

5 Material und Methoden

5.1 Materialliste und Bezugsquellen

5.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
100 bp DNA Längenstandard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Appligene Oncor, Illkirch Graffenstaden, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bacto™ Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ Hefeextrakt	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ Tryptone	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Biomax® X-ray Film	Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
CoCl ₂	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
dNTPs	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
E. coli DH5α	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ficoll	Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland
Gel 40-Rotiphorese	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hepes	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
humane genomische DNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kodak [®] X-OMAT	Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂ (50mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MgSO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Plastikpetrischalen	Greiner GmbH, Pleidelsheim, Deutschland
Q-Solution	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Random Hexanukleotid Mix (10x)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Random Primer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
RNasin (40 U/μl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tris	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
X-Gal	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

5.1.2 Lösungen, Puffer, Medien, Gele

DEPC-Wasser

Diethylpyrocarbonat 1 mg
destilliertes Wasser 999 ml
 bei Raumtemperatur für 12-16 h
 stehenlassen, dann autoklavieren

0,5 M EDTA pH 8,0 (Ethyldiamintetraessigsäure)

EDTA•2 H₂O 93,05 g
 in 300 ml H₂O lösen; den pH mit
 NaOH auf 8,0 einstellen; Aqua dest.
 ad 500 ml

Ficoll-Puffer

Ficoll 15 g
 1x TBE-Puffer 100 ml
Bromphenolblau (gesättigt) 1 ml
 zunächst Ficoll mit 60 ml 1x TBE in
 Lösung bringen, dann auf 100 ml
 auffüllen und Bromphenolblau
 zugeben

LB-Agar

Bacto-Agar 1,5 g
LB-Medium 100 ml
 sofort autoklavieren; Lagerung bei
 4°C

LB-Medium

Bacto-Hefeextrakt 5 g
 Bacto-Tryptone 10 g
NaCl 10 g
 Aqua dest. ad 1000 ml; den pH auf
 7,05 einstellen, dann autoklavieren;
 Lagerung bei 4°C

10x TBE

Tris-Base 108 g
 Borsäure 55 g
0,5 M EDTA pH 8,0 40 ml
 Aqua dest. ad 1 l

TE-Puffer

1,0 M Tris-Puffer pH 8,0 1 ml
0,5 M EDTA pH 8,0 0,2 ml
 Aqua dest. ad 100 ml, dann
 autoklavieren; Lagerung bei 4°C

X% Agarosegel

Agarose X g
1 x TBE-Puffer 100 ml
 durch Kochen in Lösung bringen; 6
 µl/ 100 ml Ethidiumbromidlösung
 (10mg/ml) zugeben und gießen

5.1.3 Enzyme

Enzymart	Name	Hersteller	Puffer	Hersteller
Restriktionsenzyme	<i>Bgl</i> II	New England	Puffer C	Promega
	<i>Kpn</i> I	BioLabs	Puffer C	Promega
	<i>Mlu</i> I		NE Puffer 3	New
	<i>Nhe</i> I		NE Puffer 2	England BioLabs
DNA-Polymerase	Taq	Gibco BRL	10x PCR-Puffer	Gibco BRL
	HotStarTaq™	Qiagen	10x PCR-Puffer	Qiagen
RNA-Polymerase	SuperScript™	Gibco BRL	5x First Strand	Gibco BRL
	RNase H		Puffer	
Terminale Transferase		New England BioLabs	NE Puffer 4	New England BioLabs
Ligase	T4	Invitrogen	10x	Invitrogen
	DNA Ligase		Ligationspuffer	
DNase	DNase RQ1	Promega	10x RQ1-Puffer	Promega

5.1.4 Vektoren

Vektorname	Hersteller
pGL3basic®	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
pGL3SV40®	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
pBluescript® II KS(+)	Stratagene, La Jolla, USA
pCR® 2.1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pSV-β-Galaktosidase Kontrollvektor	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

5.1.5 Kits

Name	Hersteller
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep® Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
TA Cloning® Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

5.1.6 Zellkulturbedarf

Substanz	Hersteller
12-Loch-Platten	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
6-Loch-Platten	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
DMEM	Cambrex Bio Science Verviers S.P.R.L., Verviers, Belgien
ECGM	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
FCS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
FuGENE™ 6	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Galacto-Light®	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
HAT-Zusatz (50x)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Kollagen A (1mg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Kulturflaschen mit Filter	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
LipofectAMINE™ Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectin®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LipoTAXI®	Stratagene, La Jolla, USA
M 199	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Natrium Pyruvat (100mM)	Cambrex Bio Science Verviers S.P.R.L., Verviers,

NEAA (100x)	Belgien Cambrex Bio Science Verviers S.P.R.L., Verviers, Belgien
Nut. Mix F-12 (HAM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Optimem-1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Cambrex Bio Science Verviers S.P.R.L., Verviers, Belgien
Reporterlysepuffer (5x)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin	Cambrex Bio Science Verviers S.P.R.L., Verviers, Belgien

5.1.7 Zellkulturmedien

BAEC

DMEM mit 4,5 g/l Glucose und L-Glutamin

Zusätze:

- 1% Penicillin/Streptomycin
- 1% Natrium Pyruvat (100 mM)
- 1% NEAA
- 10% FCS

Kulturflaschen mit Kollagen A beschichten

ECV304

Medium 199 Earle ohne L-Glutamin

Zusätze:

- 1% Penicillin/Streptomycin
- 1% L-Glutamin (200 mM)
- 10% FCS

EA.hy926

DMEM mit 4,5 g/l Glucose und L-Glutamin

Zusätze:

- 1% Penicillin/Streptomycin
- 1% Natrium Pyruvat (100 mM)
- 1% NEAA
- 2% HAT-Zusatz
- 10% FCS

MDA MB 435s

DMEM mit 1 g/l Glucose ohne L-Glutamin

Zusätze:

- 1% Penicillin/Streptomycin
- 2% L-Glutamin (200 mM)
- 20% FCS

HUVEC

ECGM mit SupplementMix

MCF7

RPMI 1640

Zusätze:

1% Penicillin/Streptomycin

1% L-Glutamin (200 mM)

10% FCS

5.1.8 Geräte

Name	Hersteller
ABI Prism™ 377 DNA Sequencer	Perkin Elmer
Geldokumentationssystem 5000	Firma UVP
Lumat LB 9501	Berthold
Mikroskop Olympus CK2	Olympus
Image Plate Scanner BAS-1500	Fujifilm
Programmable Thermal Controller-100™	MJ Research
Spektrophotometer UV-VIS 1202	Shimadzu
Superspeed RCL-B	Sorvall
Tischzentrifugen 5417/5402	Eppendorf

5.2 Molekularbiologische Untersuchungen

5.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus den kultivierten Zellen erfolgte mittels des RNeasy® Mini Kits nach Herstellerprotokoll. Die RNA-Integrität wurde mit Hilfe der Elektrophorese in einem Agarosegel kontrolliert. Konzentration und Reinheit wurden im Spektrophotometer bestimmt. Für die Konzentration der RNA gilt dabei:
 Extinktion bei 260 nm x Verdünnungsfaktor x 40/ 1000 x µg/µl = µg RNA/µl.

Einen Anhalt über die Reinheit der RNA erhält man durch den Quotienten aus den Absorptionen bei $A_{260\text{nm}}/ A_{280\text{nm}}$, der zwischen 1,7 und 1,9 liegen sollte.

5.2.2 Synthese von cDNA durch reverse Transkription

Dazu wurden zunächst 5 µg RNA einem DNase-Dau zugeführt, um die Verunreinigung durch genomische DNA möglichst gering zu halten (**Protokoll 1**). Danach folgte die eigentliche reverse Transkription, d.h. die Synthese eines DNA-Moleküls anhand einer RNA-Matrize (**Protokoll 2**).

x µl	= 5 µg RNA	Inkubation im Wasserbad:
2,50 µl	10x RQ1-Puffer	1. 37°C, 15 min
1,25 µl	MgCl ₂ (50 mM)	2. 65°C, 10 min
0,25 µl	DNase RQ1	
DEPC-H ₂ O ad 25 µl		

Protokoll 1: DNase-Dau

		Reaktionsbedingungen:
25,00 µl	DNase-Verdau	1. 20°C, 10 min
1,25 µl	RNasin (40 U/µl)	2. 37°C, 60 min
10,00 µl	5x First Strand Puffer	3. 95°C, 5 min
5,00 µl	DTT (100 mM)	4. 4°C, 5 min
5,00 µl	dNTPs (10 mM)	
2,50 µl	Hexamer Primer (100 mM)	
1,00 µl	SuperScript™ Reverse Transkriptase (200 U/µl)	
0,25 µl	DEPC-H ₂ O	

Protokoll 2: Reverse Transkription

5.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die in der reversen Transkription generierte cDNA wurde im Anschluß mittels PCR auf die Existenz eines ECE-1c-spezifischen Transkriptes mit 5'-untranslatierter Region (5'-UTR) überprüft (**Protokoll 3**), als sense-Primer Nukleotide an den Positionen – 89 (5'-GCAGCTGGGCTGGGAGCA-3'), –142 (5'-

CTCGCCCGCTGGAGCTGAG-3') und -240 (5'-CCTCAGGCCGTGATTGGCT-3') relativ zum ATG in Exon 1c dienten und der antisense-Primer in Exon 2 lokalisiert wurde (5'-CTGCAGGCCGTTGGGGTATGC-3'). Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese im 1%igen Agarosegel aufgetrennt, die DNA-Banden mittels Anregung im UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert. Intronüberspannende Primer und ein negativer RT-Minus-Ansatz (RT-), d.h. ein RT-Ansatz ohne Zugabe der reversen Transkriptase, schlossen dabei eine mögliche DNA-Kontamination aus. Falsch positive PCR-Banden wurden durch eine H₂O-Probe ermittelt. Zur Qualitätskontrolle der reversen Transkription wurde für alle RNA-Proben GAPDH als endogener Standard benutzt.

		Reaktionsbedingungen:	
1,00 µl	cDNA-Probe	ECE-1c	GAPDH
2,50 µl	10x PCR-Puffer		
0,75 µl	MgCl ₂ (50 mM)	1. 94°C, 3 min	1. 94°C, 3 min
0,50 µl	dNTPs (10 mM)	2. 69°C, 1 min	2. 55°C, 1 min
1,00 µl	3'-Primer (10 µM)	3. 72°C, 1 min	3. 72°C, 1 min
1,00 µl	5'-Primer (10 µM)	4. 94°C, 30 s	4. 94°C, 30 s
0,25 µl	Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	5. 38 Zyklen 2 bis 4	5. 33 Zyklen 2 bis 4
18,00 µl	H ₂ O	6. 69°C, 1 min	6. 55°C, 1 min
		7. 72°C, 10 min	7. 72°C, 10 min

Protokoll 3: RT-PCR

5.2.4 Genomische PCR

Um Teile der genomischen Sequenz 5' des c-spezifischen Translationsinitiationsstartkodons ATG in Exon 1c zu amplifizieren und damit die potentielle Promotorregion des Gens zu generieren, wurde eine genomische PCR durchgeführt (**Protokoll 4**). Als antisense-Primer diente jeweils 5'-AGCTCGCGTGCTCCGCC-3' mit verschiedenen sense-Primern (siehe **5.2.11, Tabelle 2**). Dabei handelte es sich um sogenannte Ankerprimer, die mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Kpn* I am 5'-Primer und *Bgl* II am 3'-Primer konstruiert worden waren, um die Effizienz der sich anschließenden Subklonierung

zu steigern (**Abb. 3**). Der Amplifikationszyklus umfaßte nach einer einleitenden Aktivierung der HotStarTaq™ DNA-Polymerase durch eine 15 minütige Inkubation bei 95°C die übliche Denaturierung, Primeranlagerung und Extension mit einem abschließenden Syntheseschritt von 10 min.

		Reaktionsbedingungen:
1,00 µl	humane genomische DNA (100 ng/µl)	1. 94°C, 1 min
5,00 µl	10x PCR-Puffer	2. 65°C, 1 min
10,00 µl	Q-Solution	3. 72°C, 2 min
1,00 µl	dNTPs (10 mM)	4. 94°C, 30 s
2,00 µl	3'-Primer (10 µM)	5. 38 Zyklen 2 bis 4
2,00 µl	5'-Primer (10 µM)	6. 65°C, 1 min
0,25 µl	HotStarTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)	7. 72°C, 10 min
28,75 µl	H ₂ O	

Protokoll 4: Genomische PCR

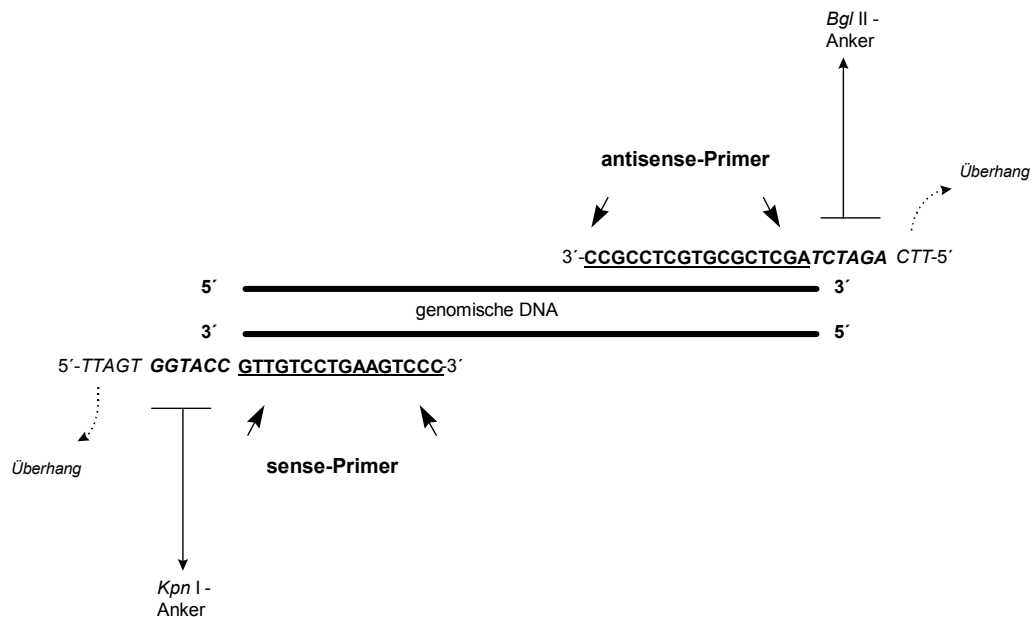


Abb. 3: Prinzip der DNA-Amplifikation mittels Ankerprimern: Die Anker beinhalten das Erkennungsmotiv der Restriktionsenzyme; der Überhang wird zur richtigen Anlagerung des Enzyms benötigt.

5.2.5 Subklonierung in den pGL3basic-Luziferase-Reportervektor

Bei einem Reportervektor handelt es sich um ein Plasmid, welches u.a. für eine Luziferase kodiert. Ob und in welcher Menge in einer Zelle Luziferase synthetisiert wird, hängt von der Stärke des Promotorfragmentes ab, welches in der Subklonierung vor das Luziferase-Gen eingebracht wird. Da die Aktivität der Luziferase mittels einer enzymatischen Reaktion quantifiziert werden kann, bietet dieses System eine Möglichkeit, ein genomisches Fragment auf seine fragliche Promotoraktivität hin zu prüfen. Dazu muß die zu untersuchende Sequenz zunächst in die zuvor linearisierte Vektor-DNA eingebaut werden. Dies erfolgt mittels einer DNA-Ligase unter Bildung einer Phosphodiesterbindung und wird als **Ligation** bezeichnet. Das genomische Fragment, welches nun Bestandteil des Plasmids ist, heißt *Insert*. In einem zweiten Schritt werden die Plasmide in Bakterienzellen überführt. Dies wird als **Transformation** bezeichnet und dient dazu, durch Vermehrung des Gastbakteriums einen hinsichtlich der Basenabfolge stabilen Klon des interessierenden DNA-Abschnittes in großer Quantität zu erzeugen (**Abb. 4**).

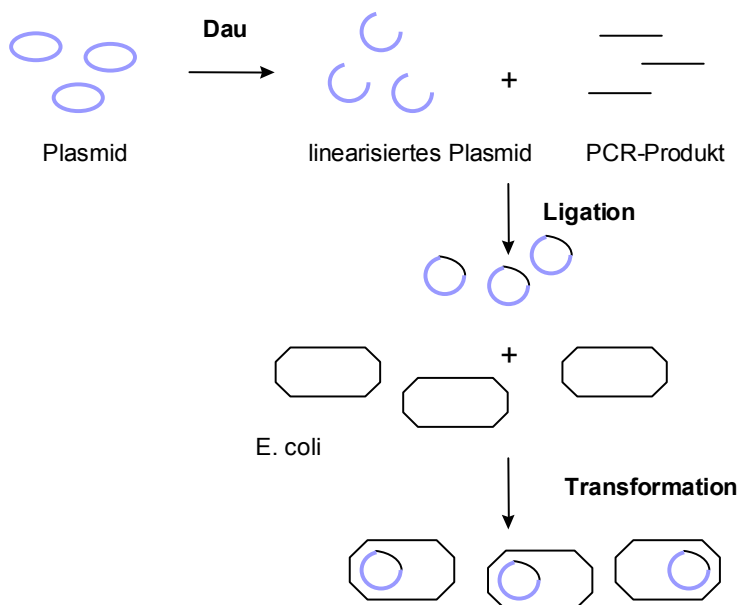


Abb. 4: Prinzip der Subklonierung eines PCR-Fragmentes in einen Vektor und anschließende Transformation in DH5 α E. coli

Im einzelnen wurden zunächst 35 µl der vorangegangenen genomischen PCR mit Hilfe des QIAquick™ PCR Purification Kits von Qiagen nach den Herstellerangaben aufgereinigt und mit 30 µl H₂O eluiert. Im Anschluß erfolgte der Dau des PCR-Produktes und des pGL3basic-Reportervektors mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I und *Bgl* II (**Protokoll 5, 6**). Nach erneuter Aufreinigung und Eluation wurden je 13 µl der Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Effizienz des Daus und der Aufreinigung zu kontrollieren. Dann erfolgte die Ligation zwischen PCR-Produkt und linearisiertem Plasmid nach **Protokoll 7**. Da linearisierte Vektoren schlechter transformiert werden, wurde die Ligation mit dem Restriktionsenzym *Mlu* I nachgedaut. Die Schnittstelle für *Mlu* I, welche normalerweise im pGL3-basic Vektor enthalten ist, wurde bei erfolgreichem Einbau des PCR-Produktes in den Vektor entfernt, so daß durch diesen Nachdau lediglich die leeren, nicht ligierten Plasmide linearisiert wurden. Dieses Vorgehen erfolgte, um die Effizienz der sich anschließenden Transformation zu erhöhen (**Protokoll 8**). Zur Transformation wurden DH5α E. coli verwendet (**Protokoll 9**), die anschließend zur Koloniebildung auf eine Agarplatte ausplattiert wurden. Am nächsten Tag wurde je ein Bakterienklon in geeignetes Kulturmedium überführt. Zur Auslese der nicht transformierten Zellen diente dabei die Anwesenheit von Ampicillin sowohl im Agar, als auch im Kulturmedium, da nur die E. coli, die mit dem Plasmid auch die Fähigkeit zu β-Laktamase-Bildung erhalten hatten, in Anwesenheit des Antibiotikums wachsen konnten.

Dau der aufgereinigten DNA:

16 µl PCR-Amplifikat
+ 1 µl *Kpn* I
+ 1 µl *Bgl* II
+ 2 µl Puffer C

2 h Inkubation, 37°C

Protokoll 5: Dau der aufgereinigten DNA

Dau des pGL3basic-Vektors:

2 µl pGL3basic-Vektor (1 µg/µl)
+ 1 µl *Kpn* I
+ 1 µl *Bgl* II
+ 2 µl Puffer C
+ 14 µl H₂O

2 h Inkubation, 37°C

Protokoll 6: Dau des pGL3basic-Vektors

<p>Ligation:</p> <p>1 µl pGL3basic-Vektor + 7 µl PCR-Produkt + 1 µl T4-DNA-Ligase + 1 µl 10x Ligationspuffer</p> <p>1. Inkubation über Nacht, 14°C 2. 10 min Ligase-Inaktivierung, 70°C</p>	<p>Nachdau:</p> <p>8 µl Ligationsansatz + 1 µl <i>Mlu</i> I + 1 µl NE Puffer 3</p> <p>3 h Inkubation, 37°C</p>	<p>Transformation:</p> <p>2 µl Nachdau + 50 µl DH5α E. coli</p> <p>1. 30 min auf Eis 2. 20 s, 37°C 3. 2 min auf Eis</p>
<p>Protokoll 7: Ligation</p>	<p>Protokoll 8: Nachdau</p>	<p>Protokoll 9: Transformation</p>

Zur Isolation und Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde das QIAprep[®] Miniprep Kit bzw. QIAgen[®] Plasmid Maxi Kit für 5 bzw. 250 ml E. coli-Kulturen in LB-Medium nach der Anleitung des Herstellers verwendet. Zur Separation des gewünschten DNA-Fragmentes aus der Mischung der möglicherweise nicht oder falsch ligierten Plasmide wurde aus dem eluierten Plasmid mittels der Restriktionsenzyme *Kpn* I und *Bgl* II das Insert herausgeschnitten. Ein Elektrophoresegele bestätigte anhand der Größe der gewonnenen DNA-Fragmente die korrekte Länge und damit den Erfolg der Subklonierung. Die automatische Sequenzierung des *Inserts* stellte abschließend die Richtigkeit der Basenabfolge sicher.

5.2.6 Herstellung der Reportergenkonstrukte

Die Deletionsmutanten des ECE-1c Promotors wurden wie das Vollkonstrukt mittels genomischer PCR generiert, wobei ein gemeinsamer antisense-Primer direkt oberhalb des fakultativen Translationsstartkodons und mehrere sense-Primer (–89, –142, –240, –490, –739, –885) benutzt wurden (**Abb. 5**). Aufgrund der Transfektionsergebnisse wurden im weiteren Verlauf noch zwei weitere Konstrukte synthetisiert mit den sense-Primern –217 und –409.

Vollkonstrukt:



Deletionsmutanten:

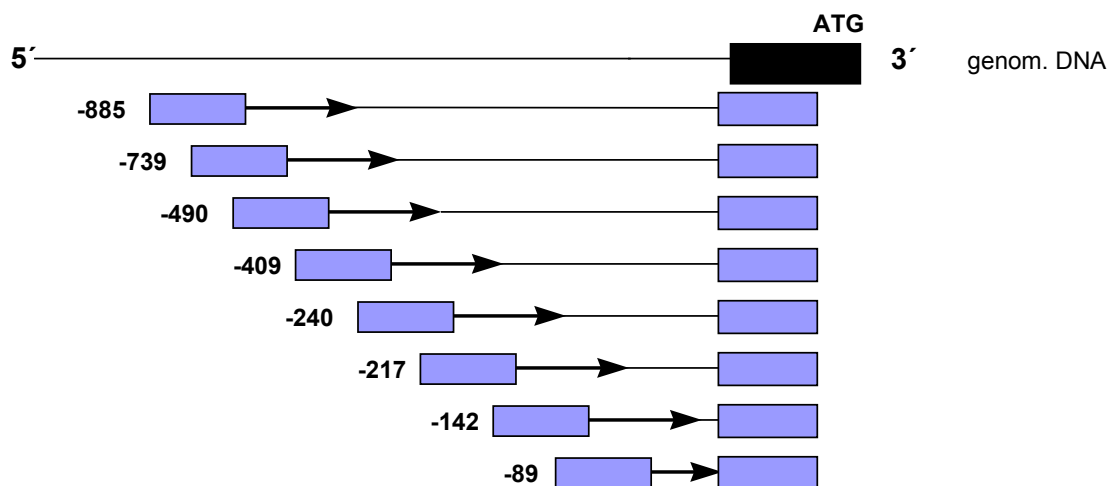


Abb. 5: ECE-1c Promotor: Reporter-genkonstrukte

5.2.7 Weitere Reporter-genkonstrukte

Für den Vergleich der ECE-1c Promotoraktivität mit den anderen ECE-1 Isoformen wurden die Vollkonstrukte des humanen ECE-1b (-1278) und -1a (-1206) Promotors, sowie der TIE1-Promotor der Maus von anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

5.2.8 Punktmutation in der E2F-Konsensussequenz des ECE-1c Promotors

Punktmutationen können über eine PCR-basierte Methode in die genomische Sequenz eingefügt werden (Higuchi et al., 1988). Dazu werden zunächst sense- und antisense-Primer synthetisiert, die sich über das zu verändernde Element des Genoms erstrecken und die Punktmutation enthalten. Mit diesen wird nun in einer ersten PCR DNA vervielfältigt, welche am 3'- bzw. 5'-Terminus das mutierte Element enthält. Diese Träger der Mutation dienen in einer zweiten PCR als Matrize und

werden über Wildtyp-Primer wieder auf die Ausgangsgröße des Fragmentes gebracht. **Abb. 6** zeigt das Prinzip:

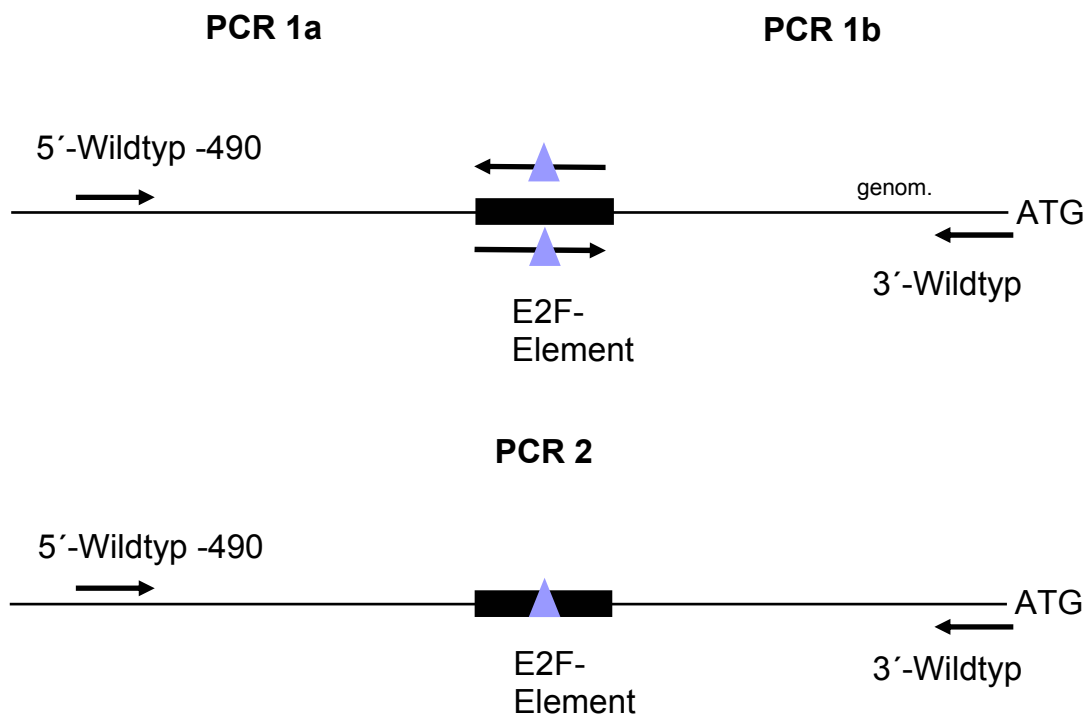


Abb. 6: Einföhrung von Punktmutationen mittels PCR-Technik. → Primer; △ Punktmutation

Die PCR 1a und 1b wurden parallel angesetzt mit humaner genomischer DNA als Matrize und unter der Verwendung von HotStarTaq™ DNA-Polymerase. Ansatz 1a wurde mit dem Wildtyp-sense-Primer 5'-CGGGTCACACTCCAGTGCA-3' an Position -490 und einem mutierten antisense-Primer 5'-CGCGGCTTCGGAACCGAGTG-3' durchgeföhrt (**Protokoll 10**). Für die PCR 1b wurde ein mutierter sense-Primer 5'-CACTCGGTTCCGAAGCCGCG-3' komplementär zu dem mutierten antisense-Primer aus Ansatz 1a und ein Wildtyp-antisense-Primer an Position -1 verwendet (**Protokoll 11**). Nach Aufreinigung über eine QiaQuick-Säule zur Entfernung überschüssiger Primer dienten die PCR-Produkte als Matrize für die PCR 2 mit dem Wildtyp-5'- und Wildtyp-3'-Primer (**Protokoll 12**). Der Erfolg der Mutation wurde per Sequenzierung bestätigt und das PCR-Amplifikat in den Luziferase-Reportervektor pGL3basic subkloniert.

		Reaktionsbedingungen:
1,000 µl	humane genomische DNA (50 ng/µl)	1. 95°C, 15 min
2,500 µl	10x PCR Puffer	2. 94°C, 1 min
5,000 µl	Q-Solution	3. 65°C, 1 min
0,500 µl	dNTPs (10 mM)	4. 72°C, 1 min
1,000 µl	3'-Wildtyp-Primer/ mutierter 3'-Primer (10 µM)	5. 39 Zyklen 2 bis 5
1,000 µl	mutierter 5'-Primer/ 5'-Wildtyp-Primer (10µM)	6. 94°C, 1 min
0,125 µl	HotStarTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)	7. 65°C, 1 min
13,875 µl	H ₂ O	8. 72°C, 10 min

Protokoll 10/11: Punktmutation im E2F-Element mittels PCR; Ansatz 1a und 1b mit humaner genomischer DNA als Template und den Wildtyp- bzw. mutierten sense-/antisense-Primern.

		Reaktionsbedingungen:
1,000 µl	PCR-Produkt	1. 95°C, 15 min
2,500 µl	10x PCR Puffer	2. 94°C, 1 min
5,000 µl	Q-Solution	3. 64°C, 1 min
0,500 µl	dNTPs (10 mM)	4. 72°C, 1 min
1,000 µl	promAS-Primer (10 µM)	5. 39 Zyklen 2 bis 5
1,000 µl	promS-490-Primer (10µM)	6. 94°C, 1 min
0,125 µl	HotStarTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)	7. 64°C, 1 min
13,875 µl	H ₂ O	8. 72°C, 10 min

Protokoll 12: Punktmutation im E2F-Element. In der PCR 2 werden die Einzelfragmente aus Ansatz 1a und 1b ligiert.

5.2.9 RNase Protection Assay (RPA)

Das Prinzip des RNase Protection Assays (RPA) ähnelt dem klassischen Northern Blot: spezifische RNA wird mittels einer radioaktiv markierten Sonde aus Gesamt-RNA detektiert. Vorteile des RPA gegenüber dem Northern Blot liegen zum einen in der hierbei stattfindenden Bildung von thermodynamisch stabileren RNA-RNA-Doppelsträngen im Gegensatz zu den RNA-DNA-Hybriden des Northern Blots. Zum anderen ist es anhand eines RPA möglich, durch eine Sonde verschiedene Isoformen eines Gens in einem Ansatz zu erfassen. Dagegen muß beim Northern

Blot jeweils mit einer neuen Sonde hybridisiert werden. Eine ausführliche Darstellung der Methode ist der Dissertation von Frau J. Lemmer zu entnehmen (Lemmer, 2002).

Für die Detektion der isoformspezifischen mRNA-Expression mittels RPA wurde zunächst ein 302 bp cDNA Fragment von ECE-1c mittels PCR generiert, wobei humanes fetales Herz als Matrize diente mit dem sense-Primer 5'-GGAGCTGCGCGAAGCCGGGGCGG-3' in Exon 1c und dem antisense-Primer 5'-GACACAAGCTTCGCTCAGGCACA-3' in Exon 3. Das PCR-Produkt mit einer Größe von 302 bp wurde in den Vektor pBluescript II KS(+) subkloniert. Die anschließende Transkription der antisense-RNA-Sonde, die Hybridisierung von Sonde und RNA, die sowie Separation der Fragmente mittels Gelelektrophorese wurde von anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Die erwarteten Größen der geschützten Fragmente betragen für ECE-1c 302, für ECE-1b 264 und für ECE-1a 177 Nukleotide. Die Auswertung erfolgte im Image Plate Scanner von Fujifilm.

Für die Analyse der Transkriptionsstartpunkte wurde ein genomisches DNA-Fragment von 739 bp 5' des ATG in Exon 1c in den Vektor pCR2.1 kloniert. Dieser wurde mit dem Restriktionsenzym *Nhe I* linearisiert, was in einer Gesamtlänge der antisense-RNA-Sonde von 491 Nukleotiden und einer genspezifischen Größe von 394 Nukleotiden resultierte. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben dargestellten Arbeitsprozeß.

5.2.10 Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

Als weitere Methode zur Detektion der Transkriptionsstartpunkte von ECE-1c erfolgte eine 5'-RACE. Da hierbei das definitive 5'-Ende der ECE-1c mRNA gesucht wird, kann kein spezifischer sense-Primer eingesetzt werden. Statt dessen wurde die in einem ersten Schritt aus Gesamt-RNA generierte cDNA (**Protokoll 1 und 2**) in einer Verlängerungsreaktion mit einem Poly-G-Anker versehen (**Protokoll 13**), welcher in der sich anschließenden PCR-Amplifikation als Anlagerungsstelle für den sense-Primer aus Poly-C-Basen fungierte (**Protokoll 14**). Anschließend wurde mit dem

Amplifikat eine zweite PCR mit einem *nested*, d.h. einem weiter 5' in Exon 1c liegenden antisense-Primer (5'-CATAGCTCGCGTGCTCCGCCCCGGCT-3') und wiederum dem Poly-C Primer als sense-Primer durchgeführt (**Protokoll 15**). Das resultierende Produkt wurde nach dem Protokoll des TA Cloning Kits in den pCR2.1 Vektor subkloniert und sequenziert.

		Reaktionsbedingungen:
10,00 µl	Eluat	
5,00 µl	NE Puffer 4	
4,50 µl	CoCl ₂ (2,5 mM)	
1,00 µl	dGTP (100 nmol/µl)	1. Inkubation bei 37°C, 40 min
0,50 µl	Terminale Transferase (20 U/µl)	2. Transferase-Inaktivierung bei 70°C,
29,00 µl	H ₂ O	10 min

Protokoll 13: Erster Schritt der RACE: Einfügen des Poly-G-Ankers

		Reaktionsbedingungen:
1,000 µl	HUVEC cDNA mit Poly-G (100 ng/µl)	1. 95°C, 15 min
2,500 µl	10x PCR Puffer	2. 94°C, 1 min
5,000 µl	Q-Solution	3. 64°C, 1 min
0,500 µl	dNTPs (10 mM)	4. 72°C, 1 min
1,000 µl	Poly-C sense-Primer (10 µM)	5. 39 Zyklen 2 bis 5
1,000 µl	antisense-Primer in Exon 2 (10µM)	6. 94°C, 1 min
0,125 µl	HotStarTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)	7. 64°C, 1 min
13,875 µl	H ₂ O	8. 72°C, 10 min

Protokoll 14: RACE mit Poly-C sense-Primer und antisense-Primer in Exon 2

		Reaktionsbedingungen:
1,000 µl	Amplifikat aus Protokoll 14	1. 95°C, 15 min
2,500 µl	10x PCR Puffer	2. 94°C, 1 min
5,000 µl	Q-Solution	3. 64°C, 1 min
0,500 µl	dNTPs (10 mM)	4. 72°C, 1 min
1,000 µl	Poly-C sense-Primer (10 µM)	5. 39 Zyklen 2 bis 5
1,000 µl	antisense-Primer in Exon 1c (10µM)	6. 94°C, 1 min
0,125 µl	HotStarTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)	7. 64°C, 1 min
13,875 µl	H ₂ O	8. 72°C, 10 min

Protokoll 15: *Nested* PCR mit einem antisense-Primer in Exon 1c

5.2.11 Primerdesign und -synthese

Die Auswahl der Nukleotidsequenz der verwendeten Primer (**Tabelle 2**) erfolgte über die publizierten genomischen DNA- bzw. cDNA-Sequenzen in der Gendatenbank auf dem Server des **National Centers for Biotechnology** (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov). Beim Entwurf der idealen Nukleotidsequenz der Primerpaare wurden folgende Punkte berücksichtigt:

1. *Annealing*-Temperatur zwischen 58°C und 68°C
2. Primerlänge mindestens 15 Basen
3. Überspannen mindestens eines Introns bei cDNA-Matrizen.

Die Berechnung der *Annealing*-Temperatur T_{α} erfolgte nach Wu et al. (1991):

$$T_{\alpha} (^{\circ}\text{C}) = 22 + 1,46 ((2 \cdot (G + C) + (A + T)),$$

wobei A, C, G und T jeweils die Anzahl der entsprechenden Basen kennzeichnet.

Lage	Name	Orientierung	5'- Sequenz -3' ohne Anker und Überhang
Exon 1c	promAS	antisense	AGCTCGCGTGCTCCGCC
-89	promS-89	sense	GCAGCTGGGCTGGGAGCA
-142	promS-142	sense	CTCGCCCGCTGGAGCTGA
-217	promS-217	sense	CACCCAGGCCCCCGCGCC
-240	promS-240	sense	CCTCAGGCCGTGATTGGCT
-409	promS-409	sense	TTCTTCCCGTTCTGCTAG
-490	promS-491	sense	CGGGTCACACTCCAGTGCA
	mutierter Primer	antisense	CGCGGCTTCGGAACCGAGTG
	mutierter Primer	sense	CACTCGGTTCCGAAGCCGCG
-739	promS-739	sense	CGGACACACACACAGCAAC
-885	promS-885	sense	GAATCCACCCTCCCCCA
-968	promS-968	sense	GTTGTCCTGAAGTCCCTGG
Exon 1c	sense- Primer	sense	GGAGCTGCGCGAAGCCGGGGCGG
Exon 1c		antisense	CATAGCTCGCGTGCTCCGCCCGGCT
Exon 2		antisense	CTGCAGGCCGTTGGGGTATGC
Exon 3	antisense- Primer	antisense	GACACAAGCTTCGCTCAGGCACA

Tab. 2: Verwendete Primer

5.3 Zellkultur

5.3.1 Primärkultur

Es wurden die in der Arbeitsgruppe vorhandenen, kryokonservierten primären **bovinen aortalen Endothelzellen** (BAEC) verwendet, die nach dem Protokoll von Sill et al. (1992) hergestellt worden waren.

Zur Gewinnung der **humanen umbilikalen Endothelzellen** (HUVEC) wurde eine frische Nabelschnur beidseits mit sterilen Klemmen abgeklemmt und von der Plazenta isoliert. Das Präparat wurde anschließend direkt in eine Flasche mit sterilem PBS überführt und bis zur weiteren Präparation bei 4°C aufbewahrt. Bei Entnahme der Nabelschnur aus der PBS-Flasche wurde sie von außen mit Kleenex gesäubert und im Anschluß an einem Ende erneut abgeklemmt. Hier wurde in die Nabelschnurvene ein Butterfly mit Kanülenschutz eingeführt, um mit etwa 20 ml NaCl (0,9%) das restliche Blut aus dem Gefäß zu entfernen. Zum Trocknen wurde Luft nachgespritzt. Nach Verschuß des anderen Nabelschnurendes mit einer weiteren Klemme wurden je nach Länge der Nabelschnur 5-10 ml 1,25%iges Trypsin eingefüllt und das Präparat dann für 30 min bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Anschließend wurde die Nabelschnur zunächst leicht geknetet, um das Lösen der Endothelzellen mechanisch zu unterstützen. Zur Zellentnahme wurde eine Klemme gelöst und die Trypsinlösung in einem 50 ml Falconröhrchen aufgefangen. Damit möglichst viele Endothelzellen gewonnen werden konnten, wurde mit 10 ml PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ nachgespült und diese Flüssigkeit ebenfalls in das Falconröhrchen überführt. Dann erfolgte die Zentrifugation mit 900 U für 10 min bei Raumtemperatur. Nach Absaugen des Überstands und Resuspension des Zellsedimentes mit 10 ml ECGM wurden die Zellen auf zwei 25 cm² Kulturflaschen verteilt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, um evtl. vorhandene Erythrozyten und Zelldetritus zu entfernen, und die Zellen anschließend mit frischem Medium versorgt. Danach erfolgte der Mediumwechsel alle 2 Tage. Je nach Dichte der Aussaat breiteten sich

die Endothelzellen innerhalb von 3-7 Tagen zu einer einschichtigen konfluenten Zellschicht aus.

5.3.2 Zelllinien

Die Zelllinie ECV304 ist ursprünglich beschrieben worden als spontane Transformation einer Kultur humaner Endothelzellen aus einer Nabelschnurvene (Takahashi et al., 1990) und wurde seitdem als ein Endothelzellmodell in einer Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten - wie auch in dieser - eingesetzt. Seit 2000 gibt es jedoch kontroverse Diskussionen bezüglich des Ursprungs dieser Zellen, da ECV304 trotz Expression einiger endothelzellspezifischer Marker eine genetische Übereinstimmung mit der Blasenkarzinomzelllinie T24/83 aufweisen und damit einen epithelialen Zelltyp darstellen (Suda et al., 2001; Brown et al., 2000). ECV304 (ECACC, Salisbury) und die Endothelzelllinie EA.hy926 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. C.-J. Edgell) wurden wie bereits beschrieben kultiviert (Orzechowski et al., 1997).

Die humanen epithelialen Mammakarzinomzelllinien MCF7 (ATCC, Rockville) und MDA MB 435s (Cell Line Service, Heidelberg) wurden in RPMI 1640 bzw. DMEM kultiviert.

5.3.3 Passagieren von Zellen

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, welches anschließend durch 2,5 ml auf 37°C erwärmte Trypsinlösung ersetzt wurde. Nach 2 min Einwirkzeit im Brutschrank wurden die Zellen mit 10 ml Kulturmedium abgespült, darin aufgenommen und die Zellsuspension in ein steriles 50 ml-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur (800 U/min, 5 min) wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert. Die Suspension wurde daraufhin auf drei, bei den EA.hy926 auf bis zu 16 80 cm²-Kulturflaschen verteilt, die zuvor mit je 10 ml Kulturmedium beladen worden waren. Für die BAEC waren die Flaschen außerdem mit 1 ml Kollagen A-PBS-Lösung beschichtet worden. Am

nächsten Tag erfolgte der erste Mediumwechsel, dann alle 2 Tage bis zur erneuten Konfluenz.

5.3.4 Transfektion

Um die Aktivität des ECE-1c Promotors in eukaryontischen Zellen zu bestimmen, wurden in die oben genannten Zellen die Reportergenkonstrukte mit dem Ziel eingebracht, daß die unter Kontrolle des Promotors synthetisierte Luziferase in den Zielzellen exprimiert wird. Hierzu wurden die kationischen Liposomen Lipofectin und LipofektAMINE, sowie die Lipidlösungen LipoTAXI und FuGENE 6 verwendet. Prinzipiell gilt, daß Lipid-DNA-Komplexe endozytotisch mit der Zellmembran verschmelzen, wobei die Plasmide zunächst ins Zytoplasma und daraufhin durch die Kernporen in den Zellkern gelangen, wo sie transkribiert werden können. Da nicht alle Zellen mit jedem Transfektionsreagenz gleichermaßen gut transfiziert werden können, mußte auf die verschiedenen, oben genannten Lösungen zurückgegriffen werden. Neben den Promotorkonstrukten im Luziferasevektor wurden bei jedem Ansatz 0,5 µg pSV-β-Galaktosidase Vektor transfiziert, um die Luziferaseaktivität durch Elimination unterschiedlicher Transfektionseffizienzen zu standardisieren. Um den Hintergrund an Luziferaseaktivität zu ermitteln, wurde jeweils eine 6-Loch-Platte mit dem promotorlosen pGL3-Plasmid, pGL3basic, transfiziert. Als Positivkontrolle diente der pGL3SV40-Vektor, der den starken viralen Promotor SV40 enthält. Pro Konstrukt wurde stets eine komplette 6-Loch-Platte transfiziert.

Transfektion von BAEC mittels LipofectAMINE:

BAEC wurden in einer Konzentration von 4×10^5 Zellen pro Loch auf 6-Loch-Platten passagiert und 18-24 h im Brutschrank bis zur 80%igen Konfluenz inkubiert. Das Medium wurde von den 6-Loch-Platten abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Optimem-1 pro Loch gewaschen. Im Anschluß wurden 810 µl Optimem-1 pro Loch einpipettiert. Dazu kamen 190 µl Transfektionslösung (**Protokoll 16**) pro Loch mit anschließender Inkubation bei 37°C für 4 h. Nach einem Mediumwechsel erfolgte 48 h später die Zellernte.

Transfektionslösung pro Loch:

- 0,5 µg Luziferasekonstrukt
 - + 0,5 µg pSV-β-Galaktosidase Vektor
 - + 10,0 µg LipofectAMINE (2 µg/µl)
1. Auffüllen auf 200 µl mit Optimem-1
 2. Inkubation bei Raumtemperatur, 30 min

Protokoll 16: Transfektionslösung für BAEC

Transfektion von ECV304 mittels Lipofectin:

ECV304 wurden in einer Konzentration von $3,5 \times 10^5$ Zellen/Loch auf 6-Loch-Platten passagiert und 18-24 h im Brutschrank bis zur 80%igen Konfluenz inkubiert. Das Medium wurde von den Platten abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Optimem-1 pro Loch gewaschen. Im Anschluß wurden 810 µl Optimem-1 pro Loch einpipettiert. Dazu kamen je 190 µl der Transfektionslösung (**Protokoll 17**) pro Loch mit anschließender Inkubation der Zellen bei 37°C für 24 h. Nach einem Mediumwechsel erfolgte weitere 24 h später die Zellernte.

Transfektionslösung pro Loch:

- 2,0 µg Luziferasekonstrukt
 - + 0,5 µg pSV-β-Galaktosidase Vektor
 - + 5,0 µg Lipofectin (1 µg/µl)
1. Auffüllen auf 200 µl mit Optimem-1
 2. Inkubation bei Raumtemperatur, 45 min

Protokoll 17: Transfektionslösung für ECV304

Transfektion von EA.hy926 und MCF7 mittels FuGENE 6:

EA.hy926 wurden in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/Loch auf 6-Loch-Platten, MCF7 in einer Dichte von 3×10^5 Zellen/Loch auf 12-Loch-Platten passagiert und 18-24 h bis zur 80%igen Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit frischem Kulturmedium versorgt. Dazu wurden 100 µl der Transfektionslösung (**Protokoll 18 und 19**) pro Loch tropfenweise zu den Zellen gegeben, die dann bis zur Zellernte 48 h im Brutschrank inkubierten.

Transfektionslösung pro Loch:

100 µl serumfreies Optimem-1
+ 1,5 µl FuGENE 6

Inkubation bei Raumtemperatur, 5 min

Optimem-FuGENE 6-Mischung
+ 0,5 µg Luziferasekonstrukt
+ 0,5 µg pSV-β-Galaktosidase Vektor

Inkubation bei Raumtemperatur, 15 min

Transfektionslösung pro Loch:

100 µl serumfreies Optimem-1
+ 3,0 µl FuGENE 6

Inkubation bei Raumtemperatur, 5 min

Optimem-FuGENE 6-Mischung
+ 0,5 µg Luziferasekonstrukt
+ 0,5 µg pSV-β-Galaktosidase Vektor

Inkubation bei Raumtemperatur, 15 min

Protokoll 18: Transfektionslösung für MCF7

Protokoll 19: Transfektionslösung für EA.hy926

Transfektion von MDA MB 435s mittels LipoTAXI:

MDA MB 435s wurden in einer Dichte von 3×10^5 Zellen/Loch auf 12-Loch-Platten passagiert und 18-24 h bis zur 80%igen Konfluenz im Brutschrank gehalten. Dann wurde das Medium abgesaugt und pro Loch mit 300 µl der Transfektionslösung (**Protokoll 20**) für 5 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß kamen 300 µl DMEM mit 20% FCS dazu, nach 24 h wurde die Transfektionslösung abgesaugt und durch 1 ml normales Kulturmedium ersetzt. Die Zellernte erfolgte weitere 24 h später.

Transfektionslösung pro Loch:

100 µl DMEM (ohne Antibiotika/ohne FCS)
+ 5 µl LipoTAXI
+ 1 µg Luziferasekonstrukt
+ 1 µg pSV-β-Galaktosidase Vektor

1. Inkubation bei Raumtemperatur,
45 min
2. Zugabe von 300 µl DMEM
(ohne Antibiotika/ohne FCS)

Protokoll 20: Transfektionslösung für MDA MB 435s

5.3.5 Zellernte

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 500 µl bei 6-Loch-Platten bzw. 300 µl bei 12-Loch-Platten Reporterlysepuffer pro Loch überschichtet. Unter leichtem Schütteln wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im

Anschluß wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturplatten gelöst. Es folgte die Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C für 2 min sowie die Übertragung des Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß. Anschließend konnte die Luziferase- oder Galaktosidaseaktivität gemessen werden.

5.3.6 Bestimmung der Luziferaseaktivität

Beim luminometrischen Nachweis der Luziferaseaktivität wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Dabei wurden 20 µl des Zell-Lysates in ein Röhrchen pipettiert und in das Luminometer gestellt, welches 100 µl des Substrates Luziferin einspritzte. Die Meßzeit des Luminometers betrug 20 Sekunden.

5.3.7 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

Der luminometrische Nachweis des β -Galaktosidaseprodukts erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei wurden 10 µl des Zell-Lysates und 70 µl Galacton[®] vermengt und 30 bis 60 min inkubiert. Dann erfolgte die Messung über 5 s im Luminometer, welches 100 µl des Akzelerators[®] automatisch einspritzte. Der Akzelerator terminiert dabei die Galaktosidaseaktivität und beschleunigt die Lichtemission.

5.3.8 Statistik

Relative Luziferaseaktivität: Die Transfektionseffizienz wurde durch die Kotransfektion mit einem β -Galaktosidaseplasmid in jedem Loch standardisiert. Pro Reporter-genkonstrukt wurden n = 6 Transfektionen pro Zellart durchgeführt.

t-Test: Die Daten wurden mit einem zweiseitigen Student's t-Test für unverbundene Stichproben analysiert. Bei einem p < 0,05 wurde Signifikanz angenommen.