2 Material und Methoden

2.1 Geräte

2.1.1 Labor

Bakterienbrutschrank BE400	Memmert, Schwalbach
Bakterieninkubator Certomat R	Braun, Melsungen
Dounce Homogenizator 15 und 50 ml	Braun, Melsungen
Geltrockner Unigeldryer	UniEquip, Martinsried
Kühlfalle Uni Cryo MC 2L-60.0C	UniEquip, Martinsried
Luminometer Lumat LB 9501/16	Berthold, Wildbach
Pistill Typ B	Roth, Karlsruhe
Spektralphotometer Uvikon 860	Kontron, Eching
Thermocycler Techne	Progene, Wertheim
Ultrazentrifuge L8-70M	Beckmann, München
Vakuumzentrifuge Uni Vapo 100 H	UniEquip, Martinsried
Zentrifugen: Biofuge 13, Sepatech	Heraeus, Hanau
J2-21	Beckmann, München

2.1.2 Zellkultur

Inkubator BB16	Heraeus, Hanau
Mikroskop Olympus IX 50	Olympus, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Schreck, Hofheim
Sterile Werkbank Lamin Air HLB 2448	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Labofuge GL	Heraeus, Hanau

2.2 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien

2.2.1 Chemikalien

Agarose für DNA-Elektrophorese	Sigma, Deisenhofen
Ameisensäure	Serva, Heidelberg
APS	BioRad, München
Biorad Reagenz	BioRad, München
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau/Xylencyanol-Lösung	Sigma, Deisenhofen
BSA	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
DMS	Fluka, Neu-Ulm
DNA-Längenstandards III und VIII	Boehringer, Mannheim
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
DTT	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Hydrazin	Serva, Heidelberg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaninchen-Präimmunserum	Dako, Hamburg
KCl	Merck, Darmstadt
KOH	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel de Häen, Seelze
$MgCl_2/6H_2O$	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumcacodylat	Sigma, Deisenhofen
Nonidet P40	Fluka, Neu-Ulm
Phenol	Roth, Karlsruhe
Piperidin	Fluka, Neu-Ulm

PMSF	Sigma, Deisenhofen
Poly (dA/dT)	Sigma, Deisenhofen
Poly (dI/dC)	Sigma, Deisenhofen
Polyklonale Antikörper gegen Sp1, Sp3 und Sp4	Guntram Suske, IMT, Marburg
Protein Assay	BioRad, München
rotiphorese®Gel 30	Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
Sigmacote	Sigma, Deisenhofen
Sp1 (human) [2 fpu/µl]	Promega, Madison/USA
Spermidin	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
t-RNA aus Hefe	Sigma, Deisenhofen
$ZnCl_2$	Sigma, Deisenhofen

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt; Riedel de Häen, Seelze; Roth, Karlsruhe und Sigma, Deisenhofen in p.a. Qualität bezogen.

2.2.2 Bakterienkultur

Trypton	Difco, Detroit/USA
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Difco, Detroit/USA
NaCl	Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen

2.2.3 Zellkultur

DMSO	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Linz/Österreich
Galacto-Light-PlusTM	Tropix, Bedford/USA
Gewebekulturflaschen	Greiner, Frickenhausen

Luciferase Assay System	Promega, Madison/USA
Penicillin-Streptomycin (10000 µg/ml)	Gibco, Eggenstein
Petrischalen für Gewebekultur	Greiner, Frickenhausen
Reporter Lysis Puffer 5x	Promega, Madison/USA
RPMI 1640-und DMEM -Medium	PAA, Linz/Österreich
Trypsin-EDTA	Gibco, Eggenstein

2.2.4 Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme

DNaseI	[7,5 U/µl]	Boehringer, Mannheim
DNaseI (1 U/µl), RQ1 RNase free		Promega, Madison/USA
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	[2 U/µl]	MBI, Vilnius/Litauen
Pwo DNA Polymerase	[5 U/µl]	Boehringer, Mannheim
Restriktionsendonukleasen		MBI, Vilnius/Litauen Boehringer, Mannheim Pharmacia, Freiburg New England Biolabs, Schwalbach
T4-Polynukleotidkinase	[10 U/µl]	Boehringer, Mannheim

2.2.5 Radioaktive Verbindungen

[γ-^{32}P] ATP (5000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	Amersham, Braunschweig

2.2.6 Verbrauchsmaterialien

Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Glaswolle	Koobe, Marburg
Meßröhrchen für Lumat	Sarstedt, Nümbrecht
Nicksäulen (Nick columns, Sephadex G-50)	Pharmacia, Freiburg
Nucleobond®AX Kit PC 500	Macherey-Nagel, Düren

Nuctrap®Probe Purification Columns	Stratagene, Heidelberg
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Perkin Elmer, Foster City/USA
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme Kodak X-Omat AR	Kodak, Stuttgart
Spectra Por Dialyse-Schläuche MWCO: 3,500	Roth, Karlsruhe
Whatman 3 mm Filterpapier	Herolab, St. Leon
Zentrifugenröhrchen	Beckmann, München

2.3 Bakterienstämme

E. coli DH5α (Hanahan, 1983)

2.4 Zellinien

Ratteninsulinoma-Zellen RIN38A (Philippe, J. et al., 1988)
Humane Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom-Zellen (NSCLC) EPLC-32M1 (Bepler et al., 1988).
Humane Mesotheliom-Zellen MSTO-211H (Bepler et al., 1988)
Humane Kleinzellige Bronchialkarzinom-Zellen (SCLC) NCl-H69 (Carney et al., 1985)
Humane Pankreaskarzinoid-Zellen BON-I (Evers et al., 1991)

2.5 Oligonukleotide

huCACC WT $^{-115}$ 5´-GATCCTGTGCCCCACCCCATTA-3´ $^{-98}$
huCACC mt $^{-115}$ 5´-GATCCTGTGCCCCACC**A**CATTA-3´ $^{-98}$
huCACC dmt $^{-115}$ 5´-GATCCTGTGCC**A**CACC**A**CATTA-3´ $^{-98}$

gERE WT	$^{-68}$ 5´-GTAGGGGCGGGGTGGGGGGA-3´ $^{-53}$
gERE M4	$^{-68}$ 5´-GTA**TT**GGCGGGGTGG**TTTT**A-3´ $^{-53}$
gERE M5	$^{-68}$ 5´-GTAGGG**C**CGGGGTGGGGGGA-3´ $^{-53}$
gERE M6	$^{-68}$ 5´-GTAGGGGCGGGG**C**GGGG**C**GA-3´ $^{-53}$
cRE	$^{-145}$ 5´-TGAAAGGGCGGGGCAGGGTG-3´ $^{-126}$
AP1	$^{-168}$ 5´-CTGGATGACTGACAC-3´ $^{-150}$
hugas -193 forward	$^{-193}$ 5´-AACTCCCCTATCCTTCCC-3´ $^{-176}$
hugas +60 reverse	$^{+60}$ 5´-CTGCAGAGCTGGGAGGTG-3´ $^{+44}$

(Die hochgestellten Zahlen geben die Position der unterstrichenen Base im Gastrinpromotor an, Mutationen sind fettgedruckt.)

2.6 DNA-Konstrukte

Folgende Konstrukte wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Babette Simon hergestellt und zur Verfügung überlassen. Alle Konstrukte wurden restriktionsenzymatisch und durch Sequenzierung der relevanten Bereiche kontrolliert.

pGL2-Control Vektor: (Promega, Madison/USA)
pGL2-Basic Vektor: (Promega, Madison/USA)
pSV-ß-Galaktosidase-Kontroll Vektor:
(Promega, Madison/USA)

hugas 2kb pst-/pGEM1: 1300 bp großes Fragment des humanen Gastringens, das mit Hilfe von EcoRI-PSTI-5´ aus pGEM-1 geschnitten wurde (Wang et al., 1992).

hugas Luc –1300: Das 1300er Gastrinreportergenkonstrukt wurde durch Subklonierung des EcoRI-PstI geschnittenen Fragments des humanen Gastringens in den promotorlosen Expressionsvektor pGL2-Basic hergestellt (Simon et al., 1997).

hugas Luc –1145, -1035, -935, -835, -710, -600, -510, -400, -190, -148, -119, -82, -79, -68 und -40: Diese Deletionskonstrukte wurden über Polymeraseketten-reaktion (PCR) mit hugas Luc –1300 als Template hergestellt und die Bindungsenden mit einem Restriktionsverdau vor der Ligation in den pGL2-Basic Vektor erzeugt.

Die zur bakteriellen Expression notwendigen Konstrukte von Sp1, Sp3 und Sp4 wurden freundlicherweise von Dr. G. Suske, IMT, Marburg zur Verfügung gestellt.

2.7 Sicherheitsvorkehrungen und Abfallbeseitigung

Arbeiten an genetischem Material wurden gemäß dem „Gesetz zur Regelung von Fragen der Gentechnik“ nur in zugelassenen Räumen der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt. Der Umgang mit radioaktiven Substanzen erfolgte entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen. Mit stärkeren β-Strahlern wurde nur hinter Plexiglasabschirmung gearbeitet. Zum Schutz gegen Kontamination von Haut und Kleidung wurden Einweghandschuhe und Laborkittel getragen. Die individuelle Strahlenbelastung wurde mit einer Dosimeterplakette gemessen. Infektiöses Material wurde nach Autoklavieren oder Desinfektion entsorgt. Radioaktiver Abfall sowie Lösungsmittelreste und giftige Feststoffe wurden getrennt in entsprechenden Behältern gesammelt und der vorgeschriebenen Beseitigung zugeführt.

2.8 Molekularbiologische Standardverfahren

Alle Arbeitsschritte wurden, falls nicht anders erwähnt, bei 4^0C durchgeführt. Verwendete Medien, Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert, bzw. sterilfiltriert. Ihre Zusammensetzung sowie die Durchführung von Standardverfahren der Molekularbiologie, sofern sie nicht näher beschrieben werden, sind dem Methodenbuch „Molecular cloning, a laboratory manual“ (Sambrook, J. et al., 1989) zu entnehmen.

2.8.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Alle Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen wurden in den vom Hersteller empfohlenen Puffern durchgeführt. Die zehnfach konzentrierten, bei –20^{0}C gelagerten Puffer wurden kurz vor Gebrauch aufgetaut, 10 U des betreffenden Restriktionsenzyms pro µg zu schneidender Plasmid-DNA und BSA in einer Endkonzentration von 0,1 µg/µl hinzugegeben. Das Gesamtvolumen des Ansatzes wurde so gewählt, daß die zugegebene Enzymlösung mindestens 1:10 verdünnt wurde. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde anhand eines Aliquots gelelektrophoretisch überprüft. Gegebenenfalls konnten die Spaltung durch Zugabe von EDTA, pH 8 (Endkonzentration 10 mM) gestoppt und die Proteine durch Phenol/Chloroformextraktion und Ethanol-Fällung entfernt werden.

2.8.2 Entfernen von Proteinen aus DNA-Lösungen

Um aus DNA-Lösungen Proteine zu entfernen, wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 24:24:1) versetzt, kurz geschüttelt und zur Phasentrennung 5 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die wäßrige obere Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend gefällt.

2.8.3 Fällen und Waschen von DNA

Zur Aufreinigung nach einer PCI-Extraktion, Beendigung enzymatischer Reaktionen, sowie zwecks Konzentrierung von DNA und Elimination von Salzen und anderen unerwünschten Reaktionsprodukten wurden Ethanol(EtOH)-Fällungen durchgeführt. Dem Ansatz wurde zum Präzipitieren der DNA 1/10 Volumen 3M NaOAc (pH 5,4) und 2,5 Volumen EtOH (100%) zugegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und für 20 bis 25 min auf Eis oder alternativ über Nacht bei –20^{0}C inkubiert. Nach der Fällung wurde die Probe 10 min bei 13.000 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Als zusätzliche Reinigung wurde 70%iger EtOH hinzupipettiert und nochmals 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet kurz luftgetrocknet, bevor es in einem für die nachfolgenden Versuche geeigneten Puffer aufgenommen wurde.

2.8.4 Quantifizierung von DNA

DNA-Lösungen wurden im Photometer bei 260 nm in einer Quarzküvette quantifiziert. Die Konzentration der Lösung wurde so gewählt, daß die optische Dichte (OD) zwischen 0,1 und 1 lag. Es wurden die folgenden Näherungen verwendet:

Doppelsträngige DNA:	1 OD_{260} = 50 µg/ml
RNA oder einzelsträngige DNA:	1 OD_{260} = 40 µg/ml
Oligonukleotide:	1 OD_{260} = 33 µg/ml

Der Reinheitsgrad der DNA ergibt sich aus dem Quotienten OD_{260} und OD_{280}, er sollte optimal einen Wert von1,8 bis 2 ergeben.

2.8.5 Quantifizierung von Proteinen

Die photometrische Bestimmung von Proteinen erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Das Biorad Reagenz wurde 1:5 verdünnt und je 1 ml zu 1 bis 10µl der zu bestimmenden Probe, bzw. zu 1 bis 12 µg eines BSA-Proteinstandards gegeben und die Lösung bei 595 nm im Photometer gemessen. Die Proteinkonzentration der Probe wurde aufgrund der Eichgeraden des BSA-Standards berechnet.

2.8.6 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

2.8.6.1 Agarosegele

Eine Trennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel wurde sowohl für analytische Zwecke als auch für präparative DNA-Isolierungen in 0,5x TBE-Puffer durchgeführt. Die Agarose wurde in einer Konzentration von 0,8 bis 2 % in 0,5x TBE aufgekocht, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Etbr) versetzt und nach dem Abkühlen auf ca. 60^0C in eine Horizontalkammer mit eingesetztem Kamm gegossen.

TBE (1x): 90 mM Tris/HCl pH 8,3, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA

2.8.6.2 Acrylamidgele

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten unter 300 bp Länge wurden vertikale 4 bis 8%ige (PAA-) Polyacrylamidgele mit 0,5x (Gelretardations-Experimente) bzw. 1x (Sequenzgele) TBE als Laufpuffer verwendet. Zur Herstellung der PAA-Gele wurden fertige Vorratslösungen (Roth) verwendet, die mit Aqua bidest. verdünnt und mit einer dem Laufpuffer entsprechenden Konzentration von TBE versetzt wurden. Die Polymerisation wurde mit APS und TEMED initiiert. Denaturierenden Gelen wurde 7 M Harnstoff zugegeben.

2.8.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

Zur Isolierung radioaktiver DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde das Gel in Plastikfolie eingeschlagen und nach fünfminütiger Autoradiographie des Gels das Fragment mit Hilfe des entwickelten Films detektiert und ausgeschnitten. Das isolierte Gelstück wurde zerkleinert in ein mit Glaswolle präpariertes, am Boden durchlöchertes Reaktionsgefäß gegeben und für zwei Stunden bei -20^0C inkubiert. Nach dem Auftauen wurde das Reaktionsgefäß in ein neues gestellt und für 5 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Das gewonnene Eluat wurde Phenol/Chloroform-extrahiert, präzipitiert und gewaschen.

2.8.7 Präparation von Plasmid-DNA

2.8.7.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung kompetenter E. coli-Stämme DH5α wurde nach der Methode von Morrison, 1975, durchgeführt. Dabei wurde ein Aliquot des Stammes auf einer Agarplatte ohne Antibiotika ausgestrichen, über Nacht bei 37^OC inkubiert, davon eine Einzelkolonie gepickt und wiederum über Nacht in 10 ml LB-Medium inkubiert. 5 ml von diesem Ansatz wurden in 200 ml LB-Medium überführt und bei 37^OC bis zu einer OD_{550} von etwa 0,5 bei 200 UpM geschüttelt. Der Ansatz wurde dann für 3 min auf Eis geschwenkt und

anschließend 5 min bei 5000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig mit 50 ml eiskaltem 0,1 M $MgCl_2$ resuspendiert und in gleicher Weise zentrifugiert. Es erfolgte eine Resuspendierung in 50 ml eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$. Daraufhin wurden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 9 ml 0,1 M $CaCl_2$ und 1,3 ml 14%igem Glycerol aufgenommen, in Reaktionsgefäße aliquotiert, in Flüssig-N_2 schockgefroren und bei –80^{0}C gelagert.

LB-Medium (1 Liter): 5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton

2.8.7.2 Transformation von E. coli mit Plasmiden

Die Transformation der E. coli Stämme DH5α mit Plasmiden wurde nach der Methode von Bergen, 1987, durchgeführt. Dabei wurde der Ligationsansatz (ca. 100 bis 200 ng Plasmid-DNA in 5 µl, zuzüglich 45 µl 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5) mit 200 µl kompetenten Bakterien versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock von 2 bis 3 min bei 42^{0}C und Abkühlung von 1 min auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium inkubierte der Ansatz für 15 bis 30 min bei 37^{0}C. Anschließend wurden aufsteigende Mengen (z.B. 10, 50 und 100 µl) auf LB_{amp}-Platten (LB-Medium mit Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml) ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37^{0}C konnten die sichtbaren Kolonien für Minilysate verwendet werden. Die erzielte Transformationseffizienz betrug zwischen 1x 10^6 bis 10^8 Kolonien pro µg DNA.

2.8.7.3 Analytische Lysate

Zur Analyse von transformierter DNA im Restriktionsverdau wurden einzelne Kolonien gepickt und „Übernacht“-Kulturen in 10 ml LB_{amp} angesetzt. Die Hälfte des Ansatzes wurde bei 5000 UpM zentrifugiert und anschließend Minilysate mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits nach Angaben des Herstellers angefertigt. Im Falle eines positiven Restriktionsverdaus konnte die andere Hälfte des Ansatzes für die präparative Plasmidgewinnung verwendet werden.

2.8.7.4 Präparative Plasmidgewinnung

Zur präparativen Plasmidgewinnung wurde ein Aliquot einer „Übernacht“-Kultur in 200 ml Lb_{amp} überimpft und bei 200 UpM üN. inkubiert. Das durch Zentrifugation bei 5000 UpM über 20 min gewonnene Pellet wurde mit Hilfe des Plasmid-Präparationskits Nucleobond®AX Kit PC 500 bei Raumtemperatur aufgearbeitet. Das gewonnene DNA-Pellet wurde in 200 µl TE-Puffer, pH 8, aufgenommen und restriktionsenzymatisch kontrolliert.

TE-Puffer (1x): 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA

2.8.8 Herstellung radioaktiv markierter Oligonukleotidsonden

2.8.8.1 5´-Endmarkierung

Zur Phosphorylierung der 5´-Enden von Oligonukleotiden mit [γ-^{32}P] ATP wurden zu 200 ng Einzelstrang-DNA 5 µl 10x-Kinasepuffer, 5 µl [γ-^{32}P] ATP, 2 µl T4-Polynukleotidkinase und Aqua bidest. pipettiert, um einen Reaktionsansatz von 50 µl zu erhalten, der zunächst 30 min bei 37^{0}C und dann 10 min bei 65^{0}C (Denaturierung der Kinase) inkubiert wurde. Daraufhin erfolgte ggf. die Hybridisierung der Einzelstrang-DNA.

Kinasepuffer(10x), pH 8,2: 500 mM Tris/HCl, 100 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 50 mM Dithiothreitol, 1 mM Spermidin

2.8.8.2 Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide

Zur Herstellung von doppelsträngiger DNA wurde der 5´-endmarkierten Einzelstrang-DNA der 3,5fache Überschuß der Gegenstrang-DNA hinzugefügt und der Ansatz im Heizblock auf 80^{0}C inkubiert. Nach Ablauf von 10 min wurde der Heizblock ausgestellt und der Ansatz so langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, um eine möglichst vollständige Verschmelzung der Einzelstränge zu Doppelsträngen zu erreichen. Die danach noch

vorhandenen einzelsträngigen Überhänge („sticky ends“) wurden unter Verwendung von dNTPs und des Klenow-Fragments durch 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Abtrennung freier Nukleotide über entsprechende Säulen (s.u.).

2.8.8.3 Abtrennung freier Nukleotide

Um einen Ansatz nach einer Markierungsreaktion von nicht eingebauten Nukleotiden zu befreien, wurde er bei Raumtemperatur über eine Nuctrap®Probe Purification Column („Push Columns“) aufgereinigt. Die Säule wurde mit 70 µl STE-Puffer äquilibriert, der Markierungsansatz mit Aqua bidest. auf 70 µl aufgefüllt, auf die Säule aufgetragen und zweimal mit 70 µl STE-Puffer oder Aqua bidest. eluiert. Das Endvolumen betrug 120 bis 140 µl mit einer Aktivität von ca. 250.000-500.000 cpm/µl. Falls die markierte DNA anschließend für eine PCR eingesetzt werden sollte, empfiehlt sich alternativ eine Aufreinigung über Nick-columns, da bei Aufreinigung über „Push Columns“ eine Hemmung der Amplifikation beobachtet wurde. Die Säule wurde dabei mit 3 ml Aqua bidest. äquilibriert, der Markierungsansatz auf 100 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt, aufgetragen und mit 2x 400 µl Aqua bidest. eluiert, wobei das erste Eluat verworfen wurde. Das zweite Eluat wurde in der Speed vac auf eine Menge von 80 µl verdampft, die eine Aktivität von 10.000 bis 25.000 cpm/µl aufwies.

STE-Puffer (1x), pH 8: 0,1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA

2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Um ein einseitig markiertes, ca. 250 bp großes DNA-Fragment für Sequenzierungen nach Maxam-Gilbert und DNaseI-Footprint-Reaktionen zu erhalten, wurde eine PCR mit dem 5´-endmarkierten Primer 1 (hugas –193 forward), dem nicht markierten Primer 2 (hugas +60 reverse) und dem Template hugas 2kb pst-/pGem1 durchgeführt. Der Amplifikationsansatz wurde nach folgendem Pipettierschema bei Raumtemperatur durchgeführt:

Mastermix 1:	dNTPs (2,5 mM jeweils)	8 µl (final=200 µM)
	Primer 1	150 ng
	Primer 2	150 ng
	Template	100 ng
Mastermix 2:	10x PCR Puffer	10 µl
	Pwo-DNA-Polymerase	2,5 U
	Aqua bidest.	ad 100 µl (Mastermix 1+2)

Nach dem Zusammenpipettieren wurde der PCR-Ansatz mit Mineralöl überschichtet und die DNA folgendermaßen amplifiziert: 1x 94^0C für 3 min, 30x 94^0C/56^0C/72^0C für je 1 min und 1x 72^0C für 10 min.

10x PCR-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,85, 250 mM KCl, 50 mM $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM $MgSO_4$

2.10 Sequenzierung, modifiziert nach Maxam-Gilbert (Maxam und Gilbert, 1980)

Um eine genaue Lage von Proteinbindungsstellen bei Footprintreaktionen zu erhalten, war die Herstellung einer Sequenzleiter, die nach der Maxam-Gilbert-Methode hergestellt wurde, notwendig. Da die Gastrinpromotorsequenz des über PCR gewonnenen 250 bp großen Teilstücks bekannt ist, waren lediglich eine G- und G/A-Modifizierung und Spaltung durchzuführen. Die Reaktionen setzen sich aus einem basenmodifizierenden Schritt (durch DMS, Hydrazin und Ameisensäure) sowie einem diese Modifikation spaltenden Schritt (durch Piperidin) zusammen. So kommt es pro DNA-Molekül im Durchschnitt zu einer Spaltung, und die auf diese Weise entstandene DNA-Population weist ein einheitlich markiertes und unterschiedlich basenspezifisch gespaltene Enden auf. Die basenspezifischen Modifikationsreaktionen wurden nach folgendem Protokoll bei Raumtemperatur durchgeführt:

Reaktion	DNA	Reagenz	Reaktionszeit	Stoplösung
G	10 µl DNA (10 bis 20.000 cpm), 200 µl DMS-	1 µl DMS	4 min	50 µl DMS-Stoplösung, 750 µl EtOH

	Reaktionspuffer			(100 %)
G/A	10 µl DNA (10 bis 20.000 cpm)	25 µl HCOOH	5 min	200 µl Hydrazin-Stoplösung, 750 µl EtOH (100 %)

Nach Zugabe der Stoplösungen wurden die Proben 10 min bei 13.000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl Aqua bidest. resuspendiert und gefällt. Das gewonnene Pellet wurde in 70 µl 10 %igem Piperidin (frisch hergestellt) aufgenommen und für 30 min bei 90^0C inkubiert. Es folgten eine weitere Fällung und eine anschließende Waschung der DNA. Das getrocknete Pellet wurde in 3 bis 6 µl Formamid-Ladepuffer resuspendiert und vor dem Laden des Sequenzgels (8%iges, denaturierendes PAA-Gel, 1x TBE) bei 90^0C 3 min denaturiert und auf Eis abgekühlt.

DMS-Reaktionspuffer:	50 mM Natrium-cacodylat, pH 8, 1 mM EDTA
DMS-Stoplösung:	1,5 M NaOAc, pH 7, 100 µg/ml Hefe-RNA, 1 M β-Mercaptoethanol
Hydrazin-Stoplösung:	0,3 M NaOAc, pH 7, 0,1 M EDTA, 25 µg/ml Hefe-RNA
Formamid-Ladepuffer:	0,1 M NaOH: Formamid (1:2), 0,1 % Xylencyanol, 0,1 % Bromphenolblau

2.11 Herstellung von Kernextrakten

2.11.1 Kernextrakt-Präparation nach Dignam (Dignam et al., 1983)

Die auf diese Weise hergestellten Extrakte konnten sowohl für Gelretardations-Experimente als auch für DNaseI-Footprint-Reaktionen verwendet werden.

Die geernteten, dreimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschenen, bei 1500 UpM für 5 min pelletierten Zellen wurden in 5-fachem Zellvolumen Puffer A resuspendiert, auf Eis 10 min inkubiert, anschließend bei 2000 UpM für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die aufgeschwollenen Zellen wurden nun in 2-fachem Zellvolumen Puffer A aufgenommen und im Dounce Homogenizator durch 10 Auf- und Abbewegungen mit Pistill B lysiert. Die Kerne wurden daraufhin bei 2000 UpM in dickwandigen

Zentrifugenröhrchen für 10 min pelletiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zentrifugation für weitere 30 min bei 10.500 UpM fortgesetzt. Das Kernpellet wurde dann in 1-fachem Pelletvolumen Puffer C resuspendiert, im Dounce Homogenizator durch 10 Auf- und Abbewegungen mit Pistill B lysiert und die Kerne unter leichtem Schwenken 30 min extrahiert. Nach 40-minütiger Zentrifugation bei 10.500 UpM in dickwandigen Zentrifugenröhrchen wurde der proteinhaltige Überstand 2x gegen Puffer D200 für 15 min und 3x gegen Puffer D100 für jeweils 15, 30 und 90 min dialysiert. Anschließend wurden die gewonnenen Kernproteine in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, in Flüssig-N_2 schockgefroren und bei –80^{0}C gelagert.

PBS (1x), pH 7,4 (1 Liter):	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4, 0,24 g KH_2PO_4
Puffer A:	10 mM Tris/HCl pH 7,9, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT*
Puffer C:	20 mM HEPES/Na, pH 7,9, 0,5 M NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM PMSF*, 2 mM DTT*, 25 % Glycerol (V/V)
Puffer D200:	20 mM HEPES/Na, pH 7,9, 12,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA, 2 mM DTT*, 0,25 mM PMSF*, 17 % Glycerol (V/V), 200 mM KCl
Puffer D100:	wie Puffer D200, jedoch KCl 100 mM

* DTT-und PMSF-Stocklösungen wurden bei –20^{0}C gelagert und direkt vor Gebrauch den Puffern zugegeben.

2.11.2 Kernextrakt-Präparation nach Schreiber (Schreiber et al., 1989)

Die auf diese Weise hergestellten Extrakte konnten für Gelretardations-Experimente verwendet werden.

Die Zellen wurden wie unter 2.11.1 geerntet, pelletiert und anschließend in 400 µl Puffer A resuspendiert. Zum Schwellen wurde die Suspension für 15 min auf Eis inkubiert, zur Lysis 25 µl Nonidet P-40-Lösung hinzupipettiert und der Ansatz 10 sec geschüttelt. Das Homogenat wurde dann für 30 sec in einer Minifuge zentrifugiert. Der zytoplasmatische Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 µl Puffer C gelöst und für 15 min bei 4^{0}C geschüttelt. Der Kernextrakt wurde daraufhin bei 13.000 UpM für 5 min zentrifugiert, der

Überstand abgenommen, in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, in Flüssig-N_2 schockgefroren und bei –80^{0}C gelagert.

Puffer A: 10 mM HEPES, pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT*, 0,5 mM PMSF*

Puffer C: 20 mM HEPES, pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1mM DTT*, 1 mM PMSF*

*frisch dazugeben

2.12 Analyse von DNA-Protein-Interaktionen

2.12.1 Gelretardations-Experimente (Bandshifts)

Zum Nachweis von DNA-Protein-Interaktionen wurden radioaktiv markierte doppelsträngige Oligonukleotide mit verschiedenen Kernextrakten sowie unspezifischer Kompetitor-DNA (hier poly dI/dC) inkubiert und über Gelelektrophorese aufgetrennt. An Proteine gebundene DNA wandert dabei langsamer als freie DNA und erscheint als Bande, deren Lage durch Größe, Ladung und Struktur des Bindungskomplexes bestimmt wird. Die Bindungsspezifität der Proteine wurde durch Kompetition der Komplexbildung durch Zugabe von nicht markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden im Überschuß überprüft.

5 bis 20 µg Kernextrakt nach Dignam (Dignam et al., 1983) oder Schreiber (Schreiber et al., 1989) wurden auf Eis aufgetaut und so in Bindungspuffer pipettiert, daß bei einem Endvolumen von 20 µl folgende Konzentrationen vorlagen: 10 mM Tris/HCl*, 5 mM $MgCl_2$*, 1 mM EDTA*, 1 mM DTT*, 75 mM KCl, 10 % Glycerol, 2 µg poly dI/dC, 1 mM Spermidine, ggf. 0,5 bis 2 mM $ZnCl_2$ und Kompetitor-DNA (50 bis 1000facher Überschuß). Dieser Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend das markierte Oligonukleotid hinzugegeben (10 bis 30.000 cpm pro Ansatz) und nochmals 10 bis 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben mit je 3 µl Ladepuffer auf ein inzwischen bei 30 mA vorgelaufenes 4%iges PAA-Gel (0,5x TBE) aufgetragen und ca. 2 Stunden bei 4^{0}C aufgetrennt (Bromphenolblau am unteren Ende des Gels). Anschließend wurde das Gel getrocknet und autoradiographiert.

*Bindungspuffer (5x):	50 mM Tris/HCl, pH 7,9, 25 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 5 mM DTT
Stocklösungen:	750 mM KCl, 50 % Glycerol, poly dI/dC 2 µg/µl, 20 mM Spermidine, 20 mM $ZnCl_2$
Ladepuffer:	1,6 % Bromphenolblau, 40 % Glycerol, 0,5x TBE

2.12.2 Gelretardations-Experimente mit Antikörpern (Supershifts)

Zum genauen Nachweis, um welche Protein-DNA-Komplexe es sich bei den Bandshifts handelt, wurden bei ähnlichem Versuchsaufbau zusätzlich polyklonale Antikörper mitinkubiert. Es standen polyklonale Antikörper gegen die Zinkfingerproteine Sp1, Sp3 und Sp4 (Hagen et al., 1992) zur Verfügung (Dr. G. Suske, IMT, Marburg). Durch die zusätzliche Bindung der Antikörper an die Protein-DNA-Komplexe verändert sich die Wanderungsgeschwindigkeit und somit die Bandenhöhe. Als Vergleich wurde Kaninchen-Präimmunserum eingesetzt.

5 bis 20 µg Kernextrakt nach Dignam (Dignam et al., 1983) oder Schreiber (Schreiber et al., 1989) wurden auf Eis aufgetaut und so in Supershift-Bindungspuffer pipettiert, daß bei einem Endvolumen von 20 µl folgende Konzentrationen vorlagen: *12,5 mM HEPES pH 7,5, *6,25 mM $MgCl_2$, *9 % Glycerol, *5 µM $ZnSO_4$, 1 µg poly dI/dC, 0,5 µg BSA, 0,5 mM $ZnCl_2$ und ggf. Kompetitor-DNA. Nach Inkubation auf Eis für 10 min, Zugabe des radioaktiven Oligonukleotids (10 bis 30.000 cpm pro Ansatz)und weiterer Inkubation auf Eis für 10 min wurden je 1 µl der polyklonalen Antikörper bzw. Kaninchen-Präimmunserum hinzupipettiert und nochmals für 10 min auf Eis inkubiert. Die Gelelektrophorese erfolgte wie bei den Bandshifts.

*Supershift-Bindungspuffer (5x):	62,5 mM HEPES, pH 7,5, 31,25 mM $MgCl_2$, 45 % Glycerol, 25 µM $ZnSO_4$
Stocklösungen:	poly dI/dC 2 µg/µl, BSA 1 µg/µl, 20 mM $ZnCl_2$

2.12.3 DNaseI-Footprinting

Die DNaseI-Footprint-Technik ermöglicht die genauere Aufklärung über die Kontaktregion eines sequenzspezifisch bindenden Proteins auf DNA-Ebene. Hierbei wird ein einseitig endmarkiertes DNA-Fragment einem partiellen Verdau durch DNaseI ausgesetzt, so daß im Durchschnitt jedes DNA-Molekül nur einmal geschnitten wird. Bei anschließender PAA-Gelelektrophorese stellt sich so eine Leiter aller möglichen Spaltprodukte dar. Werden vor der DNaseI-Behandlung spezifisch bindende Proteine mit der DNA inkubiert, so verhindert die Proteinbindung an dieser Stelle den DNaseI-Verdau, und es kommt zum Fehlen von Banden. Eine parallel verlaufende Sequenzreaktion desselben DNA-Fragments ermöglicht die genaue Zuordnung der Kontaktregion.

1.) 80 bis 150 µg Roeder-Kernextrakte (parallel zur Kontrolle BSA in gleicher Konzentration) wurden mit 2,5 µg poly dI/dC und 1x Bindungspuffer in einem Gesamtvolumen von 25 µl gemischt, das einseitig endmarkierte DNA-Fragment (10 bis 30.000 cpm) hinzupipettiert und bei Raumtemperatur 25 min inkubiert. 1 bis 20 U DNaseI (Boehringer), ggf. verdünnt in 10 mM Tris/HCl, pH 8, wurden mit einem vorbereitetem Gemisch von 10 µl 100 mM $MgCl_2$ und 5 µl poly dA/dT 1 min vor Ablauf der Bindungsreaktion zur optimalen Aktivitätsentfaltung der DNaseI inkubiert. Danach wurden beide Ansätze zusammengegeben und der Verdau nach exakt 40 sec durch Zugabe von 50 µl Stoplösung beendet.

2.) 1 bis 6 fpu Sp1-Protein (Promega) wurden mit 25 µl Sp1-Bindungspuffer und Aqua bidest. in einem Gesamtvolumen von 50 µl gemischt und das DNA-Fragment hinzugegeben und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 50 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-Lösung hinzugefügt, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und 3 µl DNase-Verdünnung hinzugegeben. Die DNase-Verdünnung wurde durch Mischen von 0,5 µl DNaseI (Promega) in 10 µl eiskalter10 mM Tris/HCl frisch hergestellt. Der Verdau wurde nach 1 min mit 90 µl Stoplösung beendet.
Die Produkte aus 1 und 2 wurden einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen, gefällt und gewaschen, das getrocknete Pellet wurde in 3 bis 6 µl Formamid-Ladepuffer resuspendiert und vor dem Laden des Sequenzgels (8%iges, denaturierendes PAA-Gel) bei 90^0C 3 min denaturiert und auf Eis abgekühlt.

Bindungspuffer (1x):	12,5 mM HEPES, pH 7,5, 6,25 mM $MgCl_2$, 9 % Glycerol, 5 µM $ZnSO_4$
Stoplösung:	200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 1 % SDS, 100 µg/ml Hefe-RNA
Sp1-Bindungspuffer:	50 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM KCl, 12,5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 20 % Glycerol, 1 mM DTT
Ca^{2+}/Mg^{2+}-Lösung:	5 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$

2.13 Zellkultur

2.13.1 Zellinien und Kultivierung

Alle Arbeiten mit eukaryonten Zellen erfolgten an einem sterilen Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1.

Die Ratteninsulinoma-Zellen RIN38A (Philippe et al., 1988) stammen von einem pluripotenten Inselzelltumor ab und exprimieren bioaktives Gastrin (Wang et al., 1990). Die Zellinie wurde in DMEM-Medium (High Glucose) mit 10 % FCS und 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin kultiviert.
Das Gastringen wird in allen Klassen von bronchogenen Karzinomen exprimiert (Rehfeld et al., 1989). Die NSCLC-Zellen 32M1 (Bepler et al., 1988) und MSTO-211H (Bepler et al., 1988) sowie die SCLC-Zellen H69 (Carney et al., 1985) wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin kultiviert. Die H69-Zellen wachsen in Suspension.
Für Transfektionen wurden möglichst Zellen mit niedriger Passagenummer verwendet, die Transfektion erfolgte in DMEM-Medium mit 10 % FCS und 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin.
Die beschriebenen Zellen wurden routinemäßig in Gewebekulturflaschen (600 ml) kultiviert. Die Kultur erfolgte in wassergesättigter Atmosphäre bei 37^0C unter Begasung mit 5 % CO_2 und 95 % Luft in einem Brutschrank. Die Passagierung erfolgte zweimal wöchentlich. Hierzu wurde das Medium in den Flaschen unter der Werkbank abgesaugt und die konfluenten Zellen mit 6 ml Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden gelöst. Nach

vollständigem Ablösen wurde durch Zugabe von Medium das Trypsin inaktiviert, mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl/ml Medium ermittelt, um anschließend die Zellen in gewünschter Dichte in Flaschen oder auf Petrischalen für Gewebekultur auszusäen. Da H69-Zellen in Suspension wachsen, wurde hier durch Schrägstellung der Flaschen eine Sedation erreicht, so daß das alte Medium vorsichtig abgesaugt werden konnte, eine Trypsinierung war nicht nötig.

2.13.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die nicht für Experimente benötigt wurden, wurden eingefroren und in Flüssig-N_2 gelagert. Hierzu wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, geerntet und für 5 min bei 1500 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in Medium mit 10 % DMSO resuspendiert, in Kryogefäße aliquotiert und für zwei Stunden bei –80^{0}C gefroren, bevor sie in Flüssig-N_2 gelagert wurden. Das Auftauen erfolgte möglichst schnell im warmen Wasserbad, anschließend wurden die Zellen in wenig Medium für 5 min bei 1500 UpM zentrifugiert, das Pellet in neuem Medium resuspendiert und in eine vorbereitete Gewebekulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde nochmals das Medium gewechselt, um ein optimales Anwachsen zu erreichen.

2.13.3 Transiente Transfektion

Das Einführen von DNA in eukaryonte Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Bei der transienten Transfektion soll es dabei zu einer vorübergehenden Expression des fremden Gens kommen. Der Nachweis der Genexpression nach der Transfektion kann dabei mit Hilfe des Luciferase-Reportergens (pGL2-Basic) erfolgen, das hinter die Gastrinpromotorsequenzen (Simon et al., 1997) kloniert wurde. Unterschiede der Transfektionseffizienz wurden durch Kotransfektion mit dem Kontrollplasmid pSV-β-Gal., welches Galaktosidase exprimiert, kontrolliert und normalisiert. Als Negativkontrolle diente das promotorlose Luciferaseplasmid pGL2-Basic. Als Positivkontrolle diente der Vektor pGL2-Control, der ein hinter den SV40-Promotor geschaltetes Luciferasegen enthält und so zur Kontrolle der Transfektionseffizienz dient.

2.13.3.1 Calcium-Phosphat-Methode (Wigler et al., 1979)

Bei den Zellinien H69, 32M1 und MSTO-211H führte die Calcium-Phosphat-Methode zu einer guten Transfektionseffizienz. Die Zellen wurden so auf 30 mm-Schalen ausgesät, daß sie am nächsten Tag zu 50 bis 70 % konfluent waren. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Je Schale wurden 5 µg Plasmid-DNA und 2 µg pSV-β-Gal.-Plasmid in 250 µl $CaCl_2$-Lösung in einem Röhrchen gemischt und über „Bubbeln" (Luftzufuhr über eine Glaspipette) langsam in ein zweites Röhrchen mit 250 µl 2x HBS überführt. Dieser Ansatz wurde 30 bis 40 min bei Raumtemperatur inkubiert und das so entstandene feine Präzipitat auf die inzwischen mit DMEM-Medium versehenen Schalen gegeben. Nach 18 bis 24 h wurde den Zellen wieder ihr eigenes Medium zugeführt, weitere 24 h später wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS geerntet und die Luciferase- und β-Galaktosidase-Aktivität bestimmt.

Calciumchlorid-Lösung (sterilfiltriert):	250 mM $CaCl_2$
HBS (2x), pH 7,05 (sterilfiltriert):	50 mM HEPES, 10 mM KCl, 12 mM Dextrose, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na_2HPO_4

2.13.4 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Die in 1 ml 1x PBS geernteten Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Reporter Lysis Puffer (Promega, 1:5 in Aqua bidest. verdünnt) gelöst und zweimal in Flüssig-N_2 schockgefroren. Nach der so provozierten Zellysis wurde der Ansatz nochmals zentrifugiert und der Überstand (Cytosol) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 1 bis 5 µl des Überstandes wurden für die Messung am Luminometer in Meßröhrchen pipettiert, wobei im Gerät je 100 µl Luciferase Assay Substrate injiziert wurden. Der Leerwert betrug etwa 100 Light-Units und wurde automatisch von den Meßwerten abgezogen.

2.13.5 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

Als interner Standard wurde das pSV-β-Gal.-Plasmid kotransfiziert. Zur Hitzeinaktivierung der zelleigenen β-Galaktosidase wurde der Überstand aus der Bestimmung der Luciferase-Aktivität für 50 min bei 48^0C inkubiert. Anschließend wurden zur Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität 66,6 µl Reaktionspuffer (Tropix: Galacton-Plus™ Substrate, 1:100 mit Galacto-Light™ Reaction Buffer Diluent verdünnt) im Abstand von 20 sec zu 1 bis 5 µl des Überstandes pipettiert und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung am Luminometer erfolgte im gleichen Zeitabstand, als Reagenz wurde Light Emission Accelerator vom Gerät injiziert. Der Leerwert betrug etwa 100 Light-Units und wurde automatisch von den Meßwerten abgezogen.