



**Technische Universität Braunschweig**

**Protokoll eines Laborpraktikums**

vom 12.07. bis 25.08.2004

im Bereich der Molekular- und Zellbiologie – Dr. T. Brand

zur Anerkennung des Praktikums

**Molekulargenetik II**

– Dr. R. Hehl

**Einbringen von zufälligen Punktmutationen in  
den Promotor des *popdc2*-Gens zur  
Auffindung eines Enhancer-Elements**

vorgelegt von  
Katrín Peter  
Matr.-Nr.: 2655727

# Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| 1 Einleitung.....  | 2  |
| 2 Ziel der Arbeit.....   | 3  |
| 3 Material und Methoden.....   | 3  |
| 3.1 Erzeugung von zufälligen Punktmutationen im <i>popdc2</i> -Promotor.....     | 3  |
| 3.2 Anlegen einer Klon-Bibliothek.....   | 4  |
| 3.2.1 Verdau der PCR-Produkte.....   | 4  |
| 3.2.2 Religation der verdauten und aufgereinigten PCR-Produkte.....              | 5  |
| 3.3 Kontrolle über eine Veränderung der Genexpression durch Punktmutationen..... | 5  |
| 3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA im 96-well Format.....                          | 5  |
| 3.3.2 Herstellung einer Primärkultur von Kardiomyocyten aus Hühnerembryonen..... | 6  |
| 3.3.3 Transfektion der DNAs aus der Klon-Bibliothek in Kardiomyozyten.....       | 7  |
| 3.3.4 Luciferase-Test.....   | 7  |
| 4 Ergebnisse.....  | 8  |
| 4.1 Das <i>popdc2</i> -Promotor-Fragment.....                                    | 8  |
| 4.2 Anfertigung der Klone und Isolierung ihrer DNA.....                          | 9  |
| 4.3 Luciferase-Test als Nachweis der Genexpression.....                          | 12 |
| 5 Auswertung und Diskussion.....   | 13 |
| 6 Literatur.....   | 15 |
| 7 Anhang.....  | 16 |

# 1 Einleitung

Das *popdc2*-Gen gehört als eines von drei Mitgliedern zur neuartigen Familie der Popeye (*Popdc*)-Gene, welche in Vertebraten in der Skelett-, Glatt- und Herzmuskulatur exprimiert werden. Alle drei Vertreter zeigen eine präferentielle Expression in embryonalen Muskelgeweben, vor allem dem Herzen, weshalb sie wahrscheinlich eine wichtige Rolle während der fötalen und embryonalen Entwicklung dieses Organs spielen [1]. Den *Popdc*-Genen gemeinsam ist eine stark konservierte Region, welche für drei Transmembrandomänen kodiert. Der C-Terminus der *Popdc*-Proteine befindet sich auf intrazellulärer Seite der Plasmamembran und trägt vermutlich eine zyklische Nukleotid-Bindungsdomäne, während das N-terminale Ende extrazellulär ist und Glykosylierungsstellen besitzt [2].

Diese Merkmale lassen vermuten, dass es sich bei den *Popdc*-Proteinen um Transmembranmoleküle handelt, die an der Zelladhäsion und / oder Signaltransduktion beteiligt sind. Die Popeye-Genfamilie ist somit eine einzigartige Klasse von Molekülen, die keine Homologien zu anderen Proteinfamilien aufweist.

Die einzelnen *Popdc*-Gene weisen eine große Ähnlichkeit in ihrer Sequenz auf, haben jedoch ein individuelles Expressionsmuster in den verschiedenen Muskelgeweben. *Popdc2* wird hauptsächlich im Herzmuskel und kaum in den Skelettmuskeln exprimiert. Es ist deshalb für die molekulargenetische Erforschung der embryonalen Herzentwicklung besonders interessant.

Ein wichtige Rolle bei der Kontrolle der Genexpression spielen Transkriptionsfaktoren und deren Bindungsstellen in der Promotorregion des betreffenden Gens. Zur Auffindung solcher (und insbesondere kardialer) Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im *popdc2*-Gen wurden in Vorarbeiten von Alexander Fröse Deletionen im Promotorbereich von *popdc2* durchgeführt.

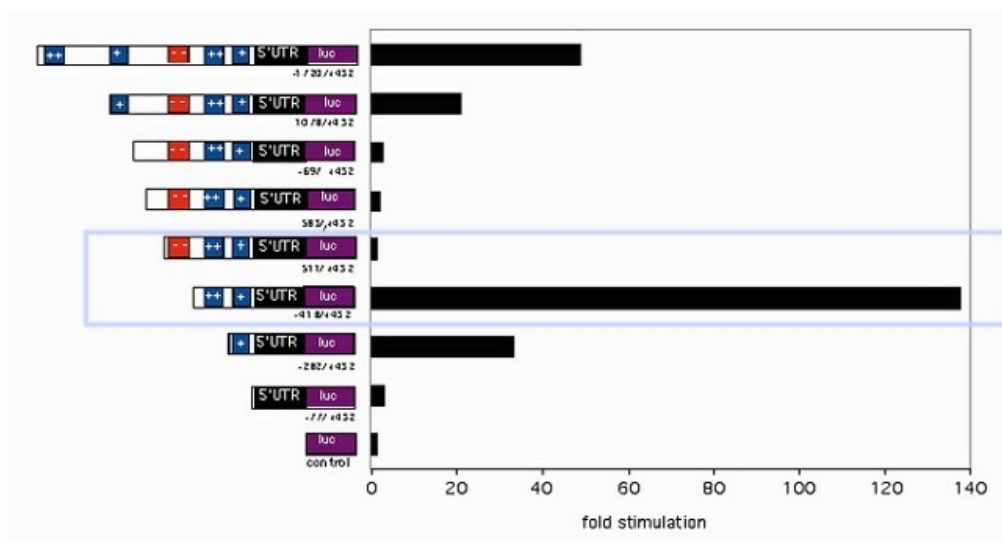


Abb. 1: Deletionsanalyse am *popdc2*-Promotor [3]

Eine Kontrolle der Genexpression der verschieden langen Promotor-Fragmente in Primärkulturen von Cardiomyozyten und Myoblasten aus Hühnerembryonen zeigte das Vorhandensein von Enhancer-Elementen (in Abb. 1 als blaue Kästchen gekennzeichnet) zwischen einem Repressor-Element (rote Kästchen) und dem Transkriptionsstart auf. Ein Enhancer-Element wurde mit Hilfe eines Gel mobility shift assays als SRF-Bindungsstelle (CarG-Box) identifiziert. Zusammen mit einer ebenfalls identifizierten GATA-Box kann sie jedoch nicht für die starke Genexpression nach der Deletion des Repressors verantwortlich sein (blaue Umrandung). Es ist daher zu vermuten, dass ein weiteres Enhancer-Element zwischen Repressor und Transkriptionsstartpunkt liegt.

## 2 Ziel der Arbeit

Da das bisher noch unbekannte Enhancer-Element eine entscheidende Rolle für die Expression des *popdc2*-Gens spielt, soll der Promotorbereich zwischen dem Repressor-Element und der CarG-Box mit zufälligen Punktmutationen versehen werden. Anschließend sollen die Auswirkungen der einzelnen Mutationen auf die Expression des *popdc2*-Gens untersucht und somit der genaue Ort der Enhancer-Sequenz ausfindig gemacht werden.

## 3 Material und Methoden

Zunächst wurde von Alexander Fröse ein 0.45 kb großes Promotor-Fragment zusammen mit einem 0,43 kb langem Stück des 1. Exons mit den Restriktionsenzymen Sac I und Nhe I aus dem Pop2-Gen herausgeschnitten und in den *pGL3-Basic Vector* von Promega, der ein Luciferase-Reporter-Gen aus dem Glühwürmchen trägt, subkloniert (Anhang 1). Diese DNA diente als Ausgangspunkt für meine Versuche.

Sac I schneidet einige Basenpaare unterhalb des Repressor-Elements.

Da der zu untersuchende DNA-Bereich zwischen dem Repressor-Element und dem Transkriptionsstart liegen soll, wurde mit Hilfe des Computerprogrammes *Sequencher* nach einer Schnittstelle eines weiteren Restriktionsenzym in der Promotorsequenz gesucht, die zwar in der MCS des *pGL3-Basic Vectors* vorhanden ist, aber kein weiteres Mal im Vektor auftritt. Als zweites Restriktionsenzym wurde Nsi I gewählt (siehe Ergebnisse).

### 3.1 Erzeugung von zufälligen Punktmutationen im *popdc2*-Promotor

Die Punktmutationen sollten mit Hilfe einer modifizierten Polymerase während einer PCR in das zu untersuchende DNA-Fragment eingebracht werden. Hierzu wurde das *GeneMorph<sup>®</sup> Random Mutagenesis Kit* von Stratagene genutzt. Es enthält die mutierte DNA-Polymerase *Mutazyme*, welche ein spezifisches Spektrum an zufälligen Punktmutationen durch den spontanen Einbau einer falschen Base produziert (Anhang 2) [4].

Das amplifizierte DNA-Fragment besitzt blunt ends. Damit es nach der PCR ohne Probleme in den *pGL3-Basic Vektor* religiert werden kann, muss es Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Sac I und Nsi I enthalten (Anhang 3). Es wurden daher Primer gewählt, die die Schnittstellen in ihrer Sequenz enthalten:

Sac I Primer 5' > G AGC TCA CAG TGA TGT TTG CTG AGT G <3'

Nsi I Primer 5' > CCA TTT GGA ATG CAT GAT CTC <3'

Um die optimale Annealing-Temperatur beider Primer zu bestimmen, wurde eine Gradienten-PCR zu den unten beschriebenen PCR-Bedingungen durchgeführt. Der Temperaturgradient richtete sich nach den aus dem jeweiligen G/ C-Gehalt der Primer errechneten Annealing-Temperaturen. Als Polymerase wurde die *rTaq* DNA-Polymerase von TaKaRa verwendet. Jedem PCR-Reaktionsansatz wurden 100 ng Template-DNA zugegeben. Nach Beendigung der PCR erfolgte eine Auftragung sämtlicher Ansätze auf ein Agarose-Gel.

Im *GeneMorph® Random Mutagenesis Kit* sind der genau aufeinander abgestimmte *Mutazyme*-Reaktionspuffer und dNTP-Mix enthalten. Die einzige Variable zur Festlegung der Anzahl an Punktmutationen in einem DNA-Fragment ist die Menge des DNA-Templates, welche man zum PCR-Ansatz hinzufügt. Je höher die gewünschte Mutationsfrequenz, desto weniger Template-DNA muss eingesetzt werden. Um eine Mutationsfrequenz von 0-3 Mutationen pro kb zu erhalten, braucht man eine Menge von 10-100 ng an Template-DNA.

Für einen 50 µl Reaktionsansatz benötigt man:

- 41,5 µl Wasser
- 5 µl 10 x *Mutazyme*-Reaktionspuffer
- 1 µl dNTP-Mix
- 0,5 µl Primer-Mix (von jedem Primer 250 ng/ µl)
- 1 µl *Mutazyme* DNA-Polymerase
- 1 µl Template-DNA

PCR-Bedingungen: 1 min Anfangsdenaturierung bei 95 °C und 40 Zyklen mit 1 min bei 95 °C, 1 min Primer-Annealing-Temperatur und 1 min bei 72 °C. Abschließende Extension für 10 min bei 72 °C.

## 3.2 Anlegen einer Klon-Bibliothek

### 3.2.1 Verdau der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden zur Kontrolle auf ein Agarose-Gel aufgetragen, die Banden ausgeschnitten und aus dem Gel mit dem *QIAEX II Gel Extraction Kit* von QIAGEN extrahiert. Hierbei wird während der Auflösung der Agarose die DNA an Silikat-Kügelchen gebunden und von diesen anschließend mit Wasser eluiert.

Es folgte der Verdau der aufgereinigten DNA mit Sac I und daraufhin eine Zwischenaufreinigung der DNA mit dem *NucleoSpin® Extract Kit* von Macherey&Nagel. Bei einer Natriumacetat-Fällung ging zu viel DNA verloren, was sich an einer geringen Anzahl von Klonen äußerte (siehe Ergebnisse).

Nach dem Verdau der gereinigten DNA mit Nsi I wurde der gesamte Verdauungsansatz auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um das gewünschte DNA-Fragment von DNA-Resten und Proteinen zu trennen.

### 3.2.2 Religation der verdauten und aufgereinigten PCR-Produkte

Um ein Religation der PCR-Produkte in den *pGL3-Basic Vector* zu ermöglichen, wurde die Template-DNA in gleicher Weise wie die PCR-Produkte mit Sac I und Nsi I verdaut. Nach der Auftragung des Verdauungsansatzes auf ein Agarose-Gel wurde die Bande des Vektors ausgeschnitten und wiederum mit dem *QIAEX II Gel Extraction Kit* extrahiert. Die so erhaltene Vektor-DNA wurde mit einer alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die aufgereinigte DNA der PCR-Produkte in den dephosphorylierten Vektor religiert.

Die so erhaltene DNA wurde unter Hitzeschock bei 42 °C in den E. coli-Stamm XL1-Blue transformiert und auf LB-Ampicillin-Agar ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden der Übersicht wegen, und um Fehler bei der Plasmid-Präparation zu vermeiden, nummeriert.

Zur Kontrolle über die Anzahl der Punktmutationen in der zu untersuchenden Promotorsequenz wurden stichprobenartig Kolonien gepickt, aus deren Über-Nacht-Kulturen die DNA isoliert und anschließend sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Original-Sequenz des *popdc2*-Promotors über das Computerprogramm *Sequencher* verglichen. Die PCR zur Sequenzierung erfolgte mit *RVprimer3*, dem forward primer des *pGL3 Basic Vectors*.

Die molekulargenetischen Methoden des Verdauens von DNA mit Restriktionsenzymen, Dephosphorylierens, Ligierens und Transformation in XL1-Blue-Zellen wurden nach Standard-Protokollen durchgeführt. Die LB-Ampicillin-Agar-Platten hatten ebenfalls Standard-Zusammensetzung. Die Gele enthielten 1 % Agarose, als Marker wurde der *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* von MBI Fermentas eingesetzt.

## 3.3 Kontrolle über eine Veränderung der Genexpression durch Punktmutationen

Um die Auswirkungen der einzelnen Mutationen auf die Expression des *popdc2*-Gens untersuchen zu können, sollten die DNAs aus der Klon-Bibliothek in eine Primärkultur embryonaler Kardiomyozyten des Huhns transfiziert und die Expression des Luciferase-Reportergens ermittelt werden.

### 3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA im 96-well Format

Um so effizient wie möglich aus sehr vielen Klonen die Plasmid-DNA zu präparieren, wurde das *Wizard® SV 96 Plasmid DNA Purification System* von Promega benutzt. Dieses System ermöglicht die parallele und weitgehend endotoxinfreie Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA von maximal 96 Über-Nacht-Kulturen über kleine Säulen. Diese Säulen sind auf einer Platte angeordnet und haben eine auf Silikat basierende Füllung, an welche die DNA - nach einer Lyse der Bakterienzellen und Abtrennung der DNA - gebunden wird. Nach einem Wasch- und Trocknungsschritt werden die Plasmid-DNAs mit Nuklease-freiem Wasser von den Säulen in eine 96-well Platte eluiert (Anhang 4).

Dieses System der Plasmid-Aufreinigung fordert den Gebrauch des *Vac-Man® 96 Vacuum Manifold* von Promega. Die Plasmid-DNA wird durch Vakuum-Filtration vom Bakterienlysat gereinigt und an die Säulen gebunden, wobei sämtliche Abfall-Produkte aufgefangen und sofort abgeführt werden. Das Waschen, Trocknen und Eluieren erfolgt ebenfalls unter Vakuum (Anhang 5).

### **3.3.2 Herstellung einer Primärkultur von Kardiomyocyten aus Hühnerembryonen**

Für die Isolierung von Kardiomyozyten aus Hühnerembryonen wurden 20 Hühnereier 12 Tage lang bei 37,8 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 58 % inkubiert. Aus den Embryonen wurden dann die Herzen herausgeschnitten, die Atrien und Blutgefäße abgetrennt und die Ventrikel in HBSS-Puffer (Hank's Balanced Salt Solution) sehr fein zerschnitten. Nachdem sich das Gewebe nach einigen Minuten Ruhestand abgesetzt hatte, wurde das überstehende HBSS abgenommen, 4 ml einer 0,25 %igen Trypsinlösung auf die zerschnittenen Ventrikel dazugegeben und die Suspension 15 min in einem 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand vorsichtig entfernt und verworfen, stattdessen 4 ml einer 0,1 %-igen Kollagenase-Lösung auf das Gewebe gegeben, vermischt und weitere 30 min im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe durch mehrmaliges Auf- und Absaugen mit einer Pipette dissoziiert. Sobald sich nach ein paar Minuten das gröbere Gewebe abgesetzt hatte, wurde der Überstand abgenommen, in etwa 4 ml Zellmedium überführt und auf Eis aufbewahrt. Das Zellmedium setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 10 % FCS (fötales Kälberserum); 1 % Streptomycin; 1 % Penicillin; 1 % Glutamin; Chicken Embryo Extract; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium).

Auf das verbliebene Gewebe wurden wiederum 4 ml Collagenaselösung gegeben und 30 min im Wasserbad inkubiert. Die Schritte des Absaugens des Überstandes und Verdauens mit Collagenase wurden solange wiederholt, bis das gesamte Gewebe dissoziiert war. Sämtliche Überstände wurden in einem Gefäß gesammelt, anschließend 5 min bei 1650 rpm zentrifugiert und die Lösung möglichst quantitativ vom Zellpellet entfernt.

Um nun die Kardiomyozyten von den Fibroblasten, roten Blutzellen und Zelltrümmern zu isolieren, wurde eine Percoll-Gradienten-Zentrifugation durchgeführt. Zunächst wurde das Zellpellet in 12 ml 1,082 g/ml Percoll resuspendiert. Der Percoll-Gradient wird errichtet, indem man 12 ml 1,050 g/ml Percoll mit 12 ml 1,060 g/ml Percoll, und diesen wiederum mit den 12 ml 1,082 g/ml Percoll, der die Zellen enthält, unterschichtet. Die Zentrifugation wurde 30 min bei 3300 rpm und Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Zentrifugation sind vier Banden sichtbar, wobei sich die Kardiomyozyten zwischen den Schichten mit 1,082 g/ml Percoll und 1,060 g/ml Percoll angesammelt haben. Bis zu dieser Interphase wurden die darüberliegenden Schichten entfernt. Die Bande mit den Kardiomyozyten wurde vorsichtig abgenommen, in 20-30 ml Phenolrot-haltigem 1x ADS-Puffer suspendiert und anschließend 5 min bei 1650 rpm zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation wurden die Kardiomyozyten erneut mit Phenolrot-haltigem 1x ADS gewaschen, der Überstand verworfen und die Zellen in 5 ml Zellmedium aufgenommen. Nun wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. In PRIMARIA 96-wells mit 150 µl vorgelegtem Zellmedium pro well wurden je  $5 \cdot 10^4$  Zellen ausplattiert.

Die Zellkulturen wurden bei 37 °C und 10 %igem CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert.

### 3.3.3 Transfektion der DNAs aus der Klon-Bibliothek in Kardiomyozyten

Die Transfektion der DNA erfolgte mit dem polykationischem Transfektionsreagens *Metafectene*<sup>TM</sup> von Biontex. *Metafectene*<sup>TM</sup> komplexiert zunächst die zu transfizierende DNA in kompakte liposomale Strukturen, so dass sie effizient von der Zelle aufgenommen werden kann. Innerhalb der Zelle wird die gesamte transfizierte DNA wieder freigelegt, um eine optimale Transkription und Translation des Gens zu gewährleisten.

Für einen erfolgreichen Transport der transfizierten DNA in den Nukleus ist es notwendig, dass sich die Zellen in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden. Deshalb wurde die Transfektion etwa 20 Stunden nach dem Ausplattieren der Kardiomyozyten angesetzt, als die Bedeckung der Wachstumsfläche eines wells 80-90% betrug. Außerdem wurde zwei Stunden vor der eigentlichen Transfektion das alte Zellmedium abgenommen, 50 µl angewärmtes frisches Zellmedium auf die Zellen gegeben und weiter inkubiert.

Es wurden zwei Lösungen in je einer 96-well Platte hergestellt:

Lösung A: 15 µl DMEM mit 0,2 µl *Metafectene*<sup>TM</sup> pro well .

Lösung B: 15 µl DMEM mit 0,1 µg/ µl Luciferase-Vektor-DNA aus der Plasmidisolierung und zusätzlich 0,03 µg/ µl DNA des Vektors *pRL-CMV* von Promega pro well.

*pRL-CMV* trägt das Reportergen für eine Quallen-Luciferase. Durch die Cotransfektion der Glühwürmchen-Luciferase-Vektor-DNA mit der Quallen-Luciferase-Vektor-DNA kann beim nachfolgenden Luciferase-Test eine Standardisierung durchgeführt und somit Schwankungen in der Transfektionseffizienz ausgeglichen werden.

Lösungen A und B wurden vereinigt, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. In dieser Zeit erfolgt die Bildung der DNA/Lipid-Komplexe. Anschließend wurde die 30 µl Lösung auf das 50 µl Zellmedium zu den Kardiomyozyten gegeben, gemischt und bei 37 °C und 10 %igem CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert.

### 3.3.4 Luciferase-Test

Die Auswirkungen der Punktmutationen auf die Regulation der Transkription wurden mit Hilfe des *Dual Glo*<sup>TM</sup> *Luciferase Assay Systems* von Promega untersucht. Hierfür wurde 48 Stunden nach der Transfektion die 96-well Platte aus dem Inkubator geholt, das Medium von den Kardiomyozyten abgesaugt und durch 25 µl 1x PBS (phosphate-buffered saline) pro well ersetzt. Diese Maßnahme verhindert eine Beeinträchtigung der Sensitivität des Assays durch Phenolrot.

*Messung der Glühwürmchen-Luciferase-Aktivität:*

Auf jedes well wurden zusätzlich 25 µl *Dual Glo*<sup>TM</sup> *Luciferase Reagent*, das den Glühwürmchen-Luciferase-Puffer und das Glühwürmchen-Luciferase-Substrat enthält, gegeben und mit dem 1x PBS vermischt. Nach 20 Minuten wurden die insgesamt 50 µl Lösung pro well in eine 96-well Luciferase-Mess-Platte transferiert. Mit einem Luminometer konnte nun die Glühwürmchen-Luciferase-Aktivität gemessen werden.

*Messung der Quallen-Luciferase-Aktivität:*

Nach der Messung der Glühwürmchen-Luciferase-Aktivität wurden 25 µl *Dual Glo*<sup>TM</sup> *Stop & Glo*<sup>®</sup> *Reagent* auf jedes well der Luciferase-Mess-Platte gegeben und alles vermischt. Diese Reagenz stoppt die Lichtreaktion der Glühwürmchen-Luciferase und bereitet gleichzeitig den Puffer der Quallen-Luciferase vor. Nach weiteren 20 Minuten konnte die Quallen-Luciferase-Aktivität gemessen werden.



Zur grundsätzlichen Überprüfung der Funktion des Luciferase-Tests diente ein *pGL3-SV 40 Vector*. Als Positiv-Kontrolle wurde ein *pGL3-Basic Vector* eingesetzt, der ein nicht mutiertes 0,88 kb großes Promotor-Fragment des *popdc2*-Gens enthielt. Die Negativ-Kontrolle war ein *pGL3-Basic Vector*, in dessen MCS nichts hineinkloniert wurde. Alle Kontroll-DNAs sind zuvor ebenfalls in XL 1-Blue-Zellen gebracht worden und wurden zusammen mit den PCR-Klon-DNAs präpariert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Das *popdc2*-Promotor-Fragment

Die zu untersuchende Promotor-Sequenz des *popdc2*-Gens sollte zwischen dem Repressor-Element und dem Transkriptionsstart liegen.

Durch vorausgegangene Arbeit von Alexander Fröse ist bekannt, dass einige Basenpaare unterhalb des Repressor-Elements die Schnittstelle des *Sac I*-Restriktionsenzymys liegt (-455 bp). Die zweite Schnittstelle oberhalb des Transkriptionsstartpunktes sollte mit Hilfe des Computerprogrammes *Sequencher* ermittelt werden. Hierfür wurde die Sequenz des *Pop2dc*-Promotors vom Repressor-Element bis Transkriptionsstartpunkt in den Computer eingegeben. Dieser ermittelte anschließend die Schnittstellen aller bekannter Restriktionsenzyme, die in dieser Sequenz genau einmal schneiden. Durch Vergleich mit den in der MCS des *pGL3-Basic Vectors* vorhandenen Schnittstellen konnte ich zwei in Frage kommende Restriktionsenzyme ermitteln: *BstE II* und *Nsi I*.

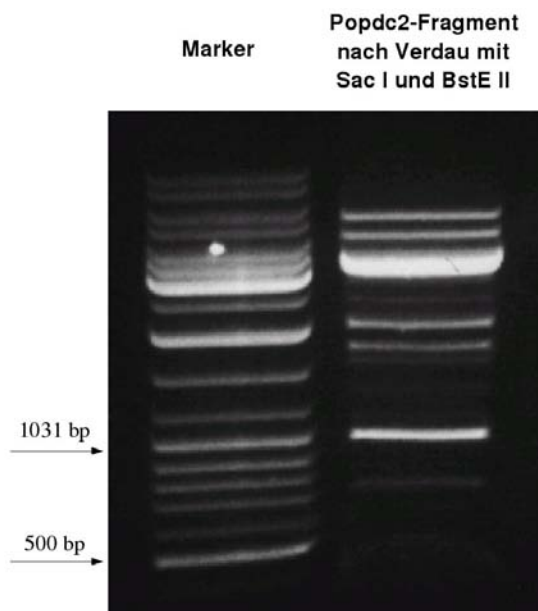


Abb. 2:  
Star-Aktivität beim Verdau des *popdc2*-  
Fragments mit *Sac I* und *BstE II*



Abb. 3:  
Staraktivität beim  
Verdau mit *Sac I*  
und *Nsi I* ohne  
Zwischen-  
aufreinigung

Beide Enzyme schneiden die Promotorsequenz einige dutzend Basenpaare upstream des Transkriptionsstartpunktes und bilden sticky ends. BstE II hat jedoch in der Sequenz seiner Schnittstelle eine Base, die beliebig sein kann (Anhang 6). Ein einfacher Test, in dem der *pGL3-Basic Vector* mit dem eingefügten 0.88 kb großen *popdc2*-Fragment zuerst mit Sac I und nach einer Zwischenaufreinigung mit BstE II verdaut wurde, ergab, dass BstE II wahrscheinlich aufgrund dieser variablen Stelle zu Star-Aktivität neigt und demnach ungeeignet war.

Nsi I zeigte im gleichen Test keine Star-Aktivität. Jedoch ist bei einem Verdau mit Sac I und nachfolgend mit Nsi I eine Zwischenaufreinigung notwendig. Die beiden Enzyme benötigen sehr unterschiedliche Reaktionspuffer, sodass eine einfache Enzym-Hitzeinaktivierung ohne jegliche Aufreinigungsschritte ebenfalls zu Star-Aktivität führte.

Da Nsi I bei -76 bp schneidet, ergibt sich nach dem Restriktionsverdau des *pGL3-Basic Vectors* mit dem integrierten 0.88 kb großen *popdc2*-Fragment mit Sac I und Nsi I ein etwa 380 bp großes *popdc2*-Promotor-Fragment. Dieses Promotor-Fragment diente bei der Erzeugung der Punktmutationen während den PCRs mit dem *GeneMorph<sup>®</sup> Random Mutagenesis Kit* als Template-DNA

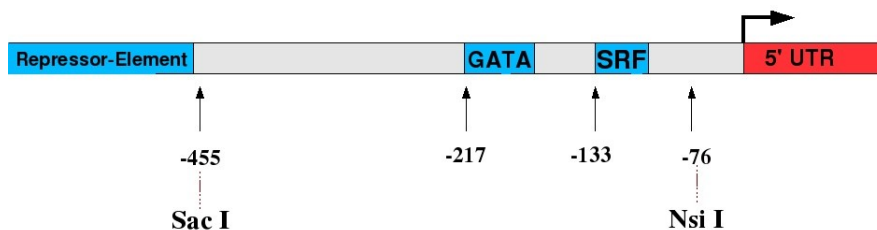


Abb. 4: Modell des *popdc2*-Promotors

## 4.2 Anfertigung der Klone und Isolierung ihrer DNA

Bei der PCR für die Mutationen, in der das zu untersuchende DNA-Fragment amplifiziert wird, kommt eine spezielle DNA-Polymerase zum Einsatz. Dieser Polymerase fehlt die proofreading-Aktivität, so dass vereinzelt Basen falsch in den entstehenden DNA-Strang eingebaut werden. Durch das Vorhandensein von  $Mg^{2+}$  und einer nicht ausbalancierten dNTP-Konzentration im Reaktionspuffer wird ein spezifisches Muster an Punktmutationen erzeugt. Die Mutationsfrequenz wird alleine durch die eingesetzte Menge an Template-DNA bestimmt.

Um das *GeneMorph<sup>®</sup> Random Mutagenesis Kit* anwenden zu können, mussten zwei Primer konstruiert werden, die in ihrer Sequenz die Schnittstellen von Sac I bzw. Nsi I enthalten. Für die Ermittlung der Annealing-Temperaturen der Primer wurden zunächst Näherungswerte  $T_m$  über deren GC-Gehalt berechnet:

$$T_m = \left( 4 \cdot \left( \sum G + \sum C \right) + 2 \cdot \left( \sum A + \sum T \right) \right) - 4$$

$T_m$  [ °C]: näherungsweise Schmelztemperatur



Wie sich bei PCR1 und PCR2 herausstellte, geht bei der Zwischenaufreinigung durch Natriumacetat-Fällung nach dem Verdau mit Sac I sehr viel DNA verloren. Daher konnten nach dem Religieren der DNA in den dephosphorylierten Vektor und der Transformation in *E. coli* nur wenige Kolonien gewonnen werden. Für die nachfolgenden Ansätze wurde deshalb für die Zwischenaufreinigung das *NucleoSpin® Extract Kit* verwendet und so konnte die Kolonienzahl deutlich vergrößert werden.

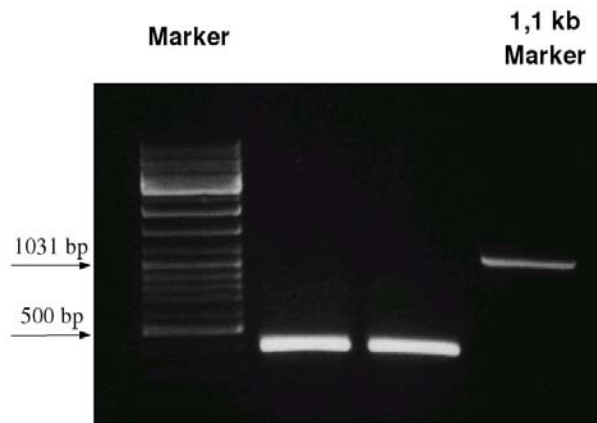


Abb. 6: Kontrollgel von PCR2

Nach Erhalt der Kolonien von PCR1 und -2 wurden vier willkürlich gewählte Klone sequenziert, von denen drei Klone Punktmutationen enthielten. Auf die Gefahr hin, dass in einer Sequenz mehr als nur eine Punktmutation vorliegt, sollte die Mutationsfrequenz weiter leicht erhöht werden.

Deshalb wurden in den 1. Versuchsdurchlauf zwei weitere PCR-Ansätze aufgenommen: PCR3, die als Template-DNA 1  $\mu$ l des PCR2-Produktes enthielt, und PCR4, welche mit 25 ng DNA in die Reaktion ging.

Nach der Durchführung der 1. Plasmid-Präparation im 96-well Format wurde von zehn Proben die DNA-Konzentration zur Berechnung der notwendigen DNA-Menge für die Transfektion gemessen. Hier ergab sich eine mittlere DNA-Konzentration von 190  $\mu$ g/ $\mu$ l.

Für den 2. Versuchsdurchlauf konnten nur noch Klone eines PCR-Ansatzes mit verringerter Template-DNA-Menge erzeugt werden: PCR5 mit 10 ng DNA in der Reaktionslösung. Die Stichproben- Sequenzierung von zehn PCR5-Klonen zeigte jedoch, dass nur vier Klone Mutationen enthielten.

PCR6, bei der nur 5 ng DNA eingesetzt wurden, lieferte auf dem Kontrollgel nach der PCR-Reaktion eine sehr schwache Bande. Nach ihrer Aufarbeitung konnten keine Kolonien gewonnen werden. Hier reichte eine Amplifikation nach 40 Zyklen nicht aus, eine für die Klonierung notwendige Menge an DNA bereit zu stellen.

Neben den PCR5-Klonen wurden die im 1. Versuch gefundenen Mutanten ein zweites Mal getestet. Um außerdem Aktivitätsschwankungen im Luciferase-Test besser ausgleichen zu können, wurden insgesamt vier Positiv- und zwei Negativ-Kontrollen beigelegt. Die Messung der DNA-Konzentration nach der 2. 96-well Plasmid-Präparation von acht Proben ergab eine im Vergleich zum 1. Versuch geringere mittlere Konzentration von 165  $\mu$ g/ $\mu$ l.

### 4.3 Luciferase-Test als Nachweis der Genexpression

Um die Effizienz der Translation untersuchen zu können, wurde das *Dual Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay System* verwendet. Grundlage hierfür ist, dass das zu untersuchende Promotorfragment vor das Reportergen der Glühwürmchen-Luciferase (aus *Photinus pyralis*) geschaltet ist und somit dessen Transkription reguliert. Das gebildete Glühwürmchen-Luciferase-Molekül reagiert mit dem im *Dual Glo<sup>TM</sup> Luciferase Reagent* enthaltenen Luciferin, ATP und Mg<sup>2+</sup> sofort zu Licht. Die Lichtintensität, welche von einem geeigneten Luminometer gemessen wird, ist proportional zur Luciferasemenge und somit ein Parameter der Transkriptionseffizienz des zu untersuchenden Promotors.

Bei der Messung einer Abnahme von Transkription oder Translation eines Reportermoleküls ergibt sich die Schwierigkeit zu erkennen, ob dies durch eine zelluläre Regulation geschehen ist, oder ob die Zellen tot sind.

Mit dem *Dual Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay System* ist es möglich, dieses Problem zu umgehen: Neben dem Plasmid, welches das zu untersuchende Promotorstück und das Reportergen der Glühwürmchen-Luciferase trägt, wird in die tierische Zelle zusätzlich ein Plasmid mit dem Reportergen einer Quallen-Luciferase (aus *Renilla reniformis*) cotransfiziert. Die beiden verschiedenen Luciferasen sind monomer und müssen nicht post-translational modifiziert werden, sodass sie ihre Funktion als genetischer Reporter sofort nach der Translation aufnehmen können.

Während die Produktion der Glühwürmchen-Luciferase unter der Regulation des eigenen Promotors steht (in diesem Fall das 0,88 kb große Pop2-Promotorfragment mit den Punktmutationen), wird die Quallen-Luciferase durch einen konstitutiven Promotor kontrolliert. Auf diese Weise dient die Lumineszenz der Quallen-Luciferase neben der Kontrolle der Transfektionseffizienz zusätzlich als Referenz für die Normalisierung der Glühwürmchen-Luciferase-Werte.

Nach der Messung beider Lumineszenzen wird für jedes well das Verhältnis der Glühwürmchen-Luciferase zur Quallen-Luciferase gebildet (*relative ratio*). Die relativen Verhältnisse der experimentellen Proben können mit den relativen Verhältnissen der Positiv- und Negativ-Kontrollen normalisiert werden (*relative response ratio*):

$$RRR = \frac{(RR \text{ der experimentellen Probe}) - (RR \text{ der Negativkontrolle})}{(RR \text{ der Positivkontrolle}) - (RR \text{ der Negativkontrolle})}$$

*RRR*: relative response ratio

*RR*: relative ratio

Bei der Normalisierung wird die Positiv-Kontrolle auf den Wert 1 und die Negativ-Kontrolle auf 0 gesetzt. Die experimentellen Werte liegen dazwischen und geben die prozentuale Translationseffizienz an.

## 5 Auswertung und Diskussion

Durch das Einfügen von zufälligen Punktmutationen in eine 0.38 kb große Promotorsequenz des *popdc2*-Gens sollte ein Enhancer-Element auffindig gemacht werden. Die Selektion der Mutanten erfolgte über einen Luciferase-Test. Eine Mutation in einem Enhancer bewirkt eine Verringerung der Luciferase-Aktivität. Da es sich hier um einen sehr starken Enhancer handelt, wurde willkürlich festgelegt, dass für eine weitere Auswertung nur Klone in Frage kommen, die maximal die Hälfte der Aktivität des nicht mutierten Promotors zeigen. Dies entspricht einem *relative response ratio* zwischen  $RRR = 0$  und  $RRR = 0,5$ .

Der 1. Versuchsdurchlauf war von einer hohen Schwankungsbreite der *RRRs* gekennzeichnet, wobei nahezu ein Drittel der Proben ein  $RRR = 0,5$  aufzeigten. Die Sequenzierung von 28 Proben-DNAs zeigte jedoch, dass in nur vier Klonen Mutationen vorhanden waren. Wie sich nach der Messung ihrer DNA-Konzentration herausstellte, war der Grund für dieses Ergebnis, dass in die Kardiomyozyten teilweise eine zu geringe Menge an Proben-DNA transfiziert worden war. Die DNA der Quallen-Luciferase wurde hingegen in gleich bleibender Menge kotransfiziert. Dadurch wurde beim Luciferase-Test bei vielen Proben eine nur geringe Promotor-Aktivität vorgetäuscht. Die DNA-Konzentrationen der 96 Plasmid-Präparationen betrug demnach nicht analog Werte um  $190 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , wie die Stichprobenmessung ergab. Wahrscheinlich lagen diese Konzentrationsschwankungen an der Unerfahrenheit in der Durchführung der Plasmid-Präparation im 96-well Format.

Weiterhin ist die geringe Mutationsfrequenz auffällig. Obwohl von den vier Stichproben, die nach PCR1 und -2 angefertigt wurden, in drei Klonen Punktmutationen vorhanden waren und außerdem die Mutationsfrequenz in PCR3 und -4 erhöht wurde, zeigte sich mit nur vier Mutanten von 28 sequenzierten Proben eine insgesamt viel zu geringe Anzahl von Mutationen.

Als Konsequenz dieses Ergebnisses musste die Mutationsfrequenz für einen weiteren Versuchsdurchlauf drastisch erhöht werden. Die kleinste einsetzbare Konzentration an Template-DNA maß jedoch  $10 \text{ ng}$  pro PCR-Reaktionsansatz. Bei noch geringerer DNA-Menge konnten nach der Aufarbeitung des sehr gering ausgefallenen PCR-Produkts keine Kolonien gewonnen werden. Der Grund hierfür lag wahrscheinlich in der unausgeglichene dNTP-Konzentration des PCR-Reaktionspuffers, was generell zu einer Verringerung der Produktausbeute führt. Eine einfache Erhöhung der PCR-Zykluszahl bewirkt leider keine Zunahme der Amplifikationsprodukte, da diese am Ende einer PCR immer häufiger miteinander statt mit den Primern hybridisieren.

Nach der Durchführung des 2. Luciferase-Tests hatten noch knapp  $1/6$  der Proben Werte mit  $RRR = 0,5$ . Davon wurden zehn Proben-DNAs, die eine ähnlich hohe Konzentration hatten, sequenziert. Es waren jedoch in nur einem einzigen Klon Punktmutationen auffindbar. Von allen gefundenen Mutanten weist dieser Klon die mit Abstand geringste Luciferase-Aktivität auf. Bei einer DNA-Konzentration von  $138 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  nach der 96-well Plasmid-Präparation hat er ein *relative response ratio* von  $RRR = 0,2$ . Wie die Sequenzierung dieses Klons ergab, liegt hier jedoch nicht nur eine sondern drei Punktmutationen innerhalb des zu untersuchenden DNA-Abschnitts vor (Anhang 7).

Abbildung 7 gibt einen Überblick über alle gefundenen Mutationen in der zu untersuchenden Sequenz. Die roten Basen zeigen die drei Stellen der Punktmutationen des einen Klons mit der besonders geringen Luciferase-Aktivität. Blaue Basen markieren Orte, an denen Punktmutationen keine oder nur eine schwächere Abnahme der Aktivität hervorriefen.

|                                      |  |                     |                            |
|--------------------------------------|--|---------------------|----------------------------|
| <u>Sac I</u><br>CACAGT <b>T</b> GATG | TT <b>T</b> GCT <b>G</b> AGT           | GTCTTAAACC          | TTTCACGGGG                 |
| CTTTTCTGTT                           | CTCCCTGCCA                             | GTACTGTTTC          | TGTTAGTAGT                 |
| CCCAGGTATT                           | CCCGCTCTCA                             | ATGGCCTTCC          | TACCTCCCAT                 |
| AAATCCCCAA                           | ATCCTCCAGA                             | CAGGA <b>C</b> ATCA | GCGCTGTGTC                 |
| CCGTCCACTC                           | CATGGACCTC                             | AATTCCTGC           | TTGCTTTCCC                 |
| TT <b>T</b> GACCCCTC                 | CCTGCCTGCC                             | TCTGTTGACC          | CTGGGTCTTA <sup>GATA</sup> |
| <u>TCTTGT</u> CCTC                   | TGGAGGTATG                             | CTA <b>A</b> GTGCC  | TGCCAGCCTG                 |
| GCCTGTTTTC                           | TTTCACTG <b>CC</b>                     | AGCACCTCCT          | GGATTCCAAT                 |
| <sup>SRF</sup><br>TCCAAACATG         | <u>GTAT</u> CCCTCT                     | GGGGTCACCC          | TTT <b>C</b> TTCCGG        |
| CGCCAAGAGA                           | <sup>Nsi I</sup><br><u>TCATGC</u> ATTC |                     |                            |

Abb. 7: Punktmutationen im 0,88 kb *popdc2*-Fragment

Um ein aussagekräftigeres Ergebnis zu erhalten, hätte man die Versuchsdurchläufe wesentlich optimieren müssen. Jedoch wurden durch eine unglückliche Wahl der Stichproben für die Messung der DNA-Konzentration und zur Ermittlung der Mutationsfrequenz die Zwischenergebnisse teilweise verfälscht, was vor allem das Ergebnis des 1. Versuchsdurchlaufs belastete.

Aber auch im 2. Durchlauf hätte die Mutationsfrequenz noch höher sein müssen. Man könnte zum Beispiel versuchen, mehrere PCRs mit 5 ng Template-DNA parallel ansetzen, deren Produkte für die weitere Arbeit vereinigen und so eventuell Klone erhalten. Für eine höhere Anzahl von Mutationen wäre es auch möglich, die  $Mg^{2+}$ -Konzentration in der PCR-Reaktionslösung zu erhöhen, da eine DNA-Polymerase in dessen vermehrter Anwesenheit fehlerhaft arbeitet. Dies wäre jedoch ein recht gewagter Versuch, da in dem *GeneMorph*<sup>®</sup> *Random Mutagenesis Kit* die Verhältnisse der einzelnen Komponenten ausbalanciert sind und eine Eingriff dieser Art kaum vorhersehbare Auswirkungen auf das Ergebnis hätte.

Die Mutationsfrequenz darf allerdings nicht zu stark erhöht werden. Wie man aus dem 2. Versuch ersehen kann, scheint die *Mutazyme* DNA-Polymerase in einige DNA-Stränge keine und bei anderen Strängen mehr als eine Punktmutation einzufügen. Sollte ein interessanter Klon mehrere Punktmutationen aufweisen, muss jede einzelne auf eine Lokalisierung im Enhancer untersucht werden.

Ein solcher Klon könnte derjenige mit dem  $RRR = 0,2$  sein. Um aber sicherzustellen, dass es sich bei ihm nicht um ein Artefakt handelt, sollte er bei weitergehenden Untersuchungen nochmals im Luciferase-Test geprüft werden. Erweist er sich auch danach als erfolgversprechend, kann durch gezielte Punktmutationen der einzelnen Basenpaare diejenige Mutation ermittelt werden, die für den Verlust der Enhancer-Aktivität verantwortlich ist.

Letztendlich aber lassen die wenigen erzeugten Punktmutationen kaum Schlüsse über die Lokalität eines Enhancer-Elements zu. Der Luciferase-Test erwies sich als unerwartet unspezifisch, da sich viele Klone mit vermeintlich geringer Luciferase-Aktivität als mutationslos erwiesen.

In Anbetracht des nicht zufrieden stellenden Ergebnisses bin ich zu dem Schluss gekommen, dass noch mindestens ein Versuch unter optimierten Bedingungen durchgeführt werden müsste, wobei der bisher einzig interessante Klon ein zweites Mal getestet wird. Sollte tatsächlich ein Enhancer entdeckt werden, gilt es diesen zu klassifizieren. Von besonderem Interesse ist hier die Frage, ob es sich dabei um eine reguläre oder herzspezifische Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle handelt.

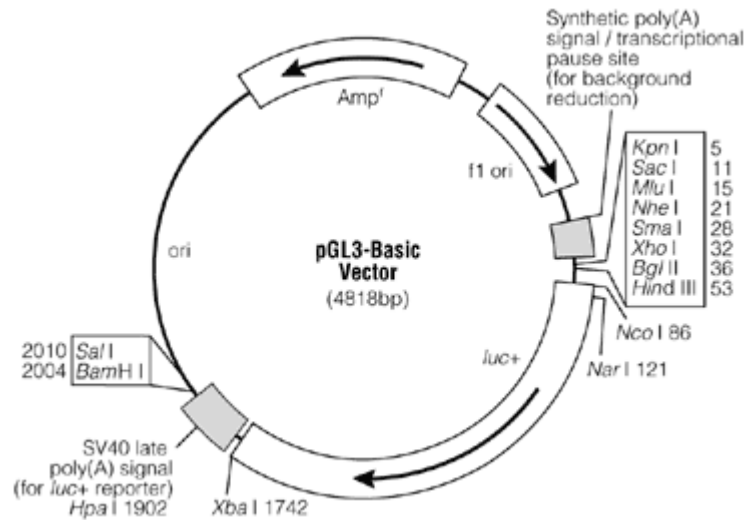
## 6 Literatur

- [1] André, B., Hillemann, T., Kessler Icekson, G., Schmitt-John, T., Jockusch, H., Arnold, H.-H., Brand, T.: Isolation and characterization of the novel popeye gene family expressed in skeletal muscle and heart. *Dev. Biol.* 223, 371-382, 2000.
- [2] Breher, S.: Molekulare Charakterisierung der Popeye-Familie im Huhn. Diplomarbeit. TU Braunschweig, 2003.
- [3] Fröse, A., Brand, T.: Characterization of the promotor-proximal elements of the murine Popeye2 (Pop2) gene. Poster. TU Braunschweig, 2003.
- [4] <http://www.stratagene.com/displayProduct.asp?productId=132>

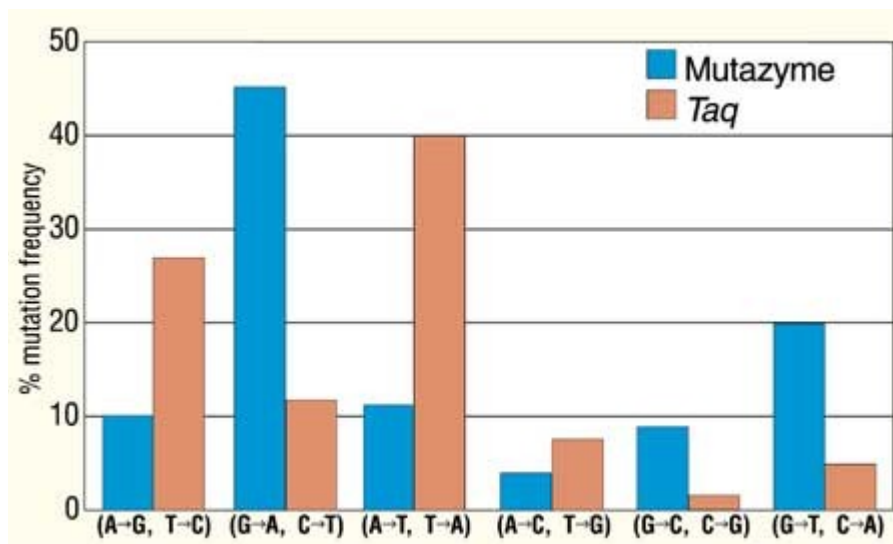


## 7 Anhang

### Anhang 1: Vektorkarte des *pGL3 basic Vectors*



### Anhang 2: Spektrum der Punktmutationen mit dem *GeneMorph® Random Mutagenesis Kit*

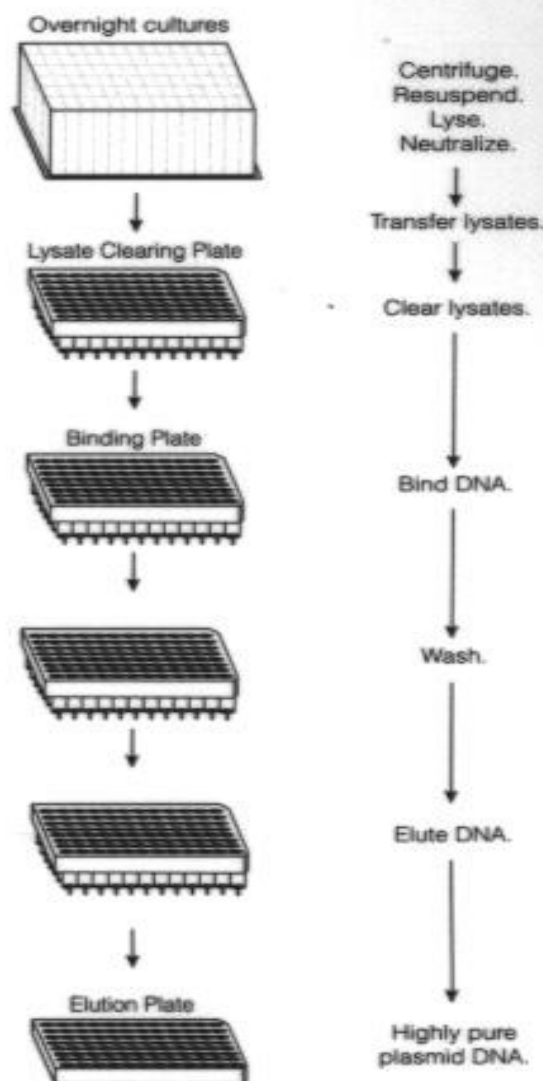


### Anhang 3: Schnittstellensequenzen der Restriktionsenzyme Sac I und Nsi I

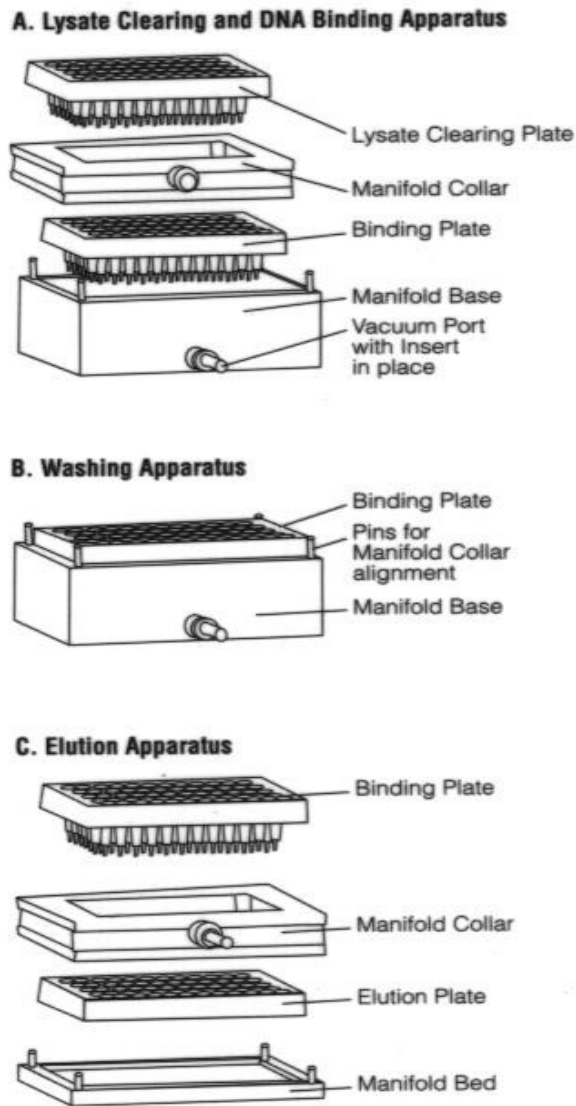
Nsi I : 5' ... ATGCA'T ... 3'  
3' ... TACGTA... 5'

Sac I : 5' ... GAGCT'C ... 3'  
3' ... CTCGAG... 5'

### Anhang 4: Plasmid-DNA-Isolation mit dem Wizard® SV 96 Plasmid DNA Purification System



Anhang 5: Vakuum-Filtration mit dem *Vac-Man*<sup>®</sup> 96 *Vacuum Manifold*



Anhang 6: Schnittstellensequenz des Restriktionsenzym BstE II

BstE II :    5' ... G GTNACC ... 3'  
              3' ... CCANTGG ... 5'

**Anhang 7: Sequenz des Klons mit den drei Punktmutationen**  
 (die mutierten Basen sind eingekreist)

