

---

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. MATERIAL

#### 2.1.1. Eukaryotische Zellen und Nährlösungen

##### Humane Melanom-Zelllinien:

SK-Mel-28, SK-MEL-23, SK-Mel-13 (Cary et al., 1976), MeWo (Bean et al., 1975), Mel-2A (Bruggen et al., 1978), M5 (Liao et al., 1975), A-375 (Giard et al., 1973), BRO (Lockshin et al., 1985), Mel-HO (Holzman et al., 1988).

##### SKMel-13-Tet-On, BRO-Tet-On; Mel-2A-Tet-Off

Die Tet-On Zelllinie SKM13-Tet-On und BRO-Tet-On wurden von Dr. Eberle, die Mel-2A-Tet-Off von Dr. Fecker durch stabile Transfektion des Plasmids Tet-On bzw. Tet-Off (Clontech) in die Melanom-Zelllinie SK-Mel-13, BRO und Mel-2A hergestellt.

##### HL-60 und Jurkat Leukämie-Zelllinien :

Die beiden humanen Leukämie-Zelllinien stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig ).

##### Melanozyten:

Es wurden mehrere Melanozyten-Kulturen aus verschiedenen menschlichen Vorhäuten generiert.

##### Lösungen für die Zellkultur

FCS (Seromed)

Trypsin/EDTA 0,05/0,02% (w/v) in PBS w/o  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  (Seromed)

Penicillin/Streptomycin 10.000 U / 10.000  $\mu\text{g}$  / ml (Seromed)

Geneticin (G-418, Gibco), 100 mg Geneticin gelöst in 2 ml PBS

Hygromycin (Gibco), 50 mg/ml

PBS w/o  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  (Phosphate Buffered Saline; Seromed)

##### Nährmedien:

Dulbecco`s Modified Eagle Medium 1660 mit Glucose 4,5 g/l (Gibco BRL)

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Seromed-Biochrom)

je 500 ml + FCS 50 ml, Penicillin/Streptomycin 5ml

### 2.1.2. Enzyme

DNA-modifizierende Enzyme:

|                                              |            |
|----------------------------------------------|------------|
| T <sub>4</sub> DNA Ligase (1 U/μl)           | GibcoBRL   |
| Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) (1 U/μl) | Boehringer |
| DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) (5 U/μl)    | GibcoBRL   |
| Taq-Polymerase (10 U/μl)                     | GibcoBRL   |
| Pfu DNA Polymerase (2,5 U/μl)                | Stratagene |

Tab. 1: Verwendete Restriktionsenzyme:

| Enzym    | Puffer | Temperatur | Firma    |
|----------|--------|------------|----------|
| BamHI    | 3      | 37°C       | GibcoBRL |
| Bgl II   | 3      | 37°C       | GibcoBRL |
| ClaI     | 1      | 37°C       | GibcoBRL |
| EcoRI    | 3      | 37°C       | GibcoBRL |
| Hind III | 2      | 37°C       | GibcoBRL |
| KpnI     | 4      | 37°C       | GibcoBRL |
| NsiI     | 3      | 37°C       | GibcoBRL |
| PstI     | 2      | 37°C       | GibcoBRL |
| PvuII    | 6      | 37°C       | GibcoBRL |
| XbaI     | 2      | 37°C       | GibcoBRL |
| XhoI     | 2      | 37°C       | GibcoBRL |

Tab. 2: Restriktionspuffer (nach Gibco-BRL)

| Reaktionspuffer Nr. | pH  | Tris-HCl | MgCl <sub>2</sub> | NaCl   | KCl   |
|---------------------|-----|----------|-------------------|--------|-------|
| 1                   | 8,0 | 50 mM    | 10 mM             | -      | -     |
| 2                   | 8,0 | 50 mM    | 10 mM             | 50 mM  | -     |
| 3                   | 8,0 | 50 mM    | 10 mM             | 100 mM | -     |
| 4                   | 7,4 | 20 mM    | 5 mM              | -      | 50 mM |
| 6                   | 7,4 | 50 mM    | 6 mM              | 50 mM  | 50 mM |

### 2.1.3. Antibiotika

Ampicillin (Gibco): 50 mg/ml in steril filtriertem Wasser

Geneticin (Gibco): 100 mg Geneticin gelöst in 2 ml PBS

Hygromycin (Boehringer): 50 mg/ml

Doxycyclinhydrochlorid (Sigma): 1mg/ml in steril filtriertem Wasser

#### Zur Transfektion:

Transfektionsmittel: DMRIE-C Reagent (Invitrogen) 2 mg/ml

### 2.1.4. Nährmedium für Bakterien:

LB-Medium: Ansatz für 1 Liter (Gibco BRL)

Trypton 10 g

Hefeextrakt 5 g

NaCl 10 g

NaOH (1M) 1ml

H<sub>2</sub>O ad 1000 ml

Ampicillin (50 µg/ml)

Für die Verwendung in Petrischalen + 14 g Agar (Gibco).

### 2.1.5. Vektoren und Plasmide

pTRE (3,1 kb): (ClonTech; Gossen and Bujard, 1995)

pTRE enthält folgende Elemente: P<sub>CMV-1</sub>, den induzierbaren Promotor des Cytomegalovirus, und das TRE-Element, das stromaufwärts zu P<sub>CMV-1</sub> bei 1 - 438 bp liegt.

TATAA box: 341-348 bp.

Die Startstelle für die Replikation (origin) vom pUC-Plasmid: 1295 -1938 bp

Resistenzmarker (Ampicillin)

Multiple Cloning Site (MCS): 439-487 bp

SV-40 PolyA-Signal: 711-720 bp

pTet-On (7,4 kb): ClonTech (Gossen and Bujard, 1995)

pTet-On enthält folgende Elemente:

Einen konstitutiv aktiven Promotor des Cytomegalovirus: 86-673 bp

„reverse tetracycline-responsive transcriptional activator“ (rtTA): 774-1781 bp

pUC Startstelle für die Replikation: 2604-3247 bp

Resistenzmarker (Ampicillin)

PolyA-Signalstelle von SV40: 1797-2254 bp

Neomycin/Kanamycin-Resistenzgen: 6462-5668 bp

pTK-Hyg (5,1 kb) ClonTech (180 ng/μl)

Dieses Plasmid wurde für die Selektion der stabil transfizierten Zellen verwendet. Es enthält das Hygromycin-Resistenz-Gen.

pIRES mit dem eingebauten Maus-**bcl-2**-Fragment wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Geilen zur Verfügung gestellt. Das Hind III / Not I Fragment ist 740 bp lang.

Das humane **β-Aktin**-Fragment wurde als Kontrolle für die Vitalität eukaryotischer Zellen im Northern Blot verwendet.

Die humane **bcl-X<sub>L</sub>** und **bcl-X<sub>S</sub>** cDNA im pTRE Expressionsvektor wurde mittels RT-PCR hergestellt. Das bcl-X<sub>L</sub>-Gen mit den Schnittstellen EcoRI/EcoRI ist 670 bp lang, bcl-X<sub>S</sub> mit den gleichen Schnittstellen ist 560 bp lang.

Das Plasmid pcDNA3 mit dem eingebauten humanen **bax**-Fragment wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Daniel zur Verfügung gestellt. Das mit einem myc-Tag versehene bax ist 650 bp lang und liegt mit den Schnittstellen BamHI/BamHI auf pcDNA3.

### 2.1.6. Primer

Die Primer wurden in lyophilisiertem Zustand von den Firmen Metabion GmbH München bzw. TIB Molbiol Berlin bezogen. Sie wurden in bidestilliertem Wasser zu 100 μM aufgelöst.

Primer für Bcl-X<sub>L</sub>/X<sub>S</sub>

5' T T G G A C A A T G G A C T G G T T G A 3'

5' G T A G A G T G G A T G G T C A G T G 3'

Primer für β-Aktin

5' G T G G G C G C C C A G G C A C C A 3'

5' C T C C T T A A T G T C A C G C A C G A T T T C 3'

**2.1.7. Längen-Marker**

DNA-Marker: 1 kb-Leiter (Gibco)

Die Fragmentlängen in bp: 12216 , 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506/517, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75.

RNA-Marker (Gibco)

Die Fragmentlängen in Nukleotiden: 9049, 7046, 4040, 2003, 1035, 240

**2.1.8. Kits**

Reagenzien zur Nucleinsäureextraktion

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Gelextraktionskit (Jetsorb) | Genomed |
| Plasmid Midi Kit            | Qiagen  |
| Plasmid Mini Kit            | Qiagen  |
| RNeasy Kit für Gesamt-RNA   | Qiagen  |

Reagenzien zur Klonierung

|                                          |                     |
|------------------------------------------|---------------------|
| SAP-Kit (Dephosphorylierung)             | Boehringer Mannheim |
| Topo-TA Cloning Kit                      | Invitrogen          |
| DNA-Ligase-Kit                           | Gibco               |
| E. coli (kompetente Zellen) DH5 $\alpha$ | ClonTech            |

Reagenzien für Apoptose und Zytotoxizität

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| Cell Death Detection Kit         | Roche |
| Cytotoxicity Detection Kit (LDH) | Roche |

Reagenzien für Fraktionierung von Mitochondrien und Zytosol

|                                        |        |
|----------------------------------------|--------|
| Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit | Alexis |
|----------------------------------------|--------|

Caspase-Assay

|                                     |          |
|-------------------------------------|----------|
| ApoAlert Caspase Colorimetric Assay | Clontech |
|-------------------------------------|----------|

**2.1.9. Material zur Proteinanalytik**

|                                            |            |
|--------------------------------------------|------------|
| BCA Protein Assay Kit                      | Pierce     |
| <u>Protein-Marker</u>                      |            |
| Prestained SDS-Page Standard (Broad Range) | BioRad     |
| Cruz Marker Molecular Weight               | Santa Cruz |

Protease-Inhibitoren

|           |                                      |       |
|-----------|--------------------------------------|-------|
| Pepstatin | 0,5 mg/ml in bidest.H <sub>2</sub> O | Sigma |
| Leupeptin | 10 µg/ml in bidest.H <sub>2</sub> O  | Sigma |
| Aprotinin | 10% in bidest.H <sub>2</sub> O       | Sigma |
| PMSF      | 100 mM in DMSO                       | Sigma |

**2.1.10. Antikörper**Primäre Antikörper

| <b>Antigen</b>                     | <b>Spezies</b> | <b>Verdünnungsfaktor</b> | <b>Firma</b>   |
|------------------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
| Cytochrom C                        | Maus           | 1:800                    | Pharmingen     |
| Bcl-X <sub>L</sub> /X <sub>S</sub> | Kaninchen      | 1:200                    | Santa Cruz     |
| Bcl-2                              | Maus           | 1:400                    | Santa Cruz     |
| Bax                                | Kaninchen      | 1.500                    | Santa Cruz     |
| AIF                                | Ziege          | 1:400                    | Santa Cruz     |
| β-Aktin                            | Maus           | 1:1000                   | Sigma          |
| VDAC                               | Maus           | 1.1000                   | Calbiochem     |
| Bid                                | Kaninchen      | 1:1000                   | Cell Signaling |
| Caspase-3                          | Kaninchen      | 1:1000                   | Cell Signaling |
| Caspase-3                          | Maus           | 1:1000                   | Calbiochem     |
| Caspase-6                          | Kaninchen      | 1:1000                   | Cell Signaling |
| Caspase-7                          | Kaninchen      | 1:1000                   | Cell Signaling |
| Caspase-8                          | Kaninchen      | 1:1000                   | Cell Signaling |
| LaminA                             | Kaninchen      | 1:1000                   | Cell Signaling |
| DFF45                              | Kaninchen      | 1:400                    | Cell Signaling |
| PARP                               | Maus           | 1:1000                   | Mol-Biol       |

Sekundäre Antikörper

| Antikörper                                                           | Verdünnungsfaktor | Firma |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------|-------|
| Anti-Anti-Maus konjugiert mit<br><i>Horseraddish</i> Peroxidase      | 1:5000            | Dako  |
| Anti-Anti-Ziege konjugiert mit<br><i>Horseraddish</i> Peroxidase     | 1.5000            | Dako  |
| Anti-Anti-Kaninchen konjugiert mit<br><i>Horseraddish</i> Peroxidase | 1:5000            | Dako  |

**2.1.11. Apoptose-Stimulanzen:**

|                                                      |          |                 |
|------------------------------------------------------|----------|-----------------|
| CH-11 (agonistischer Anti-Fas Antikörper)            | 1 µg/µl  | Immunotech      |
| Ceramid (gelöst in Ethanol)                          | 20 mM    | Alexis          |
| DTIC (Dacarbazin, gelöst in bidest.H <sub>2</sub> O) | 20 mg/ml | Medac           |
| VP-16 (Etoposid, gelöst in DMSO)                     | 20 mM    | Sigma           |
| Pamidronat (gelöst in bidest.H <sub>2</sub> O)       | 21,5 mM  | Novartis Pharma |

**2.1.12. Lösungen:**10 x TBS (Tris-Buffered Saline)

24,2 g Tris-Base

80 g NaCl

pH 7,6

ad 1 Liter bidest. Wasser

50 x TAE (Tris-Acetat):

242 g Tris-Base

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

ad 1 Liter bidest. Wasser

20 x SSC:

175,3 g NaCl

88,2 g NaCitrat pH 7,0

ad 1 Liter bidest. Wasser

10 x Formaldehydpuffer:

41,2 g MOPS  
 26,6 ml NaAcetat (3 M)  
 20 ml EDTA (0,5 M)  
 ad 1 Liter bidest. Wasser pH 7,0

10% SDS:

100 g SDS  
 ad 1 Liter bidest. Wasser pH 7,2

0,5 M EDTA:

186,1 g EDTA  
 ad 1 Liter bidest. Wasser pH 8,0

3 M NaAcetat:

408,1 g NaAcetat  
 1 Liter bidest. Wasser pH 5,2

10% Dextranlösung

1% SDS  
 1 M NaCl  
 10% Dextran

**2.1.13. Chemikalien und Radiochemikalien**

|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1)   | BioRad     |
| Agarose                             | Gibco BRL  |
| Ammoniumpersulfat (APS)             | BioRad     |
| Bromphenolblau                      | BioRad     |
| d(ATG)-Mix: dATP, dTTP, dGTP        | Gibco BRL  |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) | Sigma      |
| Essigsäure                          | Merck      |
| Ethanol                             | J.T. Baker |
| Ethidiumbromid                      | Sigma      |
| Formaldehyd                         | J. T.Baker |

---

|                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| Formamid                        | Sigma                           |
| Glycerol                        | Sigma                           |
| Glycin                          | Serva                           |
| Harnstoff                       | United States Biochemical (USB) |
| Isopropanol                     | J.T.Baker                       |
| $\beta$ -Mercaptoethanol        | Merck                           |
| Methanol                        | J.T.Baker                       |
| Natriumacetat                   | Merck                           |
| Natriumchlorid                  | Merck                           |
| Natriumcitrat                   | Merck                           |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)      | Amresco                         |
| Natriumhydroxid                 | Merck                           |
| Natrium-X-Phosphat              | Merck                           |
| Non-Fat Dry Milk                | BioRad                          |
| Ponceau S                       | Sigma                           |
| Saccharose                      | Merck                           |
| Tween-20                        | Calbiochem                      |
| TEMED                           | BioRad                          |
| Tris(hydroxymethyl-)aminomethan | Merck, Invitrogen               |
| Salzsäure                       | Merck                           |
| Xylencyanol                     | BioRad                          |

Radiochemikalien:

(alpha-<sup>32</sup>P)dCTP, 3000 Ci/mmol, 10  $\mu$ Ci /  $\mu$ l NEN

**2.1.14. Sonstige Materialien**

|                                                    |                   |
|----------------------------------------------------|-------------------|
| Blue und Red Cap Tubes (50 ml)                     | Falcon            |
| Kryoröhrchen                                       | Falcon            |
| Farbnegativfilme 100 ASA                           | Kodak             |
| Filmkassetten                                      | Kodak             |
| Filterpapier 3MM                                   | Whatman           |
| Filtriergerät                                      | Millipore         |
| Gelfiltrationssäulen: NAP <sup>TM</sup> -5 Columns | Pharmacia Biotech |

---

|                                        |                        |
|----------------------------------------|------------------------|
| Gewebekulturflaschen                   | Falcon                 |
| Glas-Homogenisator (Douncer)           | BioRad                 |
| Heparin-Spritzen                       | Becton Dickinson       |
| Hybridisierungs-Transfermembran        | Du Pont                |
| Hyperfilm ECL                          | Amersham               |
| Imaging Platte 20x40 cm 2040S          | Fuji                   |
| Mikrofilter (0,2 µm)                   | Braun                  |
| Mikrotiterplatten (24 well)            | Falcon                 |
| Nitrozellulose-Membran (Protran BA 83) | Schleicher und Schuell |
| Petrischalen                           | Falcon                 |
| Röntgenfilme                           | Fuji                   |
| Salmon Sperm DNA Solution              | Gibco BRL              |
| Schwarz-Weiß Filme                     | Polaroid               |
| 6-well Zellkultur-Platten              | Falcon                 |
| 24-well Zellkultur-Platten             | Nunc                   |
| 96-well Zellkultur-Platten             | Nunc                   |
| Zellschaber                            | Costar                 |

### 2.1.15. Geräte

|                                   |                             |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Autoklav                          | Webeco                      |
| Bidest-Gerät Destamat             | Heraeus                     |
| Brutschrank mit Schüttler         | GFL 3032                    |
| Cytospin 2                        | Shandon                     |
| Elektrophoreseapparaturen         | Pharmacia Biotech           |
| ELISA-Photometer                  | Dynatech MR5000             |
| Feinwaage                         | Sartorius                   |
| Heizblock                         | Techne Dri-Block            |
| Mikroskop                         | Olympus                     |
| Mikrowelle                        | Bosch                       |
| Peristaltikpumpe                  | Medap                       |
| pH-Meter mit Ingold-Elektrode 405 | Knick                       |
| Photometer                        | Beckmann, Pharmacia Biotech |
| Pipettierhilfe                    | Hirschmann                  |

---

|                                 |                   |
|---------------------------------|-------------------|
| PCR-Geräte                      | Eppendorf, Hybaid |
| Schüttler                       | Köttermann        |
| Sofortbildkamera                | Polaroid          |
| Transformatoren LKB-Gps 200/400 | Pharmacia         |
| Vakuumpzentrifuge               | Uniequip          |
| UV-Stratalinker 1800            | Stratagene        |
| Vortex                          | Bender & Hobein   |
| Wasserbad                       | B. Braun          |

Zentrifugen:

|                                            |         |
|--------------------------------------------|---------|
| Tischzentrifuge: Biofuge 13                | Heraeus |
| Sorvall-Zentrifuge mit Rotoren HS-4, SS-34 | Du Pont |

---

## **2.2. METHODEN**

### **2.2.1. Allgemeine Methoden**

#### **2.2.1.1. Sterilisierung von Lösungen und Nährmedien**

Alle Puffer und Lösungen wurden in doppelt destilliertem Wasser angesetzt und, wenn nötig, durch Autoklavieren 3 Stunden bei 2,7 bar oder durch Filtrieren sterilisiert (Sterilfilter 0,2 µm). Die pH-Werte wurden bei 23-25°C bestimmt. Prozentangaben sind als Gewicht pro Volumen zu verstehen.

#### **2.2.1.2. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA**

Zur Messung diente ein UV/VIS Spektrophotometer. Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Bei der DNA-Bestimmung entspricht eine Optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml und bei der RNA-Bestimmung 40 µg/ml. Zur Bestimmung der Reinheit einer Nukleinsäurelösung wird der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm gebildet. Dieser Quotient soll für RNA im Bereich von 1,8 - 2,0 und für DNA im Bereich von 1,6 - 1,8 liegen.

#### **2.2.1.3. Ethanol-Fällung von DNA**

##### TE-Puffer

Tris-HCl            10 mM

EDTA pH 8,0    1 mM

Die DNA-Fällung wird mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetatlösung und 2 Volumen kaltem abs. Ethanol 10 min bei 70°C durchgeführt. Die Sedimentation erfolgt in der Zentrifuge 30 min bei 13000 rpm und 4°C. Das Pellet wird mit kaltem 70% Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C). Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wird die DNA in TE-Puffer aufgenommen.

#### 2.2.1.4. Agarosegel-Elektrophorese

##### Ladepuffer:

Glycerin 40%  
Bromphenolblau 0,25%  
Xylencyanol 0,25%

##### 50 x TAE:

40 mM Tris-Base  
40 mM Essigsäure  
1 mM EDTA

In Agarosegelen können lineare DNA-Moleküle von etwa 0,1 bis 60 kb aufgetrennt werden, wenn die Agarosekonzentration entsprechend gewählt wird.

Hier werden 0,8 bis 2,0%-ige Agarosegele verwendet, je nach dem zu betrachtenden Längenbereich. Die entsprechende Menge Agarose wird in 1xTAE gelöst. Der TAE-Puffer wird zum Sichtbarmachen von mindestens 10 ng DNA pro Bande mit 0,5 µg Ethidiumbromid pro ml versetzt. Die Proben werden zum Absinken in die Taschen und zur besseren Kontrolle der Elektrophorese mit 1/5 bis 1/10 des Probenvolumens Ladepuffer gemischt. Die Elektrophorese wird mit 50 bis 120 V durchgeführt. Durch Interkalierung von Ethidiumbromid in die DNA kann diese sichtbar gemacht werden, da das Ethidiumbromid unter UV-Licht fluoresziert.

#### 2.2.1.5. Autoradiographie

Die Autoradiographie ist ein röntgentechnisches Abbildungsverfahren, mit dem Strahlungsquellen in Form radioaktiv markierter Moleküle nachgewiesen werden. Die markierten Verbindungen auf einer Hybridisierungsmembran senden Strahlen aus, die auf der Phosphoimage-Platte (Fuji Film, Base-MP 2040s) als Signale registriert werden. Diese Signale werden später mit einem Phosphoimager (Fuji) gescannt und quantifiziert. Die Expositionszeiten variierten zwischen einer Stunde und sieben Tagen bei Raumtemperatur. Alternative können die radioaktiven Moleküle auf Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

### 2.2.2. DNA-Techniken

#### 2.2.2.1. Klonierungstechniken

Restriktionen, Ligationen, Dephosphorylierungen und Transformationen von Bakterien wurden durchgeführt wie in entsprechenden Protokollen der Firmen beschrieben.

TA-Klonierung

Hier wurde die TA-Klonierung angewendet, um ein PCR-Produkt direkt in die „Multiple Cloning Site“ des Vektors pCR 2.1-TOPO zu klonieren (Shuman et al., 1994). PCR-Produkte tragen durch die Taq Polymerase ein einzelnes Adenosin an jedem 3'-Ende, daher wird für die Ligation ein Vektor verwendet, dem nach Linearisierung komplementäre Thymidine angehängt wurden. Die „Multiple Cloning Site“ des Vektors liegt im Sequenz-Bereich des LacZ-Gens, beeinträchtigt die Produktion der  $\beta$ -Galaktosidase jedoch nicht.  $\beta$ -Galaktosidase ist ein Enzym, das durch Spaltung X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) in das Produkt (5,5'-Dibrom-4,4'-dichloroindigo) umsetzt, welches blau gefärbt ist. Die Bakterien, die noch das komplette, nicht unterbrochene LacZ-Gen haben, können so als blaue Klone auf X-Gal-beschichteten Platten beobachtet werden. Im Gegensatz dazu werden weiße Klone gefunden, wenn ein Fragment in das LacZ-Gen des Vektors eingebaut wurde und daher keine  $\beta$ -Galactosidase mehr produziert werden konnte. Die weißen Kolonien werden dann genauer untersucht.

Bakterien-Transformation mit PCR-ProdukteSoc-Medium:

|        |             |       |                   |
|--------|-------------|-------|-------------------|
| 2%     | Trypton     | 10 mM | MgCl <sub>2</sub> |
| 0,5%   | Hefeextrakt | 10 mM | MgSO <sub>4</sub> |
| 10 mM  | NaCl        | 20 mM | Glucose           |
| 2,5 mM | KCl         |       |                   |

Es werden folgende Vorbereitungen getroffen:

- Herstellung eines frischen PCR-Produkts
- Einstellen des Wasserbades auf 42°C
- Anwärmen des Soc-Mediums auf Raumtemperatur
- Vorwärmen der LB-Platten (50  $\mu$ g Ampicillin/ml) bei 37°C
- Ausstrich von 40  $\mu$ l X-Gal (1,6 mg/ $\mu$ l) und 40  $\mu$ l IPTG (100  $\mu$ M) je Platte

Das PCR-Produkt wird mit dem PCR-TOPO-Vektor kurz vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wichtig ist, dass die Inkubationszeit nicht über 5 min hinausgeht, da die Transformationseffizienz sonst abnehmen kann. Zu den kompetenten Zellen (E.Coli, TOP10F'; Invitrogen) werden 2  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol gegeben und danach 2  $\mu$ l vom Ligationansatz. Die zu transformierenden Bakterien werden 30 min auf Eis inkubiert, bei

42°C für 30 s einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort wieder für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 ml Soc-Medium wird bei 37°C für 30 min inkubiert, anschließend auf den Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die weißen Kolonien werden weiter untersucht.

#### Vereinzelung von Bakterienklonen

Die Bakterienklone werden mit einer sterilen Impföse auf einer vorgewärmten ampicillinhaltigen Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden Einzelklone gepickt.

#### **2.2.2.2. Tet-On<sup>TM</sup>-Genexpressionssystem**

In E.coli ist das Gen für das Tetracyclin-Resistenz-Operon vom Tn10 Transposon negativ regulierbar durch den Tet-Repressor (TetR), der die Transkription durch Bindung an eine Tet-Operator-Sequenz (tetO) bei Anwesenheit von Tetracyclin blockiert (Hillen und Berens, 1994). Diese zwei Elemente, das TetR-Protein und die tetO-Regulationssequenz, liefern die Grundlage für Tet-Off- und Tet-On-Systeme.

Hier wird das Tet-On-System verwendet. Das Tet-On System ist dem Tet-off-System ähnlich (Gossen und Bujard, 1992), hat aber einen „reversen Tet-Repressor“ (rTetR), der sich in vier Aminosäuren vom TetR des Tet-Off-Systems unterscheidet (Hillen und Berens, 1994; Gossen und Bujard, 1995). Er wird als Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus exprimiert. Die mit dem Tet-On-Plasmid selektierten Klone werden später mit dem Plasmid pTRE, in dem das gewünschte Gen-Fragment eingebaut ist, und dem Plasmid pTK-Hyg kotransfiziert. Der reverse Repressor bindet in Anwesenheit des Tetracyclinderivates Doxycyclin an das in pTRE enthaltene „Tet responsive element“ (TRE), das aus sieben TetO-Sequenzen besteht. TRE befindet sich stromaufwärts zum Promotor P<sub>minCMV</sub>. Dieser CMV-Promotor ist mutationsbedingt nicht mehr konstitutiv aktiv. Durch Bindung des Fusionsproteins rTet-VP16 an TRE bei Doxycyclin-Zugabe kommt es zur Aktivierung von P<sub>minCMV</sub>. Anschließend kommt es zur Expression der eingebauten Fragment-Sequenz (Abb.7). Das Plasmid pTK-Hyg mit einer Hygromycin-Resistenz dient dann zur Selektion der doppelt-stabil transfizierten Zelllinie.

Mit diesem System hat man die Möglichkeit, die Expression eines gewünschten Gens zu regulieren (Gossen and Bujard., 1995). Es handelt sich um eine zweistufige Transfektion. Eine Zelllinie wird mit dem Tet-On-Plasmid transfiziert, dann werden Klone selektiert. Für die Selektion wird das Antibiotikum Geneticin (G418) verwendet. Die Klone werden auf

Induzierbarkeit des Promotors mit Doxycyclin in einem Luciferase-Experiment getestet. Dieser Teil des Experiments wurde von Dr. Eberle durchgeführt. Die mit dem Tet-On-Plasmid stabil transfizierte Zelllinie SK-Mel-13 wird anschließend mit dem Plasmid pTRE/Bcl-X<sub>L</sub>/X<sub>S</sub> und pTK-Hyg kotransfiziert. Für die Selektion dienen Geneticin (G-418) und Hygromycin. Eine schematische Darstellung des Tet-On-Systems wird in Abb. 7 gezeigt.

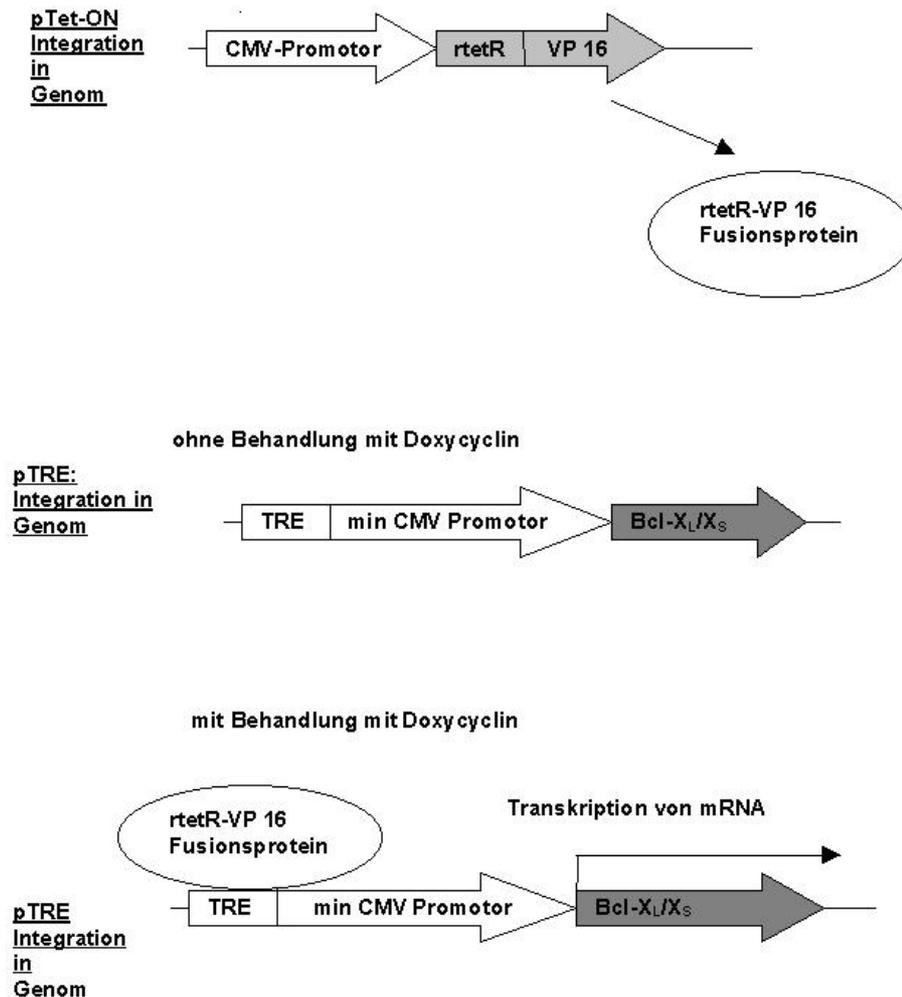


Abb. 7 : Schematische Darstellung des Zusammenspiels der beiden Plasmide (pTet-On-Plasmid, pTRE/ Bcl-X<sub>L</sub>/X<sub>S</sub>)

### 2.2.2.3. Restriktion

Die Plasmide oder DNA-Fragmenten wurden mit einem Überschuss an Enzymen verdaut. Es werden pro 1 µg DNA 5 bis 10 Units Enzym eingesetzt. Außerdem wird die Reaktion durch 1/10 Volumen 10x Reaktionspuffer auf Bedingungen eingestellt, bei denen die Enzyme eine hohe Aktivität besitzen. Der Ansatz wird bis zur vollständigen Verdauung bei 37°C im Wasserbad 1 bis 3 Stunden inkubiert. Bei Doppel-Verdauung mit 2 Enzymen wird der

Reaktionspuffer so gewählt, dass beide eine möglichst hohe Aktivität aufweisen. Gibt es diese Möglichkeit nicht, so wird die DNA zwischen den Reaktionen gefällt und gereinigt.

#### **2.2.2.4. Dephosphorylierung**

Alkalische Phosphatase wird verwendet, um die endständige 5'-Phosphat-Gruppe in einem linearen doppelsträngigen DNA-Molekül zu entfernen. Dephosphorylierung von DNA-Enden ist notwendig, wenn bei der Ligation eine Religation des Vektors mit sich selber verhindert werden soll. Ein pmol 5'-Enden und 1 Unit SAP werden in 20 µl Gesamtvolumen 10 min bei 37°C inkubiert. Nach der Reaktion wird zum Inaktivieren des Enzyms der Ansatz 15 min bei 65°C inkubiert.

#### **2.2.2.5. Ligation**

Ligation bezeichnet die Verknüpfung der kompatiblen Enden zweier Nukleinsäure-Moleküle mit Hilfe einer Ligase. DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe und einer im gleichen Strang eines doppelsträngigen DNA-Moleküls gegenüberliegenden freien 3'-Hydroxyl-Gruppe. Bei der Zirkularisierung oder Selbstligation handelt es sich um eine intramolekulare Ringschlußreaktion, bei der sich die beiden einzelsträngigen Enden eines linearen DNA-Moleküls zusammenlagern, sofern ihre Enden miteinander kompatibel sind. Einerseits ist die Zirkularisierungsreaktion erwünscht, da ein Klonierungsvektor nur als zirkuläres Molekül in der Zelle biologisch aktiv ist. Da bei der Klonierung jedoch lineare, zur Aufnahme der Fremd-DNA vorbereitete Vektor-DNA und lineare DNA-Fragmente miteinander verknüpft werden sollen, muss die Selbstzirkularisierung des Vektors ohne Einbau des zu klonierenden DNA-Fragments vermieden werden. Ebenfalls unerwünscht ist die Concatemerisierung oder Oligomerisierung, d.h. die Ausbildung von Dimeren und anderen Multimeren eines DNA-Moleküls. Zur Unterdrückung der unerwünschten Reaktionen gibt es mehrere Strategien. Die Längen der zu ligierenden DNA-Moleküle und die Konzentration der freien Enden in einem Reaktionsansatz bestimmen primär, ob überwiegend intermolekulare oder intramolekulare Reaktionen ablaufen. Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einer intramolekularen Rezirkularisierung kommt. Durch die Erhöhung der Gesamtkonzentration von freien Enden werden z.B. bimolekulare Reaktionen wahrscheinlicher, während eine Verdünnung zu einer Bevorzugung monomolekularer Reaktionen, z.B. zum Ringschluß eines linearisierten Moleküls führt (Weiss et al., 1968).

Bei der Ligationsreaktion wird das gewünschte DNA-Fragment in den passenden Vektor eingebaut. Um eine optimale Ligationsreaktion zwischen zu insertierendem Fragment und Vektor zu erreichen, sollte das Insert in etwa dreifach molarem Überschuss vorliegen. Die Effizienz der Ligation ist bei DNA-Fragmenten mit glatten Enden geringer als bei Fragmenten mit überhängenden Enden.

5 x T4 DNA Ligase Puffer:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Tris-HCl (pH7,6)                 | 250 mM |
| MgCl <sub>2</sub>                | 50 mM  |
| ATP                              | 5 mM   |
| DTT                              | 5 mM   |
| 25% (w/v) Polyethylenglycol-8000 |        |

Ligationsreaktionen wurden nach dem Protokoll von Gibco BRL durchgeführt.

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Insertion       | 3 pmol |
| Vektor          | 1 pmol |
| T4 DNA Ligase   | 0.5 U  |
| 5x Ligasepuffer | 4 µl   |
| ad. bidest      | 20 µl  |

Die Ligationsansätze wurden bei 12-14°C über Nacht inkubiert. Als Kontrolle wurde parallel dazu ein Reaktionsansatz ohne Insert-DNA angesetzt. Ein Teil des Reaktionsansatzes wurde zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. 2 bis 3 µl vom Reaktionsansatz wurden zur Transformation verwendet.

### **2.2.2.6. Transformation kompetenter Bakterien-Zellen**

Zur Vervielfältigung wird das gewünschte Plasmid in kompetente Bakterien (E.coli) gebracht, die dann nach Ampicillinresistenz selektiert werden.

LB-Lösung:

1% (w/v) Trypton

0,5% (w/v) Hefe-Extrakt

0,5% (w/v) Natriumchlorid

LB Agar:

1% (w/v) Trypton

0,5%(w/v) Hefe-Extrakt

0,5% (w/v) Natriumchlorid

1,5% (w/v) Agar

Ampicillin: 100 µg/ml

50 µl der kompetenten Zellen werden in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß auf Eis gestellt. Zu diesen werden 1-3 µl (1-10 ng) Ligationsansatz gegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellen werden auf Eis für 30 min inkubiert, danach einem Hitze-Schock (37°C) für 20 s ausgesetzt. Anschließend wird 2 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation werden bei Raumtemperatur 0,95 ml LB-Medium dazugegeben und die Zellen eine Stunde bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. In dieser Zeit können die Bakterien das Gen für die Ampicillinresistenz exprimieren. Von diesem Ansatz werden 10 µl, 50 µl und 200 µl auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Außerdem werden folgende Kontrollen mitgeführt:

- a. Kompetente Zellen ohne DNA
- b. Kompetente Zellen mit 500 pg Vektor pUC19

**2.2.2.7. β-Galaktosidase-Test**

Das native Enzym β-D-Galaktosid-Galacto-Hydrolase besteht aus vier gleichen Untereinheiten zu je 1021 Aminosäuren und spaltet β-D-Galaktosidase in Galactose und die entsprechende Alkohol-Verbindung. Das physiologisch wichtigste Substrat ist Lactose. Sie wird durch das Enzym in die beiden Monosacharide Galactose und Glucose hydrolysiert. Das künstliche Substrat X-Gal bildet nach der Hydrolyse ein farbiges Reaktionsprodukt und erlaubt die *in vivo*-Anfärbung von Bakterienkolonien. Der Nachweis ist so empfindlich, dass ca. ein Molekül des Enzyms pro Zelle nachgewiesen werden kann.

### 2.2.2.8. Plasmid-Minipräparation

Die Klone werden mit Zahnstochern in je 2 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert (maximal 18 Stunden). Die Plasmid-DNA wird mit einem Kit von Qiagen gewonnen, der die vorgefertigten Puffer P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> und P<sub>3</sub> enthält (siehe unten).

Je 1 ml über-Nacht-Kultur (in einem Eppendorfgefäß) werden bei 13000 rpm 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 150 µl P<sub>1</sub> resuspendiert, dann werden 150 µl P<sub>2</sub> dazugegeben, invertiert (nicht vortexen) und 4 min bei Raumtemperatur (24-25°C) inkubiert. Mit 150 µl P<sub>3</sub> wird neutralisiert: 4 min bei Raumtemperatur und gelegentlich invertiert. Danach wird 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 5 min wie oben zentrifugiert. Nach Zugabe von 1 ml abs. Ethanol (-20°C) wird 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70% Ethanol zweimal gewaschen und 3-5 min in der Vakumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wird in 20 µl TE aufgenommen, davon werden 1 µl (0,1-0,2 µg) für den Kontroll-Restriktionsverdau eingesetzt.

### 2.2.2.9. Plasmid-Midipräparation

(nach dem Protokoll der Firma Qiagen)

Bakterienklone werden in 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angesetzt und über Nacht bei 37°C und 220 rpm geschüttelt.

Die Bakterien-Pellets werden in jeweils 4 ml Puffer P<sub>1</sub> aufgenommen und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann 4 min mit Puffer P<sub>2</sub> ebenfalls bei Raumtemperatur und nach Zusatz von P<sub>3</sub> 30 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze werden mit 6500 rpm bei 4°C 40 min zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine vorher mit QBT-Puffer äquilibrierte Säule gegeben, und nach Waschen mit Puffer QC wird mit QF-Puffer die Plasmid-DNA eluiert. Das Eluat wird mit 0,7 Vol. Isopropanol mit 13.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Es wird dann zweimal mit 2 ml kaltem 70%igen Ethanol gewaschen und in 200 µl TE aufgenommen.

#### Puffer:

##### Resuspensionspuffer (Puffer P1)

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| Tris-HCl (pH 8,5) | 50 mM     |
| EDTA              | 10 mM     |
| RNase             | 100 µg/ml |

Lysepuffer (Puffer P2)

|      |        |
|------|--------|
| NaOH | 200 mM |
| SDS  | 1%     |

Neutralisationspuffer (Puffer P3)

|              |       |
|--------------|-------|
| KOAc (pH5,5) | 3,0 M |
|--------------|-------|

Elutionspuffer (Puffer QF)

|                  |        |
|------------------|--------|
| Tris-HCl (pH8,5) | 50 mM  |
| NaCl             | 1,25 M |
| Ethanol          | 15%    |

Äquilibrierungspuffer (Puffer QBT)

|              |        |
|--------------|--------|
| NaCl (pH7,0) | 750 mM |
| MOPS         | 50 mM  |
| Ethanol      | 15%    |
| Triton X-100 | 0,15%  |

Waschpuffer (Puffer QC)

|              |       |
|--------------|-------|
| NaCl (pH7,0) | 1,0 M |
| MOPS         | 50 mM |
| Ethanol      | 15%   |

TE-Puffer

|             |      |
|-------------|------|
| Tris-HCl    | 10mM |
| EDTA pH 8,0 | 1 mM |

**2.2.2.10. Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten**

(nach dem Protokoll von der Firma GENOMED)

Jetsorb Suspension

Lösung A<sub>1</sub>: NaClO<sub>4</sub>, TBE-Solubilizer, Natriumacetat

Lösung A<sub>2</sub>: Ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel werden die Ethidiumbromid-gefärbten Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und die gewünschten DNA-Banden mit einem

Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Das Jetsorb-Material wird durch 1 min Vortexen gut resuspendiert. 300  $\mu$ l Lösung A<sub>1</sub> (pro 100 mg Gel) und 10  $\mu$ l Jetsorb-Suspension (pro 7,5  $\mu$ g DNA) werden zu dem ausgeschnittenen Gel-Stück gegeben und bei 50°C 15 min inkubiert. Anschließend wird die Mischung 1 min bei RT und 13.000 rpm abzentrifugiert. Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt. Das Pellet wird in einem weiteren Schritt zweimal mit Lösung A<sub>2</sub> gewaschen. Es wird 1-3 min in der Vakumzentrifuge getrocknet und danach die DNA mit 20  $\mu$ l TE-Puffer 5 min bei 50°C eluiert. Nach 1 min Abzentrifugieren bei 13.000 rpm wird der DNA-haltige Überstand in ein neues Eppendorfgesäß überführt.

### 2.2.2.11. Sequenzierung der DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Sanger-(Didesoxy-)Methode durchgeführt (ABI PRISM, Applied Biosystem).

Diese Methode basiert auf dem Mechanismus der DNA-Synthese durch DNA-Polymerasen. DNA-Polymerasen benötigen sowohl einen Primer, an den Nukleotide addiert werden, als auch einen Matrizenstrang, der die Auswahl der neuen Nukleotide steuert. Die 3'-Hydroxygruppe am Primer reagiert mit dem neu hinzukommenden Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) unter Bildung einer neuen Phosphodiesterbindung. Beim Sanger-Sequenzierungsverfahren werden Didesoxynukleosidtriphosphat-(ddNTP) Analoga eingesetzt, um die DNA-Synthese zu unterbrechen. Ersetzt man dNTP durch ddNTP, wird die Strangverlängerung nach der Addition des Analogons abgebrochen, da ihm die für den nächsten Schritt erforderliche 3'-Hydroxygruppe fehlt. Die zu sequenzierende DNA dient als Matrizenstrang, und ein kurzer Primer wird daran angelagert. Durch den Zusatz von kleinen Mengen eines einzelnen ddNTP, z.B. ddCTP, zu einem Reaktionssystem kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch der synthetisierten Stränge an Stellen, wo normalerweise dC vorkommt. Da wesentlich mehr dCTP vorhanden ist als ddCTP, ist die Wahrscheinlichkeit, dass statt dC das Analogon eingebaut wird, bei jedem einzelnen dC relativ gering.

Die kurzen Oligonukleotide, die bei der Sanger-Methode als Primer für die DNA-Synthese verwendet werden, können durch ein fluoreszierendes Molekül markiert werden, das dem DNA-Strang eine bestimmte Farbe verleiht. Wählt man für jedes Nukleotid eine andere Farbe, kann das am Ende eines Fragments liegende Nukleotid jeweils anhand der Farbe identifiziert werden. Man wendet die Didesoxy-Methode an, wobei man in jedes der vier Reagenzgläser, den verschiedenen Farbuordnungen entsprechende ddNTP gibt. Die erhaltenen gefärbten DNA-Fragmente werden zusammen elektrophoretisch auf einer Gelspur der Größe nach getrennt.

Alle Fragmente einer gegebenen Länge wandern innerhalb eines einzigen Peaks durch das Gel, mit Hilfe eines Laserstrahls wird die Farbe jedes der aufeinanderfolgenden Peaks festgestellt. Die DNA-Sequenz wird abgelesen, indem die Farbsequenz der den Detektor passierenden Peaks bestimmt wird.

#### PCR Programm:

| <u>Zyklen</u> | <u>Temperatur</u> | <u>Zeit</u> |
|---------------|-------------------|-------------|
| 1x            | 94°C              | 2 min       |
| 16x           | 94°C              | 30 s        |
| 16x           | 50°C              | 30 s        |
| 16x           | 64°C              | 4 min       |

Für die Sequenzierung wird die DNA mittels PCR unter Verwendung eines mit Farbstoff markierten Primers vervielfältigt. Nach der Amplifikation wird die DNA gefällt, um störenden Salze zu entfernen. 80 µl bidest. H<sub>2</sub>O und 10 µl 3 M Na-Acetat werden zur Probe gegeben, danach 250 µl 100% Ethanol. 15 min wird bei 15.000 rpm zentrifugiert, vorsichtig der Überstand abgesaugt, mit weiteren 250 µl 70% Ethanol gewaschen und bei 15.000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wird das Pellet in der Speed-vac getrocknet, in 4 µl Formamid / 25 mM EDTA pH 8,0 (5:1) aufgenommen und 2 min auf 90°C erhitzt. Anschließend wird die Probe auf Eis heruntergekühlt, 2 µl davon werden in der Sequenzierapparatur auf ein 6%iges Polyacrylamidgel/7M Harnstoff aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

### **2.2.3. RNA-Techniken**

#### **2.2.3.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen**

(Nach dem Protokoll der Firma Qiagen)

Die Zellen werden bei einer Konfluenz von 60-80% geerntet, das Pellet eingefroren und später verarbeitet.

Die folgenden Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt: Der Lyse-Puffer RLT wird mit 10 µl β-Mercaptoethanol / 1ml Lyse-Puffer versetzt (haltbar bis zu einem Monat). RPE-Puffer wird mit 4 Volumen abs. Ethanol versetzt.  $5 \times 10^6$  Zellen werden mit 350 µl Lyse-Puffer auf Eis 3-5 min inkubiert. Das Lysat wird überführt auf eine „Qiashredder-Säule“ (Qiagen) und in ein 2 ml-Röhrchen abzentrifugiert (2 min bei 13.000 rpm). 350 µl 70%

Ethanol werden zum Überstand gegeben, dieser in eine RNeasy Spin Säule in einem 2 ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert 1 min bei 10.000 rpm. Der Durchfluß wird verworfen. Die Säule wird mit RW1-Puffer einmal gewaschen (1 min bei 13.000 rpm) und auf einem neuen 2 ml-Röhrchen mit 500 µl RPE-Puffer 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird 2 min bis zum Trocknen abzentrifugiert. Die Säule wird auf ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß gesetzt, die RNA mit 50 µl RNase freiem Wasser eluiert (1 min bei 13.000 rpm).

### 2.2.3.2. Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Unter reverser Transkription (RT) versteht man die Umschreibung von einzelsträngiger komplementäre DNA in cDNA als Matrixe. Anschließend kann man mittels PCR die Expression eines bestimmten Gens nachweisen. Hier wurde die RT-PCR mit SUPER SCRIPT™ II (GIBCO) durchgeführt.

|                            |                                 |
|----------------------------|---------------------------------|
| Super Script II            | 200U/µl                         |
| 5x First Strand RT-Buffer: |                                 |
| Tris-HCl pH 8,3            | 250 mM                          |
| KCl                        | 375 mM                          |
| MgCl <sub>2</sub>          | 15 mM                           |
| DTT                        | 0,1 M                           |
| Rnasin                     | 16,5 U/µl                       |
| Random-Primer (Hexamere)   | 60 ng/µl                        |
| dNTP Mix                   | je 10 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP |

Die RNA-Proben werden in einem Verhältnis von 1:1 mit den *random*-Primern für 10 min bei 70°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Nach kurzer Zentrifugation wird 10 min weiter bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von RT-Puffer werden die Proben 2 min bei 42°C im Wasserbad und anschließend mit reverser Transkriptase 50 min bei 42°C inkubiert. Das Enzym wird danach 15 min bei 70°C inaktiviert. Um zu bestätigen, dass die Umschreibung von RNA in cDNA geschehen ist, wird parallel eine PCR mit β-Aktin durchgeführt.

### Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (Mullis und Faloona, 1987) ist eine *in vitro*-Technik, die die selektive Vermehrung von DNA-Abschnitten mit definierter Länge und Sequenz aus einem Nukleinsäuregemisch

ermöglicht. Durch Auswahl zweier synthetischer Oligonukleotide (Primer), die komplementär zum jeweiligen DNA-Strang sind, kann man gezielt den zu untersuchenden DNA-Bereich vervielfältigen. Vor Beginn der PCR wird die Matrizen-DNA 5 min bei 94°C denaturiert, damit sich die Primer beim langsamen Abkühlen anheften können. Als nächstes wird die Temperatur auf die vorher ermittelte Anheftungstemperatur abgesenkt. Die DNA-Sequenzen werden von der Taq-Polymerase an die Primer anknüpfend verlängert (Vosberg, 1989). Bei der Amplifikation werden in der Regel 25-35 Zyklen durchlaufen. Viele Faktoren beeinflussen die Effektivität und Spezifität der PCR. Man erhält gute Ausbeuten, indem man die PCR-Bedingungen für den jeweiligen Ansatz optimiert. Dies gilt sowohl für die Konzentrationen der Matrizen-DNA, der Primer, der dNTPs als auch für die  $Mg^{2+}$ -Konzentration, die Qualität der Matrizen-DNA und die Puffer-Bedingungen.

#### PCR-Programm für bcl-X

|               | Temperatur | Zeit     | Zyklus |
|---------------|------------|----------|--------|
|               | 92°C       | 1 min    | 1x     |
| Denaturierung | 92°C       | 1,25 min | 35x    |
| Annealing     | 56°C       | 2 min    | 35x    |
| Amplifikation | 72°C       | 3 min    | 35x    |
| Extension     | 72°C       | 7 min    | 1x     |

#### PCR-Program für $\beta$ -Aktin

|               | Temperatur | Zeit  | Zyklus |
|---------------|------------|-------|--------|
|               | 92°C       | 1 min | 1x     |
| Denaturierung | 92°C       | 1 min | 35x    |
| Annealing     | 67°C       | 1 min | 35x    |
| Amplifikation | 72°C       | 3 min | 35x    |
| Extension     | 72°C       | 4 min | 1x     |

### 2.2.3.3. Northern Blot

Bei dieser Methode wird RNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus der Gelmatrix eines Trenngels auf eine geeignete Trägerschicht aus Zellulose oder Nylon übertragen und dort immobilisiert. Das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster der Moleküle bleibt nach der Übertragung erhalten, so dass man eine exakte Replik des Gels erhält. Die Technik verbindet das hohe Auflösungsvermögen der Gelelektrophorese mit der Möglichkeit, getrennte RNA-Moleküle nach Übertragung auf eine Membran weiter zu analysieren. Der Name der Technik leitet sich vom Namen des Erfinders des DNA-Blots, Edwin Southern ab. Die RNA wird vor dem Transfer entweder in Methyl-Quecksilber-, Glyoxal-, Formaldehyd-, Harnstoff-Gelen, oder unter alkalischen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, wobei es zu einer vollständigen Denaturierung der RNA kommt. Ein Vorteil der alkalischen Gele ist zugleich, dass es bei größeren RNA-Molekülen zu einer partiellen Hydrolyse kommt, so dass die kleineren RNA-Fragmente leichter auf die Träger-Matrix transferiert werden können. Die Northern-Blot-Technik erlaubt nicht nur auf einfache Weise eine qualitative und quantitative Bestimmung einzelner RNA-Moleküle in RNA-Gemischen, sondern auch deren Identifikation. Als Molekulargewichtsstandards werden in der Regel verschiedene RNAs bekannter Molmasse eingesetzt, so dass sich durch Vergleich die Molmasse einer durch Hybridisierung nachgewiesenen RNA bestimmen lässt. Der Nachweis spezifischer RNA-Moleküle erfolgt durch Hybridisierung mit einer geeigneten radioaktiv markierten Gensonde, z.B. einer zur RNA komplementären DNA. Auf diese Weise lässt sich nachweisen, ob eine Zellpopulation bestimmte RNA-Sequenzen exprimiert. Sie werden nach Autoradiographie der Hybridisierungsmembran als Bande auf einem Röntgenfilm sichtbar.

#### RNA-Denaturierung

##### Ladepuffer:

|                              |                           |
|------------------------------|---------------------------|
| Formaldehyd                  | 2,3 µl                    |
| Formamid                     | 6,7 µl                    |
| GLB (Gel Loading Buffer) RNA | 1,26 µl (sterilfiltriert) |
| Ethidiumbromid               | 0,1 µl                    |
| 10x MOPS                     | 0,75 µl                   |
| Bidest. H <sub>2</sub> O     | 3 µl                      |

Die RNA-Proben (je 20 µg) werden in der Vakuumzentrifuge eingeeengt und die Pellets in Ladepuffer gelöst. Sie werden bei 90°C für 2 min denaturiert und sofort auf Eis gestellt.

### Formaldehyd-Agarosegel

#### 10x MOPS Puffer (pH 7,0)

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| MOPS                     | 41,2 g     |
| NaOAC (3 M)              | 26,6 ml    |
| EDTA (0,5 M)             | 20 ml      |
| Bidest. H <sub>2</sub> O | ad 1000 ml |

Der Puffer wird autoklaviert, in Alufolie eingewickelt und anschließend bei 4°C gelagert.

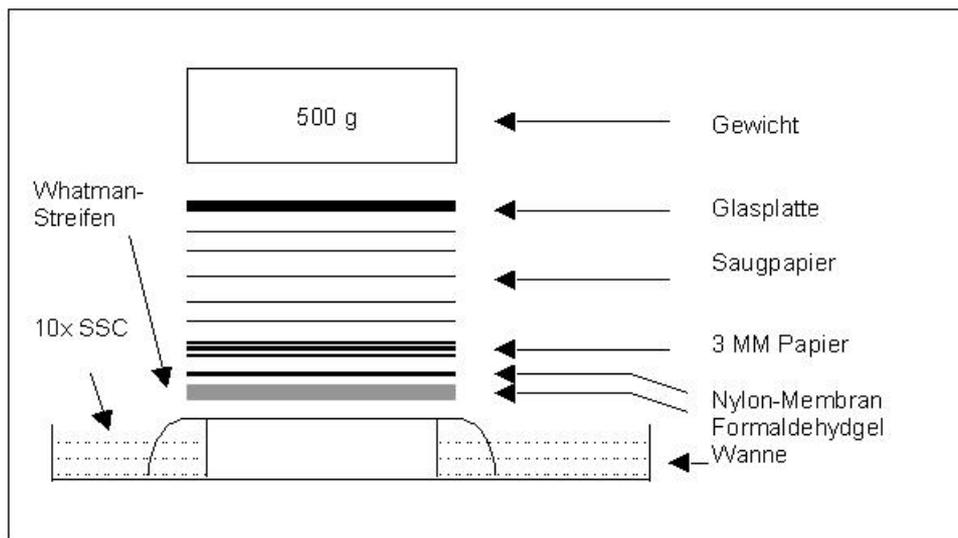
#### Gellösung:

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| Agarose (1,2%)           | 3,6 g    |
| Formaldehyd              | 53 ml    |
| 10x Mops                 | 29,2 ml  |
| Bidest. H <sub>2</sub> O | 218,2 ml |

Für einen 20 x 18,5 cm<sup>2</sup> großen Gelträger werden 300 ml 1,2% Agaroselösung benötigt, die in autoklaviertem bidest. H<sub>2</sub>O aufgekocht werden. Zu der Lösung werden unter dem Abzug Formaldehyd und 10 x MOPS gegeben. Das Gel wird in den Gelträger gegossen und polymerisiert in 30 min aus. Nach 5-minütigem Leerlauf bei 150 V werden die RNA-Proben aufgetragen und bei Raumtemperatur mit 130 Volt Spannung in 3-4 Stunden aufgetrennt. Das Gel wird unter UV-Licht photographiert.

### Northern-Transfer

Das Transferieren geschieht durch Kapillarkräfte vom Gel zur darüber liegenden Membran. Das Gel wird unter Schütteln in 50 mM NaOH 30 min inkubiert, damit größere RNAs durch partielle Hydrolyse besser auf die Membran transferierbar werden. Nach der alkalischen Hydrolyse wird das Gel zweimal mit bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen und 20 min in 20 x SSC inkubiert. Das Gel wird mit der glatten Seite auf den vorher mit 3 MM Filterpapier bedeckten Gelträger in 20 x SSC gelegt und, wenn nötig, werden die entstandenen Luftblasen mit einer sauberen Pipette entfernt. Eine zurechtgeschnittene Nylonmembran (Genescreen Plus) wird kurz in Bidest getaucht und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Es kommen dann 3 zurechtgeschnittene 3 MM Filterpapiere und Saugpapiere darauf. Anschließend wird ca. 500 g Gewicht auf das Saugpapier gelegt. Der Aufbau ist in Abb. 8 dargestellt. Der Blot läuft über Nacht.



**Abb. 8 Transfer-Turm für Northern**

Am folgenden Tag wird der Turm abgebaut und die Nylonmembran kurz in 1x SSC gewaschen. Die Nylonmembran wird anschließend an der Luft getrocknet, die RNA in einem UV-Crosslinker mit hochenergetischer UV-Bestrahlung oder im Ofen bei 60°C an der Membran fixiert. Zur Bestätigung des Transfers wird die Membran fotografiert.

Lösungen:

50 mM NaOH

Autoklaviertes bidest. H<sub>2</sub>O

20x SSC Puffer (pH 7,0)

Natriumcitrat 176,4 g

NaCl 350,6 g

Bidest ad 2000 ml

Alle Lösungen und Gefäße werden autoklaviert und alle Arbeiten unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

Hybridisierung

(Gene Screen Protokoll)

Diese Methode eignet sich für die Analyse der mRNA (Northern Blot) oder DNA (Southern Blot) eines Gens.

Herstellung von radioaktiven DNA-Sonden

Random-Primer-Markierung :

Reaktionsmix für 1 Ansatz:

|                                         |        |
|-----------------------------------------|--------|
| Primer/Puffer                           | 3 µl   |
| dATP, dTTP, dGTP (je 100 mM)            | 1,2 µl |
| $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10 µCi/µl) | 1 µl   |
| Klenow-Enzym (5 U/µl)                   | 0,2 µl |

Es werden ca. 10 ng eines Fragments mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 4,6 µl Volumen gebracht, 5 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert, kurz zentrifugiert und sofort auf Eis gestellt. Dann werden 5,4 µl Reaktionsmix dazugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Säulenchromatographische Reinigung der Sonden

Die Säule wird mit 10 mM TE-Puffer äquilibriert. Die Probe wird mit dem Puffer auf 100 µl Volumen gebracht, auf die Säule gegeben und mit 400 µl Puffer einlaufen gelassen. Anschließend wird mit 1 ml Puffer eluiert. Die Einbaurate wird bestimmt, indem ein Aliquot vor und nach der Reinigung im Szintillationszähler gemessen wird.

PrähybridisierungHybridisierungslösung

|                   |                            |
|-------------------|----------------------------|
| 10% Dextransulfat | 5 g                        |
| SDS (1%)          | 5 ml (10%)                 |
| NaCl (1 M)        | 10 ml (3 M)                |
| Bidest            | ad 50 ml (Lösen mit Wärme) |

Die Hybridisierungs-Röhrchen werden mit Bidest gefüllt und die eingerollte Membran hineingelegt. Es ist wichtig, dass die Membran luftblasenfrei an der Glaswand anliegt. Die Membran wird in Hybridisierungs-Lösung für 3 Stunden bei 60°C im Rotationsofen inkubiert. Für die weitere und bessere Blockierung der unspezifischen Stellen wird die Membran dann mit denaturierter Lachssperma-DNA (10 mg/ml) inkubiert.

#### Hybridisierungssonde

Die Sonde wird 5 min bei 100°C denaturiert und in die Hybridisierungslösung pipettiert. Die Hybridisierung wird über Nacht bei 60°C unter Rotation im Inkubator durchgeführt.

#### Waschen der Hybridisierungsmembran

Waschpuffer:

##### Lösung 1: (2xSSC )

|         |            |
|---------|------------|
| 20xSSC  | 200 ml     |
| Bidest. | ad 2000 ml |

##### Lösung 2: (2xSSC,1% SDS )

|         |            |
|---------|------------|
| 20x SSC | 100 ml     |
| 10%SDS  | 100 ml     |
| Bidest. | ad 1000 ml |

##### Lösung 3: (0,1xSSC)

|        |           |
|--------|-----------|
| 20xSSC | 2,5 ml    |
| Bidest | ad 500 ml |

Die Hybridisierungslösung wird entfernt. Die Membran wird 3 x mit Lsg. (1) für 3-5 min bei Raumtemperatur in der Hybridisierungsröhre und anschließend noch 2 x in einer Schale unter Bewegung gewaschen. Lsg. (2) wird im Wasserbad auf 60°C vorgewärmt. Die Membran wird dann in Lsg (2) für eine Stunde inkubiert. Zuletzt wird 30 min in Lsg (3) bei Raumtemperatur unter Bewegung inkubiert. Nach kurzem Waschen in Bidest wird die Membran in Folie wasserdicht und luftblasenfrei verpackt, in einer Kassette mit einer Imaging-Platte bei Raumtemperatur exponiert. Die Imaging-Platte wird anschließend mit dem Phosphoimager quantifiziert.

### Rehybridisierung von Membranen (Stripping)

Waschlösung:    1%    SDS  
                      0.1x    SSC

Die feuchte Membran wird bei 90°C in der Waschlösung für 30 min gekocht und kurz mit Bidest gewaschen. Zur Kontrolle wird die „gestrippte“ Membran für 1-4 Stunden auf der Phosphoimaging-Platte exponiert.

## **2.2.4. Techniken zur Proteinanalytik**

### **2.2.4.1. Herstellung von Zellysaten**

#### Lysepuffer:

|                   |                    |
|-------------------|--------------------|
| 50 mM Tris pH 7,6 | Frisch dazu:       |
| 150 mM NaCl       | 5 µg/ml Pepstatin  |
| 1% Nonidet P-40   | 1 mM PMSF          |
| 10% Glycerin      | 10 µg/ml Leupeptin |
| 0,2% SDS          | 10 µg/ml Trasylol  |

Die Sedimente eukaryotischer Zellen werden langsam auf Eis aufgetaut. Je  $3 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen werden in 100-500 µl kaltem Lysepuffer mit 1 ml Spritzen geschert, 10 min mit höchster Umdrehung pro min in der Eppendorf-Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert und die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die weißlichen Rückstände bestehen hauptsächlich aus DNA und Membranresten, die bei der SDS-PAGE stören würden. Die Lysate werden bei -20°C gelagert.

#### Mitochondrien / Zytosol Fraktionierungskit (Alexis)

Folgendes ist im Kit enthalten:

Puffer A: 5x Zytosol-Extraktionspuffer

Puffer B: Mitochondrien-Extraktionspuffer

DTT (1 M)

Protease-Inhibitor Cocktail

Zur Bestimmung der Cytochrom C- und AIF-Freisetzung werden jeweils  $5 \times 10^7$  Zellen geerntet, mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und bei 600g, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml (1x) Puffer A resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden in einem

1ml-Glashomogenisator (Douncer) mit 50 Stößen homogenisiert. Das Homogenisat wird mit 700 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um Zellkerne zu entfernen. Der Überstand wird zur Sedimentierung der Mitochondrien mit 10000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand entspricht der zytosolischen Fraktion, das Pellet wird dann in 100 µl Puffer B resuspendiert und bei -20°C gelagert (Mitochondrien-Fraktion). Puffer A und B enthalten pro ml jeweils 2 µl Protease-Inhibitor und 1 µl DTT. Es werden beide Fraktionen in einen 15%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Freisetzung der proapoptotischen Proteine wird mittels Immunoblot-Analyse mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen Cytochrom C und einem monoklonalen Ziege-Antikörper gegen AIF bestimmt.

#### **2.2.4.2. Harnstoff-Puffer zum Nachweis von PARP:**

|          |                   |
|----------|-------------------|
| 62,5 mM  | Tris-HCl pH 6,8   |
| 6 M      | Harnstoff         |
| 10%      | Glycerol          |
| 2%       | SDS               |
| 0,00125% | Bromphenolblau    |
| 5%       | β-Mercaptoethanol |

#### **2.2.4.3. CHAPS-Puffer zum Nachweis von Caspasen:**

|          |                  |
|----------|------------------|
| 50mM     | Pipes/HCL PH 6,5 |
| 2 mM     | EDTA             |
| 0,1%     | Chaps            |
| 20 µg/ml | Leupeptin        |
| 10 µg/ml | Pepstatin A      |
| 10 µg/ml | Aprotinin        |
| 5 mM     | DTT              |
| 1 mM     | PMSF             |

Hier wurde speziell für PARP und sein Spaltprodukt ein Harnstoff-Puffer sowie für die Caspasen ein CHAPS-Puffer verwendet. Der Harnstoff-Puffer unterstützt die Dissoziation von PARP und DNA, der CHAPS-Puffer stabilisiert die Spaltprodukte der Caspasen.

Ca. 4 Millionen Zellen werden in 1 ml Harnstoff-Puffer lysiert und danach 15 Sekunden sonifiziert, um die DNA zu zerstören. Nach 15 min Inkubation bei 65°C werden die Proben in einem 7.5% SDS Gel aufgetrennt.

Für die Caspasen-Proteine werden etwa 2 Millionen Zellen in 200 µl CHAPS-Puffer 5 min auf Eis inkubiert, und dreimal hintereinander bei -70°C eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Nach 15 min Zentrifugation bei 13000 rpm wird der Überstand vom Zellpellet getrennt und bei -20°C gelagert. Da hier eine Protein-Bestimmung nicht möglich ist, werden jeweils gleiche Volumina (entsprechend gleicher Zellzahl) auf das Gel aufgetragen.

#### **2.2.4.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die Konzentration von Proteinen kann durch eine Farbreaktion in Lösung photometrisch bestimmt werden. Die Proteinbestimmung wird mit dem BCA-Protein-Assay-Reagent der Firma Pierce durchgeführt. Dazu werden je 10 µl Lysat zur Dreifachbestimmung bzw. Lysepuffer (zur Kontrolle 3x) in einer Mikrotiterplatte mit Flachboden vorgelegt. Als Eichlösungen dienen verschiedene BSA-Konzentrationen im gleichen Puffer. Je Probe werden 196 µl Reagent A und 4 µl Reagent B gemischt und dazugegeben. Die Platte wird 30 min bei 37°C inkubiert und bei 550 nm im ELISA-Reader vermessen. Mit Hilfe der bekannten Konzentrationen an BSA können die Proteinmengen der Lysate errechnet werden.

#### **2.2.4.5. Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli**

Durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese können denaturierte Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Lämmli, 1970). Dabei wandern die denaturierten, durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zum Pluspol, anfangs in einem Sammelgel zur Fokussierung der Banden und anschließend in einem Trenngel. Durch Molekulargewichtsstandards kann die Größe der Proteine bestimmt werden.

##### Laufpuffer nach Lämmli

192 mM Glycin

25 mM Tris

0,1% SDS

##### 4 x Probenpuffer

40% Glycerin

12% β-Mercaptoethanol

4% Bromphenolblau

0,8% SDS

|                                |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|
| <u>Trenngel-Puffer:</u> 500 ml | <u>Sammelgel-Puffer:</u> 500 ml |
| 0,64 M Tris-Base 38,5 g        | 0,33 M Tris-Base 19,7 g         |
| 0,12 M Tris-HCl 9,3 g          | 0,2% SDS 1,0 g                  |
| 0,2% SDS 1,0 g                 | pH auf 6,8                      |
| pH auf 8,8                     |                                 |

|                                | <u>5% Sammelgel (5 ml)</u>   | <u>12% Trenngel (10 ml)</u> |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 30% Acryl-/Bisacrylamid 37,5:1 | 800 µl                       | 4 ml                        |
| Sammelgel-Puffer               | 2,5 ml                       | -                           |
| Trenngel-Puffer                | -                            | 5 ml                        |
| Bidest. Wasser                 | 1,7 ml                       | 890 µl                      |
| 10% Ammoniumpersulfat          | 100 µl                       | 100 µl                      |
| TEMED                          | 10 µl                        | 10 µl                       |
|                                | <u>7,5% Trenngel (10 ml)</u> | <u>15% Trenngel (10 ml)</u> |
| 30% Acryl-/Bisacrylamid 37,5:1 | 2,5 ml                       | 5 ml                        |
| Trenngel-Puffer                | 5 ml                         | 5 ml                        |
| Bidest Wasser                  | 2,5 ml                       | -                           |
| 10% Ammoniumpersulfat          | 100 µl                       | 100 µl                      |
| TEMED                          | 10 µl                        | 10 µl                       |

Die SDS-Gele werden mit dem Elektrophoresesystem für Minigele der Firma BioRad hergestellt. TEMED und 10% Ammoniumpersulfat werden erst kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben. Zuerst wird das Trenngel bis ca. 1 cm unterhalb des später eingesetzten Kamms gegossen und mit Bidest überschichtet. Nach dem Polymerisieren, d.h. wenn zwei Linien zwischen Trenngel und Bidest zu sehen sind, wird das Wasser abgegossen, mit Filterpapier nachgetrocknet und das Sammelgel darüber gegossen. Ein Kamm mit 10 Taschen wird sofort in das Sammelgel gesteckt.

### Standards

8 µl Prestained SDS-Standards Broad Range (BioRad) + 2 µl Probenpuffer

8 µl Cruz Marker (Santa Cruz) + 5 µl Proben Puffer

Die Zellysate bzw. Standards werden mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Währenddessen werden die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, mit Lämmli-Puffer bedeckt und die Kämme gezogen. Die Taschen werden gespült und die Gelen von Luftblasen befreit. Die Proben werden mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen gefüllt. Die Elektrophorese wird bei 80-200 V durchgeführt, bis die blaue Front gerade aus den Gelen herausgelaufen ist.

#### 2.2.4.6. Western Blot

Beim Western Blot werden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Membran transferiert, auf der sie indirekt detektiert werden können. Hier werden über die Bindung spezifischer primärer Antikörper Meerrettich-Peroxidase-konjugierte sekundäre Antikörper gebunden. Durch die Meerrettich-Peroxidase wird ein Chemilumineszenzreagens umgesetzt, so dass die Proteinbanden schwarz auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden können.

##### Blotpuffer

1/2 Volumen Lämmli-Puffer

1/5 Volumen Methanol

Der Blot wird in einer Wet-Blot-Kammer (BioRad) wie folgt aufgebaut:

Weiße Seite (Pluspol)  
Schwamm  
2 Lagen Gel-Blotting-Papier  
Nitrocellulose-Membran  
Gel  
2 Lagen Gel-Blotting-Papier  
Schwarze Seite (Minuspol)

Dazu werden die Membran und die Filterpapiere vorher auf die Gelgröße zurechtgeschnitten. Um Verunreinigungen zu vermeiden wird stets mit sauberen Handschuhen gearbeitet. Alle Blot-Komponenten werden kurz im Blotpuffer angefeuchtet und luftblasenfrei aufeinandergelegt. Die Kammer wird auf Eis gestellt, um die entstehende Hitze abzufangen. Geblottet wird 90 min bei 90 mA (10 mA pro cm<sup>2</sup>) mit dem passenden Biometra-Spannungsgesetz. Der vorgefärbte Marker (BioRad) dient zum Nachweis des Transfers.

Anschließend werden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S angefärbt und, wenn möglich, im Weißlicht fotografiert. Nach dem Waschen mit Wasser wird der Blot mit TBS-Tween vollständig entfärbt:

#### TBS-Tween

136 mM NaCl

5 mM KCl

10 ml Tris-HCl pH 7,6

0,1% Tween-20

Die Nitrozellulosemembran wird in einer Schale über Nacht bei 4°C oder 1 h bei Raumtemperatur mit 5% oder 3% Trockenmilch in TBS-Tween inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Die folgenden Schritte werden unter Schütteln auf dem Phero-Shaker durchgeführt: Am nächsten Tag wird die Membran zweimal kurz und einmal 5 min mit TBS-Tween gewaschen und eine Stunde mit einer geeigneten Verdünnung des ersten Antikörpers in TBS-Tween bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Wäsche dreimal 5 Minuten wird der Marker mit einem Skalpell abgetrennt und in einem 15 ml Röhrchen mit 1:20000 verdünntem Avidin-Konjugat in TBS-Tween inkubiert. Zum Blot wird eine 1:5000 Verdünnung des zweiten Peroxidase-gekoppelten Antikörpers in TBS-Tween gegeben und beides eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Es wird dreimal 5 min und noch einmal kurz mit TBS/Tween (0,1%) gewaschen. Die ECL-Reagenzien (Enhanced Luminol Reagent, Amersham) werden zu gleichen Teilen gemischt und die Membranen sofort eine Minute darin inkubiert. Nach kurzem Abtropfen werden sie zwischen zwei sauberen Folien luftblasenfrei in eine Filmkassette gelegt. Röntgenfilme werden von 10 s bis zu mehreren Stunden auf der Membran exponiert.

Zur Auswertung werden, wenn möglich, die Gesamt-Proteinmengen des Ponceau-Blots und die zugehörigen Banden auf dem Röntgenfilm mit dem Computerprogramm Tina (Fuji) quantifiziert und die ECL-Banden auf die Gesamtmenge an Protein normiert. Steht ein Foto der Ponceau-Färbung nicht zur Verfügung, so werden nur die Banden des Röntgenfilms quantifiziert und miteinander verglichen, da die gleich Proteinmengen aufgetragen wurden.

## 2.2.5. Zellbiologische Methoden

### 2.2.5.1. Allgemeine Methoden der Zellkultur

Melanom-Zellen und Melanozyten-Kulturen werden in DMEM-1965- bzw. RPMI-1640-Medium mit 10 % FCS in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO<sub>2</sub> enthält, kultiviert. Die verwendeten Melanom-Zelllinien sowie Melanozyten-Kulturen wachsen adhärent auf dem Boden der Kulturflaschen. Das Zellmedium wird jeden zweiten bis dritten Tag erneuert, wobei vor jedem Mediumwechsel die Zellen mit sterilem PBS gespült werden, um sowohl tote Zellen als auch saure Stoffwechselprodukte zu entfernen. Zum Passagieren der fast konfluent gewachsenen Zellen werden die Zellen mit PBS gewaschen und ca. 5 min mit 0,3 % Trypsin inkubiert. Nach Ablösung der Zellen vom Boden werden sie von der Kulturflasche ab gespült und in ein mit etwas Medium gefülltes 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen werden 5 min bei 1000 rpm pelletiert und in Medium resuspendiert. Die Zellen werden je nach Proliferationsrate mit entsprechender Zellzahl für die Versuche ausgesät oder weiter kultiviert.

#### Lagerung eukaryotischer Zellen

Lsg.A besteht aus 50% Medium und 50% Serum

Lsg.B besteht aus 80% Medium und 20% DMSO

Die Zellen werden mit PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen, trypsiniert und in 10% FCS-haltige Medium 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. 10<sup>6</sup> Zellen werden in jeweils den gleichen Volumina von Lsg.A und Lsg.B resuspendiert. Sie werden dann in einem Kryo-Röhrchen langsam eingefroren, d.h. mit Zellstoff eingepackt, bei -70°C zwei Tage aufbewahrt und anschließend in flüssigem Stickstoff überführt.

### 2.2.5.2. Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion ist eine Technik, mit deren Hilfe die Einschleusung von DNA in höher entwickelte Zellen ermöglicht wird. Im Prinzip eignen sich alle verfügbaren Zellen von Mikroorganismen und Eukaryoten als Wirtszellen für die Aufnahme von Fremd-DNA. Bei Versuchen, in denen die in die Wirtszellen eingeschleusten Gene nur vorübergehend aktiv sind und im Verlaufe weiterer Zellteilungen wieder verloren gehen, spricht man von transienter Transfektion bzw. abotiver Transfektion. Ein solcher Fall liegt vor, wenn die eingeschleuste DNA nicht ins Chromosom der Empfängerzelle eingebaut wird oder sich extrachromosomal

nicht vermehren kann. Falls die eingeschleusten Fremdgene in den Zellen persistieren, weil sie in das Genom der Wirtszelle eingebaut wurden, spricht man von stabiler Transfektion. Es gibt aber auch spezielle Vektoren, mit denen Gene nach der Transfektion nicht ins Wirtschromosom eingebaut werden, sondern als selbstständig replizierende Elemente unter Selektionsdruck sehr lange in den Zellen erhalten bleiben. Es gibt verschiedene Methoden, mit denen man die gewünschte DNA in lebende eukaryotische Zellen einschleusen kann, z.B. die Calciumphosphat-Methode, Elektroporation und Liposomen.

#### DMRIE-C Reagent :

Das DMRIE-C (1,2-Dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethylammonium-bromid) Reagenz ist für die Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen geeignet (Invitrogen).

OPTI-MEM: Transfektionsmedium ohne Serum, ohne Penicillin/Streptomycin

Medium 0 : DMEM 1965, ohne Serum, ohne Penicillin/Streptomycin

Medium 1+: DMEM 1965, mit 10% Serum, mit Penicillin/Streptomycin, und 100 µg/ml Geneticin (G418)

Medium 1++: DMEM 1965, mit 10% Serum, mit Penicillin/Streptomycin, 100 µg/ml Geneticin (G418) und 50 µg/ml Hygromycin

Die Zelllinie SK-Mel-13 wird jeweils mit einer Anzahl von  $10^6$  Zellen in drei Kultur-Flaschen ausgesät und kultiviert, bis die Zellen 40-50% konfluent sind. Die Transfektion wird entweder in einer 6-well-Platte oder in Petrischalen durchgeführt. Jeweils  $2,5 \times 10^5$  Zellen werden in 6-well-Platten ausgesät und 24 h später transfiziert.

6 ml OPTI-MEM werden mit 6,3 µl DMRIE-C pro 6-well oder Petrischale vorsichtig in ein Polystyren-Röhrchen gegeben, vorsichtig dreimal geschwenkt und bei 25°C für 30 min inkubiert. Die Plasmid-DNA (10 µg) und das pTK-Hyg-Resistenz-Plasmid (2,5 µg pro 6-well-Platte) werden mit 1 ml OPTI-MEM sterilfiltriert. Nach Beendigung der Inkubationszeit werden die sterilfiltrierten Plasmide (250 µl = 2,5 µg) zur DMRIE-C-Lösung gegeben, geschwenkt und für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das alte Medium wird von den 6-well-Platten entfernt, die Zellen werden kurz mit OPTI-MEM gewaschen. Jeweils 1 ml der DNA-Lipid-Mischung werden in das Well gegeben und anschließend im Inkubator für 4h inkubiert. Bei der transienten Transfektion wird bei 6-well-Platten 4h nach der Transfektion das Medium gewechselt und mit Medium 1+ ersetzt. Einige der Wells werden mit Doxycyclin mit einer Endkonzentration von 2 µg/ml behandelt. Nach 24 bzw. 48h werden behandelte und unbehandelte Zellen geerntet und auf RNA- und Protein-Ebene untersucht.

Bei der stabilen Transfektion wird 2 Tage nach der Transfektion das Medium gegen Selektionsmedium (Medium 1++) gewechselt. Eine Woche später sind 80-90% der Zellen abgestorben. Die Zellen haben jetzt neues Medium 1++ bekommen und werden nach 4 Tagen trypsiniert und passagiert. Um einzelne Klone zu erhalten, werden die Zellen in verschiedenen Stufen verdünnt und in Petrischalen überführt. Es dauert 5-6 Wochen, bis genügend einzelne Zellhaufen entstehen. Ein solcher Zellhaufen wird mit einem Pipetten-Spitzen-Zylinder von den anderen Zellhaufen separiert, abtrypsiniert und in einer Mikrotiterplatte (24-well) vereinzelt. Die Einzelklone werden dann nacheinander in 24-well Platten, 6-well Platten und in Kultur-Flaschen hochgezogen und bei 50% Konfluenz mit Doxycyclin (2 µg/ml) behandelt. Sie werden nach 2 Tagen geerntet und auf RNA-, und Protein-Ebene sowie auf Apoptose untersucht.

### 2.2.5.3. APAAP-Färbung

Die immunhistochemische APAAP-Färbung ist eine Standard-Methode für die Detektion eines untersuchten Antigens direkt in der Zelle. Dazu wird ein Alkaline Phosphatase Anti-Alkaline-Phosphatase-Antikörper (APAAP) Komplex verwendet (Cordell et al., 1984). Die Zellen werden auf einem Objektträger fixiert. Nach Inkubation mit dem primären Antikörper wird ein zweiter Antikörper (Brückenbildner), der nicht markiert ist, zugegeben. An diese Brücke kann der APAAP-Komplex binden. Die Methode wurde entwickelt für die Detektion von Maus-Immunglobulinen, der APAAP-Komplex enthält einen Maus-Anti-Alkaline-Phosphatase-Antikörper. Die Färbung wird mit Neufuchsin in Kombination mit Levamisol durchgeführt.

#### Lösungen:

##### TBS pH 7,6

|                |            |         |
|----------------|------------|---------|
| Tris-Base      | 4.5 g      | 7.4 mM  |
| Tris/HCl       | 34.25 g    | 43.5 mM |
| NaCl           | 43.90 g    | 150 mM  |
| Bidest. Wasser | ad 5000 ml |         |

##### Verdünntes RPMI Medium

|      |       |      |
|------|-------|------|
| RPMI | 50 ml |      |
| FCS  | 50 ml | 10 % |

---

|                                   |        |       |
|-----------------------------------|--------|-------|
| Natriumazid                       | 0.5 g  | 15 mM |
| Bidest. Wasser                    | 450 ml |       |
| Einstellen des pH mit HCl auf 7,6 |        |       |

Konjugierter Puffer

|                        |        |        |
|------------------------|--------|--------|
| Verdünntes RPMI Medium | 2 ml   |        |
| Humanserum             | 250 µl | 12.5 % |

Neufuchsin-Lösung

|            |       |        |
|------------|-------|--------|
| Neufuchsin | 1 g   | 137 mM |
| 2 M HCl    | 20 ml |        |

Nitrit/Fuchsin

|                          |        |        |
|--------------------------|--------|--------|
|                          |        | 0.58 M |
| Natriumnitrit            | 10 mg  |        |
| Bidest. H <sub>2</sub> O | 250 µl |        |
| 137 mM Neufuchsin        | 100 µl | 39 mM  |

NAB Phosphat

|                        |        |        |
|------------------------|--------|--------|
| Naphtol AS-BI-Phosphat | 250 mg | 184 mM |
| N,N-Dimethylformamid   | 3 ml   |        |

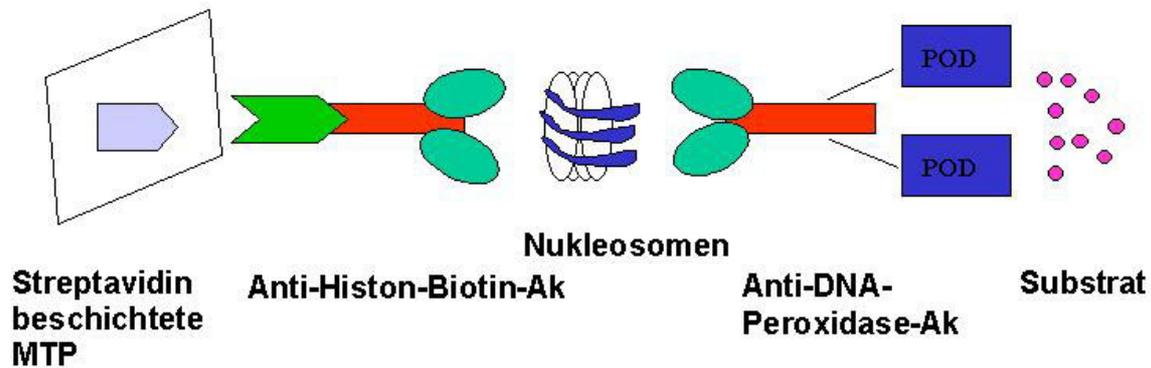
Fuchsin-Lösung

|                |                            |        |
|----------------|----------------------------|--------|
| TBS            | 35 ml                      |        |
| 1,2-Propandiol | 12,5 ml                    | 4,88   |
| HCl            | einstellen des pH auf 9,75 |        |
| Levamisol      | 20 mg                      | 2,4 mM |
| Nitrit/Fuchsin | 350 µl                     |        |
| NAB-Phosphat   | 300 µl                     | 1,6 mM |
| HCl            | einstellen des pH auf 8,8  |        |

Die Zellen werden auf einen Objektträger transferiert und 10 min mit Aceton bei RT fixiert. Nach dem Verdampfen des Acetons können die Objektträger bei  $-70^{\circ}\text{C}$  für über einen Monat gelagert werden. Zur Anfärbung des Bcl-2-Antigens wird der Bcl-2-Antikörper 1:75 in PBS/1% Rinderserumalbumin verdünnt und inkubiert für 5 Minuten. Diese Lösung wird auf den aufgetauten Objektträger gegeben und für weitere 5 min inkubiert. Es wird dreimal mit TBS für 5 min gewaschen, bevor mit einem Maus-Anti-Maus-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:50 in konjugiertem Puffer für 30 min inkubiert wird. Nach dreimaligen Waschen mit TBS für ca. 5 min wird der Objektträger mit dem APAAP-Komplex mit einer Verdünnung von 1:50 in RPMI 30 min bei RT inkubiert. Die Färbung wird durchgeführt, nachdem die Objektträger dreimal 5 min mit TBS gewaschen wurden. Dies geschieht mit Fuchsin-Lösung und einer Gegenfärbung mit Hematoxylinlösung für 1 min. Danach wird der Objektträger mit bidest. Wasser für 5 min gewaschen und mit Aquamount (Promochem) und einem Deckglas eingedeckt.

#### **2.2.5.4 Quantifizierung der Apoptose (DNA-Fragmentierung)**

Es gibt mehrere Methoden, mit deren Hilfe die Apoptose detektieren werden kann. Eine dieser Methoden, die hier verwendet wurde, bestimmt die DNA-Fragmentierung, den finalen Schritt bei der Apoptose (Wieder et al., 1998). Der Test basiert auf dem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip unter Verwendung zweier Antikörper gegen DNA und Histon-Proteine. Dies ermöglicht den spezifischen Nachweis von Mono- und Oligonukleosomen in der zytoplasmatischen Fraktion von Zelllysaten. Im ersten Inkubationsschritt wird ein Anti-Histon-Antikörper adsorptiv an der Wand der Mikrotiterplatte fixiert, anschließend werden unspezifische Bindungsstellen mit Inkubationspuffer abgesättigt. Im zweiten Inkubationsschritt werden die in der Probe enthaltenen Nukleosomen über ihren Histon-Anteil von dem an der Wand immobilisierten Antikörper gebunden. Im dritten Inkubationsschritt bindet Anti-DNA-Peroxidase (POD) an den DNA-Anteil der Nukleosomen (Abb. 9). Nach Auswaschen des nicht-gebundenen Peroxidase-Konjugates wird der Anteil der im Immunkomplex fixierten Peroxidase mit ABTS als Substrat photometrisch bestimmt.



**Abb. 9: Cell Death Detection ELISA Kit:** Der Test ist durchführbar in einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte (MTP). Hier bildet sich ein Komplex (Sandwich) aus Anti-Histon-Biotin-Antikörper (Ak) und Anti-DNA-Antikörper mit den Nukleosomen des Zelllysates.

#### Lösungen:

Anti-Histon-Antikörper, gebunden an Biotin

Anti-DNA-Antikörper, konjugiert mit Peroxidase

Inkubationspuffer

Lysepuffer

Positive Kontrolle

Substrat-Lösung (2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-Sulfonat])

Immunreagenz für 60 Proben:

240 µl Anti-Histon-Antikörper

240 µl Anti-DNA-Antikörper

4320 µl Inkubationspuffer

Nach unterschiedlichen Behandlungen werden die Zellen in 6-well-Platten einem Apoptose-Test unterzogen. Die Platten werden bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, mit 1 ml Lyse-Puffer pro well werden die Zellen bei RT inkubiert. Danach werden die Zellen bei 1200 rpm für 10 min zum zweiten Mal zentrifugiert. 20 µl der jeweiligen Proben werden auf die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Nach Zugabe von 80 µl Immunreagenz Lösung werden die Proben unter moderatem Schütteln für 120 min bei RT inkubiert. Die wells werden dreimal mit Inkubationspuffer gewaschen, 100 µl der Substrat-Lösung dazu pipettiert und nach 5 und nach 10 min bei 405 nm in ELISA

Photometer gemessen. Die Kontrollwerte werden gleich 100 Prozent gesetzt und die gemessene Werte auf die Kontrollen bezogen.

#### **2.2.5.5. Bestimmung der Caspase-3-Aktivität**

##### Komponenten des ApoAlert Caspase Colorimetric Assay Kits (Clontech):

- Zelllysepuffer
- 2x Reaktionspuffer
- 1 M DTT
- 1 mM Caspase-3 Substrat (DEVD-pNA)
- 1 mM Caspase-3 Inhibitor (DEVD-fmk)
- 100 mM PNA

Aktive Caspase-3 kann aus der inaktiven Proform durch Spaltung, z.B. durch Caspase-9, rekrutiert werden. Die Aktivität der Caspase-3 kann alternativ zum Western Blot auch photometrisch, d.h. mit größerer Genauigkeit, bestimmt werden. Dazu wurde hier der ApoAlert Caspase Colorimetric Assay Kit der Firma Clontech verwendet. Je  $2 \times 10^6$  Zellen wurden nach den Angaben der Firma in 50  $\mu$ l vorgekühltem Lysepuffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 50  $\mu$ l des 2x Reaktionspuffers / 10 mM DTT gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Noch einmal wurden 50  $\mu$ l des 2x Reaktionspuffers / 10 mM DTT zugegeben und der Ansatz mit 5  $\mu$ l Caspase-3 Substrat (DEVD-pNA, Endkonzentration 50  $\mu$ M) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Messung wurde dann bei 405 nm im Photometer durchgeführt.

#### **2.2.5.6. Zytotoxizitätstest**

Das Platzen der Zellen durch Schädigung der Plasmamembran (Nekrose) geschieht in der Regel in Folge äußerer Einflüsse, z.B. durch Verbrennungen, Vergiftungen, Strahlung oder mechanische Verletzungen. Dadurch werden Moleküle aus dem Zytoplasma freigesetzt.

Es gibt mittlerweile mehrere Methoden, mit deren Hilfe die Zytotoxizität quantitativ bestimmt werden kann, z.B. durch Trypanblau-, Eosin- oder Propidiumiodid-Färbung. Hier wird die Aktivität des freigesetzten Laktat-Dehydrogenase-Enzyms (LDH) nach dem Lysieren der Zellen im Zellüberstand gemessen. Die Freisetzung der LDH wird mit dem „Cytotoxicity Detektion Kit (LDH)“ von Roche quantifiziert. Die Aktivität dieses Enzyms wird nach zwei enzymatischen Schritten gemessen. Im ersten Schritt katalysiert LDH die Oxidation von

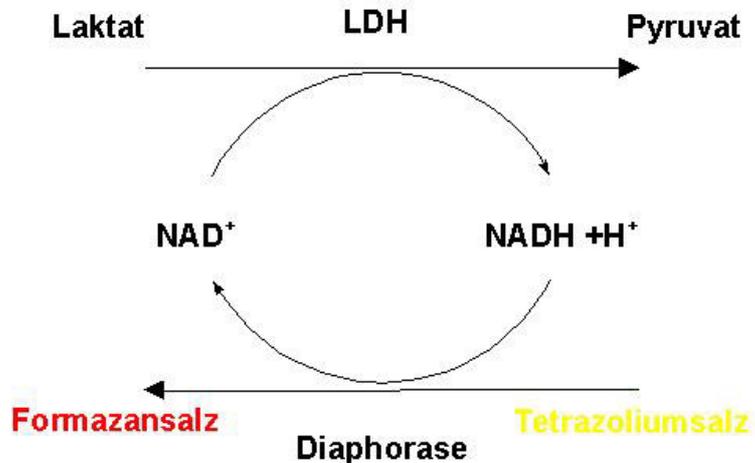
Laktat zu Pyruvat, während  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert wird. Im zweiten Schritt transferiert Diaphorase  $\text{H}/\text{H}^+$  auf das Tetrazoliumsalz 2-[4-Iodphenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyl-tetrazolium (gelb), das dadurch zu Formazansalz (rot) reduziert wird. Gemessen wird die Absorbtion bei 490 nm mit dem ELISA-Photometer (Abb. 10). Die Aktivität der LDH im Überstand ist proportional zur Menge der Zellen.

Reaktionsgemisch:

Katayse-Lösung: 125  $\mu\text{l}$

Färbe-Lösung: 5,7 ml

Nach der Behandlung der Zellen wird der Überstand abgenommen und bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird 1:4 verdünnt und in 96-well-Platten transferiert. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Reaktionsgemisch werden die Proben bei RT 30 min im Dunkeln inkubiert und bei 490 nm im ELISA-Photometer vermessen. Die Kontrollwerte werden gleich 100% gesetzt und die Werte der Proben darauf bezogen.



**Abb. 10: Schematische Darstellung der Zytotoxizitätsdetektion**

Die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase im Zellkultur-Überstand wird bestimmt durch zwei Reaktionen. Im ersten Schritt katalysiert LDH die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wodurch  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert wird. Im zweiten Schritt wird  $\text{H}^+/\text{H}$  auf ein Tetrazoliumsalz (gelb) transferiert, die folgende Reduktion photometrisch quantifiziert.

### 2.2.5.7. Tierexperimente

Zur Abschätzung der Tumorigenität *in vivo* werden Melanomzellen in 6-8 Wochen alte Nacktmäuse (Balb-C-nu/nu, Dänemark) injiziert. Die Melanomzellen werden dazu nach kurzer Behandlung mit Trypsin/EDTA geerntet und zweimal mit Medium, das 10% FCS enthält, gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl werden zweimal ca.  $10^6$  Zellen in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert und auf beiden Bauchseiten einer Maus subkutan injiziert. Einen Tag später erhält eine Gruppe der Tiere Sucrose-haltiges (50 mg/ml) Trinkwasser ohne und eine zweite Gruppe Sucrose-haltiges Trinkwasser mit Doxycyclin (2 mg/ml) zur Produktion des in die Melanomzellen eingeschleusten induzierbaren Gens. Nach dem Erscheinen der Tumore in nicht Doxycyclin-behandelten Mäusen werden alle drei Tage Tumorgröße und -gewicht gemessen (Eberle et al., 2003). Die Tumor-Volumina werden zweidimensional nach der Formel Länge x Breite<sup>2</sup> x 0.52 kalkuliert (Xie et al., 2001).

### 2.2.6. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Bei der Auswertung der Messwerte werden Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und die zugehörigen Standardabweichungen angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen werden mit dem Programm Microsoft Excel errechnet.