TGG TGA AC	60
	5874	GTA AGA GTC CTT CCC ATG CC	64
Satz B	6400	CAG ATG AAG CTT CAC TGG CTC	68
	6428	ACT CAC CTC CTG CTG CGC A	64
	6441	TGC GCA GCC TGG TTC CTA AC	68
Satz C	7006	CCT TTC TCT GAG TTT CCA GA	60
	7041	CTT ACC CAG CTG AGC AGA GT	62
	7059	GTC CCA GCA TGG CTC TCG TT	64
Satz D	7214	GCC CTG CAG CAA TTC CCC GT	68
	7231	CGT CCA GTT TCT CTG TGC CC	66
	7248	CCC ACT TTG TCT CCG TGT TA	60
Satz E	7411	CCA TTG TCA CCT TAT CAG CCT G	66
	7451	CTC TCA GGC TTC CCC AGA AT	64
	7465	CAG AAT CTG TCC GAG GGA AA	62
Satz F	8705	CCT AAG ACT TTC CCC TAC AC	62
	8718	CCT ACA CGA CAG GGC TTT TA	62
	8744	AGT CAT CTG AAA AGG TGT CAG C	62
Satz G	8925	AAA GTT CCC GGA GGC CAC CT	61
	8944	TAC TGC AGC CCT GCA CTT TA	62
	8963	ACA AAG AAG AGA AAG ATT CTC CC	62
Satz H	9181	CAG CCA CAG ATT CCA GAA GA	62
	9195	AGA AGA CAC CCC ACT CCC AG	68
	9217	CCA ACC TGC TGC CTT TAG AA	62
Satz I	9411	CTT CCA CCG TGA ACT TCC TC	62
	9424	CTT CCT CCC CCT GCT TTA TA	62
	9444	AAA ACA GGC CTG CCT CAG CT	68

Tabelle 3.1: Primersätze in der LM-PCR.

Die Primer zur Generierung des unidirektionalen Linkers und die im *in vivo* Footprint verwendeten Puffer sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (**Tab. 3.2**).

10x PBS:	Puffer I:	4x Stop-Lösung
für 1 l: 80 g NaCl 2 g KCl 21 g Na ₂ HPO ₄ (12 H ₂ O) oder 14,4 g Na ₂ HPO ₄ (2 H ₂ O) 2 g KH ₂ PO ₄	150 mM Saccharose 80 mM KCl 35 mM HEPES, 7.4 5 mM K ₂ HPO ₄ 5 mM MgCl ₂ 0.5 mM CaCl ₂	80 mM EDTA, pH 8.0 4 % SDS 2,4 mg/ml Proteinase K

TAG-Oligonukleotide/Primer: <u>TAG-1:</u> GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC <u>TAG-2:</u> GAATTCAGATC <u>TAG-3:</u> GCGGTGACCCGGGAGATC (50 pMol/Ansatz)	2x PCR-Puffer (<i>Taq & AmpliTaqGold</i>): f für 1 ml: (Roche) 200 µl 10xPCR-Puffer (enthält MgCl ₂) je 4 µl 100 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP 784 µl H ₂ O
2x PCR-Puffer (<i>Pfu</i>): für 1 ml (Promega): 200 µl 10xPCR-Puffer (enthält MgCl ₂) je 4 µl 100 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP 784 µl H ₂ O	Stopper/Auftrag-Lsg.: 95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol
Primer (1-3 & TAG): TAG (50 pMol/Ansatz) genspezifischer Primer 1 (50 pMol/Ansatz) genspezifischer Primer 2 (50 pMol/Ansatz) genspezifischer Primer 3 (1-1,5x10 ⁶ cpm ³² P pro Ansatz)	Synthese des TAG-Doppelstrang-Linkers: für 100 µl (10 pMol/µl): 20 µl TAG-1 (50 µM) 20 µl TAG-2 (50 µM) 25 µl 1M Tris, pH 7,5 35 µl H ₂ O 5'/95°C, langsam auf RT abkühlen, bei -20°C aufbewahren
Phenol: Phenol wird frisch angesetzt und mit 50 mM Tris (pH 8,0) gesättigt	Reinigung: <i>QIAquick PCR Isolation Kit</i> (QIAGEN) <i>QIAquick Nucleotide Removal Kit</i> (QIAGEN)

Tabelle 3.2: Linker-Primer und verwendete Puffer.

Vorbereiten der Zellen

Die Zellen wurden geerntet, abzentrifugiert und in Medium/10 % FCS resuspendiert (10⁷-10⁸/ml, 1 ml/225 cm² Flasche).

In vivo Methylierung

In einem 15 ml Falcon wurde DMS ad 0.1-0.5 % dazugeben und 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden zügig 10 Vol eiskaltes PBS zum „Quenchen“ der Reaktion zugegeben und bei 4°C und 1500 rpm 10 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Anschluss noch einmal mit kaltem PBS gewaschen.

Kontroll-DNA

100 µg genomische DNA wurden mit ca. 1/10 Vol 5 % DMS (20 % Isopropanol-Lsg.) je 60 sec und 90 sec bei RT behandelt, sofort kalt mit 1/10 Vol NaOAc (2,5 M, pH 7,0)/ 1 Vol Isopropanol gefällt und 10 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde noch einmal kurz in kaltem Isopropanol gewaschen und in TE aufgenommen.

DNA-Präparation aus Zellmaterial

Das Zellpellet wurde in PBS (oder Puffer I) resuspendiert (ca. 5×10^7 /ml) und mit 1/3 Vol der 4x Stop-Lösung gut durchmischt und 1h bei 50°C inkubiert, um alle Proteine abzubauen. Anschließend wurde einmal mit Phenol (mit 50 mM Tris, pH 8,0 gesättigt) und zweimal mit CHCl_3 (Chloroform) gewaschen. Die DNA wurde dann mit 1/10 Vol NaOAc (2,5 M, pH 7,0)/ 1 Vol Isopropanol gefällt und in 200 μl TE aufgenommen.

Piperidin-Behandlung

180 μl DNA wurden mit 20 μl 10 M Piperidin versetzt und 30 min bei 90°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit 1/10 Vol NaOAc (2,5 M, pH 7,0)/ 1 Vol Isopropanol gefällt, in TE aufgenommen und noch zweimal umgefällt. Letztlich wurde das Pellet in 200 μl 10 mM Tris (pH 7,5) aufgenommen.

Einzelstrangsynthese mit Primer 1

Die Reaktion wurde nach folgender Rezeptur durchgeführt :

25 μl	2x PCR-Puffer (Pfu)
1 μl	50 μM Primer 1
5-10 μg	DNA (methyliert)
1 μl	<i>Pfu</i> -Polymerase
H ₂ O ad 50 μl .	

PCR-Programm:

5 min bei	94°C
5 min bei	X° C (T_M)
10 min bei	72°C.

Die Reinigung des Ansatzes erfolgte mit *QIAquick PCR Purification-Kit* entsprechend den vorgegebenen Protokollen und die DNA wurde mit 30 μl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) eluiert.

Ligierung des Linkers

Der Ligierungsansatz wurde nach der folgenden Rezeptur durchgeführt :

30 µl DNA-Eluat der Einzelstrangsynthese
4 µl 10x Ligase-Puffer (Roche)
5 µl TAG-Doppelstrang-Linker
3 µl T4 DNA Ligase (Roche).

Der Ansatz wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4°C ligiert.

Amplifikation mit TAG-3 und Primer 2

Die Reaktion wurde nach folgender Rezeptur durchgeführt :

25 µl 2x PCR-Puffer (AmpliTaQGold)
1 µl 50µM Primer 2
1 µl 50µM TAG-3
2µl Template (direkt aus Liierungsansatz)
0,5 µl AmpliTaQGold
20,5 µl H₂O.

PCR-Programm (30 Zyklen):

10-12 min bei 94°C (sogenannter „hot-start“),
20 sec bei 94°C
30 sec bei X° C (T_M)
3 min bei 72°C.

Markierung des Primer 3 mit [γ -³²P]ATP

Die Reaktion wurde nach folgender Rezeptur durchgeführt :

3 µl 50µM Primer 3
6 µl [γ -³²P]ATP
2 µl 10x PNK-Puffer (Roche)
1 µl Polynukleotidkinase (PNK, 10U, Roche)
8 µl H₂O

Der Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem *QIAquick Nucleotide Removal Kit* aufgereinigt. Es wurde mit 50 µl H₂O eluiert, 1 µl abgenommen und die Aktivität in einem *Tri-Carb® 1500* Scintillation Analyser (Packard) gemessen.

Primer Extension mit radioaktiv markiertem Primer 3

Die Reaktion wurde nach folgender Rezeptur durchgeführt :

10 µl	2x PCR Puffer (AmpliTaqGold)
0,2 µl	AmpliTaqGold
1,5 -3µl	[³² P] markierter Primer 3 (ca. 1-1,5 Mio. CPM/Ansatz)
2 µl	Template (direkt aus dem Amplifizierungsansatz)
ad 20 µl	H ₂ O

PCR-Programm (15 Zyklen):

10-12 min bei	94°C (hot-start),
20 sec bei	94°C
30 sec bei	X° C (T _M)
3 min bei	72°C

Sequenziergel

Für den Sequenziergellauf zur Visualisierung wurde die *Sequi-Gen® GT* Gellaufapparatur (Biorad) mit dem dafür vorgegebenen Protokoll verwendet. Das 6 %ige, 40x20 cm Polyacrylamidgel wurde jeweils frisch hergestellt und vor der Polymerisation 15 min entgast, 0,5 mm Kamm/Spacer verwendet und das Gel bei 25 mA 1 vorlaufen gelassen, so dass sich eine Temperatur von 45°C einstellen konnte. Dann wurden 1-4 µl des Primer Extension Ansatzes, 3-0 µl H₂O und 2 µl Stopper-Lsg. in einem Reaktionsgefäß vereinigt und die DNA 5 min bei 95°C denaturiert. Es wurden je 5µl/Bahn direkt auftragen und das Gel ca. 1:30 h mit 25 mA betrieben. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf ein Gel-Blotting-Papier (Schleicher&Schuell) gelegt und 2 h bei 80°C vakuumgetrocknet. Das Gel wurde schlussendlich 1-2 Tage auf einen *BIOMAX™ MR*-Film (Kodak) exponiert.