

Kapitel 2. Material und Methoden

2.1 Identifikation von Zebrafisch Homologen zu menschlichen Krankheitsgenen: Datenbank Konstruktion und BLAST-Suche

Um Hinweise über die Funktion der Sequenz zu bekommen, muss sie analysiert werden. Fast immer wird dabei auch nach Sequenzen gesucht, die schon bekannt oder der neuen Sequenz ähnlich sind. Dabei wird mit der neuen Sequenz eine Datenbank von bereits vorliegenden Sequenzen abgesucht. Dieser Sequenzvergleich basiert auf einem *Alignment* der zu vergleichenden Sequenzen. Darunter versteht man die Anordnung von zwei oder mehr Sequenzen, dass identische Nukleotide oder Aminosäuren untereinander stehen. Als quantitatives Maß für den Grad der Übereinstimmung zweier Sequenzen kann z.B. die Ähnlichkeit in Prozent der übereinstimmenden Positionen ausgedrückt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, einer Datenbank von humanen Krankheitsgenen (S. Hennig, persönliche Mitteilung) entsprechende Homologe einer Zebrafisch cDNA Bibliothek zuzuordnen. Um eine hohe Genauigkeit in Hinsicht auf die Homologie der Klone für die anschließende in-situ-Hybridisierung zu erreichen, sind verschiedene Strategien gewählt worden (siehe 3.), die auf einem Abgleich von Sequenzen mittels BLAST (Altschul et al. 1997) basieren.

2.2 Fischhaltung und Embryonengewinnung

Erwachsene wild-typ Zebrafische wurden von zwei Berliner Zoohandlungen bezogen (Aquaristik Reitzig und Interfish) und gemäß der Anleitung von *Westerfield* (Westerfield 1993) in 45 l Aquarien bei einer Wassertemperatur von 28 °C gehalten. Ein Liter deionisiertes Wasser wurde mit 60 mg Instant Ocean Salz versetzt. Ein Aquarium enthielt ca. 25 Fische.

Embryonen wurden von den laichenden Fischen gewonnen, indem die Eier unter einer Schicht von Murmeln in einem Plastikkasten aufgefangen wurden.

Diese wurden in EM (Embryomedium) gereinigt, in Petrischalen gelegt und bei 28 °C im Wasserbad zur weiteren Entwicklung gehalten. Embryonen, welche ein abnormes Furchungsmuster oder körnige Konsistenz der Zellen aufwiesen, wurden entfernt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Entwicklungsstufen der Embryonen wurden unter Verwendung eines Lichtmikroskops Leica MZ 8 (Leica, Deutschland) nach *Kimmel* klassifiziert (Kimmel et al. 1995). Sobald die Embryonen ein bestimmtes Entwicklungsstadium erreicht hatten, wurde die weitere Entwicklung durch Austausch des EM mit eisgekühltem 4% Paraformaldehyd in PBS gestoppt und die Embryonen über Nacht darin fixiert.

Nach der Fixierung wurde das Chorion per Hand unter Zuhilfenahme einer Watchmaker's No. 5 Pinzette (Dumont & Fils, Schweiz) entfernt. Ausnahme bildeten die 24 hpf. Embryonen, welche vor Fixation bereits dechorioniert werden.

An die Fixation schloss sich ein erster Waschschrift in PBT an, sowie 3-4 weitere in 100% Methanol. Abschließend werden die Embryonen bei -20°C mindestens über Nacht vor der weiteren Verwendung in 100% Methanol gelagert.

2.3 Anzüchtung von Klonen der cDNA Bibliothek RZPDp609

Klonierungsvektoren sind kleine Plasmide, welche extrachromosomale circuläre DNA enthalten. Sie replizieren unabhängig vom normalen Zellzyklus, so dass sie eine Anzahl von mehreren Hundert in einer einzigen Zelle erreichen können.

Klonierungsvektor der verwendeten cDNA Bibliothek RZPDp609 ist der 4109 bp lange pSPORT 1 (siehe Abb. 3 aus Sambrook et al. 1989).

Vektoren enthalten einen Replikationsursprung (engl. *origin of replication* (ori)), an welchem die Replikation starten kann, als auch ein für die Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum kodierendes Gen, z.B. Ampicillin. Das Bakterium ist somit in der Lage, in einer mit Ampicillin behandelten Kultur zu überleben.

In der Molekularbiologie ist die Koppelung zwischen diesen beiden Abschnitten auf dem Plasmid notwendige Voraussetzung, um spezifisch transfizierte Bakterienkulturen heranzuzüchten und somit ausreichende Mengen der benötigten DNA zu erhalten.

Das Bakterium, in welches das entsprechende DNA Stück geklont wurde, wird in mit Ampicillin versetzte Kultur (2 YT) gebracht und ist dort, im Gegensatz zu anderen Bakterien, in der Lage zu überleben. Diese Vorgehensweise dient dazu, Kontaminationen mit ubiquitär vorkommenden Bakterien, welche keine geklonte DNA enthalten, zu verhindern.

5 µl einer Bakteriensuspension wurden 16-24 h in einer 96-deep-well Platte in 1.5 ml Medium (2 YT) angesetzt. Um optimale Wachstumsbedingungen sicherzustellen, wird die Kultur in einer Schüttelvorrichtung in ständiger Bewegung gehalten. *E. coli*, welche das amp^r Resistenzgen enthalten, überleben, während kontaminierende Bakterien durch das Ampicillin abgetötet werden.

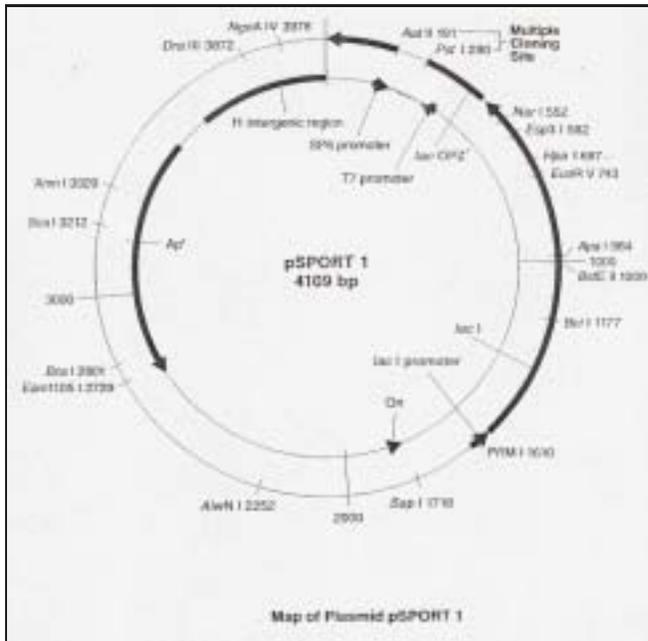


Abb. 3 Darstellung des verwendeten Plasmids der cDNA Bibliothek RZPDp609 (Grafik aus Sambrook et al.). Die *multiple cloning site* (MCS) enthält die klonierte cDNA; ApR ist der DNA Abschnitt, welcher für das Resistenzgen codiert, SP6 and T7 sind die Promotoren an den gegenüberliegenden Enden der MCS, welche die komplementäre RNA-Synthese von dem 5' oder 3' Ende erlauben

2.4 Plasmid Präparation – Minipreps und EcoR1 Verdau

Durch Minipräparation wird anschließend das Volumen an Plasmiden aus den Bakterien geerntet. Dazu werden die Kulturen bei 4000 min⁻¹ für 20 min bei 4 °C zentifugiert und der Überstand abpipettiert. Ziel ist es nun, das Plasmid aufzureinigen und die restlichen Zellbestandteile, wie z.B. Zell-DNA und -membranen zu verwerfen.

Die Minipräparation selbst wurde von der Servicegruppe des Max-Planck-Instituts durchgeführt. Die Konzentration des aufgereinigten Plasmids wurde durch Spektrophotometrie ermittelt.

Den nächsten Schritt stellt die Linearisierung des zuvor in den Vektor geklonten DNA Stückes dar, welches spezifisch ist für jeden Klon. Dazu nutzt man Endonucleasen, welche an einer bestimmten Stelle der DNA schneiden. In dieser Arbeit wurde *EcoRI* benutzt, welche direkt an der, am 5' Ende insertierten, geklonten DNA ansetzt und spezifisch schneidet.

Hierfür wurde zu 20 µl der Minipreparation 3 µl *EcoRI* (Roche Boehringer Mannheim, Deutschland), 3 µl 10x EcoR1 Puffer und 4 µl dd H₂O gegeben und 3 h verdaut, bevor die Lösung bei 4 °C über Nacht gelagert wurde. Am nächsten Tag wurde die Lösung mit 60 µl 100% Ethanol sowie 3 µl Natriumacetat pH 5.6 versetzt. Ein Zentrifugationsvorgang von 30 min bei 4000 min⁻¹ und 4 °C schloss sich an. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 100 µl 70% Ethanol erneut gewaschen und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, daraufhin das Pellet, nachdem es getrocknet war, in 0.5x TE (Tris EDTA pH8) gelöst und bei 20 °C gelagert.

Natriumacetat und Ethanol sind für die Präzipitation von DNA / RNA verantwortlich. TE enthält Trishydrochlorid, um die Lösung zu puffern und EDTA, welches die DNA gegen Abbauvorgänge schützt, indem es als Chelatbildner Mg²⁺ bindet und dadurch Nucleasen inhibiert.

2 µl der verdauten DNA in TE dienen der Verifizierung des korrekten Ausschnitts der DNA durch Gelelektrophorese (1% Agarosegel). Der Gellauf erfolgte 30 min in 1x TAE Puffer. Das Gel enthielt 0.5 mg/l Ethidiumbromid zur DNA Färbung. Die Banden wurden unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht.

2.5 Herstellung von Antisense-RNA-Sonden mittels DIG-Markierung

DIG-markierte antisense RNA Sonden wurde nach folgendem Verfahren erstellt: 1 µl der Plasmid-Minipräparation wurden 2 µl 5x Transkriptionspuffer, 1 µl DIG-RNA (Roche), 0.1µl RNAsin, 1 µl SP6 RNA Polymerase (beide Promega Mannheim Deutschland), 0.12 Units thermostabile Pyrophosphatase (New England Biolabs, UK) hinzugegeben. Aufgefüllt wurde auf 9 µl mit 3.3 µl dd H₂O (DEPC behandelt) und für 2.5 h bei 40 °C im Thermocycler

(PTC 100, MJ Research Inc., USA) inkubiert. SP6 ist der Promoter, von welchem am 3' Ende ausgehend die komplementäre RNA-Sonde zu der klonierten DNA synthetisiert wurde.

DEPC und RNAsin (RNA Inhibitor) interagieren mit ubiquitär vorhandene RNasen und verhindern so Kontamination und Abbau der RNA-Probe.

Die Präzipitation der RNA-Sonde wurde durch Zugabe von 1.25 µl 4 M Lithiumchlorid und 37.5 µl 100% Ethanol durchgeführt. Anschliessend wurde für 30 min bei 4000 min⁻¹ und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, 40 µl 70% Ethanol zugegeben, nochmalig zentrifugiert und abpipettiert, bevor das Pellet getrocknet und in 100 µl HM gelöst wurde.

2.6 Manuelle in situ Hybridisierung der whole-mount Embryonen

Für die manuell durchgeführte Hybridisierung wurden 1.5 ml Eppendorfgefässe und ein Heizblock Thermomixer Comfort (Eppendorf Hamburg, Deutschland) benutzt. Alle Reagentien wurden mit DEPC behandelt und autoklaviert.

2.6.1 Rehydratation der Embryonen

Die Embryonen wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und bei Raumtemperatur für jeweils 5 min in abnehmenden Methanol / PBT Lösungen rehydratisiert (75%, 50%, 25% Methanol in PBS). Es folgte eine abschließende Inkubation in 100% PBT über 5 min. Um die Permeabilität der Embryonalzellen zu erhöhen und somit den Sonden sowie dem Antikörper zugänglich zu machen, wurden diese mit Proteinase K behandelt. Die Inkubation mit Proteinase K erfolgt für 15 min bei einer Proteinase K Konzentration von 10 mg/l PBT. Dies ist vor allem für die 24 hpf. Embryonen notwendig, da sie bereits dickere Gewebe entwickelt haben, in deren tieferen Zellschichten eine Hybridisierung sonst nicht mehr möglich wäre. Auch für die anderen verwandten Stadien der Embryonen wurde dieses Verfahren verwendet mit Ausnahme der 6 hpf. Embryonen aufgrund deren hoher Fragilität.

Auch die Methode des Hitzeschocks durch Wasserbad bei 95 °C über 2 min wurde verwandt, allerdings nicht durch bessere Ergebnisse gerechtfertigt, so dass, mit Ausnahme der Roboterhybridisierung, erstere Methode beibehalten wurde. Embryonen, welche mit

Proteinase K behandelt worden waren, zeigten eine bessere Bindung der Sonde, sichtbar an der qualitativ besseren Antikörpervisualisierung.

Der nächste Waschschrift wurde mit 4% PFA / PBS über 20 min durchgeführt, bevor vier jeweils 5 minütige Inkubation in 100% PBT folgten um die Rehydratisierung der Embryonen zu beenden.

Die Embryonen wurden dann in 2 ml Eppendorfgefäße mit jeweils 7-10 Embryonen eines Stadiums (6,10, 14, 18, 24, hpf) transferiert.

2.6.2 Prähybridisierung

Die Hybridisierungsreaktionen basieren im wesentlichen auf dem Protokoll aus *Trends in Genetics* (Jowett et al. 1994).

Prähybridisierung wurde durch Inkubation in Hybridisierungsmix (50% Formamid ; 25% Tween-20; 0,5% tRNA; 0,1% Heparin) für 4-12 Stunden bei 65 °C durchgeführt. Dies ist essentiell, um unspezifische Bindungsreaktionen zu vermeiden. Empfohlen werden mindestens 4-6 Stunden oder mehr. Der Prähybridisierungsschritt in dieser Arbeit wurde normalerweise über Nacht durchgeführt. Aufgrund von unspezifischen Hintergrundreaktionen wurde eine Modifikation der Temperatur auf 70 °C vorgenommen, ohne jedoch grundlegend das Problem zum Positiven zu verändern.

2.6.3 Hybridisierung

Um den Hybridisierungsprozess zu starten, wurde der HM unter Beibehaltung seiner Temperatur ausgetauscht und dann 5-10 µl der markierten RNA-Sonde zugegeben. Die Embryonen wurden über Nacht bei 70 °C weiterinkubiert.

2.6.4 Posthybridisierung

Die folgenden Schritte der Posthybridisierung wurden alle mit auf 65 °C vorgewärmten Lösungen durchgeführt.

Um nichtgebundene Bestandteile der RNA-Probe aus der Lösung zu entfernen, wurde erneut für 5 min mit HM inkubiert und dann in Schritten von 10 min Dauer die HM-Lösung sukzessive in 2x SSC überführt (75%, 50%, 25%, 0% HM / 2x SSC). Abschliessend wurde 2x SSC durch 0.2x SSC ersetzt und die Embryonen bei Raumtemperatur für 25 min zur Abkühlung stengelassen.

Weitere Waschschrte überführten die 0.2x SSC Lösung in PBT. Dies erfolgte durch fünfminütigen Austausch der PBT-Lösung mit absteigendem 0.2x SSC Anteil (75%, 50%, 25%, 0% 0.2x SSC / PBT), mit abschliessendem nochmaligen Austausch der 100% PBT-Lösung.

Die Embryonen wurden dann für 3 h in Blockierlösung inkubiert.

Daraufhin wurde die Blockierlösung mit dem in einer Konzentration von 1: 5000 hinzugegebenen Phosphatase gekoppelten anti-DIG-Antikörper (Boehringer / Roche Mannheim, Deutschland), ebenfalls für 3-4 h, inkubiert.

Aufgrund von Problemen bei der Antikörperbindung und Hintergrundaufkommen wurden zu der Blockierlösung mit dem enthaltenen anti-DIG-Antikörper einige homogenisierte Embryonen gegeben, um durch "Präabsorption" unspezifische Bindungen vorher herauszufiltern und deren Auftreten bei Inkubation mit den hybridisierten Nucleotiden zu minimieren.

Sechs Waschschrte in PBT für jeweils 15 min und Austausch mit AP-Puffer mit 3 Waschschrten für jeweils 5 min erfolgten vor dem Transfer in die Färbelösung (AP-Puffer mit 4,5 ml/l NBT und 3,5 ml/l BCIP; NBT und BCIP von Boehringer / Roche Mannheim, Deutschland).

Für die Entwicklung der Färbung wurden die Embryonen in 24-well-Platten gegeben und unter Lichtabschluss durch Aluminiumfolie bei Raumtemperatur gehalten. Durch regelmäßige Überprüfung unter einem Binokularmikroskop wurde die Färbungsreaktion überwacht. Bei ausreichend starker Ausprägung eines Expressionsmuster wurde durch Austausch mit 4% PFA / PBS die Reaktion abgebrochen. Die Dauer der Farbreaktion erstreckte sich über 1 / 2 h bis ~20 h.

Nach Unterbrechung der Reaktion wurden die Embryonen einen Tag später durch langsames (tageweise) Absenken der PBS Konzentration in Glycerol überführt (50% PBS / Glycerol, dann 100% Glycerol).

2.7 Automatisierte whole-mount in situ Hybridisierung

Für das erste Screening der Klone ("prescreening") wurde ein 96-well-format InSituPro in situ Hybridisierungsroboter (Abimed, Deutschland) verwandt. Das Protokoll für diese automatisierte in-situ-Hybridisierung war gleich dem manuellen Verfahren mit folgenden Ausnahmen: Proteinase K Behandlung wurde durch einen Hitzeschock ersetzt, dem die Embryonen für 2 min in einem 95 °C Wasserbad ausgesetzt wurden. Auf das Wasserbad folgte die sofortige Abkühlung durch Schockfrierung auf Eis. Die Inkubationszeiten für die einzelnen Hybridisierungsschritte wurde auf ein Minimum von 25 min angehoben aufgrund der längeren Zeiten, welche der Roboter benötigt, um die Lösungen in allen 96 Reaktionsröhrchen auszutauschen. Auch die Konzentration der anti-DIG Antikörper wurde angehoben (1:7500), um das kleinere Reaktionsvolumen in den Röhrchen des Roboters auszugleichen. Die Färbeschritte zur Visualisierung der Antikörper wurden per Hand vorgenommen.

2.8 Photographische Dokumentation

Die Embryonen wurden in 100% Glycerol konserviert und mit einem Leica Lichtmikroskop analysiert. Lokalisierte Expressionsmuster wurden unter Zuhilfenahme eines Leica M8 Mikroskop, LSM 510 Kamera und Axiovision Software (Zeiss, Deutschland) digital gespeichert. Diese Digitalaufnahmen wurden mit dem Programm *Adobe Photoshop*[®] bearbeitet und mit Hilfe des Klassifikationssystem *InSitu Annotator* (A. Hewelt, in press) nach räumlicher Position und Entwicklungsstadium beschrieben.

Die Aufnahmen sollen in die CloneCard Datenbank des RZPD eingegeben werden.

2.9 Lösungen und Puffer

Hybridisierungsmix (HM)

55 % Formamid
5x SSC
0.1 % Tween – 20
Citric Acid (pH 6.0)
Heparin [50 mg / l]
tRNA [500 mg / l]

2x YT Medium

1.6 % Bacto- Trypton
1 % Bacto-Yeast-Extract
85 mM NaCl

AP-Puffer

100 mM Tris-HCl (pH 9.5)
100 mM NaCl
0.1 % Tween-20
50 mM MgCl₂

Färbelösung

AP-Puffer
NBT [225 mg / l]
BCIP [175 mg / l]

Blockierlösung

1x PBT
2% Schafserum
BSA [2 g / l]

1x TAE

40 mM Tris-Acetat (pH 8.0)
1 mM EDTA

1x SSC

150 mM Na Cl
15 mM Natriumcitrat

1x TE

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM EDTA