

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Größenstandards

Die verwendeten Chemikalien, soweit nicht anders vermerkt, wurden von den Firmen Sigma und Roth bezogen. Soweit nicht anders erwähnt war die Bezugsquelle für Enzyme, 2xPCR-Master-Mix und DNA-Größenstandards die Firma Promega. Protein-Größenstandards wurden von Fermentas bezogen. Zellkulturchemikalien und -lösungen wie DMEM, HANKS, Trypsin, FCS und OptiMem wurde von PAA Laboratories bezogen.

2.1.2 Bakterien

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	<i>E. coli</i> K12, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac-</i> , <i>F'</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI_qZΔM15</i> , <i>Tn10</i> (Tet) _r

LB (Luria Bertani) 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, zur Herstellung von LB-Agar wurden 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

Für die Selektion rekombinanter Klone wurde das Medium in Abhängigkeit des Vektors mit 30 µg Kanamycin/mL oder 150 µg Ampicillin/mL supplementiert.

2.1.3 Zelllinien

U-2 OS HTB-96; humane Osteosarcoma-Zelllinie, (Heldin et al., 1986)
 HEK 293 ACC-305; humane embryonale Nierenzellen, (Graham et al., 1977)

2.1.4 Antikörper

Tab. 2.1: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper und deren Verdünnung.

Primärantikörper	Typisierung	Hersteller	Verdünnung
anti-CD44, HCAM	mAK Maus	Santa Cruz	1:1000 WB
anti-c-myc	mAK Maus	Upstate	1:500 WB
anti-Flag	mAK-Maus	Sigma	1:1000 IF
anti-FXR1	mAK Maus	Santa Cruz	1:100 IF
anti-hnRNP F	mAK Maus	Abnova	1:100 IF
anti-hnRNP M	mAK Maus	Santa Cruz	1:100 IF
anti-hnRNP Q	mAK Maus	Sigma	1:250 IF
anti-hnRNP U	mAK Maus	Sigma	1:100 IF
anti-HuR	mAK Maus	Sigma	1:100 IF
anti-LEF1	mAK Maus	Santa Cruz	1:500 WB
anti-MAPK4	mAK Maus	Abnova	1:500 WB
anti-MSK1	mAK Maus	Santa Cruz	1:500 WB
anti-PTEN	mAK Maus	Cell Signaling	1:500 WB
anti-RAPGEF2	mAK Maus	Abnova	1:500 WB
anti-TIAR	mAK Maus	BD Transduction	1:500 IF
anti-Tubulin, DM1 α	mAK Maus	Sigma	1:2500 WB
anti-Vinculin, hVin1	mAK Maus	Sigma	1:2500 WB
anti-ZBP1	mAK Maus	Eigenimmunisierung	IP
anti- β -Aktin	mAK Maus	Sigma	1:1000 WB
anti-hnRNP A1	mAK Ziege	Santa Cruz	1:100 IF
anti-hnRNP R	mAK Ziege	Santa Cruz	1:100 IF
anti-YB1	mAK Ziege	Santa Cruz	1:100 IF
anti-DCP2	pAK Kaninchen	(Meyer et al., 2004)	1:50 IF
anti-HA	pAK Kaninchen	Sigma	1:1000 IF
anti-hnRNP E1	pAK Kaninchen	zur Verfügung gestellt von A. Ostareck-Lederer (Peptidimmunisierung)	1:100 IF
anti-hnRNP E2	pAK Kaninchen	zur Verfügung gestellt von A. Ostareck-Lederer (Peptidimmunisierung)	1:100 IF
anti-hnRNP k	pAK Kaninchen	zur Verfügung gestellt von A. Ostareck-Lederer (Peptidimmunisierung)	1:100 IF
anti-RHA	pAK Kaninchen	Abcam	1:100 IF
anti-ZBP1 (460)	pAK Kaninchen	(Huttelmaier et al., 2005)	1:200 IF, 1:1000 WB
Sekundärantikörper	Antigen	Hersteller	Verdünnung
anti-Maus FITC	Maus IgG	Dianova	1:500
anti-Maus Cy3	Maus IgG	Dianova	1:1000
anti-Maus Cy5	Maus IgG	Dianova	1:50
anti-Maus HRP	Maus IgG	Dianova	1:2500
anti-Kaninchen FITC	Kaninchen IgG	Dianova	1:500
anti-Kaninchen Cy3	Kaninchen IgG	Dianova	1:1000
anti-Kaninchen HRP	Kaninchen IgG	Dianova	1:2500
anti-Ziege FITC	Kaninchen IgG	Dianova	1:500

2.1.5 Plasmide

pCR [®] -blunt	Invitrogen
pcDNA3.1 (+)	Invitrogen
pEGFP-C1	CLONTECH
pEGFP-C2	CLONTECH
pEGFP-C1	CLONTECH
pEYFP-C1	CLONTECH

2.1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Klonierung und qRT-PCR wurden von MWG und Invitrogen bezogen. siRNAs wurden von Invitrogen bezogen.

Oligonukleotide zur Klonierung. Alle in der Tabelle aufgeführten Oligonukleotide wurden standardmäßig bei *annealing*-Bedingungen von 55°C und 30 s verwendet. Die Elongationszeit variierte je nach Größe des PCR-Produkts (Amplikon). Hierbei wurde die vom Hersteller angegebene Reaktionsgeschwindigkeit der Pfx-Polymease von 1 min/1 kb zu Grunde gelegt. Die eingeführten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Tab. 2.2: Oligonukleotide zur Klonierung.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
V1C Nhe I <i>s</i>	GAT <u>TGC TAG CAT</u> GGT GAG CAA GGG CGA GG
V1C Bgl II <i>as</i>	GAT <u>TAG ATC TGG</u> TGA TAT AGA CGT TGT GGC
V2C Nhe I <i>s</i>	GGG <u>CTA GCA</u> TGG CCG ACA AGC AGA AGA ACG GC
V2C Bgl II <i>as</i>	GAT <u>TAG ATC TCT</u> TGT ACA GCT CGT CCA TGC
Flag(Bgl II/EcoRI) <i>s</i>	<u>GAT CTA</u> TGG ACT ACA AGG ACG ACG ACA <u>AGG</u>
Flag(Bgl II/EcoRI) <i>as</i>	<u>AAT TCC</u> TTG TCG TCG TCC TTG TAG TCC <u>ATA</u>
HA(Bgl II/EcoRI) <i>s</i>	<u>GAT CTA</u> TGG GCT ACC CCT ACG ACG TGC CCG ACT <u>ACG</u>
HA(Bgl II/EcoRI) <i>as</i>	<u>AAT TCG</u> GCG TAG TCG GGC ACG TCG TAG GGG TAG <u>CCC</u>
MS2BP Xho I <i>s</i>	GGG <u>CTC GAG</u> CAC GCT TCT AAC TTT ACT CAG TTC GTT
MS2BP Xba I, BamHI <i>as</i>	GGG <u>TCT AGA GGA TCC</u> TTA GTA GAT GCC GGA GTT TGC TGC G
G3BP EcoRI <i>s</i>	GGG <u>AAT TCA</u> TGG TGA TGG AGA AGC CTA GTC
G3BP Sal I <i>as</i>	GGG <u>TCG ACT</u> TAC TGC CGT GGC GCA AGC CCC CTT C

Oligonukleotide für qRT-PCR. Alle in der Tabelle aufgeführten Oligonukleotide wurden standardmäßig bei *annealing*-Bedingungen von 60°C und 30 s verwendet. Reaktionsbedingungen für qRT-PCR siehe 2.2.3.3.

Tab. 2.3: Oligonukleotide für qRT-PCR.

Gen	<i>sense (5' 3')</i>	<i>antisense (5' 3')</i>
18S	AGGGCAGGGACTTAATCAACGC	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGG
ACTR2	ATCACGGTTGGAACGAGAAC	CACACGGACACCCTTTTCTT
α -Tubulin	AGTGCATCTCCATCCACGTT	TCAATGACTGTGGGTTCCAA
AVPR1A	ACCGAATCGGAAAACCCTAC	CATGGGAAGCTTTGAACACA
β -Aktin	TCCCTGGAGAAGAGCTACG	GTAGTTTCGTGGATGCCACA
BCAN	CGGATCAGACCGTGAGGTAT	CAGCTTCTCTGGAGGGTCAC
BCL2L1	GGGGTAAACTGGGGTTCGCATT	ACCTGCGGTTGAAGCGTTC
BCOR	AGCAACCAAAGACTCCGAGA	TTCGTTCTGTTCTGCAATG
c-myc	CAGCTGCTTAGACGCTGGATT	GTAGAAATACGGCTGCACCGA
CPSF6	AAGATTGCCTTCATGGAATTGAG	TCGTGATCTACTATGGTCCCTCTCT
CUL4A	TCGAAAACCTCAGTGGCAA	TGGCCATTTTTATCTCCTCA
Cyclophilin A	GTC AAC CCC ACC GTG TTC TT	CTG CTG TCT TTG GGA CCT TGT
ENPP1	GCCTGTTTCAGATGACTGCAA	AGAAGTCCACCCCAAGTGTG
EPM2A	AGTGTCCCCTATTGCCACTC	GAAGAGGTGCCTGCAAAGAC
firefly	GAATCCATCTTGCTCCAACAC	TTCGTCCACAAACACAACCTC
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
HSPB1 (Hsp27#1)	GTCCCTGGATGTCAACCACT	GGACAGGGAGGAGGAAACTT
IGF-II	CGATGCTGGTGCTTCTCACC	GTCACAGCTGCGGAAACAGC
JUP	TCAGCAGCAAGGGCATCAT	TGGGTGTAAGTGGTGGTTTTCTT
LAMA1	GAACAGTGTGTGGTGGATGC	CCTTGCCAAGGTCAAACAT
LEF1	ACAGATCACCCACCTCTTG	TGAGGCTTCACGTGCATTAG
MAPK4	TGCTCAAGATTGGGGATTTC	GATGAGTTGCATCTGCTCCA
MERTK	CCCGGCGTGCTAACTGTT	TTGTCATTGTGGGCCTCACA
NRG1	CGTGGAAATCAAACGAGATCATCA	GCTTGTCCCAGTGGTGGATGT
NRXN2	TTGTCATCGAGCTGGTCAAG	TTGTGCCACTGGTTGTCATT
PBX1	CCCATCTCAGCAACCCTTACC	CCATGGGCTGACACATTGG
PTEN	ACCAGGACCAGAGGAAACCT	GCTAGCCTCTGGATTTGACG
RAPGEF2	ACATTCTGAGGACGGTGGAC	CATTGAGAAGTGCAGCCAGA
renilla	ATCAGGCAAATCTGGTAATGG	ACATCTACTACACTTTCAGCGT
RPLP 0	GGCGACCTGGAAGTCCAACCT	CCATCAGCACCACAGCCTTC
RPS6KA5	TTCAGCTGTAAGCCACATGC	TGAGATTGGAAGGGAACCTG
RRBP1	TGGAGGATGAGCAGACACAG	GTTCTGTCAGCTTCTTACC
SFRS14	ACAGCACCGATAACCCTGAC	GGGCTCGTCTTCAAACCTCTG
SHANK3	GCCTGAAGACGACAAACCA	ACTTCTTGGCAGGGTCCAG
STAT3	CAGTCAGTGACCAGGCAGAA	GCTGCAACTCCTCCAGTTTC
TBC1D10A	GAGTCCAAGTGGCTGGACAT	CTGACAGGTAAGTCCAAGCA
Vinculin	TTACAGTGGCAGAGGTGGTG	TCACGGTGTTCATCGAGTTC
ZBP1	TAGTACCAAGAGACCAGACCC	GATTTCTGCCCGTTGTTGTC

Tab. 2.4: siRNAs.

siRNA	Sequenz (5' → 3')
Kontrolle	UGG GCG UCG UGG AGG CUU UTT
ZBP1	CCG GGA GCA GAC CAG GCA ATT

2.1.7 Systeme

WIZARD Plus SV Miniprep	Promega
PURE YIELD™ Plasmid Midprep System	Promega
RNeasy MiniElute Clean Up	QIAGEN
QIAEX II Gel Extraktion Kit	QIAGEN
Dc Protein Assay	Biorad
Dual-Glo™ Luziferase Assay System	Promega
pCR®-blunt	Invitrogen

2.1.8 Sonstiges

Blotmembran	Amersham
ECL	Amersham
Zellkulturmaterialien	TPP
qRT-PCR-Materialien	VWR
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Prolong-Antifade	Invitrogen

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Protokolle für grundlegende Methoden wie z.B. Ethanol-fällung, die Phenol-Chloroformextraktion von Nukleinsäuren oder die Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA-Lösungen wurden allgemein gebräuchlichen Laborhandbüchern entnommen (Ausubel, 1996; Sambrook, 1989). Enzymatische Reaktionen, wie Ligation, Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung oder die Restriktionsspaltung von DNA erfolgten nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der entsprechenden Enzyme und Puffer. Die Präparation geringer Mengen (1-2 µg) Plasmid-DNA erfolgte nach (Birnboim, 1976). Es wurden standardmäßig 2 ml einer Über-Nacht-Kultur eingesetzt. Zur Sequenzierung oder Transfektion verwendete DNA wurde unter Verwendung der unter 2.1.8 angegebenen Isolationssysteme von Promega präpariert, Sequenzierung wurden durch die Firma MWG durchgeführt. Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben unter Verwendung des QIAEX II Gel Extraktion Kits von QIAGEN.

2.2.1.2 Mikrobiologische Standardmethoden

Allgemeine mikrobiologische Methoden, wie die Sterilisierung von Lösungen und Gegenständen, die Kultivierung von *E. coli* in Medien bzw. auf selektiven Agarplatten, die Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen sowie deren Transformation durch Hitzeschock wurden anhand von Standardprotokollen durchgeführt.

2.2.1.3 Klonierungen

Alle Klonierungen wurden standardmäßig wie folgt durchgeführt. Das zu klonierende DNA-Fragment wurde mittels Pfx-Polymerase (Invitrogen) und mit spezifischen Oligonukleotiden, welche die entsprechenden Restriktionsschnittstellen enthielten, nach Angaben des Herstellers amplifiziert (Oligonukleotide siehe 2.1.6). Als *template* für *de novo* Amplifikationen diente aus RNA von U2OS-Zellen hergestellte cDNA, welche mittels

SuperScriptII (Invitrogen) nach Herstellerangaben synthetisiert wurde. Die BiFC-Plasmide (YFP_N und YFP_C) wurden basierend auf dem pEYFP C1-Vektor von CLONTECH synthetisiert. Das PCR-Produkt wurde in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bande der entsprechenden Größe wurde anschließend mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraktion Kits von QIAGEN isoliert und in den pCR[®]-blunt-Vektor ligiert. Die Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung verifiziert und anschließend über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen in die in Tab. 2.5 angegebenen Vektoren mittels T4-DNA-Ligase subkloniert. Die Oligonukleotid-Linker Flag bzw. HA wurden aus den entsprechenden Oligonukleotiden (2.1.6) hergestellt. Dazu wurde ein 1:1 Gemisch aus *sense* und *antisense* Oligonukleotid bei 95°C für 2 min denaturiert und zur Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde der Oligonukleotid-Linker im Überschuss in das YFP_N- bzw. YFP_C-Plasmid mittels T4-DNA-Ligase unter Verwendung der angegebenen Restriktionsschnittstellen ligiert. Bei der Subklonierung des MS2BP in den YFP_C-HA-Vektor wurde letzterer nach dem Restriktionsverdau mit BamHI mittels alkalischer Phosphatase nach Standardprotokollen dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Alle Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung verifiziert.

Tab. 2.5: Verwendete Plasmide.

Plasmidname	Insert	Vektor	Restriktionsschnittstellen	Beschreibung
ZBP1-Deletionsfragmente	ZBP1-Deletionsfragmente	pEGFP C2	EcoRI / Sal I	(Farina et al., 2003)
GFP-Imp1	Imp1	pEGFP C2	EcoRI / Sal I	(Stohr et al., 2006)
GFP-Imp2	Imp2	pEGFP C2	EcoRI / Sal I	(Stohr et al., 2006)
GFP-Imp3	Imp3	pEGFP C2	EcoRI / Sal I	(Stohr et al., 2006)
GFP-Raver	Raver	pEGFP C1		(Huttelmaier et al., 2001)
GFP-PTB	PTB	pEGFP C1		(Huttelmaier et al., 2001)
GFP-EF1 α	EF1 α	pEGFP C1		(Huttelmaier et al., 2001)
GFP-KSRP	KSRP	pEGFP C1		(Huttelmaier et al., 2001)
RFP-DCP1	DCP1b	mRFP C1	EcoRI / BamHI	
GFP-DCP1	DCP1b	pEGFP C1	EcoRI / BamHI	
GFP-G3BP	G3BP1	pEGFP C2	EcoRI / Sal I	(Stohr et al., 2006)
YFP _N	YFP _N	pEGFP C1	Nhe I / Bgl II	in Anlehnung an (Rackham and Brown, 2004)
YFP _C	YFP _C	pEGFP C1	Nhe I / Bgl II	in Anlehnung an (Rackham and Brown, 2004)
YFP _N -Flag	Flag	YFP _N	Bgl II / EcoRI	
YFP _C -HA	HA	YFP _C	Bgl II / EcoRI	
YFP _N -Flag-ZBP1	ZBP1	YFP _N -Flag	EcoRI / XhoI in Sal I	(Stohr et al., 2006)
YFP _C -HA-MS2BP	MS2BP	YFP _C -HA	BamHI	(Stohr et al., 2006)

GFP-NLS-MS2BP	NLS, MS2BP	pEGFP C1		(Bertrand et al., 1998)
Luc-ΔZip	firefly Luziferase	pcDNA3.1	BamHI / EcoRI	(Huttelmaier et al., 2005)
Luc-Zip	firefly Luziferase, β-Aktin Zipcode	pcDNA3.1	HindIII / XhoI	(Huttelmaier et al., 2005)
Luc-ΔZip-MS2	firefly Luziferase, 6 MS2	pcDNA3.1	HindIII / BamHI	(Bertrand et al., 1998)
β-Aktin-Zip-MS2	β-Aktin cds und Zipcode, 6 MS2	pcDNA3.1	HindIII / BamHI	(Bertrand et al., 1998)

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Kultivierung humaner Zelllinien

U2OS und HEK293 Zellen wurden in DMEM (*Dublecco's Modified Eagle Medium*), welchem 10% FCS (Fötale Kälber Serum) zugesetzt wurden, bei 37°C und unter 10% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden in 10 cm TC-Platten kultiviert.

Zum Passagieren wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit HANKS-Puffer mit einer Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, bis sich ca. 50-70% der Zellen vom Gefäßboden gelöst hatten. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe des doppelten Volumens DMEM/10% FCS gestoppt, die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellzahl replattiert.

Zur Transfektion wurden U2OS-Zellen in 6well-Platten mit einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/well ausgesät. Für Immunfluoreszenzen wurden 24well-Platten, welche 12 mm Deckgläschen enthielten, verwendet. Hierfür wurde eine Zellzahl 5×10^4 Zellen/well ausgesät. Für die Immunopräzipitationen wurden U2OS- sowie HEK293-Zellen in 15 cm Schalen und einer Zellzahl von 1×10^7 kultiviert.

2.2.2.2 Transfektion von U2OS Zellen

Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Menge des verwendeten OptiMem richtete sich hierbei nach der Größe der zu transfizierenden Kulturschale und wurde ebenfalls, wie vom Hersteller empfohlen, verwendet. U2OS-Zellen wurden am Vortag in der entsprechenden Zellzahl ausgesät und am Folgetag transfiziert. Sechs Stunden nach Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die in den einzelnen

Experimenten verwendeten DNA- bzw. siRNA-Mengen wurden im Anhang in Tab. 6.1 zusammengestellt.

2.2.2.3 Stressapplikation

Zur Erzeugung von oxidativem Stress in U2OS-Zellen wurde dem Kulturmedium eine Endkonzentration von 2,5 mM Natriumarsenat zugesetzt. Das Natriumarsenat wurde in Kulturmedium gelöst. Wenn nicht anders vermerkt erfolgte die Inkubation mit Natriumarsenat für eine Stunde im Brutschrank. Ein Hitzeschock wurde durch Applikation von 42°C warmen Kulturmedium und einer anschließenden Inkubation bei 42°C für eine Stunde ausgelöst. Die radioaktive Bestrahlung von U2OS-Zellen wurde in Zusammenarbeit mit der Radiologie (Medizinische Fakultät, Universität Halle/Wittenberg) durchgeführt. Die Zellen wurden mit 0,5 Gy, 1 Gy bzw. 6Gy für eine Minute bestrahlt, danach für 1 h bzw. 4 h im Brutschrank inkubiert und anschließend fixiert.

Zur Inhibierung der PolymeraseII-gesteuerten Transkription für die Analyse des mRNA-Abbaus in U2OS-Zellen wurde dem Kulturmedium 5 µM Aktinomycin D für die angegebenen Zeitpunkte zugesetzt. Das Aktinomycin D wurde hierfür nach Herstellerangaben in 95%igem Ethanol gelöst.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von Gesamt-RNA mittels TRIZOL wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit TRIZOL von der Kulturschale lysiert. Es wurde 1 mL TRIZOL pro *well* einer 6*well*-Platte verwendet. Die Suspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Reinigung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden Zelltrümmer für 5 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde in ein frische Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 200 µL Chloroform unter Vortexen extrahiert. Zur Phasentrennung wurde für 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die wässrige (obere) Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgt durch Zugabe von 500 µL Isopropanol für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die RNA für 10 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 200 µL kaltem

80%igen Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die RNA wurde in 30 μL RNase/DNase-freiem Wasser gelöst und bis zur reversen Transkription bei -80°C gelagert.

TRIZOL:

0,8 M Guanidiniumthiocyanat
0,4 M Ammoniumthiocyanat
0,1 M Natriumacetat, pH 5.0
5% (w/v) Glycerol
48% Roti-Aqua-Phenol für RNA-Isolierung

2.2.3.2 Reverse Transkription

Zur Analyse der RNA mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) wurden 2 μg Gesamt-RNA revers transkribiert. Die reverse Transkription erfolgte mit der M-MLV reversen Transkriptase (Promega) nach folgendem Protokoll:

2 μg Gesamt-RNA
1 μL *random hexamers*
Auffüllen auf 14,5 μL mit RNase/DNase-freiem Wasser

Denaturierung der RNA für 5 min bei 65°C und anschließende Inkubation auf Eis für weitere 5 min.

Zugabe von 5,5 μL Master-Mix, bestehend aus:

4 μl 5xRT-Puffer
1 μl dNTPs
0,25 μl RNasin
0,25 μl M-MLV reverse Transkriptase

Inkubation für 2 h bei 42°C und anschließende Inaktivierung der reversen Transkriptase durch Inkubation für 15 min bei 75°C . Die cDNA wurde falls nicht unmittelbar verwendet bis zur Analyse mittels qRT-PCR bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Veränderungen des RNA-Gehaltes von Zellen bzw. Verschiebungen im Mengenverhältnis einzelner Transkripte können im Wesentlichen mit zwei Methoden quantifiziert werden – dem Northern Blot und der quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Die Vorteile der qRT-PCR liegen vor allem in der höheren Sensitivität, die es erlaubt, auch geringe Unterschiede zu detektieren, und der wesentlich geringen Menge an benötigter RNA. Darüber hinaus verzichtet die qRT-PCR auf die Verwendung von Radioaktivität bei den eingesetzten Sonden und ermöglicht zudem, einen höheren Messdurchsatz.

Es gibt im Wesentlichen zwei Technologien, die die Quantifizierung einer PCR erlauben, zum einen ist das die SYBR[®] Green I-Technologie, zum anderen finden so genannte Taqman-Sonden Anwendung. Beiden Technologien liegt eine herkömmliche PCR zu Grunde, deren Verlauf jedoch anhand einer fluoreszenzbasierenden Messung dokumentiert werden kann. Demnach ist die gemessene Fluoreszenz proportional der entstandenen Menge an PCR-Produkt. Unter Berücksichtigung der Reaktionszyklen können daraus Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der untersuchten Transkripte gezogen werden.

Bei dem Taqman-System kommt neben den PCR-Primern, eine zusätzliche Sonde zum Einsatz, welche sowohl ein Fluorophor als auch einen Quencher enthält, der das Fluoreszieren der Sonde verhindert. Diese Sonde ist komplementär zu einem Teil des entstehenden PCR-Produkts. Im Verlauf der PCR wird durch die Exonuklease-Aktivität der Polymerase die erste Base der Sonde, an welche der Fluorophor gekoppelt ist, entfernt. Die freigesetzte Fluoreszenzmenge ist zu der entstandenen Produktmenge proportional. Vorteil der Taqman-Technologie ist die hohe Spezifität, jedoch sind bei weitem nicht für alle Gene Taqman-Sonden kommerziell erhältlich. Darüber hinaus ist diese Methode besonders kostenintensiv.

In dieser Arbeit wurde die SYBR[®] Green I-Technologie angewendet. Diese Methode basiert auf der Verwendung des Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I, welcher durch Interkalieren in doppelsträngige DNA fluoresziert. Bei dieser Form der qRT-PCR wird lediglich ein spezifisches Primerpaar zur Detektion eines Transkripts benötigt. Zusätzliche Sonden finden hierbei keine Anwendung. Unter Berücksichtigung bestimmter Parameter beim Primerdesign und den Reaktionsbedingungen kann auch mit dieser Methode eine hohe Spezifität erzielt werden. Beim Primerdesign ist besonders auf die Schmelztemperatur und auf mögliche Sekundärstrukturen, welche zu Primerdimerisierungen führen können, zu achten. Außerdem ist es von Vorteil, dass die Amplikons eine Exon/Exon-Grenze beinhalten, um die

Amplifikation von genomischen DNA-Verunreinigungen zu verhindern. Im Anschluss an die PCR findet eine Schmelzkurvenanalyse statt, bei der durch langsame kontinuierliche Temperaturerhöhung das doppelsträngige PCR-Produkt in seine beiden Einzelstränge geschmolzen wird, wodurch das gebundene SYBRgreen[®] freigesetzt wird und nicht mehr fluoresziert. Die Anzahl der dadurch erhaltenen *peaks* korreliert mit der Anzahl der entstandenen PCR-Produkte. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstandene Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des *peaks* der Schmelzkurve gibt zusätzlich Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde jede qRT-PCR als Dreifachbestimmung durchgeführt. Dabei kamen folgende Standardbedingungen zur Anwendung:

Master-Mix1: (Angaben pro Reaktionsansatz)

- 7,5 µL 2xPCR-Master-Mix (enthält Taq-Polymerase)
- 0,3 µL SYBRgreen[®] (Stocklösung 1:1000 in DMSO verdünnt, Lagerung bei -20°C, nach dem Auftauen nicht wieder einfrieren)
- 0,03 µL Rox (Referenzfarbstoff, Stratagene)
- 2,17 µL RNase/DNase-freies Wasser

Master-Mix2: (Angaben pro Reaktionsansatz)

- 10 µL Master-Mix1
- 0,03 µL *sense primer* (100 µM)
- 0,03 µL *antisense primer* (100 µM)

Zunächst wurde der Master-Mix1 im Überschuss für alle durchzuführenden Reaktionen hergestellt. Der Master-Mix2 wurde anschließend für jedes einzelne Primerpaar separat hergestellt, indem die entsprechende Menge Master-Mix1 mit dem jeweiligen Primern versetzt wurde. Pro Reaktion wurden zuerst 10 µL Master-Mix2 in ein *well* einer 96well-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden 5 µL der zuvor 1:5 verdünnten cDNA zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer optischen Folie versiegelt und mit dem MX3000P-Cycler von Stratagene unter Verwendung des folgenden PCR-Programms vermessen: initiale Denaturierung für 3 min bei 95°C, 50 Zyklen bestehend aus Denaturierung

(30 s bei 95°C), *annealing* (30 s bei 60°C) und Elongation (30 s bei 72°C), Schmelzkurve (55°C-95°C).

Im Anschluss an eine Schmelzkurvenanalyse wurden die Messwerte unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode ausgewertet (Livak and Schmittgen, 2001). Bei dieser relativen Quantifizierung werden die C_T -Werte (*threshold cycle*; Zykluszahl, bei der die entstandene Produktmenge einen definierten Schwellenwert erreicht) der zu quantifizierenden Transkripte zweier Populationen (z.B. Knockdown und Kontrolle) direkt unter Normalisierung auf ein Kontrollgen mit einander verglichen. Eine vorherige Quantifizierung der Absolutmengen mittels Standardkurven ist dadurch nicht mehr notwendig. Hierbei wird eine 100%ige PCR-Effizienz vorausgesetzt. Zur Auswertung wurde folgende Formel verwendet:

$$R = 2^{(-((C_{TA} - C_{TB})_x - (C_{TA} - C_{TB})_y))}$$

R - mRNA ratio
 C_{TA} - C_T -Wert Gen
 C_{TB} - C_T -Wert Kontrollgen
 x - Population
 y - Kontrollpopulation

Standardmäßig dienten in dieser Arbeit 18S rRNA und *RPLP0* als Kontrollgene der Normalisierung. Für die SIRT-Analysen wurden zusätzlich *Cyclophilin A*, *GAPDH*, *HSP27*, α -*Tubulin* sowie *Vinculin* verwendet.

2.2.3.4 SDS-PAGE und Western Blotting

Für Western Blot-Analysen wurde zunächst ein Proteinextrakt aus U2OS-Zellen mittel RIPA-Puffer hergestellt. Hierfür wurden die Zellen in RIPA-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die unlösliche Fraktion durch Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C für 10 min pelletiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Dc Protein Assay (Biorad) bestimmt. Zur elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden 10%ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet, die mit jeweils 10 μ g Proteinextrakt pro Tasche beladen wurden. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit einer *Semi-dry*-Blotapparatur (VWR) unter Verwendung des Drei-Puffer-Systems. Der Proteintransfer wurde durch PonceauS-Färbung überprüft. Nach dem Entfärben der Membran durch mehrmaliges Waschen mit TBST erfolgt die Absättigung von unspezifischen Bindestellen für mind. 1 h in einer Lösung aus 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST. Primärantikörper

wurden je nach Spezifität und Affinität in einem Bereich von 1:250 bis 1:2500 in 2,5% (w/v) BSA in TBST verdünnt (siehe 2.1.4) und für 1 h mit der Membran unter leichtem Schwenken inkubiert. Vor der Zugabe der Sekundärantikörper wurde mehrmals mit TBST gewaschen. Die Sekundärantikörper waren mit einer Peroxidase (HRP, *horse raddish peroxidase*) gekoppelt und wurden in einer Verdünnung von 1:2500 in 2,5% Magermilchpulver in TBST für 1 h mit der Membran inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBST erfolgte die chemiluminometrische Detektion unter Verwendung der ECL-, ECL *plus*- oder *advanced*-ECL-Systeme von Amersham in einem Syngene-Detektionsgerät (Syngene Bio Imaging). Die Blots wurden durch Quantifizierung der Bandenintensitäten mittels Gene-Tools (Syngene Bio Imaging) Software semiquantitativ ausgewertet.

RIPA-Puffer:

50 mM Tris pH7.4
200 mM NaCl
1% Triton X100
0,25 % Deoxycholate
1 mM EDTA
1 mM EGTA

10xTBST

100 mM Tris/HCl, pH 8
1,5 m NaCl
1% Tween 20

Probenauftragspuffer

250 mM Tris/HCl, pH 6.8
10 mM EDTA
5% SDS
50% Glycerin
0,005% Bromphenolblau
5% β -Mercaptoethanol

Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl, pH 8.8
0,4% SDS

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl, pH 6.8
0,4% SDS

5xElektrophorepuffer

25 mM Tris
250 mM Glycin
0,1% SDS

Trenngelzusammensetzung

12,5 mL Acrylamid/Bisacrylamid
7,5 mL Trenngelpuffer
9,9 mL Aqua bidest
10 μ L TEMED
100 μ L APS

Sammelgelzusammensetzung

1,3 mL Acrylamid/Bisacrylamid
2,5 mL Sammelgelpuffer
6,2 mL Aqua bidest
10 μ L TEMED
200 μ L APS

Transferpuffer 1

300 mM Tris/HCl, pH 10.4
20% Methanol

Transferpuffer 2

25 mM Tris/HCl, pH 10.4
20% Methanol

Transferpuffer 3

25 mM Tris/HCl, pH 9.4
20% Methanol
40 mM γ -Aminocaprinsäure

2.2.3.5 Ko-Immunopräzipitation von ZBP1-mRNA-Liganden

Um die spezifische Assoziation von ZBP1 mit verschiedenen mRNAs zu untersuchen, wurde endogenes ZBP1 mit monoklonalen Antikörpern präzipitiert. Die aus dem Präzipitat isolierte RNA wurde mittels semiquantitativer und quantitativer RT-PCR analysiert. Das Experiment wurde mit HEK293 und U2OS-Zellen wie folgt durchgeführt.

Zur Herstellung eines Zellextraktes aus vier konfluenten 15 cm Petrischalen wurde das Tap-Lysis-Puffersystem verwendet, welches eine fraktionierte Extraktion von Zytoplasma und Zellkernen ermöglicht. Hierfür wurden die zuvor geernteten Zellen einmal mit 10 mL Lysis I-Puffer gewaschen und bei 1500g für 5 min zentrifugiert. Der Lysis II-Puffer wurde mit 50U/mL RNasin, 100 μ M RVC (Ribonukleotid-Vanadyl-Komplexe) und Protease-Inhibitoren (nach Angaben des Herstellers) versetzt, bevor das Zellpellet in 1,5 mL resuspendiert wurde. Zur Lyse wurde die Suspension 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 15-20-mal "gedounced". Um die Zellkerne beim Pelletieren nicht zu zerstören, wurde für 5 min bei 5000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, das Pellet ein zweites Mal mit 1 mL Lysis II-Puffer wie zuvor extrahiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 5 min bei 5000g und 4°C wurden die beiden Überstände vereinigt. Ein DNase I -Verdau wurde mit 10 U/mL DNase I (RNase-frei) für 15 min auf Eis durchgeführt. Zelltrümmer wurden anschließend für 10 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frische Eppendorfgefäß überführt und mit 0,2% (v/v) Hefe-tRNA versetzt. Von dem fertigen Zellextrakt wurden 3 Proben entnommen: zweimal 100 μ L als RNA-Input, einmal 100 μ L als Protein-Input. Die Proben verblieben bis zur Aufarbeitung auf Eis.

In der Zwischenzeit wurden die in einem ZBP1-Immunsereum enthaltenen Antikörper an Protein-A *beads* gekoppelt. Hierfür wurde der Lysis II-Puffer auf 150 mM KCl unter Verwendung des Lysis III-Puffer eingestellt. 50 μ L Protein-A *beads* wurden mit Lysis II-Puffer (150 mM KCl) eingewaschen. 25 μ L Protein-A *beads* wurden zur Immobilisierung des Antikörpers mit 1 mL ZBP1-Immunsereum für 1h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Weitere 25 μ L Protein-A *beads* wurden als Kontroll-*beads* mit 1 mL DMEM/10% FCS ebenfalls für eine Stunde bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die *beads* wurden abzentrifugiert und mit Lysis II-Puffer (150 mM KCl) gewaschen. 2 mL Zellextrakt wurden mit 600 μ L Lysis III-Puffer auf 150 mM KCl eingestellt. Die ZBP1- bzw. Kontroll-*beads* wurden zur Immunopräzipitation jeweils mit 1,3 mL Zellextrakt (150 mM KCl) für 1,5 h bei 4°C unter Rotation inkubiert.

Im Anschluss wurden die *beads* dreimal mit Lysis II-Puffer (150 mM KCl) gewaschen, bevor eine Protein/RNA-Elution wie folgt durchgeführt wurde. Die *beads* wurden in 200 μ L DEPC-Wasser mit 0,2% SDS und 2% (v/v) β -Mercaptoethanol aufgenommen und für 5 min bei 70°C zur Proteinelution inkubiert. Nach dem Pelletieren der *beads* durch Zentrifugation für 30 s bei 13000 rpm wurde jeweils eine Probe von 20 μ L als Protein-IP entnommen. Um die spezifische Immunopräzipitation von ZBP1 zu überprüfen, wurden die Proben zusammen mit der Inputprobe auf ein SDS-PAGE aufgetragen und es wurde ein Western Blot gegen ZBP1 durchgeführt. Die verbliebenen *beads* wurden einem Proteinase-K-Verdau mit 4 μ L Proteinase-K für 15 min bei 55°C unter Schütteln unterzogen. Die beiden RNA-Input-Fractionen wurden nach Zugabe von 80 μ L Lysis II-Puffer (150 mM KCl) ebenfalls Proteinase-K-Verdau unterzogen. Anschließend wurden alle Proben mit jeweils 160 μ L DEPC-Wasser und 80 μ L NH₄-Acetat (7,5 M) versetzt. Die *beads* wurden für 30 s bei 13000 rpm abzentrifugiert. 400 μ L des Übersandes wurden in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und durch Zugabe von 400 μ L Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol unter Vortexen extrahiert. Zur Phasentrennung wurde für 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. 380 μ L der oberen Phase wurden in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 1 mL 99%igen Ethanol und 2 μ L Glycogen für 1 h bei -20°C gefällt. Anschließend wurde für 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 80%igem Ethanol gewaschen und in 20 μ L RNase/DNase-freiem Wasser resuspendiert.

10 μ L der RNA wurden revers transkribiert (siehe 2.2.3.2) und mittels qRT-PCR (siehe 2.2.3.3) analysiert und wie folgt unter Anwendung der $2^{-\Delta C_T}$ ausgewertet (Livak and Schmittgen, 2001):

- Die spezifische Anreicherung der ZBP1-IP (Z) bezogen auf die Kontroll-IP (C) wurde berechnet; $E1 = 2^{-(C_T^{Z-C} - C_T^C)}$
- Die spezifische Anreicherung der ZBP1-IP (Z) bezogen auf den RNA-Input (I) wurde berechnet; $E2 = 2^{-(C_T^{Z-C} - C_T^I)}$
- Die unspezifische Bindung in der Kontroll-IP (C) bezogen auf den RNA-Input (I) wurde berechnet; $E3 = 2^{-(C_T^{C-C} - C_T^I)}$
- Ein spezifischer Aufreinigungsindex F_G wurde für jedes Gen berechnet; $F_G = (E1 * E2) / E3$
- Ein normalisierter Aufreinigungsindex F wurde durch Normalisierung auf den mittleren Aufreinigungsindex aller Kontrollgene $\overline{F_G}$ berechnet; $F = F_G / \overline{F_G}$

Lysis I:	Lysis II:	Lysis III:
10 mM Hepes pH 7.2-7.6	10 mM Hepes pH 7.2-7.6	10 mM Hepes pH 7.2-7.6
10 mM KCl	3 mM MgCl ₂	3 mM MgCl ₂
5 mM MgCl ₂	10 mM KCl	0,5 M KCl
	5% Glycerol	5% Glycerol
	0,5% NP40	0,5% NP40

2.2.3.6 Mikroarray-Analysen

Für die Mikroarray-Analysen wurde je eine 10 cm Petrischale mit ZBP1 spezifischen- bzw. Kontroll-siRNAs transfiziert. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen für 2 h mit 2,5 mM Natriumarsenat gestresst und anschließend geerntet. Aus einem Teil der Zellen wurde Proteinextrakt hergestellt und ein Western Blot gegen ZBP1 und Vinculin durchgeführt, um den Knockdown auf Proteinebene zu überprüfen. Aus den restlichen Zellen wurde Gesamt-RNA mittels TRIZOL isoliert, welche anschließend mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers nachgereinigt wurde. Veränderungen des RNA-Gehaltes von *β-Aktin*, *IGF-II*, *c-myc* und *CD44* wurden mittels qRT-PCR validiert.

Die Mikroarray-Analysen wurden durch die Microarray Core Facility des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF) Leipzig (Medizinische Fakultät der Universität Leipzig) wie folgt durchgeführt: Die Beschaffenheit und Konzentration der RNA wurde mit Hilfe eines Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) unter Verwendung des LabChip Kit (Agilent Technologies) nach Angaben des Herstellers untersucht. Anschließend wurde aus 5 µg Gesamt-RNA doppelsträngige cDNA unter Verwendung der Superscript II reversen Transkriptase (Superscript II, Life Technologies, Gaithersburg, MD USA) sowie oligo dT Primern, welche eine T7 RNA *polymerase promoter site* (Genset SA, Paris, France) enthielten, generiert. Die cDNA wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und danach unter Verwendung des IVT labeling Kits (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) zu cRNA *in vitro* transkribiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels RNeasy Kit (QIAGEN) aus der cRNA entfernt. Anschließend wurde diese fragmentiert und mit dem Affymetrix GeneChip HG133 Plus 2.0 Array hybridisiert. Der Array wurde mit dem *third generation* Affymetrix GeneChipScanner 3000 ausgelesen. Die Affymetrix GeneChip Daten repräsentieren ca. 47 000 Transkripte und decken das vollständige menschliche Genom ab. Die Daten wurden durch Dr. Krohn des IZKF unter Verwendung der MAS 5.0 *software* sowie Normalisierung auf einen Inter-Array

ausgewertet. Die vollständige Liste der unter ZBP1 Knockdown am stärksten reduzierten Transkripte befindet sich im Anhang (Tab. 6.2).

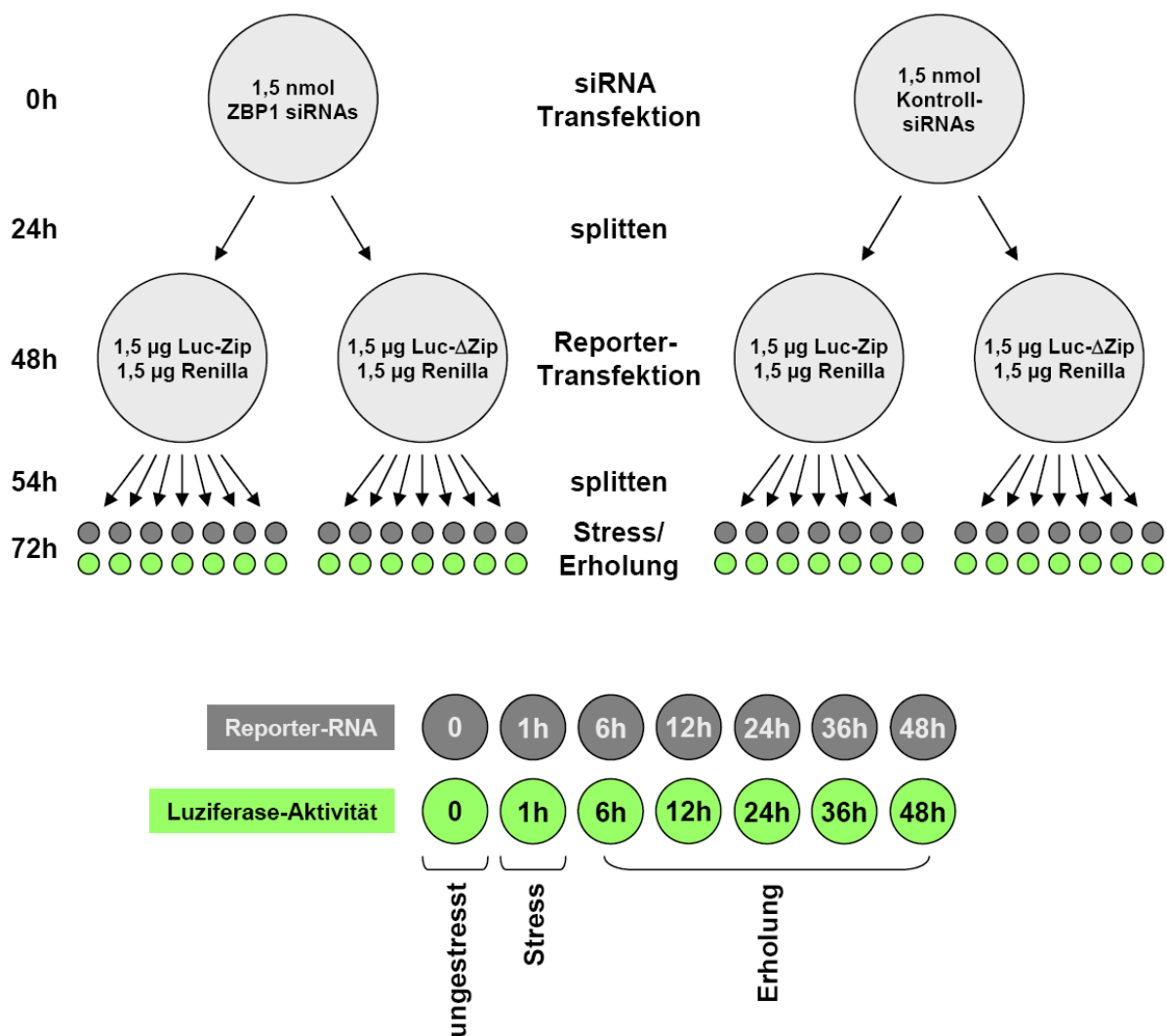
2.2.3.7 Stress-Erholungs-Assay

U2OS-Zellen wurden mit einer Zellzahl von jeweils 2×10^6 in zwei 10 cm Schalen ausgesät und am Folgetag mit ZBP1 spezifischen sowie Kontroll-siRNAs transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen zu gleichen Teilen partagiert und nach weiteren 24h mit jeweils 1,5 μg Luc-Zip-Reporter (kodiert für *firefly* Luziferase) und *renilla* Luziferase bzw. Luc- Δ Zip-Reporter (kodiert für *firefly* Luziferase) und *renilla* Luziferase erneut transfiziert. Nach weiteren 6h wurden die Zellen in 12well-Platten umgesetzt. Hierbei wurde jede der vier Population auf 14 wells aufgeteilt. 72 h nach Transfektion der siRNAs wurde aus jeweils einem well pro Population Gesamt-RNA isoliert und aus einem weiteren well die Luziferase-Aktivität der *firefly* und *renilla* Luziferase bestimmt (Nullprobe). Den übrigen wells wurde für 1 h oxidativer Stress durch Zugabe von Natriumarsenat appliziert. Nach 1 h Stress wurde erneut aus jeweils einem well pro Population Gesamt-RNA isoliert und aus einem weiteren well die Luziferase-Aktivität der *firefly* und *renilla* Luziferase bestimmt (Stressprobe). Bei den übrigen wells wurde zur Stresserholung das Kulturmedium gewechselt. Nach 6 h, 12 h, 24 h, 36 h sowie 48 h wurde aus jeweils einem well pro Population Gesamt-RNA isoliert und aus einem weiteren well die Luziferase-Aktivität der *firefly* und *renilla* Luziferase bestimmt (Erholungsproben).

Gesamt-RNA wurde wie unter 2.2.3.1 beschrieben mittels TRIZOL isoliert. Um eine Kontamination der RNA mit Reporter-Plasmid zu vermeiden, wurde die RNA einem DNase I Verdau unterzogen. Dazu wurden 5 μg Gesamt-RNA in einem Gesamtvolumen von 50 μL mit 5 μL DNase I (Promega) im entsprechenden Puffer für 30 min bei 37°C verdaut. Anschließend wurde zur Inaktivierung der DNase I 1 μL DNase-Stop-Solution (Promega) zugegeben und der Reaktionsansatz bei 70°C für 10 min inkubiert. Zusätzlich wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierfür wurde das Volumen des Reaktionsansatzes mit RNase-freiem Wasser auf 200 μL erhöht und mit 200 μL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Zur Phasentrennung wurde 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die RNA wurde mit 500 μL 99%igem Ethanol, 2 μL Glycogen und 20 μL einer 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung für 1 h bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die RNA für 10 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 100 μL

80%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µL RNase/DNase-freiem Wasser gelöst. Die reverse Transkription erfolgte wie unter 2.2.3.2 beschrieben. Zur Quantifizierung der mRNA-Mengen der Reporter wurde eine qRT-PCR durchgeführt (siehe 2.2.3.3). Die Auswertung erfolgte nach der in Abb. 2.1 dargestellten Formel, die *renilla* Transkriptmenge diente hierbei dem Transfektionsabgleich.

Für Messungen der Aktivitäten der *firefly* und *renilla* Luziferasen wurde das Dual-Glo™ Luziferase Assay Systems (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei wurde die *renilla* Luziferase als Transfektionsabgleich verwendet. Die Auswertung erfolgte nach der in Abb. 2.1 dargestellten Formel.



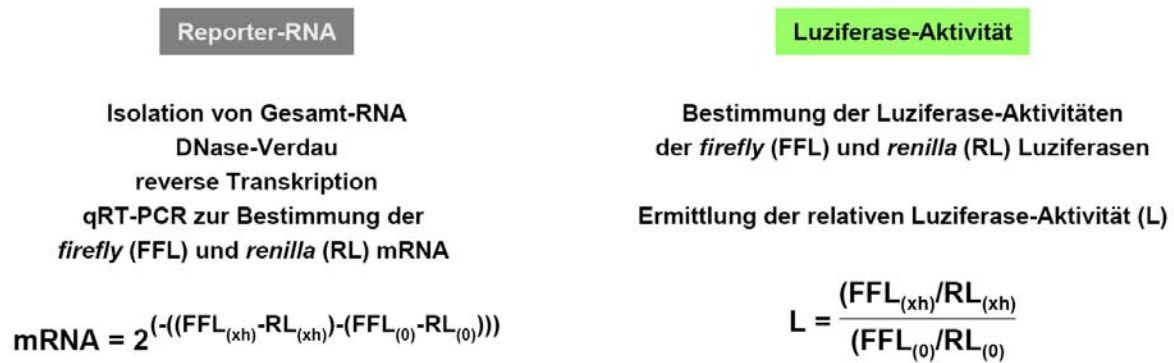


Abb. 2.1: Versuchsaufbau des Stress-Erholungs-Assays. U2OS-Zellen wurden mit ZBP1 spezifischen sowie Kontroll-siRNAs transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen zu gleichen Teilen partigiert. Nach 48 h erfolgte die Transfektion der Reporter-Plasmide. Nach weiteren 6 h wurden die Zellen auf 12well-Platten wie dargestellt umgesetzt. 72 h nach Transfektion der siRNAs wurde für 1h Natriumarsenat appliziert. Anschließend wurde zur Stresserholung das Medium gewechselt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde aus je einem well pro Population die RNA-Mengen und aus einem weiteren well die Luziferase-Aktivitäten bestimmt und nach den dargestellten Formeln ausgewertet.

2.2.3.8 Statistische Auswertungen

Soweit nicht besonders erwähnt wurden alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Quantifizierungen anhand mind. drei unabhängiger Experimente durchgeführt. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, letztere wurden als Fehlerbalken in den einzelnen Diagrammen dargestellt. Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zweier Populationen (z.B. ZBP1 Knockdown- und Kontrollpopulation) wurden die p-Werte anhand eines zweiseitigen heteroskedastischen Student' s t-Test ermittelt. Der p-Wert bezeichnet hierbei die Wahrscheinlichkeit, mit der die beiden analysierten Populationen zur Deckung zu bringen sind. Ein p-Wert von 0.05 entspricht somit einer Wahrscheinlichkeit von 5%, dass Argumente der einen Population auch in der zweiten Population enthalten sind. Die p-Werte wurden in den Diagrammen durch "*" dargestellt, hierbei bezeichnet *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.005$ sowie ***, $p \leq 0.0005$. Wurden mehr als zwei Populationen miteinander verglichen, wie es bei den SIRT-Analysen der Fall war, wurde zusätzlich ein Anova-Test durchgeführt. Anhand des Anova-Tests wurde bestimmt, ob die Einzelanalyse mittels Student' s t-Test zulässig ist. Bei einem durch Anova ermittelten p-Wert < 0.05 wurden anschließend Einzelanalysen mittels Student' s t-Test durchgeführt. Anova-Tests wurden als Box-Plots dargestellt.

2.2.4 Immunohistologische Methoden

2.2.4.1 Immunofluoreszenz

Die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen wurde mittels Immunofluoreszenzen analysiert. Hierfür wurden U2OS-Zellen in 24well-Platten auf 12 mm Deckgläschen kultiviert und ggf. transfiziert und/oder Stress appliziert. Die Fixierung der Zellen erfolgt mit 4% PFA (Paraformaldehyd) in PBS für 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS für 5 min permeabilisiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen erfolgte eine Inkubation in 1% BSA in PBS für 1 h. Daran schloss sich eine einstündige Inkubation mit den Primärantikörpern an, welche in 1% BSA in PBS verdünnt wurden (siehe 2.1.4). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit den entsprechenden Sekundärantikörpern, welche an FITC-, Cy3- oder Cy5-Fluorophore gekoppelt waren und in 1% BSA in PBS verdünnt wurden, für 1 h inkubiert (siehe 2.1.4). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt, bevor die Deckgläschen mehrmals mit PBS, zweimal mit *Aqua dest.* und zweimal mit 96%igen Ethanol zur Dehydrierung gewaschen wurden. Nach dem vollständigen Trocknen wurden die Deckgläschen unter Verwendung von Prolong-Antifade auf Objektträgern befestigt und mittels Fluoreszenzmikroskopie (TE2000 von Nikon) analysiert.

10x PBS (Phosphatgepufferte Saline), pH 7.4

A: 0,2 M Na₂HPO₄

1,3 M NaCl

B: 0,2 M NaH₂PO₄

1,3 M NaCl

Lösung **A** vorlegen und mit Lösung **B** einen pH-Wert von 7.4 einstellen

2.2.4.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Zur Visualisierung endogener mRNA wurde die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung verwendet. Hierfür wurden pro Transkript ein Gemisch aus fünf verschiedenen spezifischen DNA-Sonden verwendet, welche jeweils aus 50 Nukleotiden bestanden. Jede Sonde enthielt fünf modifizierte Thyminer, die eine Veresterung mit dem Fluorochrom Cy3 ermöglichten. Die Sonden wurden im Labor von Robert H. Singer, New York, hergestellt.

Um vor der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung eine endogene Markierung von SGs mittels Immunofluoreszenz durchführen zu können, wurde die Methode wie folgt modifiziert. Nachdem U2OS-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und der Stressbehandlung mit Natriumarsenat unterzogen wurden, wurden sie für 30 min bei Raumtemperatur mit 4% PFA in PBS fixiert. Daran schloss sich ein weiterer Fixierungsschritt mit 1% PFA in PBS über Nacht im Kühlschrank an. Am Folgetag wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 10 min mit 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Für die anschließende Antikörperfärbung wurden unspezifische Bindungen für 30 min mit 1% BSA in PBS abgesättigt. Die Inkubation mit dem anti-TIAR-Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:300 in 1% BSA in PBS für 1 h. Daran schlossen sich zwei Waschschrte mit PBS sowie die halbstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper an. Es wurde ein FITC-gekoppelter anti-Maus-IgG Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:400 in 1% BSA in PBS verwendet. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde die Antikörperfärbung in 4% PFA in PBS für 30 min fixiert, da die anschließenden Behandlung im Hochsalzpuffer mit Formamid während der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung diese sonst ablösen würde. Danach wurde zweimal mit PBS und einmal mit Hybridisierungspuffer gewaschen, bevor die Deckgläschen in Hybridisierungspuffer bei 42°C für 1 h prähybridisiert wurden. Während der Prähybridisierung wurden die Sonden wie folgt präpariert:

- Lösung 1: 160 µL Formamid, 24.5 µL DEPC-Wasser, 3.6 µL 20x SSC, 2 µL Kompetitor¹
- Lösung 2: 198 µL DEPC-Wasser, 50 µL 20x SSC, 2 µL BSA (20 mg/mL Stock in Wasser); wird auf Eis gehalten
- pro Deckgläschen (12 mm) wurden 10 ng Sonde mit 9.5 µL Lösung 1 gemischt, für 3 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gekühlt
- zu der denaturierten Sonde wurden 10 µL Lösung 2 gegeben

Die prähybridisierten Deckgläschen wurden mit jeweils 20 µL der präparierten Sonde über Kopf auf Parafilm in einer feuchten Kammer über Nacht bei 37°C hybridisiert. Am Folgetag wurden die Deckgläschen zweimal für 15 min bei 37°C mit Hybridisierungspuffer gewaschen. Daran schlossen sich zwei weitere Waschschrte mit PBS für 20-30 min bei Raumtemperatur. Nach anschließender DAPI-Färbung wurden die Deckgläschen zum Analyse, wie unter 2.2.4.1 beschrieben, auf Objektträgern fixiert.

20x SSC:

Hybridisierungspuffer (frisch hergestellt):

40 mL Formamid

12 mL 20x SSC

48 mL DEPC-Wasser

¹ **Kompetitor:** Gemisch aus gleichen Volumina 10mg/mL ssDNA (Sigma D-7656) und 10mg/mL tRNA (Roche 109541)