

2. Material und Methoden

2.1 Material

Geräte

Autoklav	400 D, Sterico AG
BIACORE®-System	BIACORE® 2000, Biacore AB
Cerenkow-Zähler	LS6000 SC, Beckman
Elektrophorese-Apparatur für Nukleinsäuren	Agagel Mini, Biometra
Elektrophorese-Apparatur für Proteine	Protean II, Minigel, BioRad
Heizbad	U3, Julabo
Heizblock	Bioblock Scientific, ThermoLyne
Heizrührer	RCT IKA-Combimag
Heizschränke	ST 5050 & B5042, Heraeus
Heizschüttler	G25, New Brunswick
Homogenisator	Laboratory Blender, Waring
Hybridisierungssofen	Hybaid, Biometra
Magnetischer Separator	5x 1,5 ml, Dynal
Netzgeräte	ECPS 3000/150, Pharmacia, Consort
PCR-Geräte	GeneAmp 2400, Perkin Elmer, Progene, Techne
pH-Meter	Cyberscan 500
Photometer	UV-1202, Shimadzu
Pipetten P2, 20, 200, 1000, 5.000, 10.000	Gilson-Pipettman, Abimed
Reinstwasseranlage	Milli-Q, Millipore
Schüttler	Vortex Genie, Bender & Hobein AG
	Celloshaker Variospeed
Transilluminator	Reprostar II, LAMAG
Vakuumpumpen	Beta, Christ, MZ2C/1,7, Vakuubrand
Vakuumentrifuge	Speedvac Concentrator, Savant
Videosystem	CS1, Cybertech + Copy Processor, Mitsubishi
Waagen	AC 88, & PC 4400, Mettler
Zentrifugen	Biofuge A Heraeus Christ, Profuge A Stratagene
	HF120 Capsule Tomy, J2-21 Beckman

Chemikalien, Antibiotika, Inhibitoren

α - ³² P-CTP	Amersham-Pharmacia, Freiburg
1,4 Dithiothreitol (DTT) & 1,4 Dithioerythrit (DTE)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8 & 38:2)	Roth, Karlsruhe
Agar	Gibco BRL, Eggenstein
Agarose, Seakem® LE	FMC Bioproducts, Rockland, USA
Ammoniumsulfat (APS)	BioRad, München
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roche, Mannheim
Aprotinin, Leupeptin	Roche, Mannheim
Caseinhydrolysat (Pepton 140)	Gibco BRL, Eggenstein
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg
Chloroform/Isoamylalkohol 24:1	Roth, Karlsruhe

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
DIG-11-ddUTP	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
D-Maltose	Serva, Heidelberg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycerin (87 %, 99%, v/v)	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
Heparin	Roth, Karlsruhe, Serva, Heidelberg
HEPES	Merck, Darmstadt
Hydrazidagarose	Pharmacia, Freiburg
IPTG, X-Gal	Roche, Mannheim
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Maleinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriummetaperiodat	Merck, Darmstadt
NBT/BCIP	Roche, Mannheim
Nukleosidtriphosphate	Roche, Mannheim
Pefabloc®	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1, pH 5,2	Amresco, Solon, USA
Polyethylenglycol (PEG) 3350	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNase-Inhibitor	Roche & Promega, Mannheim
Spermidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tricin	Biomol, Hamburg
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Pierce, Sankt Augustin
tRNA (Lyophilisat aus Hefe)	Roche, Mannheim

Weitere Chemikalien von Merck, Darmstadt: CoCl_2 , NaCl , ZnCl_2 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{NaOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, NaOH , KOH , HCl , NaH_2PO_4 .

Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)	NEB, Schwalbach
DNase I	Roche, Mannheim
<i>Eco</i> RI, <i>Not</i> I, <i>Eco</i> RV	Gibco BRL, Eggenstein
Klenow-Fragment	Gibco BRL, Eggenstein
KlenTaq-Polymerase	Clontech, Heidelberg
Mungbohnen-Nuklease	Roche, Mannheim
<i>Nsi</i> I	NEB, Schwalbach
Proteinase K	Roche, Mannheim & Gibco BRL, Eggenstein

<i>Pst</i> I	Stratagene, Heidelberg
T4-DNA-Ligase	Gibco BRL, Eggenstein
T4-Polynukleotid-Kinase	Promega, Mannheim
T4-RNA-Ligase	NEB, Schwalbach
Terminale Transferase	NEB, Schwalbach

Kits, Fertigprodukte, Molekulargewichtsstandards

λ DNA Kit	Qiagen, Hilden
λ TriplEx™ Library	Clontech, Heidelberg
10x TAE, 10x TBE	Gibco BRL, Eggenstein
4x Roti Load	Roth, Karlsruhe
Baculovirus TA Cloning® Kit	Invitrogen, De Schelp, Niederlande
BM Fast Stain	Roche, Mannheim
DIG DNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
DIG Easy Hyb	Roche, Mannheim
DIG/Biotin Labeling Mix	Roche, Mannheim
DNA Extraktionskits	InViTek, Berlin, Clontech, Heidelberg, Qiagen, Hilden
DNA-Oligonukleotide	TIBMolbiol, Berlin, BioTez, Berlin
Magnetische Partikel (Anti-DIG, Streptavidin)	Roche, Mannheim
Marathon™ cDNA Amplification Kit	Clontech, Heidelberg
Marker, Nukleinsäuren (100-, 250 bp-Leiter, 1 kb-Leiter, ϕX174 RF DNA/ <i>Hae</i> III)	Gibco BRL, Eggenstein
RNA-Laddar	Roche, Mannheim
Marker, Proteine (High Range, Mid Range)	Roche, Mannheim
Micro BCA Assay	Pierce, Sankt Augustin
Mobitec Säulen (Mobicols)	Mobitec, Göttingen
Nylonmembran	Roche, Mannheim
Oligotex™-Partikel	Qiagen, Hilden
Pipettenspitzen SafeSeal, 2, 20, 200µl, 1, 5, 10 ml	Biozym, Oldenburg
Plasmid Mini-, Midi-, Maxi-Präparationkits (Jetstar)	Genomed,
RiboMAX Large Scale RNA Produktion System	Promega, Mannheim

Puffer, die bei den nachfolgenden Methoden nicht aufgeführt sind

10x REACT2	10x REACT3	10x KlenTaq-Polymerasepuffer
500 mM Tris-HCl, pH 8,0	500 mM Tris-HCl, pH 8,0	400 mM Tricine-KOH, pH 9,2
500 mM NaCl	1000 mM NaCl	150 mM KoAc
100 mM MgCl ₂	100 mM MgCl ₂	35 mM Mg(OAc) ₂
		750 µg/µl BSA
10x Kinasepuffer	10x Ligasepuffer	TE-Puffer
700 mM Tris-HCl, pH 7,6	300 mM Tris-HCl, pH 7,8	20 mM Tris-HCl, pH 8,0
100 mM MgCl ₂	100 mM MgCl ₂	1 mM EDTA
50 mM DTT	100 mM DTT	
	10 mM ATP	

Tricine-EDTA

10 mM Tricine-KOH, pH 8,5
0,1 mM EDTA

2.2 Klonierung der H19-cDNA

Um die H19-RNA strukturell oder funktionell untersuchen zu können, muss sie zunächst isoliert werden. Prinzipiell sind dafür zwei Wege denkbar: die Isolierung aus humanem Gewebe oder die Klonierung der cDNA-Sequenz in einen Vektor mit anschließender RNA-Produktion mittels *in-vitro*-Transkription. Die Isolierung aus humanem Gewebe ist aus mehreren Gründen schwierig. Zunächst ist die geringe Verfügbarkeit von frischem humanem Gewebematerial zu nennen, dass auch noch intakte H19-RNA in möglichst großen Mengen enthalten muss. Das einzige Material, was überhaupt in Frage käme, wäre humane Plazenta, da sie recht frisch zu bekommen wäre und H19-RNA enthält, allerdings nur in sehr geringen Absolutmengen (1 % der mRNA). Die Praxis zeigte jedoch, dass auch Plazenten nur begrenzt mit schwankendem organisatorischem Aufwand zu bekommen sind. Gegen diese Form der H19-Isolierung spricht auch der enorme Aufwand, den diese Form mit sich bringen würde (Waschen, Homogenisieren des Gewebes, Zentrifugationen, Beladen und Ernten eines Gradienten, Beseitigung enormer Mengen kontaminierten Abfalls etc.). Die Qualität, Quantität und Reinheit unterliegt starken Schwankungen.

Demgegenüber bietet die Klonierung mehrere Vorteile. Es müsste nur einmal ein größerer Aufwand zur Klonierung betrieben werden. Anschließend könnten mit Hilfe simpler, etablierter und reproduzierbarer Methoden (Plasmidpräparation, Restriktionsverdau, T7-Transkription) beliebige Mengen hochreiner intakter RNA hergestellt werden. Sämtlicher Aufwand, den das Arbeiten mit blutigem Humangewebe mit sich bringt, wird überflüssig.

Die Sequenz der H19-cDNA ist bereits seit 1990 bekannt (Brannan *et al.*, 1990). Versuche der Kontaktaufnahme zu dieser Gruppe mit der Bitte um Überlassung eines möglichst vollständigen Klons blieben zunächst erfolglos (keine Antwort). Eine Partnerarbeitsgruppe im trilateralen Projekt besaß lediglich die genomische Variante eines H19-Klons (inklusive Introns). Somit ergab sich zwingend die Notwendigkeit eigener Klonierungsarbeiten.

2.2.1 RACE-PCR

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation eines definierten DNA-Abschnitts. Benötigt werden dabei neben der Zielsequenz, dem sog. Template, prinzipiell zwei Oligonukleotide (ca. 20 - 30 Nukleotide lang), im folgenden Primer genannt, die komplementär zu den 3'-Enden des Templates bzw. des Gegenstranges sind und somit den zu amplifizierenden Bereich eingrenzen (vorwärts- und rückwärts-Primer). Daneben wird eine thermostabile DNA-Polymerase mit Puffer benötigt, die die angelagerten Primer an ihrer 3'-OH-Gruppe entsprechend der Templatevorlage

verlängern unter Einbau von Desoxyribonukleosid-triphosphaten (dNTPs). Während der PCR werden fortlaufend Temperaturzyklen durchlaufen, wobei jeder Zyklus aus den Schritten Denaturierung (= Trennung der DNA-Doppelstränge), Primeranlagerung (durch Absenken der Temperatur = Annealing) und Primerverlängerung (beim Temperaturoptimum der Polymerase = Elongation) besteht. Jeder Zyklus resultiert in der Verdoppelung der Zielsequenz, so dass diese exponentiell amplifiziert wird und durch Ethidiumbromidfärbung im Agarosegel sichtbar und isolierbar gemacht werden kann.

Als Template zur Amplifikation der H19-cDNA stand eine doppelsträngige, adapterligierte Plazenta-cDNA-Bibliothek der Firma CLONTECH zur Verfügung, die Bestandteil des Marathon™ cDNA Amplification Kits war. PCR-Experimente mit Primern, die den Anfang und das Ende der veröffentlichten H19-Sequenz begrenzten, schlugen fehl (kein Produkt der erwarteten Größe). Daher wurde der zu amplifizierende Gesamtbereich in zwei überlappende Hälften unterteilt und mit dem o.g. Kit die sog. RACE-PCR durchgeführt (RACE = *Rapid Amplification of cDNA Ends*). Dabei wird jeweils ein adapterspezifischer Primer mit einem inneren, genspezifischen Primer kombiniert. Dieses Verfahren ist immer dann vorteilhaft, wenn man nur wenig Sequenzinformationen hat bzw. die Enden der cDNA unbekannt sind (wie in diesem Fall das 5'-Ende, siehe Ergebnisse).

2.2.1.1 5'-RACE

Zur Amplifikation des 5'-Fragments von H19 wurde der adapterspezifische Primer AP1 mit dem H19-spezifischen Primer 4 kombiniert.

AP1 (forw.): 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

H19-Primer 4 (rev.): 5'-CCGAACGCTGAGGCACCGAT-3'

PCR-Ansatz (5'-Race):

Steriles H ₂ O	36,0 µl
10x KlenTaq-Puffer	5,0 µl
dNTP-Mix (100 mM)	1,0 µl
Primer AP1 bzw. 4 (je 10 µM) je	1,0 µl
Template (AdcDNA)	5,0 µl
KlenTaq-Polymerase	1,0 µl total: 50 µl

Temperaturbedingungen:

Initialdenaturierung:	94°C / 1,0 min
Zyklusdenaturierung:	94°C / 0,5 min
Annealing + Elongation	68°C / 4,0 min
	28 Zyklen

10,0 µl des PCR-Produktes wurden auf einem 1,2 %igen Agarosegel aufgetrennt (0,5x TBE). Von dem PCR-Produkt wurden 2,0 µl 1:50 mit Tricin/EDTA verdünnt und davon 5,0 µl als Template für eine sog. "nested" PCR eingesetzt. Hierbei werden Primer verwendet, die innerhalb des Primär-PCR-Produktes lokalisiert sind. Da hierbei ein weiterer H19-spezifischer Primer involviert ist, wäre das Erscheinen des Sekundärproduktes vorhergesagter Größe ein weiteres

Indiz, dass bei der Primär-PCR das korrekte H19-5'-Produkt amplifiziert wurde. Eingesetzte Primer:

AP2 (forw.): 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'

H19-Primer 2 (rev.): 5'-CCTGGGCCGAGTGCCTC-3'

PCR-Ansatz (5' "nested"):

Temperaturbedingungen:

Steriles H ₂ O	36,0 µl	Initialdenaturierung:	94°C / 1,0 min
10x KlenTaq-Puffer	5,0 µl	Zyklusdenaturierung:	94°C / 0,5 min
dNTP-Mix (100 mM)	1,0 µl	Annealing + Elongation	68°C / 3,0 min
Primer AP2 bzw. 2 (je 10 µM) je	1,0 µl	nach 15, 20, 25 Zyklen: je	6,0 µl + 3,0 µl PP
Template (verd. Primär-PCR)	5,0 µl		
KlenTaq-Polymerase	1,0 µl total: 50 µl		

Die Produkte wurden auf einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt (0,5x TBE).

Das primäre 5'-RACE-PCR-Produkt wurde aus dem Agarosegel als verschmierte Bande bei ca. 1,4 kb (erwartete Produktgröße: 1,36 kb) ausgeschnitten und standardmäßig eluiert. Zur Erhöhung der Produktausbeute und Bandenspezifität wurde das Eluat in präparativem Maßstab reamplifiziert, auf einem 1,2 %igen Agarosegel (in 1x TAE) bei 80 V aufgetrennt, die Bande ausgeschnitten und die DNA standardmäßig eluiert.

PCR-Ansatz (5'-reamp/präp):

Temperaturbedingungen:

Steriles H ₂ O	144,0 µl	Initialdenaturierung:	94°C / 1,0 min
10x KlenTaq-Puffer	20,0 µl	Zyklusdenaturierung:	94°C / 15,0 sec
dNTP-Mix (100 mM)	4,0 µl	Annealing + Elongation	68°C / 4,0 min
Primer AP1 bzw. 4 (je 10 µM) je	4,0 µl		30 Zyklen
Template (5'-Eluat)	20,0 µl		
KlenTaq-Polymerase	4,0 µl total: 4x 50 µl		

2.2.1.2 3'-RACE

Diese 3'-RACE-PCR war streng genommen keine RACE-Reaktion, weil statt des adapterspezifischen Primers ein von Frau Dr. Lippmann formulierter Primer eingesetzt wurde, der am exakten 3'-Ende der veröffentlichten H19-Sequenz hybridisiert und dahinter eine *Not I*-Schnittstelle plus verdaufördernder Zusatzsequenzen enthielt (Primer B).

Diese Amplifikation bereitete außerordentliche Schwierigkeiten: Die Kombination jeweils eines der beiden Primer mit einem zweiten H19-spezifischen Primer, die ein kleineres 3'-spezifisches H19-Produkt amplifizierten, funktionierte reproduzierbar, nicht jedoch die Amplifikation des gesamten 3'-Fragments. Dies wurde vermutlich durch Sekundärstruktur-Probleme verhindert. Für diese Reaktion war die Anwesenheit von mind. 2,5% DMSO oder Formamid zwingend notwendig. Als Template wurde wiederum adapterligierte cDNA 1:20 verdünnt (Tricin/EDTA) von CLONTECH eingesetzt.

H19-Primer 5 (forw.): 5'-GCACAGGGGTGGCCAGCGTAGGGTCCAG-3'
 H19-Primer B (rev.): 5'-
 ATAAGAATGCGGCCGCTAGTAACAGTGTTTATTGATGATGAGTCCAGGGCTCCTGC-3'
 | *Not I* | ⇒ H19 3'-Ende

PCR-Ansatz (3'-"RACE")**Temperaturbedingungen:**

Steriles H ₂ O	24,35 µl	Initialdenaturierung:	94°C / 0,5 min
10x KlenTaq-Puffer	3,5 µl	Zyklusdenaturierung:	94°C / 15,0 sec
dNTP-Mix (100 mM)	0,6 µl	Annealing + Elongation	68°C / 3,5 min
Primer 5 bzw. B (je 10 µM) je	1,2 µl	Abnahme nach 10, 16, 22, 28, 35 Zyklen (je 5,0 µl)	
Template (AdcDNA 1:20)	2,5 µl		
KlenTaq-Polymerase	0,6 µl		
DMSO/Formamid (3%) bzw. H ₂ O	1,05 µl total: 35,0 µl		

Unter den gleichen Bedingungen wurde die PCR präparativ wiederholt, indem ein dreifacher Ansatz auf drei Einzelreaktionen aufgeteilt wurde. Es wurden mit 3 % Formamid 28 Zyklen durchlaufen mit einem finalen Elongationsschritt bei 68°C für 5,0 min. Die Ansätze wurde gepoolt, auf einem 1,2 % Agarosegel bei 90 V aufgetrennt und die Produktbande ausgeschnitten und standardmäßig eluiert.

2.2.1.3 Klonierung des Gesamtkonstruktes**Zusammenführen der Fragmente**

Um nun die amplifizierte H19-cDNA als Gesamtkonstrukt zu erhalten, müssen die zuvor erhaltenen Teilfragmente zusammengeführt werden. Das 5'- und das 3'-Fragment haben einen identischen Sequenzbereich von 640 Nukleotiden Länge, so dass beide Fragmente in diesem Bereich überlappen. Innerhalb dieses Bereiches ist eine *Pst* I-Schnittstelle lokalisiert, die nur dort und sonst nirgends in H19 vorkommt. Nach einem *Pst* I-Verdau und der Gelelution der entsprechend verkürzten Fragmente lassen sich diese in der korrekten Orientierung mittels T4-DNA-Ligase zusammenführen, wobei dieses Enzym unter ATP-Verbrauch Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen bildet. Zum Verdau wurden von jedem Fragment 0,5 µg geleluierte DNA eingesetzt.

Pst I-Verdau:

	5'-Fragment	3'-Fragment	
Template	10,0 µl (0,052 µg/µl)	1,6 µl (0,32 µg/µl)	
10x-REACT2	1,5 µl	1,5 µl	Reaktion über Nacht, 37°C
H ₂ O	2,0 µl	10,4 µl	
<i>Pst</i> I (20 U/µl)	1,5 µl	1,5 µl	total: je 15,0 µl

Ligation der geleluierten 5'- bzw. 3'-*Pst* I-Fragmente:

5'- <i>Pst</i> I-Fragment:	8,75 µl
3'- <i>Pst</i> I-Fragment:	8,75 µl
10x Ligasepuffer:	2,0 µl
T4-DNA-Ligase (10U/µl):	0,5 µl
Total:	20 µl, 10 h, RT

Um den Ligationserfolg zu testen, wurde eine PCR über den gesamten H19-Bereich durchgeführt. Das Erscheinen einer Produktbande der zu erwartenden, korrekten Größe belegt zum einen den Erfolg der Ligation und ist zum anderen ein weiteres Indiz, dass es sich tatsächlich um H19 handelt.

PCR-Ansatz (Gesamt-H19)

Steriles H ₂ O	24,85 µl
10x KlenTaq-Puffer	3,5 µl
dNTP-Mix (100 mM)	0,6 µl
Primer AP1 bzw. B (je 10 µM) je	1,2 µl
Template (Ligation)	2,0 µl
KlenTaq-Polymerase	0,6 µl
Formamid (3 % f.c.)	1,05 µl total: 35,0 µl

Temperaturbedingungen:

Initialdenaturierung:	94°C / 0,5 min
Zyklusdenaturierung:	94°C / 15,0 sec
Annealing + Elongation	68°C / 4,0 min
Abnahme nach 15, 20, 25, 30, 35 Zyklen (je 5,0 µl)	

Klonierung des gesamten PCR-Produktes

Um dieses PCR-Produkt in einen Vektor zu klonieren, kann man sich die Eigenschaft der Taq-Polymerase zu Nutze machen, templateunabhängig am 3'-Ende des PCR-Produktes bei längerer Inkubation bei 72°C ein zusätzliches Desoxyadenosin anzufügen (terminale Transferaseaktivität). Das resultierende PCR-Produkt mit A-Überhängen lässt sich in einen Vektor mit komplementären T-Überhängen ligieren in der korrekten Orientierung, wenn der Vorwärts-Primer phosphoryliert wurde (sog. TA-Klonierung, Baculovirus TA Cloning® Kit, Invitrogen Corp.).
Kinasierung des Vorwärts-Primers AP1:

Anschließend wurde mit dem kinasierten Primer Gesamt-H19 amplifiziert mit dem o.g. Ligationsansatz als Template:

AP1 (10 µM)	7,0 µl
10x Kinase Puffer	1,0 µl
ATP (10 mM)	1,0 µl
T4 Kinase (10 U/µl)	1,0 µl
36 min, 37°C + 5 min, 94°C im Thermocycler	

PCR-Ansatz (kinasierte Gesamt-H19)

Steriles H ₂ O	30,5 µl
10x KlenTaq-Puffer	5,0 µl
dNTP-Mix (100 mM)	0,5 µl
kin. Primer AP1 (7,0 µM)	5,0 µl
Primer B (10,0 µM)	2,5 µl
Template (Ligation)	4,0 µl
KlenTaq-Polymerase	1,0 µl
Formamid (3 % f.c.)	1,5 µl total: 50,0 µl

Temperaturbedingungen:

Initialdenaturierung:	94°C / 1,0 min
Zyklusdenaturierung:	94°C / 15,0 sec
Annealing + Elongation	68°C / 3,5 min
Finalelongation	72°C / 7,0 min
20 Zyklen	

Das kinasierte H19-Produkt wurde über ein 1,0 % Agarosegel gereinigt und standardeluiert, um anschließend in den pCR®Bac-Vektor ligiert zu werden. Laut Protokoll wurden Vektor und H19-Insert im molaren Verhältnis 1:3 ligiert. Der Vektor ist doppelt so groß wie das H19-Insert.

Transformation

Nehmen Bakterien Fremd-DNA auf, so spricht man von Transformation, da hierbei i.d.R. die genetische

Ligation:

H19-PCR-Produkt (90 ng/μl)	1,0 μl
pCR [®] Bac-Vektor (30 ng/μl)	2,0 μl
Steriles H ₂ O	5,0 μl
10x Ligasepuffer	1,0 μl
T4-DNA-Ligase (4,0 U/μl)	1,0 μl
Total: 10,0 μl, 14°C, 5,0 h	

Ausstattung und damit die Eigenschaften des Bakteriums verändert werden. Bei der Transformation von Plasmiden erlangen die Bakterien eine oder mehrere Antibiotika-Resistenzen, mit denen später in der Zellkultur auf plasmidhaltige Bakterien selektiert werden kann. Damit Bakterien Fremd-DNA mit hoher Effektivität aufnehmen, müssen sie "kompetent" sein, d.h. die Durchlässigkeit der Bakterienwand für Fremd-DNA wird z.B. durch Behandlung mit Ca²⁺-Ionen bzw. DMSO/PEG 3350 erhöht. Es wurden fertige kompetente Zellen des Kit-Herstellers verwendet (TOP10F⁺, 50 μl-Aliquots). Ein Aliquot wurde zur Transformation des obigen Ligationsansatzes auf Eis aufgetaut, mit 2,0 μl 0,5 M β-Mercaptoethanol versetzt und mit einer Pipette verrührt (nicht pipettiert, Zellen sind empfindlich). 2,0 μl des obigen Ligationsansatzes wurden zu den kompetenten Zellen gegeben, mit einer Pipette verrührt und 30 min auf Eis stehen gelassen. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 30 sec im 42°C-Wasserbad, gefolgt von einer 2 min Inkubation auf Eis. Es wurden 250 μl RT-SOC-Medium zupipettiert und alles bei 37°C für 1 h im Thermomixer (Stufe 6) inkubiert. Dieser Schritt ist nicht zwingend notwendig, aber vorteilhaft zur Rekonstitution der Zellen und damit sie ihre neugewonnene Antibiotikaresistenz exprimieren können. 25 bzw. 250 μl des Transformationsansatzes wurden jeweils auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium: 2 % Trypton (Pepton 140), 0,5 % Hefeextrakt, 0,05 % NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glukose

2.2.1.4 Charakterisierung der Klone

Von beiden Platten wurden 16 Kolonien mit einer Impföse gepickt und jeweils 10 ml ampicillinhaltiges LB-Medium angeimpft. Die Plasmide der 15 angewachsenen Kulturen wurden standardmäßig präpariert (2.7.5). Um Religanden zu identifizieren, kann mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden, dass nur in der H19-Sequenz schneidet, nicht aber im Plasmid. Hierfür bietet sich wiederum *Pst* I an, da die Schnittstelle einmal in H19 vorkommt, nicht aber im Plasmid. Zeigt das Plasmid nach dem Verdau im Agarosegel das Laufverhalten eines zirkulären Plasmids, so handelt es sich um einen Religanden. Jeweils 0,3 μg Plasmid wurden mit 1,5 U *Pst* I für 1,5 h bei 37°C inkubiert und auf einem 0,8 % 0,5x TBE-Agarosegel aufgetrennt.

Sequenzierung, Auswertung

Die aufschlussreichste Methode zur Charakterisierung ist jedoch die Sequenzierung. Man erhält Sequenzdaten, die man unmittelbar über das Internet mit Datenbanken abgleichen kann. Somit lässt sich das Insert zweifelsfrei identifizieren, der genaue Startpunkt und das Ende des Inserts werden bestimmt und Mutationen lassen sich identifizieren. Die Sequenzierungen wurden in Kooperation in der Franz-Vollhardt-Klinik (Berlin-Buch) durchgeführt. Dabei wurden standardmäßig die enzymatische Kettenabbruchmethode und ABI Sequencer verwendet. Bei dieser Methode wird ähnlich wie bei der PCR zunächst das Plasmid hitzedenaturiert und anschließend ein Sequenzierprimer hybridisiert. Eine thermostabile DNA-Polymerase verlängert nun diesen Primer am 3'-Ende entsprechend der Templatevorlage. Innerhalb des Reaktionsgemisches befinden sich neben den regulären dNTPs auch ddNTPS (2',3'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphate) im Unterschuss. Da bei ihnen die 3'-OH-Gruppe fehlt, können sie zwar in eine wachsende Kette eingebaut, nicht aber verlängert werden. Bei ihnen endet also die Polymerisation, es kommt zum Kettenabbruch. Dieser erfolgt statistisch, so dass jede Nukleotidposition durch einen Kettenabbruch und damit einen DNA-Strang charakteristischer Länge repräsentiert ist. Zur Unterscheidung, welches der vier ddNTPs gemäß dem Template eingebaut wurde und somit die Sequenz an dieser Position charakterisiert, ist jedes ddNTP mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Nach der Auftrennung der Reaktion in einem denaturierenden Polyacrylamid-Sequenziergel werden die Farbstoffe und damit die Nukleotide beim Gelauslauf mittels eines Lasers identifiziert. Im Gegensatz zu früheren, radioaktiven Verfahren bietet dieses den immensen Vorteil, dass im Gel nur eine statt vier Spuren benötigt wird und durch die Automatisierung mittels Laser die Identifizierung der Sequenz stark vereinfacht wurde.

Pro Sequenzierreaktion wurden 1,0 µg Plasmid-DNA in 5,0 µl Bidest sowie 10 pmol (i.d.R. 1,0 µl) des einzusetzenden Primers vorbereitet und in -20°C bis zur Abholung gelagert. Die per E-mail eingehenden Sequenzdaten wurden per Internet mittels BLAST Search mit der größten Nukleotid-Sequenzdatenbank auf Homologien untersucht:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi> Stand 12/2000

Über die Abweichungen und manuellen Vergleich mit den Chromatogrammen der jeweiligen Sequenzierreaktion konnten Mutationen identifiziert werden.

2.2.2 Durchmustern einer λ-Phagen-Bibliothek

Da die Sequenzierung der mittels PCR gewonnenen H19-Klone belegte, dass alle PCR bedingte

Punktmutationen aufwiesen, war das nächste Ziel, aus einer humanen plazentalen λ -Phagen cDNA Bibliothek H19-Klone zu isolieren, da diese die Mutationen nicht aufweisen und somit der physiologischen Situation näherkommen sollten. Hierzu wurden *E.coli*-Zellen mit Phagen infiziert und auf eine LB-Agarplatte gegossen. Nachdem die Phagen in den lytischen Zyklus übergegangen waren, bildeten sich Phagenplaques im Bakterienrasen. Die Phagen-DNA wurde durch Abdruck auf einer Nylonmembran fixiert, und nach der Denaturierung sollten mittels einer H19-DNA-Sonde geeignete Kandidatenphagen identifiziert werden.

2.2.2.1 Medien, Bakterienstämme, Phagenplatten

LB-Medium, LB-Agarplatten: siehe allg. Methoden, 2.7.5.

Kanamycin-Stammlösung (kan): 25 mg/ml in H₂O = 500x (-20°C)

Tetrazyclin-Stammlösung (tet): 15 mg/ml in H₂O = 1000x (-20°C)

Chloramphenicol-Stammlösung (cam): 34 mg/ml in EtOH abs. = 1000x (-20°C)

LB/tet- bzw. LB/kan/cam-Agarplatten wurden hergestellt, indem LB-Agar autoklaviert und nach Abkühlen auf 50°C die Antibiotika zugegeben wurden. Die Platten wurden gegossen und bei 4°C gelagert. Endkonzentrationen. tet: 15 µg/ml, kan: 50 µg/ml, cam: 34 µg/ml.

MgSO₄-bzw. MgCl₂-Stammlösung: 1 M, Maltose-Stammlösung: 20 % (w/v) sterilfiltriert.

LB/MgSO₄-Nährmedium bzw. -Agarplatten enthielten 10 mM MgSO₄ und LB/MgSO₄/Maltose-Nährmedium zusätzlich 0,2 % Maltose.

LB/MgSO₄-Soft-Topagarose enthielt statt Agar 7,5 g Agarose.

10x Lambda-Vedünnungspuffer: NaCl 1,0 M; MgSO₄•7H₂O 0,1 M; Tris-HCl (pH 7,5) 0,35 M.

Bakterienstämme (*E. coli*):

1. XL 1-Blue: tetrazyklinresistent, werden zur Produktion von Phagenplaques verwendet.

2. BM25.8: kanamycin- und chloramphenicolresistent, dienen der cre-lox vermittelten

Konvertierung von λ TriplEx zum Plasmid pTriplEx.

Die mit der Phagenbibliothek mitgelieferten Glyzerinstammkulturen wurden zunächst auf einer LB-Platte mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert zur Produktion von Einzelkolonien. Diese "Stammplatten" wurden bei 4°C gelagert. Um "Arbeitsplatten" zu erstellen, wurden Einzelkolonien der Stammplatten auf LB-Platten ausgestrichen, die neben den Antibiotika 10 mM MgSO₄ enthielten. Auch diese Platten wurden bei 4°C gelagert und mit ihren Einzelkolonien Nährmedien angeimpft.

Um **Platten mit Phagenplaques** zur Abdrucknahme herzustellen, wurde folgendermaßen vorgegangen: Mit einer Einzelkolonie der XL-1 Blue Arbeitsplatte wurden 15 ml LB/MgSO₄/Maltose-Nährmedium angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden bei 4000 g für 5 min pelletiert und das Pellet in 7,5 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Davon wurden 200 µl mit 5 µl einer 1:10.000-Verdünnung der Phagenbibliothek für 15 min im 37°C-Wasserbad in einem 12 ml PPN-Röhrchen inkubiert. Dazu wurden 3 ml geschmolzene LB/MgSO₄-Soft-Topagarose (geschmolzen im Mikrowellengerät und in einem zweiten Wasserbad auf 45°C temperiert) gegeben. Das Röhrchen wurde zur Durchmischung einmal umgedreht und der Inhalt sofort auf eine vorgewärmte (37°C), trockene 90 mm LB/MgSO₄-Platte ausgegossen. Durch Kreisen der Platten wurde die geschmolzene Agarose gleichmäßig verteilt. Bei Raumtemperatur erstarrte die Agarose schließlich, und die Platte wurde umgedreht bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.2.2 Herstellung der Hybridisierungssonde

Um Phagenplaques zu identifizieren, die die H19-Sequenz enthalten, wird eine markierte H19 spezifische DNA-Sonde benötigt, die mit der immobilisierten Phagen-DNA hybridisieren kann. Hierzu bietet sich an, mit der Phagenbibliothek als Template eine H19 spezifische PCR durchzuführen und das Produkt aus dem Agarosegel zu eluieren. Das Erscheinen des spezifischen Produktes belegt zudem, dass H19-cDNA in der Bibliothek vorhanden ist. Für diese PCR wurden die Primer B (siehe 2.2.1.2) und Primer C (siehe unten) verwendet, die ein 630 bp großes Produkt vom 3'-Ende von H19 amplifizieren. Diese Primerkombination lieferte stets ein einheitliches Produkt mit der besten Ausbeute. Bei der anschließenden Markierung unter Verwendung des DIG DNA Labeling Kits ist laut Herstellerangaben die Markierungseffizienz bei ca. 700 bp am höchsten.

Primer C: 5'-GTGAAGCTAGAGGAACCAGACCTCATCAGCCCAAC-3'

PCR-Ansatz (Sonde)

Steriles H ₂ O	37,5 µl
10x KlenTaq-Puffer	5,0 µl
dNTP-Mix (100 mM)	1,0 µl
Primer C bzw. B (je 10 µM) je	2,0 µl
Template (λ-TriplEx-Lysat)	1,5 µl
KlenTaq-Polymerase	1,0 µl total:50 µl

Temperaturbedingungen:

Initialdenaturierung:	94°C / 45,0 sec
Zyklusdenaturierung:	94°C / 20,0 sec
Annealing + Elongation	68°C / 2,5 min
30 Zyklen	

Das PCR-Produkt wurde standardmäßig aus dem 1,5 %igen Agarosegel eluiert.

Zur Herstellung einer 5'-spezifischen Sonde wurde unter den o.g. Bedingungen mit den Primern A3 (5'-GAACCGAGGGGCAACCAGGGGAAGAT) und 5 (5'-GCACAGGGGTGGCC

AGCGTAGGGTCCAG-3') unter Verwendung von 200 ng des unter 2.2.1.3 hergestellten H19-Klon Nr. 5 als Template ein 960 bp großes Produkt amplifiziert.

Markieren der DNA mit Digoxigenin

Maximal 3,0 µg wässrige DNA-Lösung wurden für 10 min im 100°C-Heizblock denaturiert und sofort auf Eis/NaCl schockgekühlt. Auf Eis wurden hinzugegeben: 2,0 µl Hexanukleotid-Mix, 2,0 µl dNTP Markierungs-Mix (0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-11-dUTP, alle übrigen 1,0 mM), steriles Wasser bis zu einem Endvolumen von 19,0 µl und 1,0 µl Klenow-Enzym (= 2,0 U). Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Dabei werden die hybridisierten Hexanukleotide durch das Enzym gemäß der H19-Vorlage verlängert und dabei Digoxigenin statistisch eingebaut. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2,0 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) gestoppt und nach Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl sowie 75 µl EtOH für 2 h bei -20°C gefällt. Nach der Zentrifugation (12.000g, 4°C, 15 min) wurde das Pellet mit 300 µl 75 % EtOH gewaschen, zentrifugiert und nach Überstandsabnahme vakuumgetrocknet. Es wurde in 50 µl Bidest gelöst. Durch Spotten einer Verdünnungsreihe im Vergleich zu einer im Kit enthaltenen DIG-markierten Kontroll-DNA wurde die Konzentration näherungsweise bestimmt. Dazu wurde die DIG-DNA auf einer Nylonmembran immobilisiert und mit einem Antikörper gegen DIG inkubiert, an den das Enzym alkalische Phosphatase kovalent gebunden ist. Die Enzymaktivität wurde durch lilablaue Präzipitatbildung nach Substratzugabe (NBT/BCIP) angezeigt (siehe auch allg. Methoden, 2.7.6).

2.2.2.3 Identifizierung H19-positiver Phagen

Die Phagenplaques bestehen aus lysierten *E. coli*-Zellen, die durch die Freisetzung großer Mengen λ-Phagen entstanden sind. Um nun H19-tragende Phagen von allen anderen zu unterscheiden, muss deren DNA auf einer Membran immobilisiert und mit einer H19-spezifischen Sonde hybridisiert werden. Nach der **Entwicklung** der Membran zeigt das lilablaue Präzipitat die Hybridisierung der Sonde und damit einen H19-tragenden Phagen an. Durch Übereinanderlegen von Abdruckmembran und Phagenplatte kann schließlich der Phagenplaque identifiziert, mit einer Pasteurpipette ausgestanzt und weiter vermehrt werden. Kann der Phagenplaque nicht allein ausgestanzt werden durch zu große Nähe zu einem anderen Plaque, so wird mit diesem Plaque die ganze Prozedur wiederholt, wobei jetzt wesentlich mehr positive Signale mit eindeutiger Zuordnung zu einem Einzelplaque zu erwarten sind. *Durchführung:*

Eine auf die Form der Plaqueplatte zugeschnittene Nylonmembran wurde ohne Luftblaseneinschluss für 4 min auf diese gelegt. Dabei werden mit einer Nadel drei asymmetrische Stiche

durch Membran und Agarose vorgenommen, um später beide korrekt übereinander legen zu können, was zur korrekten Phagenisolation essentiell ist. Wurden zwei Abdrücke von einer Platten genommen (um z.B. mit 5'- und 3'-Sonde zu hybridisieren), so wurde die erste Membran für 2 min und die zweite Membran für 5 min auf der Platte belassen. Die nun an der Membran haftenden Phagen wurden denaturiert, damit die DNA einzelsträngig vorlag, indem man die Membran mit der Phagenseite nach oben für 30 sec auf der Denaturierungslösung schwimmen ließ, um sie dann für 5 min unterzutauchen. Dann wurde die Membran für 5 min in Neutralisationslösung untergetaucht und anschließend kurz in 2x SSC.

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl; 0,5 N NaOH

Neutralisationslösung: 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0

20x SSC-Stammlösung: 0,3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat•2H₂O, pH 7,0 mit NaOH

Zur kovalenten Bindung der DNA wurden die Membranen für 30 min bei 120°C gebacken. Zur Prähybridisierung wurden die Membranen für 2 h bei 42°C in Rollflaschen unter Drehen im HYBAID-Ofen mit je 15 ml DIG Easy Hyb inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C mit 5 ml DIG Easy Hyb, die 15 ng/ml bei 68°C denaturierter Sonde enthielt. Die Entwicklung der Membranen (Nachweis DIG-markierter Nukleinsäuren) erfolgte gemäß 2.7.6.

Die Präzipitatspots und Nadeleinstiche wurden positionsgleich auf einer OH-Folie markiert, um durch Auflegen der Plaqueplatte gemäß den Nadeleinstichen die positiven Plaques zu identifizieren. Handelte es sich um ineinander gelaufene Plaques, so wurde mit einer Pasteurpipette ausgestanzt, in 500 µl 1x Lambda-Verdünnungspuffer (2.2.2.1) unter vortexen eluiert und mit 2 bzw. 5 µl neue Plaqueplatten hergestellt und erneut durchmustert.

2.2.2.4 Konvertierung der Phagen zu Plasmiden

Mit einer Einzelkolonie von der BM25.8-Arbeitsplatte wurden 10 ml LB/MgSO₄ angeimpft und über Nacht bei 31°C unter Schütteln (150 rpm) inkubiert (OD₆₀₀ 1,1-1,4 gegen LB). Gleichzeitig wurde über Nacht bei 4°C ein positiver Einzelplaque in 350 µl 1x Lambda-Verdünnungspuffer (2.2.2.1) eluiert. Zu der BM25.8-Kultur wurden 100 µl 1 M MgCl₂ gegeben. 200 µl dieser Kultur wurden mit 150 µl Plaqueeluat in einem 12 ml PPN-Röhrchen ohne Schütteln im 31°C-Wasserbad für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl LB-Medium wurde bei 31°C für 1 h mit 225 rpm geschüttelt. Davon wurden 5 µl auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden nichtinfizierte BM25.8-Zellen ausgestrichen.

Mit gewachsenen Einzelkolonien wurden 5 ml ampicillinhaltiges LB-Medium angeimpft und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Plasmidpräparation nach Standardvorschrift (2.7.5).

Zeigte die Konzentrationsbestimmung mittels UV-Messung an, dass keine Plasmide vorhanden waren, so wurden mit der gesamten "Plasmidlösung" kompetente TOP10F'-Zellen transformiert (siehe 2.2.1.3) und erneut Plasmide präpariert.

2.2.2.5 Isolierung der λ -Phagen-DNA

Wenn die Konvertierung zum Plasmid fehlschlug, wurde die gesamte Phagen-DNA isoliert, um dann die H19-cDNA durch Restriktionsverdau zu isolieren und umklonieren zu können. Dazu wurden mit einer Einzelkolonie der XL-1 Blue-Arbeitsplatte 10 ml LB/MgSO₄ angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Ein positiver Plaque wurde über Nacht bei 4°C in 400 μ l 1x Lambda-Verdünnungspuffer (2.2.2.1) eluiert. 600 μ l der Kultur wurden mit 80-90 μ l Eluat für 20 min bei 37°C inkubiert. Mit diesem Gesamtansatz wurden 100 ml LB/MgSO₄ angeimpft und bei 37°C geschüttelt (130 rpm). Nach dem Anwachsen der Bakterien war die Lysis schließlich nach 6-7 h vollendet (keine Schlieren mehr, Lösung klar). Die Isolierung der Phagen-DNA erfolgte mit dem Lambda-DNA-Kit von QIAGEN (PEG-Präzipitation und Anionenaustausch). Um Zelltrümmer zu pelletieren, wurde bei 8000 g für 10 min bei RT zentrifugiert. Zum Überstand wurden 200 μ l L1 gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml eiskaltem L2 wurde für 60 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei RT und 11.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml L3 resuspendiert, nach Zugabe von 3 ml L4 für 20 min im 70°C-Wasserbad erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 3 ml L5 und sofortiger vorsichtiger Vermischung wurde für 30 min bei 4°C und 15.000 g zentrifugiert und der Überstand auf eine mit 3 ml QBT äquilibrierte QIAGEN-tip 100-Säule gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit 10 ml QC wurde mit 5 ml QF eluiert und nach Zugabe von 3,5 ml Isopropanol zum Eluat durch Zentrifugation bei RT, 30 min und 15.000g die DNA präzipitiert. Nach dem 70 % EtOH-Wasch wurde die luftgetrocknete DNA in 10-20 μ l Bidest gelöst.

L1: 300 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,2 mg/ml BSA; 20 mg/ml RNase A; 6 mg/ml DNase I

L2: 30 % (w/v) PEG 6000; 3,0 M NaCl **L3:** 100 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 25 mM EDTA

L4: 4 % (w/v) SDS **L5:** 3,0 M KOAc, pH 5,5

QBT: 750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15 % (v/v) EtOH; 0,15 % (v/v) Triton X-100

QC: 1,0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15 % (v/v) EtOH

QF: 1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 15 % (v/v) EtOH

2.2.2.6 Analytik mittels PCR, Restriktionsverdau

Zur Analytik mittels PCR wurden Primer verwendet, die die Multiple Cloning Site (MCS) sowohl der Phagen als auch der möglichen Plasmide flankieren und somit das cDNA-Insert amplifizieren. Sollte das Insert aus einer vollständigen H19-cDNA bestehen, so sollte das Amplifikat eine Größe von ca. 2,35 kb aufweisen. Als Template diente eluierte Phagen-DNA, wobei ein positiv identifizierter Kandidatenphage mit einer Pasteurpipette isoliert und in 30 µl Bidest 10 min gevortext wurde. Davon wurden 3 µl zur PCR eingesetzt.

5'-Amplimer: 5'-CTCGGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGT-3'

3'-Amplimer: 5'-ATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCC-3'

PCR-Ansatz (Insert)

Steriles H ₂ O	15,8 µl
10x KlenTaq-Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix (100 mM)	0,5 µl
5'-Amplimer (10,0 µM)	1,0 µl
3'-Amplimer (10,0 µM)	1,0 µl
Template (Ligation)	3,0 µl
KlenTaq-Polymerase	0,5 µl
3 % Formamid	0,7 µl total: 25,0 µl

Temperaturbedingungen:

Initialdenaturierung:	94°C / 0,5 min
Zyklusdenaturierung:	94°C / 20,0 sec
Annealing + Elongation	68°C / 4,0 min
5,0 µl-Abnahmen nach 20, 30, 40 Zyklen	
20 Zyklen	

Die PCR-Produkte wurden auf einem 0,8 %igen 1x TAE-Agarosegel bei 100 V aufgetrennt. Da alle Insert-Amplifikate zu klein waren, wurde mittels PCR überprüft, ob das 3'- bzw. das 5'-Ende vorhanden waren. Hierzu wurden entweder die Insert-Amplifikate aus dem Agarosegel eluiert oder die eluierte Phagen-DNA direkt als Template eingesetzt.

5'-spezifische Primer: A3: siehe 2.2.2.2 + 2: siehe 2.2.1.1

3'-spezifische Primer: C:siehe 2.2.2.2 + B: siehe 2.2.1.2

Alle wurden zusammen in einer Reaktion eingesetzt.

PCR-Ansatz (H19 3'-bzw. 5')

Steriles H ₂ O	10,0 µl
10x KlenTaq-Puffer	2,0 µl
dNTP-Mix (100 mM)	0,4 µl
A3, 2, C, B (je 10,0 µM)	0,8 µl
Template (Eluat)	4,0 µl
KlenTaq-Polymerase	0,4 µl total: 20,0 µl

Temperaturbedingungen:

Initialdenaturierung:	94°C / 0,5 min
Zyklusdenaturierung:	94°C / 15,0 sec
Annealing + Elongation	68°C / 1,33 min
40 Zyklen	

Die PCR-Produkte wurden auf einem 0,8 %igen 1x TAE-Agarosegel bei 100 V aufgetrennt. Alternativ ließ sich das Insert aus der Phagen-DNA mit *Not* I herausschneiden, da diese Schnittstelle Bestandteil des 5'-Adapters bei der cDNA-Herstellung war (CLONTECH) und außerdem in der MCS 3' vom Insert vorhanden war. Hierzu wurde die gesamte DNA mit einer entsprechen-

den Menge 10x REACT3 und 1,0 μl (= 10 U) versetzt, über Nacht verdaut und auf einem 0,8 % 1x TAE-Agarosegel aufgetrennt.

2.3 Umklonierung eines H19-Klons

Wurde mit den bisher erstellten H19-Klonen RNA mittels *in-vitro*-Transkription hergestellt, so enthielten die Transkripte zusätzlich zur H19-Sequenz am 5'-Ende 23 und am 3'-Ende 31 Nukleotide als Artefakt der Klonierungsstrategie. Um der physiologischen Situation möglichst nahe zu kommen, war das nächste Ziel, durch eine Umklonierung diese vektorspezifischen Zusatzsequenzen auf ein Minimum zu reduzieren. Zu diesem Zweck musste die H19-DNA möglichst präzise, d.h. ohne Zusatzsequenzen aus dem Ursprungsvektor ausgeschnitten und unmittelbar hinter den T7-Promotor des Zielvektors kloniert werden (5'-Ende). Außerdem musste unmittelbar hinter der H19-Sequenz eine Restriktionsschnittstelle generiert werden, um dann nach Restriktionsverdau und *run-off*-Transkription möglichst keine Zusatzsequenz am 3'-Ende zu erhalten. Bei dieser Gelegenheit bot sich an, dort gleichzeitig einen poly-A-Schwanz bei der RNA zu generieren, da H19 *in vivo* ebenfalls polyadenyliert vorliegt (Brannan *et al.*, 1990).

2.3.1 Isolation der H19-DNA, Adapterproduktion und -ligation

Isolation der H19-DNA

Da der verwendete Klon am 5'-Ende die Consensus-Sequenz enthielt (diese enthält zwei *Eco* RI und eine *Not* I-Schnittstelle) und am 3'-Ende eine *Not* I-Schnittstelle (vgl. 2.2.1.2, Primer B), wurde die H19-DNA mit einem kombinierten *Not* I/*Eco* RI-Verdau aus dem Ursprungsvektor (pBac5) isoliert. Nur *Not* I zu verwenden und damit an beiden Enden die gleichen Überhänge zu erzeugen war nicht möglich, da anschließend an jedes Ende ein unterschiedlicher Adapter ligiert werden sollte. *Not* I/*Eco* RI-Verdau:

Bidest	99,0 μl	Die Reaktion wurde bei 37°C für 6 h inkubiert und anschließend nach Zugabe von 4,0 μl (=40 U) <i>Eco</i> RI weiter bei 37°C über Nacht inkubiert.
10x REACT3	14,0 μl	
pBac5 (5,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	20,0 μl	
<i>Not</i> I (15 U/ μl)	<u>3,0 μl</u>	
	136,0 μl	

Zu der Reaktion wurden 12,0 μl 10% (w/v) SDS und 5,0 μl Proteinase K (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) gegeben und für 2 h bei 46°C inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit dem gleichen Volumen Phenol extrahiert und einmal mit Chloroform. Zur Fällung wurde zur wässrigen Phase ein halbes Volumen 4 M NaOAc (pH 5,0) und ein 2,5faches Volumen EtOH abs. gegeben und für 20 min

bei RT und 15.000 g zentrifugiert. Es wurde standardmäßig mit 70 % EtOH gewaschen, in 100 µl Bidest gelöst, präparativ auf einem 0,8 % 1x TAE-Gel aufgetrennt, gefärbt und eluiert.

Adapterproduktion und -ligation

Da durch den Restriktionsverdau die Consensus-Sequenz am 5'-Ende von H19 zu $\frac{2}{3}$ entfernt wurde, musste sie durch Ligation mit einem Adapter entsprechender Sequenz wieder hergestellt werden. Gleichzeitig wurde ein Adapter an das 3'-Ende ligiert zur Generation des poly-A-Schwanzes und der Restriktionsschnittstelle (*Nsi* I, s.u.). Zur Produktion der Adapter wurden Oligonukleotide entsprechender Sequenz gekauft, phosphoryliert (synthetischen Oligonukleotiden fehlt die 5'-Phosphatgruppe, die aber für Ligationsreaktionen benötigt wird) und zu Doppelsträngen hybridisiert. Oligonukleotid-Sequenzen: *Für den 5'-Adapter*

Eco RI-Überhang

512: 5'-TTCTAGAATTCAGCGGCCGCTG-3'
52: 3'- GATCTTAAGTCGCCGGCGACTTAA-5'

Für den 3'-Adapter ↓

31: 5'-GGCCA(30x)ATGCAT-3'
322: 3'- T(30x)TACGTATT-5'

Not I-Überhang ↑ *Nsi* I

Die Anordnung entspricht bereits den späteren Adaptern.

Die wässrigen Lösungen hatten eine Konzentration von 100 µM. 10,0 µg zu ligierende H19-DNA entsprach 12,55 pmol 5'- bzw. 3'-Enden. Es wurde jeweils mit einem hundertfachen Überschuss Adapter (= 1,3 nmol) ligiert, um Multimerisierungen der H19-DNA zu unterdrücken.

Phosphorylierung:

		5'		3'	
Oligo	512	13,0 µl	31	13,0 µl	Die Reaktionen wurden bei 37°C für 60 min inkubiert.
Oligo	52	13,0 µl	322	13,0 µl	
10x Kinasepuffer		3,3 µl		3,3 µl	
ATP (10 mM)		2,0 µl		2,0 µl	
T4-Kinase (10 U/µl)		<u>1,5 µl</u>		<u>1,5 µl</u>	
		32,8 µl		32,8 µl	

Hybridisierung: Direkt im Anschluss an die Phosphorylierung wurden die Reaktionen im PCR-Cycler folgendermaßen behandelt: 94°C, 5 min; in 10 min auf 63°C; in 10 min auf 58°C; in 10 min auf 53°C; dann langsam auf 4°C abkühlen lassen. Zur Überprüfung der Hybridbildung wurden von den Oligonukleotiden und den Adapterhybriden je 1,0 µl entweder auf ein 20 % Polyacrylamidgel in 1x TBE bei 120 V oder auf ein 4 % low-melt-Agarosegel in 0,5x TBE bei 90 V aufgetragen, elektrophoretisiert und mittels Ethidiumbromid gefärbt. Da Kinase- und Ligasepuffer kompatibel sind, konnten die obigen Reaktionen direkt zur Ligation mit H19-DNA/*Not* I/*Eco* RI eingesetzt werden. *Ligation :*

H19-DNA-Eluat (1,37 µg/µl)	7,3 µL (=10 µg)	Inkubation über Nacht bei 16°C im PCR-Cycler
5'-bzw. 3'-Adapterhybride	31,0 µl	
10x Ligasepuffer	7,9 µl	
T4-DNA-Ligase (20 U/µl)	2,0 µl total: 79,2 µl	

Die Reaktion wurde mit 30 µl DNA-Probenpuffer versetzt, auf einem 0,8 % 1x TAE-Agarosegel bei 80 V getrennt, die Produktbande standardmäßig ausgeschnitten, eluiert, phenolextrahiert und ethanolpräzipitiert.

Ligationskontrolle

Zur Überprüfung des Ligationserfolges wurden in einer PCR-Reaktion für beide Enden jeweils ein Adapter-Oligo mit einem H19-Primer kombiniert: 512 + 2 und C + 322. Als Kontrolle diente das H19 tragende Ursprungsplasmid pBac5 mit den H19-Primern A3 + 2 und C + B, wobei fast gleich große Produkte zu erwarten waren wie bei der Adapter-PCR.

Es wurden 12 ng Template pro PCR verwendet.

PCR-Ansatz (Ligation)

Steriles H ₂ O	27,8 µl
10x KlenTaq-Puffer	4,0 µl
dNTP-Mix (100 mM)	0,6 µl
Primer (je 10 µM) 4x	1,5 µl
Template	1,0 µl
KlenTaq-Polymerase	0,6 µl total: 40,0 µl

Temperaturbedingungen:

Zyklusdenaturierung:	94°C / 20,0 sec
Annealing	60°C / 45,0 sec
Elongation	72°C / 1,3 min
Abnahme nach 7, 12, 17, 22 Zyklen (je 5,0 µl)	

2.3.2 Vorbereiten des Zielvektors

Als Zielvektor wurde pGEM[®]-3Zf(+) der Firma Promega ausgewählt, da er gleich im Anschluss an den T7-Promotor eine Restriktionsschnittstelle aufweist (*Eco* RI) und die MCS auch sonst aus Schnittstellen besteht, die im Labor bereits vorhanden waren. Die MCS ist außerdem innerhalb der Sequenz des α -Peptids der β -Galactosidase lokalisiert, so dass Blau-Weiß-Screening beim Klonieren möglich war. Der Vektor wurde zunächst standardmäßig mit *Eco* RI über Nacht geschnitten, phenolextrahiert und über ein 0,8 % 1x TAE-Gel bei 80 V gereinigt, aus dem Gel eluiert, phenolextrahiert und ethanolgefällt. Diese Prozedur setzte bei der späteren Transformation die Zahl der Bakterienkolonien stark herab, die lediglich das Ursprungsplasmid trugen.

Um nun adapterligierte H19-DNA in diesen Vektor zu ligieren, müssen die beim *Eco* RI-Verdau produzierten 5'-Überhänge entweder entfernt oder zumindest partiell aufgefüllt werden. Im ersten Fall bietet sich die Behandlung mit Mungbohnen-Nuklease an und im zweiten Fall die Behandlung mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I.

Mungbohnen-Nuklease

Die Mungbohnen-Nuklease katalysiert die Hydrolyse einzelsträngiger DNA bzw. RNA unter leicht sauren Bedingungen (pH 5,0) in Gegenwart von mind. 0,1 mM Zn^{2+} -Ionen. Somit sollten die 5'-Überhänge nach dem *Eco* RI-Verdau abgespalten werden und stumpfendige Vektor-DNA übrigbleiben. Laut Herstellerangaben sollte 1,0 µg geschnittener Vektor mit 5,0 U Nuklease bei 25°C inkubiert werden. Eine andere Literaturquelle (Sambrook *et al.*, 1989) nennt 3,75 U pro 5,0 µg Plasmid für 1 h bei 37°C als Reaktionsbedingungen. In Vorversuchen erwiesen sich beide Angaben als nicht zutreffend, da die DNA sehr stark, d.h. weit über den Einzelstrangbereich hinaus, degradiert wurde. Somit bestand die Notwendigkeit, zunächst die Inkubationsbedingungen zu optimieren. Hierzu wurde der Vektor mit einem Restriktionsenzym mitten in der MCS linearisiert (*Xba* I), dann mit der Nuklease (0,5 U/µg) bei 25 bzw. 37°C für 10, 20 oder 30 min in 10,0 µl Reaktionen inkubiert. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die Reaktionen durch Zugabe von 1,0 µl 10 mM EDTA und 10,0 µl TE-Puffer gestoppt. Es wurde standardmäßig phenolextrahiert und ethanolpräzipitiert. Es wurde nicht dephosphoryliert, um die nach der Religation, Transformation und Plasmidpräparation erhaltenen Plasmide durch analytischen Restriktionsverdau auf das Vorhandensein der Schnittstellen 5' bzw. 3' von der Linearisierungsstelle testen zu können.

10x Nukleasepuffer:

300 mM NaAcetat (pH 4,5-5,0), 500 mM NaCl, 10 mM $ZnCl_2$, 0,01 % Triton X-100

Anordnung der betreffenden Restriktionsschnittstellen in der MCS (5' ⇒ 3'): *Bam* HI *Xba* I *Sal* I

Für die eigentliche Ligation mit Adapter-H19 (inklusive Dephosphorylierung des *Eco* RI-linearisierten Vektors) siehe *Partielles Auffüllen mit Klenow-Fragment*. In diesem Falle wurden zur Adapterproduktion andere Oligonukleotide 512 bzw. 322 eingesetzt, denen am 5'-Ende die beiden Thymidinnucleoside fehlten, da es sich um eine stumpfendige Ligation handelte.

Partielles Auffüllen mit Klenow-Fragment

Da das Arbeiten mit Mungbohnen-Nuklease immer wieder nur Religanden statt der gewünschten Ligationsprodukte brachte, wurde die Strategie geändert. Das dabei eingesetzte Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I diente dem partiellen Auffüllen des *Eco* RI-Überhanges, indem lediglich dATP in der Reaktion angeboten wurde. Damit verblieben AA-Überhänge, die mit den TT-Überhängen der Adapter-H19 komplementär sind (kohäsive Enden.), was die Ligationseffizienz wesentlich steigern sollte. Außerdem sind die beiden AA-Überhänge nicht mehr komplementär, was die Religation reduzieren sollte. Ferner sollten statistisch Sense- und Antisense-Konstrukte entstehen, so dass später auch Sense- und Antisense-RNA (zu Kontrollzwecken) hergestellt werden kann.

Auffüllreaktion:

Steriles Wasser	160,0 µL	Inkubation für 30 min bei RT
10x Klenowpuffer	20,0 µl	10x Klenowpuffer:
dATP (100 mM)	1,0 µl	100 mM Tris-HCl (pH 7,5),
pGEM/ <i>Eco</i> RI/eluiert (0,9 µg/µl)	16,0 µl	50 mM MgCl ₂ , 75 mM DTE
Klenow-Fragment (5 U/µl)	3,0 µl total: 200,0 µl	

Anschließend wurde wiederum phenolextrahiert und ethanolgefällt.

2.3.3 Klonierung des Gesamtkonstruktes**Ligation**

Zur Ligation der Adapter-H19 mit dem oben vorbereiteten Vektor wurden molare Verhältnisse Vektor/Insert von 1:1 und 1:3 gewählt. Als Kontrollen wurden der eluierte Vektor und der eluierte, aufgefüllte Vektor unter gleichen Bedingungen eingesetzt (Religationskontrollen). Für die 1:1 Reaktion wurden 100 ng Vektor mit 72 ng Adapter-H19 eingesetzt, für die 1:3 Reaktion entsprechend 100 ng Vektor mit 216 ng. Vektor plus Insert ergaben ein Volumen von 2,0 µl. Die Kontrollen wurden entsprechend mit Bidest aufgefüllt. Zu jeder der Reaktionen wurden 8,0 µl Mastermix pipettiert bestehend aus 5,0 µl Bidest, 2,0 µl 5x Puffer und 1,0 µl T4-DNA-Ligase (5,0 U/µl). Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 14°C.

Herstellung kompetenter Zellen

Es wurde mit dem *E. coli*-Stamm JM109 gearbeitet. Um die Zellen für die Aufnahme der Plasmid-DNA kompetent zu machen, wurde mit TSS-Lösung gearbeitet (Chung *et al.*, 1989).
Methode:

- 50 ml LB-Medium werden mit 1 ml einer Übernachtskultur (in LB) JM109 angeimpft.
- Unter Schütteln wird bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 inkubiert.
- Es wird 10 min bei 1000 g und 4°C zentrifugiert.
- Der Überstand wird abdekantiert.
- Das Zellpellet wird in $\frac{1}{10}$ des Kulturvolumens (= 5 ml) 1x TSS resuspendiert.
- 150 µl Aliquots werden in flüssigem N₂ gefroren und bei -80°C gelagert.

1x TSS-Lösung: LB-Medium mit: 10 % PEG 3350, 5 % DMSO, 50 mM MgCl₂, pH 6,5

Transformation

Neben den vier o.g. Ligationsreaktionen wurde mit drei weitere Kontrollen transformiert: pGEM/*Eco* RI (nur linearisiert), pGEM/*Eco* RI/eluiert und pGEM/*Eco* RI/eluiert/aufgefüllt. Von diesen

Lösungen wurden vor der Transformation 1:10 Verdünnungen erstellt, während die Ligationsreaktionen unverdünnt eingesetzt wurden. Jeweils 1,0 µl wurden zu 150 µl auf Eis getauten kompetenten Zellen gegeben und vorsichtig gemischt (= pipettiert). Nach einer Inkubation auf Eis für 25 min folgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 45 sec. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 2 min wurde zu jeder Transformation 1 ml LB-Medium gegeben und für 45 min bei 37°C im Thermomixer (200 rpm) geschüttelt (zur Rekonstitution und Expression der Antibiotikaresistenz). Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 1000 g wurde der Überstand abdekantiert, mit der Restflüssigkeit das Pellet resuspendiert und zur Selektion auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Blau/Weiß-Screening wurde die Platte vorher wie folgt behandelt: Die Platte wurde aus 4°C für 30 min im 37°C-Schrank vorgewärmt und getrocknet. Anschließend wurden je 40 µl IPTG (100 mM) und X-Gal (40 mg/ml) vermischt auf der Platte gleichmäßig verstrichen und wiederum 15 min bei 37°C getrocknet.

Am nächsten Tag wurden mit farblosen Kolonien ampicillinhaltige (100 µg/ml) 10 ml LB-Medien angeimpft und wiederum über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Davon werden je 500 µl mit 150 µl 87 % Glycerin vermischt und in -20°C gelagert. Der Rest wurde zur Plasmidpräparation eingesetzt. Langzeitlagerung von Glycerinkulturen erfolgte bei -80°C.

Analytik mittels Restriktionsverdau/Sequenzierung

Für eine erste Analyse boten sich Restriktionsverdau mit verschiedenen Enzymen an. *Pst* I ist ideal geeignet, da es genau einmal in H19 nach dem ersten Drittel der Sequenz schneidet und genau einmal in der MCS des Vektors hinter (= 3') der H19-Klonierungsstelle. Anhand der Größe des ausgeschnittenen Fragments war also auch zu erkennen, ob die H19-Sequenz in Sense- oder Antisense-Orientierung hinter den T7-Promotor kloniert wurde. Ferner wurde die Anwesenheit beider Adapter durch einen kombinierten *Eco* RI/*Nsi* I-Verdau überprüft. Hierbei sollte genau das H19-Insert ausgeschnitten werden. Als Drittes wurde mit diesen beiden Enzymen nochmals einzeln verdaut, um Falschpositive, die einen Adapter an beiden H19-Enden trugen, zu identifizieren. Reaktionsbedingungen:

Je 0,35 µg Plasmid-DNA wurden für 2 -3 h bei 37°C in 10,0 µl-Reaktionen mit jeweils 2,0 U Enzym verdaut, direkt mit DNA-Probenpuffer versetzt und auf einem 0,8 % 1x TAE-Agarosegel bei 90 V aufgetrennt. Puffer: *Pst* I mit 10x REACT 2, *Eco* RI und *Nsi* I jeweils und zusammen mit 10x REACT 3. Von den 10x-Puffern wurde je 1,0 µl pro 10,0 µl-Reaktion eingesetzt.

Von jeweils einem Sense- und einem Antisense-Klon wurde das komplette Insert plus Randsequenzen nach der in 2.1.1.4 beschriebenen Methode durchsequenziert und mittels BLAST analysiert.

2.4 Herstellung, Modifizierung und Immobilisierung der H19-RNA

2.4.1 T7-Transkription

Herstellung unmodifizierter RNA

Um *run-off*-Transkription durchführen zu können, wurden die Plasmide zunächst standardmäßig folgendermaßen linearisiert (über Nacht, 37°C, 0,5 - 1,0 U/µg DNA, 1,0 µg/µl DNA):

Sense = pGEM3S1: - **Nsi I**, allerdings Überhangentfernung mit T4-DNA-Polymerase oder Klenow-Fragment vorteilhaft, weil durch den *Nsi* I-3'-Überhang die Transkriptqualität leidet.

- Alternativ: **Bam HI** oder **Sal I**, es hingen dann noch kurze Zusatzsequenzen aus der MCS hinter dem poly-A-Schwanz.

Antisense = pGEM3A1: - **Xba I** oder **Bam HI** (plus kurze Zusatzsequenzen)

DHFR = pHelm1,9: - **Eco RV**. Dieser Vektor enthielt hinter dem T7-Promotor drei Mal die Sequenz von DHFR (Dehydrofolatreduktase), was nach der Linearisierung ein Transkript von 1,9 kb Länge ergibt und als Negativkontrolle diente. Der Vektor wurde freundlicherweise von Helmut Merk, RINA GmbH zur Verfügung gestellt.

Da die Puffer für den *Nsi* I-Verdau und die Behandlung mit T4-Polymerase kompatibel waren, wurden zu dem ÜN-Verdau einfach dATP (100 µM f.c.) und 1,0 U T4-DNA-Polymerase pro µg DNA gegeben und eine halbe Stunde bei RT inkubiert. Durch die Exonukleaseaktivität wurde so der 3'-Überhang entfernt. Der gesamte Ansatz wurde anschließend standardmäßig phenolextrahiert, gelfiltriert und ethanolgefällt. Alle anderen Verdauungen wurden ohne weitere Reinigung direkt als Template für die Transkription eingesetzt.

Für die Transkription wurde ein Enzymmix der Firma Promega (RiboMAX™) eingesetzt. Dieser Mix enthält neben der T7-Polymerase noch Pyrophosphatase, die das bei der Nukleinsäure-Polymerisation anfallende Pyrophosphat zu Monophosphat spaltet und damit das Gleichgewicht der Gesamtreaktion in Richtung Produkte treibt, was höhere RNA-Ausbeuten mit sich

bringt. Eine weitere Steigerung war erreichbar, wenn der rNTP-Mix der Nukleotidverteilung der H19-RNA entsprach (U:A:C:G = 4,0:4,8:6,5:8,0).

In-vitro-Transkription:

DEPC-H ₂ O	ad 50,0 µl	5x Puffer:	400 mM HEPES-KOH, pH 7,5
5x Puffer	10,0 µl		120 mM MgCl ₂
rNTP-Mix (100mM)	15,0 µl		10 mM Spermidin
Template (Plasmid lin.)	6-10 µg		200 mM DTT
RNase Inhibitor (20 U/µl)	1,0 µl		
T7-Enzymmix	4,5 µl		

Nach einer Inkubation bei 37°C für 4,0 h wurde die Plasmid-DNA durch Inkubation mit 1,0 µl (= 10 U) DNase I bei 37°C für 30 min abgebaut. Durch Zugabe von 2,0 µl 0,5 M EDTA-Lösung wurde die Reaktion gestoppt und die RNA nach Zugabe von 45,0 µl DEPC-H₂O standardmäßig durch Phenolextraktion, Gelfiltration und Ethanol-fällung gereinigt (2.7.4). Die in DEPC-H₂O gelösten RNA-Pellets wurden nach Zugabe von 0,5-1,0 µl RNase Inhibitor (= 10 - 20 U) bei -20°C gelagert.

Herstellung modifizierter RNA

Während der Transkription können statistisch Digoxigenin-, Biotin- oder ³²P-modifizierte rNTPs eingebaut und die RNA damit verändert werden. So bietet die Firma Roche RNA-Markierungsmixturen an, in denen 35% des enthaltenen UTPs an der Base kovalent mit Digoxigenin bzw. Biotin derivatisiert sind. Um die Strukturbildung der RNA nicht zu sehr zu stören, wurde ein Verhältnis zwischen markiertem und unmarkiertem UTP gewählt, dass nur jedes 30. UMP in der RNA die entsprechende Modifikation trug.

DIG/Bio-Mix: 10 mM ATP; CTP, GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG/Bio-UTP

Bei Verwendung von 10,0 µl DIG/Bio-Mix: $3,5 \times 10 = 35$ nmol DIG/Bio-UTP $\times 30$ (facher Überschuss UTP) = 1050 nmol - 65 nmol (aus DIG/Bio-Mix) = 985 nmol UTP werden benötigt: Stamm = 100 mM = 100 nmol/µl, $985/100 = 9,85$ µl UTP-Stamm müssen zum DIG/Bio-Mix pipettiert werden, sowie die anderen rNTPs entsprechend ihrem Verhältnis in H19. Diese 1:30-Mixtur wurde in der obigen Transkription an Stelle des rNTP-Mixes eingesetzt. Bei der Aufarbeitung der Transkripte wurde wegen des unpolaren Charakters von Digoxigenin auf die Phenolextraktion verzichtet.

Um die RNA für Vorversuche nach Ligationen und Immobilisierungen quantifizierbar zu machen, wurden Transkriptionen in Gegenwart von α -³²P-CTP durchgeführt. Die Durchführung entsprach dem Standardansatz *in-vitro*-Transkription unter Zugabe von 1,0 µl α -³²P-CTP (3,3 µM, 10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol.). Die Aktivität wurde über Cerenkow-Zählung ermittelt.

2.4.2 Endmarkierung der RNA

Hierbei sollten die RNA-Moleküle an einem Ende mit einer immobilisierbaren Gruppe (DIG/Biotin) versehen werden, um den statistischen Einbau und damit mögliche Strukturbehinderungen zu vermeiden. Die Immobilisierung eines Endes an eine Matrix könnte bei der Inkubation mit einem physiologischen Proteingemisch einen gewissen Schutz vor Exonukleasen bieten.

Terminale Transferase

Das Enzym Terminale Transferase (TdT) katalysiert in einer Template-unabhängigen Reaktion die Verknüpfung von dNTPs mit den 3'-OH-Enden doppel- oder einzelsträngiger DNA unter Abspaltung von Pyrophosphat. Das Enzym akzeptiert eine ganze Reihe modifizierter Nukleotide, so auch digoxigenin- und biotinmodifizierte. Rosemeyer et al. berichteten 1995, dass dies auch mit einzelsträngigen Oligoribonukleotiden funktioniert. Somit wäre es denkbar, H19-RNA spezifisch mit diesem Enzym am 3'-Ende unter Benutzung von DIG-11-ddUTP genau ein DIG-haltiges Nukleotid anzufügen. H19 wäre somit über dieses 3'-Ende an Magnetobeads immobilisierbar und dieses DIG könnte die Struktur von H19 nicht mehr stören.

5x TdT-Puffer: 1,0 M Kaliumkacodylat, 125 mM Tris-HCl (pH: 6,6), 1,25 mg/ml BSA

Standardreaktion:

5x TdT-Puffer	7,3 µl
25 mM CoCl ₂	2,4 µl (= 1,6 mM f.c.)
DIG-11-ddUTP (1,0 mM)	1,2 µl
H19-RNA (2,0 µg/µl)	25,0 µl
TdT (25 U/µl)	1,0 µl
total: 36,7 µl, Inkubation bei 37°C für 1,5 h	

Die RNA wurde durch Gelfiltration und Ethanol-fällung gereinigt. Um die Stabilität der RNA in den Einzelkomponenten zu testen, wurden 3,0 µg RNA in 15,0 µl-Reaktionen mit den obigen einzelnen Standardkomponenten (statt DIG-11-ddUTP wurde jedoch DEPC-H₂O eingesetzt) in obigen Konzentrationen bei 37°C inkubiert und nach 4 mal 20 min je 3,0 µl (= 0,6 µg) mit 6,0 µl RNA-Probenpuffer versetzt, erhitzt und auf einem 1,0 % 1x TAE-Agarosegel aufgetrennt.

T4-RNA-Ligase

Das Enzym T4-RNA-Ligase katalysiert die Ligation von 5'-Phosphat-DNA oder -RNA an 3'-Hydroxyl-DNA oder -RNA unter Hydrolyse von ATP zu AMP und Pyrophosphat. Substrate sind einzelsträngige DNA- bzw. RNA-Moleküle. Mit Hilfe dieses Enzyms besteht also die Möglichkeit, H19-RNA am 3'-Ende mit Digoxigenin bzw. Biotin zu markieren, indem sie mit einem DNA- oder RNA-Oligomer ligiert wird, dass am 5'-Ende phosphoryliert und am 3'-Ende durch

Digoxigenin bzw. Biotin blockiert ist (Unterdrückung der Multimerisierung der Oligomeren). Ein RNA-Dimer wurde freundlicherweise für Voruntersuchungen von Felix Hausch aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Jäschke der Abteilung von Prof. V.A. Erdmann der FU Berlin zur Verfügung gestellt. Dieses Dimer bestand aus zwei Cytidinen, das am 5'-Ende phosphoryliert und am 3'-Ende über einen photospaltbaren Linker mit einem Biotinmolekül kovalent verknüpft war (im Folgenden pCCBio genannt, Hausch und Jäschke, 1998). Da dieses Dimer nur begrenzt zur Verfügung stand und RNA-Synthesen sehr teuer sind, wurde es in seiner Ligationseffizienz mit einem DNA-Oligomer verglichen, das aus fünf Adeninen bestand, welches ebenfalls 5'-phosphoryliert und 3'-blockiert war durch Digoxigenin (im Folgenden pA5DIG genannt).

Reaktionsbedingungen:

³² P-markiertes Transkript	8,0 - 16,0 µg (= 10 - 20 pmol)
pCCBio bzw. pA5DIG (je 124 pmol/µl)	2,5 - 5,0 µl (30 - 40facher Überschuss)
10x T4-RNA-Ligasepuffer	2,0 µl
T4-RNA-Ligase (20 U/µl)	3,0 µl (3,0 U/µl Gesamtreaktion)
DEPC-H ₂ O	ad 20,0 µl

10x T4-RNA-Ligasepuffer: 500 mM Tris-HCl (pH 7,8) 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP

Inkubationsbedingungen: ÜN bei 4°C oder RT bzw. 37°C, ÜN bzw. 2,5 und 5,0 h

Jeder Ansatz wurde anschließend standardmäßig gelfiltriert und ethanolgefällt. Die Radioaktivität wurde sowohl vom gesamten Ligationsansatz als auch vom gereinigten, gelösten Pellet gemessen. Um nun den Anteil an erwünschtem Ligationsprodukt nach der Reaktion zu ermitteln, wurde das Produkt an magnetische Partikel immobilisiert. Die nach der magnetischen Separierung im Überstand verbleibende Aktivität entsprach also nichtligiertem Ausgangstranskript, während die immobilisierte Aktivität dem Anteil des gewünschten Produktes entsprach.

Hierzu wurde von den Herstellerangaben (Roche) ausgegangen, dass an 100 µl magnetische Partikel (10 mg/ml) ca. 10,0 pmol große Nukleinsäuren (z.B. 1,5 kb dsDNA = 10 pmol dsDNA/mg Partikel) immobilisiert werden können. Für biotinmarkierte RNA wurden Streptavidinpartikel und für DIG-markierte RNA Anti-DIG-Partikel verwendet. Es wurden Partikelmengen eingesetzt, die von ihrer Bindungskapazität her der Menge an Ausgangstranskript entsprachen. Nach dem Binden und Waschen wurde die RNA zumindest teilweise durch Proteinase K-Verdau von den Partikeln wieder abgelöst, phenolextrahiert und zur Qualitätskontrolle auf einem Agarosegel aufgetrennt, nachdem die Aktivität (in cpm) jeder Fraktion gemessen wurde. Vorgehensweise:

TEN₁₀₀-Lösung: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl

TEN₁₀₀/SDS/ProtK: 180 µl TEN₁₀₀ + 5 µl 10 % (w/v) SDS + 9 µl Proteinase K (14 mg/ml)

- Partikel dreimal in einem Vol. TEN₁₀₀ waschen, d.h. magnetische Separation, Resuspension
- Entsprechende Menge resusp. Partikel zum Ligationsprodukt geben, pipettmix, 45 min RT, immer wieder mischen durch pipettieren

- Magnetische Separation, Überstand = ÜS1, dreimal waschen in je einem Ausgangsvol. TEN₁₀₀, alle vereinigten = ÜS2
- Resuspension und Inkubation der Partikel in je 20 µl TEN₁₀₀/SDS/Proteinase K bei 37°C für 15 min
- Phenolextraktion und Lyophilisieren der wässrigen Phase (=Eluat), aber nicht bis zur Trockne, Zugabe von 10 µl RNA-PP, Separierung auf 0,8 % 1x TAE Agarosegel bei 100 V
- Aktivität messen von ÜS1, 2, Phenol, Eluat und magn. Partikel, Σ = Gesamtaktivität; $\Sigma(\text{Eluat} + \text{Partikel})$ / Gesamtaktivität x 100 = % Ligationsprodukt

2.4.3 Immobilisierung der RNA

Um H19-Bindungsproteine zu isolieren, musste die RNA an eine Matrix immobilisiert werden, um sie nach der Inkubation mit einem komplexen Gemisch aus beispielsweise cytosolischen Proteinen zusammen mit möglichen Bindungsproteinen wieder isolieren zu können. Hierzu standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: die Immobilisierung an magnetische Partikel und die Immobilisierung an derivatisierter Agarose zur Konstruktion einer Affinitätsäule.

Magnetische Partikel

Hierbei ist es prinzipiell günstiger, erst die RNA an die Partikel zu binden und dann diese beladenen Partikel mit Proteingemischen zu inkubieren. Besonders endmarkierte Moleküle erfahren einen gewissen Schutz vor Exonukleasen, und die Separation aus dem Proteingemisch würde schneller erfolgen. Die Partikel könnten außerdem maximal beladen werden. Da die Endmarkierungen jedoch zu aufwendig und teuer waren und starke Qualitätsschwankungen aufwiesen, wurde nur mit RNA gearbeitet, in die statistisch DIG eingebaut wurde. Die Immobilisierung erfolgt grundsätzlich wie in 2.4.2 beschrieben: durch dreimaliges Waschen einer adäquaten Menge Partikel, Resuspension in TEN₁₀₀-Lösung, Zugabe eines Überschusses DIG-H19 (14 µg = 17,5 pmol auf 0,6 mg Partikel) und Inkubation bei RT für 30 min. Es entstanden großklumpige Komplexe vermutlich durch Quervernetzung, da jedes H19-Molekül im Schnitt 10 - 12 DIG-Moleküle trug. Daraufhin wurde die RNA ohne Immobilisierung direkt in die Proteinlösungen gegeben und nach Inkubation diese durch Fischen mit magnetischen Partikeln zurückgewonnen (siehe 2.6).

OligotexTM-Partikel

Bei diesem Verfahren der Immobilisierung werden Latex-Partikel (QIAGEN) verwendet, an die kovalent Oligonukleotide aus 30 Thymidinen gekoppelt sind. Da das Sense-Transkript von H19 einen 30 Nukleotide langen poly-A-Schwanz trägt, sollte es sich durch Hybridisierung an diese

Partikel immobilisieren lassen. Nachteilig war, dass nur das Sense-Transkript, aber nicht das Antisense-Transkript oder andere zur Verfügung stehende klonierte Sequenzen immobilisierbar waren, da es als einziges über einen poly-A-Schwanz verfügte. Ohne Kontrollen ist ein solches Experiment jedoch nur bedingt aussagekräftig. Trotzdem wurde folgendermaßen damit gearbeitet:

Oligotex™ Suspension: 1 mg/10 µl

2x Bindungspuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1000 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,2 % SDS

DialyseII-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM KCl, 10 mM NaPhosphat, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,05 % NP-40, 10 % Glycerin

OW2: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

Kapazität laut Hersteller: 10 pmol Nukleinsäure pro 1 mg (= 10 µl) Oligotex™

300 µl 2x Bindungspuffer wurden mit 300 µl DEPC-H₂O verdünnt und mit 5 µl (= 10 µg = 12,5 pmol) H19 und 25 µl Oligotex™ Suspension versetzt, 5 min bei 65°C erhitzt und 15 min bei RT stehen gelassen. Parallel wurde ein Kontrollansatz ohne H19 verarbeitet. Anschließend wurde zentrifugiert (2 min, RT, 15.000 g), das Oligotex™-Pellet in 250 µl DialyseII-Puffer resuspendiert, wiederum zentrifugiert, das Pellet in 25 µl DialyseII-Puffer resuspendiert und anschließend mit Proteinen inkubiert (siehe 2.6)

Hydrazidagarose

Eine im Vergleich zu den magnetischen Partikeln aufwendigere Methode zur Immobilisierung von RNA besteht in der kovalenten Bindung der RNA an Agarosepartikel, wodurch Affinitäts-säulen konstruiert werden können. Gegenüber den Partikeln bietet diese Methode mehrere Vorteile: Es lassen sich wesentlich größere Mengen an RNA immobilisieren unter leicht sauren, d.h. für RNA schonenden Bedingungen. Das 3'-Ende der RNA ist durch die kovalente Bindung an die Matrix vor Exonukleasen geschützt. Die Faltung der RNA wird nicht durch den Einbau derivatisierter Nukleotide gestört. Außerdem ist die Matrix im Vergleich zu den Partikeln wesentlich preisgünstiger. Der Nachteil ist, dass die RNA nach der kovalenten Bindung nicht mehr von der Matrix eluiert und auf einem Agarosegel auf ihre Unversehrtheit nach der Protein-inkubation überprüft werden kann.

Vorgehensweise: 200-400 µg des entsprechenden Transkripts wurden mit einem 2000-3000 fachen Überschuss an NaIO₄ in 0,1 M NaOAc pH 5,0 für 1,0 h Bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe des doppelten Volumens EtOH abs. wurde die RNA für 1 h bei -20°C gefällt, mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet, in 200 µl DEPC-H₂O gelöst, mit 5,0 µl 4 M NaOAc pH 5,0 angesäuert und erneut mit EtOH gefällt. Das gelöste Pellet wurde erneut mit 4 M NaOAc pH 5,0 angesäuert (0,1 M f.c.).

Für jedes Transkript wurden ca. 300 µl sedimentierte Hydrazidagarose (Pharmacia) je 2x mit DEPC-H₂O und 3x mit 0,1 M NaOAc gewaschen, d.h. zupipettieren des 1-2fachen Volumens bei gleichzeitiger Durchmischung, Sedimentieren bei 2000 g und Abnahme des Überstandes.

Die oxidierte RNA wurde zur gewaschenen Hydrazidagarose in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben, dieses mittels Klebestreifen an eine Peristaltikpumpe geklebt und bei maximaler Umdrehung bei 4 °C für mind. 3 h inkubiert.

Die RNA-Agarose wurde jeweils in eine kleine Plastiksäule (Mobitec) mit entsprechenden Fritten gegeben. Zunächst ließ man den Überstand durchlaufen (ÜS1, Fällung mit doppeltem Volumen EtOH abs.) und anschließend weitere 300 µl 0,1 M NaOAc (ÜS2). Es folgten weitere Waschschritte: 900 µl 0,5 M NaCl (ÜS3), 900 µl 2,0 M NaCl (ÜS4) sowie 900 µl 1x A1-Puffer (ÜS5). Die aus ÜS1 gefällte RNA sowie die restlichen Überstände wurden photometrisch vermessen und die jeweils enthaltenen RNA-Mengen bestimmt. Die Summe wurde von der ursprünglich eingesetzten oxidierten RNA-Menge abgezogen, um so indirekt die Menge der auf der jeweiligen Säule immobilisierten RNA zu bestimmen.

1x A1-Puffer: 30 mM Tris-HCl pH 7,5, 130 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1,0 mM DTE

2.5 Isolation cytosolischer Proteine aus humaner Plazenta

Da die humane Variante von H19 kloniert wurde und *in vivo* H19-RNA im Cytosol von Plazentagewebe auftritt, sollten mögliche H19-spezifische Proteinliganden in diesem Gewebe zu finden sein. Außerdem ist Plazentagewebe das einzige humane Gewebe, das in frischem Zustand über Entbindungsstationen von Krankenhäusern organisiert werden kann. Zur Inkubation mit immobilisierter RNA wurden die Proteine folgendermaßen isoliert:

0,9 % (w/v) NaCl-Lösung

1x A1-Puffer: 30 mM Tris-HCl pH 7,5, 130 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1,0 mM DTE

200x PIC (Proteinase-Inhibitor-Cocktail): 2 mg/ml Aprotinin und Leupeptin, 30 mg/ml Pefabloc

Es wurde grundsätzlich bei 4°C gearbeitet. Eine Plazenta wurde in 0,9 % NaCl-Lösung auf Eis ins Institut transportiert. Die Nabelschnur wurde entfernt und die Plazenta mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Mittels Schaber und Rasiermesser wurden Blutgefäße, Chorionplatte etc. entfernt und das isolierte Gewebe in einem Becherglas mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Nachdem das Gewebe mittels Rasiermesser und Schaber weiter zerkleinert und anschließend nochmals gewaschen wurde, wurde es in einen Warring Blender überführt und mit ca. dem gleichen Volumen 1x A1-Puffer versetzt. Für 20 sec. wurde auf niedriger und anschließend für 50 sec. auf höchster Stufe homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein Becherglas überführt und das Retentat erneut mit Puffer versetzt und homogenisiert. Die Homogenisate wurden vereinigt

und zentrifugiert (JA-14-Rotor, 8.500 rpm = 11.000 g, 4°C, 25 min). Der Überstand wurde in ein Becherglas überführt und sukzessive unter Rühren mit festem Ammoniumsulfat versetzt (50 % = 29,1 g/100ml). Es wurde ÜN bei 4°C gerührt. Nach Überführen in Falcon-Tubes wurden die gefällten Proteine bei 4°C und 4000 g pelletiert (P50). Zum Überstand wurden weitere 26,8 g/100ml festes Ammoniumsulfat gegeben, um die 90 %-Proteinfraktion zu erhalten (P90).

Zu jedem Protein-Pellet pro Falcon-Tube wurden 2 ml 1x A1-Puffer gegeben und nach Resuspension für 2 h auf Eis stengelassen. Alle Resuspensionen wurden vereinigt und in einen verknoteten Spektrapor-Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgrenze von 3500 Dalton gegeben und gegen 1 l 1x A1-Puffer bei 4°C dialysiert. Nach zweifachem Pufferwechsel wurde über Nacht weiter dialysiert. Es wurde bei 15.000 g zentrifugiert und der Überstand mit 200x PIC versetzt (1x f.c.). Nach der Zugabe von 10 % (v/v) Glycerin wurden die Proteine bei -20°C gelagert. Die Konzentration wurde standardmäßig bestimmt (BCA).

2.6 Isolation und Identifikation RNA-bindender Proteine

Zu diesem Zweck wurden die Transkripte entweder an magnetische bzw. OligotexTM-Partikel oder Hydrazidagarose immobilisiert, um anschließend mit Plazenta-Proteinen inkubiert zu werden bei Anwesenheit eines Überschusses an Kompetitor (Hefe-tRNA) und gegebenenfalls Heparin. Nach dem Entfernen unspezifisch gebundener Proteine durch Waschen wurden die spezifischen durch Behandlung mit einem Hochsalzpuffer eluiert, aufkonzentriert und nach PAGE sichtbar gemacht. Bei den magnetischen Partikeln war es notwendig, die RNA zunächst mit den Proteinen zu inkubieren und anschließend die RNA mittels Partikeln zu "fischen" (vgl.2.4.3).

Magnetische Partikel, OligotexTM-Partikel

1x A1-Puffer: 30 mM Tris-HCl pH 7,5, 130 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1,0 mM DTE

TEN₁₀₀₀-Lösung: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1000 mM NaCl

Zu 200 µl Plazenta-Proteine P50 (= 4 mg) in 1x A1-Puffer wurden 30 µg DIG-H19 bzw. Antisense-RNA sowie 60 µg tRNA (= 40facher Überschuss) gegeben und 30 min bei RT unter gelegentlicher Durchmischung inkubiert. 200 µl magnetische Partikel wurden durch mehrfaches Waschen in 1x A1-Puffer äquilibriert, in 50 µl 1x A1 resuspendiert, zur Protein/H19-Lösung gegeben und für 15 min bei RT und gelegentlicher Resuspension inkubiert. Nach magnetischer Separation und Überstand-(ÜS) Entfernung wurden die Partikel 3x mit je 150 µl Waschpuffer (1x A1 + 50 µg/ml tRNA) gewaschen. Die 4. Waschfraktion wurde aufbewahrt für die PAGE. Eluiert wurden mit 3x 150 µl TEN₁₀₀₀. Für die PAGE wurden die Fraktionen mit Ultrafree-MC-Zentrifu-

gationsröhrchen (Ausschluss 10 kD, Millipore) bei 5000 g aufkonzentriert bzw. entsalzt. Die Proteine wurden standardmäßig auf einem 10 % Polyacrylamidgel (4,5 % Sammelgel) aufgetrennt.

H19-RNA wurde gemäß 2.4.3 an OligotexTM-Partikel immobilisiert und für 10 min bei RT in 150 µl (=3,0 mg) Plazenta-Proteinen, dialysiert gegen DialyseII-Puffer, inkubiert. Die Latex-Beads wurden durch Zentrifugation (2 min 15.000 g, RT) pelletiert und zunächst mit 2x 100 µl DialyseII-Puffer gewaschen (W12-Fraktion). Nach dem 3. Wasch (W3) wurden Proteine durch zweimaliges Waschen in DialyseII-Puffer/1 M NaCl eluiert, wobei hier durch spezielle Säulen des mRNA-Isolationskits zentrifugiert werden musste, da die Partikel nicht mehr pelletierten. Die Fraktionen wurde wie bei den magnetischen Partikeln konzentriert und durch PAGE aufgetrennt.

Agaroseaffinitätssäulen

1x A1-Puffer: 30 mM Tris-HCl pH 7,5, 130 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1,0 mM DTE

TEN₁₀₀₀-Lösung: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1000 mM NaCl

Die Säulen wurden gemäß 2.4.3 präpariert. Es wurde bei RT gearbeitet. Zu den Plazenta-Proteinen in 1x A1-Puffer wurden 120 µg/ml tRNA und 100 U/ml RNasin gegeben sowie gegebenenfalls 350 U/ml Heparin (ca. 2 mg/ml). Auf jede Säule wurden 2 ml (= 30 mg) Proteine P50 gegeben. Nach deren Durchlauf wurde jede Säule mit 3 x 600µl 1x A1-Puffer (50 µg/ml tRNA) gewaschen. Der Durchlauf wurde verworfen. Die 4. Wachfraktion wurde für das PAA-Gel aufgefangen. Eluiert wurde mit 900 µl TEN₁₀₀₀. Wasch- und Elutionsfraktion wurden wiederum aufkonzentriert und mittels PAGE analysiert (siehe magnetische Partikel). Die Säulen wurden durch mehrfaches Waschen mit 1x A1-Puffer regeneriert und nach Zugabe von 10-20 U RNasin bei 4°C gelagert.

MALDI, BIACORE®

Um die isolierten Proteine zu identifizieren, wurden Banden aus den gefärbten, noch nicht getrockneten PAA-Gelen mit einem Skalpell ausgeschnitten und an Mathias Dreger aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hucho übergeben, da dort die MALDI-Analysen durchgeführt wurden. Bei dieser Methoden wird der Analyt auf eine Matrix gegeben. Durch einen Laser wird die Matrix rasch angeregt mit der Folge, dass Matrix- und Analytionen bzw. dessen Fragmente in die Gasphase übergehen (MALDI = *matrix-assisted laser desorption ionization*). Im nachfolgenden TOF- (*time of flight*) Massenanalysator werden die Ionen gemäß ihrem Ladungs-Masseverhältnis aufgetrennt und vom Detektor registriert und damit die zugehörigen Peptidfragmente identifiziert. Mit den erhaltenen Werten lassen sich Datenbanken durchmustern und das zugehörige Protein

identifizieren, sofern es bereits bekannt ist. Dabei wurde zur Identifizierung der Proteine mittels der Peptidmassen über das Internet das Programm ProFound der Seite www.proteometrics.com genutzt.

Mit BIACORE[®]-Instrumenten lassen sich Interaktionen zwischen Biomolekülen in Echtzeit messen. Dabei wird das Phänomen SPR (*surface plasmon resonance*) genutzt. Hierbei wird polarisiertes Licht an der Goldoberfläche eines Sensorchips totalreflektiert. Trotz dieser Reflexion dringt ein elektromagnetisches Feld durch den Goldfilm in die darunter liegende Flusszelle mit geringerem Refraktionsindex ein (evaneszente Welle, ca. 300 nm tief). Wird nun an der Goldoberfläche in der Flusszelle ein Ligand immobilisiert oder durch die Flusszelle ein Analyt geleitet, der mit dem Liganden interagiert, so ändert dies über das elektromagnetische Feld den Reflektionswinkel des polarisierten Lichtes auf der anderen Seite des Goldfilms. Dieses Phänomen wird SPR genannt. Die Winkeländerungen werden in einem Sensorgramm als Resonanzeinheiten pro Zeit wiedergegeben. Da sowohl Analytassoziation als auch die -dissoziation entsprechende Resonanzsignale produzieren, können mit dieser Methode nicht nur spezifische Bindungen nachgewiesen, sondern beispielsweise Kinetiken gemessen werden. Ein Sensorchip enthält vier Flusszellen zur Immobilisierung jeweils eines Liganden (in unserem Falle RNA), durch die dann gemeinsam der Analyt (in unserem Falle das Protein IMP3) in einem Bindungspuffer zur Messung der Resonanz geleitet wird. Eine Flusszelle bleibt ohne Ligand zur Messung des unspezifischen Hintergrundes. Die drei verbleibenden wurden beladen mit Transkripten von H19-Sense und -Antisense sowie DHFR (1,9 kb, zur Messung von unspezifischer RNA-Protein-Wechselwirkung). Bei der anschließenden Auswertung der Sensorgramme mit Hilfe der Hersteller-Software werden die Resonanzkurven der Leerzelle und der unspezifischen DHFR-Zelle von den H19-Kurven subtrahiert, so dass die verbleibenden H19-Resonanzkurven die spezifische Interaktion zwischen diesen Transkripten und IMP3 widerspiegeln.

Zur Durchführung: Es wurde ein Streptavidin Sensorchip verwendet, um statistisch biotinylierte Transkripte von H19 Sense und Antisense sowie DHFR (1,9 kb) in den Flusszellen zu immobilisieren. Alle Kammern des Chips wurden gewaschen zur Entfernung ungebundenen Streptavidins mit 1x HBS (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,4 sowie 3 mM EDTA), 1x 0,05 % SDS und wieder 1x HBS, jeweils 50 µl/min, 250 µl. Anschließend wurden die Flusszellen mit den jeweiligen RNAs in HBS beladen, wobei Flusszelle 1 leer blieb. Die Transkripte hatten eine Konzentration von 30 ng/µl, die Flussrate betrug 10 µl/min. Folgende Mengen wurden geladen:

Flusszelle	Biotintranskript	Volumen (μl)	Resonanz (RU)	R_{max}
1	---	---	---	---
2	H19-Sense	5,0	396	29,7
3	H19-Antisense	1,0	380	28,5
4	DHFR	1,0	300	27,3

Die Menge an immobilisierter RNA spiegelt sich in der Resonanz wieder und nicht in der Menge an durchgeleiteter RNA. Für kinetische Messungen sollte laut Herstellerangaben die maximale Resonanz für eine 1:1-Interaktion zwischen Ligand und Analyt (R_{max}) zwischen 100 und 500 RU liegen, wobei folgende Beziehung gilt: $R_{\text{max}} = (MW_a / MW_l) \times RU_l$

MW_a = Molekulargewicht Analyt (Protein): IMP3 = 60 kDa

MW_l = Molekulargewicht Ligand (RNA): H19 Sense & Antisense = 800 kDa, DHFR = 660 kDa.

Durch Auflösung nach RU_l lässt sich also die Menge zu immobilisierender RNA in Resonanzeinheiten berechnen, die theoretisch zur Erreichung eines vorgegebenen R_{max} benötigt wird. Für einen R_{max} von 100 errechnet sich bei H19 Sense und Antisense ein RU_l von 1333 und bei DHFR von 1100. Vorversuche ergaben jedoch, dass bei solchen Mengen immobilisierter RNA die Interaktion mit dem Protein zu deutlich höheren Resonanzen führte als theoretisch berechnet und auch bei maximaler Proteinkonzentration kein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation erreicht werden kann. Vermutlich erfolgt keine 1:1-Bindung des Proteins an die RNA, sondern eine heterogene Bindung mehrerer Moleküle. Es wurden daher die o.g. geringeren Mengen an RNA immobilisiert.

Für die Messung der Interaktion zwischen IMP3 und den RNAs in den Flusszellen wurden vier Proteinkonzentrationen in Bindungspuffer erstellt (jeweils 300 μl): 200, 100, 50 und 20 nM. Bindungspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 120 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 1 mM DTE und 0,05 % (v/v) Surfactant P20. Die Proteine wurden jeweils mit einem 100fachen molaren Überschuss an Kompetitor-RNA (Hefe-tRNA) versetzt. Nachdem der beladene Sensorchip mit Bindungspuffer gespült wurde, wurde eine Proteinkonzentration mit einer Flussrate von 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ (250 μl total) durch alle Flusszellen geleitet (Assoziation). Anschließend wurde aus einem Reservoir Bindungspuffer zur Dissoziation mit derselben Flussrate durchgeleitet. Schließlich wurde auf dem Chip verbliebenes Restprotein durch Spülen mit 30 μl Regenerationspuffer (Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1000 mM KCl) entfernt. Nach erneutem Spülen mit Bindungspuffer konnte die nächste Proteinkonzentration durch den Chip geleitet werden.

2.7 Allgemeine Methoden

2.7.1 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese nutzt man die Tatsache, dass elektrisch geladene Moleküle sich in einem elektrischen Feld zu einer Elektrode hin bewegen. Die Geschwindigkeit der Bewegung ist dabei proportional zur angelegten elektrischen Feldstärke und zur Ladung des Moleküls sowie umgekehrt proportional zur Größe des Moleküls und dem Grad der Dichte bzw. Viskosität der Matrix, durch die das Molekül wandert (Reibung, Widerstand). Da bei den durchgeführten Elektrophoresen in einem Gel (d.h. in einer Matrix) auf alle Proben das gleiche elektrische Feld einwirkte und immer ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis vorlag, war die Wanderungsgeschwindigkeit also direkt und ausschließlich abhängig von der Größe und elektrophoretischen Beweglichkeit der in einer Probe vorhandenen Moleküle. Sie wurden also der Größe nach aufgetrennt, wobei die kleineren Moleküle schneller wanderten als die großen. Für Nukleinsäuren wurden Agarosegele verwendet und für Proteine diskontinuierliche Polyacrylamidgele (PAGE).

Agarosegele

Zur Analyse von doppelsträngigen DNA-Molekülen (Plasmid-DNA, Restriktionsfragmente, PCR-Produkte) und einzelsträngigen RNA-Molekülen (*in-vitro*-Transkripte) wurde die Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Das Polyphosphatrückgrat der Nukleinsäuren liegt bei den physiologischen pH-Werten und den verwendeten Puffern deprotoniert vor, die Moleküle sind somit negativ geladen und wandern in Richtung Anode.

Die Gelmatrix (Agarose) besteht hierbei aus linearen Polymeren, bestehend aus alternierenden D-Galaktose- und 3,6-Anhydro-L-Galaktoseeinheiten. Sie wird durch Erhitzen im Mikrowellenofen in Laufpuffer (1x TAE bzw. 0,5x TBE) gelöst, in einen formgebenden Schlitten gegossen, und nach dem Einsetzen eines taschenbildenden Kammes lässt man die Agarose durch Abkühlen erstarren. Die Dichte der Agarose und damit der auf die Moleküle wirkende Widerstand lässt sich auf das Trennproblem anpassen, d.h. je größer die Moleküle, um so niederprozentiger (w/v) die Agaroselösung und umgekehrt. Konkret wurde mit 0,8 - 1,5 % Agarosegelen gearbeitet, wobei für RNA ausschließlich 1x TAE verwendet wurde, bei DNA wurden beide Puffer verwendet.

Die ertarrten Gele wurden in die entsprechenden Gelkammern eingesetzt und mit Laufpuffer überschichtet. DNA-Proben wurden mit einem halben Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. RNA-Proben wurden mit dem doppelten Volumen an RNA-Probenpuffer versetzt, 10 min im Heizblock auf 65°C erhitzt, in Eiswasser schockgekühlt und in

die Taschen pipettiert. Elektrophoretisiert wurde bei 80 - 100 V, bis Bromphenolblau ca. 2/3 des Gels durchwandert hatte.

1x TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat
1 mM EDTA
pH 8,3

0,5x TBE-Puffer

50 mM Tris
45 mM Borsäure
0,5 mM EDTA
pH 8,4

RNA-Probenpuffer

1 ml Formamid
332 µl Formaldehyd (37% v/v)
200 µl 10x MOPS-Puffer
150 µl Bromphenolblau (0,05% w/v)
17 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

DNA-Probenpuffer

500 µl Laufpuffer
500 µl Glycerin
100 µl Bromphenolblau (0,05% w/v)

10x MOPS-Puffer

200 mM MOPS
50 mM NaOAc
10 mM EDTA
pH 6,8

Polyacrylamidgele

Um Proteingemische zu trennen, wurde die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Das Gel wird durch eine radikalische Polymerisation aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid in einem Puffer hergestellt. Als Radikalbildner dient Ammonium-Persulfat (APS), wobei die entstehenden Sulfatradikale durch N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) stabilisiert werden. Die Porengröße wird durch den Anteil an Acrylamid und seinem Vernetzungsgrad bestimmt. Im Trenngel lag der Anteil i.d.R. bei 10 %. Auf das Trenngel wird ein schmales 4,5 %iges Sammelgel gegossen, in das auch die Taschen für den Probenauftrag geformt werden. Der in diesem Gel verwendete Puffer ist leicht sauer (pH 6,8), während der pH-Wert des Trenngels und des Laufpuffers leicht basisch ist (pH 8,8). Im Laufpuffer ist die amphotere Aminosäure Glycin enthalten. Wird der Strom eingeschaltet, wandern die Pufferionen des Sammelgels in Richtung Anode. Tritt nun Glycin in das Sammelgel, so wird die Aminogruppe zur Ammoniumgruppe protoniert, während die Carboxylgruppe deprotoniert bleibt. Durch dieses Vorhandensein einer negativen und einer positiven Ladung in einem Molekül kommt dieses elektrophoretisch zum Stillstand. Da die Sammelgelionen bereits vorgelaufen sind, herrscht lokaler Ladungsträgermangel, d.h. ein hoher Widerstand. Da der Strom konstant bleibt, kommt es zu einer starken Erhöhung der lokalen Feldstärke (Ohm-Gesetz). Die anionischen Proteine laufen daher sehr schnell, bis sie die vorauslaufende Ionenfront erreichen und werden damit aufkonzentriert, um nach der Trennung im Trenngel ein scharfes Bandenmuster zu ergeben.

Damit die Proteine anionisch vorliegen, werden sie mit dem Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) behandelt. Die Proteine werden dabei in eine stabähnliche Form denaturiert und bekommen ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis. Sie können somit nach ihrer Größe getrennt werden. Über Disulidbrücken verknüpfte Polypeptidketten werden dabei durch Reduktion mittels Mercaptoethanol oder DTT in ihre Einzelketten zerlegt.

Es wurden Apparaturen für Minigele der Firma BIORAD verwendet. Nach dem Gießen des Trenngels wurde die Lösung mit 20 % Ethanol überschichtet bis zur vollständigen Polymerisation. Zum Gellauf wurden 60 mA pro Gel angelegt (200 V konstant). Es wurde eine Mischung aus 30 % Acrylamid und 2 % Bisacrylamid verwendet (ROTH)

Lösungen für zwei Minigele:

10 % Trenngel (10 ml)

Wasser	4,2 ml
4x Trenngelpuffer	2,5 ml
Acrylamid	3,3 ml
10 % APS	50 μ l
TEMED	5 μ l

4,5 % Sammelgel (5 ml)

Wasser	3,0 ml
4x Sammelgelpuffer	1,25 ml
Acrylamid	0,75 ml
10 % APS	100 μ l
TEMED	10 μ l

4x Trenngelpuffer

72,7 g Tris Base
16 ml 10 % (w/v) SDS
pH 8,8 (mit HCl)
ad 400 ml

4x Sammelgelpuffer

24,3 g Tris Base
4 ml 10 % SDS
pH 6,8
ad 400 ml

10x Laufpuffer

30 g Tris Base
144 g Glycin
100 ml 10 % SDS
pH 8,3, ad 1000 ml

SDS Probenpuffer: 4x Roti-Load (ROTH), 1/2 Probenvolumen zu jeder Probe, 5 min 95°C

2.7.2 Nachweis und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen

Nukleinsäuren wurden standardmäßig mit dem planaren, aromatischen Kation Ethidium aus Ethidiumbromid angefärbt, das mit den aromatischen Basenstapeln interkaliert. Durch Anregung mit UV-Licht (256 nm) wird dieser Fluoreszenzfarbstoff und damit die Nukleinsäurebanden in Gelen sichtbar.

DNA-Gele wurden nachgefärbt, d.h. nach dem Lauf wurden die Gele in einer Plastikschaale in 30 ml Laufpuffer für 10 min bei RT geschwenkt, zu dem vorher 1,5 μ l Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) pipettiert wurde. Bei RNA-Gelen war Ethidiumbromid bereits im Probenpuffer enthalten (2.7.1). Die Gele konnten also unmittelbar nach dem Lauf auf dem Transilluminator ausgewertet werden.

Bei der Konzentrationsbestimmung macht man sich die Tatsache zunutze, dass Nukleinsäuren wegen der aromatischen Ringsysteme der Basen ein Absorptionsmaximum von UV-Licht bei 260 nm aufweisen. Die Intensität der Absorption (A_{260}) ist dabei proportional zur Nukleinsäurekonzentration der gemessenen Probe, wobei bei DNA eine A_{260} -Einheit der Konzentration 50 μ g/ml und bei RNA 40 μ g/ml entspricht. Die in Wasser gelösten Nukleinsäuren wurden i.d.R. 1:60 mit Wasser verdünnt und ein Spektrum von 300 bis 200 nm durchgemessen.

Für **Proteine** gibt es Farbstoffe, die spezifisch Proteine komplexieren und damit im Gel sichtbar machen. Verwendet wurde ein kommerziell erhältlicher modifizierter Farbstoff auf Coomassie-Basis (BM Fast Stain, Roche). Fixieren (1h), Färben (2 h) und Waschen wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden die Gele zwischen Whatman-Papier und Zellglas unter Vakuum getrocknet. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit dem Micro BCA Protein Assay von Pierce gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Bei dieser konzentrationsabhängigen Farbreaktion wird die Proteinkonzentration anhand einer Eichgeraden (BSA-Eichreihe 0 - 40 µg/ml) ermittelt.

2.7.3 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Um ein bestimmtes DNA-Fragment (PCR-Produkt, Restriktionsfragment) z.B. für Klonierungen weiter manipulieren zu können, muss die als Bande im Agarosegel sichtbare DNA aus der Agarosematrix eluiert werden. Dazu wurde zunächst die DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Agarose wurde anschließend durch Erhitzen in einem chaotropen Hochsalzpuffer aufgelöst und die DNA an eine Silicamatrix gebunden. Nach dem Waschen der Matrix wurde die isolierte DNA mit erwärmten Bidest eluiert. Es wurden DNA Extraktionskits der Firmen InViTek, CLONTECH und QIAGEN verwendet und gemäß Herstellervorschrift verwendet. Das QIAGEN-Eluat aus den Zentrifugationssäulchen enthielt scheinbar noch Restsalze aus der Aufarbeitung, die DNA-Spektren der Konzentrationsbestimmung wurden jedenfalls durch Fremdstoffe überlagert. Daher wurde diese DNA zur weiteren Reinigung standardmäßig ethanolgefällt.

2.7.4 Nukleinsäure-Reinigung: Phenolextraktion, Gelfiltration, Ethanolfällung

Um beispielsweise RNA nach der Transkription weiter manipulieren zu können, sollte sie in hochreiner Form vorliegen, um Folgereaktionen nicht durch die Gegenwart von Salzen oder Proteinen zu stören. So sind nach der Transkription neben der RNA noch Salze, Phosphat, Mononukleotide etc. vorhanden.

Um Nukleinsäurelösungen zunächst von Proteinen zu befreien, wurde die **Phenolextraktion** durchgeführt. Durch intensives Durchmischen der wässrigen Lösung mit Phenol werden die Proteine denaturiert und verbleiben wegen ihrer teilweise hydrophoben Seitenketten in der

Interphase zwischen phenolischer und wässriger Phase, wobei letztere die hydrophilen Nukleinsäuren enthält und abpipettiert wird. Konkret wurde mit einem Gemisch aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (P/C/IAA, 25:24:1, pH 5,8, 4°C, Amresco) gearbeitet, wobei zur wässrigen Probe das gleiche Volumen P/C/IAA pipettiert und 3 min gevortext wurde. Zur schnelleren Phasentrennung wurde anschließend für 2 min bei 15.000 g zentrifugiert und die wässrige Phase zur Entfernung von Phenol mit dem gleichen Volumen eines Chloroform-Isoamylalkoholgemisches (24:1, 4°C) reextrahiert. Zur anschließenden Entsalzung und Abtrennung der Mononukleotide wurde die wässrige Phase direkt gefiltert.

Bei der **Gelfiltration** besteht die Gelmatrix aus Kügelchen eines gelartigen, hydratisierten Materials (Sephadex G-50), das eine relativ konstante Porenweite aufweist. Moleküle, deren Größe die Porenweite überschreitet (RNA), sind vom Lösungsvolumen in den Kügelchen ausgeschlossen und durchwandern die Säule schneller als kleine Moleküle (Salze, Mononukleotide), die in die Kügelchen eindringen und dort zurückgehalten werden können. Somit werden die Moleküle ihrer Größe nach getrennt. Gearbeitet wurden mit Säulen der Firma Pharmacia (NICK™), wobei maximal 100 µl wässrige Lösung auf die Säule aufgetragen wurde. Anschließend wurden 400 µl steriles Wasser auf die Säule aufgetragen und das Eluat verworfen. Das Eluat der nächsten 400 µl wurde aufgefangen und enthielt die Nukleinsäure. Zur Konzentration und zur Befreiung von Restsalzen wurde ethanolgefällt. Die Säulen wurden mit einem mehrfachen Säulenvolumen sterilen Wassers gespült, zur Konservierung mit NaN₃ versetzt und bei 4°C zur Wiederverwendung gelagert.

Bei der **Ethanol-fällung** wird zu wässrigen Nukleinsäurelösungen bei leicht saurem pH das relativ unpolare Ethanol hinzugegeben, wobei die Nukleinsäure ausfällt und durch Zentrifugation pelletiert werden kann. Die 400 µl NICK™-Eluate wurden zunächst durch Zugabe von 14 µl 4 M NaOAc-Lösung (pH 5,0) angesäuert. Anschließend wurde das doppelte Volumen Ethanol (830 µl) hinzupipettiert und durchmischt. Nach einer Inkubation bei -20°C (15 min bis mehrere Tage) wurde bei 4°C und 15.000 g für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen. RNA wurde durch kurzes Lyophilisieren getrocknet, DNA wurde lediglich luftgetrocknet, da hierbei Übertrocknung zu Problemen bei der anschließenden Lösung in sterilem Wasser führte.

2.7.5 Prokaryontische Zellkultur und Plasmidisolierung

Um eine in einen Plasmidvektor klonierte DNA zu amplifizieren und zu isolieren, mussten die

transformierten Bakterien (*Escherichia Coli*) zunächst in Kultur vermehrt und dann die Plasmid-DNA aus ihnen isoliert werden. Transformierte Zellen wurden auf Agarplatten ausgestrichen und inkubiert, um mit angewachsenen Kolonien Nährmedien anzupflanzen. Durch Anwesenheit des Antibiotikums Ampicillin sowohl in den Nährmedien als auch in den Agarplatten wurden die Zellen selektiert, die das Plasmid trugen, da nur diese Zellen durch das auf dem Plasmid lokalisierte Resistenzgen gegen Ampicillin resistent waren. Es wurde grundsätzlich mit LB-Medien und -Platten gearbeitet (Lennox-Broth):

In einem Liter deionisiertem Wasser wurden 10 g Pepton 140 (bzw. Trypton), 5 g Hefeextrakt und 5g NaCl gelöst und der pH-Wert auf 7,0 mit NaOH eingestellt. Flüssigmedien wurden anschließend in 10, 50, 100 oder 400 ml-Portionen in entsprechende Erlenmeyerkolben abgefüllt, die Öffnung mit Alufolie abgedeckt, autoklaviert und bei RT gelagert. Sollten Agarplatten hergestellt werden, so wurde dem Medium zusätzlich 15 g Agar/l zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurde der noch flüssige LB-Agar im Wasserbad auf 50°C abgekühlt, mit 100 µg/ml Ampicillin (Stamm: 100 mg/ml in Bidest) versetzt, in 90-mm-Petrischalen gegossen und nach dem Erstarren bei 4°C gelagert. Flüssigmedien wurden grundsätzlich erst unmittelbar vor dem Anpflanzen mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt.

Mit auf LB-Agarplatten gewachsenen Einzelkolonien wurden zunächst 10 ml Medien angeimpft und wie alle Flüssigkulturen ÜN bei 37°C unter Schütteln (150-220 rpm, je nach Kulturvolumen) im Heizschüttler inkubiert. Für zukünftige Plasmidpräparationen wurden zur langfristigen Lagerung **Stock-Kulturen** angelegt, indem 500 µl einer ÜN-Kultur mit 150 µl 87 % Glycerin durchmischt und bei -80°C gelagert wurden. Zum Anpflanzen von LB-Medium wurde eine Stock-Kultur auf Eis getaut und 1/1000 des LB-Volumens zu diesem pipettiert (z.B. 100 µl Stock zu 100 ml LB).

Nach der ÜN-Inkubation wurden je nach Kulturvolumen Plasmid- Mini-, Midi- oder Maxipräparationen durchgeführt. Prinzipiell werden hierbei die Zellen zunächst in Anwesenheit des Detergenz SDS unter alkalischen Bedingungen lysiert und dabei die DNA sowie Proteine denaturiert. Bei der anschließenden schlagartigen Neutralisation fallen Proteine und zufallsgeknäulte chromosomale DNA aus, während die wesentlich kleinere zirkuläre Plasmid-DNA renaturieren und in Lösung verbleiben kann. Nach der Zentrifugation wird der plasmidhaltige Überstand über eine Anionenaustauschersäule gegeben, um die Plasmid-DNA durch die Bindung an die Säule von RNA und sonstigen Kontaminationen zu befreien. Nach dem Eluieren unter Hochsalzbedingungen wird die Plasmid-DNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt, gewaschen und nach dem Trocken und Lösen in Bidest zur Konzentrationsbestimmung photometrisch vermessen.

Es wurden Kits der Firma Genomed verwendet (Jetstar) und streng nach Herstellervorschrift gearbeitet, außer dass bei der Neutralisation 10 % mehr Lösung E3 eingesetzt wurde, weil ohne RNase gearbeitet wurde (Template für spätere *in-vitro*-Transkription !!!).

2.7.6 Nachweis DIG-markierter Nukleinsäuren

Während dieser Arbeit wurden an diversen Punkten Digoxigenin (DIG)-markierte Nukleinsäuren eingesetzt. So wurden mit DIG-DNA-Sonden Phagenplaques durchmustert (2.2.2.3), mit DIG-RNA nach RNA bindenden Proteinen gesucht (2.4.3, 2.6) und DIG-RNA-Sonden zur Hybridisierung beim Northern Blot eingesetzt. Zur Überprüfung der DIG-Markierung bzw. der Lokalisation von DIG-Sonden wurde mit dem Detektionssystem der Firma Roche gearbeitet. Hierbei bindet ein Antikörper spezifisch an Digoxigenin. An diesen Antikörper wiederum ist das Enzym alkalische Phosphatase kovalent gebunden, so dass bei Zugabe geeigneter Substrate die bei enzymatischer Aktivität entstehenden Farbpräzipitate die Anwesenheit der DIG-markierten Nukleinsäure anzeigen. Als Substrat wird BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) verwendet, welches nach seiner enzymatischen Dephosphorylierung oxidativ in einen blauen Indigofarbstoff überführt wird. Als Oxidationsmittel dient NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid), welches bei dieser Reaktion ebenfalls zu einem blauen Farbstoff reduziert wird und somit farbverstärkend wirkt.

Benötigte Lösungen:

Waschpuffer

100 mM Maleinsäure, pH 7,5
150 mM NaCl 1
0,3 % (v/v) Tween® 20

Maleinsäurepuffer

100 mM Maleinsäure, pH 7,5
50 mM NaCl

Blocklösung

1 % (w/v) Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer, fertig erhältlich von Roche

Detektionspuffer

100 mM Tris-HCl, pH 9,5
100 mM NaCl

Es wurde bei RT gearbeitet. Die Membran mit der durch Crosslinking oder Hybridisierung immobilisierten, DIG-markierten Nukleinsäure wurde kurz in Waschpuffer gewaschen und 30-60 min in 100 ml Blocklösung geschwenkt. Anschließend wurde die Blocklösung ersetzt durch 20 ml Blocklösung, in die das Anti-DIG-AP-Konjugat (Roche) 1:5000 verdünnt (= 4,0 µl) wurde und für 30 min geschwenkt. Die Membran wurde dann 2x 15 min in ca. 50 ml Waschlösung geschwenkt und anschließend für 5 min in 20 ml Detektionspuffer äquilibriert. 200 µl NBT/BCIP-Stammlösung (Roche) wurden in 10 ml Detektionspuffer verdünnt, zur Membran gegeben und diese dann im Dunklen zur Entwicklung für 10 min bis 2 Tage gelagert, ohne durch Erschütterungen die Präzipitatbildung zu stören. Die Reaktion wurde bei ausreichend entwickelten

Banden oder Spots durch mehrfaches Spülen mit Bidest gestoppt und die Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen.