

2 Material und Methoden

2.1. Analyse von $\text{IkappaB}\alpha$ in Zelllinien

2.1.1 Zelllinien

Die von Hodgkin-Fällen abstammenden Zelllinien L428, L540, L1236, L591, KMH2, HDLM2 und HDMyZ sowie die T-Zell-Linie Jurkat wurden in RPMI 1640 (Seromed Biochrom, Hamburg, Deutschland) mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kalbsserum (FCS), 2 mmol L-Glutamin (GIBCO, Karlsruhe, Deutschland) und den Antibiotika Streptomycin/Penicillin gehalten. Die Cervixcarcinomlinie Hela wurde in DMEM (Gibco) kultiviert, dem 10 % FCS, sowie 1 mM Natriumpyruvat und Penicillin/Streptomycin zugefügt war.

2.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Während der folgenden Prozeduren wurden alle RNA enthaltenden Reagentien, sofern die Reaktionen es erlaubten, auf Eis gehalten, die Zentrifugationen wurden bei maximaler Rotationsgeschwindigkeit (15000 rpm) bei 4°C durchgeführt. Zur Vermeidung eines RNase Abbaus wurden alle Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser angesetzt. Sämtliche Alkoholfällungen während des Extraktionsvorganges erfolgten bei -80°C.

Für die Isolierung von zellulärer Gesamt-RNA wurden ca. 10^8 Zellen ausgezählt, zentrifugiert und wiederholt mit PBS gewaschen, um Zellkultur- und Serumrückstände zu entfernen. Durch Zentrifugation pelletiert, wurden die Zellen in 3 ml Guanidin-Thiozyanat (GUTC) zur Lyse resuspendiert. In diesem Zustand lagerten die Zellysate bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung.

Die zellenthaltende Suspension wurde zunächst zur Scherung der DNA mehrere Male durch eine dünne Kanüle aufgezogen. Aus je 500 μl der so behandelten Zellsuspension wurde die RNA mit 500 μl saurem Phenol und 100 μl Chloroform/Isoamylalkohol (CHCl_3/IAA) im Verhältnis 49:1 bei 15 min Inkubation auf Eis extrahiert. Zugegeben wurden auch 50 μl 2 M Natriumacetat. Anschließend erfolgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation. Aus der oberen wässrigen Phase wurde die RNA erneut extrahiert, jedoch dieses Mal mit 500 μl CHCl_3/IAA (49:1) mit nachfolgender Phasentrennung durch Zentrifugieren. Die anschließende Fällung wurde für 2 Stunden mit 500 μl Isopropanol aus der wässrigen Phase vorgenommen. Nach vorsichtigem Abnehmen des Alkohols nach Zentrifugation trocknete das RNA-Pellet bis es durchsichtig war. Es schloß sich ein 30 min DNase-Verdau mit 5 μl RNase-freier DNase (10 U/ μl) in 45 μl DNase-

Verdünnungspuffer (20 mM Tris, pH 7,5) an. Nach Verdau folgte die Zugabe von 100 µl Phenyl:Chloroform:Isoamylalkohol (PCI) im Verhältnis 24:23:1. Einer guten Durchmischung durch Vortexen folgte Zentrifugieren zur Phasentrennung, um aus der oberen wässrigen Phase eine erneute Alkoholfällung mit 2,5-fachem Volumen absolutem Ethanol, gemischt mit 3 µl Natriumacetat (2 M) pro 50 µl vornehmen zu können. Diese Fällung dauerte 30 min, das nach Zentrifugation gewonnene Pellet wurde getrocknet und dann in 10 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die RNA-Konzentration in dieser Lösung wurde mit je 1 µl, das in DEPC- H₂O abstuftend verdünnt wurde, mittels Spektrometrie bei 260 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch Elektrophorese in einem 2 %-igen Agarosegel beurteilt. Bis zur Weiterverwendung wurden die Lösungen bei -80°C tiefgefroren.

2.1.3 Reverse-Transkriptase-PCR

Die RT-PCR umfaßt zwei verschiedene Reaktionen, nämlich die Umschreibung der im Gesamt-RNA-Extrakt enthaltenen RNA in einsträngige c-DNA (reverse Transkription) und die Amplifikation der gewünschten Genabschnitte aus dieser neusynthetisierten c-DNA (Polymerase-Kettenreaktion).

Für die reverse Transkription wurde 1 µg Gesamt-RNA mit 2 µl eines Desoxynukleotidgemischs aus dATP, dCTP, dTTP, dGTP in einer Konzentration von jeweils 10 mM, 4 µl 25 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂), 500 ng Oligo-(dT)₁₅ Primer und 1 µl RNase-Inhibitor (50 U/µl) in 2 µl 10x Inkubationspuffer und 10 µl sterilem Wasser inkubiert. Zur Denaturierung wurde der Ansatz bei 65°C für 15 min erhitzt. Anschließend wurden 20 U einer AMV-Reversen Transkriptase (Boehringer-Mannheim) zugefügt. Es folgten zwei weitere Inkubationsschritte bei 25°C für 10 min zur Anlagerung des Primers an die RNA bzw. bei 42°C für 60 min zur c-DNA-Synthese. Die reverse Transkriptase wurde dann bei 99°C für 5 min denaturiert, um die folgende Polymerase-Kettenreaktion nicht zu stören.

Die Amplifikation des kodierenden 954 Basenpaare langen Abschnittes des IkappaB α -Gens erfolgte in mehreren Teilabschnitten, wobei darauf geachtet wurde, daß sich die Abschnitte jeweils überlappten, um die gesamte kodierende Sequenz ohne Unterbrechungen zu erfassen. Gewählt wurden hierzu 4 verschiedene Oligonukleotidpaare,

die jeweils einen zwischen 230 und 330 langen Bereich der zu amplifizierenden Sequenz umfassen.

Tab.4: Primer für die RT-PCR

		Sequenz	Position	Länge des Amplifikates
I	Sense (5'→3')	AGC GCA CCC GCA GCA GCG CCC G	58- 79	330 bp
	Antisense (5'→3')	TCA CCT GGC GGA TCA CTT CC	386 - 367	
II	Sense (5'→3')	ACT CGT TCC TGC ACT TGG CC	318 - 337	238 bp
	Antisense (5'→3')	TGC TCA CAG GCA AGG TGT AG	555 - 536	
III	Sense (5'→3')	TCC GAG ACT TTC GAG GAA ATA CC	510 - 532	270 bp
	antisense(5'→3')	TTT TGC AGG TCC ACT GCG AG	780 - 761	
IV	Sense (5'→3')	CCT TGG GTG CTG ATG TCA ATG	705 - 725	374 bp
	Antisense (5'→3')	CAA GTC CAT GTT CTT TCA GCC CC	1077-1056	

Jeder Teilabschnitt des Genes wurde in einem 25 µl Reaktionsansatz amplifiziert, der sich aus folgenden Reagentien zusammensetzt:

- 2,5 µl 10x-PCR-Puffer
- 0,25 µl 10 mM jedes Primers
- 1,25 µl 25 mM MgCl₂
- 0,2 µl dNTP (10 mM jedes)
- 1 Einheit Taq-Polymerase (Invitec, Berlin)
- 5 µl des RT-Ansatzes
- 9 µl H₂O

Die PCR erfolgte mit dem folgenden Programm:

- 90 sec bei 95°C
- 35 Zyklen mit je 40 sec bei 95°C; 40 sec bei 60°C; 60 sec bei 72°C
- 10 min bei 72°C

Für jedes Primerpaar wurde zum Ausschluss von Kontaminationen eine H₂O-Leerkontrolle mitgeführt. Nach Beendigung der PCR folgte die Analyse eines 4 µl Aliquotes durch Elektrophorese in einem ethidiumbromidhaltigen 0,8%-igen Agarosegel zur Erfolgskontrolle.

2.1.4 genomische PCR

Die kodierende Sequenz wurde auch aus DNA-Präparaten der HD-Zelllinien sequenziert. Hierzu wurden überlappend Primer im Intron- und Exon-Bereich des Gens gewählt. Diese entsprechen den für eine außerdem durchgeführte Einzelzell-PCR-gewählten Primern I und II, die auf Seite 29 aufgelistet sind. Im übrigen folgte das Programm dem der oben beschriebenen RT-PCR.

2.1.5 Präparation von Zellproteinen und Western-Blot

Für eine Gesamtpräparation zellulärer Proteine wurden ca. 5×10^6 Zellen in einem Lysepuffer für 10 min bei 4°C inkubiert. Zur Vermeidung einer Degradation sind diesem Puffer verschiedene Proteinaseinhibitor (komplett, Mini, Boehringer-Mannheim, Deutschland) zugesetzt. Nach 5 min Zentrifugation des Lysates in einer Mikrozentrifuge bei 14000 rpm wurden die Proteine aus dem Überstand in einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurden je Zelllinie 30 µg Proteinextrakt verwendet. Die Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher and Schüll, Dassel, Deutschland) erfolgte mittels Elektroblothing. Die Western-Blots wurden mit Chemilumineszenz gemäß den Anweisungen des Herstellers (ECL^R System, Amersham, Braunschweig, Deutschland) analysiert. Zur Darstellung der spezifischen IkappaB α -Banden wurde die Nitrocellulosemembran sowohl mit einem gegen den C-Terminus, als auch einem gegen den N-Terminus gerichteten Antikörper markiert, die von der Firma SantaCruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland) erhältlich sind.

2.2 Analyse von IkappaB α in Primärmaterial

2.2.1 *In situ*-Hybridisierung

2.2.1.1 Herstellung und Markierung einer Sonde

Zunächst erfolgte eine RT-PCR der als Sonde gewünschten Sequenz aus RNA in c-DNA nach den Angaben des Herstellers (Gene Amp, Perkin Elmer). Die Amplifikate entsprachen dem Abschnitt zwischen den Basen 540 und 1379 (nach Haskil⁶⁸). Die c-DNA-Sequenz wurde in Plasmide kloniert und diese in kompetente Bakterien transformiert. Nach Inkubation und Vermehrung der plasmidhaltenden Bakterien über Nacht konnte eine hohe Anzahl der für die Sonde gewünschten Sequenz präpariert werden. Die Präparation erfolgte nach Standardverfahren (Maniatis).

Da die Plasmid-DNA-Konstrukte für die folgende Transkription in linearisierter Form vorliegen müssen, wurden sie in verschiedenen Ansätzen jeweils mit den Restriktionsendonukleasen SstII bzw. SstI geschnitten. Im Anschluß wurden die geschnittenen Plasmide transkribiert.

Der Ansatz für die Transkription bestand aus

- 1 μ l linearisiertem Plasmid
- 4,5 μ l (entspricht 2 MBq) lyophilisiertem ³⁵S-UTP
- je 1 μ l 10 mM radioaktiv markierte NTP (ATP, GTP, CTP)
- 2 μ l 5x Transkriptionspuffer
- 0,5 μ l 100 mM Dithiothreitol (DTT)
- 0,5 μ l RNAsin (Promega)
- 4 μ l DEPC-H₂O
- 1 μ l RNA-Polymerase

Für die Synthese des Antisense-Stranges wurde entsprechend der benutzten Plasmide die Polymerase T7, für die Sense-Synthese die Polymerase Sp6 benutzt. Der Ansatz wurde für 90 min bei 37 °C inkubiert, wobei nach 60 min nochmals 1 μ l RNA-Polymerase zugefügt worden ist. Nach erfolgter Transkription wurde zur Degradation der Plasmid-DNA 0,5 μ l DNase zusammen mit 0,5 μ l RNAsin sowie 5 μ l Hefe t-RNA (BRL) zugesetzt und es folgte eine Inkubation bei 37°C für 8 min.

Die Aufreinigung der markierten Sonde erfolgte mittels Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation. Sie wurde anschließend in DTT und DEPC-H₂O resuspendiert. Da kleinere RNA-Fragmente einer Länge zwischen 100 bis 150 Basenpaare auf den zu markierenden Schnitten besser in die Zielzellen penetrieren können, wurden die

Transkripte bei 60°C mit NaOH hydrolisiert und die Reaktion nach einer errechneten Zeit von 49 Minuten (nach der Gleichung von Cox) mit einem Neutralisationspuffer beendet.

Die nun folgenden Schritte der *in situ*-Hybridisierung wurden nach einem Protokoll von Angerer et al⁶⁹ bzw. mit Modifikationen nach Milani et al⁷⁰ durchgeführt.

Da RNA nachgewiesen werden soll, ist bei der gesamten Versuchsdurchführung äußerste Vorsicht mit ubiquitär vorhandenen RNAsen geboten. Daher wurde ausschließlich DEPC-Wasser verwendet, und die benötigten Instrumente wie Objektträger, Deckgläser und Glasgefäße wurden vor Verwendung für 5 Stunden bei 250°C gebacken. Zusätzlich waren die Deckgläser für 20 min in 0,2 N HCl und für weitere 10 min in absolutem Ethanol gespült.

2.2.1.2 Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Paraffinschnitte einer Dicke von 4 µl, die auf Objektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet waren, wurden zunächst durch aufeinanderfolgende Inkubationen in Xylol, Aceton, Aceton-PBS-Gemisch im Verhältnis 1:1 und Waschen mit PBS (je 10 min) entparaffinisiert und rehydriert. Zur Entfernung der an die Ziel-RNA gebundenen basischen Proteine wurden die Schnitte 20 min in 0,2 N HCl/DEPC-H₂O inkubiert, und 5 min mit 1x PBS gewaschen. Es folgten

- 10 min in 0,625 mg Pronase in PBS
- 30 sec Blockierung der Pronase mit 0,1 M Glycin in 1x PBS
- dreimaliges Spülen mit 1x PBS
- 20 min Nachfixierung in 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA)/1x PBS bei 4°C,
- Waschen mit 1x PBS für 3 min
- 10 min Inkubation in Triethanolamin (ph 8,5)/Essigsäureanhydrid im Verhältnis 250:1
- Waschen mit PBS für 5 min
- Dehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe

2.2.1.3 Hybridisierung

Pro Objektträger wurde eine Sonden-Aktivität von etwa 300 000 cpm benötigt. Die Menge an Sonden-Transkript, die dieser Aktivität entsprach, wurde in je 10 mM DTT und DEPC-H₂O resuspendiert. Im Anschluß an die beschriebene Behandlung der Schnitte wurde die Lösung zusammen mit 50 %-igem deionisiertem Formamid im Wasserbad für 1 min auf

80°C erhitzt. Es folgte eine vorsichtige Homogenisierung in Hybridisierungspuffer. Dieser Puffer bestand aus 12,5 %-igem Dextransulfat; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1,2 mg/ml Hefet-RNA 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄; 0,3 M NaCl; 5 mM EDTA und 1x Denhardt's Lösung. Pro Objektträger wurden aus dieser Gesamtlösung 25 µl aufgetragen und mit silikonbeschichteten Deckgläsern blasenfrei abgedeckt. Die Hybridisierung fand in Kunststoffboxen statt, die mit Formamid-, bzw. DEPC-getränktem Zellstoff ausgelegt waren, nach Einlegen der Objektträger in PVC-Folie eingeschweißt und für 18 Stunden in einem Ofen mit der Temperatur von 50°C belassen.

Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte unter stringenten Bedingungen 5 Stunden in 50%-igem Formamid, 10 mM DTT und 1x Denhardt's gewaschen und 15 min bei 37°C in TES-Puffer inkubiert. Zur Entfernung von unspezifisch gebundener Sonde schloß sich für 30 min eine Inkubation in RNaseA (20 mg/ml in TES-Puffer) bei 37°C an sowie eine Waschung in TES-Puffer. Eine Wiederholung des stringenten Waschens machte die 20 min Inkubation in 2x SSC und 20 min in 0,1x SSC nötig. Nach dieser Behandlung konnten die Schnitte dann dehydriert und der Autoradiographie zugeführt werden.

2.2.1.4 Autoradiographie

Die folgenden Schritte wurden in einer Dunkelkammer vorgenommen: Von einer Fotoemulsion, die im Wasserbad auf 43°C erhitzt worden war, wurden je 10 ml mit 10 ml ebenfalls erwärmter 0,3 M Ammoniumacetatlösung vorsichtig gemischt. In diese Lösung wurden die, wie oben beschrieben behandelten, Objektträger etwa 2 sec getaucht und nach Abtropfen des Überschusses an Emulsion senkrecht für 2 Stunden zum Trocknen gestellt. Für die autoradiographische Exposition wurden die getrockneten Schnitte in Kartellboxen zusammen mit Kalziumchlorid als Exsikkator einsortiert. Diese wurden in Aluminiumfolie eingewickelt bei 4°C dunkel gelagert.

2.2.1.5 Exposition und Entwicklung

Nach Ablauf der Expositionszeit, die für 3 verschiedene Chargen zwei, vier und acht Wochen betrug, folgte die Entwicklung nach langsamem Aufwärmen der Schnitte auf Raumtemperatur in einer Dunkelkammer. Hierzu war die Entwicklungslösung (Kodak D 19) im Verhältnis 1:1 mit Aqua dest. verdünnt. Die Entwicklungszeit betrug 3 min und wurde durch 1 min Inkubation in 1%-iger Essigsäure beendet. Die Objektträger wurden dann für 10 min in Fixier-Lösung (Kodak Fixierer 3000 Lösung A) fixiert und anschließend 30 min in kaltem Leitungswasser gespült.

2.2.1.6 Gegenfärbung

Die Schnitte wurden in einer Haematoxylin-Eosin gegengefärbt, in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert, 5 min in Xylol getaucht und mit Corbit Balsam eingedeckt.

2.2.1.7 Kontrollen

Um die Spezifität der sichtbar gewordenen Signale nachweisen zu können, ist bei allen Experimenten pro hybridisiertem Fall ein Kontrollschnitt mit dem ³⁵S-Sense RNA Transkript der gleichen Behandlung unterzogen worden. Hierbei zeigte sich bei keinem Schnitt ein spezifisches Signal.

2.2.2 Einzelzellanalyse

2.2.2.1 Färbung von Gefrierschnitten

Aus Gefrierblöcken von Patientenlymphknoten wurden zunächst etwa 7 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen.

Zur Identifikation der zu analysierenden Zellen wurde eine Färbung mit dem CD30-spezifischen Antikörper Ber-H2 durchgeführt. Die Inkubation mit diesem Antikörper erfolgte über 45 min, anschließend wurde mit Hilfe der Alkalische Phosphatase/Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP-Technik)⁷¹ die Bindung des Antikörpers nachgewiesen. Diese APAAP-Technik beinhaltet die Bindung des primären CD30-Antikörpers durch einen Brücken-Antikörper, der seinerseits mit dem aus der alkalischen Phosphatase (AP) und einem monoklonalen Mausantikörper bestehenden Komplex reagiert. Es folgt eine Sichtbarmachung dieses Komplexes durch eine enzymatische Farbreaktion, bei der die AP zugegebenes Naphthol-AS-Biphosphat spaltet und damit dessen Bindung an Neufuchsin katalysiert. Aus dieser Reaktion entsteht ein roter Farbniederschlag an der Stelle, an der ursprünglich der CD30-Antikörper gebunden hat und somit sind die das CD30-Antigen tragenden Zellen kenntlich gemacht.

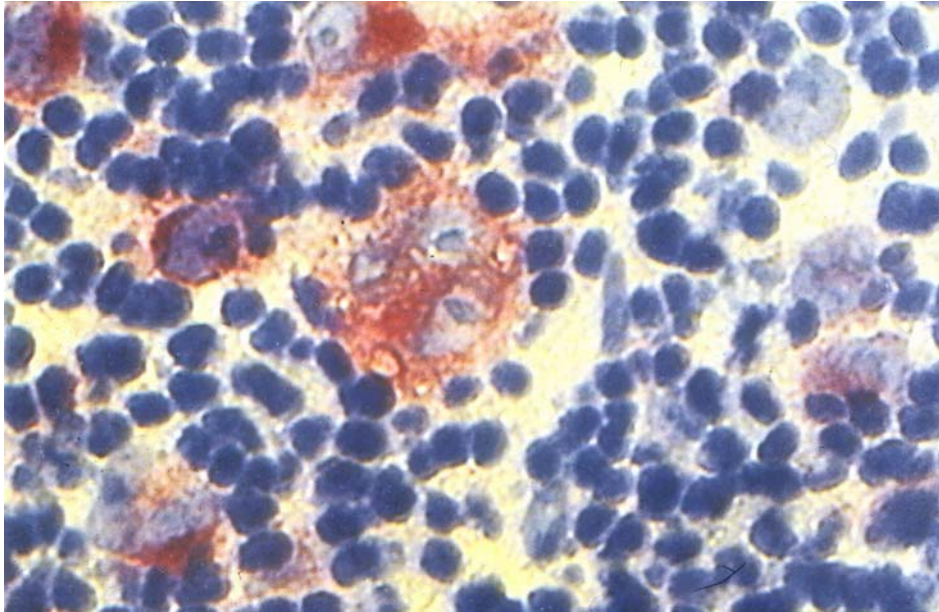


Abb.3: HRS-Zellen stellen sich bei Färbung mit dem CD30-Antikörper rot dar und können so und anhand ihrer Morphologie gut von den sie umgebenden Zellen unterschieden werden.

Um einen Abbau der Zell-DNA sowie eine Proteindegradation zu verhindern, war der PBS-Puffer, mit dem zwischen allen Inkubationsschritten gründlich gewaschen wurde, mit Heringssperma-DNA (1 mg/ml) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 1 mM) versetzt.

Die Schnitte wurden nach der Färbung in aufsteigender Ethanolreihe dehydriert. Um eine Zerstörung der gefrorenen Schnitte durch Aufnahme von Wasser zu vermeiden, wurde in die Lagerungsboxen kristallines CaCl_2 zugefügt. Bis zur weiteren Verwendung lagerten die Schnitte dann bei -80°C .

2.2.2.2 Isolierung von Einzelzellen

Für die Zellisolation wurden jeweils ein bis zwei Objektträger unter Schutz vor Luftfeuchtigkeit aufgetaut und, nachdem sie Raumtemperatur erreicht hatten, in absteigender Ethanolreihe rehydriert. Es folgte eine Überschichtung der Schnitte mit PBS-Puffer.

Die durch die rote Färbung und durch ihre auffällige Morphologie deutlich abgrenzbaren Hodgkin- bzw. Reed-Sternberg-Zellen wurden unter mikroskopischer Kontrolle (630-fache Vergrößerung) mit Hilfe einer manuell durch einen Joystick geführten geschlossenen Kapillare von den umliegenden Zellen freipräpariert, vom Objektträger gelöst und, auf der Spitze der Kapillare aufgespießt, in eine offene Mikrokapillare überführt. In diese waren

vor der Freipräparation der Zelle möglichst geringe Mengen (ca. 0,1 μ l) des Überschichtungspuffers eingesaugt worden.

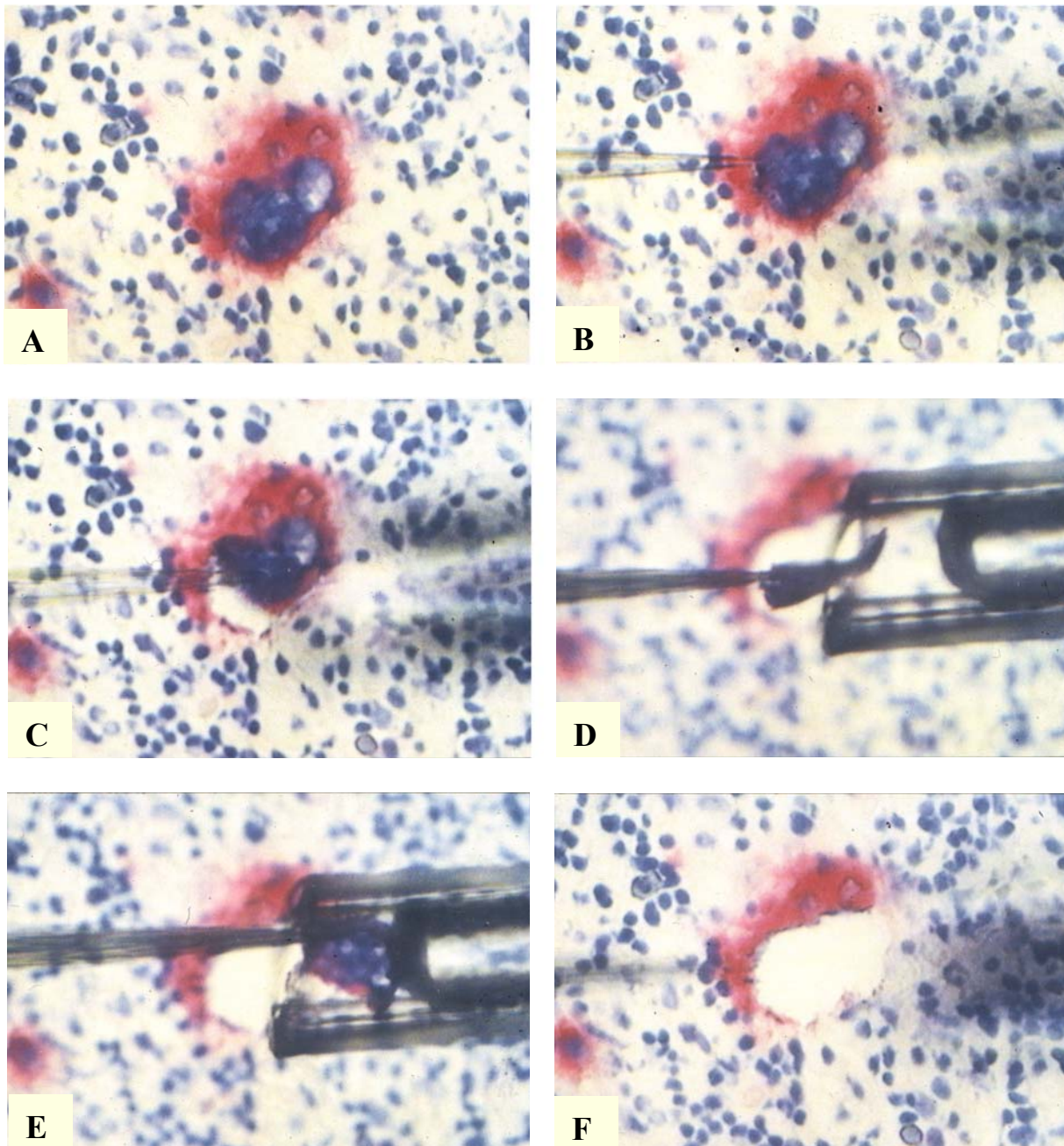


Abb.4: A-F: Eine einzelne Zelle wird als Bildausschnitt dargestellt. Zur Isolierung wird eine spitz ausgezogene geschlossene Kapillare auf die Schnittebene heruntergeführt, die Zelle freipräpariert und auf der Spitze der Kapillare aufgespießt. Sehr vorsichtig wird diese nun in die Ebene geführt, in der eine offene Kapillare positioniert worden ist und die Zelle in deren Öffnung überführt. Abschließend wird zur Dokumentation ein Photo der Stelle gemacht, an der sich nun sauber die Lücke der einzelnen Zelle befinden sollte.

Zur weiteren Analyse der Zellen mittels Polymerasekettenreaktion mußte die zellenthaltende Mikrokapillare in ein 0,2 ml-PCR-Reaktionsgefäß ausgeblasen und die äußerste Spitze abgebrochen werden. Das Abbrechen der Spitze erfolgte sicherheitshalber, damit die Zelle auch wirklich im Reaktionsgefäß enthalten war. In dieses PCR-Gefäß waren zuvor 10 µl Proteinase K in Trispuffer gegeben worden. In diesem Gemisch wurden die gepickten Zellen nach Beendigung der Picksitzung zur Freisetzung der DNA eine Stunde bei 50°C verdaut. Hiernach schloß sich entweder sofort die Primäramplifikation an, oder die verdauten Zellen wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren.

Bei jeder einzelnen Isolation erfolgte zur Dokumentation eine Fotografie der entsprechenden Zelle bzw. zum Nachweis, daß kein Umgebungsgewebe beschädigt worden ist, ein Foto der Stelle, an der die Zelle entnommen worden ist. Als Kontaminationskontrolle wurde auch nach jeder erfolgten Isolation mittels einer neuen Kapillare eine 0,2 µl-Probe des Überschichtungspuffers abgenommen. Diese Probe erfuhr im folgenden exakt die gleiche Behandlung wie die Zellen und wurde bei allen folgenden Reaktionen mitgeführt.

Mit dem beschriebenen Verfahren der Zellisolation wurden zur Kontrolle bei relevanten Fällen auch umliegende reaktive Lymphozyten einzeln oder im Verband entnommen.

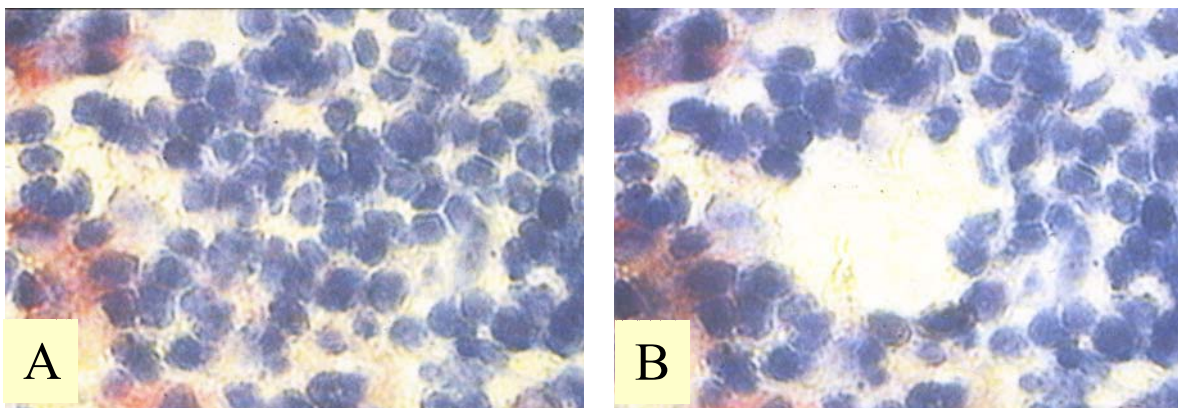


Abb.5: reaktive Lymphozyten aus einem HD-Gefrierschnitt (A), im Verband isoliert (B), die als Kontrollzellen dienen

2.2.2.3 Einzelzell-PCR

Zur Amplifikation der C-terminalen Hälfte des IkappaB α -Gens aus einzelnen Zellen wurden 3 verschiedene Primersets entwickelt, mit denen jeweils in Primär- und Reamplifikation als semi-nested PCR überlappende Teile des Gens amplifiziert werden konnten. Hierbei wurde die Primäramplifikation in einer Reaktion mit allen 6 Primern durchgeführt, zur Reamplifikation der einzelnen Abschnitte wurde aus dieser Reaktion je 1 μ l entnommen und als Substrat für die Reamplifikation jedes Teilabschnittes in separatem Reaktionsgefäß benutzt.

Tab.5: Primer für die Primär- und Reamplifikation

		Sequenz	Position
I	Sense	AGA AAA GGC ACT GAC CAT GG	2283-2303
	Antisense	GGC ATC CAA TAG GCA CTT TG	3058-3039
	Antisense (Reamplifikation)	GGA GTT TAA GCT CTT GCC TGG	3007-2987
II	Sense	ATG GTA TGT CTG CCT CCC TG	2902-2921
	Antisense	CCT CAT TAG TTA GAG CGC CG	3699-3680
	Antisense (Reamplifikation)	AGG TGG GCC AAC TTA AGG AGT C	2966-2945
III	Sense	CCA TTC CCT TCA CCC TCC	3702-3719
	Antisense	ACC ACT GGG GTC AGT CAC TC	4391-4372
	Antisense (Reamplifikation)	AGG CCC CTA GAG CTG CTC	3712-3695

Abb.6: Gensequenz mit überlappenden Teilabschnitten und Primern

1 GAGCTCTGAC CGAAGTTTGC TTTATTTTGC CTGTACCAAT TCTACCAAGT AGATGAATTC AGTCCATGGC
71 TTGCGAGGCTT GGAGGTGGAG GTGGAGTGGGA GAGCATAAAT TATATTTCTG CAGGTGAAAC CAGAGCATAG
141 TGAGCCGAAA CCCCTTTCTA CCCAGGTGGC GTGAATGGGT CCAACTGCTA CTGTCCCCA GGACAAGAGA
211 GCAAGGAGGG GCGGGCAGGA TGGGACTACC TTGAGCCTCC CGCAGGATGC CTGGCAACTA CTTTCTTAGT
281 GGTCCCTAAG GTCCAATCGC GGGTTAAGGC ACTAACTAAA CTCATTCTTC AGCCTCCTTC TCTAAGTTCT
351 CCTCGAATTT GGGTGCCAG AAGTAGGCTC ACGTACCTTT TTCTGCGGGA GCACAAATGA GGTCAGATAG
421 CATAAACGAA TAGCTACTTA TGAACACAAT AGCTACTCTG CTATTGCAAG GTATCCACAA CCACCACATC
491 AAACATTAAC ACCTTGCTTT ACTTGGGAAA CAAAAAATAT CATGGTCCCTA TTCAGCAGTT CCCCATACA
561 GGGAGCGTTT GCCCTCCCC CAGTCAACAG GGCTGTTCAT CCCTAGGAAG TGATTTGAGA GTTCTCCAAG
631 GATTTAGGCT TTTACTCCTC CAAAGCTTTC ACAACTTCTA CCTGGCGGGG GTGCGTGGGG GGGTGGGGGC
701 GAACGTAAAA GTTCTTTTGC TGCAAAGAGC CTGGTATAGG CAGAAAACACC GGCGCGCCT GCAGCCCCCT
771 AACCCAGTG CGTCTTTCCC CTTAGAAGT TGGGGAAAGC AAATCCCTAC GCCCAGCCAT CATTTCCACT
841 CTTGCGTTTT CAAAAGATCA AAAACGGAAA GGACCCGCGAG TTGGCAAACC CCAAAGAGGG ACCGCCCATC
911 AGGTGCGCGT CTTGGGATC TCAGCAGCCG ACGACCCCAA TTCAAATCGA TCGTGGGAAA CCCAGGGAA
981 AGAAGGCTCA CTTGCAGAGG GACAGGATTA CAGGGTGCAG GCTGCAGGGA AGTACCGGGG GGAGGGGGCC
1051 TGGTCGGAAG GACTTTCCAG CCACTCGGCG CTCATCAAAA AGTTCCCTGT CCGTGACCCT AGTGGCTCAT
1121 CGCAGGGAGT TTTCTCCGATG AACCCAGCT CAGGGTTTAG GCTTCTTTT CCCCTAGCA GAGGACGAAG
1191 CCAGTTCTCT TTTTCTGGCT TGACTGGCTT GGAAATTCOC CGAGCCTGAC CCCGCCCCAG AGAAATCCCC
1261 AGCCAGCGTT TATAGGGCGC CGCGGGCGG CTGCAGAGCC CACAGCAGTC CGTGCCCGCG TCCCGCCCGC
1331 CAGCGCCCCA GCGAGGAAGC AGCGCGCAGC CCGCGGCCCA GCGCACCCGC AGCAGCGCCC GCAGCTCGTC
1401 CGCGCCATGT TCCAGGCGGC CGAGCGCCCC CAGGAGTGGG CCAATGGAGGG CCCCOCGAC GGCTGAAGA
1471 AGGAGCGGCT ACTGGACGAC CGCCACGACA GCGGCCTGGA CTCATGAAA GACGAGGAGT ACGAGCAGAT
1541 GGTC AAGGAG CTGCAGGAGA TCCGCCTCGA GCCCAGGAG GTGCCGCGCG GCTCGGAGCC CTGGAAGCAG
1611 CAGCTCACCG AGGACGGGGA CTCgtaagtg gcgaggagccc ggggctgggg gtcgtcggga gggcgggacg
1681 cgccgcccct gggggtggga ggcgcggggc ctggagccc agccggggga ccagcgatgc agccgggagg
1751 ggcgcggggc accccggggc tccctgcaccg ccccgaacgc tgcagggctg cagggccgag cggggcaccg
1821 gccaactgc gagggggggc ggcctggggc ttggtgatgg cagacgtcgc cacacgccc ctcccccca
1891 gaccgctcct ctaggccggg ggcggggcgg cagcgggacg cgaagtcccc gggttcataa ggcggggcgg
1961 ggagtttctt gcccgctggc gggcgccgag cagccgggag gggagtaga gggtcgttc agctggcggg
2031 agggcggggc ggtctggccg ggcggccggc gggcccgggg gggagggggg cggaaaagtc ctgggcccct
2101 gccaggaaca actcagctca taataacctc gggaaaacac cgcggcctcg gcctccaga accccggcct
2171 tgcgcaatcc ccccgaccgc ggcctcccct gggcccacg cgggtgcactc accaccctg ggtatcttcc
2241 ctctcttccc cacagGTTCC TGCACTTGGC CATCATCCAT GAAGAAAAGG CACTGACCAT GGAAGTGATC
2311 CGCCAGGTGA AGGGAGACCT GGCTTTCCTC AACTTCCAGA ACAACCTGCA GCAGgtgccc cgttgcctg
2381 gcccgggttc tctctgacc tgggacgtag ctgagttagc agagtcaacc cagatccttt ctgaattcag
2451 ggccactgag cactattoac cctcaacttt tacttcaact cagccacat cctagagagt gaaggaatt
2521 ccaactgatt ggtgaggtct ttatgacca cctgggacct ctgctatttg ccagcctcc ccaccctcc
2591 gtctaggagg agcagcacc aaccaggaga cacgggttga ggggaactcg ggggtggttg ttggtccatg
2661 gcttactttc tctggtctct cttgcaatcg tagACTCCAC TCCACTTGGC TGTGATCACC AACCAGCCAG
2731 AAATGTGTA GGCACTTCTG GGAGCTGGCT GTGACTCTGA GCTCCGAGAC TTTCGAGGAA ATACCCCCAT
2801 ACACCTTGCC TGTGAGCAGG GCTGCCTGGC CAGCGTGGGA GTCTGACTC AGTCCTGAC CACCCCGCAC
2871 CTCCACTCCA TCCTGAAGGC TACCAACTAC AATGgtatgt ctgcctccc gcccctcccc acccctcgg
2941 agggcagggt acgtggagaa ggggcagggt ggccaacta aggagtcag gcaagagctt aaactccaa
3011 catttggaag gttgagaaaa tatgtgtgca aagtgcctat tggatgcct tataaagttc tttcagaacc
3081 cagactgtgg gttcttaaaa ttcagaagat aagactactt gttccataaa agaataagtg aaagagtg
3151 gggttgaaac aggtgttat actttttccc ttttgttctt cctagccaca CGTGTCTACA CTTAGCCTCT
3221 ATCCATGGCT ACCTGGGCAT CGTGGAGCTT TTGGTGTCTT TGGGTGCTGA TGTCAATGCT CAGgttggtc
3291 cttctgccc ccgacgcact gactcaggct cctcgtgct atgttgtag cagaaattcc aatgcagcc
3361 ataagcatc caaattcct ttggtgtag GAGCCCTGTA ATGGCCGAC TGCCCTTAC CTCGAGTGG
3431 AACCTCAAAA TCTGACCTG GTGTCACTCC TGTGAAAGTG TGGGGCTGAT GTCAACAGAG TTACCTACCA
3501 GGGCTATTCT CCCTACCAGC TCACCTGGGG CCGCCCAAGC ACCCGGATAC AGCAGCAGCT GGGCCAGCTG
3571 AACTAGAAA ACCTTCAGAT GCTGCCAGAG AGTGAGGATG AGGAGAGCTA AGACACAGAG TCAGAGTTCA
3641 CGGAGTTCAC AGAGGACGAG gtgagtctgt gaactccttc ggcgtctaa ctaatgaggt g
3711 **caacgctcc** **ggccgctcc** **agctctct** ct tatcagaggg gtaactacat aatgagtctc tcaaatcttct
3781 gtgcataacc agtatcccaa gaatgtacct gccccccc ttttttaat agcttactct ttttttaaag
3851 agaagcatta aaggcaaac cctcagcct gtaaagtcca ttatatttg gctatggaga atggagtcca
3921 agagtatttt ccagtagtgg cctcccac cggtagctt ggcagagctc cgctccgga gcttaacgtg
3991 tcttttttcc cctgttttgc agCTGCCCTA TGATGACTGT GTGTTGGAG GCCAGCGTCT GACGTTATGA
4061 GTGCAAAGGG GCTGAAAGAA CATGGACTTG TATATTGTGA CAAAAAATAA GTTTTATTT TCTAAAAA
4131 GAAAAAGAA GAAAAAATTT AAAGGGTGTA CTTATATCCA CACTGCACAC TGCCCTAGCCC AAAACGTCTT
4201 ATTGTGGTAG GATCAGCCCT CATTTTGTG CTTTGTGAA CTTTGTGAG GGGACGAGAA AGATCATTTGA
4271 AATTCTGAGA AAACCTCTTT TAAACCTCAC CTTTGTGGGG TTTTGGAGA AGGTTATCAA AAATTTCATG
4341 GAAGGACCAC ATTTTATATT TATTGTGCTT CACTGACTC ACCCACTCC TATCCTGTGA CATGTAACAG
4411 CCAGGAGTGT TAAGCGTTCA GTGATGTGGG GTGAAAAGTT ACTACCTGTC AAGGTTTGTG TTACCCTCCT
4481 GTAATGGTG TACATAATGT ATTGTTGGTA ATTATTTTGG TACTTTTATG ATGTATATTT ATTAAGAGA
4551 TTTTACAAA TG

orange: Teilabschnitt I mit gelb unterlegter Primersequenz; rot: überlappende Sequenz aus I und II
blau: Teilabschnitt II mit grau unterlegter Primersequenz; grün: Teilabschnitt III mit grün unterlegter Primersequenz

Großbuchstaben: Exons; Kleinbuchstaben: Introns

Das Reaktionsgemisch für die Primäramplifikation wurde durch Zwischenschichtung von Wachs in zwei Phasen getrennt. Hierbei wurde ein sogenannter Hot-Start erreicht, der verhinderte, daß sich in der ersten Aufwärmphase die Primer unspezifisch an die Ziel-DNA anlagern und die Polymerase mit der Bildung eines neuen DNA-Amplifikates an diesen Stellen beginnt.

In der unteren Phase befanden sich

- 2,5 µl 10x-PCR-Puffer
- 50 ng jedes Primers
- 6,0 µl 25 mM MgCl₂ (entspricht 1,5 mM in der Gesamtprobe)
- 0,8 µl dNTP (10 mM jedes)
- 13,7 µl H₂O

Nach Überschichtung mit Wachs wurde die obere Phase zugegeben, die aus

- 10,0 µl 10x-PCR-Puffer
- 0,4 µl Taq-Polymerase
- 62,2 µl H₂O

bestand.

Es erfolgte die Primäramplifikation mit dem Programm

- 2 min bei 95°C
- 5 Zyklen mit je 40 sec bei 95°C, 60 sec bei 58°C und 120 sec bei 72°C
- 38 Zyklen mit je 40 sec bei 95°C, 60 sec bei 58°C und 60 sec bei 72°C
- 10 min bei 72°C

Für die Reamplifikation wurde aus dem Reaktionsgemisch der Primäramplifikation nach erfolgter Reaktion 1 µl entnommen als Ausgang für die Amplifikation der Teilabschnitte. Diese Amplifikation erfolgte unter den gleichen Pufferbedingungen wie die Primäramplifikation nach folgendem Programm

- 2 min bei 95°C
- 40 Zyklen mit je 20 sec bei 95°C, 40 sec bei 58°C und 60 sec bei 72°C
- 10 min bei 72°C

Auch hier wurde die Quantität der Amplifikate abgeschätzt nach Elektrophorese eines 6 μ l Aliquots in ethidiumbromidhaltigem Agarosegel.

Die Isolierung und Sequenzierung der Amplifikate erfolgte entsprechend der oben für die RT-PCR-Produkte beschriebenen Methode.

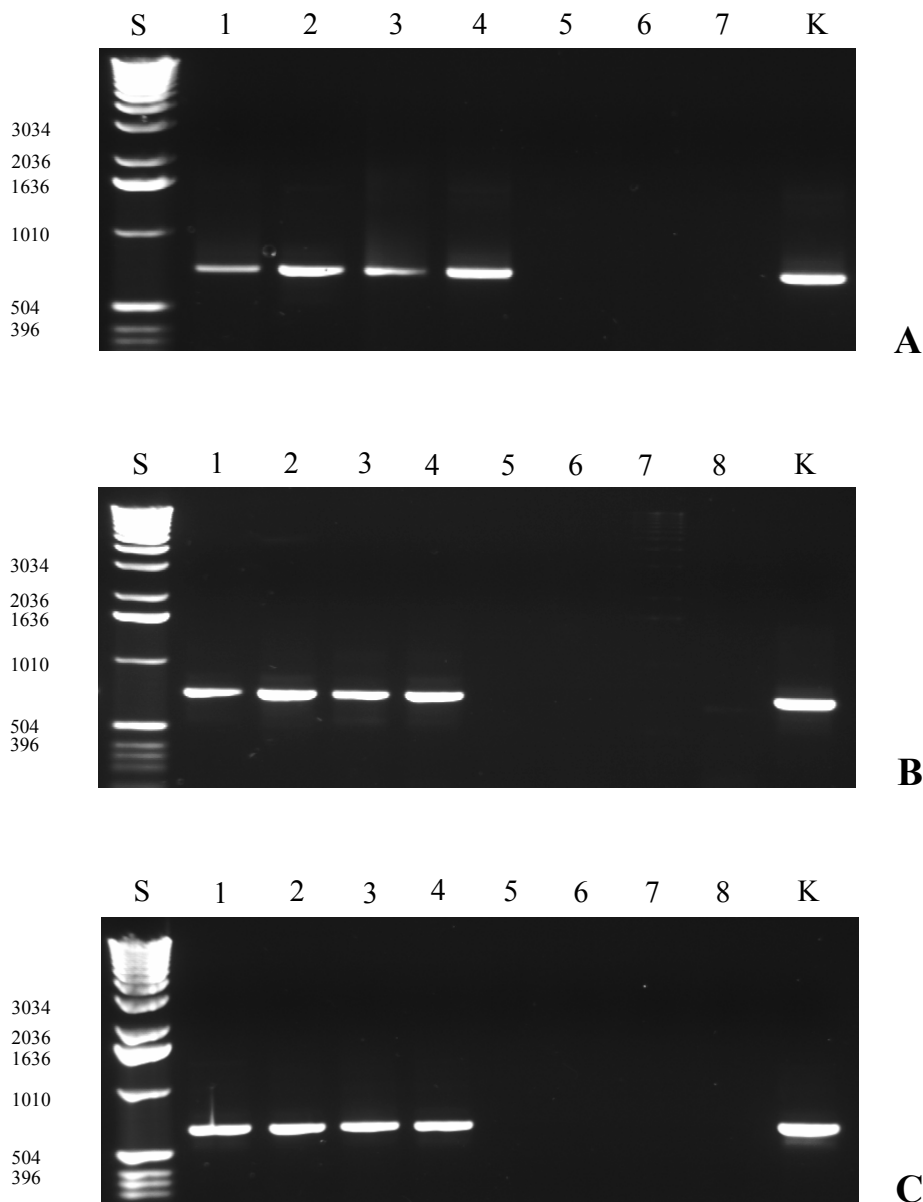


Abb.7: Gelelektrophorese der Reamplifikationsprodukte aus der IkappaB α -Einzelzell-PCR

Banden 1-4: Amplifikate aus jeweils einer isolierten Zelle

Banden 5-8: Pufferproben zur Reinheitskontrolle

K: Positivkontrolle mit bekannter Zelllinien-DNA

A, B und C entsprechen je den Amplifikationen mit den Primerpaaren I, II und III