

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung der humanen H19-cDNA

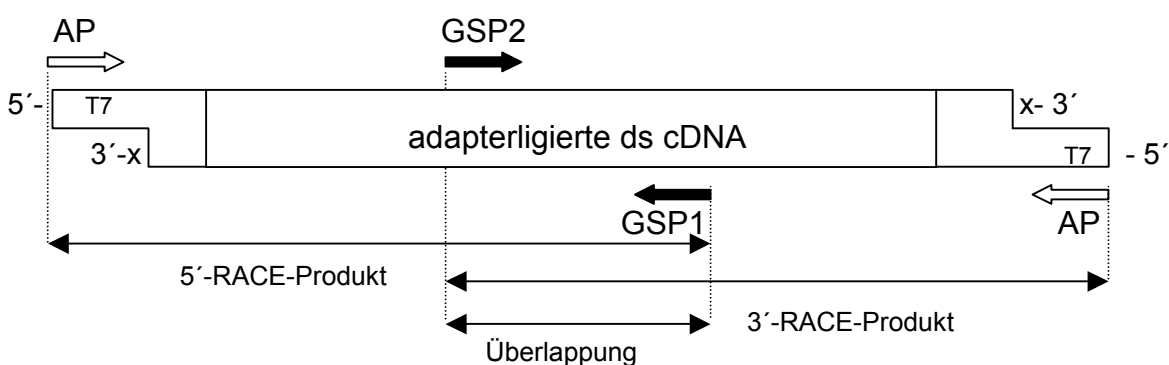
Zur Isolierung H19-bindender Proteine musste die H19-RNA zunächst in größeren Mengen (im mg-Maßstab) vorhanden sein, um ausreichend Material zur Methodenetablierung und für die eigentlichen Hauptversuche zur Verfügung zu haben. Prinzipiell ließe sich die RNA aus humanem Gewebe isolieren. Dies ist jedoch aus mehreren Gründen nicht realistisch. Da wäre zum Einen die äußerst geringe Menge an H19-RNA im Verhältnis zu allen anderen Zell- und Gewebebestandteilen, sie macht ca. 1 % der mRNA aus (Brannan *et al.*, 1990), was für eine mRNA zwar viel ist, aber für die hier benötigten Mengen extrem wenig. Zum Anderen ist die geringe Verfügbarkeit von möglichst frischem Gewebe humanen Ursprungs zu nennen, das zudem auch noch H19-RNA enthalten muss. Da die Produktion dieser RNA auf das Embryonalstadium beschränkt ist und nach der Geburt weitgehend abgeschaltet ist (Pachnis *et al.*, 1984), kämen also Embryonal- bzw. Plazentagewebe in Frage. Eine weitere mögliche Quelle wären eine Reihe von Tumorgeweben, in denen H19 wieder transkribiert wird (Nakao & Sasaki, 1996). Humanes Embryonalgewebe aus Aborten ist aus ethischen und rechtlichen Gründen nicht verfügbar. Tumorgewebe wird i.d.R. pathologisch untersucht und ist damit nicht frisch zu verarbeiten, was aber für die Isolation intakter RNA wichtig ist. Die einzige humane Gewebequelle ist somit die postnatale Plazenta, die nach einem Kaiserschnitt frisch erhältlich ist.

Die Isolation der intakten RNA einer bestimmten Sequenz ist jedoch sehr aufwendig mit der latenten Gefahr der Degradation durch endogene Nukleasen. Der hierbei zu berücksichtigende organisatorische und experimentelle Aufwand lässt die Klonierung der H19-Sequenz mit anschließender *in-vitro*-Transkription als lohnenswerte Alternative erscheinen. Ist die Sequenz einmal kloniert, läßt sich die RNA mit großer Produkthomogenität in beliebigen Mengen in sehr kurzer Zeit herstellen. Die humane H19-Sequenz wurde bereits im Jahre 1989 kloniert und 1990 veröffentlicht (Brannan *et al.*, 1990). Mehrere Versuche, von dieser Gruppe einen Klon zu erhalten, blieben zunächst erfolglos. Eine Partnerarbeitsgruppe im trilateralen Projekt besaß lediglich die genomische Variante (inklusive Introns). Somit bestand die Notwendigkeit, die H19-Sequenz selbst zu klonieren. Hierzu bieten sich zwei Möglichkeiten an: die Amplifikation der Zielsequenz mittels PCR oder die Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek mit einer H19-

spezifischen Sonde. Da die PCR ein sehr schnelles Verfahren ist, wurde zunächst dieser Weg eingeschlagen.

### 3.1.1 RACE-PCR

Da die humane H19-Sequenz bekannt war, konnten beliebige PCR-Primer entworfen werden. Jedoch schlugen alle Versuche fehl, aus einer plazentalen cDNA-Bibliothek mit Hilfe von Primern, die gemäß der Sequenz von Brannan *et al.* (1990) genau am 5'- und am 3'-Ende von H19 hybridisieren sollten, ein spezifisches Produkt der erwarteten Größe zu amplifizieren (Daten nicht gezeigt). Dies lag wahrscheinlich daran, dass der 5'-Primer seine Zielsequenz nicht fand, da das 5'-Ende der humanen Sequenz nicht experimentell ermittelt, sondern von der Maussequenz abgeleitet wurde (persönliche Kommunikation mit S.M. Tilghman). Somit wurde ein System benötigt, mit dem eine spezifische Sequenz amplifiziert werden kann, ohne deren Randsequenzen zu kennen. Das Marathon<sup>TM</sup> cDNA Amplification System der Firma CLONTECH stellt eine elegante Lösung zur Verfügung. Hierbei wird eine doppelsträngige cDNA-Bibliothek am 5'- und am 3'-Ende mit einem künstlichen Adapter ligiert. Durch Kombination von genspezifischen mit adapterspezifischen Primern werden nun zwei überlappende Hälften der gesuchten Gesamtsequenz amplifiziert, ohne dass die 5'- bzw. 3'-Enden dieser Sequenz bekannt sein müssen, da sie durch Adapterprimer ersetzt wurden (RACE-PCR, Rapid Amplifikation of cDNA Ends):



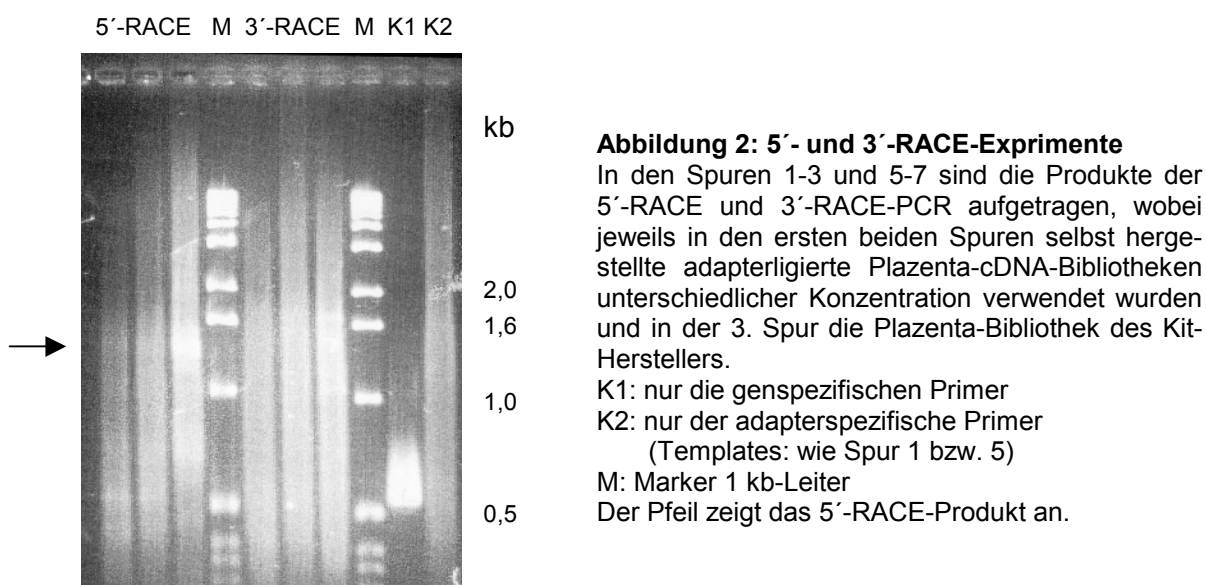
**Abbildung 1: Prinzip der RACE-PCR des Marathon<sup>TM</sup>-Systems.** AP = adapterspezifischer Primer, GSP genspezifischer Primer, x-3' = Aminoblockiertes 3'-Ende. AP hat die identische Sequenz wie der einzelsträngige Adapterbereich, so dass eine Primer-Bindestelle erst entsteht, wenn der GSP in diesen Bereich elongiert und die Komplementärsequenz generiert wurde. Daher sollte auch das 3'-Ende des Adapters blockiert sein, um nicht durch Auffüllung unspezifische AP-Bindestellen zu schaffen. Mittels einer Restriktionsendonuklease, die im Überlappungsbereich schneidet, lassen sich durch Ligation die beiden RACE-Produkte zusammenführen. T7 zeigt die Lage des Adapter-T7-Promotors.

Im Falle von H19 konnten beliebige genspezifische Primer formuliert werden, da die Sequenz im

wesentlichen bereits bekannt war. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist, dass der Adapter bereits den T7-Promotor zur Produktion einzelsträngiger RNA mittels *in-vitro*-Transkription enthält. Bei der 3'-RACE-PCR wurde daher später allerdings statt des Adapterprimer ein weiterer H19-spezifischer Primer eingesetzt, um nicht nach der Klonierung am 3'-Ende von H19 einen weiteren T7-Promotor zu erhalten, der die Transkription stören würde. Weitere Gründe waren, der veröffentlichten Sequenz möglichst nahe zu kommen und experimentelle Schwierigkeiten bei der reinen RACE-Reaktion (s.u.).

### Das 5'-RACE-Produkt

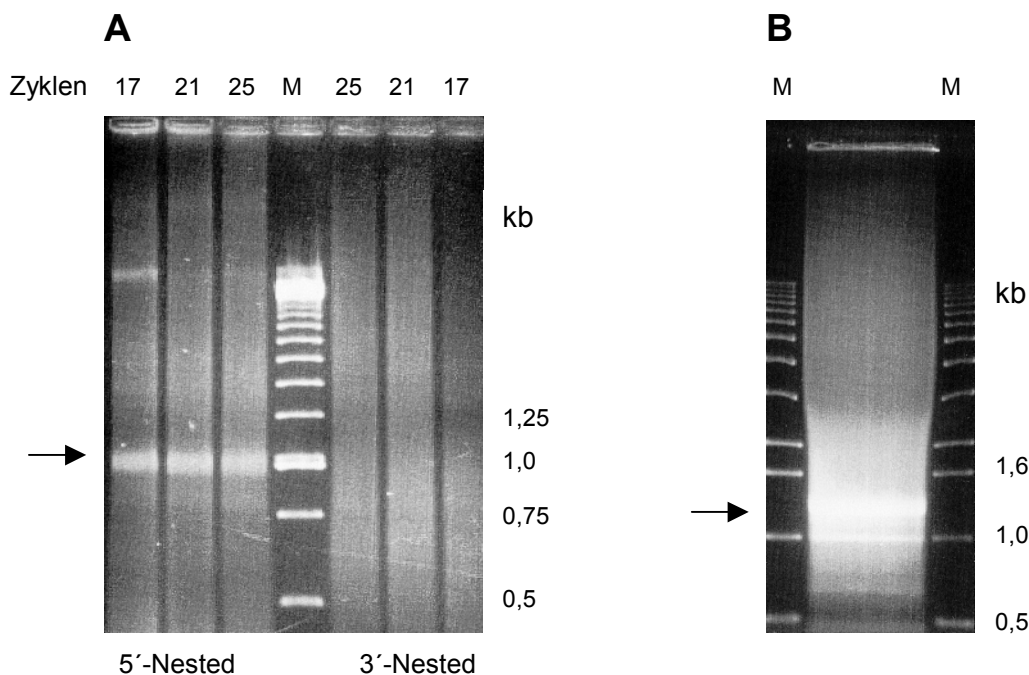
Aufgrund der gewählten genspezifischen Primer waren folgende Produktgrößen zu erwarten: 5'-RACE-Produkt: 1,36 kb, 3'-RACE-Produkt: 1,61 kb, Kombination der genspezifischen Primer (überlappender Bereich): 0,56 kb



Bei den hier gezeigten Experimenten wurden sowohl für die 5'-RACE- als auch für die 3'-RACE-Reaktionen ein genspezifischer mit dem adapterspezifischen Primer kombiniert. Wurde nur der adapterspezifischen Primer eingesetzt (Spur K2), so ist ein charakteristischer Hintergrund-"Schmier" zu erkennen, der auch in allen RACE-Reaktionen auftrat und auf etwas zu niedrige Hybridisierungstemperatur und/oder auf unvollständige Blockierung des 3'-Endes des Adapters zurückzuführen ist. In Spur K1 (nur die genspezifischen Primer) ist ein deutliches Amplifikat der erwarteten Größe zu erkennen, d.h. die PCR-Bedingungen ermöglichten für diese Primer eine sehr spezifische Hybridisierung.

Bei den 5'-RACE-Reaktionen deutet sich bei der erwarteten Größe ein spezifisches Produkt an, das sich jedoch nur geringfügig vom Hintergrund abhebt, wobei das Template des Herstellers (Spur 3) die beste Ausbeute liefert. Bei den 3'-RACE-Reaktionen ist praktisch nur noch Hintergrund zu erkennen.

Um die Spezifität des 5'-Produktes und das eventuelle Vorhandensein des 3'-Produktes im Hintergrund zu überprüfen, wurde eine sog. "Nested" PCR durchgeführt. Hierzu wurde von den verdünnten RACE-Reaktionen ein Aliquot als Template für eine zweite PCR eingesetzt, bei der Primer eingesetzt wurden, die innerhalb des spezifischen Primär-Produktes lokalisiert sind. Als Folge sollten der Hintergrund schwächer und das spezifische Sekundär-Produkt deutlicher sichtbar werden. Erwartete Sekundär-Produktgrößen: 5'-Nested: 1,06 kb, 3'-Nested: 1,23 kb



**Abbildung 2a: "Nested" PCR (A) und präparative Reamplifikation des 5'-Produktes (B)**

**A:** "Nested" PCR mit dem jeweiligen RACE-PCR-Produkten als Template, der Pfeil zeigt das spezifische 5'-Produkt, M: 250 bp-Leiter. **B:** Bei dieser präparativen PCR wurde das aus einem Gel eluierte 5'-RACE-Produkt als Template zur Reamplifikation mit den gleichen Primern eingesetzt und das durch den Pfeil gezeigte Produkt eluiert, M: 1 kb-Leiter.

Bei der "Nested" PCR des 5'-RACE-Produktes zeigt das Produkt der erwarteten Größe, dass es sich tatsächlich um das 5'-Produkt von H19 handelt. Daher wurde das 5'-RACE-Produkt zur Erhöhung von Spezifität und Ausbeute aus einem Gel eluiert, mit den gleichen Primern reamplifiziert (B) und erneut eluiert. Für Folgeexperimente standen somit 2,3 µg des 5'-RACE-Produktes von H19 nach insgesamt 58 PCR-Zyklen zur Verfügung.

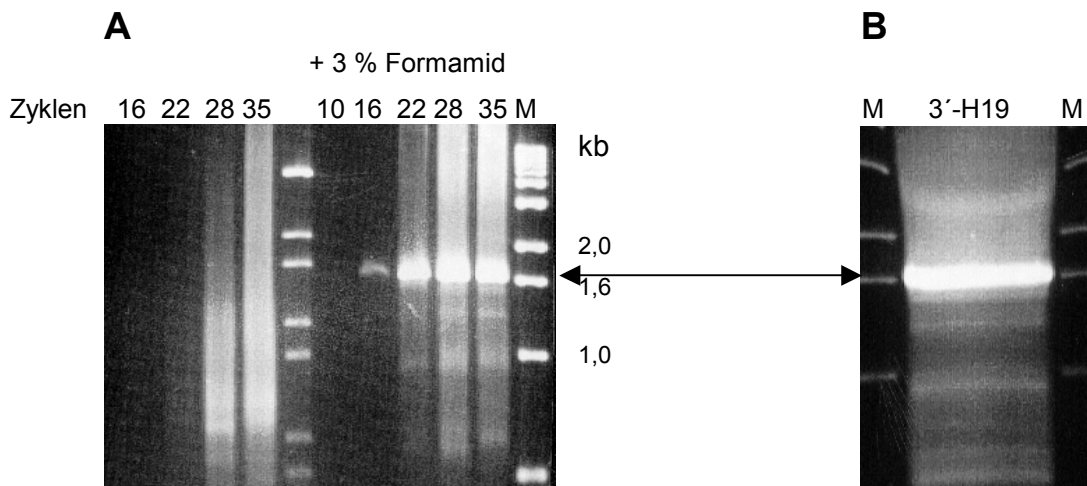
Bei der 3'-"Nested"-PCR ist kein spezifisches Produkt zu erkennen.

### **Das 3'-RACE-Produkt**

Wie sich bereits im vorigen Abschnitt andeutet, bereitete die 3'-RACE-Reaktion außerordentliche Schwierigkeiten. Bei der Kombination des eingesetzten genspezifischen Primers mit dem Adapterprimer ließ sich auch bei Variation der Primer- bzw. Templatekonzentration, der Hybridisierungstemperatur und der Magnesiumkonzentration kein spezifisches Produkt amplifizieren. Unter Standardbedingungen deutete sich zwar eine schwache aber scharfe Bande knapp oberhalb der 1,6 kb-Markerbande an (Sollgröße 1,61 kb). Dieses Fragment wurde daraufhin eluiert und reamplifiziert. Alle Kontrollversuche, d.h. "Nested" PCR und Restriktionsanalysen dieses Fragmentes ergaben immer wieder negative oder widersprüchliche Ergebnisse (Daten daher nicht gezeigt). Schließlich wurde das Fragment sequenziert. Es handelte sich um 1,6 kb vom 5'-Ende der "Human medium tumor antigen-associated 61-kD protein mRNA" aus humaner Plazenta (GenBank M31786), deren cDNA an einer Stelle zu 50 % komplementär an den gleichen Positionen ist wie der eingesetzte genspezifische H19-Primer. Das PCR-Produkt war zufälligerweise etwa so groß wie das erwartete H19-Produkt. Die lediglich 50 %ige Übereinstimmung erklärt das extrem schwache Signal. Es handelte sich um ein experimentelles Artefakt.

Damit blieb nach wie vor das Problem, dass sich das H19-Produkt nicht amplifizieren ließ, sondern eher ein Produkt, das nur zu 50 % mit dem eingesetzten Primer übereinstimmte. Um dieses Problem zu lösen, wurden zunächst zwei neue Primer eingesetzt, die länger waren und einen höheren GC-Basengehalt aufwiesen, um bei den hohen Hybridisierungstemperaturen von 68°C besser mit ihrer Zielsequenz hybridisieren zu können. Es wurde hierbei kein Adapterprimer mehr eingesetzt, sondern statt dessen ein sehr langer Primer, der mit den letzten 33 Nukleotiden am 3'-Ende von H19 hybridisiert, um durch den Einsatz von zwei H19-spezifischen Primern die Gesamtreaktion spezifischer für H19 zu machen (im Gegensatz zum 5'-Ende war das 3'-Ende durch Sequenzierung bekannt). Auch dieser Ansatz blieb zunächst erfolglos.

Schließlich blieb noch der Einsatz von Chemikalien in der PCR wie DMSO oder Formamid, die den Schmelzpunkt von Nukleinsäuren herabsetzen. Dies kann immer dann von Vorteil sein, wenn starke Sekundärstrukturen des Templates (beispielsweise durch hohen GC-Gehalt) die Denaturierung verhindern oder bei der Hybridisierung bereits wieder Renaturierung stattfindet, so dass die Polymerase die Primer nicht bis zum Templateende verlängern kann. Hierbei ist zu beachten, dass nicht alle Polymerasen in Gegenwart dieser Chemikalien aktiv sind. Die bei diesen Experimenten verwendete Taq-Variante erwies sich jedoch als widerstandsfähig und war noch in Gegenwart von 10 % DMSO bzw. 5 % Formamid voll aktiv. Größe des erwarteten 3'-Fragments von H19: 1,66 kb.



### Abbildung 3: Der Einfluss von Formamid auf die 3'-RACE-PCR

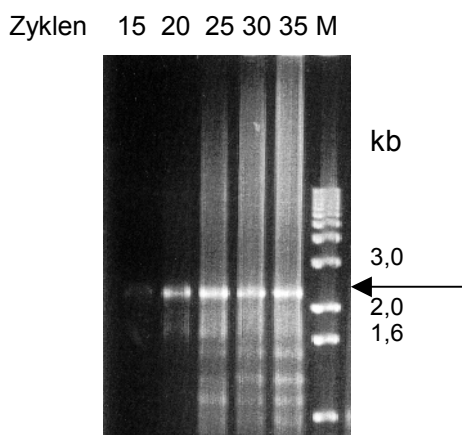
**A:** Zwei 3'-RACE-PCR-Reaktionen, die sich lediglich durch 3 % (v/v) Formamid unterscheiden. Angegeben ist die Anzahl der Zyklen, nach der ein Aliquot aus der PCR-Reaktion zur Gelauftragung abgenommen wurde, M: 1 kb-Leiter. **B:** Quantitative PCR zur Elution des spezifischen 3'-Fragments von H19 (Doppelpfeil), M: 1 kb-Leiter.

Die Gegenwart von Formamid hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Spezifität der 3'-RACE-Reaktion. In Gegenwart von 3 % (v/v) Formamid wurde aus einer völlig unspezifischen, als fehlgeschlagen zu betrachtenden PCR-Reaktion eine sehr spezifische Reaktion mit hoher Produktausbeute. Somit waren die bisherigen Probleme bei der Isolation des 3'-Fragments von H19 tatsächlich auf Sekundärstrukturen des PCR-Templates in diesem Bereich zurückzuführen. Da es sich hierbei also um einen Effekt der Schmelztemperatur handelte, hätte theoretisch derselbe Effekt erzielt werden können durch Erhöhung der Hybridisierungstemperatur während der PCR. Da jedoch bereits bei sehr hoher Temperatur gearbeitet wurde (68°C), hätte eine weitere Erhöhung dazu geführt, dass die Primer nicht mehr ausreichend hybridisieren für eine funktionierende PCR. Nach einer quantitativen PCR (Abb 3, B) konnten 3,2 µg des 3'-Fragments von H19 nach 28 PCR-Zyklen für Folgereaktionen eluiert werden.

### Klonierung der gesamten H19-cDNA

Nachdem nun zwei überlappende Teilstücke von H19 zur Verfügung standen, mussten diese nun zusammengeführt und in einen Vektor kloniert werden. Für die Zusammenführung wurde eine Restriktionsendonuklease benötigt, die im überlappenden Bereich beider Fragmente genau ein Mal schneidet, nicht aber im übrigen Bereich von H19. Dies traf für *Pst* I zu. Die verdauten Einzelfragmente konnte aus dem Agarosegel eluiert und über die kohäsiven Enden zur vollständigen H19-cDNA ligiert werden. Zur Überprüfung des Ligationserfolges wurde mittels PCR über

den gesamten H19-Bereich reamplifiziert unter Einsatz der Außenprimer, die auch bei den RACE-Reaktionen eingesetzt wurden. Somit sollte ein PCR-Produkt entstehen, dass am 5'-Ende der kompletten H19-Sequenz die Adaptersequenz trägt, die den T7-Promotor enthält (Sollgröße: 2,38 kb).



**Abbildung 4: Amplifikation des gesamten H19-Konstruktes nach der Ligation**

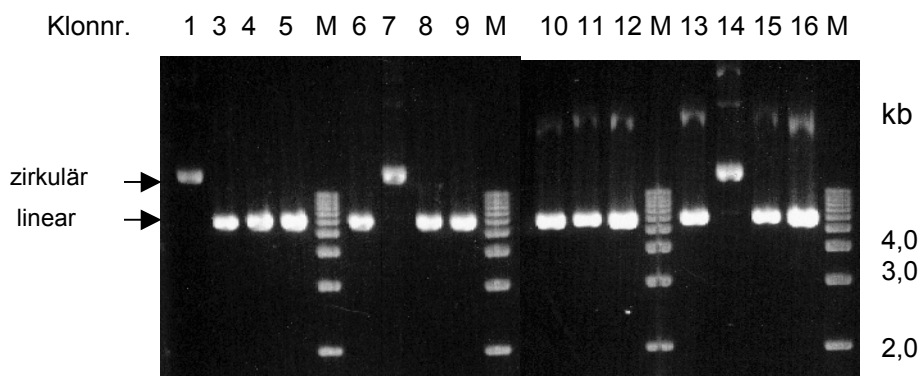
Gezeigt ist der Verlauf der PCR-Reaktion über die angegebene Zyklenzahl mit  $\frac{1}{10}$  der Ligationreaktion als Template unter Einsatz des Adapterprimers (5'-Ende) und des langen H19-spezifischen 3'-Primers (mit 3 % Formamid). Der Pfeil zeigt das spezifische H19-PCR-Produkt. M: 1 kb-Leiter.

Die Größe des spezifischen Hauptproduktes dieser PCR-Reaktion entspricht sehr gut der erwarteten, was bedeutet, dass die Ligationsreaktion erfolgreich war und es sich tatsächlich um H19 handelte. Es konnte somit direkt zur Klonierung übergegangen werden. Es bot sich an, hierfür das oben gezeigte Amplifikat einzusetzen, da es zu eluierbaren Mengen aus der Ligationsreaktion vervielfältigt werden kann. Des Weiteren ist die terminale Transferaseeigenschaft der verwendeten Taq-Polymerase nutzbar, um die sehr einfache TA-Klonierung durchführen zu können. Dazu wird nach dem letzten PCR-Zyklus für weitere 7 - 10 min. bei Elongationstemperatur inkubiert, wobei die Polymerase an das 3'-Ende des PCR-Produktes ein Desoxyadenosin anfügt, so dass ein A-Überhang entsteht. Unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen, linearisierten Vektors mit komplementären T-Überhängen lässt sich dieses PCR-Produkt recht effizient quasi kohäsiv ligieren. Um das PCR-Produkt in nur einer Orientierung zu ligieren, was für die spätere Linearisierung zur Transkription von Bedeutung ist, muss lediglich der Vorwärts-Primer phosphoryliert werden, da nur das 5'-Ende des Vektors phosphoryliert ist, dass mit dem 3'-Ende des PCR-Produktes (Rückwärts-Primer) ligieren wird. Somit entsteht nur in der korrekten Orientierung ein replikationsfähiges Plasmid, in der falschen Orientierung bleibt das Konstrukt linearisiert und nicht replizierbar. Bei der quantitativen PCR mit phosphoryliertem Vorwärts-Primer wurden nach 23 Zyklen 0,96 µg klonierbares H19-Amplifikat eluiert.

Nach der Ligation des PCR-Produktes in den TA-Vektor und der anschließenden Transformation in kompetente *E.coli*-Zellen wurden 16 Klone zur weiteren Analyse kultiviert.

### Analyse der erhaltenen H19-Klone

Von den 16 kultivierten Klonen ist einer nicht angewachsen, die restlichen 15 wurden zunächst mittels Restriktionsanalyse untersucht. Wie bereits oben erwähnt, enthält die H19-cDNA genau eine *Pst* I-Restriktionsschnittstelle, der Klonierungsvektor hingegen enthält diese Schnittstelle nicht. Somit sollten H19 tragende Plasmide nach dem Verdau linearisiert vorliegen, Religandenplasmide bleiben zirkulär mit deutlich unterschiedlichem Laufverhalten (Plasmidlänge: 4,8 (Vektor) + 2,3 (H19) = 7,1 kb).



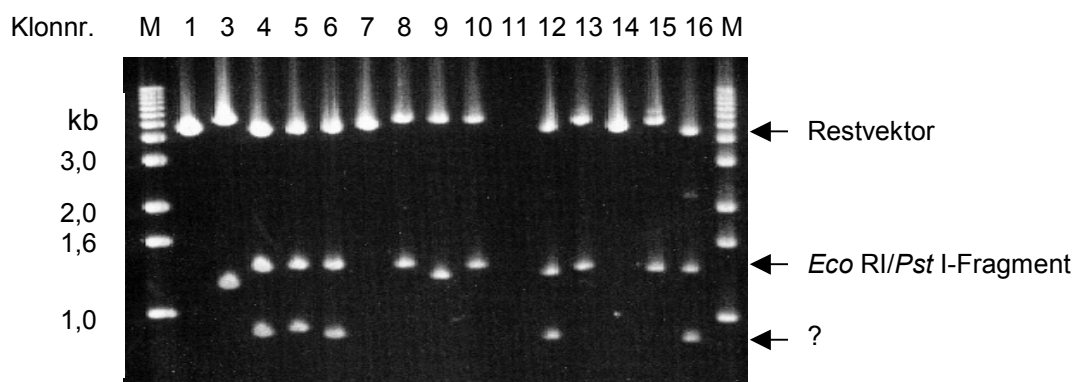
**Abbildung 5: Religandenanalyse mittels *Pst* I der erhaltenen H19-Klone**

Mit *Pst* I verdaute Plasmid-DNA wurde auf einem 0,8 % 0,5x TBE-Agarosegel aufgetrennt. M: 1 kb-Leiter. Klon Nr. 2 ist nicht angewachsen.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, sind die Klone 1, 7 und 14 Religanden (vermutlich durch fehlende T-Überhänge des Klonierungsvektors), da deren Bande oberhalb der 1 kb-Leiter lokalisiert ist. Die oberste Bande dieser Leiter ist mit 12 kb bereits deutlich größer als die zu erwartende (7,1 kb), so dass es sich nicht um linearisierte Plasmide handeln kann. Dass die linearisierten Plasmide etwa in Höhe der 6 kb-Bande lokalisiert sind, liegt sicherlich in der ungenügenden Auflösung der Leiter und der leichten Überladung der Plasmidspuren (dicke Banden) begründet.

Zur Verifikation der Orientierung der insertierten H19-DNA wurden die Plasmide doppelt verdaut mit einem Enzym, das innerhalb von H19 schneidet (*Pst* I) und einem, das unmittelbar hinter dem Insert im Vektor schneidet (*Eco* RI). Da die *Pst* I-Schnittstelle nicht in der Mitte von H19, sondern in der 5'-Hälfte lokalisiert ist, wird je nach Orientierung ein unterschiedlich großes Stück ausgeschnitten: in der korrekten Orientierung 1360 bp und anders herum 1020 - x, je nachdem, wieviele Nukleotide am 5'-Ende im Vergleich zum veröffentlichten H19-Startpunkt fehlen.





**Abbildung 6: Orientierungstest der H19-Klone mittels *Eco* RI/*Pst* I-Doppelverdau**  
M: 1 kb-Leiter, ? = nicht vorhersagbare Zusatzbande.

Auch hierbei wird bestätigt, dass die Klone 1, 7 und 14 lediglich durch *Eco* RI linearisiert wurden, da es sich um Religanden handelt. Somit verbleiben 12 informative Klone, die ein H19-Insert tragen. Bei allen ist das H19-spezifische *Eco* RI/*Pst* I-Fragment in etwa 1,3 bis 1,4 kb groß, was belegt, dass das Insert jeweils in der erwarteten, korrekten Orientierung vorliegt (bei Klon 11 ebenfalls, in getrenntem Experiment verifiziert). Weshalb die Fragmente von Klon 3 und 9 etwas kleiner sind, blieb unklar.

Von diesen 12 Klonen weisen 6 eine zusätzliche, nicht vorhersagbare Bande auf (?, bei Klon 11 ebenfalls). Dieses kann jedoch ebenfalls nur aus dem H19-Insert stammen, da *Pst* I gar nicht und *Eco* RI nur einmal im Vektor schneidet. Da dieses Zusatzfragment bei allen in etwa gleich groß ist, kann es sich auch nicht um eine zufällig durch PCR-Mutation entstandene Restriktionsschnittstelle handeln. Die Größe des Zusatzfragmentes (ca. 0,9 kb) ergibt zusammen mit dem *Eco* RI/*Pst* I-Fragment (ca. 1,4 kb) die Größe des gesamten H19-Inserts (2,3 kb), was nahe legt, dass es sich bei dem Zusatzfragment um das 5'-Fragment von H19 handelt. Am 5'-Ende von H19 und im angrenzenden Vektorbereich ist jedoch keine der beiden Restriktionsschnittstellen bekannt. Um dieses Rätsel zu klären, wurden die 5'-Enden von H19 (inklusive Vektor/Insert-Übergang) aller Klone ansequenziert.

Diese Sequenzierung ergab, dass alle Klone das H19-Produkt wie erwartet in der korrekten Orientierung enthielten. Ferner war bei allen das 5'-Ende unvollständig bezogen auf den postulierten Startpunkt (Brannan *et al.*, 1990). Damit war klar, dass die ursprünglichen PCR-Versuche mit einem Primer spezifisch für das postulierte 5'-Ende von H19 nicht funktionieren konnten, da der Primer an keine Zielsequenz hybridisierte.

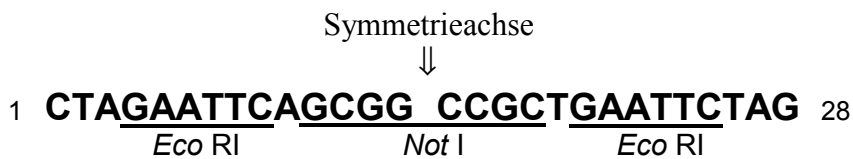
Die Zusatzbande bei der Restriktionsanalyse entstand daher, dass die betreffenden 6 Klone unmittelbar vor dem Start der H19-Sequenz eine Zusatzsequenz enthielten, die eine bei der Analyse verwendete Restriktionsschnittstelle aufwies:

Klon-Nr	Fehlende Nukleotide am 5'-Ende	Zusatzsequenz vor H19 (5')
		1 <span style="float: right;">28</span>
4	70	CTAGAATTCATCG <b>ACCA</b> CTGAATTCTAN
5	57	AGCGGCCGCTGAATTCTAG
6	97	AATTCAGCGGCCGCTGAATTCTAG
11	95	CTAGAATTCAGCGGCCGCT <b>TA</b> ATTCTAG <b>AA</b>
12	98	CTAGAATTCAGCG <b>ACCG</b> CTGAATTCTAG
16	94	CTAGAATTCAGCG <b>ACCG</b> CTGAA

**Tabelle 2: Alignment der H19-Zusatzsequenz**

Die Anzahl der fehlenden Nukleotide am 5'-Ende des postulierten Transkriptionsstartpunktes sind angegeben.

Durch das Alignment ergibt sich eine palindromische Consensus-Sequenz:



Diese Consensus-Sequenz ist jeweils unmittelbar zwischen der Adaptersequenz und dem 5'-Ende der H19-Sequenz lokalisiert, sie stammt also aus der cDNA-Bibliothek, ist aber in der veröffentlichten Sequenz (Brannan *et al.*, 1990) nicht zu finden. Daher wurden mit dieser Consensus-Sequenz die verfügbaren Nukleotid-Datenbanken mittels BLAST Search auf Homologien durchsucht (Stand Oktober 99):

- Es wurden 30 Sequenzen gefunden, in denen diese Consensus-Sequenz mit wenigstens 22 Nukleotiden (79 %) Homologie vorhanden ist.
- Bei allen außer zwei ist die Consensus-Sequenz ebenfalls im 5'-Bereich lokalisiert, davon bei 63 % am exakten Anfang der Datenbank-Sequenz.
- Alle liegen außerhalb des codierenden Bereiches.
- Es handelt sich um 18 humane, 6 Maus und 6 andere Sequenzen; Ein logischer Zusammenhang mit H19 ist nicht zu erkennen.
- Alle wurden 1996 oder später isoliert mit PCR-Methoden (RACE oder Differential Display, einige sind unveröffentlicht).

Die Consensus-Sequenz weist ferner Homologien zum Marathon-RACE-cDNA-Primer auf, mit dem die Erststrangsynthese initiiert wird bei der Herstellung von cDNA-Bibliotheken zum Zwecke der RACE-PCR:

Consensus-Sequenz: 5'-**CTAGAATTCAGCGGCCGCTGAATTCTAG**-3'

Marathon-cDNA-Primer: 5'-TT**CTAGAATTCAGCGGCCGCT** (30x) NN-3'

Dies legt den Verdacht nahe, dass es sich um ein Artefakt der cDNA-Synthese handeln könnte. Dagegen spricht allerdings, dass der Marathon-Primer mit seinem 30 Nukleotide langen poly-T-Schwanz dazu dient, am poly-A-Schwanz der mRNA zu hybridisieren. Damit sollte er nur am 3'-Ende zu finden sein, nicht aber am 5'-Ende einer cDNA-Sequenz. Außerdem ist der Marathon-Primer nicht palindromisch und hätte zudem den poly-T-Schwanz verlieren müssen, da dieser nirgends am 5'-Ende der H19-Sequenz zu finden ist. Die Umwandlung des Marathon-Primers in die Consensus-Sequenz ist daher nur schwer vorstellbar.

Handelt es sich aber nicht um ein PCR-Artefakt, so müsste diese Sequenz posttranskriptional angefügt worden sein, da sie in der genomischen Sequenz von H19 nicht zu finden ist. Außerdem beginnt die H19-Sequenz hinter dieser Consensus-Sequenz mit unterschiedlichen Nukleotidpositionen, d.h. der Übergang zwischen Consensus- und H19-Sequenz ist nicht konstant. Die posttranskriptionelle Verlängerung von mRNA am 5'-Ende ist allerdings bisher nicht beschrieben worden. Hätte diese Sequenz eine physiologische Relevanz, so wäre sie vermutlich bei mehr Sequenzen anzutreffen als oben beschrieben. Auch die häufige Sequenzisolation mittels PCR spricht wiederum für ein experimentelles Artefakt. Solange aber diese Frage ungeklärt bleibt, sollte diese Consensus-Sequenz Bestandteil zukünftiger H19-*in-vitro*-Transkripte sein.

Nach der Auswertung der Sequenzierungschromatogramme stand ferner fest, dass jeder Klon Sequenzänderungen an einzelnen Positionen, also Punktmutationen, enthielt:

Klonnr.	4	5	6	8	11	12	13	15	16
Fehlende 5'-Nukl.	-70	-57	-97	-97	-95	-98	-146	-79	-94
Anzahl Consensus-Nukl.	28	19	24		30	28			22
<b>Position</b>									
941			M (+A)						
945		M (C)							
976				M (A)					
988						M (A)			
1018								M (C)	
1052		M (C)	M (C)	M (C)	M (C)	M (C)	M (C)		M (C)
1095	M (T)								
1139	M (T)								
1165				M (C)					
1167									(M (-G))
1169		M (G)							
1181	?	?	(G)			(G)		(G)	(G)
1183	?	?			?	?			?
1186			?						
1221						M (T)			
1228		?	?	(G)	?	(G)		(G)	(G)
1230						M (C)			
1234	?	?	?	(G,T)	(G)	(G)	?	? (o. G)	?
1241	?	(G)	M (A)					?	(G)
1244	?		(G)						
1256	?		?						
1262	?					(+C)			
1273	M (+T)								
1279	M (T)								
1322						?	?	?	?

**Tabelle 3: Mutationsanalyse des 5'-Bereiches der H19-Klone**

Die angegebenen Klone wurden vom 5'-Ende ansequenziert und mittels BLAST Search auf Sequenzänderungen im Vergleich zur veröffentlichten Sequenz (Brannan *et al.*, 1990) untersucht. Die Angabe der Nukleotid-Position bezieht sich ebenfalls auf die veröffentlichte Sequenz, dortiger Start bei Nukleotid 830. M (Mutation, mit Angabe der neuen Base in Klammern) bezeichnet die nach Chromatogramm-Auswertung eindeutigen Sequenzänderungen, bei den Klammern und Fragezeichen ist auch nach dieser Auswertung keine Aussage möglich.

Wie in Tabelle 3 zu erkennen ist, lagen die Mutationen im untersuchten 5'-Bereich i.d.R. bei jeden Klon an einer anderen Position, waren also zufällig verteilt, was dafür spricht, dass es sich um PCR-bedingte Mutationen handelte. Zwar enthielt der verwendete Polymerase-Mix mit Deep Vent eine Proofreading-Polymerase mit Exonukleaseaktivität, also der Fähigkeit, fehleringebaute Nukleotide durch die korrekten zu ersetzen, die Hauptkomponente bildete jedoch eine Taq-Variante, der die entsprechende Exonukleaseaktivität fehlt. Daraus resultiert eine ca. dreimal höhere Mutationsfrequenz als bei Deep Vent (Cline *et al.*, 1996) und die allgemeine Gefahr, dass mit zunehmender Zyklenzahl auch zunehmend Mutationen entstehen, die ebenfalls vervielfältigt würden.

Die Mutation an Position 1052 ist in auffällig vielen Klonen vertreten. Sie ist demnach in einem sehr frühen Zyklus entstanden und ist durch die Amplifikation in fast allen Klonen vorhanden.

Schließlich wurde Klon 5 ausgewählt und komplett durchsequenziert, da er das vollständigste 5'-Ende aufwies.

## Sequenzanalyse H19, Klon 5 (pBac5) mittels BLAST Search

Referenz: GenBank M32053 (= H19-cDNA, Brannan *et al.*, Mol.Cell.Biol. 10, 28-36 (1990)), mit Chromatogramm-Auswertung

M = eindeutige Änderung gegenüber Referenz mit Angabe der Basenänderung

? = nicht eindeutig bestimmbar, ob Referenzbase oder eine andere

Seq.Primer	Informativer Sequenzbereich	Mutationsposition	Mutationen, bereinigt durch überlappende Sequenzierung (*: keine überlappenden Sequenzdaten)
5' forw.	887 - 1320	930: ? 945: M, A → C 1052: M, T → C 1169: M, A → G 1181: ? 1183: ? 1228: ? 1234: ? 1241: ?	* 930: ? * 945: M, A → C *1052: M, T → C *1169: M, A → G *1181: ? *1183: ? *1228: ? *1234: ? *1241: ?
6 forw.	1367 - 1800	1456: M, T → C 1521: ? 1569: M, T → A  1570: ? 1603: M, G → A 1737: M, G → A 1747: ? 1766: ?	1456: M, T → C 1569: M, T → A 1603: M, G → A 1737: M, G → A  3058: M, C → T *3338: ? *3385: ? *3412: ? *3445: ?
2 rev.	1426 - 1797	1456: M, T → C, A 1569: M, T → A 1603: M, G → A 1671: ? 1737: M, G → A	5'-Ende von H19: - 57 bp im Verhältnis zum publ. Transkr.startpunkt (s.o.) 5'-Ende von Klon 5: + 23 bp (nach T7) 3'-Ende von Klon 5: + 31 bp (nach <i>Hind</i> III)
4 rev.	1671 - 2018	1737: M, G → A	↓ werden transkribiert
3 forw.	1999 - 2564	2360: ? 2367: ? 2370: ? 2542: ?	
7 forw.	2259 - 2880	2273: ? 2331: ? 2488: ? 2538: ? 2718: ?	
DGB5 forw.	2502 - 3134	3013: ? 3058: M, C → T	
DGB8 rev.	2966 - 3327	3037: ?	

5'-RACE = 78

PCR-Zyklen

↑

*Pst* I

↓

3'-RACE = 48

PCR-Zyklen

### Tabelle 4: Sequenzanalyse Klon 5

Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die veröffentlichte genomische Sequenz von H19 (830 bis 3489). Angegeben sind die Vorwärts- (forw.) bzw. Rückwärts- (rev.) Sequenzierprimer. Die jeweiligen informativen Sequenzbereiche überlappen zum Teil, so dass hier mehrfache Sequenzinformationen vorliegen. Damit können nicht eindeutige Positionen geklärt werden, was die Liste erheblich verringert (rechte Spalte).

		3058: M, C → T 3066: ? 3070: ?
C forw.	2926 - 3320	3058: M, C → T
8 forw.	3266 - Ende (3489)	3338: ? 3385: ? 3412: ? 3445: ?

Es stellte sich heraus, dass Klon 5 insgesamt 8 eindeutige Punktmutationen aufwies, wobei 7 im Bereich der 5'-RACE-PCR lokalisiert waren und nur eine im Bereich der 3'-PCR. Bedenkt man, dass das 5'-Fragment über insgesamt 78 Zyklen amplifiziert wurde, das 3'-Fragment aber nur über 48 Zyklen, so spricht dies ebenfalls für PCR-bedingte Mutationen.

Wird mit diesem Klon nach Linearisierung H19-RNA mittels *in-vitro*-Transkription hergestellt, so enthält das Transkript als Artefakt am 5'-Ende 23 und am 3'-Ende 31 zusätzliche Nukleotide aus dem Adapter bzw. dem Vektor.

### 3.1.2 λ-Phagen-Bibliothek

Nachdem nun H19 mittels RACE-PCR schließlich erfolgreich kloniert werden konnte, die erhaltenen Klone aber alle Punktmutationen und ein unvollständiges 5'-Ende aufwiesen (3.1.1), war die Frage, wie diese Mängel umgangen werden können. Denn es ist nicht auszuschließen, dass die Mutationen die spezifische Bindung eines Proteins (oder mehrerer) beeinflussen könnten, wenn sie in einem für die Interaktion sensiblen Strukturbereich lokalisiert sind.

Wie lassen sich nun Klone erzeugen oder isolieren, die möglichst vollständig und mutationsfrei sind? Will man nicht von Neuem klonieren, könnte man versuchen, die Mutationen des vorhandenen Klons zu beseitigen. Dies könnte theoretisch durch PCR-vermittelte Mutagenese erreicht werden. Dieses Verfahren wird normalerweise angewandt, um Mutationen einzuführen, indem ein Primer eingesetzt wird, der in der Mitte die gewünschte Mutation (also Fehlpaarung) aufweist, flankiert von ca. 15 korrekt gepaarten Nukleotiden. Somit könnte auch eine Punktmutation im H19-Klon quasi rückmutiert werden. Dies müsste allerdings für alle 8 Mutationen durchgeführt werden, was recht aufwendig werden würde. Auch erneute PCR-Mutationen wären nicht ausgeschlossen.

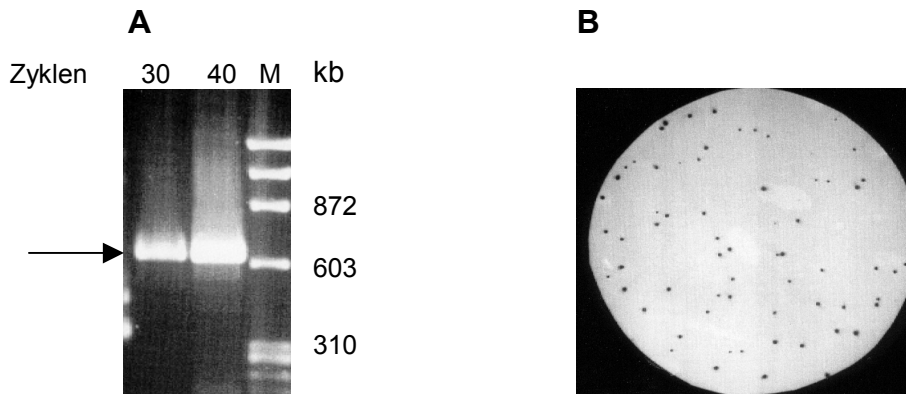
Weiterhin bleibt die Möglichkeit, erneut zu klonieren. Dies könnte mit der in 3.1.1 beschriebenen RACE-PCR unter Verwendung einer Polymerase mit Korrekturfunktion geschehen. Aller-

dings war durch die Schwierigkeiten bei der ersten Klonierung das Template bereits verbraucht. Auch kann das Risiko erneuter Punktmutationen (wenn auch in geringerer Anzahl) nicht ausgeschlossen werden. Daher sollten PCR-Methoden vermieden werden. Es bot sich daher an, eine plazentale cDNA-Bibliothek mittels Hybridisierung mit einer H19-spezifischen Sonde zu durchmustern. Hierbei würde also mit einer direkten Kopie der mRNA ohne PCR-Amplifikation gearbeitet werden, so dass Punktmutationen ausgeschlossen sein sollten. Es wurde hierfür das  $\lambda$ -TripleEx<sup>TM</sup>-System der Firma CLONTECH ausgewählt.

Bei diesem System wurde eine plazentale cDNA-Bibliothek in einen  $\lambda$ -Phagen ligiert. Mit diesen Phagen werden *E.coli*-Zellen infiziert und in Nährmedium, das geschmolzene Agarose enthält, auf eine LB-Agarplatte gegossen. Bei der über-Nacht-Inkubation vermehren sich in der erstarrten LB-Agarose die Bakterien zu einem dichten Rasen, in dem durch Phageninfektion und deren Vermehrung bis zur Lysis der Bakterien charakteristische Plaques entstehen. Die in den Plaques enthaltenen  $\lambda$ -Phagen werden durch Abdruck auf eine Nylonmembran übertragen und in einer alkalischen Lösung denaturiert. Die nun einzelsträngige Phagen-DNA wird durch Backen (120°C) kovalent mit der Membran verbunden und mit einer H19-spezifischen, Digoxigenin-markierten DNA-Sonde hybridisiert. Über einen Antikörper gegen Digoxigenin, an den das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist, lassen sich nach Substratzugabe und Phosphatase-vermittelter Farbpräzipitation die Plaques identifizieren, deren Phagen die H19-cDNA tragen. Mit diesen läßt sich dann ein zweiter *E.coli*-Stamm infizieren, der jedoch nicht lysiert wird, sondern durch *Cre-lox*-vermittelte Rekombination aus der Phagen-DNA ein replikationsfähiges Plasmid ausschneidet, das die insertierte cDNA trägt und zur Selektion eine Ampicillinresistenz. Somit wären Plasmide isoliert, aus denen nur noch die H19-cDNA unter T7-Promotorkontrolle umkloniert werden müsste.

#### **Sondenherstellung, Durchmustern der Phagenbibliothek**

Zunächst musste festgestellt werden, ob die Phagenbibliothek überhaupt H19-cDNA enthielt. Zu diesem Zweck wurde die PCR eingesetzt, um mit der Bibliothek als Template ein 632 bp großes PCR-Produkt zu amplifizieren, das spezifisch ist für das 3'-Ende von H19. Dieses Produkt hätte auch eine ideale Größe, um als Hybridisierungssonde eingesetzt zu werden. Es müsste dazu nur aus dem Agarosegel eluiert und hitzedenaturiert werden, um nach der Verlängerung hybridisierter randomisierter Hexanukleotid-Primer mittels Klenow-Fragment unter Einbau von DIG-markierten Nukleotiden DIG-markierte H19-DNA-Sonden zu erhalten. Mit diesen Sonden kann dann die auf Nylonmembranen immobilisierte Phagen-DNA der Plaques durch Hybridisierung auf das Vorhandensein von H19-cDNA getestet werden.



**Abbildung 7: Sondenherstellung und Durchmusterung der  $\lambda$ -Phagenbibliothek**

**A:** Amplifikation des 632 bp-3'-Fragments von H19 aus der Phagenbibliothek (Pfeil), M:  $\phi$ X174, *Hae* III

**B:** Nylonmembran-Abdruck einer Phagenplatte nach der Hybridisierung mit dem aus A eluierten und DIG-markierten PCR-Produkt nach der Entwicklung (Sekundär-Screening-Platte).

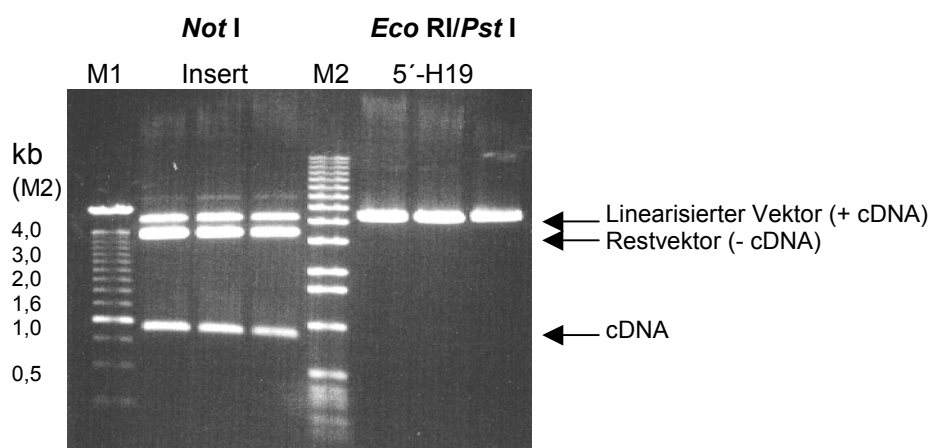
In Abbildung 7 A ist die sehr spezifische Amplifikation des Fragments in der erwarteten Größe zu erkennen. Die H19-cDNA ist also in der Bibliothek vorhanden, und diese kann daher durchmusterung werden. Dazu wurde mittels des PCR-Produktes eine H19-spezifische, DIG-markierte Sonde hergestellt und mit dieser eine Membran mit immobilisierter Phagenplaque-DNA durchmusterung. Hierbei war nur ein Signal zu erkennen. Beim korrespondierenden Plaque liefen mehrere Plaques ineinander über, so daß der H19-Plaque nicht zu identifizieren war. Es wurden also alle Plaques in dem Bereich ausgeschnitten und mit diesen erneut eine Plaqueplatte erstellt (Sekundär-Screening). Die Durchmusterung dieser Platte ist in Abb. 7 B zu sehen. Erwartungsgemäß sind nun wesentlich mehr H19-Signale zu erkennen. Auch hierbei liefen einige Plaques ineinander über, jedoch waren auch genügend Einzelplaques vorhanden, so dass 3 Einzelplaques isoliert wurden, die alle vom selben Primär-Plaque abstammten und somit denselben Klon repräsentierten. Kontroll-PCRs mit diesen Plaques und den Sondenprimern zeigten das eindeutige H19-Signal (nicht gezeigt).

Somit konnte zur Konvertierung der Phagen zu zirkulären Plasmiden übergegangen werden mittels Infektion eines zweiten *E.coli*-Stammes mit diesem H19-Phagen. Dies bereitete außerordentliche Schwierigkeiten. Zwar wuchsen die infizierten Zellen auf ampicillinhaltigen Agarplatten zu sehr vielen Kolonien an, was bedeutet, dass die Zellen nicht durch Phagenaktivität lysiert wurden, sondern sich durch die Anwesenheit des resistenztragenden Plasmides vermehren konnten. Die anschließende Kultivierung gepickter Klone in Ampicillin-Flüssigmedium verlief ebenfalls normal. Jedoch konnten keine Plasmide isoliert werden; es war nach der Präparation keine Nukleinsäure photometrisch nachweisbar. Dieses Ergebnis war beliebig reproduzierbar. Auch H19-spezifische Kolonie-PCR-Versuche (mit angewachsenen Zellen als Template) zeigten kein Ergebnis. Das Ampicillin war in den Versuchen aktiv, wie das Nichtanwachsen nichtinfi-



zierter Bakterien belegte. Warum sich die Infizierten ohne Plasmid in Gegenwart des Antibiotikums vermehren konnten, blieb rätselhaft.

Schließlich wurden mit den wässrigen Lösungen der Plasmidpräparationen kompetente Zellen eines anderen *E.coli*-Stammes transformiert, um die Anwesenheit geringer Mengen Plasmid-DNA zu testen und zu vermehren. Diesmal konnte in der Tat aus drei erhaltenen Kolonien Plasmid-DNA gewohnter Menge isoliert werden. Mittels Restriktionsanalyse wurde nun die enthaltene cDNA untersucht. Bei dem entstandenen Plasmid schneidet *Not* I die cDNA komplett aus, so dass deren Größe ermittelt werden kann. Die Kombination *Eco* RI/*Pst* I würde ca. 1,0 kb des 5'-Endes von H19 ausschneiden:



**Abbildung 8: Restriktionsanalyse eines potentiellen H19-Phagen-Plasmides**

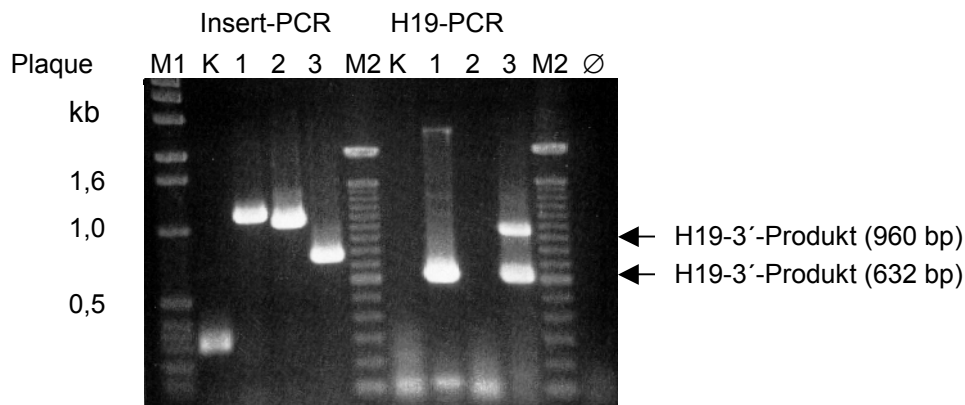
Die drei isolierten Plasmide desselben Klons wurden mit den angegebenen Nukleasen behandelt. Erwartete Fragmentgrößen: *Not* I (Gesamt-cDNA): 3,57 kb (Vektor) + 2,3 kb (Insert)  
*Eco* RI/*Pst* I: 4,87 kb (Vektor + 3'-H19) + 1,0 kb (5'-H19).

Wie in Abb. 8 deutlich zu erkennen, ist die in den Plasmiden enthaltene cDNA mit 0,9 kb deutlich zu klein; die enthaltene H19-cDNA ist unvollständig. *Pst* I schneidet in der H19-Sequenz, während *Eco* RI im Vektor 5' der cDNA schneidet. Da die Kombination dieser Enzyme lediglich zur Linearisierung führte, die *Eco* RI-Schnittstelle im Vektor aber auf jeden Fall vorhanden ist, muss also die *Pst* I-Schnittstelle fehlen. Somit fehlt der 5'-Bereich von H19, was erklärt, warum die Sondenhybridisierung und die PCR, die beide spezifisch für das 3'-Ende von H19 waren, positiv verliefen. Diese Klone waren also wertlos und es musste erneut die Bibliothek nach vollständigen Klonen durchmustert werden.

Die Bibliothek wurde mit demselben Verfahren erneut durchmustert. Wiederum war es nicht möglich, von Phagen mit positivem Hybridisierungssignal konvertierte Plasmid-DNA zu isolieren, auch nicht bei erneuter Transformation in kompetente Zellen. Daher wurde die Phagenvermehrung in größerem Maßstab und die Isolation der gesamten Phagen-DNA etabliert, um dann die enthaltene cDNA mittels Restriktionsverdau zu isolieren. Doch bei allen isolierten

Phagen wiesen die ausgeschnittenen cDNAs eine Größe von lediglich 500 bis 1100 bp auf, so dass also erneut nur Teile der H19 cDNA vorlagen. Offensichtlich lagen in der Bibliothek unvollständige Varianten der H19-cDNA vor, mit denen die 3'-Sonde hybridisieren konnte. Für ein erneutes Durchmustern der Bibliothek musste also zusätzlich mit einer Sonde spezifisch für das 5'-Ende von H19 gearbeitet werden.

Die benötigte H19-5'-Sonde wurde mittels PCR mit anschließender DIG-Markierung hergestellt, wobei als PCR-Template der aus 3.1.1 isolierte und sequenzierte RACE-PCR-Klon der H19-cDNA diente. Bei der erneuten Durchmusterung der Bibliothek wurden nun von jeder Plaque-Platte zwei Nylonmembran-Abdrücke gefertigt, so dass eine mit der 5'- und die andere mit der 3'-Sonde hybridisiert werden konnte. Diejenigen Plaques, die ein positives Signal mit beiden Sonden lieferten, wurden weiter analysiert. Zur schnelleren PCR-Analyse der Phagen wurden nunmehr phagenspezifische Primer eingesetzt, die die gesamte cDNA amplifizierten, um so deren Größe schnell bestimmen zu können. Daneben wurden in einer weiteren H19-spezifische PCR-Reaktion die Primer eingesetzt, mit denen die 5'- und 3'-Sonden erzeugt wurden, um das Vorhandensein der jeweiligen Enden zu testen:



#### Abbildung 9: PCR-Analyse hybridisierungspositiver Phagen

Bei der Insert-PCR (insgesamt 25 Zyklen) wurde die gesamte cDNA amplifiziert (Soll = 2,3 kb). Bei der H19-PCR wurden in einer Reaktion sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende von H19, soweit vorhanden, amplifiziert. M1: 1kb-Leiter, M2: 100 bp-Leiter, K: Kontrollplaque (hybridisierungsnegativ), ∅: Leerkontrolle (ohne Template).

In Abb. 9 ist ein Beispiel einer solchen Analyse gezeigt. Auch hierbei wird deutlich, dass alle H19-positiven Plaques ein deutlich zu kleines cDNA-Insert aufwiesen, in diesem Falle 1,1 kb. Da sowohl die Leerkontrolle (ohne Template) als auch der Kontrollplaque erwartungsgemäß maximal die Primerbanden aber keinerlei Produktbanden aufwiesen und die H19-Banden exakt die erwartete Größe hatten, können die H19-PCR-Reaktionen als spezifisch angesehen werden. Plaque 1 (1,1 kb) generierte nur das H19-5'-Signal, Plaque 2 (1,0 kb) generierte gar keines, während Plaque 3 mit dem kleinsten Insert (0,75) beide H19-Signale zeigte, was natürlich extrem

widersprüchlich ist: Es kann normalerweise kein PCR-Produkt entstehen, das größer ist als das Template. Außerdem kann ein so kleines H19-Fragment nicht gleichzeitig beide Enden von H19 in dieser Größe aufweisen. Widersprüchlich ist auch, dass hybridisierungspositive Plaques überhaupt kein H19-spezifisches PCR-Signal aufwiesen (Plaque 2). Alle analysierten Plaques wiesen solche oder ähnliche Widersprüche auf, und sämtliche cDNAs waren zu klein.

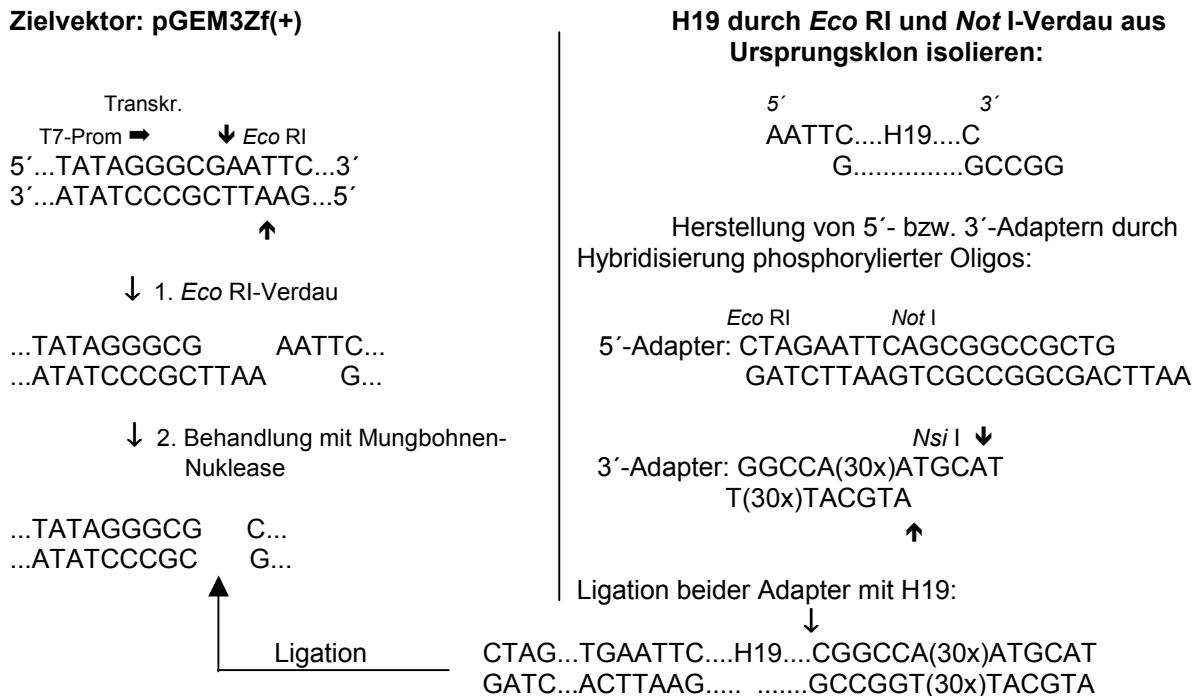
Da trotz der Anzahl der Durchmusterungen der Bibliothek und dem damit verbundenen Etablierungs- und Durchführungsaufwand bis jetzt kein vollständiger H19-Klon isoliert werden konnte, musste festgestellt werden, dass Aufwand und Nutzen in keinem wissenschaftlich oder wirtschaftlich vertretbaren Verhältnis standen. Es erschien sinnvoller, die Punktmutationen der leicht verkürzten H19-Varianten aus der RACE-PCR-Klonierung in Kauf zu nehmen und mit den bereits vorhandenen Klonen weiter zu arbeiten. Die Experimente mit der Phagen-Bibliothek wurden daher abgebrochen.

### 3.2 Umklonierung des H19-Klons

Wie in 3.1.1.4 erläutert, enthielt der durch RACE-PCR-Experimente für die zukünftigen Versuche ausgewählte H19-Klon als Artefakt der Klonierungsstrategie am 5'-bzw. 3'-Ende kurze Zusatzsequenzen, die bei der *in-vitro*-Transkription Bestandteil der H19-RNA wurden. Diese stammten aus dem Adapter bzw. dem Vektor. Um der physiologischen Situation möglichst nahe zu kommen, war das nächste Ziel, durch eine Umklonierung in einen anderen Vektor diese Zusatzsequenzen auf ein absolut unvermeidbares Minimum zu reduzieren. Bei dieser Gelegenheit sollte gleichzeitig das 3'-Ende der cDNA so manipuliert werden, dass im Zuge der Transkription die RNA mit einem Poly-A-Schwanz am 3'-Ende versehen wird, da auch dies der physiologischen Situation entspricht. Dieser poly-A-Schwanz hätte weiterhin den Vorteil, dass er in keine Sekundärstruktur involviert und das 3'-Ende somit besser für Immobilisierungsstrategien zugänglich wäre.

Zunächst muss also die cDNA möglichst genau aus dem Ursprungsvektor isoliert werden. Am 5'-Ende enthält die cDNA die palindromische Consensus-Sequenz (3.1.1.4), die eine *Not* I und zwei *Eco* RI-Schnittstellen aufweist. Am 3'-Ende wurde bei der Klonierung ein PCR-Primer eingesetzt, der 3' von H19 ebenfalls eine *Not* I-Schnittstelle einführte. Somit kann die cDNA recht genau durch kombinierten *Eco* RI/*Not* I-Verdau isoliert werden. Die Isolation nur durch *Not* I ist nicht sinnvoll, da in diesem Fall an beiden Enden der gleiche Überhang entstehen würde. An beide Enden müssen anschließend aber unterschiedliche Adapter ligiert werden, um die Consen-

sus-Sequenz (5') wieder herzustellen bzw. am 3'-Ende den poly-A-Schwanz zu generieren. Bei zwei unterschiedlichen Überhängen kann die Ligation beider Adapter in einem Schritt erfolgen:



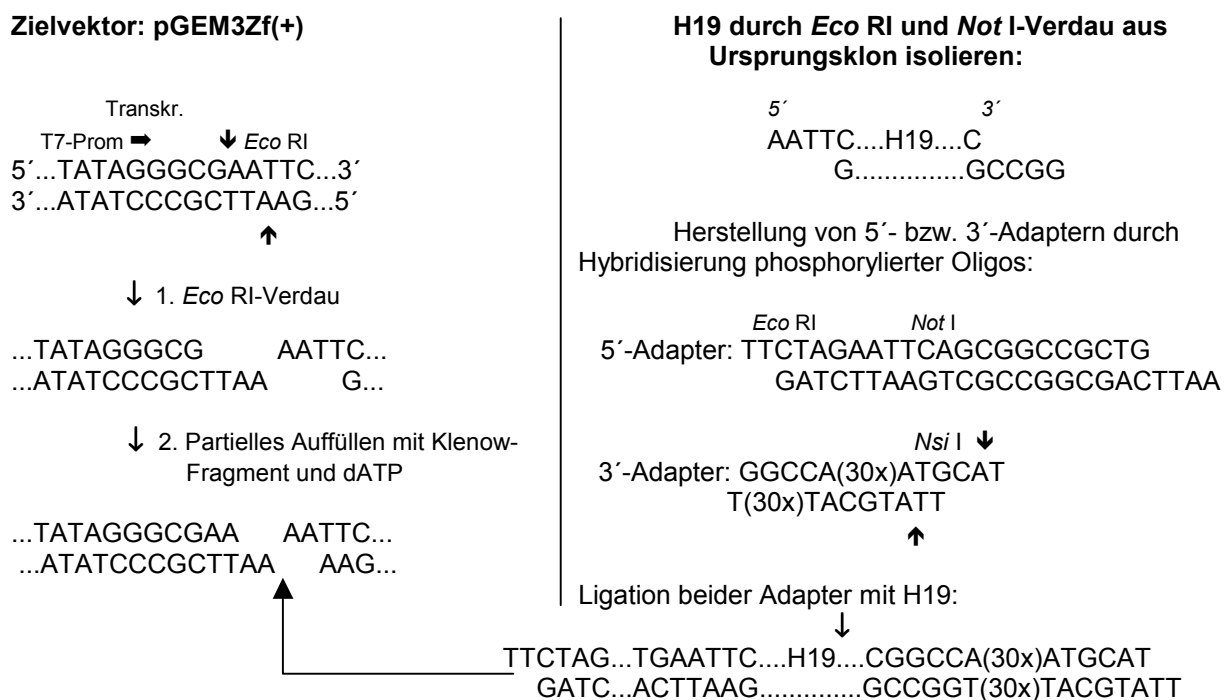
#### Abbildung 10: Umklonierung der H19-cDNA: Mungbohnen-Nuklease

Mittels Mungbohnen-Nuklease werden die einzelsträngigen Überhänge des linearisierten Zielvektors entfernt. Adapter-H19 wird stumpfend in den Vektor ligiert. Dabei entstehen Sense- und Antisense-Konstrukte. Das Transkript von *Nsi* I-linearisiertem Sense-Konstrukt hätte noch 5 zusätzliche Nukleotide am 5'-Ende sowie 8 zusätzliche am 3'-Ende vor dem poly-A-Schwanz (31x A).

Der zur Umklonierung eingesetzte Vektor pGEM3Zf(+) besitzt dicht hinter dem Transkriptionsstartpunkt des T7-Promotors eine *Eco* RI-Schnittstelle. Nach dem Verdau können die Überhänge theoretisch mit der einzelstrangspezifischen Mungbohnen-Nuklease entfernt werden, so dass nach stumpfendiger Ligation von Adapter-H19 in diesen Vektor sowohl Sense- als auch Antisense-Konstrukte unter T7-Promotorkontrolle entstehen. Die mögliche Produktion von Antisense-H19-RNA ist als Kontroll-RNA für zukünftige Experimente (z.B. Isolation RNA-spezifischer Bindungsproteine) von Bedeutung. Die Zusatzsequenzen an den Enden der Sense-H19-RNA würden in diesem Fall reduziert: 5' von 23 auf 5 Nukleotide und 3' von 31 auf 8 Nukleotide vor dem hinzugefügten poly-A-Schwanz (31 x A).

Darüber hinaus wurde eine zweite Strategie entwickelt für den Fall, dass die erste nicht funktionieren sollte, weil z.B. stumpfendige Ligationen wesentlich ineffizienter sind als kohäsive Ligationen oder die Nuklease unerwartete Eigenschaften aufweisen sollte, wie z.B. Doppelstrang-Degradation. Außerdem sind bei der ersten Strategie Religanden nicht durch Bau-weiß-Screening

zu ermitteln, da die mit der Überhangabspaltung verbundene Leserasterverschiebung nicht mehr zur Ausbildung einer funktionellen  $\beta$ -Galaktosidase führen kann. Die zweite Strategie bestand nun darin, die Überhänge des linearisierten Zielvektors mittels Klenow-Fragment in Gegenwart von dATP partiell aufzufüllen, so dass jeweils zwei A-Überhänge an den 5'-Enden verbleiben (Klenow-Fragment hat lediglich eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die Überhänge bleiben also erhalten). Durch leicht veränderte Adapterprimer erhält die adapterligierte H19-cDNA je zwei komplementäre T-Überhänge an den 5'-Enden, so dass sie quasi kohäsiv in den Vektor ligiert werden kann (TTAA-Klonierung):



#### Abbildung 11: Umklonierung der H19-cDNA: TTAA-Klonierung

Gezeigt ist das Prinzip der TTAA-Klonierung. Auch hierbei sollte die Ligation Vektor/Adapter-H19 Sense- und Antisense-Konstrukte liefern. Das Sense-Transkript hätte im Vergleich zur Nukleasestrategie 4 zusätzlich Nukleotide am 5'-Ende (damit insgesamt 9).

Der Vorteil der in Abbildung 11 gezeigten Strategie ist die verbesserte Ligationseffizienz, die Unterdrückung der Religation des Vektors wegen der nunmehr inkompatiblen 5'-Überhänge, die Möglichkeit der Identifikation von Religanden mittels Blau-Weiss-Screening sowie der Ausschluss der Nukleasebehandlung und der damit verbundenen Risiken. Allerdings müssen hierbei 4 zusätzliche Nukleotide am 5'-Ende der Sense-Transkripte in Kauf genommen werden.

### 3.2.1 Vorbereiten des Zielvektors

Es erwies sich generell als vorteilhaft, vor der Klonierung die linearisierte Vektor-DNA aus dem Agarosegel zu eluieren und damit von nichtlinearisierten Vektormolekülen weitgehend abzutrennen, da diese sehr effizient transformiert werden und den Religandenhintergrund stark erhöhen (vgl. 3.2.3).

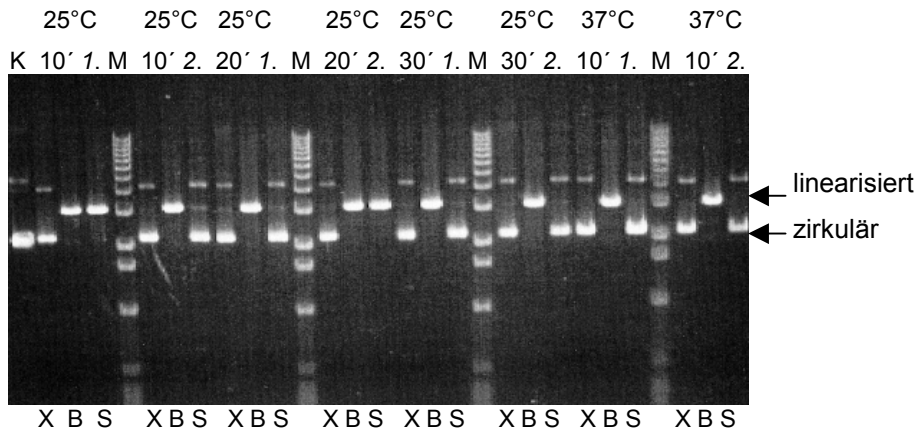
#### **Mungbohnen-Nuklease**

Zunächst wurde versucht, die Überhänge des linearisierten Vektors mittels Mungbohnen-Nuklease zu entfernen. Wurde hierfür unter Hersteller- bzw. Standardbedingungen gearbeitet (1 h, 37°C, 0,75 U/µg, Roche-Vorschrift bzw. Sambrook *et al.*, 1989), so wurde die Plasmid-DNA stark degradiert, im Agarosegel war nur noch ein Schmier zu erkennen (nicht gezeigt). Die Nuklease schien also entgegen der Darstellung des Herstellers sehr wohl auch doppelsträngige DNA zu degradieren, zumindest unter diesen Versuchsbedingungen. Daher mussten also zunächst die Bedingungen ermittelt werden, unter denen die Nuklease tatsächlich nur die Überhänge entfernt. Zu diesem Zweck linearisiert man den Vektor an einer Restriktionsschnittstelle in der Mitte der MCS, behandelt den Vektor mit der Nuklease unter Variation von Zeit und Temperatur, um nach erfolgter Religation, Transformation und Plasmidpräparation mittels Restriktionsverdau zu testen, ob einerseits die Linearisierungsschnittstelle vernichtet und andererseits die angrenzenden Schnittstellen noch vollständig vorhanden sind. Die MCS hinter dem T7-Promotor (3', stromabwärts) des verwendeten Klonierungsvektors enthielt im wesentlichen folgende Schnittstellen:



**Abbildung 11a: pGEM-3Zf(+)** mit relevantem Teil der multiplen Klonierungsstelle (MCS)

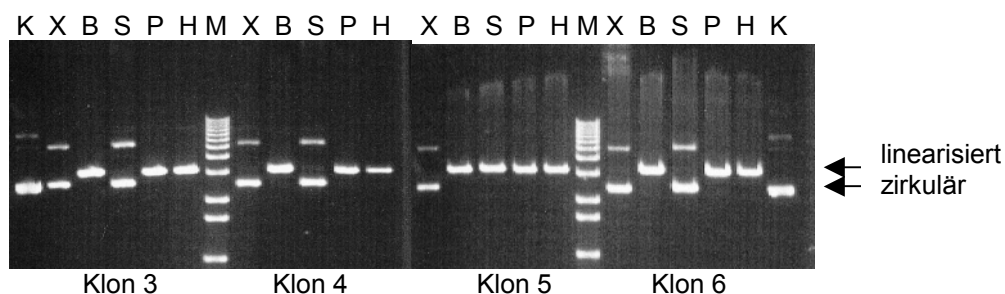
Vor der Nukleasebehandlung wurde der Vektor mit *Xba* I linearisiert. Mit 0,5 U Nuklease pro µg DNA wurde dann bei 25°C oder 37°C für 10, 20 oder 30 min behandelt. Die religierten Plasmide wurden dann auf die Schnittstellen *Xba* I, *Bam* HI und *Sal* I untersucht:



**Abbildung 12: Restriktionsanalyse der Aktivität von Mungbohnen-Nuklease**

Der mit *Xba* I linearisierte Vektor wurde für die angegebene Zeit bei der angegebenen Temperatur mit Nuklease inkubiert und jeweils zwei Klone analysiert. Für jeden analysierten Religationsklon wurden die drei Verdauungen (*Xba* I, *Bam* HI und *Sal* I) nebeneinander auf ein 1x TAE-Gel aufgetragen. K: Kontrollplasmid zirkulär, M: 1 kb-DNA-Leiter.

Bei allen analysierten Klonen wies die jeweils erste Spur (*Xba* I) zirkuläres Plasmid auf, d.h., bei allen war die Linearisierungsschnittstelle nicht mehr vorhanden. Dieses beabsichtigte Ziel wurde also bereits nach Inkubation bei 25°C für 10 min erreicht. Die 5' lokalisierte *Bam* HI-Schnittstelle war bei allen untersuchten Klonen vorhanden, die Nuklease degradierte also bei allen untersuchten Temperatur- und Zeitpunkten nicht den 5' gelegenen Doppelstrangbereich des Plasmides. Die 3' gelegene *Sal* I-Schnittstelle war hingegen bei 25°C nur noch bei 10 und 20 min jeweils einmal vorhanden, alle anderen Klone wiesen diese Schnittstelle nicht mehr auf. Die Nuklease degradiert also offenbar zeit- und temperaturabhängig doppelsträngige DNA stromabwärts. Für die stumpfendige Umklonierung der H19-cDNA wäre dies tolerabel, da der T7-Promotor intakt bliebe. Um zu untersuchen, ob stromabwärts noch weitere Schnittstellen betroffen waren (*Pst* I und *Hind* III) bzw. das Ausbleiben der stromaufwärts-Degradation zu verifizieren, wurden vier weitere Klone analysiert, die bei 25°C für 10 min behandelt wurden:



**Abbildung 13: Restriktionsanalyse der Aktivität von Mungbohnen-Nuklease bei 25°C, 10 min**

Analyse vier weiterer Klone, die bei 25°C für 10 min mit Nuklease behandelt wurden. Jeweils nebeneinander sind die Verdauungen eines Klons mit *Xba* I, *Bam* HI, *Sal* I, *Pst* I und *Hind* III gezeigt. K: Kontrollplasmid zirkulär, M: 1 kb-DNA-Leiter.

Auch hierbei bestätigte sich, dass *Xba* I immer entfernt wurde, *Bam* HI (5') immer vorhanden war und teilweise *Sal* I (3') ebenfalls entfernt wurde. Die weiter stromabwärts gelegenen *Pst* I- und *Hind* III-Schnittstellen waren hingegen immer vorhanden, was auch für die Klone aus Abb. 12 bestätigt wurde, die bei 25°C für 10 bis 30 min behandelt wurden (nicht gezeigt). Die Doppelstrangdegradation scheint also auf den vom T7-Promotor abgewandten Stromabwärtsbereich beschränkt und bei dieser Temperatur nicht sehr ausgeprägt zu sein, da nur eine weitere Schnittstelle entfernt wurde. Daher schien ein mit *Eco* RI linearisierter und bei 25°C für 10 min mit Mungbohnen-Nuklease behandelter Vektor für die Klonierung der Adapter-H19 geeignet zu sein.

### ***Klenow-Fragment***

Der linearisierte und mit Klenow-Fragments partiell aufgefüllte Vektor wurde nicht weiter analysiert, sondern direkt bei der Klonierung der Adapter-H19-cDNA getestet. (siehe 3.2.3)

## **3.2.2 Vorbereiten des H19-Inserts**

Die H19-cDNA wurde zunächst mittels *Eco* RI/*Not* I-Verdau aus dem Ursprungsvektor ausgeschnitten. Zur besseren Auftrennung im Agarosegel wurde der Restriktionsansatz zunächst mit Proteinase K behandelt, phenolextrahiert und ethanolgefällt. Die H19-cDNA wurde aus dem Agarosegel eluiert und wiederum extrahiert und gefällt, um sie für weitere Manipulationen in hochreiner Form zu erhalten. Von dem Ursprungsplasmid (7,1 kb) wurden 120 µg eingesetzt, am Ende erhielt man 24 µg H19-cDNA (2,3 kb). Daraus errechnet sich eine Ausbeute von 63 %, was für die Anzahl der Reinigungsschritte akzeptabel erscheint. Die Menge ist in jedem Falle ausreichend für die weiteren Schritte und die eigentliche Klonierung.

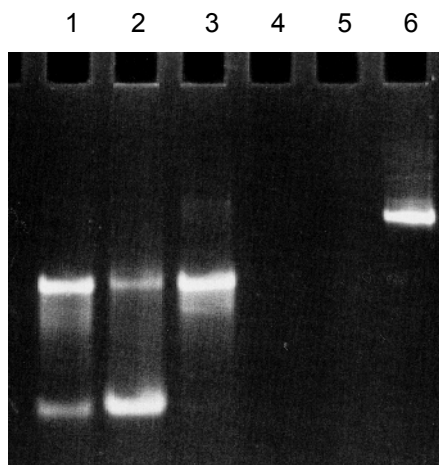
Da bei der Isolation der H19-cDNA die 5'-Consensus-Sequenz weitgehend entfernt wurde und am 3'-Ende des Transkriptes ein poly-A-Schwanz generiert werden sollte, mussten entsprechende Adapter an die Enden ligiert werden (vgl. 3.2). Da die cDNA an jedem Ende einen anderen Überhang trug, konnten beide Adapter in einer Reaktion ligiert werden.

### ***Adapterproduktion und -ligation***

Zur Herstellung doppelsträngiger Adaptermoleküle wurden Oligonukleotide entsprechender Sequenz bestellt und zunächst mittels T4-Kinase phosphoryliert, was notwendig ist, da synthetischen Oligonukleotiden die jeweilige 5'-Phosphatgruppe fehlt, die aber zur späteren Ligation der Adapter an die H19-cDNA und des Gesamtkonstruktes in den Zielvektor vorhanden sein



muss. Anschließend wurden unter den milden Salzbedingungen der Kinasierung die Oligos eines Adapter zusammen im PCR-Gerät zunächst hitzedenaturiert und durch langsames Abkühlen schließlich hybridisiert. Der Hybridisierungserfolg wurde mittels PAA-Gelelektrophorese überprüft:



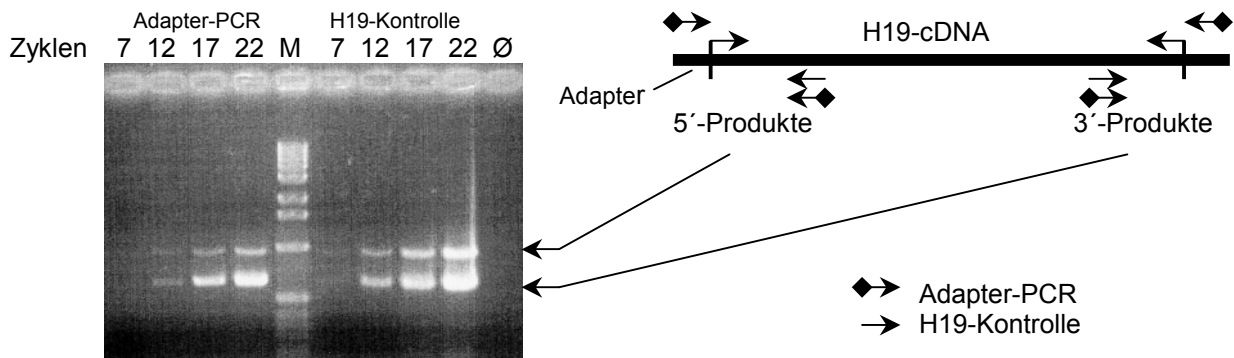
**Abbildung 14: Hybridisierung der Oligonukleotide zu Doppelstrang-Adapttern**

Jeweils 100 pmol Oligonukleotid bzw. Hybridisierungsprodukt wurden aufgetrennt.

- 1: 1. 5'-Oligonukleotid
- 2: 2. "
- 3: 5'-Adapter
- 4: 1. 3'-Oligonukleotid
- 5: 2. "
- 6: 3'-Adapter

Die einzelnen Oligonukleotide des 5'-Adapters weisen beide zwei Banden auf, die auf gleicher Höhe mit entgegengesetzter Intensität lokalisiert sind, worin sich die Komplementarität der Sequenzen und die Ausbildung ähnlicher intramolekularer Strukturen widerspiegeln könnten. Das Hybridisierungsprodukt (5'-Adapter) hingegen weist nur noch eine einheitliche Bande auf, es sind also nur noch doppelsträngige Hybridmoleküle vorhanden. Bei den einzelnen Oligonukleotiden des 3'-Adapters hingegen ist gar keine Bande zu erkennen, was auf den hohen Anteil von poly-A bzw. poly-T und die damit verbundene Abwesenheit jeglicher Doppelstrangbereiche zurückzuführen zu sein scheint, so dass Ethidiumbromid offenbar nicht interkalieren kann. Denn im Gegensatz dazu ist das doppelsträngige Hybridisierungsprodukt (3'-Adapter) klar als Einzelbande zu erkennen.

Da also jeweils die gewünschten Adapterhybride entstanden sind, konnten diese direkt zur Ligation an die H19-cDNA eingesetzt werden, zumal Kinase- und Ligasepuffer kompatibel sind. Das Produkt der korrekten Größe wurde wiederum aus dem Gel eluiert, um mögliche Multimere abzutrennen. Es wurden schließlich 7,0 µg Ligationsprodukt isoliert. Um den Erfolg dieser Ligationen zu überprüfen, bietet sich die PCR an. Hierbei wird jeweils ein Adapter-Oligonukleotid als Primer mit einem H19-spezifischen Gegenprimer kombiniert. Nur wenn die Ligation erfolgreich war, kann das spezifische PCR-Produkt entstehen. Da die zu überprüfenden Enden im Verhältnis zur Größe der entstehenden PCR-Produkte sehr weit auseinander liegen, können die spezifischen Produkte beider Enden in einer Reaktion amplifiziert werden:



### Abbildung 15: Überprüfung der Adapterligation an die H19-cDNA mittels PCR

Amplifikation spezifischer Produkte durch Kombination von Adapter-Oligonukleotid und H19-Primer (Adapter-PCR) im Vergleich zur Kombination zweier H19-spezifischer Primer (H19-Kontrolle, Produkte sind nur geringfügig kleiner als Adapter-PCR-Produkte). M: 1 kb-Leiter, Ø: Leerkontrolle (PCR ohne Template (d.h. Ligationsprodukt)).

Deutlich zu erkennen sind die jeweiligen spezifischen Produkte bei der Adapter-PCR, was bedeutet, dass die Ligation erfolgreich war. Bei der Adapter-PCR und bei der H19-Kontrolle sind die Produkte ab der gleichen Zyklenzahl (12) zu erkennen. Es lagen also in etwa die gleichen Templatemenen vor, d.h. quasi jedes H19-Molekül ist mit entsprechenden Adaptermolekülen verbunden worden. Die Ligation war also quantitativ, was bei einem 100fachen Überschuss an Adaptermolekülen auch zu erwarten war. Die geringere Intensität der Adapter-PCR-Banden im Vergleich zu den H19-Kontrollbanden ist sicherlich dadurch zu erklären, dass z.T. andere Primer (adapterspezifische) mit anderen Längen, GC-Gehalten und Möglichkeiten zur Sekundärstruktur-bildung eingesetzt wurden, was die Hybridisierung der Primer und damit die Effizienz der gesamten PCR beeinflusst. Da das gewünschte Produkt also in mehr als ausreichenden Mengen vorlag, konnte es in den Zielvektor ligiert werden.

### 3.2.3 Das Gesamtkonstrukt

Nunmehr konnten der vorbereitete Zielvektor und die präparierte H19-cDNA zum neuen Transkriptionsvektor zusammenligiert, transformiert, isoliert und charakterisiert werden.

#### Mungbohnen-Nuklease

Zunächst wurde versucht, gemäß der Strategie aus Abb. 10 mittels stumpfendiger Ligation das Ziel der Umklonierung zur Herstellung optimierter Transkripte zu erreichen. Als erstes wurde nukleasebehandelter, dephosphorylierter Vektor mit adapterligierter H19-cDNA ligiert. Sämt-

liche auf der Selektionsplatte erhaltenen Kolonien enthielten jedoch Religanden. Auch der Versuch der Ligation des Vektors mit nukleasebehandelter H19-cDNA brachte ebenfalls nur Religanden hervor. Schließlich wurde versucht, stumpfendige PCR-Produkte der H19-cDNA in den Vektor zu ligieren. Obwohl hierbei die Religationskontrollen keine Kolonien aufwiesen, waren alle erhaltenen Klone wiederum Religanden. Die unimolekulare Religation war anscheinend trotz Dephosphorylierung stark bevorzugt, so dass auch ein dreifacher molarer Überschuss des H19-Inserts nicht zum angestrebten Ziel führte. Die Gründe hierfür blieben unklar. Da Religanden nicht durch Blau/Weiss-Screening ermittelt werden konnten, würde ein Festhalten an dieser Methode eine sehr große Anzahl an Plasmidpräparationen mit stets ungewissem Ausgang nach sich ziehen. Es schien daher wesentlich sinnvoller, zur zweiten Methode überzugehen, dem partiellen Auffüllen mit Klenow-Fragment.

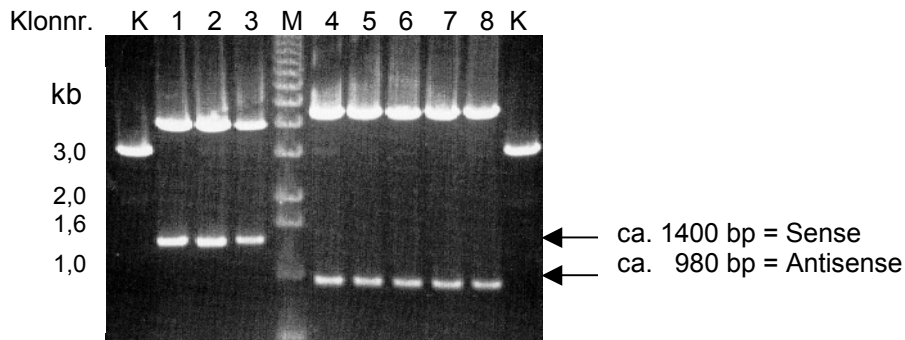
### ***Klenow-Fragment***

Diese in Abb. 11 dargestellte Methode bot zum einen den enormen Vorteil der Möglichkeit, Religanden durch Blau/Weiss-Screening an der Farbe der Kolonie (blau) zu identifizieren und damit die Zahl der durchzuführenden Plasmidpräparationen zu minimieren. Zum anderen sollte die eigentliche Ligation durch die quasi kohäsiven TTAA-Enden deutlich effizienter sein als die stumpfendige bei der Nuklease. Der linearisierte, geleluierte und mit Klenow-Fragment teilaufgefüllte Zielvektor wurde im molaren Verhältnis Vektor/Insert 1:1 und 1:3 ligiert, wobei eluierter und teilaufgefüllter Vektor ohne Insert jeweils als Religationskontrollen dienten. Nach der Transformation wurden die Kolonien gezählt:

Transformation mit	Anzahl blauer Kolonien (Religanden)	Anzahl farbloser Kolonien (Klone mit Insert)
Religation Vektor linearisiert/eluiert	> 1000	0
Religation Vektor linearisiert/eluiert/Klenow	192	8
Ligation Vektor lin/el/Klen mit Ad-H19 1:1	155	10
Ligation Vektor lin/el/Klen mit Ad-H19 1:3	67	6
Kontrolle Vektor linearisiert	297	0
Kontrolle Vektor linearisiert/eluiert	8	0
Kontrolle Vektor linearisiert/eluiert/Klenow	0	0

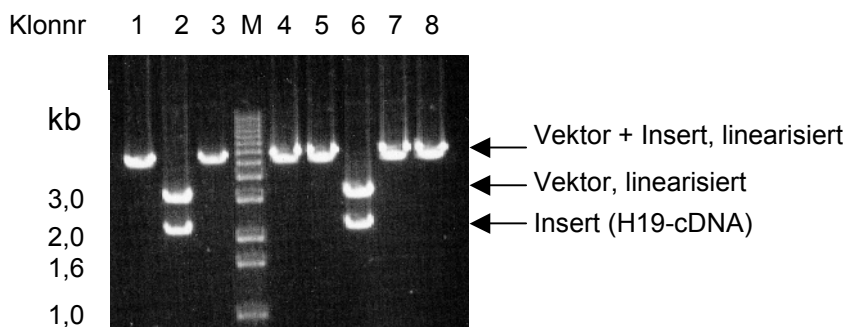
Durch die Religationsreaktionen wird deutlich, dass das partielle Auffüllen mittels Klenow-Fragment und die damit verbundene Inkompatibilität der Enden die Religation zwar deutlich herabsetzt aber nicht gänzlich unterdrückt. Die Reaktion ist also nicht quantitativ und ein Hintergrund an Religanden nicht zu verhindern, die durch Blau/Weiss-Screening identifiziert werden müssen, um die wenigen farblosen Kolonien, die möglicherweise ein Insert tragen, mit einem vertretbaren Aufwand näher untersuchen zu können. Warum bereits bei der Religation nach

Klenow-Behandlung farblose Kolonien entstanden, blieb unklar. Es wurden alle farblosen Kolonien der Ligationsreaktionen mittels Restriktionsanalyse näher untersucht. Von den 16 Untersuchten stellten sich 8 als Religanden heraus. Die Orientierung des H19-Inserts der übrigen 8 Klone wurde mittels *Pst* I-Verdau ermittelt, da dieses Enzym einmal in H19 und einmal hinter dem Insert in der MCS des Vektors schneidet. In der Sense-Orientierung sollte ein Fragment der Größe 1400 bp und in der Antisense-Orientierung der Größe 980 bp ausgeschnitten werden:



**Abb 16: Restriktionsverdau (*Pst* I) der erhaltenen Klone zur Ermittlung der cDNA-Orientierung**  
K: linearisierter Zielvektor, M: 1 kb-Leiter.

Somit enthielten 3 Klone die H19-cDNA in der Sense- und 5 in der Antisense-Orientierung. Außerdem wurde die korrekte Lokalisierung der Adapter geprüft: Der 5'-Adapter enthält zweimal die Schnittstelle *Eco* RI, die auch im Vektor bei der Sense-Orientierung unmittelbar vor dem Adapter einmal vorhanden ist. Ist dieser Adapter korrekt lokalisiert, wird nach Verdau mit dieser Nuklease der Vektor linearisiert. Ist der Adapter am 3'-Ende oder an beiden Enden vorhanden, würde das gesamte Insert ausgeschnitten werden. Bei der Antisense-Orientierung enthält der Vektor diese Schnittstelle nicht mehr. Nur wenn der Adapter an beiden Enden vorhanden wäre, würde dies durch Ausschnitt des gesamten Inserts bemerkt werden:



**Abbildung 17: Restriktionsverdau mit *Eco* RI zur Überprüfung des 5'-Adapters**

Klone 1-3: Sense-H19, Klone 4-8: Antisense-H19, M: 1 kb-Leiter. Linearisierter Vektor mit Insert: 5,5 kb, Vektor: 3,2 kb und Insert: 2,3 kb.

Der Sense-Klon Nr. 2 und der Antisense-Klon Nr. 6 enthalten *Eco* RI-Schnittstellen auf beiden Seiten der H19-cDNA, so dass diese ausgeschnitten wurde. Dies ist nur möglich, wenn der 5'-Adapter an beide Enden der H19-cDNA ligiert wurde. Dies wurde bestätigt durch einen Verdau mit der Nuklease *Nsi* I, die die Vektoren nur bei Anwesenheit des 3'-Adapters linearisiert (vgl. 3.2). Da diese beiden Klone in der Tat keine *Nsi* I-Schnittstelle aufweisen (nicht gezeigt), enthalten sie also nur den 5'-Adapter auf beiden Seiten der cDNA und keinen 3'-Adapter. Sie wurden daher verworfen. Somit verblieben zwei Sense- und vier Antisense-Klone, mit denen die gewünschten Transkripte hergestellt werden konnten. Zur endgültigen Absicherung der Sequenz und damit auch der des korrespondierenden Transkriptes wurde die cDNA des ersten Sense-Klones (pGEM3S1) komplett durchsequenziert:

### Sequenzanalyse H19, pGEM3S1 mittels BLAST-Search nach Umklonierung aus pBac5

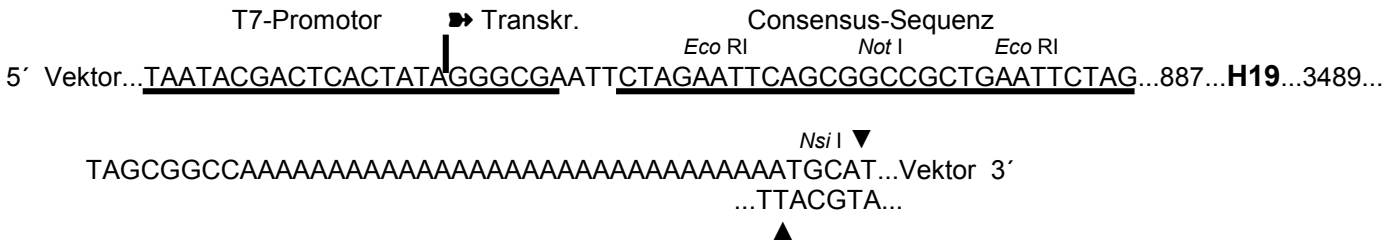
Referenz: GenBank M32053 (= H19-Gen, Brannan *et al.*, Mol.Cell.Biol. 10, 28-36 (1990)), nach Chromatogramm-Auswertung

M = eindeutige Änderung gegenüber Referenz mit Angabe der Basenänderung

Seq.Primer	informativer Sequenzbereich	Mutationsposition	Mut.pos. pBac5
SA4 forw.	887 - 1011	945: M, A → C	identisch
A3 forw	923 - 1480	945: s.o. 1052: M, T → C 1169: M, A → G	s.o. identisch identisch
6 forw.	1350 - 1900	1456: M, T → C 1569: M, T → A 1603: M, G → A 1737: M, G → A	identisch identisch identisch identisch
4 rev.	1560 - 2114	1569: s.o. 1603: s.o. 1737: s.o.	s.o. s.o. s.o.
3 forw.	1971 - 2799	keine	
7 forw.	2266 - 3050	keine	
C forw.	2911 - Ende	3058: M, C → T	identisch
8 forw.	3266 - Ende	<u>keine</u>	

**Σ = 8 Punktmutationen durch PCR**

Klonsequenz ab T7-Promotor (angegebene Sequenz entspricht der Transkript-Sequenz):



Transkript enthält am 5'-Ende 9 zusätzliche Nukleotide und am 3'-Ende vor dem poly-A-Schwanz 8.

MW Transkript pGEM3S1: 799.923,6 g/mol = 1,25 pmol/µg

Basenzusammensetzung des Transkripts:		%	
U	394	16,9	}
A	487	20,8	
			}
C	652	27,9	}
G	805	34,4	
			}

Hierbei wurden die bei der ersten Sequenzierung ermittelten Punktmutationen eindeutig bestätigt. Die am 5'- und am 3'-Ende des Transkriptes enthaltenen Zusatzsequenzen wurden auf ein Minimum reduziert und ein 31 Nukleotide langer poly-A-Schwanz am 3'-Ende eingeführt. Der hohe GC-Basengehalt der H19-RNA (62,3 %) könnte ein Anzeichen dafür sein, dass sie ausgeprägte und stabile Sekundärstrukturen bilden und mit anderen Makromolekülen wechselwirken könnte. Mit den optimierten Transkripten dieses Sense-Klons (pGEM3S1) bzw. des korrespondierenden Antisense-Klons (pGEM3A1) wurden alle weiteren Versuche zur Immobilisierung und Isolierung bindender Proteine durchgeführt.

### 3.3 Modifizierung und Immobilisierung der H19-RNA

Um letztendlich mögliche H19-bindende Proteine isolieren zu können, musste die RNA an eine Matrix immobilisiert werden, was zunächst ihre Modifikation mit immobilisierbaren Komponenten voraussetzte. Dazu bot sich die Benutzung von Nukleotiden an, die kovalent mit den Molekülen Digoxigenin bzw. Biotin verknüpft waren, da sich diese Moleküle und mit ihnen die gesamte RNA an entsprechend modifizierte magnetische Partikel (mit Anti-DIG-Antikörper bzw. Streptavidin) immobilisieren lassen. Diese Nukleotide können bei der Transkription statistisch in das Transkript eingebaut werden. Um jedoch theoretisch mögliche Störungen der RNA-Struktur- bildung durch DIG bzw. Biotin auszuschließen, sollten die modifizierten Nukleotide nach Möglichkeit an einem Ende der Transkriptmoleküle angefügt werden.

Außerdem bestand die Möglichkeit, die RNA über ihren poly-A-Schwanz an magnetische Partikel oder andere Matrizen mit kovalent gebundenen poly-T-Oligonukleotiden zu hybridi-

sieren, wie sie auch zur mRNA-Isolierung verwendet werden. Der Nachteil hierbei ist jedoch, dass nur das Sense-Transkript mit seinem poly-A-Schwanz am 3'-Ende immobilisiert werden kann, nicht aber das Antisense-Kontrolltranskript mit seinem poly-T-Schwanz am 5'-Ende.

Eine weitere Möglichkeit war eine in den siebziger Jahren entwickelte Methode, bei der die RNA mittels Periodat chemisch modifiziert wird, wodurch die vicinalen OH-Gruppen am 3'-Ende der RNA zu Aldehydgruppen oxidiert werden (Fahnestock & Nomura, 1972), was deren Umsetzung mit Hydrazidagarose unter Bildung eines Hydrazons ermöglicht (Lamed *et al.* 1972). Die RNA wird dadurch kovalent mit der Agarose verbunden, mit der dann Affinitätsäulen gefüllt werden können.

Der statistische Einbau von modifizierten Nukleotiden bei der Transkription bereitete keine Probleme. Das im Transkript enthaltene Digoxigenin konnte durch einen Spot-Test nachgewiesen werden durch eine enzymatische Farbreaktion der an den Anti-DIG-Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase (nicht gezeigt). Besser geeignet für die nachfolgenden Applikationen wäre jedoch endmarkierte RNA.

### 3.3.1 Endmarkierung

Da bei einer RNA dieser Größenordnung deren chemische Synthese und damit die Markierung während dieses Prozesses ausgeschlossen ist, müssen markierte Nukleotide an das RNA-Molekül gekoppelt werden. Am 5'-Ende könnte ein DIG-derivatisiertes, komplementäres Dinukleotid als Initiator-Dinukleotid bei der T7-Transkription eingebaut werden (Pitulle *et al.* 1992). Um quantitativ am 5'-Ende eingebaut zu werden, müsste das Dinukleotid im Überschuss zum normalerweise eingebautes GTP in der Transkriptionreaktion vorliegen. Der ganz überwiegende Teil des Initiators ginge also ungenutzt verloren, was diese Methode für die Herstellung größerer Mengen markierter RNA wirtschaftlich uninteressant macht.

Am 3'-Ende könnten DIG oder Biotin markierte Nukleotide bzw. Oligonukleotide mittels Terminaler Deoxynucleotidyltransferase (TdT) oder T4 RNA Ligase angefügt werden.

Eine weitere Markierung am 3'-Ende wäre die Periodat-vermittelte Oxidation der 2'-und 3'-OH-Gruppe zu Aldehydgruppen.

#### ***Terminale Deoxynucleotidyltransferase (TdT)***

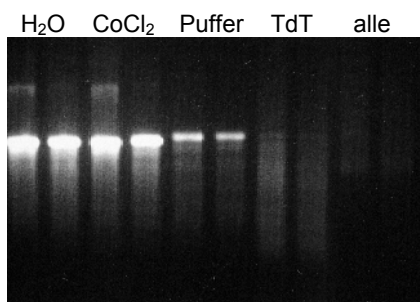
Diese Methode kann angewendet werden zur Markierung einzel- bzw. doppelsträngiger DNA sowie RNA verschiedener Größen (bis 1600 Nukleotide getestet) mit DIG- oder biotinderivatisierten Nukleotiden (Rosemeyer *et al.*, 1994). Somit könnte die H19-RNA unter Benutzung

eines DIG-markierten Didesoxynukleotids am 3'-Ende mit genau einem DIG-Molekül markiert werden:



Somit wäre die RNA optimal markiert: Pro Molekül wäre genau ein DIG-Molekül am Ende vorhanden, d.h. die Strukturbildung würde nicht gestört werden. Die Immobilisierung des 3'-Endes über den Antikörper an beispielsweise magnetische Partikel könnte dieses Ende vor Nuklease-Abbau schützen. Durch Einbau nur eines DIG-Moleküls würde es nicht zur Quervernetzung mit anderen Partikeln kommen; die Partikel könnten maximal beladen werden.

Wurde die H19-RNA gemäß obiger Reaktion unter Herstellerbedingungen markiert, war die RNA nach der Reinigung stark degradiert. Es wurden daher die Stabilität der RNA in den einzelnen Reaktionskomponenten getestet:



**Abbildung 18: Stabilität der H19-RNA in den Einzelkomponenten der TdT-Reaktion**

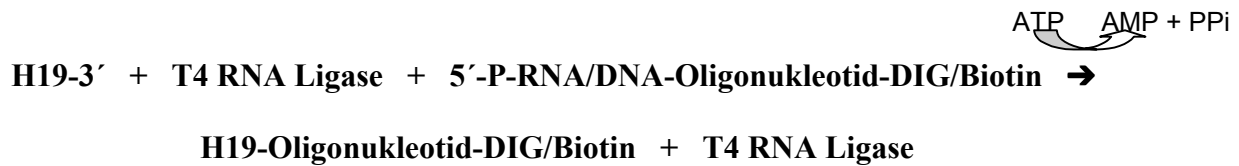
Jeweils 0,5 µg H19-RNA wurden mit der jeweils genannten Komponente (jeweilige Standardkonzentration) bei 37°C für 30 bzw. 60 min inkubiert und nebeneinander auf ein Agarosegel aufgetragen.

Deutlich zu erkennen ist, dass die RNA durch die Inkubation mit der Terminalen Transferase stark degradiert wird. Auch nach der Inkubation mit dem Puffer ist deutlich weniger RNA vorhanden als nach der Inkubation mit sterilem Wasser. Dieses Ergebnis war leider beliebig reproduzierbar, auch mit der Transferase eines anderen Herstellers. Daher stellt sich die Frage, wie Rosemeyer *et al.* es 1994 geschafft haben, ein 1600 Nukleotide langes Transkript erfolgreich zu markieren, zumal diese Gruppe in dem Unternehmen arbeitete, dessen Transferase im obigen Experiment verwendet wurde. In der Publikation ist das Ergebniss nur schriftlich beschrieben. Wie auch immer, diese Strategie schien aussichtslos zu sein und wurde aufgegeben.

#### **T4 RNA Ligase**

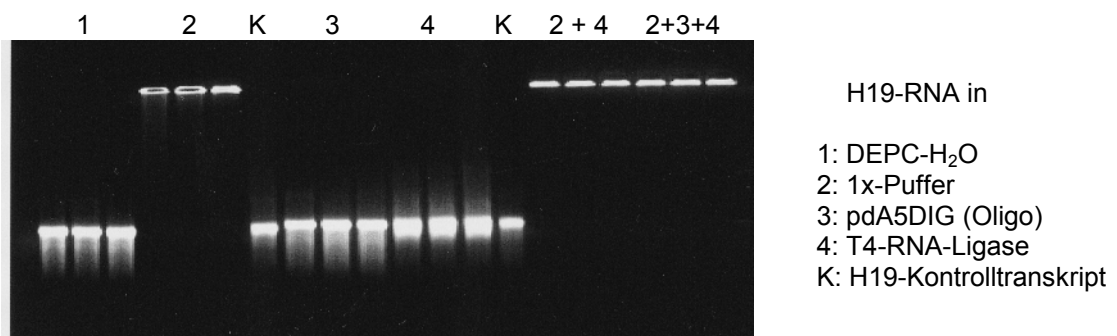
Das Enzym T4-RNA-Ligase katalysiert die Ligation von 5'-Phosphat-DNA oder -RNA an 3'-Hydroxyl-DNA oder -RNA unter Hydrolyse von ATP zu AMP und Pyrophosphat. Substrate sind einzelsträngige DNA- bzw. RNA-Moleküle:





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-Oligonukleotid ligiert wird, das am 5'-Ende phosphoryliert und am 3'-Ende durch Digoxigenin bzw. Biotin blockiert ist. Die Blockierung des 3'-Endes ist wichtig, um die Multimerisierung der Oligonukleotide zu unterdrücken. Ein RNA-Dimer wurde freundlicherweise für Voruntersuchungen von Dr. 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). Da dieses Dimer nur begrenzt zur Verfügung stand und RNA-Synthesen sehr teuer sind, wurde es in seiner Ligationseffizienz mit einem DNA-Oligonukleotid verglichen, das aus fünf Desoxyadenosinen bestand, welches ebenfalls 5'-phosphoryliert und 3' durch Digoxigenin blockiert war (im Folgenden pdA5DIG genannt).

Zunächst jedoch wurde die Stabilität der H19-RNA in den T4-RNA-Ligase-Komponenten getestet:



**Abbildung 19: Stabilität der H19-RNA in T4-Ligase-Komponenten**

Je 1,0 µg H19-RNA wurde für 1,5, 3,0 und 5,0 h bei 37°C mit den jeweils angegebenen Komponenten inkubiert (Standardkonzentrationen) und jeweils nebeneinander auf einem Agarosegel aufgetragen und getrennt.

Alle Spuren, die T4-Ligasepuffer-behandelte H19-RNA enthalten, weisen keine Bande mehr auf der Höhe des Kontrolltranskriptes auf. Hierbei ist die RNA in den Taschen des Agarosegels lokalisiert. Der 1x-Puffer enthält 10 mM Magnesiumchlorid. Dies entspricht dem des Öfteren beobachteten Phänomen, dass die H19-RNA ab einer Mg<sup>2+</sup>-Konzentration von 3 bis 4 mM nach

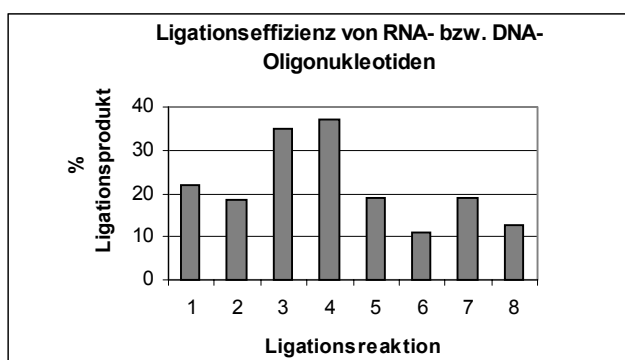
Erhitzen im RNA-Probenpuffer das Laufverhalten ändert und schließlich nicht mehr in das Gel einwandert. Vermutlich wird die Löslichkeit der RNA irreversibel so weit herabgesetzt, dass die Gelmatrix eine unüberwindbare Barriere darstellt. Wird die RNA jedoch bei 10 mM  $Mg^{2+}$  ohne Erhitzen in DNA Probenpuffer aufgetragen, so ist die Auftrennung unverändert, es ist keine  $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit zu beobachten (nicht dargestellt). Es handelt sich also um ein Artefakt der Probenpufferbehandlung. Da alle anderen Spuren vollständig intakte H19-RNA aufweisen, kann dies auch für die RNA in den Taschen vermutet werden. Somit konnte der Ansatz der T4-RNA-Ligation weiter verfolgt werden.

Um eine Multimerisierung der H19-RNA bei der Ligation zu unterdrücken, wurden die Oligonukleotide im 30fachen molaren Überschuss eingesetzt. Zur Quantifizierung wurden  $^{32}P$ -markierte Transkripte verwendet, so dass die Ausbeute an Ligationsprodukt nach der Abtrennung der nichtligierten DIG/Bio-Oligonukleotide und der Immobilisierung des Produktes an im Überschuss vorliegende magnetische Partikel grob ermittelt werden konnte. Anschließend konnte die Intaktheit der RNA durch deren Ablösung von den Partikeln durch Proteinase-K-Verdau und Phenolextraktion auf einem Agarosegel überprüft werden.

Im Folgenden wird die Ligation von pCCBio (RNA) und pdA5DIG (DNA) an je H19 Sense und Antisense über Nacht bei 4°C bzw. RT gezeigt:

Ligation	ÜS1 (cpm)	ÜS2 (cpm)	E + M (cpm)	$\Sigma$ ÜS1,2, E, M (cpm)	% Ligations- produkt
1 = Sense-DIG RT	92.000	3.000	27.000	122.000	22,1
2 = Sense-DIG 4°C	93.000	3.400	21.500	117.000	18,4
3 = Sense-Bio RT	73.000	2.700	40.500	116.000	34,9
4 = Sense-Bio 4°C	73.000	3.800	45.500	122.300	37,2
5 = Antisense-DIG RT	87.000	3.700	21.000	111.700	18,8
6 = Antisense-DIG 4°C	145.000	4.500	18.500	168.000	11,0
7 = Antisense-Bio RT	107.000	4.500	26.000	137.500	18,9
8 = Antisense-Bio 4°C	142.000	5.200	21.000	168.200	12,5

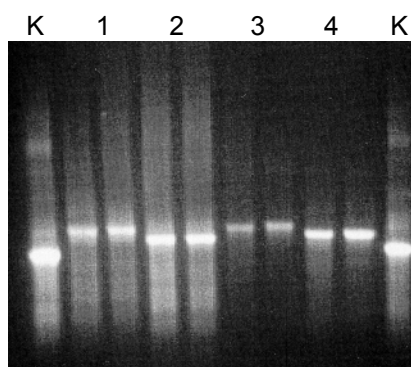
**Tabelle 5: Ligation von RNA (Bio)- bzw. DNA (DIG)-Oligonukleotiden an  $^{32}P$ -H19-Sense bzw. - Antisense RNA durch T4 RNA-Ligase bei RT bzw. 4°C**



Nach der Ligation wurden die nichtligierten Oligonukleotide durch Gelfiltration entfernt. Dann wurden die Ligationsprodukte an entsprechende magnetische Partikel immobilisiert. ÜS1 entspricht dem Überstand nach der magnetischen Separation, also der nichtligierten Ausgangs-RNA. ÜS2 entspricht den vereinigten Überständen nach intensivem Waschen der Partikel. E + M entspricht der Summe aus eluierter (Proteinase-K-Verdau) und an den Partikeln verbliebener RNA, also an immobilisiertem Ligationsprodukt. Der prozentuale Anteil an Ligationsprodukt entspricht dem Anteil von E + M an der Gesamtsumme der Aktivität ( $\Sigma$ ) und ist ein Maß für die Quantität der Ligation. Dieser prozentuale Anteil der jeweiligen Reaktion ist im nebenstehenden Diagramm nochmals gezeigt.

Die Ligationen mit Sense-H19 verdeutlichen, dass RNA-Oligonukleotide (3, 4) deutlich besser ligiert werden ( $\varnothing$  36 %) als DNA-Oligonukleotide (1, 2,  $\varnothing$  20 %), wobei die Temperatur keinen signifikanten Einfluss hat. Die Temperaturwerte können hierbei also als Doppelwerte angesehen werden. Bei der Antisense-RNA ist zwischen den Oligonukleotiden kein Unterschied mehr zu erkennen (5 - 8); beide werden gleich schlecht ligiert. Die Ursache hierfür liegt in der unterschiedlichen Zugänglichkeit des 3'-Endes des jeweiligen Transkriptes: Das Sense-Transkript trägt einen strukturlosen poly-A-Schwanz, so dass das 3'-Ende vermutlich aus der Gesamtstruktur der RNA herausragt und für die Ligase gut zu erreichen ist. Das Antisense-Transkript hat keinen poly-A-Schwanz. Das 3'-Ende kann also selbst Teil einer Sekundärstruktur sein oder von einer solchen verdeckt werden, so dass sterische Behinderung die Ligationseffizienz herabsetzt. Dafür spricht auch die deutlichere Temperaturabhängigkeit: Bei Raumtemperatur (5, 7, 22°C) ist die Ligationausbeute höher (ca. 19 %) als bei 4°C (6, 8, ca. 12 %). Da mit höherer Temperatur die Wahrscheinlichkeit lokaler Auflösung von Sekundärstrukturen steigt, könnte dies die Zugänglichkeit des 3'-Endes und damit die Ligationseffizienz steigern.

Die eluierte RNA wurde schließlich im Agarosegel auf Degradation überprüft:



**Abbildung 20: Agarosegel der Transkripte nach der Ligation, Immobilisierung und Elution (magn. Partikel)**

K: Kontrolltranskript Sense, nicht extrahiert.

1: Sense-DIG

2: Sense-Bio

3: Antisense-DIG

4: Antisense-Bio

Jeweils RT- und 4°C-Probe nebeneinander.

In jeder Spur ist die jeweilige Produktbande deutlich zu erkennen; Degradation haben also kaum stattgefunden. Allerdings sind die eluierten Transkripte im Verhältnis zur Kontroll-RNA zu höherem Molekulargewicht verschoben. Vordergründig könnte angenommen werden, dass sich hierin die Verlängerung der Transkripte um das jeweilige Oligonukleotid widerspiegelt, zumal die mit dem DIG-Pentamer ligierten stärker verschoben wurden als die mit dem Bio-Dimer. Da die Transkripte jedoch insgesamt ca. 2300 Nukleotide lang sind, ist die Auflösung dieses kleinen, analytischen Agarosegels bei weitem nicht ausreichend, um derartig geringe Unterschiede sichtbar zu machen. Es handelt sich vielmehr um ein Artefakt der Phenolextraktion, wie mehrfach beobachtet werden konnte, da die extrahierte RNA nicht gefiltert und ethanolgefällt wurde wie das Kontrolltranskript (vgl. nächste Abb.).

Bei weiteren Ligationsversuchen mit dem Sense-Transkript konnten die oben erhaltenen Werte der Ligationseffizienz reproduziert werden. Das Transkript wurde zu ca. 40 % mit dem RNA-Dimer ligiert, aber nur zu 15 bis 20 % mit dem DNA-Pentamer. Allerdings war die Einheitlichkeit des Transkriptes nicht zuverlässig reproduzierbar:



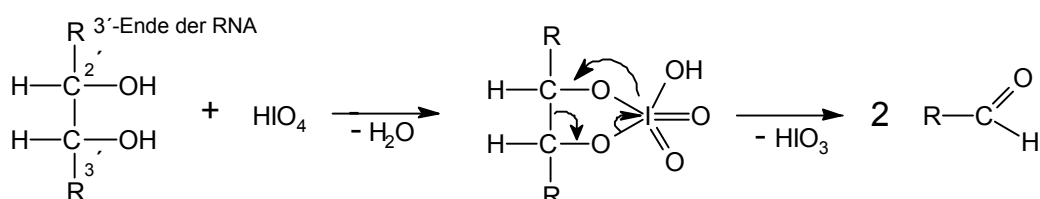
**Abbildung 21: H19-Sense-Transkripte nach der Ligation, Immobilisierung und Elution (magn. Partikel)**  
Die Transkripte wurden über Nacht bei RT ligiert. Nach der Elution bzw. der Phenolextraktion wurden die wässrigen Phasen gefiltert und ethanolgefällt. Die Auftrennung erfolgte im Agarosegel.

Auf dem linken Gel der Abbildung hat die Produktbande deutlich abgenommen zugunsten niedermolekularer, degradierter Produkte, während das rechte Gel die erwünschten intakten Produkte zeigt. Auch dieses uneindeutige Ergebnis konnte mehrfach reproduziert werden.

Das Verfahren der T4-RNA-Ligation ist also prinzipiell anwendbar, zeigte jedoch Probleme. Da das Verfahren beim Arbeiten mit größeren Mengen RNA recht teuer werden würde und die Homogenität des Endproduktes nicht unbedingt gewährleistet war, wurde für Proteinisoliationsversuche mit magnetischen Partikeln auf statistisch markierte Transkripte zurückgegriffen. Der Einbau von lediglich 10 - 12 DIG-Molekülen pro Transkriptmolekül musste dafür billiger in Kauf genommen werden. Das hierfür bei der Transkription gewählte Verhältnis DIG-11-UTP/UTP von 1:30 schien akzeptabel angesichts der Tatsache, dass in der Literatur beschriebene Verfahren höhere Einbauraten aufwiesen (1:20 bzw. 1:10, Nielsen *et al.*, 1999; Ashley *et al.*, 1993).

### **Chemische Modifikation des 3'-Endes der RNA**

Wegen der oben beschriebenen Probleme bei der enzymatischen Endmarkierung der RNA wurde als weitere Methode zur RNA-Immobilisierung die Möglichkeit zur kovalenten Kopplung an Hydrazidagarose genutzt. Dazu werden die vicinalen OH-Gruppen am 3'-Ende der RNA mittels Periodsäure zu Carbonylgruppen oxidiert, während die C-C-Bindung gespalten wird:



Der Erfolg der Oxidation wurde indirekt über die Immobilisierbarkeit des Produktes an Hydrazid-agarose gezeigt. In allen Fällen überstand die RNA die gesamte Prozedur ohne Anzeichen von Degradation (vgl. 3.3.2).

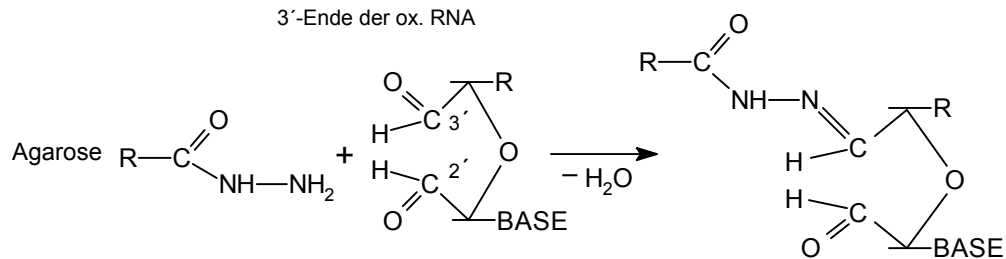
### 3.3.2 Immobilisierung der RNA

Für die Isolation RNA-bindender Proteine mussten die Transkriptmoleküle an eine Matrix immobilisiert werden, um nach der Inkubation mit einem komplexen Gemisch aus Proteinen die RNA mit den spezifisch gebundenen Proteinen wieder isolieren und die unspezifischen abtrennen zu können. Um mit Streptavidin-verknüpften *magnetischen Partikeln* zu arbeiten, wurden Transkripte verwendet, in die statistisch Digoxigenin eingebaut wurde. Laut Herstellerangaben bindet 1,0 mg der Partikel ca. 10 pmol 1,5 kb dsDNA mit einem einzelnen DIG-Molekül an einem Ende. Da die 2,3 kb H19-RNA eine deutlich komplexere Sekundärstruktur besitzt als doppelsträngige DNA und zudem 10 bis 12 DIG-Moleküle trägt, ist eine verringerte Kapazität zu erwarten. Vorversuche ergaben, dass die Kapazität der Partikel um ca. die Hälfte verringert war, also bei ca. 5,0 pmol (= 4,0 µg/mg) lag. Hierbei wurden die Partikel zunächst mit RNA inkubiert und damit beladen, wobei die Beladung deutlich sichtbar war: Es bildeten sich große, schnell präzipitierende Komplexe der ansonsten fein verteilten Partikel. Eine Erklärung hierfür ist, dass jedes Transkriptmolekül mehrere DIG-Moleküle trug und somit mehrere Partikeln binden konnte, welche wiederum ihrerseits andere Transkriptmoleküle binden konnten usw. Allerdings wirft das die Frage auf, ob derartig komplexe Netzwerke überhaupt in der Lage sein können, H19-spezifische Proteine zu binden, da mit zunehmender Komplexität die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass Protein-Bindungsmotive der RNA verdeckt werden. Außerdem präzipitierten die Komplexe so schnell, dass ihre spätere Verteilung in der Proteinlösung kaum gewährleistet werden konnte. Es war daher fraglich, ob die RNA-Moleküle (falls zugänglich) mit ihren Protein-Bindungspartner wechselwirken konnten. Es erschien daher sinnvoller, für die spätere Proteinisolation zunächst die Transkripte mit den Proteinen zu inkubieren und anschließend durch Zugabe der magnetischen Partikeln die RNA-Protein-Komplexe zu binden und zu isolieren.

Dieses Problem bestand nicht beim Arbeiten mit *Oligotex<sup>TM</sup>-Partikeln*, da die Sense-RNA an ihrem 3'-Ende über den poly-A-Schwanz durch Hybridisierung immobilisiert werden konnte. Kontrollexperimente mit Antisense-RNA waren also nicht möglich. An 5,0 µl Oligotex<sup>TM</sup>-Lösung konnte ca. 1,0 µg RNA immobilisiert werden. Diese Partikel konnten allerdings immer nur durch Zentrifugation pelletiert und damit isoliert werden. Durch ihre extrem feinkörnige

Struktur kam es beim Abnehmen der Überstände immer wieder zu Verlusten. Im Elutionspuffer, der zur Elution der gebundenen Proteine dient und daher 1,0 M NaCl enthält, pelletierten die Partikel gar nicht mehr, sondern schwammen oben auf. Sie mussten daher durch Zentrifugation in Säulchen durch eine Fritte vom Elutionspuffer getrennt werden.

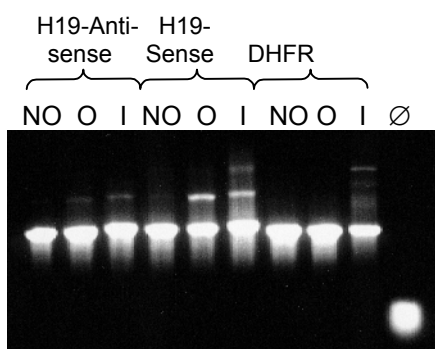
Schließlich wurde die RNA nach der Oxidation kovalent an **Hydrazidagarose** gebunden, so dass Affinitätsäulen konstruiert werden konnten:



Dazu wurden je 300 µl gewaschene sedimentierte Hydrazidagarose mit 200 bis 400 µg oxidiertes RNA bei pH 5,0 und 4°C für 3,0 h inkubiert. Anschließend wurde die RNA-Agarose in kleine Plastiksäulchen gegossen und der Durchlauf (ÜS1) ethanolgefällt. Die Säulen werden jeweils mit einem dreifachen Volumen an verschiedenen Waschpuffern gewaschen, darunter einem Hochsalzpuffer (2 M NaCl), um nicht kovalent gebundene RNAs zu entfernen und die Säule schließlich im Bindungspuffer zu äquilibrieren (ÜS2 bis ÜS5). Der RNA-Gehalt von ÜS1 bis ÜS5 kann photometrisch ermittelt werden. Wird die Summe dieser RNA-Fractionen von der ursprünglich zur Immobilisierung eingesetzten RNA abgezogen, so ergibt sich die Menge an immobilisierter RNA in den Affinitätsäulen. Durch Auftragen von RNA-Aliquots vor bzw. nach der Oxidation bzw. nach der Immobilisierung (ÜS1) auf ein Agarosegel kann die Unversehrtheit der in den Säulen enthaltenen RNAs überprüft werden.

	Transkript vor Immobilisierung (µg)	Transkript gebunden (µg)
H19-Antisense 1.	297	204
H19-Antisense 2.	332	220
H19-Sense 1.	237	205
H19-Sense 2.	191	151
DHFR 1.	326	254
DHFR 2.	386	311
tRNA nicht oxidiert	210	23

**Tabelle 6: Immobilisierung oxidiertes RNA an jeweils 300 µl sedimentierter Hydrazidagarose**



**Abbildung 22: Transkripte vor bzw. nach der Oxidation bzw. Immobilisierung (Hydrazidagarose)**

Von jedem Transkript wurden jeweils 1,0 µg nebeneinander auf einem Agarosegel aufgetrennt. NO= nicht oxidiert, O= oxidiert, I= immobilisiert und ∅ = tRNA nicht oxidiert, nach Inkubation mit Hydrazidagarose.

Von H19-Sense bzw. -Antisense konnten etwas mehr als 200 µg (250 pmol) immobilisiert werden, während von dem kleineren DHFR-Transkript (1930 Nukleotide, Sense und Antisense: 2340) bis zu ca. 300 µg (450 pmol) immobilisierbar waren. Die Ursachen sind sterischer Natur: Kleinere RNA-Moleküle können mehr Hydrazid-Bindungsstellen besetzen als größere, da mit zunehmender Größe der RNA auch mehr Bindungsstellen verdeckt werden und nicht mehr zur Verfügung stehen. Von der nichtoxidierten tRNA verblieb nur ein geringer Teil unspezifisch auf der Säule. Diese Säule konnte daher als Leerkontrolle verwendet werden, um später die unspezifische Wechselwirkung von Plazenta-Proteinen mit der Agarose abzuschätzen.

Das Agarosegel (Abb. 22) belegt, dass die eingesetzten Transkripte sowohl nach der Oxidation als auch nach der Immobilisierung keinerlei Anzeichen von Degradation aufwiesen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Affinitätssäulen unmittelbar vor der Beladung mit Proteinen mit intakten Transkripten beladen waren.

### 3.4 Isolierung RNA-bindender Proteine

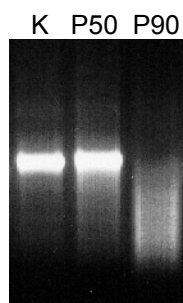
Da nun die RNA immobilisierbar war, sollte nunmehr versucht werden, durch Inkubation mit Proteinen diejenigen zu isolieren, die spezifisch mit der H19-RNA wechselwirken. Es ist nicht auszuschließen, dass die Bindung von Proteinen und damit die Beeinflussung ihrer Aktivität zu den bisher unbekannt Funktionen dieser rätselhaften RNA gehört. Da die H19-RNA neben dem Embryonalgewebe auch im extraembryonalen Plazentagewebe vorkommt, sind mögliche Bindungspartner ebenfalls in diesem Gewebe zu vermuten. Daher wird die RNA unter physiologischen Salz- und pH-Bedingungen in Gegenwart eines Überschusses an Kompetitor-RNA (tRNA) mit isolierten Proteinen aus Plazentagewebe inkubiert. Nach Abtrennung der ungebundenen Proteine und mehrfachem Waschen mit Bindungspuffer (mit tRNA) zur Entfernung unspezifischer Proteine werden schließlich die spezifisch gebundenen durch Behandlung mit einem Hochsalzpuffer (u.a. 1 M NaCl) eluiert, aufkonzentriert und mittels PAGE analysiert. Wurde mit magnetischen Partikeln gearbeitet, so konnte anschließend die Intaktheit der immobilisierten Transkripte untersucht werden, was für die Spezifität der Bindung von Bedeutung ist.

Das Plazentagewebe wurde homogenisiert und die cytosolischen Proteine des postmitochondrialen Überstandes zunächst mit 50 % (P50) und anschließend mit 90 % (P90) Ammoniumsulfat gefällt und damit konzentriert, in Bindungspuffer resuspendiert und gegen diesen dialysiert, um Ammoniumsulfat zu entfernen.

### 3.4.1 Magnetische und sonstige Partikel

Hierbei wurden zunächst die Transkripte ohne Immobilisierung mit den Proteinen inkubiert, um eine große Komplexbildung mit möglicher Verdeckung von Strukturmotiven zu vermeiden (3.3.2). Anschließend wurden RNA-Proteinkomplexe durch Inkubation mit den magnetischen Partikeln quasi "geangelt" und weiter prozessiert. Bei den Oligotex<sup>TM</sup>-poly-T-Partikel dagegen konnte und musste das Transkript vor der Inkubation mit Proteinen durch Hybridisierung immobilisiert werden.

In Vorversuchen wurden zunächst die beiden Proteinfractionen (P50 , P90) auf ihre RNase-Aktivität getestet:

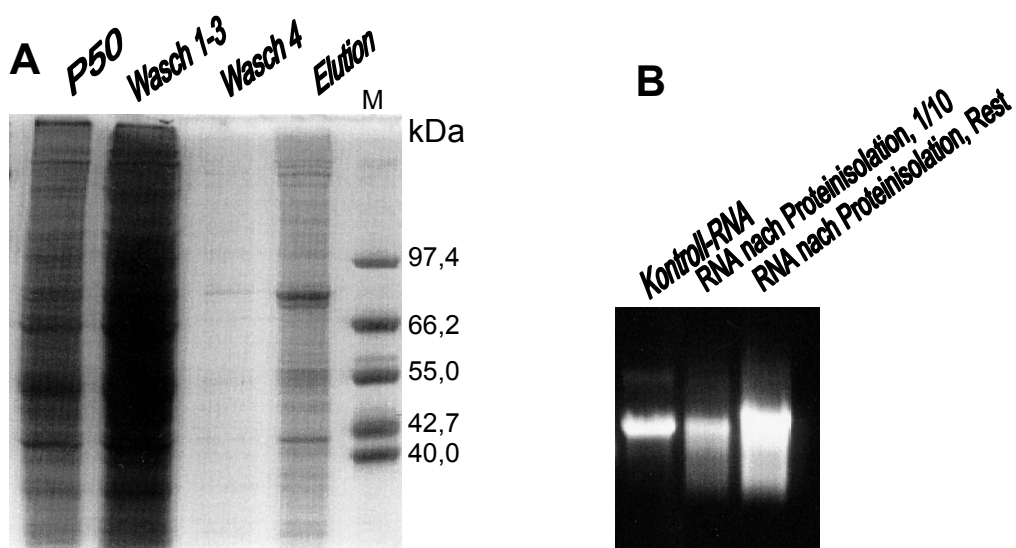


**Abbildung 23: RNase-Aktivität der Proteinfractionen aus Plazenta**

H19-Sense-RNA-beladene magnetische Partikel wurden für 15 min. bei RT mit der jeweiligen Proteinfraction inkubiert und die anschließend isolierte RNA auf einem Agarosegel aufgetrennt. K: RNA in Dialysepuffer inkubiert, P50 bzw. P90: RNA inkubiert in Plazenta-Protein-Fraktion (50 bzw. 90 % Ammoniumsulfat-Fraktion).

Da die P90-Fraktion starke RNA-degradierende Aktivität aufwies, wurde diese Fraktion nicht weiter verwendet.

Im Folgenden ist die Isolation von RNA-Proteinkomplexen mit der H19-Sense-RNA mittels magnetischer Partikel dargestellt:

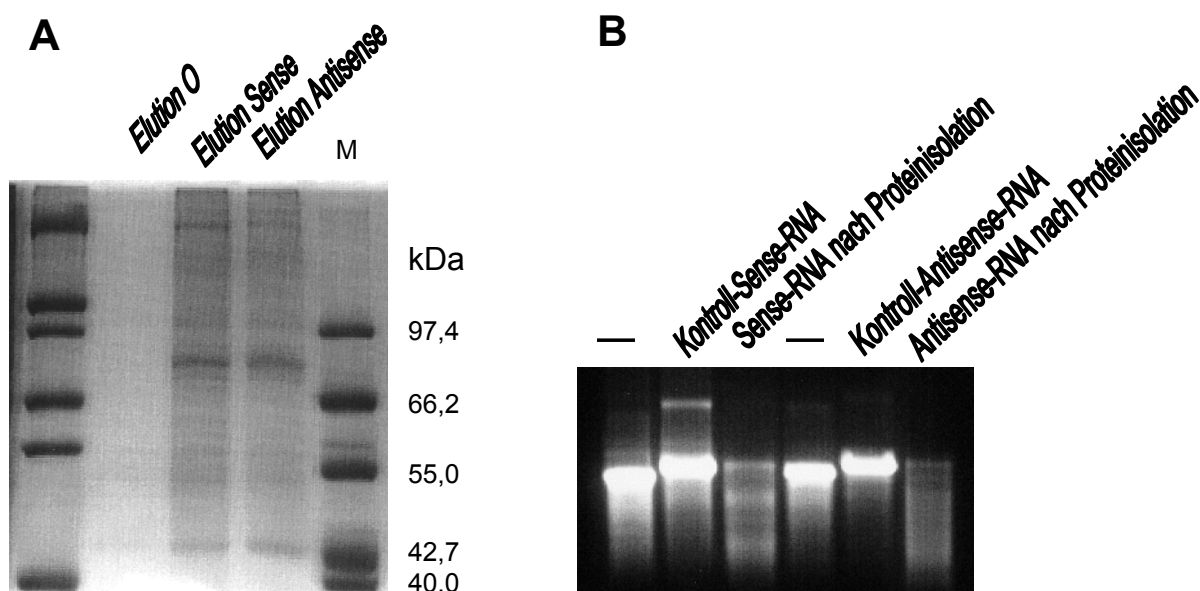


**Abbildung 24: Isolation RNA-bindender Plazenta-Proteine mittels H19-Sense-RNA und magnetischer Partikel**

**A:** PAGE der Proteine der angegebenen Wasch- bzw. Elutionsfraktion, P50: Gesamtproteine aus Plazenta, M: Marker (mid range). **B:** Agarosegel der RNA nach der Protein-Isolation



Das Polyacrylamidgel zeigt, dass beim 4. Waschschrift praktisch keine Proteine mehr abgelöst wurden, während die Elution im Hochsalzpuffer ein deutliches Bandenmuster aufweist. Hierbei erscheint die prominenteste Bande bei ca. 80 kDa im Vergleich zu den plazentalen Gesamtproteinen (P50) deutlich angereichert. Das korrespondierende RNA-Gel (B) belegt, dass die RNA zwar Anzeichen von Degradation aufweist, der überwiegende Teil jedoch auf der Höhe der Kontroll-RNA lokalisiert und damit intakt war. Somit könnte es sich bei den eluierten Proteinen tatsächlich um spezifisch RNA-bindende Proteine handeln. Um dies näher zu untersuchen, wurde der Versuch wiederholt, wobei zusätzlich als Kontrolle die H19-Antisense-RNA und eine Leerkontrolle (ohne RNA) mit einbezogen wurden:



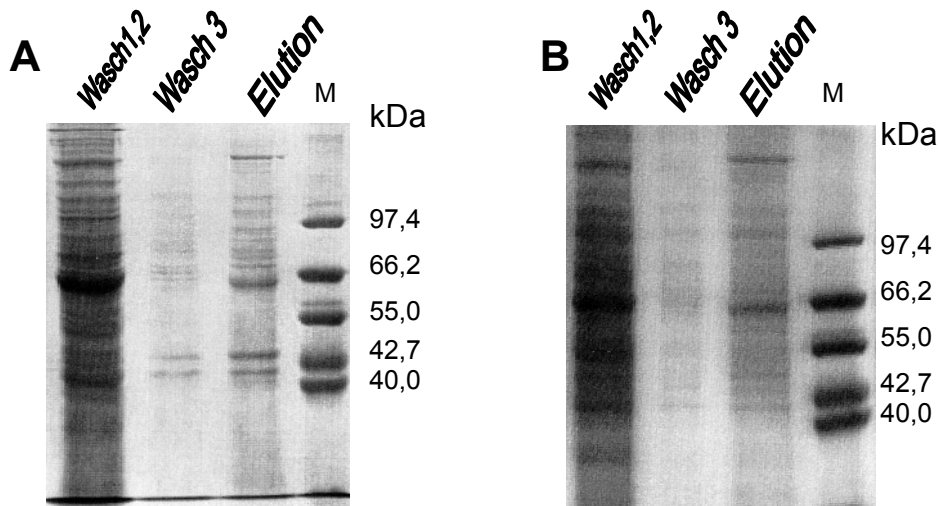
**Abbildung 25: Isolation RNA-bindender Plazenta-Proteine mittels H19-Sense-, -Antisense-RNA und magnetischer Partikel**

**A:** PAGE der Proteine der angegebenen Elutionsfraktionen, 0= magnetische Partikel ohne RNA (Leerkontrolle), M: Marker (mid range). **B:** Agarosegel der angegebenen RNAs nach der Proteinisolation.

Das Bandenmuster der eluierten Proteine ist hierbei schwächer als in Abb. 24, was auf die Tatsache zurückgeführt werden kann, dass hier die Partikel in insgesamt dem doppelten Volumen gewaschen und damit Proteine entfernt wurden. Die Muster sind dennoch grob vergleichbar, wie die hier ebenfalls vorhandene prominenteste 80 kDa-Bande andeutet. Sie wurde allerdings sowohl mit dem Sense- als auch mit dem Antisense-Transkript gleichermaßen isoliert. Das Agarosegel der RNAs zeigt zudem an, dass beide Transkripte durch die Proteininkubation recht stark degradiert wurden. Das bedeutet, dass es sich nicht um H19-spezifische, sondern nur um unspezifisch RNA-bindende Proteine handelt. Eine unspezifische Wechselwirkung mit den

magnetischen Partikeln ist ausgeschlossen, wie die Elution der Leerkontrolle belegt. Somit wurde also das Ziel der Isolation H19-spezifischer Proteine mit dieser Vorgehensweise nicht erreicht.

Außerdem wurde an Oligotex™-Partikeln immobilisierte H19-Sense-RNA mit plazentalen Proteinen (P50) inkubiert, gewaschen und eventuell gebundene Proteine eluiert:



**Abbildung 26: Isolation plazentaler Proteine mittels Oligotex™-Partikeln mit bzw. ohne H19-Sense-RNA**

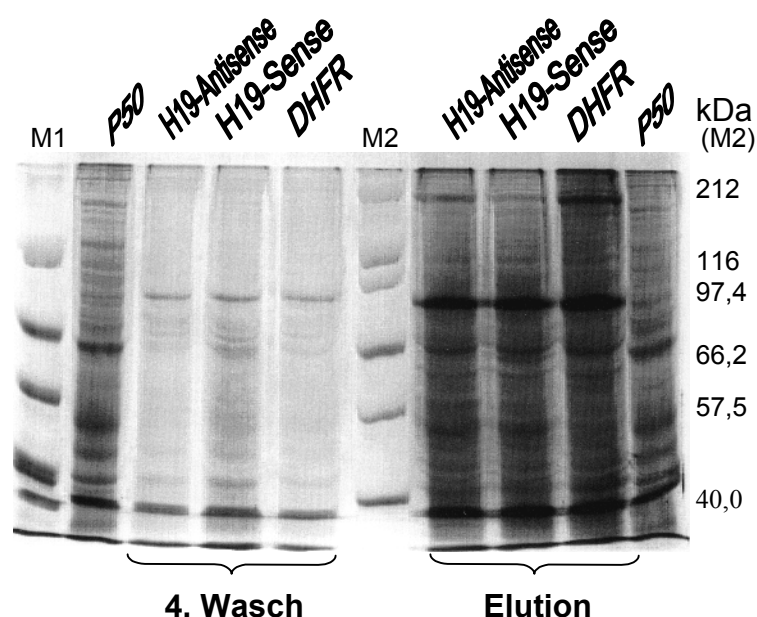
**A:** Oligotex™-Partikel mit RNA (6,0 pmol), **B:** Partikel ohne RNA, M: Marker (mid range).

Auffällig ist, dass zwischen den Partikeln mit (A) und ohne RNA (B) bei der eluierten Fraktion kein wesentlicher Unterschied zu erkennen ist. Die prominenten Banden sind im Wesentlichen bei beiden gleich und spiegeln in etwa das Muster der ersten Waschfraktionen wider. Es handelt sich also sehr wahrscheinlich um unspezifisch an die Partikel gebundene Proteine, wie in B (ohne RNA) zu erkennen ist, da dort nach dem dritten Waschschrift praktisch keine Proteine zu erkennen sind, während die Hochsalzelution Proteine aufweist. Das Bandenmuster ist außerdem insgesamt anders im Vergleich zu dem der magnetischen Partikel (Abb. 24), ein weiterer Beleg, dass es sich hierbei nicht um unspezifische RNA-Binder, sondern um Partikel-Binder handelt. Die unspezifische Bindungseigenschaft der Partikel ist natürlich für die Isolation spezifisch RNA-bindender Proteine sehr ungünstig. Da die Partikel außerdem nur begrenzt zur Verfügung standen, in der Handhabung problematisch waren (vgl. 3.3.2) und nur H19-Sense-RNA immobilisiert werden konnte, wurde diese Strategie aufgegeben.

### 3.4.2 Affinitätssäulen: Der Einfluss von Heparin

Die Konstruktion von RNA-Affinitätssäulen hatte Vorteile gegenüber dem Arbeiten mit den in 3.4.1 beschriebenen Partikeln. Zum Einen ließen sich wesentlich größere Mengen an RNA immobilisieren, deren 3'-Ende zudem über ihre kovalente Bindung an die Matrix vor dem Abbau durch Exonukleasen geschützt ist. Der Einbau von Digoxigenin oder Biotin in das Transkriptmolekül war überflüssig, womit auch keine Gefahr der Störung der Sekundärstrukturbildung mehr bestand. Außerdem sind Matrix und Säulen wesentlich preisgünstiger als die magnetischen Partikel. Daher erschien es sinnvoll, diese Strategie schließlich als einzige weiter zu verfolgen.

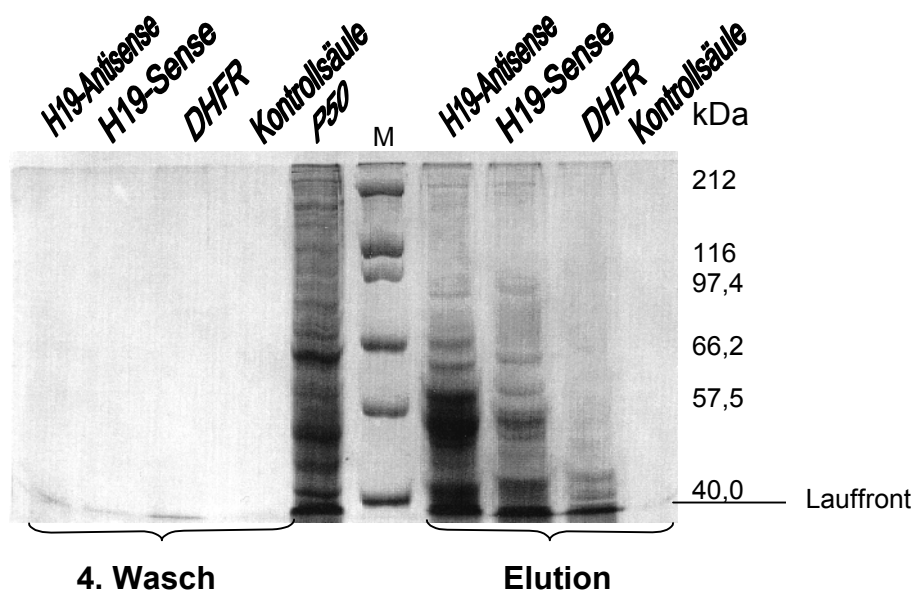
Da es bei den Experimenten mit den Partikeln große Probleme mit der Spezifität der isolierten Proteine gab, sollte bei den Säulen der Einfluss von Heparin untersucht werden, das unspezifische RNA-Protein-Interaktionen reduziert und somit die Spezifität erhöht (Neupert *et al.*, 1989, Peng *et al.*, 1998, Nielsen *et al.*, 1999). Zunächst wurde die Isolierung von Proteinen ohne Heparin durchgeführt:



**Abbildung 27: Isolation plazentaler Proteine mittels RNA-Affinitätssäulen ohne Heparin**  
PAGE der jeweils angegebenen Fraktionen. P50: Totalproteine aus Plazenta, M1: Marker (mid range), M2: Marker (high range).

Auch in diesem Experiment ist das Bandenmuster der eluierten Proteine der einzelnen RNA-Säulen identisch. Die prominenteste Bande ist bei ca. 80 kDa lokalisiert und ähnelt damit der Hauptbande des Experiments mit magnetischen Partikeln (3.4.1, Abb. 25). Auch beim 4. Waschschritt, d.h. nach Waschen mit dem achtfachen Säulenvolumen, werden Proteine von den Säulen

gewaschen, die in ihrem Muster dem der eluierten Proteine ähneln. Da der Waschpuffer tRNA enthielt, lässt dies alles zusammen den Schluss zu, dass es sich wiederum um unspezifisch RNA-bindende Proteine handelte. Daher wurde im Folgenden das Experiment wiederholt in Gegenwart von Heparin mit einer zusätzlichen Kontrollsäule ohne RNA (nichtoxidierte tRNA wurde praktisch nicht immobilisiert, vgl. 3.3.2) zur Abschätzung der unspezifischen Proteinbindung an die Agarosematrix:



**Abbildung 28: Isolation plazentaler Proteine mittels RNA-Affinitätssäulen mit Heparin**  
PAGE der jeweils angegebenen Fraktionen. P50: Totalproteine aus Plazenta, M: Marker (high range)

Im Vergleich zur vorherigen Abbildung ist hier allein durch die Gegenwart von Heparin die Situation völlig verändert. So wurden bei dem 4. Waschschrift (achtfaches Säulenvolumen) praktisch keinerlei Proteine mehr von den Säulen gewaschen trotz der Gegenwart der tRNA. Dies belegt zusammen mit der wesentlich geringeren Anzahl, dass die eluierten Proteine deutlich spezifischer mit der immobilisierten RNA wechselwirkten. Unspezifische Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix sind ausgeschlossen, wie die Kontrollsäule belegt. Von der DHFR-mRNA-Kontrollsäule wurden deutlich weniger Proteine eluiert als bei den H19-Säulen und zwar im Bereich bis ca. 45 kDa, weshalb diese Proteine in der Nähe der Lauffront außer Acht gelassen wurden. War beim Arbeiten ohne Heparin eine Proteinbande von 80 kDa sehr prominent, so ist diese nun fast gar nicht mehr vorhanden. Bei ca. 55, 60 und 64 kDa sind in der H19-Antisense-Spur drei Proteine zu erkennen, die in ihrem Muster, wenn auch deutlich weniger intensiv, ebenfalls bei der H19-Sense-Spur vorhanden sind, während die 66 kDa-Bande spezifisch für das Antisense-Transkript zu sein scheint. Insgesamt zeigte sich also, dass Heparin in der Tat einen großen Einfluss in dieser

Art von Experimenten hat und geeignet zu sein scheint, die Spezifität der RNA-Protein-Wechselwirkung entscheidend zu erhöhen.

Um Proteine nun mittels MALDI identifizieren zu lassen, wurden wegen der größeren Materialmenge Banden der Antisense-Spur gewählt mit einer auf gleicher Höhe laufenden Sense-Bande als Kontrolle (bei 55 kDa).

### **MALDI, BIACORE®**

Mittels MALDI wurden folgende Proteine sicher identifiziert (Details siehe 7.5 Massenspektren, Suchergebnisse):

Antisense, 55 kDa = polypyrimidine tract-binding Protein (PTB2)

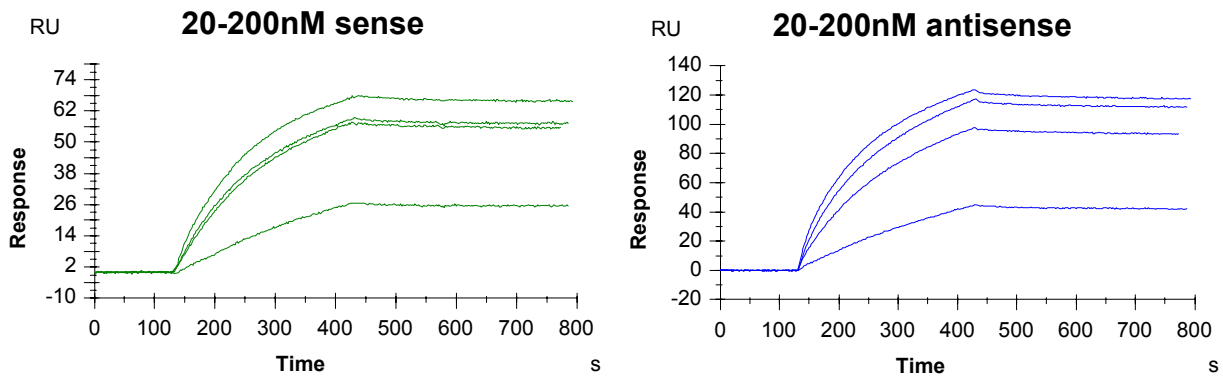
Sense, " = " " " " (PTB1)

Antisense, 60 kDa = hnRNP K-Protein

Antisense, 64 kDa: Enthielt zwei Proteine : 1. myc far upstream element-binding Protein (FUSE-BP)  
2. IMP3 (IGFII mRNA-binding Protein 3)

Es handelt sich um RNA-bindende Proteine (FUSE-BP bindet DNA), was die erhöhte Spezifität der Wechselwirkung durch Heparin bestätigt. PTB wurde sowohl mit dem Sense- als auch mit dem Antisense-Transkript von H19 isoliert, auch wenn es sich um die Nummern 1 und 2 handelt, denn in der Literatur wird nur allgemein PTB erwähnt. Somit handelt es sich wahrscheinlich bei den ähnlichen Proteinmustern in Abb. 28 um die gleichen Proteine, die an beide Transkripte binden. Dies wird zudem bestätigt durch die nachfolgend mittels BIACORE® untersuchte Wechselwirkung von IMP3 sowohl mit dem Sense- als auch dem Antisense-Transkript von H19.

Mittels BIACORE® wurde mit kloniertem IMP3 die Wechselwirkung dieses Proteins mit H19-Sense-, Antisense- und DHFR-RNA untersucht. Die einzelnen Proteinkonzentrationen wurden vor der Messung mit einem 100fachen molaren Überschuss an Kompetitor-RNA (Hefe-tRNA) versetzt, um unspezifische Protein-RNA-Interaktionen möglichst abzusättigen und damit die Aussagekraft der Messung zu erhöhen. Von den jeweiligen Resonanzkurven wurden bereits die Resonanz der Leerzelle (ohne RNA) und der DHFR-Zelle (unspezifische RNA-Protein-Wechselwirkung) subtrahiert, so dass diese Kurven nun die spezifische Wechselwirkung von IMP3 mit H19-Sense- bzw. Antisense-RNA widerspiegeln:



**Abbildung 29: Wechselwirkung von IMP3 mit H19-Sense- bzw. Antisense-RNA (BIACORE®)**

Jeweils vier Proteinkonzentrationen wurden durch die Flusszellen geleitet und ergeben daher auch vier Bindungskurven: 200 (oberste), 100, 50 und 20 nM (unterste). Bei 120 sec. wurde die Proteinlösung injiziert (Beginn der Assoziation) und bei 420 sec. durch Bindungspuffer ersetzt, danach sollte also die Dissoziation erfolgen. Response gibt die RNA-Protein-Wechselwirkung wieder (Resonanz) und korreliert mit der Menge an die RNA gebundenen Proteins.

Zunächst fällt auf, dass der Anstieg der Resonanz bei H19-Antisense stärker ist als bei H19-Sense, d.h. es werden höhere Resonanz-Werte erreicht. Bei einer 1:1-Bindung des Proteins an die jeweilige RNA wäre bei beiden eine Resonanz von maximal knapp 30 RU bei sehr steilem Anstieg und raschem Übergang in das Gleichgewicht Assoziation/Dissoziation zu erwarten gewesen. Dieser  $R_{\max}$ -Wert wird jedoch weit übertroffen, der Anstieg ist flacher und es wird kein Gleichgewicht erreicht. Die Bindung ist also heterogen, d.h. mehrere Proteinmoleküle binden an ein Transkriptmolekül. Extrapoliert man die Kurven der maximalen Proteinkonzentration, so ergeben sich ungefähre  $R_{\max}$ -Werte von ca. 80 für H19-Sense und 150 für H19-Antisense, was bedeutet, dass H19-Sense ca. 2,8 und H19-Antisense ca. 5 Moleküle IMP3 binden. Dabei handelt es sich allerdings um Mindestzahlen, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch den statistischen Einbau von Biotin bei der Immobilisierung Bindungsstellen verdeckt werden.

Die größere Zahl von IMP3-Molekülen, die von H19-Antisense im Vergleich zu H19-Sense gebunden werden, korreliert mit der stärkeren Intensität der Protein-Banden bei der Isolation der Proteine (Abb. 28).

Warum die 50 und 100 nM-Kurven bei der Sense-RNA praktisch identisch sind, ist rätselhaft, da bei der Antisense-RNA im selben Experiment sehr wohl die erwartete stärkere Resonanz beobachtet werden kann. Mit steigender Proteinkonzentration nähern sich die Kurven immer stärker an, da die Sättigung des Systems erreicht wird. Daher wurde nicht mit noch höheren Protein-Konzentrationen gearbeitet.

Werden die Flusszellen nach der Assoziation des Proteins an die jeweilige RNA mit Bindungspuffer gespült, so nimmt die Resonanz praktisch nicht ab. Es findet also keine nennens-

werte Dissoziation statt, was allerdings auch für die DHFR-Kontroll-RNA zutrifft (nicht dargestellt). IMP3 bindet also mit hoher Affinität an RNA-Moleküle, wobei H19-Sense und –Antisense deutlich bevorzugt werden.

Eine spezifische Interaktion des Proteins mit den H19-Transkripten scheint gesichert, so dass das Ergebnis der Isolierungsexperimente als reell angesehen werden kann. Es bleibt allerdings die Frage, warum H19-Sense- und Antisense-RNA im Wesentlichen mit den gleichen Proteinen zu interagieren scheinen.