

4. Material und Methoden

4.1. Restriktionsendonucleasen

Enzym	Erkennungssequenz	Quelle	Pufferbedingungen	Hersteller
<i>Bam</i> HI	5'-G↓GATCC-3'	<i>Bacillus amylo-liquefaciens</i> H	1 × REact™3, 2 × OPA ⁺	Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein)
<i>Bg</i> II	5'-A↓GATCT-3'	<i>Bacillus globigii</i>	1 × NEBuffer 3	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Cla</i> I	5'-A↓TCGAT-3'	<i>Caryophanon latum</i> L.	1 × NEBuffer 4	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Eco</i> RI	5'-G↓AATTC-3'	<i>E. coli</i> RY 13	1 × REact™3	Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein)
<i>Hind</i> III	5'-A↓AGCTT-3'	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd.	1 × O.B. #3	Stratagene (Heidelberg)
<i>Kpn</i> I	5'-GGTAC↓C-3'	<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8	1 × OPA ⁺ ; 1 × REact™4	Amersham-Pharmacia Biotech (Freiburg); Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein)
<i>Mfe</i> I	5'-C↓AATTG-3'	<i>Mycoplasma fermentas</i>	1 × NEBuffer 4	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Mlu</i> I	5'-A↓CGCGT-3'	<i>Mirococcus luteus</i>	2 × U.B.	Stratagene (Heidelberg)
<i>Not</i> I	5'-GC↓GGCCGC-3'	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	1 × <i>Not</i> I Incubation Buffer	MBI Fermentas (St. Leon Rot)
<i>Pst</i> I	5'-CTGGA↓C-3'	<i>Proteus stearothermophilus</i>	1 × NEBuffer 3	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Sst</i> I	5'-GAGCT↓C-3'	<i>Streptomyces stearothermophilus</i>	1 × OPA ⁺	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>Sa</i> I	5'-G↓TCGAC-3'	<i>Streptomyces albus</i> G	2 × OPA ⁺	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>Sma</i> I	5'-CCC↓GGG-3'	<i>Serratia marcescens</i> SB	1 × REact™4	Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein)
<i>Spe</i> I	5'-A↓CTAGT-3'	<i>Spaerotilus spec.</i>	1 × U.B.	Stratagene (Heidelberg)
<i>Xho</i> I	5'-C↓TCGAG-3'	<i>Xanthomonas c. pv. Holcicola</i>	1 × U.B.	Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein)
<i>Xba</i> I	5'-T↓CTAGA-3'	<i>Xanthomonas c. pv. badrii</i>	1 × U.B.	Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein)

Die Durchführung von Restriktionsspaltungen einschließlich der Zusammensetzung der verwendeten Puffer wird ausführlich in Kap. 4.27.1. beschrieben.

4.2. Modifizierende Enzyme

<i>AdvantTaq</i> TM DNA-Polymerase („Advantage®-GC2 PCR Kit“)	CLONTECH GmbH (Heidelberg)
Agarase	CalBiochem (Frankfurt)
CIAP (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)	Roche Diagnostics (Mannheim)
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	New England Biolabs (Schwalbach)
MMLV RNase H- Reverse Transcriptase („SUPERSCRIPT TM II“)	Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein)
Proteinase K	Roche Diagnostics (Mannheim)
T4 DNA-Ligase	MBI-Fermentas (St. Leon Rot)
T4 DNA-Polymerase	New England Biolabs (Schwalbach)
T4 Polynucleotidkinase	New England Biolabs (Schwalbach)
T7 DNA-Polymerase („T7-Sequencing TM -Kit“)	Amersham-Pharmacia Biotech (Freiburg)
T7 RNA-Polymerase („TNT® T7 Quick Coupled <i>in vitro</i> Transcription/Translation System“)	Promega, Boehringer-Ingelheim (Heidelberg)
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein)
Trypsin	SIGMA-Aldrich (München)
Vent _R ® (exo-) DNA Polymerase („CircumVent TM Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing Kit“)	New England Biolabs (Schwalbach)

4.3. Größenmarker

4.3.1. DNA-Größenmarker

100 bp DNA-Leiter

Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein)

Die Leiter besteht aus 15 Fragmenten im Längenbereich von 100 bp bis 1500 bp in 100 bp-Schritten und einem zusätzlichen 2072 bp-Fragment. Die 600 bp-Bande ist im Vergleich zu den anderen Banden zwei- bis dreifach verstärkt.

Lambda-DNA, HindIII-gespalten

Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein)

Fragment	Länge (in bp)	Anteil Gesamtlänge (in %)
1	23130	47,7
2	9416	19,4
3	6557	13,5
4	4361	9,0
5	2322	4,8
6	2027	4,2
7	564	1,2
8	125	0,2
Gesamtlänge: 48502 bp		

 Φ X174-DNA, HaeII-gespalten

Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein)

Fragment	Länge (in bp)	Anteil Gesamtlänge (in %)
1	1353	25,1
2	1078	20,0
3	872	16,2
4	603	11,2
5	310	5,8
6	281	5,2
7	271	5,0
8	234	4,3
9	194	3,6
10	118	2,2
11	72	1,3
Gesamtlänge: 5386 bp		

4.3.2. Protein-Größenmarker„Rainbow™“ colorierter Protein-Molekulargewichtsmarker (RPN 756, 14,3 bis 220 kDa)

Amersham-Pharmacia Biotech (Freiburg)

Dieser Molekulargewichtsmarker besteht aus einem Gemisch individuell gefärbter, gereinigter Proteine, die unterschiedliche Molekulargewichte repräsentieren. Er liegt in einer Formulierung vor, die nach Zugabe geeigneter Mengen Ladebuffer (mit 2-Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 5 %) direkt einsetzbar ist. Die einzelnen Markerproteine und -farben sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Protein	Molekulargewicht in kDa	Färbung
Myosin	220	blau
Phosphorylase b ^a	97,4	braun
Serumalbumin (Rind)	66	rot
Ovalbumin	46	gelb
Carboanhydrase	30	orange
Trypsin-Inhibitor	21,5	blau
Lysozym	14,3	magenta

^a kann sich im Gel in 2 Banden auflösen

4.4. Nucleotide

4.4.1. Desoxy- und Didesoxynucleotide (dNTPs und ddNTPs)

Die vier 2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) wurden als Dinatriumsalze von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

Die vier 2'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) wurden als Dinatriumsalze von Amersham-Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

4.4.2. Radioaktiv markierte Nucleotide

[α - ³⁵ S]-dATP (35 TBq/mmol)	Amersham-Pharmacia Biotech (Braunschweig)
[γ - ³³ P]-rATP (35 TBq/mmol)	
[α - ³² P]-dATP (111 TBq/mmol)	
[α - ³² P]-dCTP (111 TBq/mmol)	

4.5. Oligonucleotide

Oligonucleotid	Sequenz	Position	Beschreibung
15C-for2	5'-AGGAGGACGCCAGGACTGCGTC-3'	131 – 152 in 15C-UTR	15C-PCR-Vorwärts-Primer
15C-for4	5'-AAGAATCAATGCTTTGGCCCTGG-3'	374 – 397 in 15C-UTR	15C-Sonde (E 1.2)
15C-rev2	5'-ATTGAGGCTGCACAGGACCTCACTG-3'	90 – 66 in APM-1-Exon 2/3	15C-PCR-Rückwärts-Primer
a31-for2	5'-GACGGGCTACGTCGGAGTGTGTC-3'	210 – 233 in a31-UTR	a31-PCR-Vorwärts-Primer
a31-for3	5'-TGACCTTGACAAGAACCCTCCCC-3'	345 – 368 in a31-UTR	a31-Sonde (E1.1)
a31-rev2	5'-GTGCCGCTGTGAAAAGCTTCTTG-3'	215 – 192 in APM-1-Exon 2/3	a31-PCR-Rückwärts-Primer
ATV49^a	5'-ACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'	488 – 510 in β -Aktin-cDNA	β -Aktin-PCR-Vorwärts-Primer
ATV50^a	5'-CTTGCTGATCCACATCTGCTGGA-3'	1087-1065 in β -Aktin-cDNA	β -Aktin-PCR-Vorwärts-Primer
GAPDH-for	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	81 – 99 in GAPDH-cDNA	GAPDH-PCR-Vorwärts-Primer
GAPDH-Probe	5'-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'	277 – 258 in GAPDH-cDNA	GAPDH-Sonde
GAPDH-rev	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'	306 – 287 in GAPDH-cDNA	GAPDH-PCR-Rückwärts-Primer
GL Primer 2	5'-CTTTATGTTTTGGCGTCTCC-3'	111 – 89 in pGL3-Basic	pGL3-Sequenzier-Primer
MV05	5'-CTGGCTGAGAACATGGCC-3'	5 – 22 in APM-1-Exon 2/3	Sequenzier-Primer
MV07	5'-CTCTGGCTGCTATCCTGGAG-3'	267 – 286 in APM-1-Exon 2/3	PCR-Vorwärts- u. Sequenzier-Primer

^a freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Pöpperl

Oligo-nucleotid	Sequenz	Position	Beschreibung
MV08	5'-GAAGGAGTCAGGGAAGTCCC-3'	649 – 630 in APM-1-Exon 2/3	PCR-Rückwärts-Primer
MV09	5'-ATGATGACACGGAGGACTTTG-3'	510 – 530 in APM-1-Exon 2/3	PCR-Vorwärts- u. Sequenzier-Primer
MV10	5'-GATCTTCCGATTCTTGATGACC-3'	883 – 862 in APM-1-Exon 2/3	PCR-Rückwärts-Primer
MV13	5'-AGGACATGTTCCCTGACCTG-3'	948 – 967 in APM-1-Exon 2/3	Exon 2/3-PCR-Vorwärts-Primer
MV14	5'-TCGTAGTTGTGCACGAACTT-3'	1317 – 1297 in APM-1-Exon 2/3	Exon 2/3-Sonde
MV16	5'-CTCTGGCGCTTGATGTGG-3'	1428 – 1411 in APM-1-Exon 2/3	Exon 2/3-PCR-Rückwärts-Primer
MV25	5'-CAAGGAGGTGGCTCAGAGTC-3'	-83 – -64 zu APM-1-Exon 2/3 (Intron)	PCR-Vorwärts- u. Sequenzier-Primer
MV26	5'-TTACAGCTGGAAGGAGAAGAGG-3'	+1547 – +1526 zu APM-1-Exon 2/3 (Intron)	PCR-Rückwärts-Primer
MV27	5'-ATTCGATGGAGAAGTCCCG-3'	701 – 684 in APM-1-Exon 2/3	PCR-Rückwärts-Primer
p2-for2 (MV55)	5'-AATCAATGACAACCTCCCGCCG-3'	36 – 57 in p2-UTR	p2-PCR-Vorwärts-Primer
p2-rev3 (MV56)	5'-AGCCTCAGGCTGGACAAAGTCGATC-3'	267 – 243 in APM-1-Exon 2	p2-PCR-Rückwärts-Primer
MV57	5'-CAGGCTCCCGCGAGCAGC-3'	65 – 82 in p2-UTR	p2-Sonde
p53EP-for	5'-TTCCCATCAAGCCCTAGGG-3'	1 – 19 in p53-URR+	PCR-Vorwärts-Primer
p53EP-rev-B	5'-GC AGATCT <i>GCCCGT</i> GA CTCAGAGAGGAC-3' ^b	994 – 975 in p53-URR+	PCR-Rückwärts-Primer mit 5'- <i>Bgl</i> II-Schnittstelle
pGUPPA-for	5'-ATAAAGCAATAGCATCAC-3'	unbekannt	pGUP.PA-Sequenzier-Primer
pGUPPA-rev	5'-TTGATACGAATTCCTGC-3'	unbekannt	pGUP.PA-Sequenzier-Primer
RV Primer 3	5'-CTAGCAAAAATAGTCTGTCCC-3'	4760 – 4779 in pGL3-Basic	pGL3-Sequenzier-Primer
SB09	5'-AGCGGTGATGGTGAGCGTG-3'	318 – 301 APM-1-Exon 2/3	PCR-Rückwärts- u. Sequenzier-Primer

^b Die zusätzlich angefügte Restriktionsschnittstellen ist **fett**, die spezifische Sequenz ist *kursiv* gedruckt.

4.6. Vektoren und Expressionsplasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pBluescript II KS (+/-)	Phagemid, pUC19-Derivat, 2961 bp, MCS, <i>Amp</i> ^R , <i>lacZ</i>	Stratagene (Heidelberg)
pMefust-4	pBluescript-Derivat, 7579 bp; viral-zelluläre Hybrid-cDNA aus Zervixkarzinom-Zelllinie ME180 (4618 bp- <i>Eco</i> RI-Fragment); viraler Anteil: am 5'-Ende verkürzter E6- und kompletter E7-ORF von HPV68 und E1-Zell-Hybrid-ORF; zellulärer Anteil: codierende Sequenz von <i>APM-1</i> inklusive 3'-UTR (Reuter <i>et al.</i> , 1998)	Eigenkonstruktion
pBS-a31-<i>Pvu</i>II	pBluescript-Derivat, 4967 bp; genomisches <i>Pvu</i> II-2006 bp-Fragment mit a31-UTR	Stratagene (Heidelberg)
pSG5	eukaryontischer Expressionsvektor, 4076 bp; <i>Amp</i> ^R ; früher SV40-Promotor/Enhancer, T7-Promotor; <i>Eco</i> RI-, <i>Bam</i> HI- und <i>Bgl</i> II-Schnittstelle, Intron II des Kaninchen- β -Globin-Gens und SV40-Poly(A)-Signal (Green <i>et al.</i> , 1988)	

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pSG5-APM-1	pSG5-Derivat, <i>APM-1</i> -Expressionsplasmid; 7865 bp; komplette <i>APM-1</i> -cDNA inklusive 3'-UTR (3789 bp- <i>MfeI</i> - <i>EcoRI</i> -Fragment aus pMefust-4) in <i>EcoRI</i> -Schnittstelle von pSG5 (Reuter <i>et al.</i> , 1998)	Eigenkonstruktion
pSG5-APM-1-as	wie pSG5-APM-1 , aber 3789 bp- <i>MfeI</i> - <i>EcoRI</i> -Fragment aus pMefust-4 in „antisense“ (as)-Orientierung zum SV40-Promotor/Enhancer	
pGL3-Basic	Luciferase-Reportervektor, 4818 bp; <i>Amp^R</i> ; MCS; Luciferase-Gen aus <i>Photinus pyralis</i> (luc+); spätes Poly(A)-Signal von SV40	Promega, Boehringer-Ingelheim (Heidelberg)
pGL3-Enhancer	Luciferase-Reportervektor, 5064 bp; <i>Amp^R</i> ; MCS; Luciferase-Gen aus <i>P. pyralis</i> (luc+); spätes Poly(A)-Signal von SV40; SV40-Enhancer	Promega Boehringer-Ingelheim (Heidelberg)
pGUP.PA	Luciferase-Reportervektor, 5096 bp; <i>Amp^R</i> ; MCS; <i>hsp70</i> -Minimalpromotor; Luciferase-Gen aus <i>P. pyralis</i>	Dr. K. Butz (DKFZ, Heidelberg)
p53Con-GUP.PA	Luciferase-Reporterplasmid; <i>Amp^R</i> ; artifizielle p53-Bindungsstelle (~ 50 Nt); <i>hsp70</i> -Minimalpromotor; Luciferase-Gen aus <i>P. pyralis</i>	Dr. K. Butz (DKFZ, Heidelberg)
pFragA-GUP.PA	Luciferase-Reporterplasmid; <i>Amp^R</i> ; authentische p53-Bindungsstelle (~ 50 Nt) aus „ribosomal gene cluster“ (RGC); <i>hsp70</i> -Minimalpromotor; Luciferase-Gen aus <i>P. pyralis</i>	Dr. K. Butz (DKFZ, Heidelberg)
pCMV-Gal	Standardisierungsplasmid; <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> -Fragment des β -Galaktosidase-Gens aus <i>E. coli</i> unter Kontrolle des hCMV-Promotors/Enhancers (Konstruktion: Dr. M. Rentrop, DKFZ, Heidelberg)	Dr. C. Geisen (DKFZ, Heidelberg)
p53wt	p53-Expressionsplasmid; <i>Amp^R</i> ; menschliches <i>p53</i> -Gen (Wildtyp) unter Kontrolle des hCMV-Promotors/Enhancers	Dr. K. Butz (DKFZ, Heidelberg)
pTRE	Klonierungsvektor, 3146 bp; P_{hCMV*1} = Tet-responsives Element (TRE, sieben Kopien der 42 bp-tet Operator-Sequenz <i>tetO</i>) + P_{minCMV} (minimaler CMV-Promotor); MCS; SV40-Poly(A)-Signal; <i>Amp^R</i>	CLONTECH GmbH (Heidelberg)
pTk-Hyg	Hygromycin-Selektionsplasmid, 5,1 kb; <i>Amp^R</i> ; Hygromycin-Resistenzgen (<i>Hyg^R</i>) unter Kontrolle des Herpes Simplex Virus (HSV)-Thymidinkinase-Promotors/Enhancers; HSV-TK-Poly(A)-Signal	CLONTECH GmbH (Heidelberg)
pSV2-neo	G418-Selektionsplasmid; <i>Amp^R</i> ; 1,4-kb- <i>HindIII</i> - <i>BamHI</i> -Fragment des Neomycin-Resistenzgens aus <i>E. coli</i> (<i>neo^R</i>) unter Kontrolle des SV40-Promotors/Enhancers (Southern und Berg, 1982)	Dr. C. Geisen (DKFZ, Heidelberg)

4.7. Hybridisierungssonden

- G9-POZ** 399 bp-*XbaI*-Fragment aus dem *APM-1*-Klon einer menschlichen GehirncDNA-Bank; enthält die vollständige BTB-Domäne (Reuter *et al.*, 1998)
- 1160** 1160 bp-*SacI*-Fragment, das sich am äußersten 3'-Ende der *APM-1*-cDNA befindet (Reuter *et al.*, 1998)
- GAPDH** 1,4 kb-*PstI*-Fragment mit der gesamten cDNA des Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH)-Gens der Ratte (Fort *et al.*, 1985); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K. Butz (DKFZ, Heidelberg)

4.8. Zelluläre Nucleinsäuren

Soweit nicht anders angegeben, wurden zelluläre DNAs sowie zytoplasmatische RNAs freundlicherweise von E. Schwarz zur Verfügung gestellt.

4.9. Menschliche Zelllinien und Biopsieproben; Kulturmedien und Zusätze

4.9.1. Menschliche Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz/Quelle
CX-1	Colon-Adenokarzinom	Goldin <i>et al.</i> , 1981/Tumorbank DKFZ Heidelberg
CX-2	Colon-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
SW48	Colon-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
LS180	Colon-Adenokarzinom	Tom, 1976/Tumorbank DKFZ Heidelberg
LS174T	Colon-Adenokarzinom; trypsinierte Variante von LS 180	Tom, 1976/Tumorbank DKFZ Heidelberg
LoVo	Colon-Adenokarzinom	Drewinko und Yand, 1976/Tumorbank DKFZ Heidelberg
KM-12	Colon-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
CXF94	Colon-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
CoLo-320	Colon-Adenokarzinom	Quinn <i>et al.</i> , 1979/Tumorbank DKFZ Heidelberg
SW707	Colon-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
SW403	Colon-Adenokarzinom	Leibovitz <i>et al.</i> , 1976/Tumorbank DKFZ Heidelberg
SW480	Colon-Adenokarzinom	Leibovitz <i>et al.</i> , 1976/Tumorbank DKFZ Heidelberg
SW948	Colon-Adenokarzinom	Leibovitz <i>et al.</i> , 1976/Tumorbank DKFZ Heidelberg
CaCo-2	Colon-Adenokarzinom	Fogh <i>et al.</i> , 1977/Tumorbank DKFZ Heidelberg
HT-29	Colon-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
HCT116	Colon-Karzinom	Brattain, 1981/Tumorbank DKFZ Heidelberg
5637	Harnblasen-Karzinom	Welte <i>et al.</i> , 1985/Tumorbank DKFZ Heidelberg
RT112	Übergangsepithelkarzinom der Harnblase	Marshall <i>et al.</i> , 1977/Tumorbank DKFZ Heidelberg
RT4	Übergangsepithelkarzinom der Harnblase	Rigby und Franks, 1970/Tumorbank DKFZ Heidelberg
EJ28	Harnblasen-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
XF439	Übergangsepithelkarzinom der Harnblase	Tumorbank DKFZ Heidelberg
HBTCPL-1	Harnblasen-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
LNCap	Prostata-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
PC-3	Prostata-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
DU145	Prostata-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg

Zelllinie	Beschreibung	Referenz/Quelle
RPMI-2650	Plattenepithel-Karzinom des nasalen Septums	Tumorbank DKFZ Heidelberg
LX-1	Lungen-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
H-Messo-1	Mesotheliom der Lunge	Tumorbank DKFZ Heidelberg
H-Messo-1a	Mesotheliom der Lunge	Tumorbank DKFZ Heidelberg
A-549	Lungen-Karzinom	Giard <i>et al.</i> , 1973/Tumorbank DKFZ Heidelberg
A-548	Lungen-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
A-427	Lungen-Karzinom	Giard <i>et al.</i> , 1973/Tumorbank DKFZ Heidelberg
H69	Lungen-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
LUTCML-54	Lungen-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
LXF289	Lungen-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
H209	Lungen-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
HeLa	Zervix-Adenokarzinom, HPV18-positiv	Gey <i>et al.</i> , 1952/Tumorbank DKFZ Heidelberg
ME180	Zervix-Karzinom, HPV68-positiv	Sykes <i>et al.</i> , 1970/Tumorbank DKFZ Heidelberg
SiHa	Zervix-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
C4-I	Zervix-Karzinom, HPV18-positiv	Auersperg, 1969/Tumorbank DKFZ Heidelberg
C4-II	Zervix-Karzinom, HPV18-positiv	Auersperg, 1969/Tumorbank DKFZ Heidelberg
SW756	Zervix-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
C33A	Zervix-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
CaSki	Zervix-Karzinom, HPV16-positiv	Pattilio, 1977/Dr. K. Butz (DKFZ, Heidelberg)
HT3	Zervix-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
MRI H215	Zervix-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
MRI H196	Zervix-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
MRI H186	Plattenepithelkarzinom der Zervix	Tumorbank DKFZ Heidelberg
MS751	Zervix-Karzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
Ekto-CxK	Ektozervikale Keratinozyten	Dr. C.Geisen (DKFZ, Heidelberg)
CxF-CX12	Zervikale Fibroblasten	Dr. C.Geisen (DKFZ, Heidelberg)
CxF-CX13	Zervikale Fibroblasten	Dr. C.Geisen (DKFZ, Heidelberg)
ACHN	Nieren-Karzinom	American Type Culture Collection (ATCC)
786-O	Nieren-Karzinom	ATCC
A498	Nieren-Karzinom	ATCC
KTCTL-1M	Nierenzell-Karzinom GII	Tumorbank DKFZ Heidelberg
769-P	Nieren-Karzinom	ATCC
Caki-1	Nieren-Karzinom	Fogh <i>et al.</i> , 1977/ATCC
Caki-2	Nieren-Karzinom	Fogh <i>et al.</i> , 1977/ATCC
HTB45	Nieren-Karzinom	ATCC

Zelllinie	Beschreibung	Referenz/Quelle
AsPC-1	Pankreas-Adenokarzinom	Tan, 1981/Tumorbank DKFZ Heidelberg
A818-4	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
Capan-1	Pankreas-Adenokarzinom	Fogh <i>et al.</i> , 1977/Tumorbank DKFZ Heidelberg
Capan-2	Pankreas-Adenokarzinom	Kyriazis <i>et al.</i> , 1986/Tumorbank DKFZ Heidelberg
DanG	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
Colo357	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
MDH Panc	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
Panc Tu-1	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
Panc Tu-2	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
HPAF	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
PL45	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
PT45	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
CFPac	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
SW979	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
SW850	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
Pala44	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
Pan T	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg
MiaPala2	Pankreas-Adenokarzinom	Tumorbank DKFZ Heidelberg

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zellen von E. Schwarz zur Verfügung gestellt.

4.9.2. Menschliche Biopsieproben

- Leukozyten-Proben von 6 Gehirntumor-Patienten aus Erlangen und 8 Leukämie-Patienten
- 47 Proben aus Lymphknoten, Schleimhaut, einer Metastase und Tumoren des Hals-Nasen-Ohren (HNO)-Bereichs von 19 Patienten der HNO-Klinik Mannheim
- 19 Proben von Mikrodissektionen aus Plattenepithelkarzinomen des HNO-Bereichs von 17 Patienten der Kopfklinik Heidelberg (zur Verfügung gestellt von Dr. F.-X. Bosch)
- 13 Proben von Gehirntumor-Patienten aus Erlangen mit Gliomen, Gliosarkomen, Glioblastomen und Meningeomen
- 13 Proben aus Nierengewebe und Nierentumoren der Tumorbank des DKFZ Heidelberg

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Proben von Dr. T. Kahn (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

4.9.3. Kulturmedien und Zusätze

(DMEM) Dulbecco's Modified Eagle's Medium	SIGMA, (München)
RPMI-1640	SIGMA, (München)
Leibovitz L-15	SIGMA, (München)
Waymouth MB752/1	Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein)
FKS (Fötales Kälberserum)	Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein)
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	SIGMA, (München)

Komplettmedium

Kulturmedium	79-89 % (v/v)
FKS	10-20 % (v/v)
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)

Geneticin (G-418-Sulfat) Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein)

10 g Geneticin-Pulver wurden unter sterilen Bedingungen im Lieferbehälter in einem Gesamtvolumen von 20 ml zusatzfreiem DMEM gelöst, auf Aliquots zu 1 ml (je 500 mg Geneticin) verteilt und bei -20 °C gelagert.

Hygromycin B Roche Diagnostics (Mannheim)

Als gebrauchsfertige Lösung mit 20 mg/ml in PBS bezogen

Doxyzyklin-Hydrochlorid SIGMA (München)

1 g Doxyzyklin-HCl-Pulver wurden unter sterilen Bedingungen im Lieferbehälter in einem Gesamtvolumen von 1000 ml *aqua bidest.* gelöst, steril filtriert, in Aliquots von 1 mg/ml verteilt und bei -20 °C gelagert.

12-O-Tetradecanoylphorbolacetat (TPA)

Eine 2×10^{-3} M Vorratslösung in DMSO wurde von Dr. Rainer Schmidt (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die 1×10^{-4} M Arbeitslösung wurde durch Verdünnung in DMSO hergestellt und wie die Vorratslösung bei -20 °C gelagert.

5-Aza-2'-desoxycytidin

SIGMA (München)

Zur Herstellung einer 3 mM Lösung in PBS wurden 5 mg 5-Aza-2'-desoxycytidin-Pulver unter sterilen Bedingungen im Lieferbehälter in einem Gesamtvolumen von 7,3 ml autoklaviertem PBS langsam durch schrittweise Flüssigkeitszugabe und vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gelöst. Die Lösung wurde auf Aliquots zu je 500 µl verteilt und bei -20 °C gelagert.

Einfriermedium

Komplettmedium 90 % (v/v)

DMSO 10 % (v/v)

Trypsinierlösung

DKFZ (Heidelberg)

0,125 % (w/v) Trypsin, 0,125 % (w/v) EDTA, 0,115 % (w/v) Na₂HPO₄, 0,02 % (w/v) KH₂PO₄, 0,8 % (w/v) NaCl, 0,02 % (w/v) KCl, 0,01 % (w/v) MgSO₄, 0,001 % (w/v) CaCl₂·H₂O in *aqua bidest.*, steril filtrieren

4.10. Bakterienstämme und Medien**4.10.1. Bakterienstämme***E. coli* XL1-Blue (Sambrook und Russell, 2001)

Stratagene (Heidelberg)

E. coli TG-1 (Sambrook und Russell, 2001)

Stratagene (Heidelberg)

4.10.2. Kulturmedien

Bezeichnung	Bestandteile
LB (Luria Broth)	1 % (w/v) Bacto Trypton 0,5 % (w/v) Bacto Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl 10 mM MgSO ₄ in <i>aqua bidest.</i> , autoklavieren
LB-Nährboden	1 % (w/v) Bacto Trypton 0,5 % (w/v) Bacto Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl 10 mM MgSO ₄ 1,5 % (w/v) Bacto-Agar in <i>aqua bidest.</i> , autoklavieren
SOB	2 % (w/v) Bacto Trypton 0,5 % (w/v) Bacto Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl ad 990 ml mit <i>aqua bidest.</i> , auf pH 7,0 mit 5 N NaOH einstellen, autoklavieren vor Gebrauch 10 ml MgCl ₂ /MgSO ₄ (je 10 mM, pH 7,0) zugeben

Bezeichnung	Bestandteile
Antibiotikum zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien	100 µg/ml Ampicillin
SOC	SOB-Medium 20 mM Glukose (sterilfiltriert)
Einfriermedium für Bakterien	LB-Medium 15 % Glycerin (steril)

4.11. Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Bestandteile
Ampicillin-Stammlösung	10 mg/ml Ampicillin in <i>aqua bidest.</i> lösen, steril filtrieren und lichtgeschützt bei -20 °C lagern
10 % Ammoniumsulfat (APS)-Lösung	10 mg/ml APS in <i>aqua bidest.</i> lösen, steril filtrieren und bei -20 °C lagern
Chloroform/Isoamylalkohol (CIA) 24:1	24 Teile Chloroform 1 Teil Isoamylalkohol lichtgeschützt bei 4 °C lagern
500 mM EDTA pH 8,0	18,61 g EDTA ad 100 ml mit <i>aqua bidest.</i> , auf pH 8,0 mit NaOH einstellen
50 × Elektrophoresepuffer	2 M Tris 250 mM Natriumacetat 50 mM EDTA in 1 l <i>aqua bidest.</i> lösen, auf pH 7,8 mit Eisessig einstellen, ad 2 l mit <i>aqua bidest.</i>
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in 1 × TE lösen und bei 4 °C lichtgeschützt lagern
3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2	408,2 g/l Natriumacetat × 3H ₂ O in <i>aqua bidest.</i> lösen, auf pH 5,2 mit Essigsäure einstellen
2 M Natriumacetat-Lösung pH 4,0	272,2 g/l Natriumacetat × 3H ₂ O in <i>aqua bidest.</i> lösen, auf pH 4,0 mit Essigsäure einstellen
PBS („phosphate-buffered saline“, Phosphat-gepufferte Salzlösung)	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ in 800 ml <i>aqua bidest.</i> lösen, mit HCl auf pH 7,5 einstellen, ad 1 l mit <i>aqua bidest.</i> , autoklavieren
Phenol-Lösung	1 kg Phenol bei 68 °C lösen, 1 g 8-Hydroxychinolin als Oxidationsschutz und 500 ml 20 mM Tris/1 mM EDTA pH 8,0 zugeben, schütteln und über Nacht abkühlen lassen; obere Phase abnehmen und weitere 250 ml 20 mM Tris/1 mM EDTA zugeben, lichtgeschützt bei 4 °C lagern.
Phenol*	1 Teil Phenol 1 Teil CIA 24:1
10 % Sarkosyl-Lösung	10 mg/ml Sarkosyl in <i>aqua ad iniectabilia</i> lösen, nicht autoklavieren
10 % SDS-Stammlösung	10 mg/ml SDS in <i>aqua bidest.</i> lösen, nicht autoklavieren
20 × SSC („standard saline citrate“, Standard-Zitratsalzlösung)	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat in <i>aqua bidest.</i> lösen
100 × TE-Lösung	1 M Tris-Base 100 mM EDTA in <i>aqua bidest.</i> lösen, auf pH 8,0 mit HCl einstellen
1 M Tris/HCl, pH 7,0	48,46 g Tris-Base in 300 ml <i>aqua bidest.</i> lösen, auf pH 7,0 mit 37 % HCl einstellen, ad 400 ml mit <i>aqua bidest.</i>

Alle übrigen Puffer und Lösungen werden in den entsprechenden Methodenkapiteln beschrieben.

4.12. Baukastensysteme („Kits“)

System	Beschreibung
Advantage®-GC 2 PCR Kit	PCR-System zur Amplifizierung GC-reicher DNA-Abschnitte (CLONTECH GmbH, Heidelberg)
Dynabeads	Material zur Selektion von poly(A) ⁺ -RNA aus Gesamt-RNA (DynaL S.A., Oslo, Norwegen)
CircumVent™ Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing Kit	System zur Sequenzierung einzel- und doppelsträngiger Matrizen-DNA nach der „Cycle-Sequencing“-Methode (New England Biolabs, Schwalbach)
Megaprime™ DNA Kit	System zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten nach der „Random Priming“-Methode (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg)
QIAquick™ Gel Extraction Kit	System zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Standard- oder LMP-Agarosegelen (QIAGEN® GmbH, Hilden)
QIAquick™ PCR Purification Kit	System zur Aufreinigung von doppel- oder einzelsträngigen PCR-Produkten aus Amplifikationsreaktionen (QIAGEN® GmbH, Hilden)
Tet-Off™ and Tet-On™ Gene Expression Systems	System zur Etablierung stabiler Genexpression unter Regulation durch Tetrazyklin bzw. Doxzyzyklin (CLONTECH GmbH, Heidelberg)
TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	System zur <i>in vitro</i> -Transkription von dsDNA mit direkt angeschlossener Translation der produzierten mRNA im zellfreien Retikulozyten-Lysat (Promega, Boehringer-Ingelheim)
T7-Sequencing™ Kit	System zur konventionellen Doppelstrangsequenzierung klonierter Matrizen-DNA (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg)

4.13. Zellkultur

Menschliche Zellen wurden als adhäsiv wachsende Einschicht-Kulturen in Kulturmedium unter Zusatz von 10-20 % fötalem Kälberserum (FKS) sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die dafür erforderlichen Maßnahmen, die Bestimmung von Zellzahlen sowie die Vorgehensweise zur langfristigen Aufbewahrung der Zellen wurden bereits beschrieben (Vogt, 1997).

4.14. Bakterienkultur

Die Zellen der Bakterienstämme *E. coli* XL-1 Blue und *E. coli* TG-1 wurden in LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin (100 µg/ml) kultiviert wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.15. Isolierung und Reinigung von DNA

4.15.1. Extraktion genomischer DNA aus Gewebekulturzellen

Genomische DNA wurde aus Gewebekulturzellen isoliert wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.15.2. Isolierung von Plasmid-DNA

4.15.2.1. Aufarbeitung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde nach einer von Zhou (1990) beschriebenen, modifizierten alkalischen Lyse-Prozedur durchgeführt wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.15.2.2. Aufarbeitung von Plasmid-DNA im großen Maßstab

Die Großaufarbeitung von Plasmid-DNA wurde nach der von Sambrook (2001) beschriebenen, geringfügig modifizierten alkalischen Lyse-Prozedur durchgeführt wie beschrieben (Vogt, 1997). Die für Transfektionen von Säugerzellen verwendete Plasmid-DNA wurde dabei standardmäßig über zwei aufeinanderfolgende CsCl/Ethidiumbromid-Gradienten gereinigt.

4.15.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA-Fragmenten aus „Low Melting Point“-Agarose

Mit Hilfe des Enzyms Agarase können DNA-Restriktionsfragmente von Plasmiden aus „Low Melting Point“ (LMP-)Agarose-Gelstücken präpariert werden (Michiels *et al.*, 1987; Burmeister und Lehrach, 1989). Die Isolierung wurde durchgeführt wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.15.2.4. Isolierung von Plasmid-DNA-Fragmenten aus Agarosegelen durch Säulenaufreinigung

Alternativ zur Präparation von DNA-Restriktionsfragmenten aus LMP-Agarosegelstücken mittels Agarase wurde die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit Hilfe des „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ der Firma QIAGEN GmbH (Hilden) durchgeführt gemäß den Angaben des Herstellers.

4.16. Reinigung und Fällung von DNA

Um Plasmid-DNA nach der Durchführung von Restriktionsspaltungen oder sonstigen Behandlungen zur weiteren Verwendung insbesondere von eventuell störenden Proteinen zu säubern, wurde entweder eine Reinigung über ein Agarosegel oder eine Phenol*-CIA-Extraktion vorgenommen. Die Durchführung wurde bereits beschrieben (Vogt, 1997).

4.17. Isolierung und Reinigung von zytoplasmatischer RNA aus Gewebekulturen

Die Isolierung zytoplasmatischer RNA wurde unter Verwendung der von Chomczynski und Sacchi (1987) beschriebenen „Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform“ (AGPC-) Methode durchgeführt wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.18. Selektion von poly(A)⁺-RNA aus Gesamt-RNA

Zur spezifischen Anreicherung von mRNAs (ca. 5 % der Gesamt-RNA einer eukaryontischen Zelle) kam ein Verfahren zur Anwendung, das sich die Existenz eines poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende reifer Transkripte zunutze macht. Dabei werden die mRNAs über ihren poly(A)-Schwanz zunächst mit Oligo(dT)-Molekülen hybridisiert, die wiederum an magnetische Sepharose-Kügelchen gebunden vorliegen. Verwendet wurden hierzu die sogenannten *Dynabeads* der Firma Dynal S.A. (Oslo, Norwegen). Während die poly(A)⁺-RNA an den Kügelchen gebunden bleibt, können alle anderen RNA-Fractionen durch Waschvorgänge abgereichert werden. Zum Schluß werden die angereicherten mRNAs durch pH-Änderung und Hitzedenaturierung wieder von den Kügelchen abgelöst und eluiert. Die Arbeitsschritte im einzelnen wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Aus jeweils 75 µg Gesamt-RNA wurden auf diese Weise etwa 2 µg poly(A)⁺-RNA isoliert.

4.19. Bestimmung von Nucleinsäurekonzentrationen

Bei einer photometrischen Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration einer DNA-Lösung (Sambrook und Russell, 2001) wurde die Extinktion (E) der in 600 µl Endvolumen verdünnten Lösung bei 260 nm in einem Spektralphotometer gegen die Extinktion der reinen Verdünnungslösung (in der Regel H₂O) gemessen. Die Bestimmung wurde durchgeführt wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.20. DNA- und RNA-Gelelektrophorese in horizontalen Agarosegelen

4.20.1. Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung von Plasmid- und genomischer DNA werden je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente Agarosekonzentrationen von 0,7 % (Fragmentgrößen von 0,8 bis 10 kb) bis 2 % (Fragmentgrößen von 0,1 bis 2 kb) empfohlen (Sambrook und Russell, 2001). Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.20.2. Gelelektrophorese von RNA

Die elektrophoretische Auftrennung zytoplasmatischer RNA erfolgte in nicht-denaturierenden 1 %igen Agarosegelen (Khandjian und Meric, 1986) wie beschrieben (Vogt, 1997). Als Größenmarker dienten die ribosomalen RNAs:

- 28S rRNA mit 4718 Nucleotiden
- 18S rRNA mit 1874 Nucleotiden
- 5S rRNA mit 120 Nucleotiden

4.21. Transfer von Nucleinsäuren aus Agarosegelen auf Nylonmembranen

4.21.1. DNA-Transfer auf Nylonmembranen (Southern Blot)

Die Übertragung von in Agarosegelen aufgetrennten DNA-Fragmenten auf Nylonmembranen erfolgte mittels Kapillartransfer (Southern, 1975). Nachdem die Banden des DNA-Größenstandards im Gel durch seitliches Einschneiden mittels Skalpell markiert worden waren, wurden Gele mit genomischer DNA zur partiellen Depurinierung der DNA für 15-20 Minuten in eine 0,25 M HCl-Lösung eingelegt. Diese Behandlung entfiel bei Gelen mit Plasmid-DNA. Nach Spülen in *aqua bidest.* wurde durch Behandlung des Gels in stark basischem Denaturierungspuffer (0,4 M NaOH, pH > 13) für zweimal 15 Minuten eine Spaltung der Phosphodiester-Bindungen an den depurinierten Stellen herbeigeführt. Die aus dieser Vorbehandlung des Gels resultierenden denaturierten und partiell hydrolysierten DNA-Fragmente werden aufgrund ihrer geringen Größe von 1-4 kb schneller und effizienter als höhermolekulare DNA-Fragmente transferiert (Meinkoth und Wahl, 1984). Die weitere Durchführung erfolgte wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.21.2. RNA-Transfer auf Nylonmembranen (Northern Blot)

Die Übertragung von RNA auf eine Nylonmembran wurde mittels Kapillartransfer (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.22. Radioaktive Markierung und Reinigung von DNA

4.22.1. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten nach der „Random-Priming“-Methode

Die hier angewandte Vorgehensweise zur radioaktiven Markierung von DNA leitet sich von der ursprünglich von Feinberg und Vogelstein (1983; 1984) eingeführten Methode ab, bei der Hexanucleotid-Primer

mit zufälliger Sequenz an denaturierte, geschlossen zirkuläre oder lineare doppelsträngige DNA (= gereinigte Restriktionsfragmente) hybridisiert und unter Einsatz des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I durch Einbau der Desoxyribonucleosidtriphosphate dATP, dGTP, dTTP und [α - 32 P]-dCTP verlängert wurden. Die in Abhängigkeit von der DNA-Menge variierende Reaktionszeit von 2-12 Stunden konnte durch Verwendung von Nonamer-Primern auf 10 Minuten reduziert werden. Diese Variante der ursprünglichen Methode liegt dem „*MegaprimeTM DNA Kit*“ (Amersham-Pharmacia Biotech) zugrunde, der für die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten eingesetzt wurde wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.22.2. Reinigung radioaktiv markierter DNA über eine Biogel P30-Säule

Die Abtrennung radioaktiv markierter DNA von freien Nucleotiden erfolgte durch eine Biogel P30-Säulenchromatographie wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.23. Hybridisierung von DNA- und RNA-Filtern mit DNA-Sonden

Die auf Nylonmembranen fixierten DNA-Fragmente und RNAs wurden mit radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert (Sambrook und Russell, 2001). Die Hybridisierung erfolgte grundsätzlich unter stringenten Bedingungen bei 68 °C wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.24. Isolierung von Protein aus Gewebekulturzellen

4.24.1. Extraktion von Gesamtprotein aus Gewebekulturzellen

Die Gewebekulturzellen wurden nach Entfernen des Mediums zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Zellen in 100 mm-Kulturschalen wurden dann mit 1 ml, in 200 mm-Kulturschalen mit 2 ml PBS überschichtet. Anschließend wurden die Zellen mit „Rubber Policeman“-Schabern vom Schalenboden abgelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Es folgte Zentrifugation bei 2.500 rpm für 5 Minuten bei 4 °C. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment entweder bei -70 °C gelagert oder sofort in 2 ml PBS resuspendiert und in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment in eiskaltem RIPA-Puffer (100 μ l pro 100 mm-Schale, 200 μ l pro 200 mm-Schale) aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 12.000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und zur dauerhaften Lagerung bei -70 °C eingefroren.

RIPA-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 7,5	+ Proteaseinhibitor-Gemisch (kurz vor Gebrauch zugeben):
150 mM NaCl	1 mM PMSF
1 mM EDTA	2,5 µg/ml Aprotinin
1 % (v/v) Nonidet-P40	1 µg/ml Pepstatin
0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat	4 µg/ml Leupeptin
0,1 % (w/v) SDS	40 µg/ml Bestatin

4.24.2. Extraktion von Kernprotein aus Gewebekulturzellen

Die Gewebekulturzellen wurden nach Entfernen des Mediums zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Zellen in 100 mm-Kulturschalen wurden dann mit 1 ml, in 200 mm-Kulturschalen mit 2 ml Lysepuffer überschichtet. Die lysierten Zellen wurden mit „Rubber Policeman“-Schabern vom Schalenboden abgelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Nach Zentrifugation bei 4.000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C und Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment zum Aufbrechen der noch intakten Zellkerne in SE-Puffer (50 µl pro 100 mm-Schale, 100 µl pro 200 mm-Schale) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 12.000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und zur dauerhaften Lagerung bei -70 °C eingefroren.

Lysepuffer

0,6 % (v/v) Nonidet-P40
150 mM NaCl
10 mM Tris/HCl, pH 7,4
1 mM EDTA

SE-Puffer

10 mM HEPES	+ Proteaseinhibitor-Gemisch (kurz vor Gebrauch zugeben):
0,1 mM EGTA	1 mM PMSF
0,1 mM EDTA	2,5 µg/ml Aprotinin
1,5 mM MgCl ₂	1 µg/ml Pepstatin
420 mM NaCl	4 µg/ml Leupeptin
25 % (v/v) Glycerol	40 µg/ml Bestatin
	1 mM EDTA

4.25. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Konzentrationsbestimmung von isoliertem Protein wurden zunächst 3-5 µl unverdünnte Proteinlösung mit 1 ml zuvor 1:5 in *aqua bidest.* verdünntem BIORAD-Reagenz vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion (E) des Gemischs bei 595 nm photometrisch gegen die Extinktion des verdünnten BIORAD-Reagenz als Referenzwert vermessen. Die Ermittlung der Proteinkonzentration in µg/µl erfolgte durch Vergleich der gemessenen Extinktion mit den Werten einer BSA-Eichkurve.

4.26. Immundetektion von Proteinen (Western Analyse)

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen nach Towbin (1985) wurden diese zunächst durch denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, anschließend mittels Elektrotransfer auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen übertragen und schließlich mit Hilfe spezifischer Antiseren sowie einem gegen diese Antiseren gerichteten, enzymgekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen.

4.26.1. Auftrennung der Proteine im denaturierenden Polyacrylamidgel

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels eindimensionaler, vertikaler SDS-PAGE nach dem System von Laemmli (1970). Die eigentliche Auftrennung wurde in einem Minigel mit 5 %iger Sammel- und 10 %iger Trenngelschicht sowie einem Tris/Glycin-Laufpuffer vorgenommen. Zur Herstellung des Gels wurden zunächst zwei Glasplatten mit technischem Ethanol gereinigt, unter Verwendung von Abstandhaltern (Dicke 1 mm) und Halteklammern zusammengebaut und mit 1,5 %iger Agarose abgedichtet. Danach wurde die Trenngel-Lösung zwischen die Gelplatten bis auf eine Höhe von etwa 2-3 cm unterhalb des oberen Plattenrandes gegossen und mit einigen Tropfen Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol abgenommen, die Sammelgel-Lösung auf das Trenngel gegossen, und der Gelkamm eingeschoben. Die Gel-Lösungen waren folgendermaßen zusammengesetzt:

Trenngel-Lösung (10 %)

5,3 ml H₂O
1,2 ml Trenngelpuffer (1 M Tris/HCl, pH 8,8)
3,3 ml 30 % Acrylamidlösung
100 µl 10 % SDS
5 µl TEMED
100 µl 10 % APS

Sammelgel-Lösung (5 %)

3,5 ml H₂O
620 µl Sammelgelpuffer (470 mM Tris/HCl, pH 6,8)
830 µl 30 % Acrylamidlösung
50 µl 10 % SDS
5 µl TEMED
50 µl 10 % APS

Für den Gellauf in 1 × Laufpuffer wurden 5-20 µl der aufzutragenden Proben (30-100 µg Protein) mit einem geeigneten Volumen 4 × Probenpuffer versetzt, für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert und neben 10 µl einer 10 kDa-Proteinleiter in die Geltaschen geladen. Der Lauf erfolgte bei ca. 100 V und 500 mA.

4 × Probenpuffer

170 mM Tris/HCl pH, 6,8
400 µl 2-Mercaptoethanol
40 % (v/v) Glycerin
0,4 % (w/v) BPB
4 % (w/v) SDS

10 × Laufpuffer (pH 8,3)

250 mM Tris-Base
1,92 M Glycin
1 % SDS

4.26.2. Transfer von Protein auf Nylonmembranen (Western Blot)

Die Übertragung von mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf PVDF-Membranen erfolgte im elektrischen Feld nach dem „Semidry“-Verfahren. Dazu wurde nach Beendigung des Gellaufs zunächst die Sammelgelschicht von der Trenngelschicht abgetrennt, und das Trenngel in Transferpuffer inkubiert. Ein Stück PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Bedford, U.S.A.) wurde auf Trenngelgröße zurecht geschnitten, kurz in Methanol geschwenkt, in *aqua bidest.* gespült und ebenfalls in Transferpuffer inkubiert. Zuletzt wurden insgesamt acht Whatman-3MM Papiere von Trenngelgröße in Transferpuffer eingeweicht. Für den Transfer wurden die einzelnen Komponenten luftblasenfrei von unten (Anode) nach oben (Kathode) wie folgt aufgebaut:

- 4 Papiere Whatmann-3MM
- Membran
- Gel
- 4 Papiere Whatmann-3MM

Der Elektrotransfer erfolgte bei ca. 0,6 mA pro cm² Gelfläche über Nacht oder bei ca. 1,5 mA pro cm² Gelfläche für 90 Minuten.

4.26.3. Immundetektion

4.26.3.1. Nachweis durch chromogene Detektion

Nach erfolgtem Elektrotransfer wurden die Proteinbanden auf der Membran ggf. zunächst mit Ponceau-S-Lösung angefärbt, um die Transfereffizienz zu kontrollieren und den Molekulargewichtsmarker sichtbar zu machen. Dazu wurde die Membran für ca. 30 Sekunden in der Färbelösung geschwenkt und dann zwei Mal mit *aqua bidest.* gespült. Die Banden der 10 kDa-Leiter wurden mit Kugelschreiber nachgezeichnet, die Markerspur abgetrennt, und die Proteinbanden mit TBST wieder entfärbt. Zur Unterbindung unspezifischer Antikörper-Anlagerungen wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken in Blocklösung inkubiert. Dann wurde der Primärantikörper in Blocklösung in einem empirisch ermittelten Verhältnis verdünnt, und die Membran in der Primärantikörper-Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach Entfernen der Primärantikörper-Lösung erfolgte sechsmaliges Waschen für je 5 Minuten in Waschlösung. Danach wurde ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Sekundärantikörper je nach Herstellerangaben in Blocklösung verdünnt, und die Membran in der Sekundärantikörper-Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach erneutem sechsmaligem Waschen für je 5 Minuten in Waschlösung folgte die chromogene Detektion der Proteine durch Schwenken der Membran in frisch angesetzter Entwicklungslösung bis zum Eintritt einer dunkelvioletten Färbung. Zum Stoppen der Reaktion wurde die Membran zweimal in *aqua bidest.* gewaschen. Anschließend wurde die Membran getrocknet, in Folie eingeschweißt und lichtgeschützt gelagert.

Blocklösung

PBS mit 5 % (w/v) Milchpulver oder
 PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20
 und 0,1 % (v/v) Triton X-100

Waschlösung (= TBST)

1 M NaCl
 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0
 0,5 % (v/v) Tween 20

Entwicklungslösung

33 µl BCIP + 66 µl NBT pro 10 ml
 Alkalische Phosphatase (AP)-Puffer

AP-Puffer

100 mM Tris-Base, pH 9,5
 100 mM NaCl
 4 mM MgCl₂

4.26.3.2. Nachweis durch „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL)-Detektion

Zum Proteinnachweis mit erhöhter Sensitivität wurde das ECL-Detektionsverfahren mit Hilfe des *E-ECL-Kits* (NEN Life Science Products, Inc., Boston, U.S.A.) angewandt. Dabei wird nach Oxidation von zyklischem Diacylhydrazid durch Peroxidase unter alkalischen Bedingungen eine Chemilumineszenz hervorgerufen, die durch Exposition auf Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Die Behandlung der Membran nach erfolgtem Elektrotransfer verläuft analog zu der bereits in Abschnitt 3.26.3.1. beschriebenen Vorgehensweise bis zur Inkubation mit einem hier Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Danach wurde für 4 mal 5 Minuten in Waschlösung 1, dann 2 mal 5 Minuten in Waschlösung 2 gewaschen. Die ECL-Detektion wurde in der Dunkelkammer durchgeführt. Dazu wurde die Membran auf Whatman-3MM Papier getrocknet und eine 1:1-Mischung der E-ECL-Lösungen 1 und 2 vorbereitet. Die trockene Membran wurde dann für ca. 1 Minute in der E-ECL-Mischung geschwenkt. Schließlich wurde die Membran erneut getrocknet, auf Whatman-3MM Papier fixiert und auf Röntgenfilm je nach Intensität des Signals für 15 Sekunden bis 5 Minuten exponiert.

Blocklösung

PBS mit 0,05-0,5 % (v/v) Tween 20
 und 5 % (w/v) Milchpulver
 oder
 PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20
 und 0,1 % (v/v) Triton X-100

Waschlösung 1 = BlocklösungWaschlösung 2

PBS mit 0,05-0,5 % (v/v) Tween 20

4.27. Enzymatische Reaktionen zur Modifizierung und Klonierung von DNA**4.27.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen**

Die Restriktionsspaltungen von DNA wurden unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen und Verwendung mitgelieferter Puffer durchgeführt wie beschrieben (Vogt, 1997).

Folgende Puffer wurden für die Spaltungsreaktionen eingesetzt:

Puffer (Hersteller)	Zusammensetzung
10 × One-Phor-All-Buffer Plus (OPA⁺) (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg)	100 mM Tris/Acetat pH 7,5 100 mM Mg-Acetat 500 mM K-Acetat
10 × Universal Buffer (U.B.) (Stratagene, Heidelberg)	250 mM Tris/Acetat pH 7,6 1 M K-Acetat 100 mM Mg-Acetat 5 mM 2-Mercaptoethanol 100 µg/ml BSA
10 × Optimal Buffer (O.B.) #1 (Stratagene, Heidelberg)	250 mM Tris/HCl pH 7,7 100 mM MgCl ₂ 10 mM DTT 300 µg/ml BSA
10 × REactTM1 (Gibco-BRL, Life Technologies, Eggenstein)	500 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM MgCl ₂
10 × REactTM2 (Gibco-BRL, Life Technologies, Eggenstein)	500 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM MgCl ₂ 500 mM NaCl
10 × REactTM3 (Gibco-BRL, Life Technologies, Eggenstein)	500 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM MgCl ₂ 1 M NaCl
10 × REactTM4 (Gibco-BRL, Life Technologies, Eggenstein)	200 mM Tris/HCl pH 7,4 50 mM MgCl ₂ 500 mM KCl
10 × NEBuffer 3 (New England Biolabs, Schwalbach)	500 mM Tris/HCl 100 mM MgCl ₂ 10 mM DTT pH 7,9 bei 25 °C
10 × NEBuffer 4 (New England Biolabs, Schwalbach)	200 mM Tris/Acetat 500 mM K-Acetat 100 mM Mg-Acetat 10 mM DTT pH 7,9 bei 25 °C

4.27.2. Umwandlung überstehender 5'- oder 3'-Enden von DNA-Restriktionsfragmenten in glatte Enden

Um zwei DNA-Fragmente mit inkompatiblen überstehenden Enden oder stumpfen und überstehenden Enden miteinander ligieren zu können, wurden 5'- und 3'- Überhänge unter Einsatz von T4 DNA-Polymerase in glatte Enden umgewandelt („Enden-polishing“, Sambrook und Russell, 2001, verändert). Die Durchführung erfolgte wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.27.3. Dephosphorylierung von DNA

Um bei Ligationen eine Rezirkularisierung linearisierter Klonierungsvektoren zu vermeiden, werden die 5'-terminalen Phosphatreste der Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase („calf intestinal alkaline phosphatase“, CIAP) abgespalten (Chaconas und van de Sande, 1980). Auf diese Weise kann der Vektor weder intra- noch intermolekulare Reaktionen eingehen und nur mit der zu klonierenden DNA ligiert werden, da letztere eine der beiden fehlenden 5'-Phosphatgruppen liefert.

Obwohl jeweils eine Phosphodiesterbindung dabei unverknüpft bleibt, und erst nachträglich von bakteriellen Enzymen gebildet wird, kann mit diesen Molekülen effizient transformiert werden. Die Dephosphorylierung wurde wie beschrieben durchgeführt (Vogt, 1997).

4.27.4. DNA-Ligationen

Bei einer Standardreaktion wurden insgesamt 100-1000 ng DNA in einem Reaktionsvolumen von 15-20 µl bei 14 °C oder Raumtemperatur ligiert wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.28. Transformation kompetenter Bakterien

4.28.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Um Bakterien zur effizienten Aufnahme von Plasmid-DNA zu befähigen, wurde die Bakterienmembran durch CaCl₂-Behandlung und anschließenden Kälteschock durchlässig gemacht (Inoue *et al.*, 1990). Die dafür erforderliche Prozedur wurde mit Bakterien der *E. coli*-Stämme XL1-Blue und TG-1 wie beschrieben durchgeführt (Vogt, 1997).

4.28.2. Transformation

Die Transformation aufnahmebereiter Bakterien mit Plasmid-DNA erfolgte nach der von Hanahan (1983) etablierten Methode wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.29. Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Didesoxy-Methode, die auf dem basenspezifischen Abbruch einer enzymkatalysierten Primer-Verlängerungsreaktion basiert (Sanger *et al.*, 1977). Sie wurde mit Hilfe des „T7-Sequencing™ Kit“ (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) vorgenommen, bei dem im Gegensatz zu dem ursprünglich verwendeten Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I klonierte T7 DNA-Polymerase eingesetzt wird (Tabor *et al.*, 1987). Die Sequenzierungsreaktionen, sowie deren Analyse in 6 %igen, denaturierenden Polyacrylamidgelen wurde wie beschrieben durchgeführt (Vogt, 1997).

4.30. Reporter-gen-Analysen

Mit Hilfe von Reporter-gen-Analysen können genregulatorisch aktive DNA-Sequenzabschnitte in Säugerzellen untersucht werden (Alam und Cook, 1990). Enhancer- und Promotorelemente werden dazu mit bzw. ohne zusätzlichen Fremdpromotor und/oder –enhancer vor sogenannte Reporter gene kloniert und in eukaryontische Zellen durch transiente Transfektion eingebracht. Die in den präparierten Extrakten der transfizierten Zellen gemessene Enzymaktivität korreliert mit der transkriptionsfördernden Aktivität der regulatorischen Sequenzen. Durch Co-Transfektion mit Effektorplasmiden, die klonierte Transkriptionsfaktoren exprimieren, kann zudem der Einfluss solcher Faktoren auf die regulatorischen Elemente studiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Reporterplasmide mit dem Luciferase-Gen von *Photinus pyralis* verwendet (de Wet *et al.*, 1987).

Schwankungen in der Transfektionseffizienz wurden durch Co-Transfektion des β -Galaktosidase-Referenzplasmids pCMV-Gal, das als interner Standard diente, kontrolliert und ausgeglichen. Die Messungen der Enzymaktivitäten wurden im linearen Bereich durchgeführt.

4.30.1. Calciumphosphat-Transfektion

Die Übertragung von Plasmid-DNA in Säugerzellen erfolgte mittels Calciumphosphat-Präzipitation nach der Methode von Chen und Okayama (1987). Dazu wurden in zwei bis drei parallelen Ansätzen je 3 μg Luciferase-Reporterplasmid, 0,5 μg Standardisierungsplasmid pCMV-Gal, gegebenenfalls 0,1-2,5 μg Effektorplasmid sowie pBluescript auf eine Gesamtmenge von 6,5 μg DNA aufgefüllt. Die Transfektionsprozedur wurde wie beschrieben durchgeführt (Vogt, 1997).

4.30.2. Messung der Luciferase-Aktivität in eukaryontischen Zellextrakten

Die Herstellung eukaryontischer Zellextrakte wurde nach dem Verfahren von Brasier (1989) wie beschrieben durchgeführt (Vogt, 1997). In der Regel wurden 30-50 μl des Extrakts zur Messung der Luciferase-Aktivität eingesetzt. Dieser Messung liegt die durch Luciferase katalysierte ATP-abhängige Oxidation des Luciferins zugrunde, die in der Emission von Licht ($\lambda = 562 \text{ nm}$) resultiert, dessen Intensität bei Substrat-Überschuss proportional zur Luciferase-Konzentration im Ansatz ist (de Wet *et al.*, 1987). Die bei der Reaktion frei werdenden Photonen wurden in zwei verschiedenen Luminometer-Geräten detektiert. Für die Messung im Luminometer „Lumat LB9501“ (Berthold) wurden je 10-100 μl Extrakt zu 360 μl Luciferase-Reaktionspuffer in ein Plastikröhrchen pipettiert und vermischt. Im Gerät wurden zu dieser Probe dann automatisch 100 μl Luciferin-Lösung injiziert und die emittierten Photonen über einen Integrationszeitraum von 20 Sekunden gemessen. Für die Messung im Luminometer „lucy1“ (Anthos) wurden je 30-50 μl Extrakt in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Im Gerät wurden dazu automatisch 150 μl Luciferase-Reaktionspuffer und 50 μl Luciferin-Lösung injiziert und die emittierten Photonen innerhalb einer

Integrationszeit von 1-10 Sekunden vermessen. Test-Messungen mit bereits ausgewerteten Extrakten zeigten, dass sich bei beiden Geräten vergleichbare relative Messwerte ergaben.

Triton-Lysepuffer

25 mM Glycylglycin pH 7,8
15 mM MgSO₄
4 mM EGTA
1 % (v/v) Triton X-100
in *aqua bidest.*, Lagerung bei 4 °C
1 mM DTT (unmittelbar vor Gebrauch zugeben)

Luciferase-Reaktionspuffer

25 mM Glycylglycin pH 7,8
15 mM MgSO₄
1 mM DTT
in *aqua bidest.*
5 mM ATP (unmittelbar vor Gebrauch zugeben)

Luciferin-Lösung

25 mM Glycylglycin pH 7,8
15 mM MgSO₄
in *aqua bidest.*
0,25 mM Luciferin (sehr lichtempfindlich, unmittelbar vor Gebrauch zugeben)

4.30.3. Messung der β -Galaktosidase-Aktivität in eukaryontischen Zellextrakten

Um Schwankungen der Transfektionseffizienzen erfassen und abgleichen zu können, wurde das Plasmid pCMV-Gal, welches stromabwärts von dem hCMV-Promotor/Enhancer das β -Galaktosidase-Gen aus *E. coli* enthält, mit dem jeweiligen Luciferase-Reporterplasmid co-transfiziert. Zur Messung der β -Galaktosidase-Aktivität wurden 10-30 μ l jedes Zellysats in eine auf Eis stehende 96-Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt. Nach Zugabe von jeweils 200 μ l Reaktionspuffer wurde die Platte bis zum Eintreten einer leichten Gelbfärbung der Proben bei Raumtemperatur oder bei 37 °C inkubiert. In einem ELISA-Reader wurde dann die optische Dichte der Proben gegen den Referenzwert des reinen Triton-Lysepuffers bei 405 nm gemessen. Um eine auf Schmutz, Kratzer, oder Einschlüsse im Plastikmaterial zurückzuführende, unspezifische Absorption auszuschließen, wurde eine zusätzliche Messung bei 620 nm vorgenommen und automatisch von den Werten bei 405 nm subtrahiert.

β -Galaktosidase-Reaktionspuffer

100 mM Natriumphosphat pH 7,5
10 mM KCl
1 mM MgSO₄
50 mM 2-Mercaptoethanol
in *aqua bidest.*
1 \times ONPG (unmittelbar vor Gebrauch zugeben)

100 mM Natriumphosphat pH 7,5

41 ml 200 mM Na₂HPO₄
9 ml NaH₂PO₄
in *aqua bidest.*

4 \times ONPG
4 mg/ml ONPG in
100 mM Natriumphosphat pH 7,5

4.30.4. Auswertung der Reporteragen-Analysen

Die relative Luciferase-Aktivität (RLA) entspricht dem Quotienten aus der gemessenen absoluten Luciferase-Aktivität (ALA) und dem zugehörigen β -Galaktosidase-Wert (β -Gal):

$$RLA = \frac{ALA}{\beta - Gal}$$

4.31. Doxyzyklin-induzierbare Genexpression in Säugerzellen (Verwendung des Tet-On-Genexpressions-Systems)

Die Etablierung von HeLa-Zellen mit stabil induzierbarer *APM-1*-Expression wurde mit Hilfe des „Tet-On Gene Expression System“ der Firma CLONTECH GmbH (Heidelberg) durchgeführt. Für die Experimente in dieser Arbeit wurde die ebenfalls von CLONTECH bezogene Zelllinie „HeLa Tet-On“ (Cat. # C3000-1) verwendet, welche den rekombinanten Transkriptionsaktivator *rtTA* bereits stabil exprimiert. Die Expression von *rtTA* wird durch Gabe des Tetrazyklin-Derivats Doxyzyklin induziert. Die zweite Komponente ist eine stabil in das zelluläre Genom integrierte Kopie eines Plasmids, das das Gen von Interesse (hier: *APM-1*) unter Kontrolle eines Tet-responsiven Elements (TRE) exprimiert. Die Bindung von *rtTA* an TRE aktiviert die Transkription des inserierten Gens. Die rekombinanten pTRE-APM-1 Plasmide wurden mit dem mitgelieferten Selektionsplasmid pTK-Hyg co-transfiziert, um die Selektion stabiler Transfektanten mittels Hygromycin zu gestatten.

4.31.1. Transfektion und Selektion einer doppelt stabilen Tet-On Zelllinie

Zunächst wurden die Zellen der HeLa Tet-On Zelllinie, welche in Medium mit 200 µg/ml G418 (Geneticin, Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein) gehalten wurden, in 10-cm-Kulturschalen mit einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Schale 24 Stunden vor der Transfektion ausgesät. Die Transfektion wurde mittels Calciumphosphat-Präzipitation vorgenommen (siehe Kap. 4.30.1.). Je 19 µg pTRE-APM-1-DNA und 1 µg pTK-Hyg-DNA wurden mit 500 µl 0,25 M CaCl₂ und 500 µl 2 × BBS vermischt und pro Schale eingesetzt. Medium, das neben G418 zusätzlich Hygromycin B in einer Konzentration von 400 µg/ml enthielt, wurde 1 bis 2 Tage nach der Transfektion zu den Zellen gegeben, um auf Hygromycin-Resistenz zu selektionieren. Das mit dem Antibiotikum versetzte Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

Nach zweiwöchiger Selektion wurde von den transfizierten Zellen das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Danach wurden insgesamt ca. 30 möglichst große, gut isolierte Kolonien unter Verwendung einer in 80 %igem Ethanol sterilisierten Pinzette mit in Trypsinlösung getränkten Quadraten aus Whatman 3MM-Papier (Kantenlänge 3-4 mm) bedeckt und für 2-3 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (die Papierquadrate waren zuvor autoklaviert worden). Nach der Inkubation wurden die Papierquadrate mit der Pinzette, die zwischendurch immer in PBS gespült und abgeflammt wurde, kurz angedrückt und mitsamt etwa 20-40 abgelösten Zellen in die Schälchen einer 24-,well“-Platte, die jeweils 1 ml Selektionsmedium enthielten, transferiert. Es folgte Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂. Am nächsten Tag wurden die Papierquadrate aus den Schälchen entfernt, und die abgelösten Zellen unter ständiger Kontrolle weiter kultiviert. Sobald sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte, wurden die Zellen trypsiniert und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt.

4.31.2. Qualitätskontrolle und Aufbewahrung der doppelt stabilen Zelllinien

Zur Überprüfung der Hygromycin-resistenten Klone auf Dox-induzierbare Genexpression wurden die Zellen in je zwei 75-175 cm²-Kulturschalen ausgesät, und in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von 1 µg/ml Dox für 48-72 Stunden kultiviert. Die *APM-1*-Expression wurde anschließend mittels Northern Blot-Analyse und RT-PCR untersucht. Zusätzlich wurde die Gegenwart der in chromosomale DNA integrierten TRE-APM-1-Kassette mittels Southern Blot-Analyse überprüft. Von geeigneten Klonen mit induzierbarer *APM-1*-Expression bei niedrigem Hintergrund (d.h. nicht-induziertem Expressionsniveau) wurden zur Gewährleistung eines erneuerbaren Vorrats von Zellen bei -196 °C gefrorene Aliquots angelegt.

4.32. Klonales Zellwachstum unter Selektionsbedingungen („Colony Formation Assay“)

Der Einfluss eines induziert überexprimierten Gens (hier: *APM-1*) auf das klonale Wachstum von Zellen unter Selektionsbedingungen wurde mit dem sogenannten „Colony Formation Assay“ untersucht (nach Gorman *et al.*, 1983, verändert). Dazu wurden die Zellen einer HeLa Tet-On-Zelllinie mit stabil integrierter TRE-APM-1-Kassette mit und ohne Doxyzyklin-Behandlung unter Selektionsbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die gebildeten Kolonien gefärbt und analysiert.

Zunächst wurden die Zellen in 10-cm-Kulturschalen mit einer Ausgangsdichte von jeweils 500 Zellen pro Schale in Medium ausgesät, das G418 (Geneticin) in einer Konzentration von 200 µg/ml und Hygromycin B in einer Konzentration von 400 µg/ml enthielt. Nach 24 Stunden erhielten die Zellen, in denen die *APM-1*-Expression induziert werden sollte, für die gesamte Dauer des Experiments Medium mit zusätzlich 1 µg/ml in *aqua bidest.* gelöstem Doxyzyklin-HCl. Danach wurde das Kulturmedium alle 2-3 Tage gewechselt. 12-14 Tage nach Beginn der Induktion wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt: hierfür erfolgte nach Dekantieren des Mediums und zweimaligem Waschen mit kaltem PBS die Fixierung der Zellen in einer 3,7 % Formaldehydlösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Abgießen der Formaldehydlösung wurden die Zellen erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur in einer Kristallviolett-Lösung inkubiert. Schließlich wurde die Färbelösung abgegossen, und die Platten wurden unter fließendem Wasser gründlich gespült und getrocknet.

Kristallviolett-Lösung

5 g Kristallviolett

1,7 g NaCl

80 ml Formaldehyd-Lösung (37 %)

223 ml Ethanol abs.

ad 1 l mit *aqua ad iniectabilia*, Lagerung bei Raumtemperatur

4.33. Analyse von Genexpressions-Profilen mit Hilfe von cDNA-Arrays

Nucleinsäure-Arrays werden benutzt, um die Expressionsmuster bestimmter Gene unter dem Einfluss verschiedener Testbedingungen vergleichen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde das „Atlas™ cDNA Expression Array“-System der Firma CLONTECH GmbH (Heidelberg) verwendet, um die Expressionsprofile menschlicher Gene bei Überexpression des *APM-1*-Gens im Vergleich mit den korrespondierenden Profilen bei endogener *APM-1*-Expression in Tumorzellen zu analysieren.

Dazu wurde Gesamt-RNA aus entsprechend behandelten und unbehandelten Tumorzellen isoliert. Nach poly(A)⁺-Selektion der RNA (siehe Kap. 4.18.) wurden durch reverse Transkription unter Einbau von ³²P-markierten Nucleotiden radioaktiv markierte cDNAs hergestellt, die mit den cDNA-Arrays hybridisiert wurden. Nach dem Abwaschen unspezifisch gebundener cDNAs wurden die Filter auf Röntgenfilm exponiert. Das Signalmuster auf den exponierten Filmen wurde anschließend durch einen Scanvorgang digitalisiert und ausgewertet. Für die hier dokumentierten Experimente wurden die cDNA-Arrays einschließlich der mitgelieferten Komponenten des Baukastensystems „Atlas™ Human Cancer 1.2 Array“ (Cat.# 7851-1) verwendet. Bei den Arrays handelt es sich um insgesamt vier identische Nylonmembranen, auf denen cDNAs immobilisiert sind, die jeweils 1176 humane Gene verschiedener Kategorien repräsentieren. Die genaue Durchführung des Experiments erfolgte gemäß den im „Atlas™ cDNA Expression Arrays User Manual“ (PT3140-1) beschriebenen Anweisungen.

4.34. Gekoppelte *in-vitro*-Transkription/Translation von Plasmid-DNA

Um von einem klonierten Gen die Größe des exprimierten Proteins zu bestimmen, kann eine *in-vitro*-Transkription von Plasmid-DNA mit anschließender *in-vitro*-Translation der produzierten mRNA durchgeführt werden. Die Proteinsynthese verläuft unter Einbau von [³⁵S]-Methionin, und das Protein wird durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Autoradiographie analysiert. Heutzutage stehen gekoppelte *in-vitro*-Transkriptions-/Translationssysteme zur Verfügung, bei denen die Isolierung der mRNA nach der *in-vitro*-Transkription nicht mehr notwendig ist.

4.34.1. *In-vitro*-Transkriptions-/Translations-Reaktion

Die Durchführung der Reaktionen erfolgte mit Hilfe des „TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System“ (Hurst *et al.*, 1996; Promega, Boehringer-Ingelheim). Dabei wird die Transkription von Plasmid-DNA unter Kontrolle eines T7-Promotors durch die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 mit einer Translation im zellfreien Kaninchen-Retikulozyten-Lysat gekoppelt.

Das verwendete TNT®-T7-Quick-System kombiniert die separaten Standardkomponenten des gewöhnlichen Retikulozyten-Lysat Systems (T7 RNA-Polymerase, rNTPs, Salze, Aminosäure-Mischung ohne

Methionin und den Ribonuclease-Inhibitor RNasin) zusammen mit der Retikulozyten-Lysat-Lösung in einem einzigen „Master-Mix“. Zur gekoppelten *in-vitro*-Transkription/Translation wurden die einzelnen Komponenten auf Eis folgendermaßen zusammenpipettiert:

- 20 µl „TNT® T7 Quick Master Mix“
- 1 µg Matrizen-DNA
- 3 µl [³⁵S]-Methionin (1.000 Ci/mmol, 13 mCi/ml)
- ad 25 µl Gesamtvolumen mit Nuclease-freiem H₂O

Nach Inkubation für 90 Minuten bei 30 °C konnte die Reaktion bei -20 °C gelagert oder direkt zur SDS-PAGE-Analyse der Translationsprodukte eingesetzt werden.

4.34.2. Analyse der Translationsprodukte im denaturierenden Proteingel

Die Analyse der neu synthetisierten Proteine erfolgte mittels eindimensionaler, vertikaler SDS-PAGE in einem Midigel mit 3 %iger Sammel- und 10%iger Trenngelschicht sowie einem Tris/Glycin-Laufpuffer wie beschrieben (Vogt, 1997).

4.35. Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR)

4.35.1. Konventionelle PCR mit *Taq*-Polymerase

Für PCR-Reaktionen mit DNA-Matrizen geringer Komplexität und einem GC-Gehalt bis ca. 60 % wurden die aus dem Bakterienstamm *Thermus aquaticus* YT1 isolierte *Taq*-Polymerase und die mitgelieferten Komponenten (Reaktionspuffer, MgCl₂) der Firma Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein) verwendet. Die Reaktionen wurden in dünnwandigen 0,5-ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein Ansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

Komponente	Ansatz
DNA-Matrize	10 ng Plasmid-DNA oder 250 ng genomische DNA
10 × PCR-Puffer	5 µl
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	1 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
Primer ^a (je 10 pmol/µl)	je 5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U ^b /µl)	0,4 µl
H ₂ O	ad 50 µl
Gesamt	50 µl

^a Bezeichnungen und Positionen sind Kap. 4.5. zu entnehmen

^b 1 U katalysiert den Einbau von 10 nmol dNTP in Säure-präzipitierbares Material in 30 Minuten bei 74 °C

Bei drei und mehr Reaktionen pro Ansatz wurde ein Prä-Mix der jeweils gemeinsamen Komponenten mit 10 % Überschuss zum Ausgleich von Pipettierfehlern angesetzt.

10 × PCR-Puffer:
200 mM Tris/HCl, pH 8,4
500 mM KCl

4.35.2. PCR mit Advantage-GC 2 PCR Kit

Das Advantage® GC 2-System (CLONTECH GmbH, Heidelberg) ermöglicht die Amplifikation nahezu aller GC-reichen Sequenzen (mit einem GC-Gehalt von bis zu 90 %), die mit konventionellen Methoden nicht oder nur schwer zugänglich sind. Es liefert einen Enzym-Mix aus einer verbesserten *Taq*-Polymerase (*AdvanTaq™ DNA Polymerase*) als Primärpolymerase und geringen Mengen einer Polymerase mit „proofreading“-Eigenschaften. Der Mix enthält zudem einen *TaqStart™* Antikörper, der für einen automatischen „Hot Start“ der Reaktion sorgt. Darüber hinaus erlaubt ein optimierter Reaktionspuffer mit DMSO, sowie das *GC-Melt™*-Reagenz eine verbesserte Amplifikation GC-reicher Matrizen durch Schwächung von GC-Basenpaarungen und Destabilisierung von DNA-Sekundärstrukturen. Die Reaktionen wurden in dünnwandigen 0,5-ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein Ansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

Komponente	Ansatz
DNA-Matrize	1-10 ng Plasmid-DNA oder 250 ng genomische DNA
5 × GC 2 PCR-Puffer	10 µl
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	1 µl
5 M GC-Melt	5 µl
Primer ^a (je 10 pmol/µl)	je 3 µl
50 × GC 2 Polymerase-Mix	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl
Gesamt	50 µl

^a Bezeichnungen und Positionen sind Kap. 4.5. zu entnehmen

Bei drei und mehr Reaktionen pro Ansatz wurde ein Prä-Mix der jeweils gemeinsamen Komponenten mit 10 % Überschuss zum Ausgleich von Pipettierfehlern angesetzt.

5 × GC 2 PCR-Puffer
200 mM Tricine-KOH pH 9,2
75 mM KOAc
17,5 mM Mg(OAc)₂
25 % Dimethylsulfoxid (DMSO)
18,75 µg/ml Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“, BSA)
0,025 % Nonidet-P40
0,025 % Tween-20

4.35.3. Reaktionsparameter

Alle PCR-Reaktionen erfolgten in einem Peltier-Thermocycler der Firma Biozym unter Verwendung folgender Programme:

L12/2

Denaturierung	94 °C	5 min	} 33-40 ×
Denaturierung	94 °C	1 min	
„Annealing“	65 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Abschluss-Elongation	72 °C	10 min	
Ende	4 °C	∞	

L12/2/67: wie „L12/2“, jedoch mit **67 °C** „Annealing“-Temperatur

L12/2/70: wie „L12/2“, jedoch mit **70 °C** „Annealing“-Temperatur

L12/2/72: wie „L12/2“, jedoch mit **72 °C** „Annealing“-Temperatur

4.36. Sequenzierung von PCR-Produkten nach der „Cycle Sequencing“-Methode

Zur direkten Sequenzierung von PCR-Produkten wurde die „Cycle-Sequencing“-Methode mit Hilfe des *Circum Vent™ Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing Kit* (New England Biolabs, Schwalbach) durchgeführt. Die Methode besitzt unter anderem den Vorteil, dass aufgrund einer linearen Amplifikation von markiertem Produkt wesentlich geringere Mengen Matrizen-DNA benötigt werden als bei einer Standard-Reaktion. Basierend auf der Dideoxynucleotid-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) wird bei dieser Reaktion ein geeigneter, hier mit $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-rATP}$ 5'-endmarkierter Oligonucleotid-Primer an einen komplementären, durch Hitzedenaturierung einzelsträngig gemachten DNA-Abschnitt angelagert („Annealing“). Der Primer-Matrizen-Komplex wird mit der Exonuclease-defizienten DNA Polymerase aus *Thermococcus litoralis*, Vent_{TR}® (exo-) DNA Polymerase (Perler *et al.*, 1992; Kong *et al.*, 1993) unter Anwesenheit von dNTPs und ddNTPs inkubiert. Repetitive Zyklen aus Denaturierung, „Annealing“ und Elongation kleiner Mengen Matrizen-Moleküle bewirken dann die lineare Amplifikation der Reaktionsprodukte und erzeugen Sequenzierprodukte von starker Signalintensität.

4.36.1. 5'-Endmarkierung von Oligonucleotid-Primern

Folgende Komponenten wurden in einem 0,5-ml-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

- 2 µl H₂O
- 1 µl 10 × Polynucleotidkinase-Puffer
- 1 µl Primer (10 pmol/µl)
- 5 µl $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-rATP}$
- 1 µl T4-Polynucleotidkinase (1 U^a/µl)

^a 1 Richardson-Unit katalysiert den Einbau von 1 nmol Säure-unlöslichem [³²P] in 30 Minuten bei 37 °C.

Nach Inkubation des Ansatz für 45 Minuten bei 37 °C wurde die Reaktion durch 2-minütige Hitzedenaturierung des Enzyms bei 90 °C gestoppt. Sequenzen und Positionen der Primer sind in Kap. 4.5. angegeben.

10 × T4-Polynucleotidkinase-Puffer
 700 mM Tris/HCl, pH 7,6
 100 mM MgCl₂
 50 mM DTT

4.36.2. Thermales „Cycle Sequencing“ mit 5'-endmarkiertem Primer

4.36.2.1. „Nested“-PCR der zu sequenzierenden PCR-Produkte

Zur Verbesserung des Signal/Hintergrund-Verhältnisses bei der „Cycle Sequencing“-Reaktion wurden die zu sequenzierenden PCR-Produkte in der Regel mit Hilfe einer „nested“-PCR spezifisch angereichert. Dazu wurde zunächst ein Amplifikat mittels konventioneller PCR hergestellt (siehe Kap. 4.35.1.) und in einem 1-1,5%igen Agarose-Gel aufgetrennt.

Danach wurde aus der Ethidiumbromid-gefärbten Bande mittels steriler Glas-Pasteurpipette ein kreisrundes Stück ausgestochen. Dieses Stück Agarose-Gel wurde sofort in das für die anschließende „nested“-PCR vorgesehene 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und in den Reaktionsansatz als Matrize mit einem geschätzten Volumen von 5 µl einbezogen. Es folgte eine weitere konventionelle PCR mit sogenannten „nested“ Primern, die sich innerhalb der Sequenz des bei der vorhergehenden PCR amplifizierten Abschnitts befinden. Sequenzen und Positionen der Primer sind in Kap. 4.5. angegeben.

4.36.2.2. Aufreinigung der PCR-Produkte

Um die mittels PCR amplifizierte Matrizen-DNA von eventuell die Sequenzreaktion störenden Bestandteilen zu befreien, wurde zunächst eine Aufreinigung des PCR-Produkts unter Verwendung des „*QIAquick PCR Purification Kit*“ der Firma QIAGEN GmbH (Hilden) vorgenommen. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

4.36.2.3. Kombination von Matrize, Primer und Polymerase (zum „Präreaktions-Mix“)

Für je einen Sequenzierungsansatz wurden folgende Komponenten in einem 0,5-ml-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert und auf Eis gestellt:

- 5 µl gereinigtes PCR-Produkt (Matrize)
- 5,5 µl H₂O
- 1 µl 30 × (3 %) Triton X-100
- 1,5 µl 10 × CircumVent Sequenzierpuffer
- 1,5 µl 5'-endmarkierter Primer (aus Reaktion)
- 0,5 µl Vent_R (exo) DNA Polymerase (2 U/µl)

Bei drei und mehr Reaktionen pro Ansatz wurde ein Prä-Mix der jeweils gemeinsamen Komponenten mit 10 % Überschuss zum Ausgleich von Pipettierfehlern angesetzt.

4.36.2.4. Zugabe der Desoxy-/Didesoxy-Sequenziergemische

In vier mit A, C, G und T beschrifteten 0,5-ml-Reaktionsgefäßen wurden die Sequenziergemische und der „Präreaktions-Mix“ (aus Schritt a) nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

	Gefäß „A“	Gefäß „C“	Gefäß „G“	Gefäß „T“
Sequenziergemisch A	3 µl	–	–	–
Sequenziergemisch C	–	3 µl	–	–
Sequenziergemisch G	–	–	3 µl	–
Sequenziergemisch T	–	–	–	3 µl
„Präreaktions-Mix“	3,2 µl	3,2 µl	3,2 µl	3,2 µl

4.36.2.5. PCR-Reaktionsparameter

Die Reaktionen wurden in einem Peltier-Thermocycler unter Verwendung des folgenden PCR-Programms inkubiert:

C.SEQ

Denaturierung	94 °C	1 min	} 20 ×
Denaturierung	94 °C	20 sec	
„Annealing“	65 °C	20 sec	
Elongation	72 °C	20 sec	
Ende	4 °C	∞	

4.36.3. Analyse der Sequenzierprodukte

Nach Zugabe von je 4 µl Stopp-/Ladelösung pro Reaktion erfolgte entweder nach maximal 24stündiger Lagerung bei –20 °C oder unmittelbar anschließend die Auftrennung der Sequenzierprodukte in einem 6 % PAA-Gel. Dazu wurden je 2 µl jeder Reaktion für 3 Minuten bei 80 °C denaturiert und anschließend auf das Gel geladen. Danach wurde wie beschrieben vorgegangen (Vogt, 1997).

10 × CircumVent Sequenzierpuffer

100 mM KCl
100 mM (NH₄)₂SO₄
200 mM Tris/HCl, pH 8,8
50 mM MgSO₄

Stopp-/Ladelösung

deionisiertes Formamid mit:
0,3 % Xylencyanol FF
0,3 % Bromphenolblau
0,37 % EDTA, pH 7,0

CircumVent Desoxy-/Didesoxy-Sequenziergemische

angesetzt in 1 × CircumVent Sequenzierpuffer (µM-Konzentrationen)

	Gemisch A	Gemisch C	Gemisch G	Gemisch T
ddATP	900	–	–	–
ddCTP	–	420	–	–
ddGTP	–	–	360	–
ddTTP	–	–	–	720
dATP	30	30	30	30
dCTP	100	41	100	100
dGTP	100	100	37	100
dTTP	100	100	100	33

4.37. Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)

Eine Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse der Genexpression stellt die „Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction“ (RT-PCR) dar. Als Maß für die Genexpression dient dabei die produzierte mRNA, die zunächst mit Hilfe einer Reversen Transcriptase in eine Erststrang-cDNA umgeschrieben und anschließend mittels PCR amplifiziert wird.

Die RT-PCR Analysen in dieser Arbeit wurden im Zwei-Schritt Verfahren durchgeführt, bei dem in einem ersten Schritt die reverse Transkription von Gesamt-RNA unter Verwendung eines Zufalls-Dekamers als Oligonucleotid-Primer erfolgte. Das Produkt dieser Reaktion, die Erststrang-cDNA, wurde in einem zweiten Schritt in einem separaten Reaktionsgefäß als Matrize für eine PCR verwendet. Für alle RT-Reaktionen wurde die RNase H- Reverse Transcriptase „*SUPERSCRIPT™ II*“ der Firma Gibco-BRL, Life Technologies (Eggenstein) inklusive der mitgelieferten Komponenten 5 × Erststrang-Puffer und 0,1 M DTT verwendet. Das Enzym wird gewonnen aus rekombinanten *E. coli*-Bakterien, welche das *pol* Gen des Moloney Mäuse-Leukämie Virus (MMLV) enthalten (Kotewicz *et al.*, 1985; Gerard *et al.*, 1986). Die anschließenden PCRs wurden wie bereits in Kap. 4.35. beschrieben durchgeführt.

4.37.1. Synthese von Erststrang-cDNA mit SUPERSCRIPT™ II (Reverse Transkription)

Für einen Ansatz wurden folgende Komponenten in einem 0,5-ml-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

- | | |
|------------------------|------------------|
| ▪ Gesamt-RNA | 1 µl (1 µg/µl) |
| ▪ H ₂ O | 10 µl |
| ▪ Zufalls-10mer (MV46) | 1 µl (100 ng/µl) |

Es folgte die Denaturierung der RNA und Anlagerung der Primer durch 10-minütige Inkubation bei 70 °C.

Danach wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt und folgendes hinzupipettiert:

- | | |
|-------------------------|------|
| ▪ 5 × Erststrang-Puffer | 4 µl |
| ▪ 0,1 M DTT | 2 µl |
| ▪ dNTP-Mix (je 10 mM) | 1 µl |

(Bei drei und mehr Reaktionen pro Ansatz wurde ein Prä-Mix der jeweils gemeinsamen Komponenten mit 10 % Überschuss zum Ausgleich von Pipettierfehlern angesetzt.)

Das Gemisch wurde zunächst für 10 Minuten bei 25 °C und anschließend für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Jetzt wurde 1 µl SUPERSCRIPT™ II (200 U^a/µl) zugegeben und dann für weitere 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. Die synthetisierten Erststrang-cDNAs wurden entweder bei –20 °C gelagert oder für eine unmittelbar folgende PCR eingesetzt.

^a 1 U katalysiert den Einbau von 1 nmol dTTP in Säure-präzipitierbares Material in 10 Minuten bei 37 °C unter Verwendung von Poly(A)•Oligo(dT)₂₅ als Matrizen-Primer.

4.37.2. PCR

Die folgende PCR wurde entweder auf konventionelle Art und Weise (siehe Kap. 4.35.1.) oder mit Hilfe des „*Advantage®-GC 2 Kit*“ (siehe Kap. 4.35.2.) durchgeführt. Die Reaktionen verliefen in einem Peltier-Thermocycler der Firma Biozym unter Verwendung der Programme „L12/2“ und „L12/2/70“ mit 33-40 Zyklen (siehe Kap. 4.35.3.). Die verwendeten PCR-Primer waren derart positioniert, dass sich das entstehende Produkt über jeweils zwei aneinander grenzende Exons erstreckte. Dadurch sollte der störende Einfluss eventuell kontaminierender genomischer DNA minimiert werden.

4.38. Statistische Auswertung von Messergebnissen

Die Meßergebnisse der transienten Reportergen-Analysen und der Kolonie-Bildungsexperimente wurden einer statistischen Analyse unterzogen. Alle analysierten Resultate waren aus voneinander unabhängigen Ansätzen mit jeweils mehreren Parallelwerten hervorgegangen.

Sämtliche Auswertungen und Diagramme wurden mit Hilfe von Funktionen der Tabellenkalkulations-Software Microsoft® Excel Version 7.0 © 1985-1997 (Verl) vorgenommen.

Von den Statistikfunktionen wurden im einzelnen folgende benutzt:

a) MITTELWERT

Diese Funktion liefert das arithmetische Mittel \bar{x} („x quer“) numerischer Argumente, wobei

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

mit x = Messwert und n = Anzahl der Messwerte ist.

b) STABW

Diese Funktion schätzt die Standardabweichung ausgehend von einer Stichprobe. Die Standardabweichung ist ein Maß dafür, wie weit die jeweiligen Werte um den Mittelwert (Durchschnitt) streuen. Für die Berechnung einer Standardabweichung wird die Methode „Erwartungstreue Schätzung“ oder „n-1“ in folgender Formel verwendet:

$$\sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

4.39. Sequenzanalysen

Für computergestützte DNA- und Protein-Sequenzanalysen wurde das „Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources“ (HUSAR)-Softwarepaket verwendet.