

7. Methoden

7.1. Zellkultur

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bei der American Type Culture Collection erworben. Die Kulturbedingungen entsprachen den Empfehlungen der American Type Culture Collection. Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Zelllinien in 90% (v/v) RPMI 1640, 10% (v/v) fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei einer Zelldichte zwischen 5×10^5 und 1×10^6 Zellen/ml kultiviert. Die Zugabe von frischem Medium oder ein Mediumwechsel erfolgte bei allen verwendeten Zelllinien dreimal pro Woche.

7.1.1. Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf menschliche Zelllinien verwendet: Raji, Jurkat, U937, Namalwa und K562. (<http://www.atcc.org/>)

Zelllinie	Ursprung	Morphologie	ATCC-Nr.
Raji	Burkitt Lymphom; B Lymphocyt	Lymphoblast	CCL-86
Jurkat	Akute T-Zell Leukämie; T-Lymphocyt	Lymphoblast	TIB-152
U937	Histiocytisches Lymphom; Macrophagen, Histiocyten	Monocyte	CRL-1593.2
Namalwa	Burkitt Lymphom; B-Lymphocyt	Lymphoblastoid	CRL-1432
K562	Chronische myeloische Leukämie; Knochenmark	Lymphoblast	CCL-243

7.1.2. Stimulierung von Kulturzellen

Die Stimulierung der Zellen mit INF- γ erfolgte durch Zugabe von 250U INF- γ /ml zum Kulturmedium. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Zellen 16 Stunden mit INF- γ inkubiert und im Anschluß zweimal mit 1xPBS gewaschen. Die Behandlung der Zellen mit Cycloheximid (CHX) erfolgte durch Zugabe von 50 µg/ml CHX zum Kulturmedium. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Zellen wie oben behandelt. Wurden die Kulturzellen mit Cycloheximid und INF- γ behandelt, erfolgte die Zugabe von Cycloheximid 30 min vor der Zugabe von INF- γ .

7.1.3. FACS-Analysen

Die FACS-Analysen wurden mit einem Becton Dickinson FACS-Calibur™ durchgeführt. Zur Ermittlung des Anteils an toten Zellen in der Gesamtpopulation wurden die in 1ml PBS resuspendierten Zellen mit 50 µl 100 µg/µl Propidiumiodid gemischt. Zur Erstellung eines

Nullwertes wurden unbehandelte Zellen mit Propidiumiodid angefärbt und im FACS gemessen. Sämtliche Einstellungen für eine bestimmte Zelllinie wurden so erstellt und gegebenenfalls vor jeder Messung mit „Nullwertzellen“ wiederholt. Zur Messung der Transfektionseffizienz wurden Zellen mit eGFP-Expimierenden Plasmiden transfiziert und der Anteil an grün fluoreszierenden Zellen bestimmt.

7.1.4. Zählen von Zellen

Die Zellkonzentration wurde mit Hilfe eines Coulter™-Counters bestimmt. Die am Gerät einzustellenden Parameter sind der Verdünnungsfaktor und die Partikelgröße, ab der das Gerät mißt. 75 µl der Zellsuspension wurden dem Kulturgefäß entnommen, mit 7,5 ml isotoner Kochsalzlösung verdünnt (Verdünnungsfaktor 100) und gezählt. Der Größenparameter betrug für Raji- und Jurkat Zellen 10 µm, für Namalwa- und U937 Zellen 9µm und für K562-Zellen 13µm.

7.1.5. Ernten von Zellen

Behandelte Zellen wurden im Coultercounter gezählt, bei 400xg in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert und anschließend zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Zur FACS-Analyse wurden mindestens 2×10^5 Zellen in 1ml PBS-Puffer aufgenommen und mit 50 µl 100µg/ml Propidiumiodid versetzt. Zur Isolierung von RNA, DNA und Gesamtprotein wurden die Zellen nicht in Puffer aufgenommen, sondern entweder als Pellet bei -70°C eingefroren oder direkt lysiert.

7.2. Transfektion von Zellen

7.2.1. Elektroporation von Kulturzellen

Die Elektroporationsparameter für die einzelnen Zelllinien wurden vor jedem größeren Versuchsansatz experimentell ermittelt. Für eine Elektroporation wurden 2×10^7 Zellen in 1 ml kaltem Kulturmedium aufgenommen und mit 20 -30 µg Plasmid-DNA gemischt. 500 µm der Zellsuspension wurden in eine vorgekühlte 4mm Elektroporationsküvette überführt. Raji Zellen wurden im allgemeinen bei 210, 900µF, Jurkat Zellen bei 220V, 1010 µF, U937 Zellen bei 210V, 900µF, Namalwa Zellen bei 250V, 800µF und K562 Zellen bei 300 V und 1050 µF elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 10ml vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und in 10cm-Petrischalen ausgesät.

7.2.2. Elektroporation von elektrokompentenen E.coli Zellen

40 µl elektrokompentente E.coli Zellen wurden mit 2 µl DNA Lösung auf Eis gemischt. Die DNA Lösung bestand entweder aus einem gesamten Ligationsansatz (siehe Abschnitt 7.6.5.) oder 0.01 – 10 ng Plasmidvektor. Die mit DNA vermischten, elektrokompentenen Bakterien

wurden in eine 2 mm Elektroporationsküvette überführt und bei 250 V, 25 μ F und 1kOhm elektroporiert. Die elektroporierten Zellen wurden in 750 μ l auf 37°C vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C und 240 rpm im Luftschüttler inkubiert.

7.3. Isolierung von Nukleinsäuren

7.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Die Isolierung von Plasmid DNA wurde, je nach Kulturvolumen und DNA-Bedarf, mit von der Firma QIAGEN angebotenen Plasmid Maxi-, Midi- oder MiniKits gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Alle oben genannten Plasmidisolierungskits basieren auf der 'alkaline lysis' Methode [167].

Maxi- und Midipräparation: <http://www.qiagen.com/literature/plkkit.html>

Minipräparation: <http://www.qiagen.com/literature/plkmilit.html>

7.3.2. Isolierung von Phagen-DNA

Phagen DNA wurde nach einer modifizierten Plattenlysat/PEG-Fällungs- Methode [168] durchgeführt. Dazu wurde das von der Firma Qiagen angebotene Lambda Kit verwendet. Alternativ wurden die Phagenpartikel mit Antikörpern gegen Phagenhüllproteine präzipitiert. Die Weiterbearbeitung des Phagenpellets erfolgte nach Herstellerangaben.

(<http://www.qiagen.com/literature/phagelit.html>)

7.3.3. Isolierung von genomischer DNA aus Kulturzellen

Genomische DNA wurde nach einer modifizierten Methode von Miller et al. [169] mit einem Kit von Stratagene aus Kulturzellen isoliert. Die Isolierung der genomischen DNA basiert bei dieser Methode auf der Lysis der Zellen mit SDS, einem proteolytischen Abbau der im Zellysat enthaltenen, durch das SDS denaturierten Proteine und einer anschließenden Fällung der Proteolyseprodukte und des SDS durch hohe NaCl-Konzentrationen. Die genomische DNA liegt im Überstand SDS- und proteinfrei vor und kann durch Ethanol fällung isoliert werden. Die im Herstellerprotokoll angegebenen Puffervolumina erwiesen sich für 1×10^8 Zellen als zu gering, so daß die Trennung von Proteinen und DNA nicht möglich war. Das Protokoll wurde wie folgt geändert: Sämtliche vom Hersteller angegebenen Puffervolumina, Enzymmengen und Inkubationszeiten wurden verdoppelt. Statt bei 2000xg wurde bei 2800xg zentrifugiert und die Überstände wurden durch Gaze gefiltert. Die DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen, und ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte in TE-Puffer bei 4°C.

(http://www.stratagene.com/manuals/_components/200600.pdf)

7.3.4. Isolierung von gesamt-RNA aus Kulturzellen

Die Isolierung von gesamt-RNA aus Suspensionszellen wurde nach einer stark modifizierten Guanidiniumisothiocyanat [170] Methode mit einem von der Firma Qiagen angebotenen RNeasy™ RNA-Isolierungskit durchgeführt. Die Isolierung der RNA basiert bei diesem System auf der Bindung an eine Silicamatrix unter hohen Salzkonzentrationen und eine Elution unter niedrigen Salzkonzentrationen. Zum Teil wurde die isolierte gesamt-RNA nach der ersten photometrischen Konzentrationsbestimmung noch einmal mit Ethanol gefällt, da die RNA Konzentration zu niedrig war. Ein großer Vorteil der RNeasy™-Methode liegt gegenüber den auf Phenolextraktion basierenden 'single-step'-Methoden [170] darin, daß durch das im Lysispuffer enthaltene β -Mercaptoethanol vor allem auch in den Zellkompartimenten enthaltene RNasen sofort vollständig denaturiert werden. Das erwies sich vor allem bei der RNA-Isolierung aus der Monozyten/Macrophagenzelllinie U937 von Vorteil, da die RNA bei der Isolierung mit den 'single-step'-Methoden meist vollständig degradiert war.

(<http://www.qiagen.com/literature/rnalit.html>)

7.3.5. Isolierung von polyA⁺-mRNA

Die Isolierung von polyA⁺-mRNA erfolgte durch Hybridisierung von gesamt-RNA mit immobilisiertem Poly(dT)₃₀. Dazu wurden die von der Firma Qiagen angebotenen OligoTex™ Partikel verwendet, die aus Latexkugeln bestehen, an die Oligo (dT)₃₀ gebunden ist. Für die Isolierung von polyA⁺-mRNA wurden 0.8 - 1.4 mg gesamt-RNA eingesetzt und die vom Hersteller empfohlene Menge OligoTex™ Partikel verdoppelt. Der gesamte Vorgang wurde mit den am Anfang eingesetzten OligoTex™ Partikeln dreimal wiederholt.

(<http://www.qiagen.com/literature/rnalit.html>)

7.3.6. Isolierung von Kern-RNA und cytosolischer RNA

Zur Isolierung von Kern- bzw. cytosolischer RNA wurden 10^7 - 10^8 Zellen in Puffer RLN (siehe Abschnitt 5.7.4.) aufgenommen, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C mit 300xg für 15 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt unter anderem die cytosolische RNA, während das Pellet die Kerne und Zelltrümmer enthielt. Die Präparation der Kern- bzw. cytosolischen RNA erfolgte wie in Abschnitt 6.3.4. beschrieben. Im Fall der Monozyten/Macrophagenzelllinie U937 ist nicht möglich intakte Kern-RNA bzw. cytoplasmatische RNA zu isolieren, da bei der Lysis nicht ausschließlich die Zellmembran permeabilisiert wird, sondern auch Zellorganellen, die z.T. RNasen enthalten, die durch das Fehlen von β -Mercaptoethanol im Puffer RLN nicht denaturiert werden.

(<http://www.qiagen.com/literature/rnalit.html>)

7.4. Isolierung von Protein

7.4.1. Isolierung von Gesamtprotein aus Kulturzellen

Zur Isolierung von Gesamtprotein wurden 1×10^7 Zellen in 2x Lämmli-Puffer (siehe Puffer und Lösungen) aufgenommen. Das Lysat wurde anschließend mit Hilfe einer QIASHredder™-Säule homogenisiert, anschließend aliquotiert und bei -70°C gelagert.

(siehe <http://www.qiagen.com>)

7.4.2. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde die Micro-BCA-Methode (Pierce) angewendet, die eine Erweiterung der Biuret-Methode mit dem Reagenz Bicinchoninsäure (BCA) [171] darstellt. Das lösliche Reaktionsprodukt besitzt eine starke Absorption bei 562 nm. Die Proteinbezugs-kurve wird mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt. Die photometrische Messung bei 562 nm wurde mit einem ELISA-Lesegerät durchgeführt.

(<http://www.piercenet.com/Lib/SrchDoc.cfm?libNum=10>)

7.5. Reporterassays

7.5.1. Luciferase Assay

Die Durchführung der Luciferase-Assays erfolgte gemäß Herstellerangaben. Zellen wurden 16 Stunden nach der Transfektion mit Plasmiden, die das „Firefly“Luciferase- oder das „Renilla“Luciferasegen trugen, in 1x „Passive Lysis Buffer“ der Firma Promega mit Hilfe von QIASHredder™ Säulen der Firma Qiagen lysiert. Bei den meisten im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten wurde zusätzlich zu den Luciferasevektoren Plasmide kotransfiziert, die das eGFP-Gen unter Kontrolle des CMV-Promoters trugen. Das Volumen des eingesetzten Lysispuffers richtete sich nach der Anzahl der Zellen, die die Transfektion überlebt hatten und der im FACS ermittelten Transfektionsrate, die durch die Anzahl der eGFP exprimierenden Zellen festgelegt wurde. Mit Hilfe des Dual-Luciferase Assays der Firma Promega konnte die Aktivität der beiden Luciferasenzyme, die eine unterschiedliche Substratspezifität haben, bestimmt werden.

(<http://www.promega.com/tbs/tm040/tm040.html>)

7.5.2. GFP-Messung

Die Menge an GFP, die in mit GFP exprimierenden Plasmiden transfizierten Zellen synthetisiert wurde, wurde durch Western-Blot mit einem α -GFP Antikörper, durch Messung der relativen GFP-Fluoreszenz in Zellysaten oder FACS-Analyse von eGFP transfizierten Zellen ermittelt.

(<http://www.clontech.com/clontech/Manuals/PDF/PT2040-4.pdf>)

7.6. Enzymatische Reaktionen

7.6.1. Restriktionsverdau

Die Restriktion von Plasmid-DNA oder λ -DNA wurde, wenn nicht anders beschrieben, für 1h – 2h nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Restriktion von 50 - 150 μ g genomischer DNA wurde im allgemeinen in einem Volumen von 500 μ l durchgeführt. Die Pufferbedingungen entsprachen den Herstellerangaben. Die eingesetzte Enzymmenge richtete sich nach der statistischen Häufigkeit des Auftretens der Erkennungssequenz des jeweiligen Enzyms im menschlichen Genom. Aufgrund des großen Volumens wurden die Reaktionsgefäße in einem Hybridisierungssofen befestigt. Die Reaktion erfolgte Ü.N. bei 37°C. Nach 16 h (am nächsten Morgen) wurden dem Restriktionsansatz weitere 200 Enzymeinheiten zugegeben. Nach einer Inkubation von 1h bei 37° wurde die Reaktion durch eine Extraktion mit Phenol und Chloroform und anschließender Ethanolfällung gestoppt.

Die Restriktion von kurzen DNA-Fragmenten und PCR-Produkten erfolgte Ü.N. bei 37°C mit der höchstmöglichen Konzentration an Restriktionsenzym. Bei dieser Variation des Restriktionsverdau mußte vor allem darauf geachtet werden, daß das Reaktionsvolumen nicht größer als 100 μ l war, da sonst die DNA-Verluste beim Aufreinigen nach dem Verdau nicht mehr akzeptierbar gewesen wären.

7.6.2. Verdau einzelsträngiger RNA (RNase Protection Assay)

Zum Verdau einzelsträngiger RNA wurde der Hybridisierungsansatz (siehe Hybridisierung von RNA in Lösung) auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurden 350 μ l RNase Reaktionspuffer, 3,5 μ g RNase A und 25 Einheiten RNase T1 zugefügt, sorgfältig gemischt und der Ansatz für 30 min bei 30°C inkubiert. Im Anschluß an diese Inkubation wurde der Ansatz mit 10 μ l 20%iger SDS-Lösung und 50 μ g Proteinase K gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß an den Proteinase K Verdau wurde der Ansatz einmal mit 400 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Dem Ansatz wurden 5 μ g Hefe-tRNA und 1 ml eiskaltes Ethanol p.A. zugegeben, für 30 min bei –20°C inkubiert und anschließend für 15 min bei 16.000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in RNA-Ladepuffer (PAGE) resuspendiert und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe Abschnitt 7.8.3.).

(http://biochem.boehringer-mannheim.com/prod_inf/manuals)

7.6.3. Sequenzierung

Plasmid-DNA wurde mit einem 'cycle-sequencing'-Kit der Firma Amersham sequenziert. Beim 'cycle-sequencing', das auf der Kettenabbruchmethode [219] basiert, wird ein markierter Sequenzierprimer in mehreren Denaturierungs -und Syntheszyklen durch eine hitzestabile

DNA Polymerase (Thermosequenase™) verlängert. Die Reaktionsprodukte wurden im Anschluß an die Reaktion mit 1/10 Volumen Gelauftragungspuffer versetzt, für 5 min bei 94°C denaturiert, 10 min bis 20 min auf Eis abgekühlt und anschließend direkt auf ein Sequenziergel aufgetragen. Die Gelelektrophorese und die Detektion der markierten Syntheseprodukte erfolgte auf einem automatischen LiCor 4000L DNA-Sequencer.

(<http://www.usbweb.com/Product%20Information/Sequencing/thermokit78500.htm>)

7.6.4. Synthese von c-DNA

Etwa 10 µg Gesamt-RNA oder 1 - 2 µg polyA⁺-RNA wurden für einen 50 µl Reaktionsansatz mit 5 µl 2 µM pdN₆-Primer versetzt (finale Konzentration im Ansatz: 200nM) und mit nukleasefreiem H₂O auf ein Volumen von 14.5 µl gebracht, für 10 min bei 72°C denaturiert, anschließend auf Eis abgekühlt und mit 10 µl 5fach Puffer (0.25 M Tris (pH 8.3), 0.375 M KCl, 15 mM MgCl₂), 5 µl 0.1 M DTT, 20 µl dNTP-Mix (je 2.5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 2 µl Superscript II™ reverse Transkriptase (200 U/µl) gemischt. Die Reaktion wurde zunächst für 10 min bei RT, dann für 25 min bei 37°C und anschließend für 35 min bei 42°C durchgeführt und durch Erhitzen auf 94°C für 10 min gestoppt. Sollte die cDNA, die aus gesamt-RNA synthetisiert worden war, in eine PCR eingesetzt werden, wurde im Anschluß an die reverse Transkription der Reaktionsansatz mit 5 Einheiten RNaseH und mit 10 Einheiten RNaseOne™ versehen und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 94°C für 5 min gestoppt. Die fertige cDNA wurde bei -70°C aufbewahrt.

7.6.5. Ligation

Die Ligation von PCR-Produkten in den Vektor pCR-II und pCR-II.1 des TA-Cloning™ Kits der Firma Invitrogen erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden für jeden Ansatz 50 ng Plasmid eingesetzt und die Menge an PCR-Produkt, die einem dreifachen molaren Überschuß gegenüber dem eingesetzten Vektor entsprach.

Die Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Plasmidvektoren erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Zur Ligation von Fragmenten mit glatten Enden wurden mindestens 30 fmol Vektor und 90 fmol Insert mit 2 Einheiten T4-DNA Ligase für mindestens 14 h bei 12° - 14°C. Zur Ligation von Fragmenten mit kohäsiven Enden wurden 15 fmol Vektor und 45 fmol Insert eingesetzt und mit 1 Einheit T4-DNA Ligase für mindestens 1h - 12h bei RT inkubiert. Um die Ligationsreaktion zu stoppen, wurde der Reaktionsansatz mit 30 µl 1fach TE-Puffer gemischt und anschließend mit 50 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Im Anschluß an die der Phenolextraktion folgenden Ethanolpräzipitation wurde die gefällte DNA in 2 µl H₂O aufgenommen und direkt zur Elektroporation von E.coli eingesetzt.

(<http://www.invitrogen.com>)

7.6.6. Konstruktion von Haarnadelstrukturen

Zur Konstruktion von Haarnadelstrukturen wurde durch präparative PCR aus dem Plasmidvektor pBluescript SKII mit den Oligonukleotidprimern T3tele und T7strat die multiple Klonierungsstelle amplifiziert. Das DNA-Fragment, in der Folge SKII-MCS genannt, wurde mit der Restriktionsendonuklease BglII, XhoI oder XbaI über Nacht bei 37 °C verdaut. Die durch den Restriktionsverdau entstandenen DNA Fragmente wurden auf einem 4%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das größte Fragment wurde mit Hilfe des QIAQUIEK™-Gelextraktionskits aus dem Agarosegel isoliert. Hier erfolgte die Konzentrationsbestimmung des Restriktionsfragments durch eine weitere Agarosegelelektrophorese. Die SKII-MCS-Restriktionsfragmente wurden mit 1/5 Vol 5-fach Ligationspuffer und 10 Einheiten T4 DNA-Ligase in einem Volumen von 100 µl zunächst 2h bei RT und dann 16 h bei 14 °C ligiert. Die Vollständigkeit der Ligationsreaktion wurde durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Es war nicht möglich, die Ligationsprodukte durch Agarosegelelektrophorese mit Hilfe des QIAQUIEK-Gelextraktionskits zu reinigen. Bei dieser Methode der Gelreinigung wird das ausgeschnittene Gelstück in einem Puffer, der 7 –8 mol/l Guanidiniumhydrochlorid enthält, bei 50 °C gelöst. Dabei wird auch die DNA partiell denaturiert und die durch die Kopf an Kopf Ligation der Restriktionsfragmente SKII-MCS entstandene palindromische Sequenz bildet eine Haarnadelstruktur, die nicht mehr in einen Plasmidvektor ligiert werden kann.

7.6.7. *In vitro* Transkription

Zur Synthese von RNA mit einer 5'-Cap Struktur wurde das CAP-Scribe™ Kit verwendet. Die Durchführung der Reaktionen erfolgte nach Herstellerangaben mit 500 ng linearisierter Plasmid-DNA als Matritze, die im Anschluß an die Transkriptionsreaktion durch Inkubation mit 1 Einheit RQ1™ RNase freier DNase für 15 min bei 37°C verdaut wurde.

Zur Synthese von RNA ohne 5'-Cap Struktur wurde das RiboMax™ Kit verwendet. Die Durchführung der Reaktionen erfolgte nach Herstellerangaben mit 1 µg linearisierter Plasmid-DNA als Matritze. Im Anschluß an den DNase-Verdau wurde die synthetisierte RNA mit Hilfe des RNeasy-Mini Kits (siehe Abschnitt 7.3.4.) gereinigt und ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei –70°C.

RiboMax™-Kit: <http://www.promega.com/tbs/tb166/tb166.pdf>

CapScribe™-Kit: http://biochem.boehringer-mannheim.com/prod_inf/manuals

7.6.8. *In vitro* Translation

Zur Synthese von Proteinen wurde „Rabbit Reticulocyte Lysate Nuclease treated“ Kit der Firma Promega eingesetzt. Die Durchführung der Reaktionen erfolgte in einem Volumen von

30 μ l nach Herstellerangaben in 50%- oder 70% Kaninchenretikulozytenlysat mit 600 ng RNA als Matritze. (<http://www.promega.com/tbs/tm232/tm232.html>)

7.6.9. Synthese [32 P] markierter DNA durch „random priming“

DNA-Fragmente, die radioaktiv markiert werden sollten, wurden entweder durch Restriktion aus einem Plasmid, anschließender Agarosegelelektrophorese und Isolierung des zu markierenden Fragments aus dem Gel mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits oder durch PCR und anschließende Reinigung des Produktes mit dem QIAquick PCR Purification Kit hergestellt. Die radioaktive Markierung des Fragments erfolgte durch 'random priming' [172, 173] mit dem Random Primer Extension Kit von NEN. 25 -50 ng des DNA-Fragments wurden in einem Volumen von 12 μ l im Heizblock für 5 min bei 96°C denaturiert. Auf Eis wurden anschließend 6 μ l 5fach Puffer (Tris (pH 7.6), MgCl₂, BSA, 2-Mercaptoethanol, pdN8-primer), 6 μ l 5fach dNTP-Mix (je 100 μ M dATP, dGTP, dTTP), 5 μ l α [32 P]-dCTP (6000 Ci/mmol) und 1 μ l Klenow-Fragment (6 U/ μ l) zugegeben. Die Reaktion wurde bei RT für 2 - 6 h durchgeführt und durch Abtrennen der nicht eingebauten Nukleotide über Sephadex G-50 Microspin Säulen (Probequant™) gestoppt.

Die radioaktiv markierte Sonde lag in einem Volumen von 30 μ l vor. 1 μ l des Eluats wurde zur Bestimmung der spezifischen Aktivität abgenommen, der Rest sofort im Heizblock für 5 min bei 96°C denaturiert, 10 min auf Eis inkubiert und für eine Hybridisierung verwendet.

7.6.10. Synthese [32 P] markierter RNA durch in vitro Transkription

Zur Synthese radioaktiv markierter RNA-Sonden wurde das T7/SP6 Riboprobe® in vitro Transkriptionssystem verwendet. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben in einem Volumen von 20 μ l mit 1 μ g linearisiertem Plasmid als Matritze und 5 μ l α [32 P]rUTP (800Ci/mmol) zum Markieren durchgeführt. Die Reaktion wurde durch DNase Verdau (siehe Abschnitt 6.6.7.), anschließende Zugabe Phenol-Chloroform Extraktion gestoppt. An Stelle einer Ethanolfällung wurde die radioaktiv markierte RNA durch Gelfiltration (Probequant™, siehe Abschnitt 6.6.9.) von den nicht eingebauten Nukleotiden und Phenolresten abgetrennt. 1 μ l des Gesamtansatzes wurde zur Bestimmung der Aktivität der Sonde abgenommen, der Rest wurde sofort in eine Hybridisierung eingesetzt.

(<http://www.promega.com/tbs/tm016/tm016.html>)

7.7. PCR

7.7.1. Analytische PCR

Ein Reaktionsansatz für eine analytische PCR enthielt 1/10 Volumen 10fach Reaktionspuffer, 1 – 5 Einheiten hitzestabile DNA-Polymerase, 1.5 – 3.0 Mal/1 MgCl₂, 200 μmol/l jedes dNTP, 500 nmol/l rechten, bzw. linken Oligonukleotidprimer und zwischen 1 und 5 μl cDNA, Plasmid-DNA, λ-DNA oder genomische DNA als Matrize, wobei gerade bei Plasmid-DNA und λ-DNA darauf geachtet wurde, daß die Matrizenkonzentration 1 – 100 attomol/Ansatz nicht überschritt, da eine zu hohe Matrizenkonzentration die PCR Reaktion inhibieren kann.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

3 min 95°C Denaturierung

1 min xx°C Annealing

1 min 72°C Extension

1 min 94°C Denaturierung;

1 min xx°C Annealing

8 min 72°C Extension

4°C

25 – 35 Wiederholungen des Reaktionszyklus



Die Annealingtemperatur wurde mit Hilfe des Softwarepaketes MacMolly™ Analyse und des Programms RightPrimer™ durch Berechnung der Schmelztemperatur der Oligonukleotidprimer bestimmt und anschließend experimentell ermittelt. Die Extensionszeiten richteten sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Im allgemeinen wurde für Reaktionen, in denen die PCR mit Taq-DNA-Polymerase durchgeführt wurde, für 1000 bp eine Extensionszeit von 1 min gewählt. Für ein 6kb langes Fragment wurde demnach eine Extensionszeit von mindestens 6 min gewählt. Für Amplifikationen von Plasmid-DNA wurde eine hitzestabile DNA-Polymerase mit „proofreading“-Aktivität, wie z.B. Vent®, Deep Vent®, pfu oder KlenTaq®-Polymerasemix eingesetzt. Hier betrug die Extensionszeit für 1000bp 1 min 20 sec.

Die für die einzelnen Primerpaare ideale MgCl₂ Konzentration wurde experimentell ermittelt. In den meisten hier durchgeführten PCRs wurden Primerpaare verwendet, deren MgCl₂-Optimum bei 1.5 mmol/l lag. Die Reaktionen wurden ohne Übersichtung mit Öl in einem Gerät mit Heizdeckel durchgeführt.

7.7.2. Präparative PCR

Die PCR wurde zur präparativen Synthese von kurzen DNA-Fragmenten aus der multiplen Klonierungsstelle des Plasmidvektors pBluescript SKII, zur Amplifikation bestimmter Abschnitte von Plasmiden und der inversen Amplifikation von Plasmidvektoren eingesetzt.

Zur Präparativen Synthese von DNA-Fragmenten wurde eine Meistermischung angesetzt, die sämtliche Reaktionskomponenten einer PCR enthielt. Die Konzentration der einzelnen Reaktionskomponenten entsprach hier der Konzentration der Reaktionskomponenten einer analytischen PCR (siehe Abschnitt 7.7.1.) Die Meistermischung wurde in 20 – 60 Ansätze à 50 µl aufgeteilt. Diese Ansätze wurden nach der PCR vereinigt und mit Hilfe des QIA-QUIEK™ PCR-Reinigungskits der Firma Qiagen von Taq-Polymerase, Oligonukleotidprimern und nichteingebauten dNTPs und Pufferbestandteilen gereinigt. Die Konzentration der so gewonnenen DNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

7.8. Elektrophorese

7.8.1. Agarosegelelektrophorese von DNA

DNA wurde in horizontalen Agarosegelen in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufzutragenden Proben wurden mit 1/5 Volumen DNA-Ladepuffer (s. Abschnitt 6.7.1.) gemischt. Die Agarosekonzentration in den Gelen und die Art der zur Gelherstellung verwendeten Agarose hing von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente ab.

Zur Auftrennung von genomischer DNA wurden Gele aus 0.75%iger Agarose MP® (siehe Material) verwendet, die sich durch eine sehr hohe Gelstärke (1%iges Gel=>2000g/cm³) auszeichnet. Die Elektrophorese dieser Gele wurden mit 2V/cm bei 4°C Ü.N. unter Pufferumwälzung durchgeführt.

Zur Auftrennung von Plasmid-DNA verschiedener Größe wurden Gele aus 1 – 2%iger Agarose mit mittlerer Gelstärke (1%iges Gel=>500 g/cm³) verwendet. Die Elektrophorese dieser Gele erfolgte bei RT mit 6–10V/cm.

Die elektrophoretische Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten erfolgte auf 3-6%igen Gelen aus Nusieve-GTG™®-Agarose, einer Agarose, die einen sehr niedrigen Schmelzpunkt und eine sehr geringe Gelstärke hat. Die Elektrophorese dieser Gele wurde mit 3-8V/cm bei RT durchgeführt. Die Spannungsangabe pro Zentimeter bei den Elektrophoresebedingungen bezieht sich auf die Länge des verwendeten Gels.

Die verwendeten Agarosegele enthielten 1.25 µg/ml Ethidiumbromid, um die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente im Gel bei 306 oder 264 nm detektieren und fotografieren zu können.

7.8.2. Agarosegelelektrophorese von RNA

RNA wurde in horizontalen, 1 %igen Agarosegelen in MOPS-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden 2 Volumen RNA-Lösung mit 3 Volumen Denaturierungsmix versetzt, für 10 min bei 72°C inkubiert und nach 10 min Inkubation auf Eis mit 1/5 Volumen RNA-Ladepuffer gemischt. Die für die Elektrophorese von RNA verwendeten Gele wurden aus Agarose MP (siehe 7.8.1. und 6.7.1.), die 0.41 mol/l Formaldehyd und 1.25

$\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid enthielt, hergestellt. Die Elektrophorese dieser Gele wurde mit $4\text{V}/\text{cm}$ bei 4°C unter ständiger Pufferumwälzung für mindestens 4h durchgeführt.

7.8.3. Polyacrylamidgelelektrophorese von RNA

Radioaktiv markierte RNA-Fragmente wurden auf einem 6%igen Polyacrylamidgel Acrylamid:Bisacrylamid = 19:1), das 7M Harnstoff enthielt elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel auf einem Geltrockner Ü.N. getrocknet. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte mit Hilfe eines PhosphorImagersTM 445SI durch Exposition eines 'storage phosphor screens' bei RT (siehe Autoradiographie).

7.8.4. Polyacrylamidgelelektrophorese von DNA (Sequenziergel)

Die Elektrophorese von Sequenzreaktionen erfolgte auf einem LiCor 4000L Sequenziergerät. Je nach gewünschter Leseweite und Gellänge wurden, gemäß Herstellerangaben, 4 – 8%ige Sequagel XLTM Fertiggele verwendet.

7.8.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

Proteinlysate (siehe Abschnitt 6.4.1.) wurden mit 1/5 Vol. reduzierendem Probenpuffer (siehe Abschnitt 2.7.) gemischt, 10 min bei 65°C denaturiert und anschließend bis zur Elektrophorese auf Eis gelagert. Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidelektrophorese nach Laemmli [176] wurde hier ausschließlich unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die Trenngele, die zur Analyse von Proteinen einer Größe von 27 kD – 50 kD verwendet wurden, hatten eine Polyacrylamidkonzentration von 12,5% - 15% (siehe Tabelle). Die Konzentration des Sammelgels betrug 6%. Die Elektrophorese wurde bei 80V durchgeführt, bis das Bromphenolblau die untere Gelkante erreicht hatte.

Lösung	Trenngel				Sammelgel	
	7,5%	10%	12,5%	15%	3%	6%
Sol A (ml)	4,8	6,3	7,85	9,4	1,25	2,5
Sol B (ml)	3,75	3,75	3,75	3,75	-----	-----
Sol D (ml)	-----	-----	-----	-----	2,5	2,5
H ₂ O (ml)	6,3	4,8	3,25	0,75	6,15	4,9
Sol C (μl)	150	150	150	150	100	100
10% APS (μl)	50	50	50	50	50	50
TEMED (μl)	25	25	25	25	30	30

7.9. Transfermethoden

7.9.1. Southernblot

Der Transfer von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte nach dem Protokoll für den alkalischen Downward Blot [174] in einem Turboblotter™ der Firma Schleicher&Schuell. Es handelt sich hier, wie beim klassischen Southernblot [175], ebenfalls um einen Kapillartransfer, aber mit umgekehrter Transferrichtung und einem alkalischen Transferpuffer. Das Agarosegel wurde nach der Elektrophorese zweimal für 30 min in Denaturierungspuffer (3M NaCl, 0.4 M NaOH) und anschließend für 15 min in Transferpuffer (3M NaCl, 8mM NaOH) unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Nylonmembran wurde vor dem Zusammensetzen der Blotapparatur für mindestens 15 min in destilliertem Wasser inkubiert. Der Zusammenbau der Blotapparatur und der anschließende Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran erfolgte gemäß Herstellerangaben. Beim Transfer von großen DNA-Fragmenten, zum Beispiel Restriktionsfragmenten genomischer DNA, erfolgte der Transfer über Nacht. Bei kleineren DNA-Fragmenten wie PCR-Produkten oder Restriktionsfragmenten aus Plasmiden wurde der Transfer für 2 – 4 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde die Nylonmembran in Neutralisierungspuffer (0.2M Phosphatpuffer, pH 6.8) für 5 min bei RT inkubiert. Zur Immobilisierung der DNA wurde die Membran mit 120 mJ/cm² UV der Wellenlänge 256 nm bestrahlt.

(<http://www.s-und-s.de/Pages-NEU-eng/UB3/Life%20Science/Lab%20Manual/Labstart.html>)

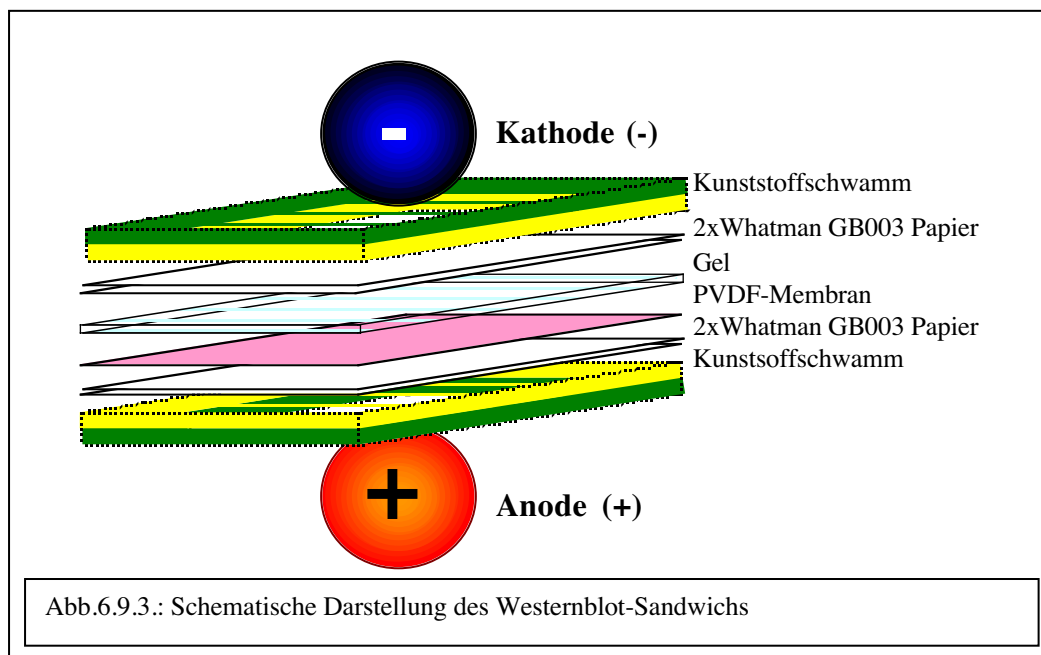
7.9.2. Northern Blot

Der Transfer von RNA aus Agarosegelen auf eine Nylonmembran erfolgte prinzipiell nach dem gleichen Protokoll wie der Transfer von DNA-Fragmenten auf eine Nylonmembran. Die Nylonmembran wurde auf die gleiche Weise für den Transfer vorbereitet wie beim Protokoll für den Southernblot. Das Agarosegel wurde im Anschluß an die Elektrophorese für 20 min in Transferpuffer (3M NaCl, 8mM NaOH) unter leichtem Schwenken inkubiert. Der Transfer der RNA aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran wurde für 3 – 5 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für 5 min bei RT in Neutralisierungspuffer (0.2M Phosphatpuffer, pH 6.8) inkubiert und die RNA durch Bestrahlung mit 120 kJ/cm² UV-Licht der Wellenlänge 265 nm an der Membran immobilisiert.

(<http://www.s-und-s.de/Pages-NEU-eng/UB3/Life%20Science/Lab%20Manual/Labstart.html>)

7.9.3. Western Blot

Der Transfer von Proteinen aus einem SDS-PAGE Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte im Tank-Blot Verfahren [177]. Vor dem Zusammensetzen des Blotsandwichs wurde das Gel in Transferpuffer äquilibriert und die PVDF-Membran in Methanol p.A. für 2 min bei RT inkubiert und anschließend ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Der Blotsandwich wurde, wie in Abb. 6.9.3. dargestellt, luftblasenfrei zusammengesetzt. der Transfer erfolgte Ü.N. mit einer Spannung von 30V bei 4°C.



Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde die Membran in 1% Poinceau STM gefärbt, um die Gleichmäßigkeit des Transfers zu überprüfen. Im Anschluß daran wurde die Membran für mindestens 1 – 2 Stunden oder Ü.N. bei RT bzw. 4°C zum Blockieren in TBST + 5% Milchpulver inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper in Blockierungslösung. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran fünfmal für mindestens 10 min bei RT in TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper wurde anschließend für 1 Stunde bei RT in TBST durchgeführt. Danach wurde die Membran dreimal für mindestens 10 min in TBST und im Anschluß daran zweimal für mindestens 10 min in TBS gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde die Membran gemäß Herstellerangaben für 1 – 2 min in ECL-Puffer/Substrat inkubiert und in der Dunkelkammer in einer PVC-Klarsichthülle in eine Autoradiographiekassette überführt. Die Exposition der Röntgenfilme erfolgte, je nach Signalstärke, für 5 sek. bis 45 min.

7.10. Hybridisierung

7.10.1. Hybridisierung immobilisierter DNA

Die Prähybridisierung und die Hybridisierung der Nylonmembranen, an denen DNA-Fragmente immobilisiert waren, wurde in langsam, horizontal um die Längsachse rotierenden Glaszylindern durchgeführt. Die Prähybridisierung wurde bei 65°C für mindestens 1h in 25 ml Southern-Hybridisierungspuffer durchgeführt.

Für die Hybridisierung wurde dem Prähybridisierungspuffer 30 µl hitzedenaturierte, radioaktiv markierte Hybridisierungssonde und 70 µl hitzedenaturierte Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 16 h (Ü.N.) bei 65°C.

Die Membran wurde nach der Hybridisierung dreimal bei 55 - 60°C mit Waschpuffer stringent gewaschen und anschließend in Klarsichtfolie eingeschlagen. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte mit Hilfe eines PhosphorImagers™ 445SI durch Exposition eines 'storage phosphor screens' bei RT(siehe Autoradiographie).

7.10.2. Hybridisierung immobilisierter RNA

Die Prähybridisierung und die Hybridisierung der Nylonmembranen, an denen RNA immobilisiert war, wurde wie unter Abschnitt 6.10.1. beschrieben, durchgeführt.

Die Prähybridisierung wurde bei 45°C für mindestens 1h in 25 ml Northern-Hybridisierungspuffer durchgeführt.

Für die Hybridisierung wurde dem Prähybridisierungspuffer 30 µl hitzedenaturierte, radioaktiv markierte Hybridisierungssonde und 70 µl hitzedenaturierte Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 16 h (Ü.N.) bei 45°C.

Die Membran wurde nach der Hybridisierung dreimal für je 20 min bei 45°C mit Waschpuffer I (2xSSC; 0.1% SDS), dann zweimal für je 20 bei 48°C min in Waschpuffer II (1xSSC; 0.1% SDS), anschließend zweimal für 20 min bei 52°C mit Waschpuffer III (0.5xSSC; 0.1%SDS), zweimal für 20 min bei 55°C mit Waschpuffer IV (0.3xSSC; 0.1%SDS) und anschließend bei 55°-60°C mit Waschpuffer 5 (0.1xSSC; 0.1%SDS) stringent gewaschen und nach kurzem spülen in 100 mmol/l Tris/HCl, pH 7.8 feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen.

Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte mit Hilfe eines PhosphorImagers™ 445SI durch Exposition eines 'storage phosphor screens' bei RT(siehe Autoradiographie).

Für eine Rehybridisierung der Membran wurde die erste Hybridisierungssonde zunächst durch dreimalige Inkubation bei 95°C für 20 min in Strip-Puffer (0.025 x SSC, 0.1 % SDS) vollständig abgewaschen.

Die Membran wurde für eine Rehybridisierung wieder Prähybridisiert und dann, wie oben beschrieben, hybridisiert.

Um ein Austrocknen zwischen den einzelnen Hybridisierungen zu verhindern, wurden die Membranen in Frischhaltefolie geschlagen bei -20°C aufbewahrt.

7.10.3. Hybridisierung von RNA in Lösung

Zur Hybridisierung von RNA in Lösung wurden 5 - 20 μg gesamt-RNA Lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 30 μl RPA-Hybridisierungspuffer aufgenommen, mit 2 - 5 μl radioaktiver RNA-Sonde versetzt und für 5 min bei 94°C denaturiert. Anschließend wurde die Lösung über 3 h auf 45°C (einzelne RNA-Sonde) bzw. 56°C (mehrere Sonden) abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgte für ca. 16 h (Ü.N.) bei 45°C bzw. 56°C. Die Denaturierung, das Abkühlen und die Hybridisierung wurden in einem Biometra Personal Cycler™ durchgeführt.

Nach Abschluß der Hybridisierung wurden die Proben auf RT abgekühlt.

7.11. Autoradiographie

Die Autoradiographie erfolgte mit Hilfe eines PhosphorImager™ 445 SI. Es wurde ein 'storage phosphor screen' auf die in Haushaltsfolie gewickelte Hybridisierungsmembran bzw. das getrocknete Gel gelegt und in einer Expositionskassette belichtet. Die Expositionszeit betrug, je nach Stärke des radioaktiven Signals auf der Membran bzw. dem Gel, zwischen 3h und 3 Tagen. Die auf dem 'storage phosphor screen' gespeicherten Signale wurden mit Hilfe des PhosphorImagers™ 445 SI eingelesen und in digitalisierter Form abgespeichert. Sowohl die qualitative als auch die quantitative Auswertung digitalisierten Daten wurde mit den Programmen IP Labgel™ und Adobe Photoshop™ durchgeführt.

Aufgrund der hohen Sensitivität dieses Autoradiographieverfahrens ist die Expositionszeit gegenüber Röntgenfilmen auf ca. 1/10 der Zeit reduziert. Außerdem beträgt der lineare Dynamikbereich der 'storage phosphor screens' 1-100000, wogegen Röntgenfilme nur einen Dynamikbereich von 1-500 haben.
