

Einfluss DNA-bindender Proteine auf die Hybridisierungsdynamik diagnostischer DNA-Mikroarrays

Institut für technische Biochemie der Universität Stuttgart

Prof. Dr. Rolf D.Schmid

Arbeitsgruppe Analytische Biotechnologie

Dr. Till Bachmann

Diplomarbeit

vorgelegt von

Gunnar Schulz

Stuttgart 2002

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir eigenständig
und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde.

Gunnar Schulz

Danksagung:

An diese Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Rolf D. Schmid für die Bereitstellung des Themas und die exzellenten Arbeitsbedingungen am ITB bedanken.

Dr. Till Bachmann danke ich für die gute Betreuung und Hilfestellungen, besonders beim schriftlichen Teil dieser Arbeit.

Dr. Satoshi Ezaki gilt mein Dank für die Einarbeitung und Betreuung des praktischen Teils der Arbeit. Des weiteren verdanke ich ihm die Idee, die dieser Arbeit zugrunde liegt.

Dr. Francois Villatte stand mir stets mit guten Ratschlägen, besonders bei der PCR, zur Seite. Dafür danke ich ihm sehr.

Ich danke auch allen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Analytische Biotechnologie für die phantastische Atmosphäre bei der Arbeit.

Allen Mitarbeitern des ITB danke ich herzlich für Ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern gilt ein ganz besonderer Dank, nicht nur für Ihre sehr großzügige finanzielle Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Schließlich möchte ich dem Bundesministerium (BMBF) für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projektes GenoMik „Schnelldiagnose von Antibiotika-Resistenzen in der Medizin“ danken

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Hybridisierungsdauer bei DNA-Mikroarrayexperimenten durch einen biochemischen Ansatz zu verringern. Dabei wurden Arrays mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasobjektträgern zur SNP-Detektion im β -Lactamasegen verwendet. Durch den Zusatz des Tumorsuppressorproteins p53 sollte die Hybridisierung komplementärer Sonde und Probe beschleunigt werden. Von diesem Protein ist u.a bekannt, daß es einen Effekt auf die Hybridisierungskinetik von DNA-Einzelstränge *in vivo* und *in vitro* besitzt.

Zur Kontrolle und Optimierung dieser p53-Aktivität wurden Hybridisierungsversuche mit fluoreszenzmarkiertem PCR-Produkt und einzelsträngigen Oligonukleotiden durchgeführt. Der Nachweis von DNA-Einzel- bzw. Doppelsträngen erfolgte über deren unterschiedliches Laufverhalten in Acrylamidgelen (*Band shift assay*). Die Hybridisierungskinetik beider Ansätze konnte durch den Einsatz von p53 beschleunigt werden.

Die in den *Band shift* Experimenten ermittelten Reaktionsbedingungen wurden nachfolgend auf Mikroarray-Versuche übertragen. Auch für dieses heterogene System mit festphasengebundener Sonden-DNA konnte eine Verkürzung der Hybridisierungsdauer mit p53 gezeigt werden. Bereits nach 30-minütiger Inkubation wurden deutliche Hybridisierungssignale nachgewiesen. Gegenüber Hybridisierungsversuchen mit reinem Puffer, ist dies ein deutlicher Zeitgewinn.

Um den Bedarf an p53 nachfolgender Arrayexperimente decken zu können, wurden initiale Klonierungs- und Expressionsversuche in *E.coli* durchgeführt.

Abstract

In this work the hybridization time of DNA-microarray experiments should be decreased by a biochemical approach. Therefore poly-L-lysine coated glass-slides for SNP-detection in the β -lactamase gene were used. Accelerated hybridization of DNA-probe with target should be achieved by the addition of the tumor suppressor protein p53. This protein is known to have an effect on the hybridization kinetics of DNA-single strands *in vivo* and *in vitro*.

To verify the p53-activity hybridization experiments with fluorescence labeled PCR-product and single stranded oligonucleotides were performed. DNA-single and double strands were detected by their different migration in polyacrylamide gels (band shift assay). The hybridization kinetics for both approaches was accelerated by the use of p53.

The experimental conditions of band shift experiments were transferred to microarray tests. The reduction of hybridization with p53 could also be shown in this heterogeneous system with bound probe-DNA. Even after 30 min of incubation a clear hybridization signal could be detected. This was a clear shortening compared to attempts with pure buffer.

To assure a continuous supply of p53 for coming array experiments initial cloning and expression experiments in *E.coli* were performed.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Mikroarrays	10
1.2	DNA-Hybridisierung in Lösungen	11
1.3	DNA-Hybridisierung auf Mikroarrays	12
1.4	Das Protein p53	16
2	Material und Methoden	20
2.1	Materialien	20
2.2	Medien und Lösungen	21
2.3	Sequenzen	24
2.3.1	Primer und Sequenzen der Gelexperimente	24
2.3.2	Primer und Sequenzen der Probe	24
2.3.3	Primer für die Klonierung	25
2.4	Geräte	25
2.5	Molekularbiologische Techniken	26
2.5.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i>	26
2.5.2	Plasmid-Isolierung	26
2.5.3	Phenol/Chloroform Fällung	26
2.5.4	Agarosegelelektrophorese	27
2.5.5	Transformation	27
2.5.6	SDS-PAGE	27
2.6	Klonierung und Expression von p53	28
2.6.1	Klonierung	28
2.6.2	Sequenzierung	29
2.6.3	Expression	30
2.6.4	Zellaufschluss	30
2.6.5	Protein-Aufreinigung durch Säulenchromatographie	30
2.6.6	Aufschluss von Einschlusskörpern	30
2.7	Kontrolle und Optimierung der p53-Aktivität (<i>Band shift assay</i>)	31
2.7.1	Hybridisierungs-Experimente mit PCR-Produkt	31
2.7.2	Hybridisierungs-Experimente mit Oligonukleotiden	32
2.8	Mikroarrays	33
2.8.1	Herstellung der Mikroarrays	33
2.8.2	Herstellung der Proben-DNA	34
2.8.3	Durchführung der Array-Experimente	35

3 Ergebnisse	37
3.1 Klonierung und Expression von p53	37
3.1.1 Klonierung	37
3.1.2 Sequenzierung	39
3.1.3 Expression	41
3.1.4 Zellaufschluss und Protein-Aufreinigung	42
3.1.5 Aufschluss von Einschlusskörpern	43
3.2 Kontrolle und Optimierung der p53-Aktivität	44
3.2.1 Hybridisierungs-Experimente mit PCR-Produkt	44
3.2.2 Hybridisierungs-Experimente mit Oligonukleotiden	46
3.3 Mikroarrays	49
3.3.1 Herstellung der DNA-Proben	49
3.3.2 Durchführung der Mikroarray-Experimente	51
4 Diskussion	57
4.1 Klonierung und Expression von p53	57
4.2 Kontrolle und Optimierung der p53-Aktivität	58
4.3 Mikroarrays	59
5 Literatur	62

Abkürzungen:

Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
DCE	1,2-Dichlorethan
dCTP	3'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
ddH ₂ O	destilliertes, demineralisiertes Wasser
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
dNTP	3'-Desoxynukleosin-5'-triphosphat
ddNTP	2', 3'-Didesoxynukleosin-5'-triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria Bertani Medium
LB-Amp	Luria Bertani Medium mit Ampicillin
m	Meter
M	Molar [mol/l]
mM	Millimolar
mA	Milliampere
MES	2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid
min	Minuten
N ₂	Stickstoff
nm	Nanometer
OD _x	Optische Dichte der Wellenlänge x nm
PBS	Phosphate buffered solution
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentia hydrogenii
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SDS	Natrium dodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
SSC	Standard Saline Citrate
ssDNA	einzelsträngige DNA
Tab.	Tabelle
U	Unit [mmol/min]
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Mikroarrays

Die DNA Mikroarray-Technologie hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Werkzeug der biologischen und medizinischen Analytik entwickelt [1-5]. Sie wird u.a. in der Expressionsanalyse [6-10], DNA-Sequenzierung [11-13] und Genomanalyse [14-16] angewendet.

Das Substrat der DNA-Arrays besteht meist aus einfachen beschichteten Glasobjektträgern. Diese tragen bekannte DNA Fragmente (Sonde) an definierten Stellen. Als Sonde finden synthetische Oligonukleotide, cDNA, PCR-Produkte oder Plasmide Verwendung. Heute können bis zu 10.000 Sonden-DNA Punkte auf einer Fläche von 3,6 cm² platziert werden [17]. Die dafür nötigen Maschinen werden Spotter oder Arrayer genannt. Die ersten Spotter verwendeten Split Pins, die die Sonde mit mechanischen Kontakt auf das Substrat bringen. Als Sondenreservoir dient die hohle Spotnadel. Ferner gibt es Pin and Ring Arrayer, die mit massiven Nadeln spotten und Piezospotter, deren Probenauftrag ohne mechanischen Kontakt zur Substratoberfläche erfolgt (Abbildung 1). Allen Arrayern gemein ist das exakte Auftragen der Sonde mit einem Punkt-Durchmesser von 50-150 µm [17,18].

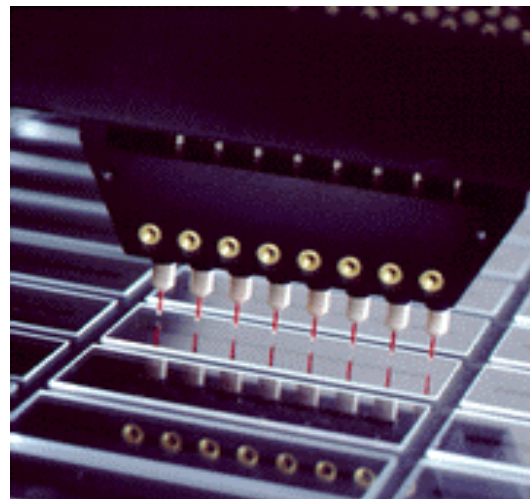
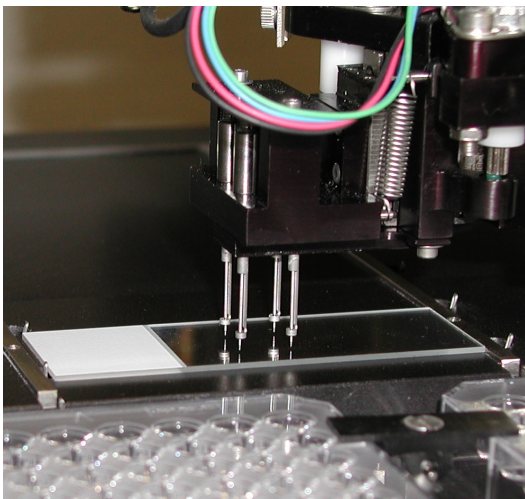


Abbildung 1 : Fotos der Druckeinheiten von **A** Kontakt Pin and Ring Spotter (GMS 417 Arrayer) und **B** kontaktlosem Piezo-Spotter (SpotArray™ Enterprise) [19]

Nachdem die Sonde aufgebracht wurde, muss sie an die Matrixoberfläche gebunden werden. Damit wird verhindert, dass sie sich bei den folgenden Waschschrritten vom Substrat löst. Die Immobilisierung kann z.B. durch eine Beschichtung der Glasoberfläche mit Poly-L-Lysin erfolgen. Die Sonde wird durch UV-Licht Aktivierung über Thymidin-Reste kovalent an die Beschichtung gebunden. Eine weitere Methode ist die Immobilisierung der DNA über ein Ende des Strangs. Dazu verwendet man u.a. Oligonukleotide mit kovalent gebundenem Biotin. Über die Beschichtung, z.B.

mit Streptavidin, kann die DNA dann nicht kovalent an die Substratoberfläche gebunden werden [20]. Bei der *in situ* Synthese wird die Sonde Base für Base auf dem Array synthetisch hergestellt [21,22]. Auf diese Weise kann jede gewünschte Sequenz mit maximal etwa 25 Basen aufgebaut werden.

Bei der Durchführung eines Arrayversuches wird meist fluoreszenzmarkierte DNA (Probe) mit der Sonde hybridisiert. Stellen auf dem Array, an die komplementäre Sequenzen binden, können dann als fluoreszierende Punkte auf dem Substrat nachgewiesen werden [23].

1.2 DNA-Hybridisierung in Lösungen

Die Bildung eines DNA-Doppelstranges wird Hybridisierung genannt. Sie ist das grundlegende Prinzip von DNA-Mikroarrays. Die Basen Adenin und Thymin, bzw. Guanin und Cytosin sind komplementär und binden einander spezifisch über Wasserstoffbrückenbindungen (Abbildung 2 A). Hybridisierung erfolgt bei Komplementarität. Diese wird durch die Sequenz bestimmt

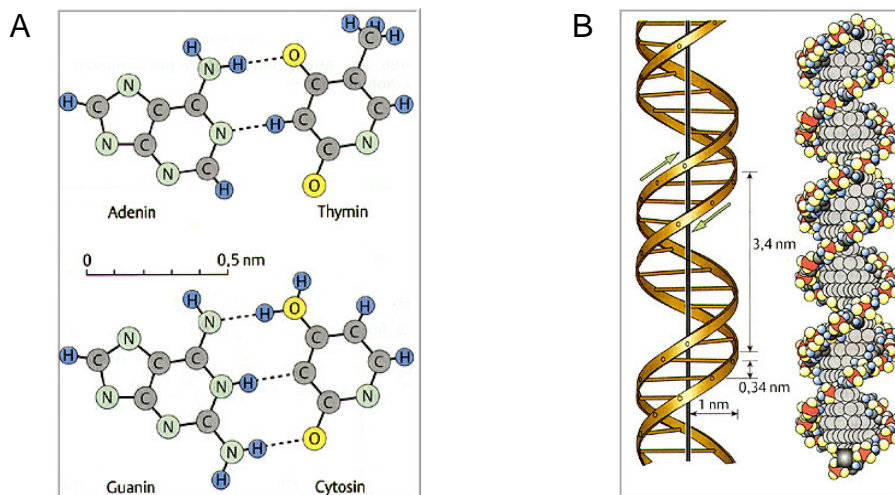


Abbildung 2: Bindungsprinzip der DNA. **A** Basenpaarung über Wasserstoffbrücken [24], **B** Watson&Crick Modell der DNA-Doppelhelixstruktur [24].

Komplementäre DNA-Einzelstränge bilden stabile Hybridmoleküle mit geordneter Doppelhelixstruktur (Abbildung 2 B). Die Schmelztemperatur (T_m) eines Doppelstrangs steht in direktem Zusammenhang mit seiner Stabilität. Diese ist definiert als die Temperatur, bei der die Hälfte der vorliegenden DNA als Einzelstrang vorliegt. T_m ist vor allem abhängig von der Zusammensetzung der DNA. Je höher der G-C Gehalt ist, desto stabiler ist das Hybrid. Die Ursache dafür liegt in der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen. Den drei Bindungen zwischen G und C stehen zwei zwischen A und T gegenüber. Für kurze DNA-Stränge gilt annähernd: Jedes G-C Basenpaar eines Doppelstranges erhöht die Schmelztemperatur um 3°C , jedes A-T um 2°C . Des weiteren hängt die Schmelztemperatur von der Länge der Einzelstränge und deren Konzentration ab. Ferner spielt die Salzkonzentration des Mediums eine wichtige Rolle. Kationen, meist Na^+ , schirmen das negativ geladene, sich gegenseitig abstoßende Phosphatrückgrat der Doppelhelixstruktur ab. Hohe Salzkonzentrationen beschleunigen dadurch die Hybridisierung und stabilisieren

doppelsträngige DNA. Die Schmelztemperatur eines DNA-Doppelstranges kann unter Berücksichtigung dieser Parameter berechnet werden (Formel 1)

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 \log [c (\text{Na}^+)] + 0,41(\% \text{ G+C}) - 500/n$$

Formel 1: Formel zur Berechnung der Schmelztemperatur (T_m) von DNA-Doppelsträngen. c -Konzentration des hybridisierten Sequenzabschnitts; n -Länge des hybridisierten Sequenzabschnitts in Basenpaaren [25]

Neben vollständig komplementären Hybriden können auch Doppelstränge mit ungepaarten Abschnitten entstehen. Stränge mit solchen Fehlpaarungen werden Heteroduplexe genannt. Sie sind weniger stabil als Hybriddoppelstränge ohne Fehlpaarungen. Unter geeigneten Salzkonzentrationen und Temperaturbedingungen kann die Formation von Heteroduplexen verhindert werden. Diese Bedingungen werden als stringent bezeichnet.

1.3 DNA-Hybridisierung auf Mikroarrays

DNA-Hybridisierungen in Lösung folgen einer Kinetik 2. Ordnung. Im Gegensatz dazu verläuft die Reaktion mit Festphasen-gebundenen Sonden (Mikroarrays) und Probenüberschuss annähernd 1. Ordnung. Ein weiterer Unterschied zur Reaktion in Lösung, ist die Hybridisierungsdauer. Sie ist aufgrund der gebundenen Sonde um den Faktor 5-10 langsamer. Formel 2 beschreibt die Kinetik dieser heterogenen Hybridisierungsreaktion. Dabei gibt $t_{1/2}$ die Zeit wieder, zu der die Hälfte der Probe mit Sonde reagiert hat.

$$t_{1/2} = \frac{N \ln 2}{K_n (L^{1/2}) C}$$

N Komplexität der Probe ($N=L$ für Proben ohne sich wiederholende Sequenzen)
 K_n Reaktionskonstante ($K_n=3,5 \cdot 10^5$ für $[\text{Na}^+]$ 0,4-1 M, pH 5-9 und Hybridisierungstemperatur $T_m-25^\circ\text{C}$)

Formel 2: Die Gleichung zeigt die Zusammenhänge der Hybridisierungszeit, der Länge der Probe und deren Konzentration. $t_{1/2}$ gibt die Zeit an, bei der die Hälfte der Probe mit der Sonde reagiert hat. C ist die Konzentration und L die Länge der Probe.

Bei konstanter Konzentration hängt $t_{1/2}$ stark von der Länge der Probe ab. Dies veranschaulichen die folgenden Werte bei einer Proben-Konzentration von 1 nM. So ist $t_{1/2}$ für 20mere 148 min, für 100mere 330 min und für 1000mere bereits 17,4 h. Einen vergleichbaren Einfluss auf $t_{1/2}$ hat eine veränderte Proben-Konzentration. Wird sie verdoppelt, halbiert sich $t_{1/2}$. Um eine schnelle Hybridisierungsreaktion zu gewährleisten, sollten Sonde und Probe möglichst kurz sein. Dabei muss darauf

geachtet werden, dass die Spezifität der Hybridisierung nicht verloren geht. Für das humane Genom sollte die DNA deshalb nicht kürzer als 17 nt sein. Für eine exakte Hybridisierung ist eine übereinstimmende Größe von Sonde und Probe ideal [26]. Wenn die Probe dagegen sehr lang ist, können sich leicht Sekundärstrukturen bilden und dadurch ganze Abschnitte der Sequenz verdecken. Diese stehen dann nicht mehr für die Hybridisierung zur Verfügung. Es kann dadurch sogar zu unspezifischen Bindungen kommen (Abbildung 3). Ferner können solch sperrige Moleküle die Bindung weiterer Probe durch das Verdecken der Sonde behindern.

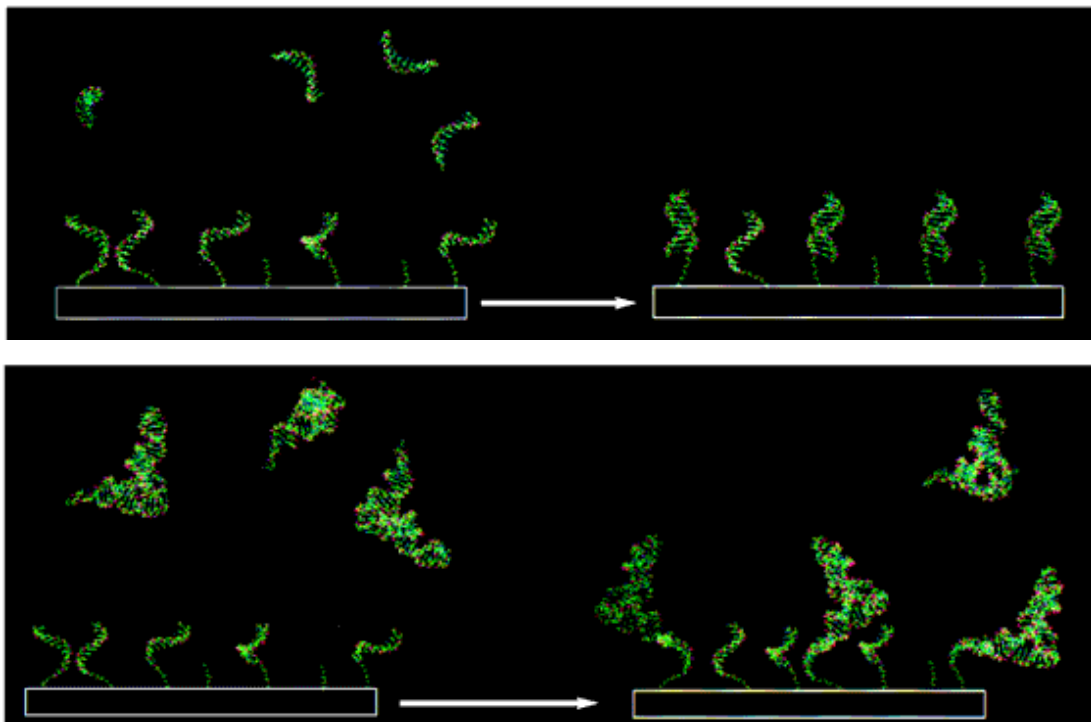


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hybridisierungsereignisse auf einem Mikroarray mit **A** kurzen und **B** langen Proben-Molekülen. Durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen kann es bei langen Proben zu unspezifischen Bindungen kommen [27].

Neben den Eigenschaften von Sonde und Probe haben die Reaktionsbedingungen einen großen Einfluss auf die Hybridisierung. Sie stellen meist einen Kompromiss zwischen möglichst kurzer Inkubationsdauer und hoher Stringenz dar. Üblicherweise liegt die Hybridisierungstemperatur 5-15°C unter der Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten DNA. Bei dieser Temperatur steht die Stringenz im Vordergrund. Die Bildung von Hybriden verläuft dabei jedoch vergleichsweise langsam. Andererseits wird durch die Verwendung hoher Salzkonzentrationen (0,6-1 M) die Hybridisierung beschleunigt. Dies basiert auf der Abschirmung des sich gegenseitig abstoßenden, negativ geladenen Phosphodiester-Rückrats durch positiv geladene Ionen (meist Na^+). Daneben wird die Stabilität doppelsträngiger DNA vergrößert. Allerdings wirkt sich eine hohe Salzkonzentration negativ auf die Stringenz der Hybridisierung aus, so dass es zur Bildung von Heteroduplexen kommen kann. Durch stringentes Waschen im Anschluss an die Hybridisierung können solch unspezifische Bindungen wieder gelöst werden. Üblicherweise wird in mehreren Schritten mit Salzlösungen

sinkender Konzentration gewaschen (z.B. 2x SSC, 0,2x SSC). Je niedriger die Salzkonzentration, desto stringenter sind die Bedingungen. Da die Bindungsstärke von Heteroduplexen schwächer ist als die vollständig komplementärer Sequenzen, lösen diese sich zuerst von der Sonde.

Die Hybridisierungszeiten einiger typischer Mikroarray-Anwendungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Der Kinetik entsprechend hängen die Inkubationszeiten meist direkt mit der Sonden- und Probenlänge zusammen.

Anwendung	Art der Sonde	Größe der Sonde	Hybridisierung	Zitat
Expressionsanalyse	Oligonukleotide	20-25 nt	16 h bei 45°C	[28]
Expressionsanalyse	PCR-Produkt	0,2-4 kb	über Nacht bei 64°C	[6]
SNP-Analyse	Oligonukleotide	ca. 20 nt	2-4 h bei 42°C	[29]
Sequenzierung	Oligonukleotide	17 nt	19 h bei 5°C	[30]

Tabelle 1: Typische Hybridisierungszeiten einiger Array-Anwendungen.

Mikroarrays mit mehrfach ungerichteter Sonde haben einige Nachteile gegenüber anderen Immobilisierungen. Einige Thymidin-Basen stehen aufgrund der Bindung mit der Oberflächenbeschichtung nicht mehr für die Hybridisierung mit der Probe zur Verfügung. Dadurch ist die Stabilität der Hybride geringer und es können unspezifische Bindungen auftreten. Da die Sonde bei dieser Verknüpfungsart sehr nahe am Substrat gebunden ist, wird deren Zugänglichkeit erschwert. Als Folge verläuft die Hybridisierung recht langsam. Das gleiche gilt in abgeschwächter Form für Arrays, deren Sonden an einem Ende des Stranges gebunden sind. Bei ihnen ragt ein Teil der Sonde vom Substrat weg. Eine wesentlich schnellere Hybridisierung wird aber auch hier durch die Nähe zu Oberfläche verhindert. Ein deutlicher Vorteil dieser Immobilisierung ist die freie Zugänglichkeit der gesamten Sonden-Sequenz. Die geeignetste Immobilisierungsmethode scheint die Fixierung der Sonde über ein Abstandsstück [31]. Durch die Entfernung von der Glasoberfläche ist sie für die Probe gut erreichbar. Da die Befestigung über ein Strangende erfolgt, steht auch hier die gesamte Sequenz für die DNA-Bindung zur Verfügung. Es hat sich gezeigt, dass die Hybridisierung im Vergleich mit den anderen Methoden bis zu 150 fach schneller abläuft [27].

Es gibt verschiedene technische Ansätze die Hybridisierungszeiten zu verringern. Ein Beispiel ist der Flow-Thru Chip der Firma Gene Logic. Hier wird das Problem der eingeschränkten Bewegung der Probe mechanisch gelöst. Der Chip besteht aus einer gleichmäßig porösen Matrix mit Kanälen, auf deren Oberfläche die Sonde immobilisiert wird. Die Probe wird durch mechanische Pumpen durch die Kanäle geleitet. Der aktive Massentransport beschleunigt die Hybridisierung gegenüber herkömmlichen passiven Methoden um etwa das sechsfache [26]. Durch die

vergrößerte Oberfläche ist die Signalintensität gegenüber zweidimensionalen Arrays zusätzlich gesteigert.

Bei elektronischen Mikroarrays der Firma Nanogen wird die Proben-DNA in Gel über Elektroden immobilisiert. Die negativ geladene Probe wird aktiv durch Anlegen eines positiven elektrischen Feldes zu den Elektroden transportiert. Nach einer sehr kurzen Hybridisierungszeit von nur 20-30 Sekunden werden Heteroduplexe und nicht hybridisierte DNA durch ein negatives elektrisches Feld von den Elektroden wegtransportiert. Die Stärke des elektrischen Feldes kann so justiert werden, dass nur Hybride ohne Basenfehlpaarung am Chip gebunden bleiben (elektronische Stringenz) [32].

Da die bisherigen Methoden eine aufwendige und meist teure Arraytechnik voraussetzen, ist deren Anwendung nicht für alle Experimente geeignet. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll die Hybridisierungsdauer, z.B. durch einen biochemischen Ansatz zu verkürzen. Auf diese Weise könnten die einfach herzustellenden und günstigen Arrays mit beschichteten Glasobjektträgern verbessert werden. Man könnte dies z.B. durch den Einsatz von Proteinen als Mediatoren der Hybridisierung erreichen.

1.4 Das Protein p53

Eine Möglichkeit, die Hybridisierung bei Mikroarrays zu beschleunigen, könnte das Protein p53 bieten. Dieses *Tumor suppressor* Protein wird in Zellen mit DNA-Schäden besonders stark exprimiert [33]. Es besitzt transskriptionsregulierende Funktionen und beschleunigt die Hybridisierungskinetik homologer DNA-Einzelstränge und RNA *in vivo* und *in vitro* [34,35]. An dieser Reaktion sind jeweils Bereiche des C-Terminus und der Mittel-Domäne beteiligt (Abbildung 4) [33].

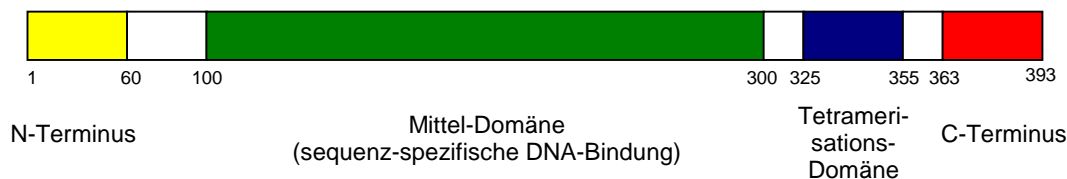


Abbildung 4: Unterteilung des Proteins p53 in funktionelle Domänen. Die Zahlen geben die Nummer der Aminosäuren im Protein an [36].

Es ist bekannt, dass der C-Terminus kurze ssDNA mit hoher Affinität bindet und längere Stränge an deren Enden. Es können auch DNA-Doppelstränge mit Einzelstrang-Enden oder Einzelstrang-Lücken gebunden werden [37]. Der C-Terminus allein kann die Hybridisierung besonders von kurzen, komplementären Einzelsträngen beschleunigen. Ein mögliches Modell dieser Katalyse zeigt Abbildung 5 A. Die DNA-Stränge binden jeweils an ein p53 und werden zusammengeführt. Dadurch wird die Hybridisierung komplementärer Stränge beschleunigt [33,35].

Ferner hat die Bindung einzelsträngiger DNA an den C-Terminus einen aktivierenden Effekt auf die Mitteldomäne. Dadurch können lange ssDNA-Stränge an dieser Domäne binden. Diese Verknüpfung ist unabhängig von der Sequenz und erfolgt bevorzugt im mittleren Bereich der ssDNA [37,38]. Abbildung 5 B zeigt einen möglichen Ablauf eines zweiten Katalysemechanismus. Kurze ssDNA bindet an den C-Terminus und aktiviert die Mitteldomäne, lange ssDNA sequenzunspezifisch zu binden. Nun gleitet das Protein am langen Einzelstrang entlang. Wird eine Stelle erreicht, die komplementär zum gebundenen Einzelstrang ist, findet Renaturierung statt.

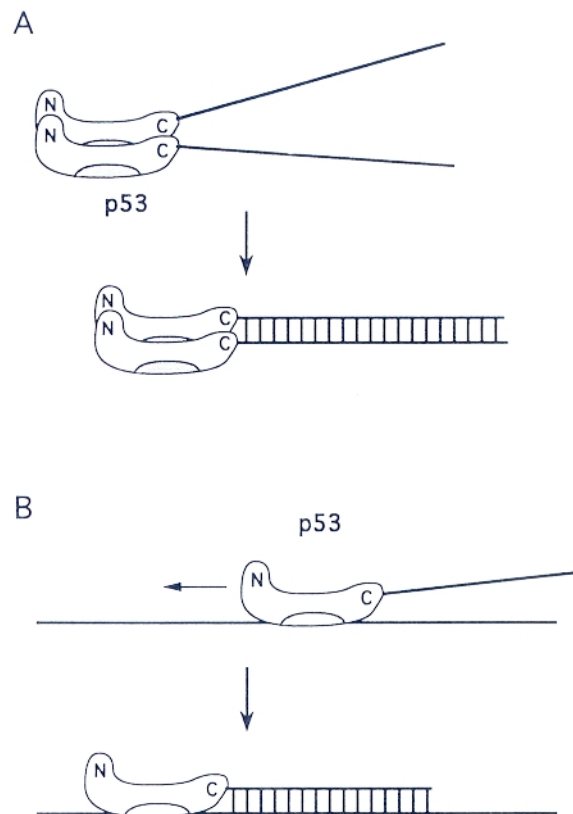
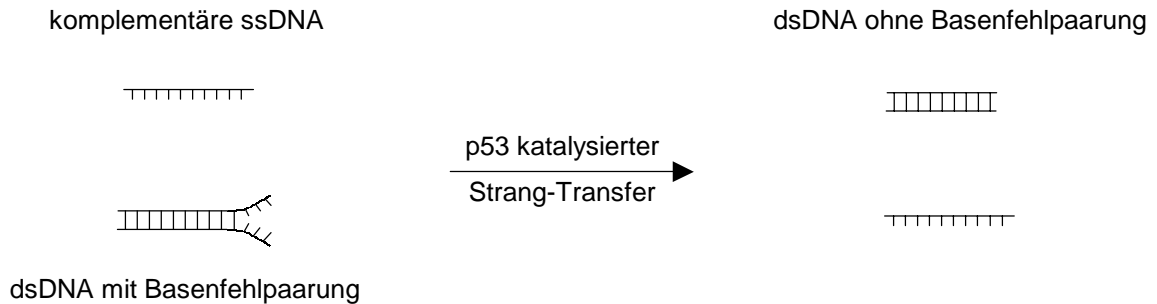


Abbildung 5: Modell des möglichen Ablaufs der katalytischen Aktivität von p53, komplementäre DNA-Einzelstränge zu renaturieren [33,38]. **A** Katalyse des C-Terminus, **B** Gemeinsame Katalyse der Mittel-Domäne und des C-Terminus.

Überdies besitzt p53 die Eigenschaft, DNA-Stränge auszutauschen [39]. Dabei wird die Verbindung von DNA-Doppelsträngen mit Basenfehlpaarungen gelöst und gegen komplementäre Stränge ausgetauscht (Abbildung 6 A). Auch der Strang-Austausch kurzer komplementärer Doppelstränge gegen lange Stränge wird katalysiert (Abbildung 6 B). Voraussetzung dafür ist, dass der kurze Doppelstrang ein offenes Einzelstrang-Ende hat, da p53 sonst nicht binden könnte [39].

Die Erkenntnisse über die katalytischen p53-Funktionen wurden größtenteils mit Acrylamidgelen untersucht. Für diese sogenannten *Band shift assays* wurden radioaktiv markierte und unmarkierte Einzelstrang-Oligos verwendet. Die Unterscheidung zwischen Einzel-, bzw. Doppelsträngen konnte aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens im Acrylamidgel bestimmt werden [39,40].

A



B

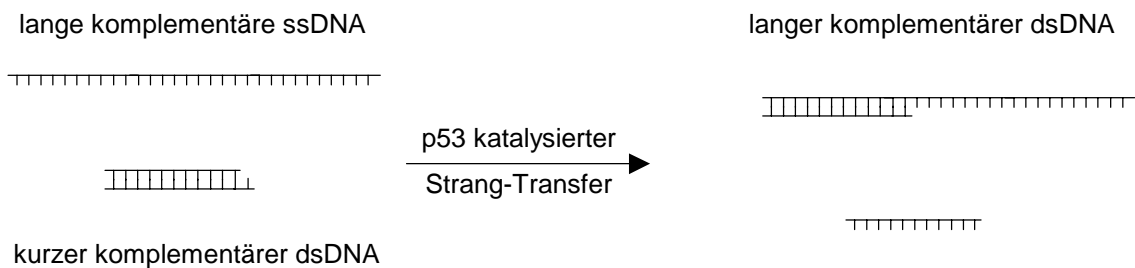


Abbildung 6: Modell der Strang-Transfer Aktivität von p53. **A** Austausch eines Stranges mit Basenfehlpaarung gegen einen komplementären Strang, **B** Austausch eines kurzen Strangs gegen einen langen

Neben dem Einfluss auf die Hybridisierungskinetik kann p53 die Transkription von Genen regulieren, die p53 responsive Elemente tragen [36,41,42]. Diese responsiven Elemente enthalten mehrere Wiederholung der Sequenz 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3'. Pu steht dabei für die Purinbasen Adenin und Guanin, Py für die Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin [43]. Die p53 Mittel-Domäne ist eine Bindestelle dieser Consensus-Sequenz (Abbildung 4).

Es gibt eine Vielzahl verschiedener Gene, die p53 responsive Elemente in ihrer Promotor-Region tragen und deren Transkription durch p53 reguliert wird [41,42]. Neben der Regulation einiger Zellzyklus steuernder Gene (z.B. Cyclin G [44], Gadd45 [45]), wird die Transkription des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p21 gesteigert. Dies löst einen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase aus [46]. Die durch p53 gesteigerte Expression von Mdm2 beeinflusst dessen Funktion, indem Mdm2 an p53 bindet und es dadurch autoregulatorisch deaktiviert [47,48]. Ein weiteres Beispiel ist die gesteigerte Transkription des Apoptose-Aktivators Bax, wodurch Apoptose ausgelöst werden kann [49].

Eine Voraussetzung für die Transkriptionsregulation von p53 ist die Zusammenlagerung mehrerer Protein-Molekülen an dem jeweiligen responsiven Element [50]. Das Protein besitzt eine Tetramerisations-Domäne (Abbildung 4), durch die es stabile, funktionelle tetramere Komplexe bilden kann (Abbildung 7) [51-53]. Bevor p53 responsive Elemente binden kann, muss es aktiviert werden. Kommt es in einer Zelle zu DNA-Schäden, bindet der C-Terminus (Abbildung 4) des Proteins sequenzunspezifisch an einzelsträngige DNA. Dadurch wird die Mittel-Domäne wahrscheinlich durch die ausgelöste Konformationsänderung des Proteins aktiviert [36,37].

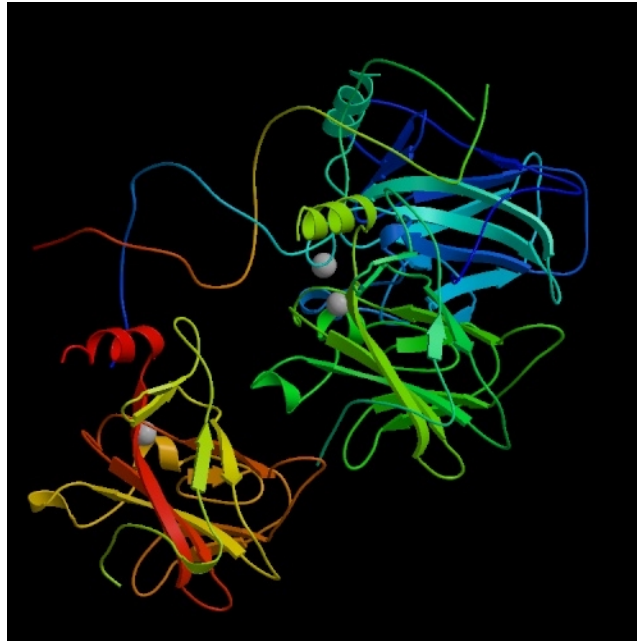


Abbildung 7: Drei p53-Moleküle im Komplex mit einem DNA-Doppelstrang [54]. Zur besseren Sichtbarkeit wurde ein p53-Molekül des in vivo vorkommenden Tetramerkomplexes nicht gezeigt.

Der N-Terminus (Abbildung 4) des Proteins besitzt regulatorische Funktionen. Über ihn wird u.a. die Dissoziation des p53 Komplexes von der DNA gesteuert. Dies wird wahrscheinlich durch die Art der Phosphorylierung des N-Terminus bestimmt. Verschiedene Kinasen sind an der Phosphorylierung beteiligt [41]. Die umfangreichen Regulationsmechanismen von p53 sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Da mehr als 50% aller humanen Krebsarten mit Mutationen im p53-Gen in Verbindung gebracht werden, sind sie ein wichtiger Inhalt klinischer Forschung. Die häufigsten, krankhaften Mutationen betreffen die Mittel-Domäne und behindern dadurch die Transkriptions-regulierenden Eigenschaften des Proteins [42].

Das Ziel dieser Arbeit ist die Verkürzung der Hybridisierungsdauer bei Mikroarrays durch den Zusatz von p53. Zu diesem Zweck soll der Einfluss des Proteins auf die Hybridisierungskinetik von DNA-Einzelsträngen ausgenutzt werden. In Gel shift Experimenten wurde eine derartige *in vitro* Funktion für DNA in freier Lösung bereits nachgewiesen. Es soll nun versucht werden, dies auf das heterologe System eines Mikroarrays zu übertragen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Bezeichnung	Herstellerfirma
Acrylamidlösung 30%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	BRL Life Technologies, Parsley, Schottland
Ammoniumpersulfat (APS)	Fluka Chemie AG, Seelze, Deutschland
Ampicillin	Fluka Chemie AG, Seelze, Deutschland
Bacto-Pepton	DIFCO Laboratorirs, Detroit, USA
Bromphenolblau	Fluka Chemie AG, Seelze, Deutschland
Coomassie Brilliant blue R250	Fluka Chemie AG, Seelze, Deutschland
DNAse RQ1, Puffer, Stop Puffer	Promega Corporation, Madison, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie AG, Seelze, Deutschland
dNTP	Gibco BRL,Life Technologies,Rockville, USA
DYEnamics ET Terminator Cycle Sequencing Premix Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
<i>E.coli</i> DH5 α	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Novagen, Madison, USA
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, Seelze, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fluka Chemie AG, Seelze, Deutschland
Cy5-dCTP (FluoroLink)	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Hefe-Extract	DIFCO Laboratorirs, Detroit, USA
HPLC H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropyl-b-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Fluka Chemie AG, Seelze, Deutschland
Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Seelze, Deutschland
Natriumdodecalphosphat (SDS)	Fluka Chemie AG, Seelze, Deutschland
<i>Ndel</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Oligonukleotide	INTERACTIVA, Ulm, Deutschland
Lachssperma DNA (sonicated salmon sperm DNA)	Stratagene, La Jolla, USA
p53	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Deutschland
PAGE-PLUS	BIO RAD Laboratories, München, Deutschland
POLY-PREP Slides	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Primer (diverse)	Gibco BRL,Life Technologies,Rockville, USA
QIAprep spin Miniprep Kit	Qiagen AG, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen AG, Hilden, Deutschland
Taq Polymerase	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris	BIO RAD Laboratories, München, Deutschland
Vektor pET20b(+)	Novagen, Madison, USA
Vektor pORF hp53	InvivoGen, San Diego, USA
<i>Xho</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von Fluka Chemie AG, Seelze, Deutschland bezogen.

2.2 Medien und Lösungen

Agarosegel

1% Agarose
1x TAE Puffer
0,1 µg/ml Ethidium Bromid

Block-Lösung

1 g Bernsteinsäureanhydrid in
200 ml DCE lösen
direkt Verwendung 2,5 ml N-
Methylimidazol zugeben

Coomassie-Entfärbelösung

30 % Methanol
10 % Essigsäure
60 % H₂O

Coomassie-Färbelösung

30 % Methanol
10 % Essigsäure
60 % H₂O
1 g/l Coomassie Brilliant blue R250

DNA-Stop-Puffer (6x)

30 % Glycerin
0,2 % Bromphenolblau
5 mM EDTA (pH 7,5)

Flexi-Prep-Lösungen

Lösung I:
100 mM Tris (pH 7,5)
10 mM EDTA
400 µg/ml RNase I
ad 100 ml H₂O

Lösung II:
30 ml Stock solution
130 ml H₂O
(Stock solution 1 M NaOH,
5,3% SDS)

Lösung III:
60 ml 5 M Kaliumacetat
11,5 ml Eisessig
28,5 ml H₂O

Hybridisierungs-Puffer

5 mM MgCl₂
10 mM KCl
5 mM Phosphatpuffer (pH 7,5)
0,5 mM EDTA pH 8
3,7% Glycerin

LB-Agarplatten

10 g/l Bacto-Trypton
5 g/l NaCl
5 g/l Hefe-Extrakt
15 g/l Agar
ad 1 l dH₂O, autoklavieren und in
Schalen gießen

LB-Medium

10 g/l Bacto-Trypton
5 g/l NaCl
5 g/l Hefe-Extrakt
ad 1 l dH₂O, autoklavieren

Lower Tris 4x

36,46 g Tris
0,8 g SDS
ad 200 ml dH₂O
pH 8,8 mit HCl einstellen

PBS-Puffer (10x)

16 g Na₂HPO₄ (2 H₂O)
4 g NaH₂PO₄ (H₂O)
80 g NaCl
ad 1 l H₂O

Sequenziergel

6,6 ml 40% PAGE-PLUS
18 g Harnstoff
5ml 10x TBE-Puffer
23 ml HPLC H₂O
20 µl TEMED
300 µl 10% APS
Laufpuffer 1x TBE

SOC-Medium (pH 7)

20 g/l Bacto Tryptone
5 g/l Hefe-Extrakt
0,5 g/l NaCl
2,5 mM KCl
0,01 M MgCl₂
20 mM Glukose
ad 1 l dH₂O

Spotting-Lösung

1,5 M Betain
3x SSC

SSC (1x)

0,015 M Natrium Citrat
0,15 M NaCl

SDS-Laufpuffer (5x)

15 g/l Tris
72 g/l Glycin
10% SDS
ad 1 l dH₂O
pH 8,3

SDS-Sammelgel (4%)

0,52 ml Acrylamidlösung 30%
1 ml Lower Tris
2,47 ml dH₂O
40 µl Ammoniumpersulfat 10%
4 µl TEMED

SDS-Trenngel (12,5%)

3,33 ml Acrylamislösung 30%
2 ml Lower Tris
2,67 ml dH₂O
40 µl Ammoniumpersulfat 10%
4 µl TEMED

SDS-Probenpuffer (5x)

320 mM Tris HCl (pH 6,8)
50% Glycerin
10% SDS
25% β-Mercaptoethanol
0,1% Bromphenolblau

TAE-Puffer (50x)

242 g Tris
57,1 ml Essigsäure
100 ml EDTA (0,5 M, pH 8)
ad 1 l ddH₂O

TBE (Tris-borate)-Puffer

10,8 g/l Tris
5,5 g/l Borsäure
4 ml 0,5 M EDTA (pH 8)
ad 1 l dH₂O

TE-Puffer (pH 8)

10 mM Tris (pH 8)
1mM EDTA

TSS-Medium (50 ml)

5 ml DMSO
2,5 ml MgCl₂ (1M)
5 g PEG 3055
ad 50 ml LB Medium, autoklavieren

Upper Tris 4x

12,11 g Tris
0,8 g SDS
ad 200 ml dH₂O
pH 6,8 mit HCl einstellen

2.3 Sequenzen

2.3.1 Primer und Sequenzen der Gelexperimente

forward Primer S4

5'-TCGCCTTGATCGTTGGGAACCG-3'

reverse Primer S6

5'-CCACGCTCACCGGCTCCAG-3'

Sequenz des PCR Produkts (234 bp)

5'-TCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGC
GTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTT
ACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT
GCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG-3'

50 nt Cy5 markiert

Cy5-CGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCCA-3'

20 nt_2

5'-GGAACCGGAGCTGAATGAAG-3'

20 nt_3

5'-GAATGAAGCCATACCAAACG-3'

22 nt

5'-TCGCCTTGATCGTTGGGAACCG-3'

35 nt

5'-TCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAG-3'

50 nt

5'-TCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACG-3'

2.3.2 Primer und Sequenzen der Probe

forward Primer 1

5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3'

reverse Primer 2

5'-TTAATCAGTGAGGCACCTAT-3'

Sequenz Probe (852 bp)

5'-ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGCATTGTC
CTTCCTGTTTTTGGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC
ACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAG
AACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACG
CCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTCACCA
GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCAT
GAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCT
TTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGC
CATAACAAACGACGAGCTGACACCACTGACAGTGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAATA
TTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCCGATAA
AGTTGCAAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAG
CCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT
CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
ATAGGTGCCTCACTGATTAA-3'

2.3.3 Primer für die Klonierung

Primer gsc_p53 forward
5'-GGATATACATATGGAGGAGCCGCAGTCAGA-3'

Primer gsc_p53 reverse
5'-GGCTCGAGGTCTGAGTCAGGCCCTTC-3'

Sequenzier-Primer p53 int 1
5'-TGCATTCTGGGAC-3'

Sequenzier-Primer p53 int 2
5'-CCAGGACAGGCAC-3'

Sequenzier-Primer T7 Promotor
5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'

Sequenzier-Primer T7 Terminator
5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

2.4 Geräte

Gerät	Typ	Herstellerfirma
Agarosegel Kammer	Mini-Sub DNA Cell	BIO-RAD, München Deutschland
DNA-Sequenzierer	ABI PRISM 377 DNA Sequenzer	Perkin Elmer, Freiburg, Deutschland
Gelbild-Drucker	Video Copy Processor P66E	Mitsubishi, Tokio, Japan
Geltrockner	583 Gel Dryer	BIO-RAD, München Deutschland
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hybridisierungskammer	CMT-Hyb. Chamber	Corning Inc., NY, USA
PCR Cycler	Master Cycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Phosphormager	Storm 860	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
Photometer	Ultrospec 3000 UV/Visible	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Power supply Agarosegele	Power Pac 300	BIO-RAD, München Deutschland
Power supply SDS-PAGE	Power Pac 3000	BIO-RAD, München Deutschland
Scanner	GMS 418 Array Scanner	Affymetrix, Wycombe, England
SDS-PAGE Kammer	Multigel	BIO-RAD, München Deutschland
Spotter	GMS 417 Arrayer	Affymetrix, Wycombe, England
UV Leuchttisch	Docu Gel-V	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
UV-Crosslinker	BLX 254	Biometra, Göttingen, Deutschland
Wärmeschrank	OV 5	Biometra, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	B3	Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen	5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Sorvall RC.5B	Du Pont Instruments

2.5 Molekularbiologische Techniken

Alle verwendeten molekularbiologischen Techniken ohne nähere Angaben wurden dem Labor-Handbuch "Molecular Cloning" entnommen [55].

2.5.1 Herstellung kompetenter *E.coli*

Aus einer *E.coli* DH5 α Übernachtskultur wurde 1 ml in 100 ml frisches LB Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C kultiviert. Nach 5 min Zentrifugation bei 20.000 g wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 10 ml TSS-Medium gelöst. Anschließend wurden je 200 μ l in sterile Reaktionsgefäße überführt und diese bei -80°C eingefroren.

2.5.2 Plasmid-Isolierung

2.5.2.1 Flexi-Prep

Einer *E.coli* ÜN-Kultur wurden 2 ml entnommen und 30 s bei 20.000 g pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen. Das Zellpellet wurde in 200 μ l Flexi-Prep-Lösung I resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 200 μ l Flexi-Prep-Lösung II aufgeschlossen. Durch Zugabe von Flexi-Prep-Lösung III wurde die Lösung neutralisiert. Durch Zentrifugation (5 min bei 20.000 g) wurden das Präzipitat abgetrennt. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und durch Zugabe von 420 μ l Isopropanol und 10 min Inkubation bei RT gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 20.000 g wurde der Überstand abgezogen. Das Pellet wurde durch Zugabe von 500 μ l Ethanol und anschließender Zentrifugation gewaschen. Das gereinigte Pellet wurde in 20 μ l TE-Puffer resuspendiert.

2.5.2.2 QIAprep Spin Miniprep Kit

Die Durchführung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Alle Puffer waren im Kit enthalten.

Aus einer *E.coli* ÜN-Kultur wurden 2 ml entnommen und durch Zentrifugation (30 s bei 20.000 g) pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 250 μ l Puffer-P1 resuspendiert. Dann wurden 250 μ l Puffer-P2 zugesetzt und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach der Zugabe von 350 μ l Puffer-N3, wurde für 10 min bei 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die im Kit enthaltene Silicagel-Säule gegeben und 30 s bei 20.000 g zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit 750 μ l PE-Puffer wurde die DNA mit TE-Puffer oder H₂O von der Säulenmatrix eluiert.

2.5.3 Phenol/Chloroform Fällung

Der zu reinigende Ansatz wurde im Verhältnis 1:1 mit Phenol/Chloroform-Gemisch vereint und gut gemischt. Nach 2 min Zentrifugation bei 20.000 g, wurde die obere (wässrige) Phase abgenommen und in ein frisches Gefäß überführt. Anschließend wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt (2.8.2.2).

2.5.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung des 1%igen Agarosegels wurde die Agarose mit TAE-Puffer gekocht, bis sich diese aufgelöst hat. Nach dem Abkühlen auf etwa 60°C wurde die Lösung mit Ethidiumbromid versetzt und in den Gelschlitten gegossen. Die Polymerisation erfolgte beim Abkühlen auf RT. Das Gel wurde in die mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer eingesetzt und die Proben in die Geltaschen gegeben. Dann wurde die Elektrophorese bei 120 V, 400 mA für 20-30 min durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf dem UV-Tisch überführt und ein Fotoausdruck gemacht.

2.5.5 Transformation

Ein Reaktionsgefäß mit kompetenten Zellen (2.5.1) wurden 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 100 µl entnommen und mit 1-2 µl Vektor, bzw. 10-20 µl Ligationsansatz gemischt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde für 45 s bei 42°C im Wasserbad inkubiert (Hitzeschock). Nach 3 min Kühlung auf Eis wurde den Zellen 1 ml SOC-Medium zugesetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch kurze Zentrifugation bei 20.000 g pelletiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde mit dem verbleibenden Medium resuspendiert und auf LB-Amp Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden ÜN bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mit sterilen Spitzen gepickt und in 5 ml LB-Amp Medium ÜN kultiviert. Des weiteren wurden zur Lagerung LB-Amp Platten mit den gepickten Kolonien beimpft und ÜN bei 37°C kultiviert. Dann wurden die Agarplatten mit Parafilm versiegelt und bei 4°C gelagert.

2.5.6 SDS-PAGE

Zur Herstellung des SDS-Gels wurde zunächst das SDS-Trenngel zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegeben. Das Gel wurde bis ca. 2 cm unter den oberen Rand der Platten gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach etwa 30 min Polymerisationsdauer, wurde das Isopropanol abgegossen und mit dH₂O gewaschen. Das SDS-Sammelgel wurde aufgegeben und der Probenaschenkamm blasenfrei eingesetzt. Nach weiteren 30 min wurde der Kamm entfernt und das Gel in die mit SDS-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt.

Die Probe wurde in SDS-Probenpuffer resuspendiert (150 µl pro 1 ml Zellkultur). Das Gemisch wurde 5 min bei 95°C denaturiert und je 5 µl in die Probenaschen gegeben. Zur Kontrolle des Molekulargewichts wurde stets ein Proteinstandard mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde erst 12 min bei 10 mA, dann 60 min bei 25 mA in SDS-Laufpuffer durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele von den Glasplatten gelöst und für ca. 30 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde für etwa 3 h in Coomassie-Entfärbelösung entfärbt. Danach wurden die Gele im Geltrockner 2 h getrocknet.

2.6 Klonierung und Expression von p53

2.6.1 Klonierung

2.6.1.1 Amplifizierung

Die Amplifizierung der p53-Sequenz erfolgte durch eine PCR mit Ansatz 2 (Tabelle 2). Als *Template* wurde der kommerzielle Vektor pORF-hp53, als Primer gsc_p53forward und gsc_p53reverse verwendet. Die PCR wurde mit Programm 1 (Tabelle 3) durchgeführt.

Tabelle 2: PCR-Ansatz 2

Vol. [μ l]	Bestandteil	Konzentration
1	<i>Template</i>	
10	PCR-Puffer	(10x)
10	MgCl ₂	(25 mM)
10	dNTPs	(2,5 mM)
1	Tag Polymerase	(1 U/ μ l)
1	forward Primer S4	(20 pmol/ μ l)
1	reverse Primer S6	(20 pmol/ μ l)
ad 100 μ l ddH ₂ O		

Tabelle 3: PCR-Programm 1

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	240 s
2	94°C	60 s
3	55°C	30 s
4	72°C	60 s
5	GOTO 2 repeat 25	
6	72°C	240 s
7	8°C	hold

Das PCR-Produkt wurde gereinigt (2.8.2.3) und mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (2.5.4). Der Expressionsvektor pET20b(+) wurde in *E.coli* DH5 α transformiert (2.5.5) und durch ÜN-Kultivierung in LB-Amp-Medium amplifiziert. Die Zellen wurden 2 min bei 20.000 g zentrifugiert und die Vektoren mit Hilfe des QIAprep spin Miniprep Kit isoliert (2.5.2.2).

2.6.1.2 Restriktionsverdau

Vektor und Insert wurden mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Xho*I jeweils 2 h verdaut und der Erfolg durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Restriktionsenzyme wurden mittels Phenol/Chloroform Fällung entfernt (2.5.3).

2.6.1.3 Ligation

Für die Ligation wurde das Insert mit dem Vektor im Verhältnis 1:5 gemischt und über Nacht bei 17°C mit T4-Ligase ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in *E.coli* DH5 α transformiert (2.5.5). Die Vektoren der ÜN Kulturen wurden mittels Flexi Prep isoliert (2.5.2.1), mit *NdeI* 2 h verdaut und die Größe durch Agarose Gelelektrophorese untersucht. Vektoren mit erwarteter Größe von 4,8 kb wurden mit QIAprep spin Miniprep Kit aus der ÜN-Kultur isoliert (2.5.2.2) und anschließend sequenziert (2.6.2). Vektoren mit gewünschter Sequenz wurden in *E.coli* BL21(DE3) transformiert (2.5.5). Mit diesen wurde eine Expression durchgeführt (2.6.3).

2.6.2 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde eine PCR mit jeweils einem Primer durchgeführt, um ausschließlich einzelsträngige DNA zu erhalten. Das *Template* wurde durch eine PCR mit *Template* pET20b(+)/p53 und den Primern T7 Promotor und T7 Terminator hergestellt. Dabei wurde PCR-Ansatz 2 (Tabelle 2) und Programm 1 (Tabelle 3) verwendet. Das Produkt wurde vor der Verwendung als Sequenzierungs-*Template* gereinigt (2.8.2.3).

Die Sequenzierungs-PCR wurde mit PCR-Ansatz 3 (Tabelle 4) und Programm 2 (Tabelle 5) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit 10 μ l ddH₂O auf 20 μ l aufgefüllt und mittels Ethanol-fällung gereinigt (2.8.2.2). Das Pellet wurde in 3 μ l Resuspensionslösung aufgenommen, 2 min bei 95°C denaturiert und mit RT auf das Sequenziergel aufgetragen (Elektrophoresebedingungen: 2400 V Spannung, 50 mA Strom, 12 h Laufzeit). Die Detektion der Fluoreszenzen erfolgte im Durchlauf, während der Elektrophorese. Die Auswertung zur Sequenz erfolgte automatisch im angeschlossenen Computer.

Mit jedem Primer ließen sich zuverlässig etwa 400 bp sequenzieren, wobei die ersten 30-40 bp nicht auswertbar waren. Um die gesamte p53-Sequenz von ca. 1200 bp zu sequenzieren, wurden 4 Primer verwendet (T7 Promotor, T7 Terminator, gsc_seq p53int1, gsc_seq p53int2).

Tabelle 4: PCR-Ansatz 3 (Sequenzierung)

Menge[μ l]	Bestandteil	Konzentration
2	<i>Template</i>	
4	Premix	
3	Primer	1 pmol/ μ l
1	ddH ₂ O	

Tabelle 5: PCR-Programm 2 (Sequenzierung)

Schritt	Temperatur	Zeit
1	94°C	30 s
2	50°C	5 s
3	60°C	240 s
4	GOTO 1 repeat 25	
5	8°C	hold

2.6.3 Expression

Eine ÜN-Kultur transformierter BL21(DE3) (2.6.1) wurde im Verhältnis 1:50.000 in frischem LB-Amp-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach weiteren 2,5 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen für 2 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Erfolg der Expression wurde mit einer SDS-PAGE untersucht (2.5.6).

2.6.4 Zellaufschluss

Der Expressionsansatz (2.6.3) wurde 10 min bei ca. 20.000 g zentrifugiert und das Pellet über Nacht bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das Pellet in wenig ddH₂O resuspendiert und eine Spatelspitze Lysozym zugesetzt. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurde 10 min 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Aufreinigung weiterverwendet. Das Pellet wurde bei -20°C eingefroren.

2.6.5 Protein-Aufreinigung durch Säulenchromatographie

Eine TALON-Säule mit etwa 5 ml Volumen, wurde vor der Aufreinigung mit 3 Säulenvolumen Waschpuffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7) equilibriert [56]. Anschließend wurde der Überstand des Zellaufschlusses aufgegeben (2.6.4). Nach dem Durchlaufen wurde mit 2-3 Säulenvolumen Waschpuffer gespült. Die ersten 4 ml des Durchlaufes wurden aufgefangen. Sie dienten später als Kontrolle, wieviel Protein auf der Säule gebunden hat. Nun wurde ein Säulenvolumen Elutionspuffer (Waschpuffer mit 150 mM Imidazol) aufgegeben. Durch das Imidazol im Elutionspuffer veränderte sich der Farbton des Säulenmaterials gut sichtbar. Die Front der Veränderung wurde beobachtet und kurz vor Erreichen des Säulenendes der Durchlauf aufgefangen. Es wurden jeweils 3 mal 2 ml aufgefangen. Zur Regeneration der Säule wurde mit 5 Säulenvolumen Regenerationspuffer (20 mM MES) gespült. Anschließend wurde mit drei Säulenvolumen Waschpuffer gespült. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (2.5.6). Es wurden das in SDS-Probenpuffer gelöste Pellet, der Überstand des Zellaufschlusses (2.6.4), des weiteren drei Durchläufe der Reinigung und die erste Elution aufgetragen.

2.6.6 Aufschluss von Einschlusskörpern

Der Zellaufschluss für die Lösung der Einschlusskörper unterscheidet sich von der in 2.6.4 genannten. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Der Expressionsansatz (2.6.3) wurde 15 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 3 ml Lysepuffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) je Gramm Zellen resuspendiert. Anschließend wurden 8 µl PMSF und 10 mg Lysozym je Gramm Zellen zugesetzt und 20 min gerührt. Nach der Zugabe von 4 mg Desoxycholsäure je Gramm Zellen wurde unter Rühren die Lösung auf 37°C erwärmt. Dem viskosen werdenden Zellaufschluss wurden 20 µl DNase I (1 mg/ml) zugesetzt und etwa 30 min weiter gerührt.

Das Zell-Lysat wurde 15 min bei 15.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml dH₂O resuspendiert und in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Nach deren Zentrifugation (15 min bei 12.000 g) wurde der Überstand verworfen und die Pellets in 0,1 M Tris-Puffer (pH 8,5) mit verschiedener Harnstoffkonzentration (4,6,8 M) gelöst. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g wurden die Überstände abgenommen und die Pellets in je 100 µl dH₂O resuspendiert. Zur Kontrolle wurde mit Überstand und gelöstem Pellet eine SDS-PAGE durchgeführt (2.5.6).

2.7 Nachweis der p53-Aktivität (*Band shift assay*)

Der Nachweis der p53-Aktivität wurde mit verschiedene Bedingungen untersucht. Dabei wurden markierte PCR-Produkte, sowie einzelsträngige Oligonukleotide unterschiedlicher Länge verwendet. Es wurden verschiedene p53 Konzentrationen, Hybridisierungs-Zeiten und Pufferbedingungen variiert. Durch Acrylamidgelelektrophorese wurde gezeigt, dass einzelsträngige bzw. doppelsträngige DNA vorlag (*Band shift assay*). [33,38,39]

2.7.1 Hybridisierungs-Experimente mit PCR-Produkt

2.7.1.1 Herstellung des Cy5 markierten PCR-Produkts (243 bp)

Die folgenden Bestandteile wurden in 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße gegeben (Tabelle 6) und im Eppendorf Master Cycler die PCR mit Programm 1 (Tabelle 3) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt (siehe 2.6.2.3) und der Erfolg mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (2.5.4).

Tabelle 6: PCR-Ansatz 1

Vol [µl]	Bestandteil	Konzentration
1	<i>Template</i>	
10	PCR-Puffer	(10x)
10	MgCl ₂	(25 mM)
1	dNTPs	(2,5 mM)
0,5	Cy5-dCTPs	(25 nM)
1	Tag Polymerase	(1 U/µl)
1	forward Primer S4	(20 pmol/µl)
1	reverse Primer S6	(20 pmol/µl)
ad 100 µl ddH ₂ O		

2.7.1.2 Hybridisierungs-Ansätze

5 µl des gereinigten PCR-Produkts wurden mit Hybridisierungs-Puffer gemischt und 15 min auf 95°C erhitzt. Dann wurden 0,5 µl p53, bzw. ddH₂O zugegeben und bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 12 µl des Ansatzes mit 3 µl DNA-Stop Puffer vermischt und auf ein 8%iges Acrylamidgel aufgetragen. Als Positivkontrolle (dsDNA) wurde nicht erhitzte, als Negativkontrolle (ssDNA) erhitzte, abgekühlte Probe verwendet. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 200 V für 40 min in 1x

TBE-Puffer durchgeführt. Das Scannen der Fluoreszenz-Banden auf den Gelen erfolgte am Phosphoimager. Folgende Ansätze wurden untersucht:

- Puffervariation (Phosphatpuffer, PIPES, Tris)
- Variation der p53-Konzentration (0-25 ng/μl)
- Variation der Inkubationszeit (1-30 min)

2.7.2 Hybridisierungs-Experimente mit Oligonukleotiden

Das PCR-Produkt konnte trotz langer Hitzebehandlung nicht vollständig vereinzelt werden. Aus diesem Grund wurden einzelsträngige Oligonukleotide verwendet. Dabei wurde ein Cy5 markiertes 50 nt langes Fragment, sowie verschieden lange (20 nt-2, 20 nt-3, 22 nt, 35 nt, 50 nt) komplementäre Stränge benutzt. Als Kontrolle für ssDNA wurde 12 μl markiertes Oligo (0,025 pmol/ml) mit 3 μl DNA-Stop-Puffer aufgetragen. Für die Kontrolle der dsDNA wurden markiertes Oligo (0,025 pmol/ml), nicht markiertes 50 nt Oligo (0,025 pmol/ml) und 100 mM MgCl₂ für 30 min bei RT inkubiert und 12 μl mit 3 μl DNA-Stop Puffer aufgetragen. Die Bestimmung von ssDNA, bzw. dsDNA wurde mit 10%igen Acrylamidgelen untersucht. Die Elektrophorese wurde 80 min bei konstanten 250 V durchgeführt. Dabei wurden die Gele zur besseren Auflösung auf 10°C gekühlt. Die Fluoreszenz wurde am Phosphoimager sichtbar gemacht.

2.8 DNA Mikroarray-Experimente

2.8.1 Herstellung der Mikroarrays

2.8.1.1 Spotten

Die Herstellung der Mikroarrays erfolgte mit einem GMS 417 Arrayer (Einstellungen siehe Abbildung 8). Es wurden kommerzielle, einzelsträngige DNA-Oligos (ssDNA) in Spotting-Lösung auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasobjektträger aufgebracht (POLY-PREP Slides). Als Spot-Kontrolle wurden Cy5 markiertes Oligonukleotide verwendet.

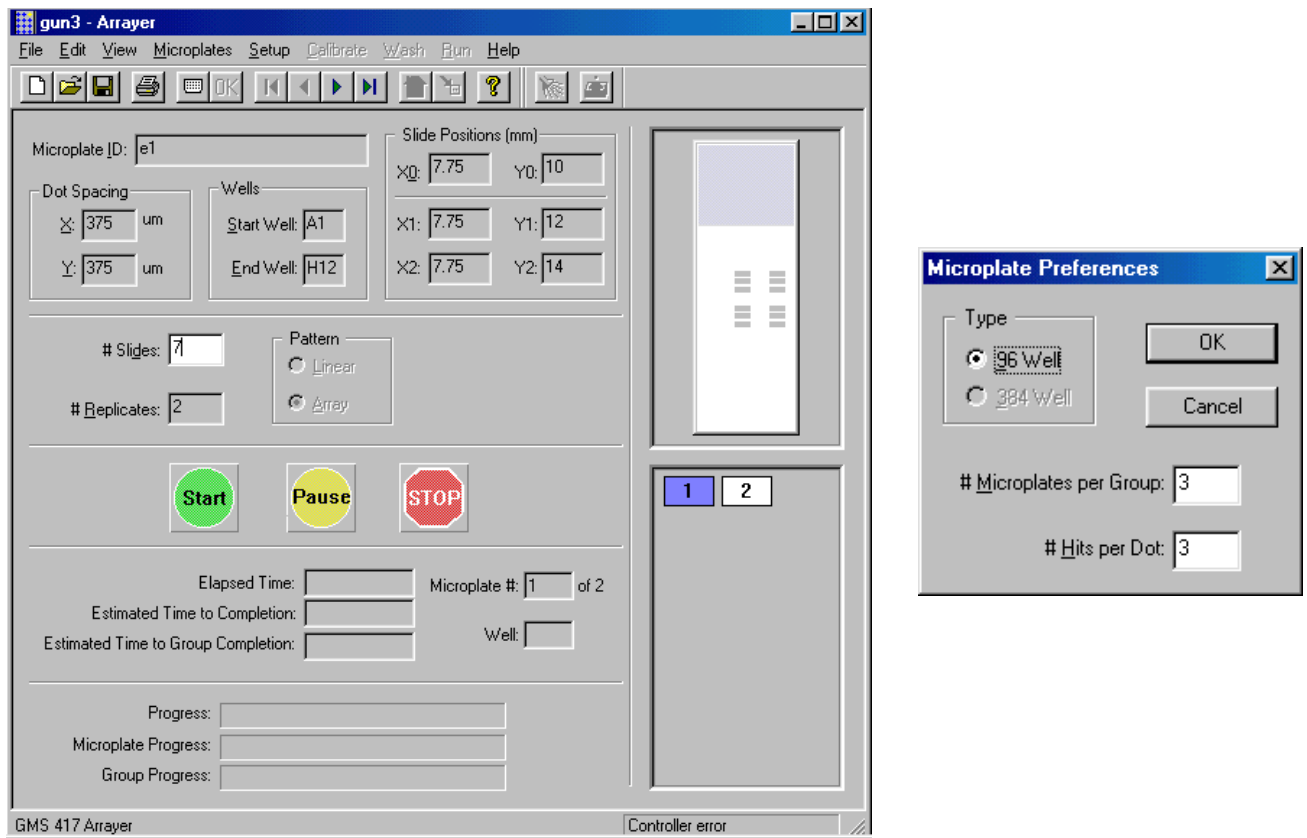


Abbildung 8: Einstellungen des GMS 417 Arrayers

Die nötige Energie für die kovalente Verknüpfung der ssDNA mit den poly-L-Lysinresten wurde durch UV-Bestrahlung zugefügt (100 mJ Gesamtenergie).

2.8.1.2 Blocken

Unspezifische DNA-Bindung an noch reaktionsfähigen poly-L-Lysinresten wurden durch einstündige Inkubation der Mikroarrays in Block-Lösung bei RT verhindert. Danach wurde durch Eintauchen in frisches DCE gewaschen und nach kurzem Eintauchen in Ethanol bei RT getrocknet. Nach Trocknung wurden 12 µl Lachs Sperma DNA (0,01 µg/µl) auf die Arrays gebracht, mit einem Deckglas abgedeckt und für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden das Deckglas vorsichtig entfernt und der Mikroarray mit N₂ Gas getrocknet.

2.8.1.3 Aufbau der Oligos

Die jeweils etwa 20 bp langen Oligonukleotide waren homolog zu Abschnitten des *bla*-TEM1 β-Lactamase-Gens gewählt [57]. Dabei wurden komplementären Bereiche so ausgesucht, dass in der Mitte der Oligo-Sequenz eine bekannte SNP (Single Nukleotide Polymorphism) Position des Gens enthalten war. Die Positionsbezeichnungen beziehen sich auf die SNP-Position in der β-Lactamase Sequenz. Für jede Position wurden 4 Sequenz-Varianten verwendet. Die Variation beschränkte sich dabei auf die SNP Position (Abbildung 9). Die Arrays wurden mit dem Layout der Abbildung 10 gespottet.

```

AGAAACGCT A GTGAAAGT
AGAAACGCT G GTGAAAGT   Wildtyp-Sequenz (sense)
AGAAACGCT C GTGAAAGT
AGAAACGCT T GTGAAAGT
  
```

Abbildung 9: Beispiel der 4 Sequenzvariationen von Position 28

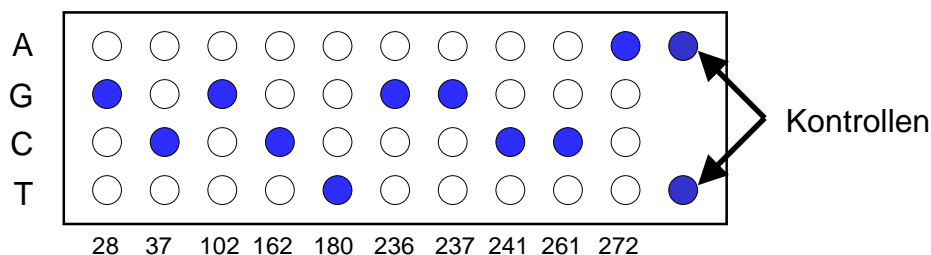


Abbildung 10: Layout der gespotteten Mikroarrays. Sequenzübereinstimmung mit dem TEM1 β-Lactamase Gen sind blau markiert. Als Kontrollen für das Spotten wurden Cy5 markierte Oligonukleotide verwendet.

2.8.2 Herstellung der Proben-DNA

2.8.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Herstellung der Probe wurde eine PCR durchgeführt. Als *Template* fand das β-Lactamase-Gen (*bla*-TEM1 in Vektor *puc19*) Verwendung. Die Markierung erfolgte durch den Einsatz von Cy5 markierten dCTPs (Fluorolink). Die PCR wurde mit nach PCR-Ansatz 1 (Tabelle 6) mit PCR-Programm 1 (Tabelle 3) durchgeführt.

2.8.2.2 Reinigung des PCR-Produkts (Ethanol-Fällung)

Dem PCR-Produkt (100 µl) wurden 10 µl Natriumacetat (3 M), 200 µl 95% Ethanol zugesetzt und die DNA 20 min bei -20°C gefällt. Anschließend wurden 15 min bei 20.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA Pellet in 50 µl ddH₂O oder TE Puffer gelöst. Bei der Reinigung wurde die DNA zweifach konzentriert, da das Pellet im halben Volumen des ursprünglichen Ansatzes resuspendiert wurde.

2.8.2.3 Reinigung des PCR-Produkts (QIAGEN-Kit)

Die Reinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die verwendeten Puffer, außer TE-Puffer, waren im Kit enthalten. 500 µl PB-Puffer wurden in die QIAGEN-Säulen gegeben und 100 µl des PCR-Produkt zugesetzt. Nach 30 s Zentrifugation bei 20.000 g, wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und die DNA mit 50 µl TE-Puffer oder H₂O eluiert.

2.8.2.4 Verdau des PCR-Produkts

Zur weiteren Herstellung der Proben-DNA wurden 45 µl gereinigtes PCR-Produkt mit 5 µl DNase Puffer und 1 µl DNase versetzt und 2 h bei 37°C verdaut. Durch Zugabe von 5 µl Stop Puffer und Denaturierung des Enzyms für 10 min bei 65°C wurde die Reaktion gestoppt. Dieser Ansatz wurde ohne weitere Veränderungen als Probe für die Mikroarrayversuche verwendet.

2.8.3 Durchführung der Array-Experimente

2.8.3.1 Hybridisieren ohne p53

Ein Gemisch aus 12 µl Hybridisierungs-Puffer und 1 µl Probe (2.8.2) wurde auf den Array gebracht und blasenfrei mit einem Deckglas bedeckt. Die Inkubation erfolgte in Hybridisierungskammern, um sie vor dem Austrocknen zu schützen. Anschließend wurden die Arrays gewaschen (2.8.3.3).

2.8.3.2 Hybridisieren mit p53

Ein Gemisch aus 11,5 µl Hybridisierungs-Puffer und 0,5 µl p53 (1 µg/µl) wurden auf den Array gebracht und mit Deckglas 10 min bei RT vorinkubiert. Nach Entfernen der Abdeckung wurde die Proben-DNA wie beschrieben hybridisiert (2.8.3.1).

2.8.3.3 Waschen

Die Mikroarrays wurden mit Deckglas in Objektträgerhalterungen eingesetzt. Zum Lösen der Deckgläser wurden die Arrays zunächst in 2x SSC, 0,1% SDS auf und ab bewegt und schließlich 10 min bei RT inkubiert. Nach kurzem Abspülen in 0,2x SSC wurden die Objektträger mit N₂ Gas getrocknet.

2.8.3.4 Scannen und Auswertung

Die Mikroarrays wurden gescannt und die resultierenden Bilder mit der Software ImaGene 3.0 analysiert (Abbildung 11).

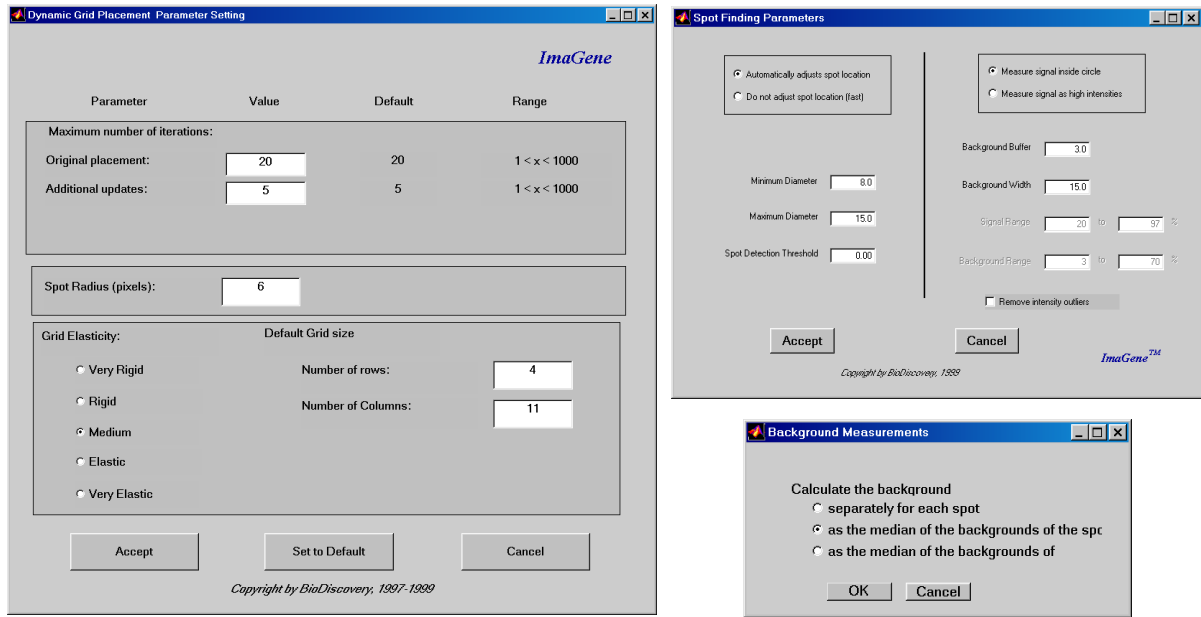


Abbildung 11: Einstellungen der Analysesoftware ImaGene 3.0

Zunächst wurde der Bereich der Sonden-Punkte durch die manuelle Definition eines Gitters festgelegt (Abbildung 12 A). Anschließend erfolgte die automatische Erkennung der Flächen von zu analysierenden Sonden-Punkten, des Hintergrunds und der nicht zu analysierenden Bereiche (Abbildung 12 B-D). Jede Fläche wurde von der Software analysiert. Die Ausgabe der Fluoreszenzintensität erfolgte als relative Einheit. Der Median jeder Sonden-Fläche wurde für die Auswertung verwendet.

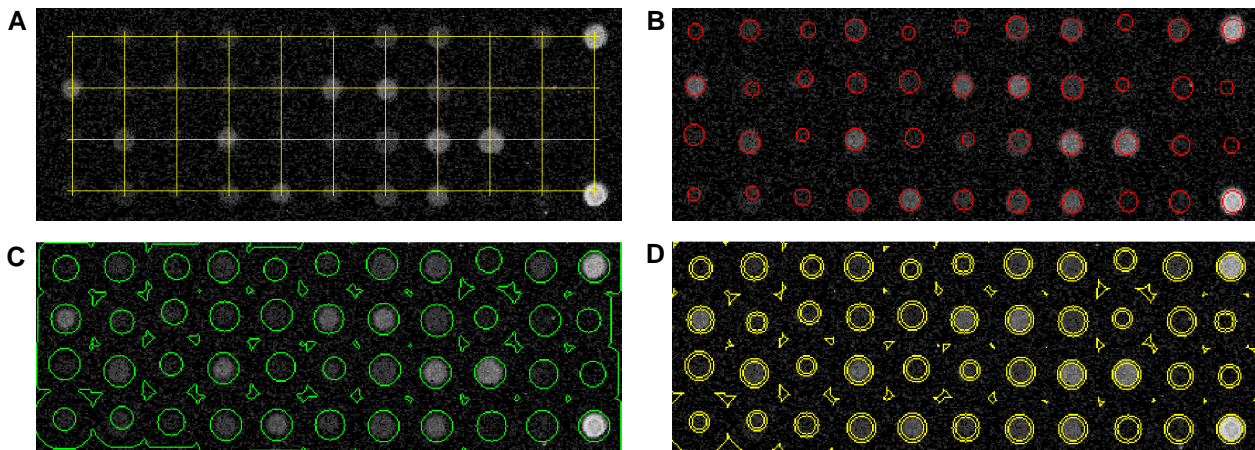


Abbildung 12: Bilder der Analysesoftware ImaGene 3.0. **A** Manuell definiertes Gitter. Automatisch erkannte Flächen der **B** Sonden-Punkte, des **C** Hintergrunds und **D** der nicht zu analysierenden Bereiche.

Die Auswertung erfolgte durch Berechnung des Mittelwertes der unspezifischen Fluoreszenzsignale [relative Einheiten] jeder SNP-Position. Dieser Wert wurde vom jeweiligen spezifischen Signal subtrahiert. Die Ergebnisse wurden in Diagrammen zusammengefasst.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung und Expression von p53

Um den p53 Bedarf für die Array-Experimente nicht mit kommerziellem Protein decken zu müssen, wurde p53 in den Expressionsvektor pET20b(+) kloniert und in *E.coli* BL21(DE3) exprimiert.

3.1.1 Klonierung

Für die Klonierung von p53 wurde zunächst das p53 Gen aus dem Vektor pORF-hp53 amplifiziert (3.1.1.1.). Das PCR-Produkt und der Vektor pET20b(+) wurden mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Xho*I verdaut (3.1.1.2.) und anschließend ligiert (3.1.1.3.) (Übersicht siehe Abbildung 13). Das Klonierungs-Produkt wurde sequenziert (3.1.2.) und die erfolgreich klonierten Vektoren in den Expressions-Stamm *E.coli* BL21(DE3) transformiert.

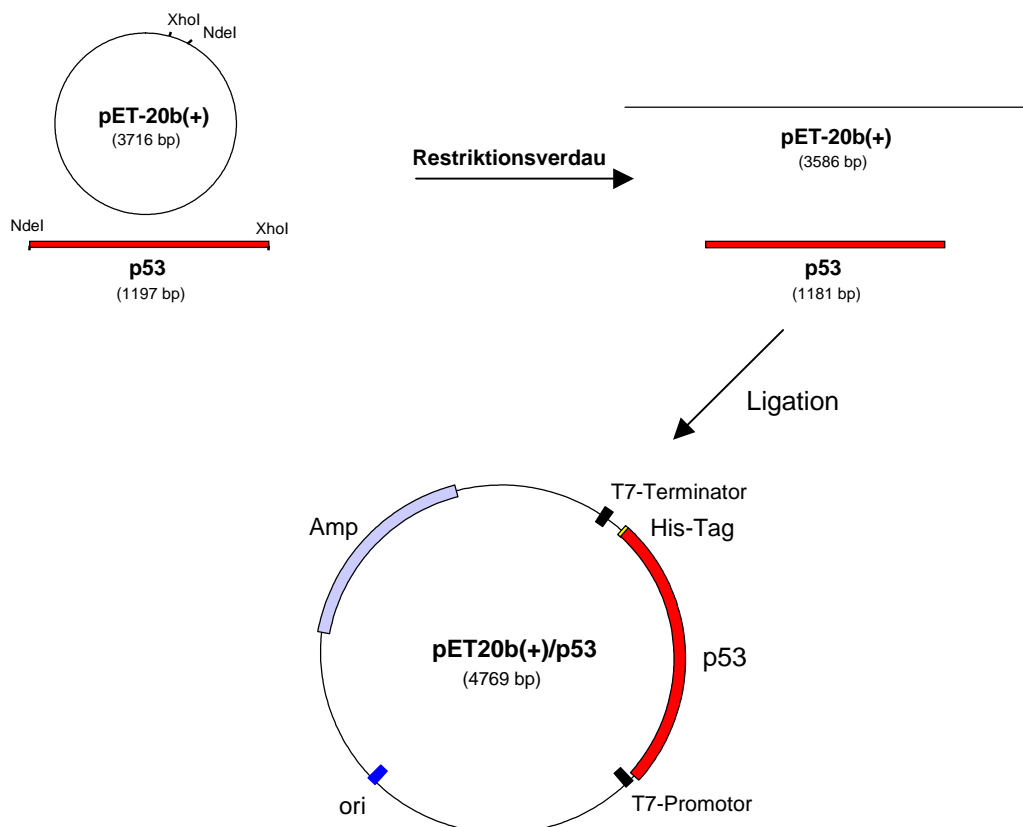


Abbildung 13: Übersicht der durchgeführten Klonierungsexperimente

3.1.1.1 Amplifizierung

Die Amplifizierung des p53 Gens (ca. 1,2 kb) erfolgte durch eine Standard-PCR mit Vektor pORF-hp53 als *Template* (2.6.1). Die Fragmentgröße wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft (Abbildung 14).

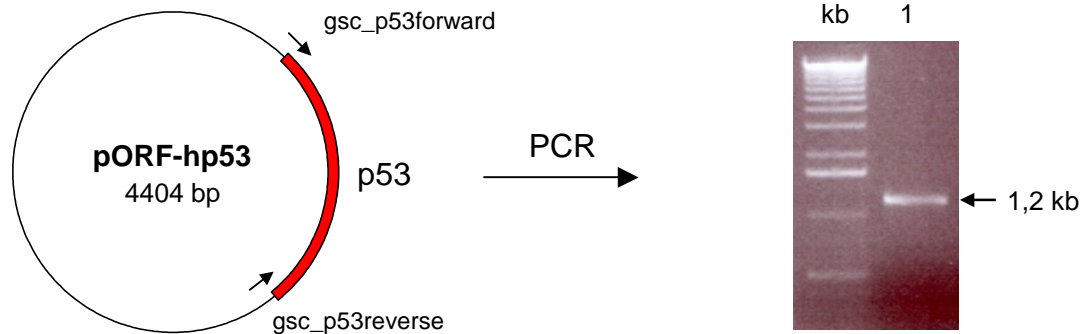


Abbildung 14: Kontrolle der p53 Gen-Amplifizierung. 1. gereinigtes PCR-Produkt

3.1.1.2 Restriktionsverdau

Vor der Ligation des Inserts mit dem Vektor pET20b(+) wurden beide mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* geschnitten. Für jedes Enzym wurde ein Kontrollverdau mit pET20b(+) durchgeführt und der Erfolg mit einem Agarosegel überprüft (Abbildung 15). Die Bande bei 3,7 kb zeigte den linearisierten DNA-Strang. Es wurde beobachtet, dass nach dem Verdau ausschließlich linearisierte DNA-Banden zu erkennen waren. Das ist ein Hinweis für vollständigen Restriktionsverdau.

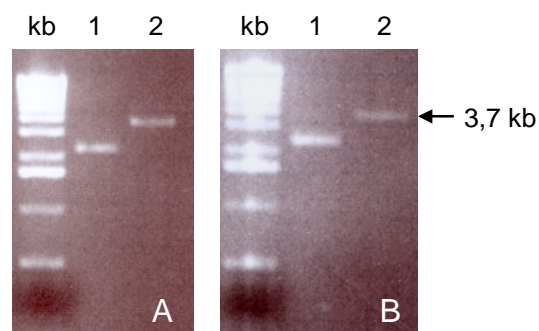


Abbildung 15: Kontrolle der Restriktionsverdau mit (A) *NdeI* und (B) *XhoI*. 1. Unverdauter Vektor pET20b(+); 2. Verdauter Vektor pET20b(+)

3.1.1.3 Ligation

Die Ligation wurde wie beschrieben durchgeführt (2.6.1.). 10 Kolonien mit transformierten Ligationsvektoren wurden von der Agarplatte gepickt und in Flüssigmedium kultiviert. Die Vektoren der ÜN-Kulturen wurden isoliert (2.5.2.2) und auf ihre Größe hin untersucht. Dazu wurden alle Vektoren 2 h mit *NdeI* verdaut. Aus zwei Kolonien wurden Vektoren isoliert, die mit ca. 4,9 kb um 1,1 kb größer waren als der Ursprungsvektor pET20b(+). Das legt die Vermutung nahe, dass sie ein Insert der richtigen Größe enthielten (Abbildung 16).

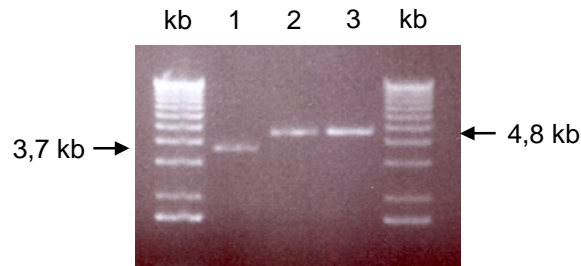


Abbildung 16: Größenvergleich von Vektor pET20b(+) vor und nach der Ligation. Alle Ansätze wurden 2 h mit *NdeI* verdaut. 1. pET20b(+); 2.+3. Ligationsprodukte

3.1.2 Sequenzierung

Der Sequenzbereich um das Insert des Ligationsproduktes wurde durch eine Standard-PCR mit den Sequenzierungs-Primern T7-Promotor und T7-Terminator amplifiziert und als *Template* für die Sequenzierungs-PCR verwendet. Die erwartete Größe des PCR-Produkts war 1,4 kb bei erfolgreicher Ligation und 300 bp für den Vektor ohne Insert.

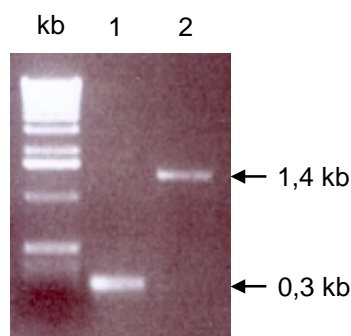


Abbildung 17: Gereinigtes PCR-Produkt mit 1. pET20b(+) Vektor und 2. pET20b(+)/p53 Vektor als *Template*

Die Sequenzierung führte zu der erwarteten Sequenz mit der Proteinsequenz im Leserahmen:

																		Nde I Start
1	TTT	CCC	TCT	AGA	AAT	AAT	TTT	GTT	TAA	CTT	TAA	GAA	GGA	GAT	ATA	CAI	ATG	
	AAA	GGG	AGA	TCT	TTA	TTA	AAA	CAA	ATT	GAA	ATT	CTT	CCT	CTA	TAT	GTA	TAC	
52	GAG	GAG	CCG	CAG	TCA	GAT	CCT	AGC	GTC	GAG	CCC	CCT	CTG	AGT	CAG	GAA	ACA	
	CTC	CTC	GGC	GTC	AGT	CTA	GGA	TCG	CAG	CTC	GGG	GGA	GAC	TCA	GTC	CTT	TGT	
103	TTT	TCA	GAC	CTA	TGG	AAA	CTA	CTT	CCT	GAA	AAC	AAC	GTT	CTG	TCC	CCC	TTG	
	AAA	AGT	CTG	GAT	ACC	TTT	GAT	GAA	GGA	CTT	TTG	TTG	CAA	GAC	AGG	GGG	AAC	
154	CCG	TCC	CAA	GCA	ATG	GAT	GAT	TTG	ATG	CTG	TCC	CCG	GAC	GAT	ATT	GAA	CAA	
	GGC	AGG	GTT	CGT	TAC	CTA	CTA	AAC	TAC	GAC	AGG	GGC	CTG	CTA	TAA	CTT	GTT	
205	TGG	TTC	ACT	GAA	GAC	CCA	GGT	CCA	GAT	GAA	GCT	CCC	AGA	ATG	CCA	GAG	GCT	
	ACC	AAG	TGA	CTT	CTG	GGT	CCA	GGT	CTA	CTT	CGA	GGG	TCT	TAC	GGT	CTC	CGA	
256	GCT	CCC	CCC	GTG	GCC	CCT	GCA	CCA	GCA	GCT	CCT	ACA	CCG	GCG	GCC	CCT	GCA	
	CGA	GGG	GGG	CAC	CGG	GGA	CGT	GGT	CGT	CGA	GGA	TGT	GGC	CGC	CGG	GGA	CGT	
307	CCA	GCC	CCC	TCC	TGG	CCC	CTG	TCA	TCT	TCT	GTC	CCT	TCC	CAG	AAA	ACC	TAC	
	GGT	CGG	GGG	AGG	ACC	GGG	GAC	AGT	AGA	AGA	CAG	GGA	AGG	GTC	TTT	TGG	ATG	
358	CAG	GGC	AGC	TAC	GGT	TTC	CGT	CTG	GGC	TTC	TTG	CAT	TCT	GGG	ACA	GCC	AAG	
	GTC	CCG	TCG	ATG	CCA	AAG	GCA	GAC	CCG	AAG	AAC	GTA	AGA	CCC	TGT	CGG	TTC	
409	TCT	GTG	ACT	TGC	ACG	TAC	TCC	CCT	GCC	CTC	AAC	AAG	ATG	TTT	TGC	CAA	CTG	
	AGA	CAC	TGA	ACG	TGC	ATG	AGG	GGA	CGG	GAG	TTG	TTC	TAC	AAA	ACG	GTT	GAC	
460	GCC	AAG	ACC	TGC	CCT	GTG	CAG	CTG	TGG	GTT	GAT	TCC	ACA	CCC	CCG	CCC	GGC	
	CGG	TTC	TGG	ACG	GGA	CAC	GTC	GAC	ACC	CAA	CTA	AGG	TGT	GGG	GGC	GGG	CCG	
511	ACC	CGC	GTC	CGC	GCC	ATG	GCC	ATC	TAC	AAG	CAG	TCA	CAG	CAC	ATG	ACG	GAG	
	TGG	GCG	CAG	GCG	CGG	TAC	CGG	TAG	ATG	TTC	GTC	AGT	GTC	GTG	TAC	TGC	CTC	
562	GTT	GTG	AGG	CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG	CGC	TGC	TCA	GAT	AGC	GAT	GGT	CTG	
	CAA	CAC	TCC	GCG	ACG	GGG	GTG	GTA	CTC	GCG	ACG	AGT	CTA	TCG	CTA	CCA	GAC	
613	GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTT	ATC	CGA	GTG	GAA	GGA	AAT	TTG	CGT	GTG	GAG	TAT	
	CGG	GGA	GGA	GTC	GTA	GAA	TAG	GCT	CAC	CTT	CCT	TTA	AAC	GCA	CAC	CTC	ATA	
664	TTG	GAT	GAC	AGA	AAC	ACT	TTT	CGA	CAT	AGT	GTG	GTG	GTG	CCC	TAT	GAG	CCG	
	AAC	CTA	CTG	TCT	TTG	TGA	AAA	GCT	GTA	TCA	CAC	CAC	CAC	GGG	ATA	CTC	GGC	
715	CCT	GAG	GTT	GGC	TCT	GAC	TGT	ACC	ACC	ATC	CAC	TAC	AAC	TAC	ATG	TGT	AAC	
	GGA	CTC	CAA	CCG	AGA	CTG	ACA	TGG	TGG	TAG	GTG	ATG	TTG	ATG	TAC	ACA	TTG	
766	AGT	TCC	TGC	ATG	GGC	GGC	ATG	AAC	CGG	AGG	CCC	ATC	CTC	ACC	ATC	ATC	ACA	
	TCA	AGG	ACG	TAC	CCG	CCG	TAC	TTG	GCC	TCC	GGG	TAG	GAG	TGG	TAG	TAG	TGT	
817	CTG	GAA	GAC	TCC	AGT	GGT	AAT	CTA	CTG	GGA	CGG	AAC	AGC	TTT	GAG	GTG	CGT	
	GAC	CTT	CTG	AGG	TCA	CCA	TTA	GAT	GAC	CCT	GCC	TTG	TCG	AAA	CTC	CAC	GCA	
868	GTT	TGT	GCC	TGT	CCT	GGG	AGA	GAC	CGG	CGC	ACA	GAG	GAA	GAG	AAT	CTC	CGC	
	CAA	ACA	CGG	ACA	GGA	CCC	TCT	CTG	GCC	GCG	TGT	CTC	CTT	CTC	TTA	GAG	GCC	
919	AAG	AAA	GGG	GAG	CCT	CAC	CAC	GAG	CTG	CCC	CCA	GGG	AGC	ACT	AAG	CGA	GCA	
	TTC	TTT	CCC	CTC	GGA	GTG	GTG	CTC	GAC	GGG	GGT	CCC	TCG	TGA	TTC	GCT	CGT	
970	CTG	CCC	AAC	AAC	ACC	AGC	TCC	TCT	CCC	CAG	CCA	AAG	AAG	AAA	CCA	CTG	GAT	
	GAC	GGG	TTG	TTG	TGG	TCG	AGG	AGA	GGG	GTC	GGT	TTC	TTC	TTT	GGT	GAC	CTA	
1021	GGA	GAA	TAT	TTC	ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CGT	GAG	CGC	TTC	GAG	ATG	TTC	
	CCT	CTT	ATA	AAG	TGG	GAA	GTC	TAG	GCA	CCC	GCA	CTC	GCG	AAG	CTC	TAC	AAG	
1072	CGA	GAG	CTG	AAT	GAG	GCC	TTG	GAA	CTC	AAG	GAT	GCC	CAG	GCT	GGG	AAG	GAG	
	GCT	CTC	GAC	TTA	CTC	CGG	AAC	CTT	GAG	TTC	CTA	CGG	GTC	CGA	CCC	TTC	CTC	
1123	CCA	GGG	GGG	AGC	AGG	GCT	CAC	TCC	AGC	CAC	CTG	AAG	TCC	AAA	AAG	GGT	CAG	

```

GGT CCC CCC TCG TCC CGA GTG AGG TCG GTG GAC TTC AGG TTT TTC CCA GTC
1174 TCT ACC TCC CGC CAT AAA AAA CTC ATG TTC AAG ACA GAA GGG CCT GAC TCA
    AGA TGG AGG GCG GTA TTT TTT GAG TAC AAG TTC TGT CTT CCC GGA CTG AGT
    Xho I                               His-Tag                               Stop
1225 GAC CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC TGA GAT CCG GCT GCT AAC AAA GCC
    CTG GAG CTC GTG GTG GTG GTG GTG GTG ACT CTA GGC CGA CGA TTG TTT CGG
  
```

3.1.3 Expression

Die Abbildung 18 zeigt für den induzierten Expressionsansatz mit pET20b(+)/p53 eine deutliche Bande bei 53 kDa und deutet damit auf eine erfolgreiche Expression von p53 hin. Im Gegensatz dazu war beim nicht induzierten Ansatz eine schwache und beim induzierten mit Vektor ohne Insert keine Bande bei 53 kDa zu erkennen.

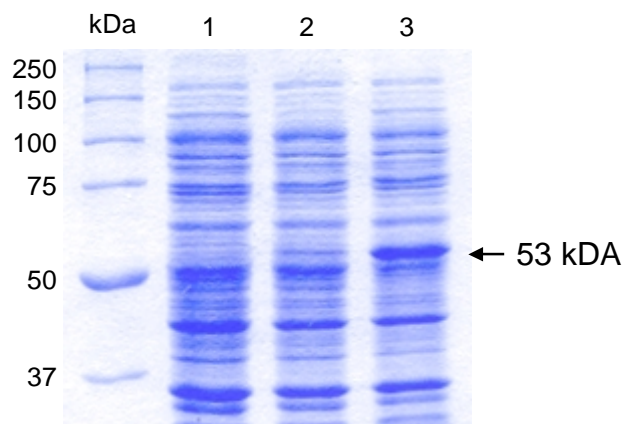


Abbildung 18: SDS-PAGE der Expressionsansätze mit *E.coli* BL21(DE3), **1.** Induzierter Ansatz mit pET20b(+); **2.** nicht induzierter Ansatz mit pET20b(+)/p53; **3.** induzierter Ansatz mit pET20b(+)/p53

3.1.4 Zellaufschluss und Protein-Aufreinigung

Die Abbildung 19 zeigt das Ergebnis der SDS-PAGE zur Kontrolle des Zellaufschlusses (2.6.4) und der anschließenden Aufreinigung mit der TALON-Säule (2.6.5). Die starken Banden in Bahn eins weisen auf eine sehr hohe Proteinkonzentration im Zellpellet nach dem Aufschluss hin. Beachtenswert war die ausgeprägte Bande bei etwa 53 kDa. Sie lässt vermuten, dass ein großer Anteil des gebildeten p53 trotz Zellaufschluss im Pellet verblieben war. Wahrscheinlich hatten sich durch starke p53-Expression Einschlusskörper gebildet. Die Bande bei 53 kDa des Zellaufschluss-Überstandes deutet darauf hin, dass ein Teil des exprimierten p53 in Lösung vorlag. In den Bahnen 3 bis 5 wurden die Durchfluss-Fractionen der Protein-Reinigung aufgetragen. Die Bandenintensität nahm dabei stetig ab, was auf ein erfolgreiches Auswaschen unerwünschter Proteine schließen lässt. Aufgrund der intensiven Bande bei 53 kDa des ersten Durchflusses kann angenommen werden, dass sehr wenig p53 an die Säulenmatrix gebunden hat. Diese Vermutung bestätigte die sehr schwache Bande der Elution bei 53 kDa. Sie könnte auf eine erfolgreiche Reinigung hindeuten, jedoch mit sehr geringer Ausbeute.

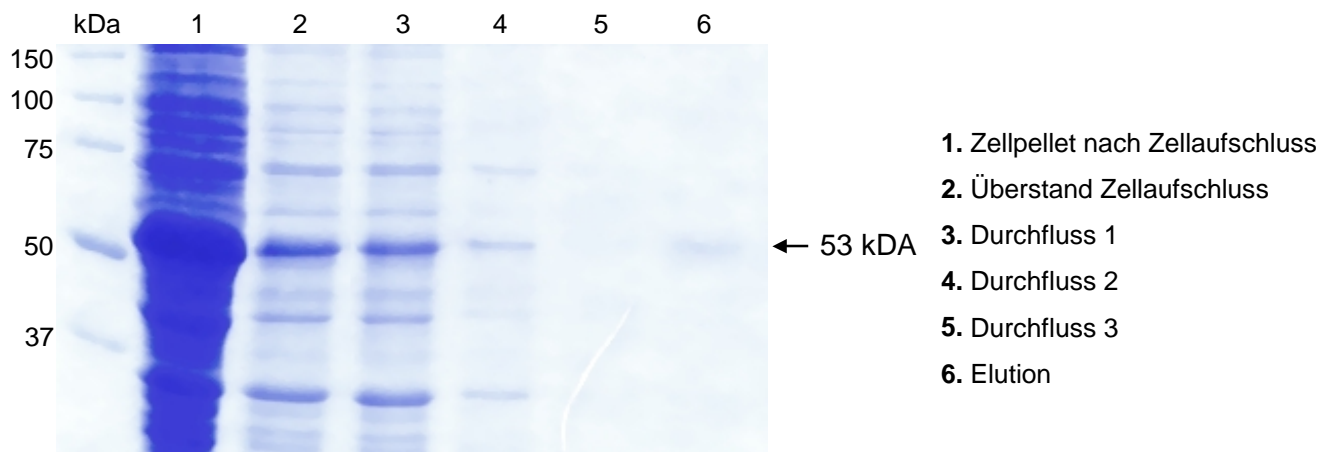


Abbildung 19: SDS-PAGE zur Kontrolle des Zellaufschlusses und der TALON-Aufreinigung. Auftragung siehe Legende.

3.1.5 Aufschluss von Einschlusskörpern

Das Ergebnis des Aufschlusses von Einschlusskörpern zeigt Abbildung 20. Das Bandenmuster der Überstände unterschied sich nicht wesentlich. Einige Banden waren mit steigender Harnstoffkonzentration stärker ausgeprägt, darunter eine Bande mit 53 kDa. Dies lässt vermuten, dass mit erhöhter Harnstoffkonzentration mehr Protein im Überstand gelöst wurde. Die Bandenmuster der Pellets glichen sich stark. Besonders auffällig war die sehr kräftige Bande bei 53 kDa. Sie weist darauf hin, dass trotz hoher Harnstoffkonzentration sehr wenig p53 im Überstand gelöst wurde.

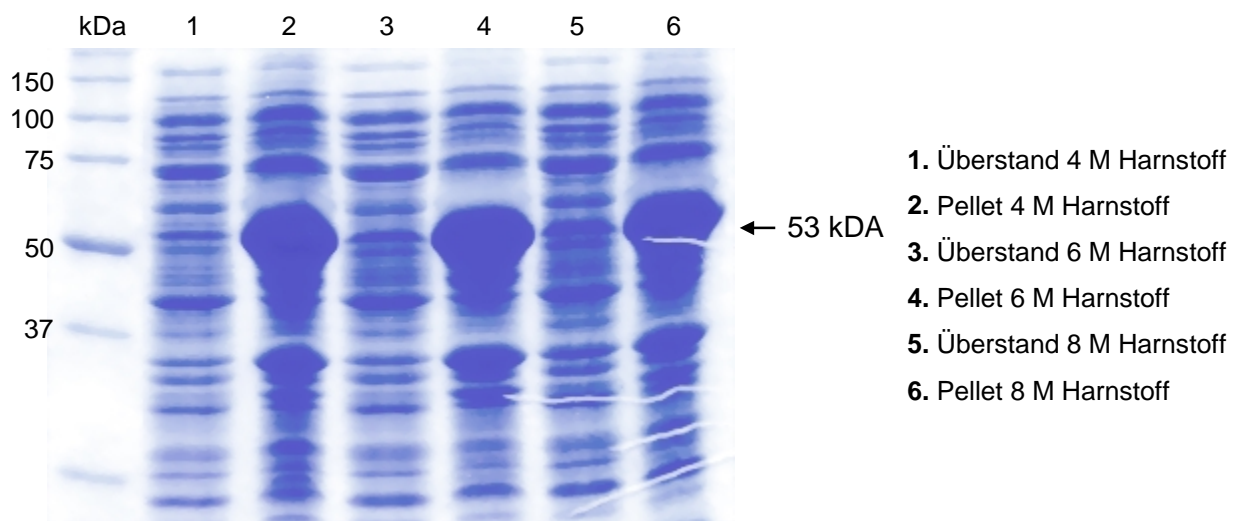


Abbildung 20: SDS-PAGE der Aufreinigung von Einschlusskörpern mit steigender Harnstoffkonzentration. Es wurden jeweils 5 μ l Probe mit SDS-Probenpuffer aufgegeben (siehe Legende).

3.2 Nachweis der p53-Aktivität

Da in dieser Arbeit kommerzielles p53 verwendet wurde, sollten die Versuchsbedingungen zunächst optimiert werden. So musste die benötigte Menge p53 für eine deutlich beschleunigte Hybridisierung ermittelt werden. Außerdem wurden verschiedene Hybridisierungszeiten und Puffer untersucht. Die Versuche wurden mit PCR-Produkt (2.7.1) und einzelsträngigen Oligonukleotiden (2.7.2) durchgeführt.

3.2.1 Hybridisierungs-Experimente mit PCR-Produkt

Zur Optimierung der p53 Kinetik wurden zunächst Versuche mit fluoreszenzmarkiertem PCR-Produkt in Acrylamidgelen durchgeführt (2.7.1). Die Kontrollen waren in allen Gelen gleich. Als Maß für doppelsträngige DNA (ds) wurde gereinigtes PCR-Produkt aufgetragen. Dies resultierte in allen Gelen in einer kräftigen Bande. Als Kontrolle einzelsträngiger DNA wurde das PCR-Produkt vor dem Auftragen durch Erhitzen denaturiert. Es waren stets drei Banden sichtbar. Eine kräftige und eine schwächere Bande zeigten wahrscheinlich zwei Sekundärstrukturen des Einzelstranges mit unterschiedlichem Laufverhalten im Gel. Daneben war eine Bande auf gleicher Höhe mit der dsDNA Kontrolle erkennbar. Das legte die Vermutung nahe, dass die Hitzedenaturierung nicht vollständig war.

Abbildung 21 zeigt das Ergebnis der 30 minütigen Inkubation hitzedenaturierten PCR-Produkts mit verschiedener p53 Konzentration. Bei den Hybridisierungsversuchen unter Verwendung von p53 erkannte man die schwächer werdenden Einzelstrangbanden mit steigender p53 Konzentration. Bei dem Vergleich zwischen Inkubationen ohne und mit 25 ng/μl p53 war die beschleunigende Wirkung auf die Renaturierung des PCR-Produkts am deutlichsten. Ohne p53 war eine kräftige Einzelstrangbande sichtbar. Dagegen war beim Ansatz mit 25 ng/μl p53 keine Einzelstrangbande mehr zu erkennen. Es konnte also angenommen werden, dass die Hybridisierung vollständig war. Diese p53 Konzentration wurde deshalb für alle weiteren Versuche verwendet.

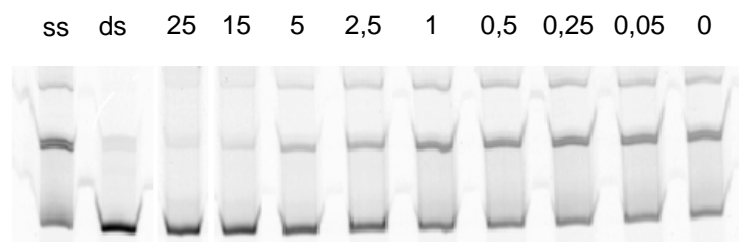


Abbildung 21: Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente mit fluoreszenzmarkiertem PCR-Produkt. Die p53-Konzentration wurde variiert (Zahlenangaben in ng/μl). Inkubation jeweils 30 min bei 37°C.

Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse mit variierender Hybridisierungsdauer. Alle Versuche wurden bei 37°C durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne p53 für 30 min inkubiert. Je länger die Hybridisierungsdauer mit p53 war, desto schwächer wurden die Einzelstrangbanden. Schon nach einer Minute Hybridisierung mit p53 waren die Einzelstrangbanden im Vergleich mit der Negativkontrolle abgeschwächt. Nach 15 min war schon keine deutliche Einzelstrangbande mehr zu erkennen. Es kann daher angenommen werden, dass das PCR-Produkt mit p53 schon nach 15 min vollständig hybridisiert war.

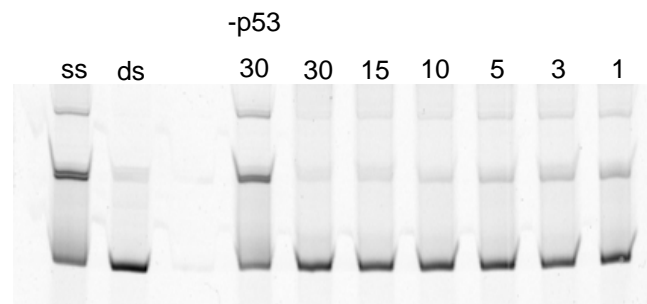


Abbildung 22: Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente mit fluoreszenzmarkiertem PCR-Produkt. Die Hybridisierungsdauer wurde variiert [Angaben in min]. Inkubation jeweils mit 25 ng/μl p53 bei 37°C

Die Hybridisierungsversuche mit verschiedenen Puffern wurden durchgeführt, weil die Wahl des Puffers einen großen Einfluss auf die Hintergrundfluoreszenz bei Mikroarrays hat. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse mit drei verschiedenen Puffern. Es wurde jeweils ein Ansatz mit und ohne p53 durchgeführt und 30 min bei 37°C inkubiert. Bei allen Ansätzen ohne p53 waren Einzelstrangbanden erkennbar. Diese waren mit Zusatz von p53 nicht zu erkennen. Da kein Einfluss der Puffer auf die Hybridisierungskinetik durch p53 erkennbar war, wurde für alle weiteren Experimente Phosphatpuffer verwendet. Es hat sich gezeigt, dass dieser die geringste Hintergrundfluoreszenz auf Mikroarrays verursacht [57].

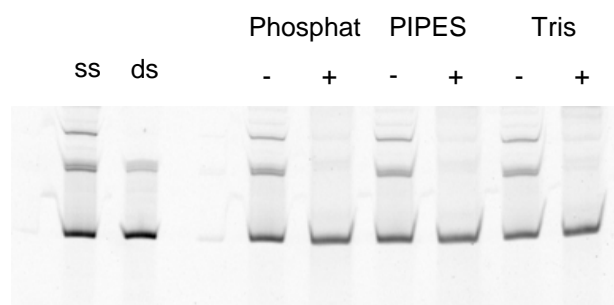


Abbildung 23: Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente mit fluoreszenzmarkiertem PCR-Produkt. Es wurden verschiedene Puffer verwendet (Konzentration je 5 mM). Ansätze mit (+) (25 ng/μl) und ohne (-) p53. Inkubationszeit jeweils 30 min bei 37°C

3.2.2 Hybridisierungs-Experimente mit Oligonukleotiden

Bei den vorangegangenen Versuchen konnte das PCR-Produkt nicht vollständig vereinzelt werden. Aus diesem Grund war nicht klar, wieviel DNA einzelsträngig, bzw. doppelsträngig jeweils vorlag. Ein weiterer Nachteil war das vergleichsweise große PCR-Produkt (234 bp). Die Oligos auf den in dieser Arbeit verwendeten Mikroarrays sollten dagegen nur etwa 25 bp lang sein, was einen direkten Vergleich erschwert. Aus diesen Gründen wurden Versuche mit kürzeren, einzelsträngigen Oligos durchgeführt. Ein Cy5 markierter, 50 bp langes Oligo und einige dazu komplementäre Oligonukleotide verschiedener Länge fanden dabei Verwendung. Als Kontrolle für ssDNA wurde das markierte Oligonukleotid aufgetragen. Für die Kontrolle doppelsträngiger DNA wurde dieser Oligo mit einem komplementären für 30 min mit 100 mM MgCl₂ inkubiert (2.7.2). Die Versuchsbedingungen wurden aus den Hybridisierungsexperimenten mit PCR-Produkt übernommen (3.2.1).

In Abbildung 24 wurde die konventionelle Hybridisierung der Oligonukleotide ohne Zusätze untersucht. Neben den Kontrollen für Einzel- und Doppelstrang-DNA wurden drei Inkubationen mit 20nt-3 aufgetragen. Nach 10 min Inkubation war eine kräftige Doppelstrangbande sichtbar. Nach 30 min war keine Einzelstrangbande mehr zu erkennen. Die Hybridisierung schien bereits nach 30 min vollständig zu sein.

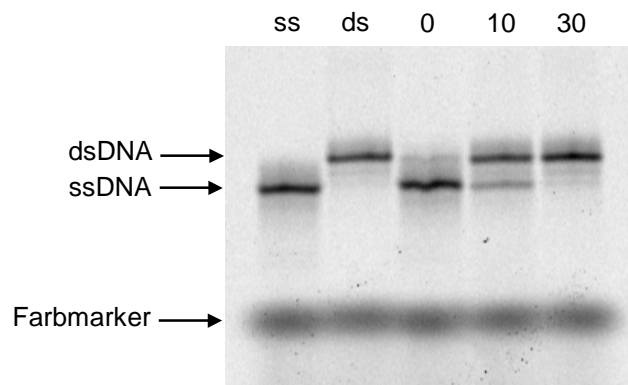


Abbildung 24: Beispiel für spontane Hybridisierung ohne Zusätze. Oligonukleotid 20nt-3 zu markiertem Oligo im Verhältnis 2:1. Hybridisierung für 0, 10 und 30 min bei 37°C.

Im Anschluss wurde einige Versuche unternommen, diese spontane oder konventionelle Hybridisierung zu vermindern. Das war wichtig, um einen Unterschied zu Ansätzen mit p53 erkennen zu können. Jedoch konnte durch den Zusatz von doppelstrangdestabilisierenden Agenzien wie Formamid, Tween20 und Triton X100 die spontane Hybridisierung nicht deutlich vermindert werden.

Durch die Verringerung der Inkubationsdauer konnte schließlich eine Hybridisierungsbeschleunigung für alle verwendeten unmarkierten Oligonukleotide mit markiertem Oligo gezeigt werden. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengefasst. Die Hybridisierungsdauer betrug jeweils 5 min bei 37°C, die p53 Konzentration 25 ng/μl. Das Verhältnis markiertes Oligo zu unmarkiertem war 1:1, bei einer Konzentration von jeweils 12,5 nmol/μl. Die schnelle konventionelle Hybridisierung war in allen Versuchen schon nach 5 min Inkubation erkennbar. Jedenfalls war mit p53 stets eine deutlich stärkere dsDNA Bande wahrnehmbar. Es konnte daher angenommen werden, dass auch die Hybridisierung kurzer Oligonukleotide von p53 gesteigert wurde.

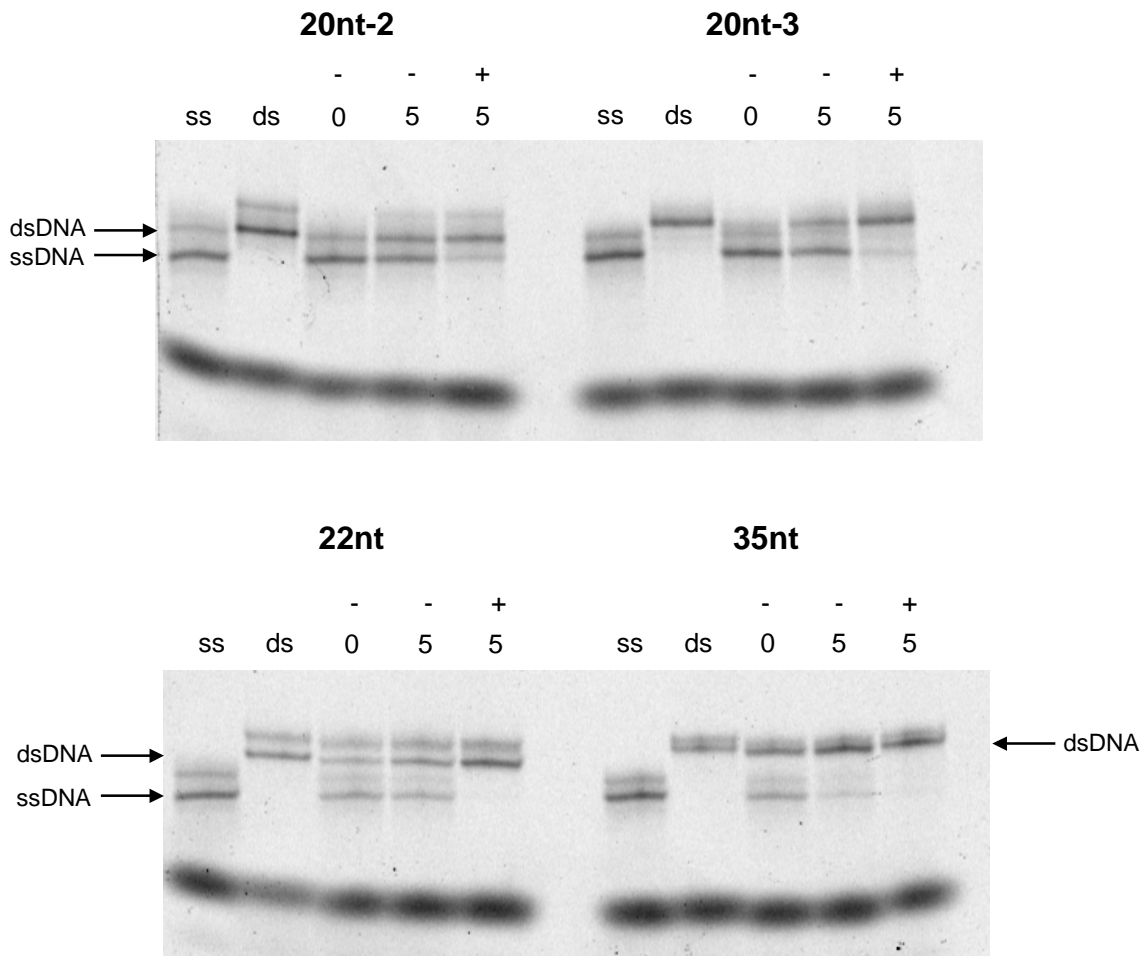


Abbildung 25: Hybridisierungsversuche mit verschiedenen Oligonukleotiden. Die Zahlen geben die Inkubationsdauer bei 37°C an. Ansätze mit p53 (+) und ohne Zusatz (-).

Bei nahezu allen Einzelstrang-Kontrollen war eine zweite Bande sichtbar. Da nur markiertes 50 nt Oligo aufgetragen wurde, handelte es sich bei der schwächeren Bande wahrscheinlich um eine andere Sekundärstruktur. Zur Überprüfung wurde daher ein natives mit einem denaturierenden Gel verglichen. Dafür wurden zwei 10%ige Acrylamidgele verwendet, wobei das denaturierende zusätzlich Harnstoff enthielt. Es wurde jeweils die gleiche Menge markiertes 50 nt Oligo aufgetragen und die Elektrophorese parallel in derselben Kammer durchgeführt.

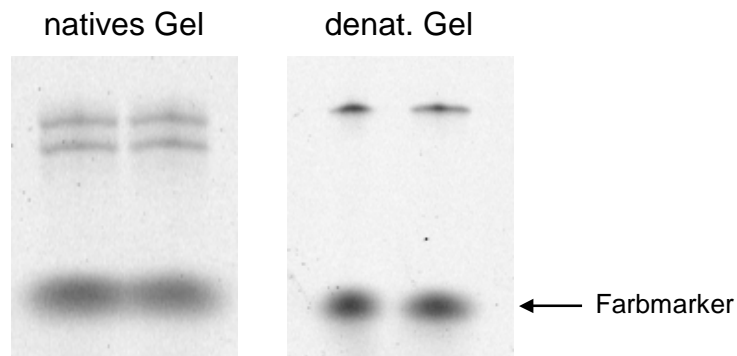


Abbildung 26: Vergleich eines nativen mit einem denaturierendem 10%igen Acrylamidgel. Es wurden je Gel zweimal 0,25 pmol Cy5 markiertes 50 nt Oligo aufgetragen.

Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der Fluoreszenzmessung am Phosphoimager. Im nativen Gel waren zwei Banden in jeder Spur, im denaturierenden dagegen nur eine zu erkennen. Diese Beobachtung unterstrich die Annahme, dass es sich bei der zweiten Bande um eine Sekundärstruktur handelt.

Allen Experimenten mit Oligos war gemein, dass die dsDNA eine kürzere Laufstrecke im Acrylamidgel hatte als die ssDNA. Im Gegensatz dazu lief bei den Versuchen mit PCR-Produkt stets die dsDNA weiter.

Die *Band shift* Versuche mit PCR-Produkt und Einzelstrangoligos zeigten unter Verwendung von p53 eine schnellere Hybridisierungskinetik als ohne. In den folgenden Experimenten soll untersucht werden, ob dies auf Mikroarray übertragbar ist.

3.3 DNA Mikroarray-Experimente

3.3.1 Herstellung der DNA-Proben

Zur Herstellung der Probe wurde zunächst das *bla* TEM1 β -Lactamase Gen durch eine PCR amplifiziert (2.8.2.1). Der Erfolg der PCR wurde für jeden Ansatz mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (2.5.4). Abbildung 27 zeigt ein Agarosegelbild mit zwei verschiedenen PCR-Ansätzen. In Bahn eins wurde eine normale PCR durchgeführt (Tabelle 2). Bahn zwei zeigt das Ergebnis einer PCR mit markierten dCTPs (Tabelle 6). Für beide Ansätze wurde das gleiche PCR-Programm verwendet (Tabelle 3). In beiden Bahnen war eine Bande bei etwa 850 bp erkennbar. Da das erwartete Produkt 852 bp groß sein sollte, kann von einem Erfolg der PCR ausgegangen werden. Es fällt auf, dass die Bande in Bahn eins kräftiger als in Bahn zwei war. Da in beiden Bahnen die gleiche Menge PCR-Produkt aufgetragen wurde, scheint die PCR ohne markierte dCTPs mehr Produkt erbracht zu haben.

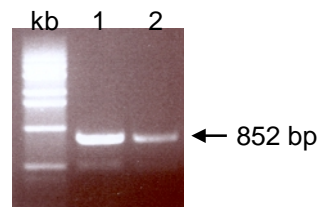


Abbildung 27: Agarosegelbild zur Erfolgskontrolle zweier PCR mit *Template bla* TEM1 β -Lactamase in Vektor *puc19* mit reverse und forward Primer 1. 1. ohne und 2. mit markierten dCTPs. Es wurden jeweils 5 μ l ungereinigtes PCR-Produkt aufgetragen.

Das PCR-Produkt wurde durch Ethanol-fällung (2.8.2.2), bzw. QIAquick PCR Purification Kit (2.8.2.3) gereinigt. Die Effektivität und Ausbeute der Reinigungen wurde mit einem 8%igen Acrylamidgel überprüft. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit dem Phosphorimager auf Fluoreszenz gescannt und anschließend 5 min mit Ethidiumbromidlösung (0,1 μ g/ml EtBr in TAE-Puffer) gefärbt. Das gefärbte Gel wurde auf dem UV-Tisch fotografiert. Abbildung 28 A zeigt das Ergebnis der EtBr Färbung, B die Fluoreszenz. Bahn eins zeigt jeweils das ungereinigte PCR-Produkt, Bahn zwei das durch Ethanol-fällung gereinigte und Bahn drei das durch den QIAquick Kit gereinigte PCR-Produkt. Die Bande in Bahn eins Abbildung 28 A bei 852 bp deutet auf den Erfolg der PCR hin. Der DNA-Verlust bei beiden Reinigung scheint minimal zu sein, da die Banden in Bahn zwei und drei nicht merklich schwächer waren. Da in Bahn eins keine Verunreinigungen erkennbar waren, kann hier keine Aussage über den Erfolg der Reinigungen getroffen werden. In Abbildung 28 B waren in allen Bahnen etwa gleich starke Banden erkennbar. Sie hatten die gleiche Laufstrecke, wie die jeweiligen Banden in Abbildung 28 B. Es scheint also fest zu stehen, dass die DNA Fluoreszenz markiert war. In Bahn eins waren neben der klaren Bande noch zwei Schmierbanden erkennbar. Es könnte sich dabei um fluoreszierende Verunreinigungen handeln. Da sie in den Bahnen der beiden Reinigungen nicht mehr sichtbar waren, kann angenommen werden, dass diese erfolgreich waren. Da sich anhand der Banden in Abbildung 28 kein merklicher

Unterschied der beiden Reinigungen in Effektivität und Ausbeute gezeigt hat, wurde für die Herstellung der Probe eine Ethanol-fällung durchgeführt.

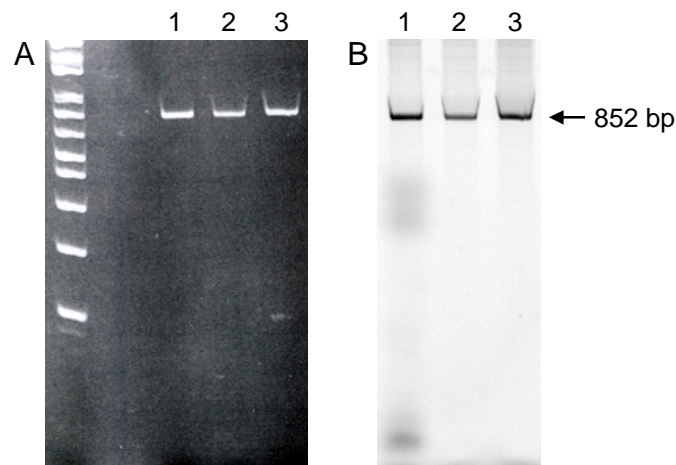


Abbildung 28: **A** UV-Bild eines EtBr gefärbten 8%igen Acrylamidgels. **B** Fluoreszenzbild desselben Gels. Es wurden jeweils 5 µl PCR-Produkt aufgetragen. 1. ungereinigt 2. nach Ethanol-fällung 3. nach Reinigung mit QIAquick PCR purification Kit .

Nach der Reinigung wurde das PCR-Produkt verdaut (2.8.2.4) und anschließend die DNA-Größe mit verschiedenen Methoden untersucht. Zunächst wurde eine Agarosegelelektrophorese (2.5.4) mit 2%igem Gel durchgeführt. Beim Verdauansatz war im Gegensatz zur unverdauten Kontrolle keine Bande bei 852 bp erkennbar. Es konnte folglich angenommen werden, dass der Verdau erfolgreich war. Da auch keine anderen Banden erkennbar waren, lag die Fragmentgröße möglicherweise unter der Auflösungsgrenze von Agarosegelen mit EtBr-Färbung. Aus diesem Grund wurde versucht, einen Nachweis mit höher auflösenden Acrylamidgelen zu erreichen. Es wurde ein 10%iges Gel verwendet und am Phosphorimager auf Fluoreszenz gescannt. Da keine Fluoreszenz auf dem Gel nachweisbar war, konnten auch hier keine Aussagen über die Fragmentgröße getroffen werden.

3.3.2 Durchführung der Mikroarray-Experimente

3.3.2.1 Verminderung der Hintergrundfluoreszenz

In ersten Hybridisierungsexperimenten wurde eine starke Hintergrundfluoreszenz beobachtet, welche eine Auswertung der Arrays unmöglich machte (Abbildung 29 A). Um mögliche unspezifische Bindung von DNA auf der Matrixoberfläche zu verhindern, wurden die Arrays mit Lachssperma DNA vorinkubiert (2.8.1.2). Abbildung 29 zeigt, dass die Hintergrundfluoreszenz mit Vorinkubation abnahm. Es kann daher angenommen werden, dass die Lachssperma DNA die unspezifischen DNA-Bindungsstellen blockierte.

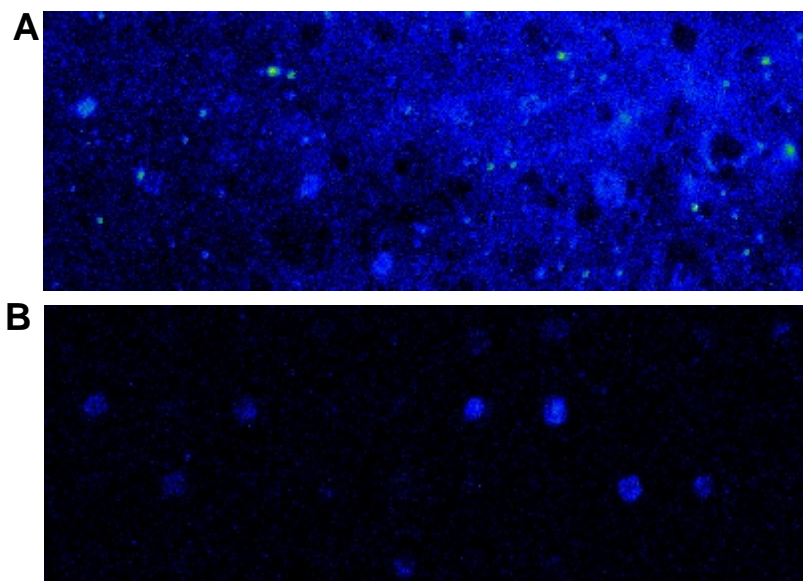


Abbildung 29: Fluoreszenzbild von Mikroarrays. **A** ohne Vorinkubation, **B** mit Vorinkubation mit Lachssperma DNA. Jeweils 30 min Hybridisierung bei 37°C mit p53.

3.3.2.2 Untersuchung geeigneter Probenkonzentrationen

Die Probenkonzentration hat einen Einfluss auf die Hybridisierungskinetik (1.3). Um eine geeignete Konzentration zu finden, wurden verschiedene Mengen Probe auf Arrays gebracht und unter gleichen Bedingungen hybridisiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C mit 25 ng/µl p53 (2.8.3). Abbildung 30 zeigt die Fluoreszenzbilder dieser Hybridisierungsversuche. Auf allen Arrays waren Fluoreszenzsignale an Stellen mit komplementärer Sonde zu erkennen. Die Fluoreszenzintensität variierte von Position zu Position. Außerdem kann unspezifische Hybridisierung angenommen werden, da auch Stellen mit nicht komplementärer Sonde fluoreszieren. Man erkennt, dass diese unspezifische Hybridisierung mit steigender Probenmenge zunahm. In allen folgenden Experimenten wurden jeweils 1 µl Probe verwendet, da die unspezifische Hybridisierung am geringsten schien und die Intensität der spezifischen Signale ausreichend war.

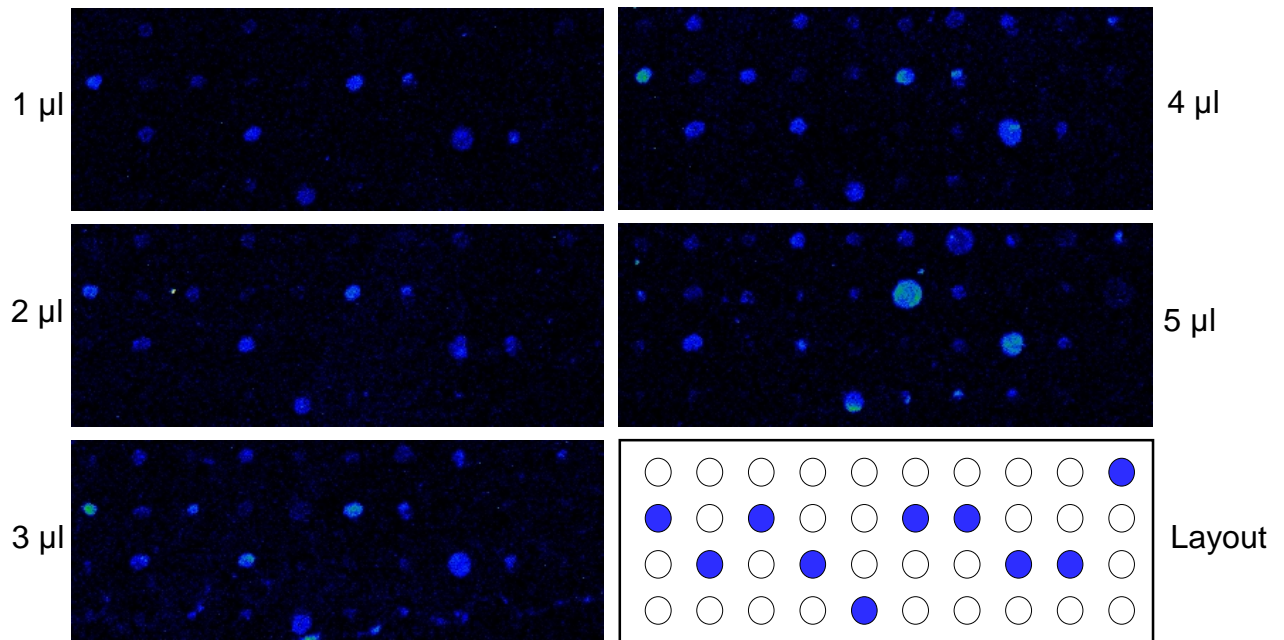


Abbildung 30: Fluoreszenzbilder der Hybridisierungsexperimente mit verschiedener Probenmenge in μl . Hybridisierung 30 min bei 37°C mit $25\text{ ng}/\mu\text{l}$. Zur besseren Übersicht ist das Layout der Arrays abgebildet (2.8.1.1).

3.3.2.3 Vergleich der Hybridisierung mit und ohne p53

Das Ziel der Arbeit war, die Hybridisierungsdauer von Mikroarrays durch den Zusatz von p53 zu verkürzen. Aus diesem Grund wurden Hybridisierungsexperimente mit verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt. Es wurden jeweils Mikroarrays mit und ohne p53 parallel bei 37°C inkubiert (2.8.3). Anschließend wurden die Arrays gescannt und ausgewertet (2.8.3.4). Die Ergebnisse jeder SNP-Position wurde in ein Diagramm eingetragen.

Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse der Hybridisierungsversuche mit 1, 2 und 3 h Inkubationsdauer. Die Ergebnisse von 1 und 2 h sind jeweils Mittelwerte aus 6 Arrays. Die Daten der 3 h Inkubation basieren auf je 2 Arrays.

Vergleicht man die Fluoreszenzintensitäten der SNP-Positionen eines Diagramms der Abbildung 31 miteinander, fällt auf, dass sie nicht einheitlich waren. Die Intensität der Positionen 37, 102 und 272 waren stets am geringsten, die der Positionen 236, 237 und 241 am größten. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Sonde die Probe unterschiedlich schnell und stark gebunden hat. Auch der Vergleich der Inkubationen mit, bzw. ohne p53 einer Position zeigte verschiedene Fluoreszenzintensitäten. Der Wert mit p53 war dabei stets höher, als der ohne p53. Das ließ auf die beschleunigende Wirkung von p53 auf die Hybridisierung auch bei Mikroarrays schließen. Der Unterschied zwischen den Diagrammen mit verschiedenen Inkubationszeiten war besonders bei 2 Stunden Inkubation augenscheinlich. Alle Intensitäten waren viel geringer, als bei 1 und 3 Stunden Inkubation. Da auch die Standardfehler jedes einzelnen Wertes aller Ansätze recht groß war, wurde eine Unregelmäßigkeit im Versuchsablauf angenommen. Aus diesem Grund wurde bei der Herstellung der Mikroarrays eine Kontrolle eingeführt.

Ergebnisse

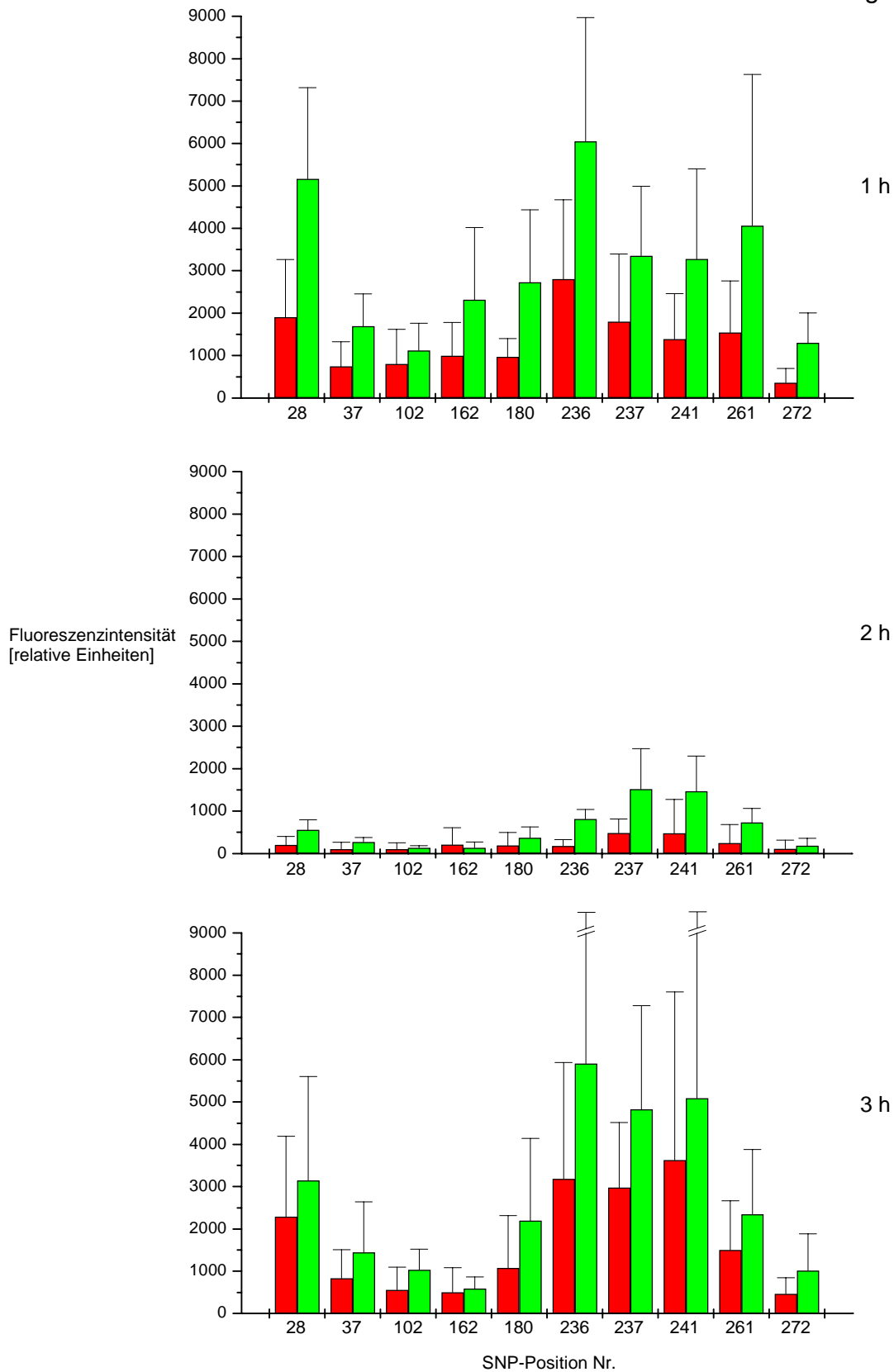


Abbildung 31: Diagramme zur Darstellung der Hybridisierungsergebnisse mit verschiedenen Inkubationszeiten bei 37°C. Aufgetragen sind die Fluoreszenzintensitäten [relative Einheiten] gegen die jeweilige SNP-Position. Die Berechnung erfolgte durch Substraktion des Mittelwertes aller unspezifischen vom spezifischen Signal. Die roten Balken sind das Ergebnis der Inkubationen ohne, die der grünen mit p53.

Als Kontrolle wurde Cy5 markiertes 50 nt Oligo neben dem üblichen Layout auf den Array gespottet (Abbildung 10). Dadurch konnte die Qualität des Spottens jedes Arrays beobachtet werden. Zum Vergleich wurden gleichförmige Arrays mit einer anderen Spot-Nadel hergestellt. Bei Hybridisierungsversuchen wurde festgestellt, dass die Arrays mit neuer Nadel stärkere und uniformere fluoreszierende Punkte ergaben (Abbildung 32). Besonders die Intensität der Spot-Kontrollen mit markiertem Cy5 Oligo waren intensiver fluoreszierend. Dies lässt den Schluss zu, dass mit der neuen Nadel mehr Sonde aufgebracht wurde. Es wurde deshalb angenommen, dass die zuvor verwendete Nadel einen Defekt aufwies.

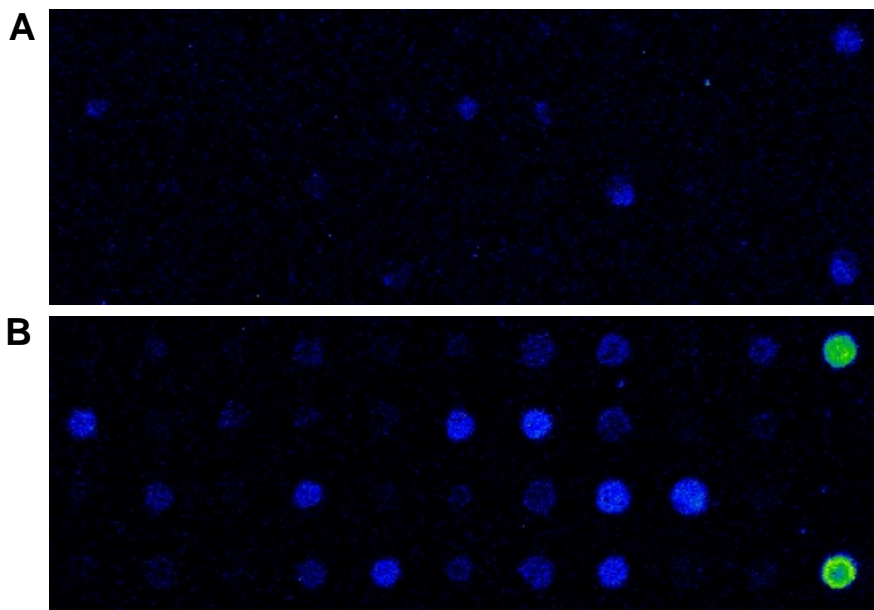


Abbildung 32: Fluoreszenzbild zweier Hybridisierungen. Die Arrays wurden mit verschiedenen Nadeln hergestellt. Die Hybridisierungsdauer betrug jeweils 30 min bei 37°C. Herstellung **A** mit bisher verwendeter Nadel, **B** neuer Nadel.

Für die folgenden Experimente wurden Arrays verwendet, die mit einer neuen Nadel gespottet wurden. Es wurden jeweils 6 Arrays mit und ohne p53 für 30 min bei 37°C hybridisiert. Abbildung 33 zeigt jeweils das Scannerbild eines Arrays mit, bzw. ohne p53 Inkubation. Die etwa gleich starken Kontroll-Spots weisen darauf hin, dass beide Arrays die gleiche Menge Sonde trugen. Beim Array ohne p53 erkennt man schwache Fluoreszenzsignale an nahezu allen spezifischen Sonde Punkten. Das Bild des Ansatzes mit p53 dagegen zeigt z.T. sehr kräftige Fluoreszenzsignale bei spezifischen, aber auch deutliche Signale bei unspezifischen Sonden-Punkten.

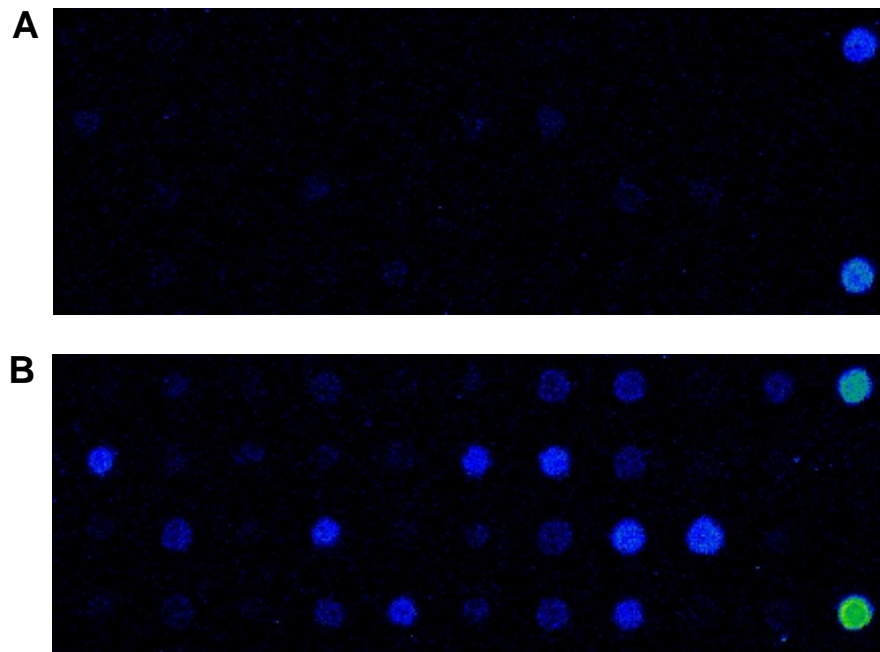


Abbildung 33: Scannerbild eines Hybridisierungsexperiments ohne (A) und mit p53 (B). Inkubationsdauer jeweils 30 min bei 37°C.

Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten sind in Abbildung 34 zusammengefasst. Wie bei den vorangegangenen Ergebnissen (Abbildung 31) sind die Intensitäten der verschiedenen Positionen recht unterschiedlich. Dies fällt allerdings nur bei den Versuchen mit p53 auf, da die Intensitäten der Versuche ohne p53 sehr gering war. Besonders der geringe Standardfehler bei allen Werten mit 30 min Inkubation fällt im Vergleich mit den vorherigen Versuchen auf. Das lässt vermuten, dass durch das Spotten mit der neuen Nadel die Variation der Hybridisierung stark verringert wurde. Der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zwischen den Ansätzen mit und ohne p53 war sehr viel größer, als bei den längeren Inkubationszeiten. Die beschleunigende Wirkung von p53 auf die Hybridisierung scheint besonders bei kurzen Hybridisierungszeiten von Bedeutung zu sein.

Neben den spezifischen Signalen trat bei einigen SNP-Positionen vermehrt unspezifische Hybridisierung auf. Dies betraf besonders Positionen mit intensiver Fluoreszenz des spezifischen Sonden-Punktes (SNP-Positionen 236, 237, 241, 261).

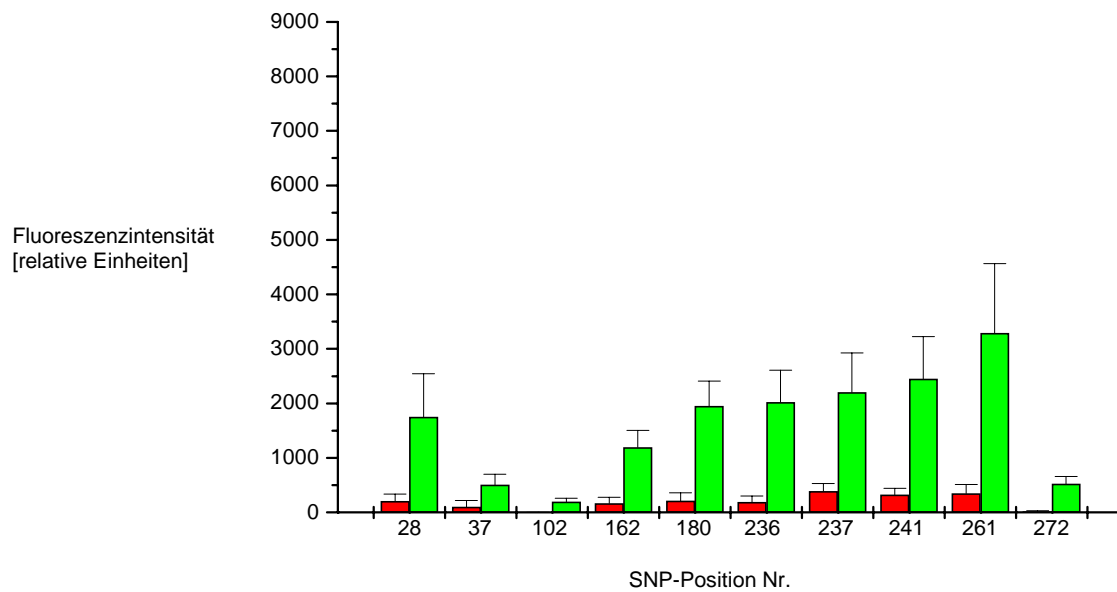


Abbildung 34: Diagramme zur Darstellung der Hybridisierungsergebnisse der Experimente mit 30 min Hybridisierung bei 37°C. Aufgetragen sind die Fluoreszenzintensitäten [relative Einheiten] gegen die jeweilige SNP-Position. Die Berechnung erfolgte durch Subtraktion des Mittelwertes aller unspezifischen vom spezifischen Signal. Die roten Balken sind das Ergebnis der Inkubationen ohne, die der grünen mit p53.

4 Diskussion

4.1 Klonierung und Expression von p53

Die Klonierung des humanen p53 Gens in den Expressionsvektor pET20b(+) verlief erfolgreich. Durch die Sequenzierung konnte die Richtigkeit der Sequenz im Leserahmen gezeigt werden. Durch eine SDS-PAGE konnte schließlich für den induzierten Expressionsansatz die Bildung eines 53 kDa großen Proteins nachgewiesen werden. Die Ausbeute der Protein-Aufreinigung durch Säulenchromatographie war sehr gering. Offensichtlich hatte das Protein nicht an die Säulenmatrix gebunden. Dies kann laut Hersteller der TALON-Säule verschiedene Ursachen haben [56]. Enthält das Protein keinen His-Tag, bindet es nicht an die Matrix. Dies kann hier als Ursache ausgeschlossen werden, da das Vorhandensein des His-Tag nach der Klonierung durch eine Sequenzierung nachgewiesen wurde. Eine andere Möglichkeit ist, dass der His-Tag durch die Sekundärstruktur des Proteins verdeckt wurde. Unter Zugabe von 6 M Guanidin könnte der His-Tag wegen der Auflösung dieser Proteinkonformation frei zugänglich werden und an die Säule binden. Puffer-Bedingungen können ebenfalls einen großen Einfluss auf die Bindung des Proteins an die Matrix haben. Es könnte versucht werden, durch weniger stringente Bedingungen Abhilfe zu schaffen. Eine Verunreinigung mit nicht kompatiblen Reagenzien, z.B. EDTA, konnte als Fehler-Ursache ausgeschlossen werden, da sie nicht verwendet wurden.

Das für die Expression verwendete pET-System enthält einen starken T7-Promotor. Es ist auf hohe Proteinexpression ausgerichtet. Die Bildung von Einschlusskörpern bei der p53 Expression war deshalb nicht ungewöhnlich. Midgley et al. zeigten bei vergleichbaren Versuchen ebenfalls die Entstehung dieser Proteinaggregate. Durch die Lösung und anschließende Renaturierung erhielten sie natives p53 [58]. Nach Makrides kann die Ausbeute durch bevorzugte Bildung von gelöstem Protein gesteigert werden. Die Lösung von Einschlusskörpern dagegen sei nicht so effektiv [59]. Der Anteil an gelöstem Protein kann z.B. durch Absenken der Expressionstemperatur und die Koproduktion von Chaperonen oder Thioredoxin erreicht werden [59,60].

Neben den ungelösten Problemen der Aufreinigung muss die Aktivität des in dieser Arbeit exprimierten rekombinanten p53 noch nachgewiesen werden. Ein kritischer Punkt könnte die Thermostabilität des rekombinant hergestelltem p53 sein. Hansen et al. zeigten einen Verlust der dsDNA Bindungsaktivität *in vitro* bei 37°C bereits nach 40 min [61]. Nichols et al. dagegen fanden für das in *E.coli* exprimierte wt Protein keinen Verlust dieser Bindungsfähigkeit bis hin zu 50°C [62]. Wie auch immer sich die Thermostabilität des Proteins verhält, bleibt der Einfluss auf die Hybridisierung von DNA Einzelsträngen unklar.

4.2 Nachweis der p53-Aktivität

Die Beschleunigung der Hybridisierung komplementärer DNA-Einzelstränge durch p53 wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen [33,38,39]. In den hier durchgeführten *Band shift assay* Experimenten konnte eine Beschleunigung der Hybridisierung durch den Zusatz von p53 nachgewiesen werden. Sowohl kurze Einzelstrang-Oligos, als auch PCR-Produkt wurden auf diese Weise schneller renaturiert. Die Ergebnisse sind mit voran gegangenen Experimenten von Bakalkin und anderen vergleichbar [39]. Im Gegensatz zu den Fluoreszenz-markierten Oligos dieser Arbeit, verwendete Bakalkin radioaktive Markierung. Da die Signalintensität der Fluoreszenz-Markierung deutlich geringer ist, wurde etwa die 10fache DNA-Menge verwendet. Die spontane Hybridisierung bei Versuchen mit Oligonukleotiden ohne p53, trat bei Bakalkin auch nach 30 Minuten Inkubation nicht auf. Dagegen war die Renaturierung kurzer Oligos dort auch nach 5 Minuten nahezu vollständig.

Bei Experimenten mit PCR-Produkt war die Renaturierungsdauer länger als bei kurzen Oligonukleotiden. Je kürzer eine Sequenz ist, desto schneller renaturiert sie [25]. Da die Nukleinsäuren des PCR-Produkts etwa 10 mal länger waren, war dies nicht ungewöhnlich.

Es wurde beobachtet, dass das Laufverhalten langer und kurzer DNA-Stränge im Acrylamidgel verschieden war. Bei Versuchen mit kurzen Oligonukleotiden war die Laufstrecke doppelsträngiger DNA kürzer als die einzelsträngiger. Im Gegensatz dazu war die Laufstrecke der Einzelstränge des PCR-Produkt (234 bp) kleiner. Ein vergleichbares Laufverhalten wurde schon bei Bakalkin et al. erwähnt, aber nicht kommentiert [33]. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Nukleinsäuren in nativen Acrylamidgelen wird ausschließlich durch deren Molekülgröße bestimmt. Die Ladung und das Molekulargewicht sind dafür nicht ausschlaggebend. Es gibt zwei Theorien zur Mobilität von DNA in Gelen. Der Ogston-Siebeffekt geht davon aus, dass gelöste Nukleinsäuren in globulärer Form vorliegen. Je kleiner ein Molekül ist, desto weniger wird es von der Gelmatrix zurück gehalten. Die Reptationstheorie besagt, dass sich Nukleinsäuremoleküle im elektrischen Feld ausrichten. Danach bewegen sich linearen Stränge schlangenartig, mit einem Ende voraus durch die Matrix. Das tatsächliche Wanderungsverhalten scheint eine Mischung beider Theorien zu sein [25]. Das unterschiedliche Laufverhalten in den durchgeführten Versuchen kann wahrscheinlich auf die verschiedene Konformation der DNA zurück geführt werden. Die Auswertung mit der Software GENETYX-WIN 4.0 (Software Development, Tokio, Japan) ergab für das Cy5 markierten 50 nt Oligo die theoretische Möglichkeit der Sekundärstrukturbildung.

4.3 Mikroarrays

Der Erfolg der PCR zur Herstellung der Proben-DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Die DNA-Konzentration konnte über die Intensität der Ethidiumbromidbanden nur abgeschätzt werden. Es wäre sinnvoll, einen Standard mit auf dem Gel aufzutragen, um über einen Vergleich der Banden die Konzentration genauer bewerten zu können. Neben der Probenkonzentration hängt die Signalintensität bei Mikroarrays auch von dem Grad der Fluoreszenzmarkierungen ab [27]. Für reproduzierbare Ergebnisse ist eine gleichbleibende Markierung der Probe also von großer Bedeutung. In dieser Arbeit wurde ein qualitativer Vergleich zwischen DNA-Menge und Fluoreszenzintensität durchgeführt. Eine einfache Kontrolle des Markierungsgrads könnte die Messung der Fluoreszenzintensität des gereinigten PCR-Produkts bieten.

Um eine ideale Hybridisierung zu erreichen, sollten Probe und Sonde die gleiche Größe haben [27]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit versucht, die Größe der Probe nach dem Verdau zu bestimmen. Die Fragmente des Verdau konnten weder mit Agarose-, noch mit höher auflösenden Acrylamidgelen bestimmt werden. Nach Sambrook et al. liegt die Auflösungsgrenze von 1%igen Agarosegelen etwa bei 50 nt, die von 10%igen Acrylamidgelen bei ca. 30 nt [55]. Die Fragmentgröße des hier durchgeführten Verdau lag wahrscheinlich unter diesem Auflösungsvermögen. Durch höher prozentige Gele wäre theoretisch eine Auflösung von kleineren Fragmenten möglich. Die Färbung mit Ethidiumbromid ist aus verschiedenen Gründen für solch kleine Moleküle nicht mehr geeignet. Je länger ein DNA-Strang ist, desto mehr EtBr kann interkalieren und umso intensiver färben. Bei der Probe handelte es sich jedoch um sehr kleine DNA-Moleküle. Pro DNA-Fragment konnte nur wenig EtBr interkalieren, die Färbung war dem entsprechend schwach. Um eine Bande im Gel erkennen zu können, musste die Anzahl der Molekülen sehr groß sein. Ferner setzt eine klar abgegrenzte Bande Fragmente gleicher Größe voraus. Da es sich bei der Proben-DNA wohl um Fragmente unterschiedlicher Größe handelte, war die Ausbildung einer unscharfen Bande wahrscheinlicher. Durch die Verteilung der DNA im Gel musste verglichen mit Fragmenten übereinstimmender Größe die Probenkonzentration größer sein. Da die Konzentration des in dieser Arbeit hergestellten markierten PCR-Produktes ohnehin geringer war als die der normalen PCR, lag diese wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze für EtBr. Durch Aufkonzentrierung der Probe und Verwendung höherauflösender Gele könnte eine Quantifizierung der Fragmentgröße gelingen. Eine weitere Möglichkeit könnte der Nachweis der Fluoreszenz mit dem Phosphoimager bieten.

Üblicherweise werden bei der Hybridisierung von Mikroarrays hohe Salzkonzentrationen verwendet. Dies dient der beschleunigten Ausbildung und Stabilisierung von DNA-Doppelsträngen durch die Abschirmung des negativ geladenen Phosphatrückrats [63]. Butcher et al. zeigten einen negativen Effekt hoher Salzkonzentrationen (>300 mM) auf die DNA-Bindung von p53 [64]. Aus diesem Grund wurden in den hier vorgestellten Experimenten niedrige Salzkonzentrationen verwendet. Diese führten jedoch zu einer starken Hintergrundfluoreszenz. Wahrscheinlich beruhte dies auf der unspezifischen Bindung der markierten Probe an geladene Stellen auf der Arrayoberfläche. Bei hoher Salzkonzentration wird die DNA dagegen von den positiv geladenen Ionen abgeschirmt und die Bindung so verhindert. Bei niedrigen Salzkonzentrationen fehlt diese Abschirmung. Um die Hintergrundfluoreszenz zu verhindern wurden die Arrays in den hier durchgeführten

Versuchen mit Lachssperma-DNA vorinkubiert. Dabei wurden wahrscheinlich die unspezifischen DNA-Bindungsstellen auf der Arrays-Oberfläche gebunden und die Bindung der markierten Probe verhindert.

Die Mikroarray-Hybridisierungsversuche mit p53 führten bei allen Inkubationszeiten zu gesteigerten Signalintensitäten gegenüber dem reinen Puffer. Die Ursache der stark schwankenden Ergebnisse der 1, 2 und 3 Stunden Hybridisierungen konnte u.a. unregelmäßigem Spotten zugeordnet werden. Die unterschiedlichen Mengen aufgebrachtter Sonde je Punkt führte zu einer Ungleichverteilung der Hybridisierungspartner für die Probe. Nachdem das Spotten optimiert wurde, waren die Punkte gleichmäßig und in sich homogen. Es ist wahrscheinlich, dass p53 auch auf Mikroarrays eine Beschleunigung der Hybridisierung bewirkte. Ferner sollte mit weiteren Kontrollen sicher gestellt werden, dass die Beschleunigung wirklich auf p53 beruht. Der Puffer, in dem p53 geliefert wurde, könnte einen Einfluss auf die Hybridisierung haben. Des Weiteren sollte die unspezifische Wirkung von Proteinen auf die Hybridisierung untersucht werden. Dies könnte durch einen Austausch von p53 mit der gleichen Menge BSA versucht werden. Erst wenn auch diese Kontrollen geringere Signale zeigen als Ansätze mit p53, kann mit Sicherheit von einer p53-Aktivität auf Mikroarrays ausgegangen werden.

Bei den Arrayversuchen wurden besonders bei Inkubationen mit p53 unspezifische Fluoreszenzsignale beobachtet. Sie können verschiedene Ursachen haben. Durch die Absenkung der Inkubationstemperatur wird die Hybridisierung beschleunigt und es kommt leicht zur Bildung von Heteroduplexen. Da diese Signale hier nur bei Inkubationen mit p53 auftraten, kann dies als alleinige Ursache ausgeschlossen werden. Neben der p53-Aktivität bei der Hybridisierung komplementärer DNA-Einzelstränge könnte das Auftreten unspezifischer Fluoreszenzsignale auf einen unspezifischen Effekt des Proteins beruhen. Denkbar wäre die Stabilisierung der Proben-DNA durch das Protein vergleichbar mit dem schon erwähnten Salzeffekt.

Die unspezifische Hybridisierung könnte durch Erhöhung der Salzkonzentration bei der Inkubation verringert werden. Unter diesen Bedingungen wäre jedoch eine Behinderung der p53 Funktion denkbar z.B. durch die Veränderung der Proteinkonformation. Überdies wäre die Verringerung der unspezifischen Bindungen durch Erhöhung der Hybridisierungstemperatur möglich. Wie vorhergehend erwähnt, ist der Einfluss der Temperatur auf die hybridisierungskinetische Aktivität von p53 nicht ausreichend untersucht. Demnach sollten sich Versuche hierzu anschließen.

Die Mikroarrayversuche haben gezeigt, daß die Hybridisierungskinetik dieses heterogenen Systems durch den Zusatz von p53 verkürzt werden kann. Um sicherzustellen, daß diese beschleunigende Eigenschaft auf p53 zurückzuführen ist, werden in einer anschließenden Arbeit Negativkontrollen mit BSA durchgeführt. Dies soll sicherstellen, dass es sich nicht um unspezifische Proteinfunktionen handelt.

Ausblick

Von der p53-Funktion könnten besonders einfach herzustellende und preiswerte Arrays mit Glasobjektträgern profitieren. Deshalb wäre die Übertragung dieser Anwendung auf andere Array-Typen sinnvoll. Besonders Arrays mit langen PCR-Produkten als Sonde könnten vermutlich durch den Einsatz von p53 verbessert werden. Die Hybridisierungsdauer ist bei ihnen erfahrungsgemäß besonders lang. Die Anwendung weiterer DNA-bindender Proteine könnte möglicherweise das Spektrum des hier begonnenen Ansatzes noch weiter ausdehnen.

5 Literatur

1. Epstein CB, Butow RA: **Microarray technology - enhanced versatility, persistent challenge.** *Curr Opin Biotechnol* 2000, **11**:36-41.
2. Gerhold D, Rushmore T, Caskey CT: **DNA chips: promising toys have become powerful tools.** *Trends Biochem Sci* 1999, **24**:168-173.
3. Schena M, Davis R: **Genes, Genomes, and Chips.** In *DNA Microarrays: A Practical Approach.* Edited by Schena M: Oxford University Press; 1999:1-15.,
4. Schena M, Davis R: **Technology Standarts for Microarray Research.** In *Microarray Biochip Technology.* Edited by Schena M; 2000.,
5. Blohm DH, Guiseppi-Elie A: **New developments in microarray technology.** *Curr Opin Biotechnol* 2001, **12**:41-47.
6. Richmond CS, Glasner JD, Mau R, Jin H, Blattner FR: **Genome-wide expression profiling in Escherichia coli K-12.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**:3821-3835.
7. Watson A, Mazumder A, Stewart M, Balasubramanian S: **Technology for microarray analysis of gene expression.** *Curr Opin Biotechnol* 1998, **9**:609-614.
8. Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ: **Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes.** *Nucleic Acids Research* 1999, **27**:1517-1523.
9. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM: **Expression profiling using cDNA microarrays.** *Nat Genet* 1999, **21**:10-14.
10. Bowtell DD: **Options available--from start to finish--for obtaining expression data by microarray.** *Nat Genet* 1999, **21**:25-32.
11. Diamandis EP: **Sequencing with microarray technology--a powerful new tool for molecular diagnostics.** *Clin Chem* 2000, **46**:1523-1525.
12. Ahrendt SA, Halachmi S, Chow JT, Wu L, Halachmi N, Yang SC, Wehage S, Jen J, Sidransky D: **Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:7382-7387.
13. Hacia JG: **Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays.** *Nat Genet* 1999, **21**:42-47.
14. Brown PO, Botstein D: **Exploring the new world of the genome with DNA microarrays.** *Nat Genet* 1999, **21**:33-37.
15. Chakravarti A: **Population genetics--making sense out of sequence.** *Nat Genet* 1999, **21**:56-60.
16. Henke C: **DNA-chip technologies.** *IVD Technology Magazine*, <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/98/09/009.html>, Letzter Zugriff 5.12.2001.
17. Rose D: **Microfluidic Technologies and Instrumentation for Printing DNA Microarrays.** In *Microarray Biochip Technology.* Edited by Schena M; 2000.,
18. Mace LM, Montagu J, Rose D, McGuinness G: **Novel Microarray Printing and Detection Technologies.** In *Microarray Biochip Technology.* Edited by Schena M; 2000.,
19. www.packardbioscience.com/products/691.asp. Letzter Zugriff: 26.11.2001.
20. Feng L, Nerengerg M: **Electronic microarray for DNA analysis.** *Gene Therapy and Molecular Biology* 1999, **4**:183-191.
21. Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ: **High density synthetic oligonucleotide arrays.** *Nat Genet* 1999, **21**:20-24.
22. Case-Green S, Pritchard C, Southern E: **Use of oligonucleotide arrays in enzymatic assays: assay optimization.** In *DNA Microarrays: A Practical Approach.* Edited by Schena M; 1999.,
23. Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G: **Making and reading microarrays.** *Nat Genet* 1999, **21**:15-19.
24. <http://www.drd.de/helmich/bio/gen/reihe2/karte212.html>. Letzter Zugriff: 18.11.2001.
25. Lottspeich F, Zorbas H: *Bioanalytik*: Spektrum; 1998.
26. Steel A: **The Flow-Thru Chip: A Three-Dimensional Biochip Platform.** In *Microarray Biochip Technology.* Edited by Schena M; 2000.,
27. Southern E, Mir K, Shchepinov M: **Molecular interactions on microarrays.** *Nat Genet* 1999, **21**:5-9.
28. Gerhold D, Lu M, Xu J, Austin C, Caskey CT, Rushmore T: **Monitoring expression of genes involved in drug metabolism and toxicology using DNA microarrays.** *Physiol Genomics* 2001, **5**:161-170.

29. Fan JB, Chen X, Halushka MK, Berno A, Huang X, Ryder T, Lipshutz RJ, Lockhart DJ, Chakravarti A: **Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays.** *Genome Res* 2000, **10**:853-860.
30. Arlinghaus HF, Kwoka MN, Jacobson KB: **Analysis of biosensor chips for identification of nucleic acids.** *Anal Chem* 1997, **69**:3747-3753.
31. Shchepinov MS, Case-Green SC, Southern EM: **Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:1155-1161.
32. Heller M: **Active microelektronik arrays for DNA hybridisation analysis.** In *DNA Microarrays-A practical approach*. Edited by Schena M; 1999,.
33. Bakalkin G, Selivanova G, Yakovleva T, Kiseleva E, Kashuba E, Magnusson KP, Szekely L, Klein G, Terenius L, Wiman KG: **p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain.** *Nucleic Acids Res* 1995, **23**:362-369.
34. Nedbal W, Frey M, Willemann B, Zentgraf H, Sczakiel G: **Mechanistic insights into p53-promoted RNA-RNA annealing.** *J Mol Biol* 1997, **266**:677-687.
35. Yokote H, Nishio K, Arioka H, Kurokawa H, Fukuoka K, Fukumoto H, Ishida T, Terada T, Itakura T, Saijo N: **The C-terminal domain of p53 catalyzes DNA-renaturation and strand exchange toward annealing between intact ssDNAs and toward eliminating damaged ssDNA from duplex formation through preferential recognition of damaged DNA by a duocarmycin.** *Mutat Res* 1998, **409**:147-162.
36. Ahn J, Prives C: **The C-terminus of p53: the more you learn the less you know.** *Nat Struct Biol* 2001, **8**:730-732.
37. Zotchev SB, Protopopova M, Selivanova G: **p53 C-terminal interaction with DNA ends and gaps has opposing effect on specific DNA binding by the core.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**:4005-4012.
38. Selivanova G, Iotsova V, Kiseleva E, Strom M, Bakalkin G, Grafstrom RC, Wiman KG: **The single-stranded DNA end binding site of p53 coincides with the C-terminal regulatory region.** *Nucleic Acids Res* 1996, **24**:3560-3567.
39. Bakalkin G, Yakovleva T, Selivanova G, Magnusson KP, Szekely L, Kiseleva E, Klein G, Terenius L, Wiman KG: **p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:413-417.
40. Oberosler P, Hloch P, Ramsperger U, Stahl H: **p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids.** *Embo J* 1993, **12**:2389-2396.
41. Cain C, Miller S, Ahn J, Prives C: **The N terminus of p53 regulates its dissociation from DNA.** *J Biol Chem* 2000, **275**:39944-39953.
42. Hainaut P: **The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival.** *Curr Opin Oncol* 1995, **7**:76-82.
43. el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B: **Definition of a consensus binding site for p53.** *Nat Genet* 1992, **1**:45-49.
44. Okamoto K, Beach D: **Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein.** *Embo J* 1994, **13**:4816-4822.
45. Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ, Jr.: **A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia.** *Cell* 1992, **71**:587-597.
46. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B: **WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.** *Cell* 1993, **75**:817-825.
47. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ: **The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop.** *Genes Dev* 1993, **7**:1126-1132.
48. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ: **The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation.** *Cell* 1992, **69**:1237-1245.
49. Miyashita T, Reed JC: **Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene.** *Cell* 1995, **80**:293-299.
50. Nagaich AK, Zhurkin VB, Sakamoto H, Gorin AA, Clore GM, Gronenborn AM, Appella E, Harrington RE: **Architectural accommodation in the complex of four p53 DNA binding domain peptides with the p21/waf1/cip1 DNA response element.** *Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**:14830-14841.
51. Mittl PR, Chene P, Grutter MG: **Crystallization and structure solution of p53 (residues 326-356) by molecular replacement using an NMR model as template.** *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 1998, **54**:86-89.

52. Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP: **Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms.** *Science* 1995, **267**:1498-1502.
53. Miller M, Lubkowski J, Rao JK, Danishefsky AT, Omichinski JG, Sakaguchi K, Sakamoto H, Appella E, Gronenborn AM, Clore GM: **The oligomerization domain of p53: crystal structure of the trigonal form.** *FEBS Lett* 1996, **399**:166-170.
54. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP: **Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations.** *Science* 1994, **265**:346-355.
55. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*; 1989.
56. TALON Metal Affinity Resins User Manual on World Wide Web URL: www.clontech.com
57. persönliche Anmerkung von Dr. Satohi Ezaki (ITB US).
58. Midgley CA, Fisher CJ, Bartek J, Vojtesek B, Lane D, Barnes DM: **Analysis of p53 expression in human tumours: an antibody raised against human p53 expressed in Escherichia coli.** *J Cell Sci* 1992, **101**:183-189.
59. Makrides SC: **Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli.** *Microbiol Rev* 1996, **60**:512-538.
60. LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM: **A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm.** *Biotechnology (N Y)* 1993, **11**:187-193.
61. Hansen S, Hupp TR, Lane DP: **Allosteric regulation of the thermostability and DNA binding activity of human p53 by specific interacting proteins.** CRC Cell Transformation Group. *J Biol Chem* 1996, **271**:3917-3924.
62. Nichols NM, Matthews KS: **Protein-DNA binding correlates with structural thermostability for the full-length human p53 protein.** *Biochemistry* 2001, **40**:3847-3858.
63. Kuhlmeier D: **Nachweis von Nukleinsäure-Wechselwirkungen mit Hilfe optischer Biosensoren [Dissertation].** Braunschweig: Technische Universität Carolo-Wilhelmina: 2000.
64. Butcher S, Hainaut P, Milner J: **Increased salt concentration reversibly destabilizes p53 quaternary structure and sequence-specific DNA binding.** *Biochem J* 1994, **298 Pt 3**:513-516.