

2 Material und Methoden

2.1 Material und Bezugsquellen

2.1.1 Bakterienstämme

XL1 Blue: supE44 hsdR17 recA1endA1 gyrA46 thi relA1lac-

Tg1: supE hsdR5(rk-mk-)thi (lac-proAB)F'{traD36lacIq LacZ M15}

JM110: dam- dcm- hsdR17 supE44 thi leu rpsL lacY galK galT ara tonA thr tsx (lac-proAB) F'{tra 36 proAB+ lacIqZ M15}

GM2163: F- ara -14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx-78 supE44 galK2 galT22 hisG4 rpsL136 (StrR) xyl-5 mtl-1 thi-1 dam-13 Tn9 (CmR)* dcm-6 hsdR2 mcrA-mcrB1-

BL21(DE3): lysogen für (DE3), lacUV5/T7 RNAPol F- ompT rB-mB-

2.1.2 Vektoren

pBluescript SK II⁻ (Stratgene)

pSP64T (Melton und Krieg, 1984)

pSP64T3 (pSP64T, modifiziert von Sergei Sokol)

pSP35T (Christoph Niehrs, Heidelberg)

2.1.3 Verwendete cDNA-Klone

Xenopus XB/U Cadherin in pBluescript SK II⁻

Bovines Preprolactin in pSP35T (Christoph Niehrs, Heidelberg)

Humanes -Catenin "myc-tagged" in pBAT (Walter Birchmeier, MDC Berlin)

Xenopus Plakoglobin "HIS-tagged" in pCS2⁺ (Michael Klymkovsky, USA)

Fibronektin-Fusionskonstrukt GST-9.11 in pGEX (alle von Douglas DeSimone,

Fibronektin-Fusionskonstrukt GST-9.11.a in pGEX UVA Charlottesville,

Fibronektin-Fusionskonstrukt GST-9.11.e in pGEX VA/USA)

diverse Klone zur Whole Mount in situ Hybridisierung aus diversen Labors

2.1.4 Oligodesoxynukleotide

Die verwendeten Oligodesoxynukleotide entstammen den Firmen Gibco-BRL (Eggenstein) und Interaktiva (Ulm).

BMP-4 U:	GAGATTGTCCATTTCCCTTGGC
BMP-4 D:	TCAGTGGAAGAAGTCCAGCCG
Brachyury F:	GGATCGTTATCACCTTCG
Brachyury R:	GTGTAGTCTGTAGCTGCA
Chordin U:	CTGTACCAACCCAATCCGTGCC
Chordin D:	CTTGGTGCAACATCTGTCCCGC
Histon H4 U:	CGGGATAACATTCAGGGTATCACT
Histon H4 D:	ATCCATGGCGGTAAGTGTCTTCCT
Noggin U:	AGTTGCAGATGTGGCTCT
Noggin D:	AGTCCAAGAGTCTGAGCA
Vent-1 U:	GCATCTCCTTGGCATATTTGG
Vent-1 D:	TTCCTTCAGCATGGTTCAAC

2.1.5 Antikörper

6D5:	monoklonaler Antikörper gegen Xenopus XB/U-Cadherin
10H4:	monoklonaler Antikörper gegen Xenopus E-Cadherin (Peter Hausen, MPI für Entwicklungsbiologie Tübingen)
4H2	monoklonaler Antikörper gegen Fibronectin (Douglas DeSimone, UVA Charlottesville, VA/USA)
GAM-POD:	Dianova, Hamburg
GAM-CY3:	Dianova, Hamburg
GAM-FITC:	Hyclone, USA

2.1.6 Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme

Sämtliche Enzyme und ihre zugehörigen Puffer wurden von den Firmen AGS, Amersham (Buckinghamshire, England), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim), Gibco-BRL (Eggenstein), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), New England Biolabs (Beverly, MA/USA), Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden), Promega (Madison, USA) und Stratagene (La Jolla, CA/USA) bezogen.

2.1.7 Versuchstiere

Die Versuchstiere *Xenopus laevis* entstammen als Wild- oder Eigennachzuchten der zentralen Tierversuchsanlage der Universität Ulm.

2.1.8 Kits

Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)
Plasmid Mini Kit (Quiagen, Hilden)
Plasmid Midi Kit (Quiagen, Hilden)
Quantum Prep™ Plasmid Miniprep Kit (BioRad, Hercules, USA)
TNT® SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Madison, USA)
mCAP™ mRNA Capping Kit (Stratagene, La Jolla, USA)
RNeasy Total RNA Kit (Quiagen, Hilden)
ECL Western blotting detection reagents (Amersham, Buckinghamshire, England)

2.1.9 Radioaktivität

³⁵S Methionin, 400 Ci/mmol (Amersham, Braunschweig)
³²P dATP, 800 Ci/mmol (Amersham, Braunschweig)

2.1.10 Trägermaterialien

Nitrocellulose BA 45 (Schleicher und Schüll, Dassel)
Nylonmembran Hybond N (Amersham, Buckinghamshire, England)

2.1.11 Chromatographiematrizes

Sephadex G-50 DNA Grade Fine (Sigma, München)
Glutathion Sepharose® 4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
ProteinA-Sepharose CL4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

2.1.12 Reagenzien

Acrylamid 2x kristallisiert (Serva, Heidelberg)
Agarose Typ I low EEO (Sigma, München)
Ammoniumperoxodisulfat (Merck, Darmstadt)
Ampicillin (Sigma, München)
Aqua Phenol (Appligene-Oncor, Heidelberg)
100 Basenpaarleiter (Gibco-BRL, Eggenstein)
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- -D-galactopyranosid, X-Gal (Boehringer Mannheim)
BCIP, 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate-p-toluidine salt (Sigma, München)

Bromphenolblau (Sigma, München)
Casein Hydrolysat (Gibco-BRL, Eggenstein)
L-Cystein Hydrochlorid (Merck, Darmstadt)
DEPC, Diethylpyrocarbonat (Sigma, München)
DMSO, Dimethylsulfoxid (Sigma, München)
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure Titriplex (Merck, Darmstadt)
Elvanol, Polyvinylalkohol 25/140 (Serva, Heidelberg)
Ethidiumbromid (Sigma, München)
Fetales Lammserum (Gibco-BRL, Eggenstein)
Ficoll 400 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
Freon 113; 1,1,2-Trichlortrifluorethan (Sigma, München)
Glycerin (Merck, Darmstadt)
Guanidiniumrhodanid, Guanidiniumisothiocyanat (Fluka, Buchs, Schweiz)
HEPES, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (Serva, Heidelberg)
High Molecular Weight Marker (Sigma, München)
Humanes Choriongonadotropin (Sigma, München)
Ionenaustauscher AG 501 XS mixed bed resin, 20-50 mesh (BioRad, München)
IPTG, Isopropylthiogalactosid (Sigma, München)
-DNA (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)
L-15 Leibowitz Medium (Gibco-BRL, Eggenstein)
Low Molecular Weight Marker (Sigma, München)
Lysozym (Sigma, München)
Magermilchpulver Instant (neuform Fink, Herrenberg)
2-Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg)
N,N'-Bisacrylamid 2x kristallisiert (Serva, Heidelberg)
Natriumdodecylsulfat, SDS (Serva, Heidelberg)
NBT, 4-Nitrotetrazolium-chloridblau (Sigma, München)
Nonidet P 40, Polyoxyehtylen(9)p-t-octylphenol (Sigma, München)
Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)
Penicillin G, Na-Salz (10000 E), Streptomycin-sulfat (10000 µg/ml), (Biochrom, Berlin)
Pepstatin (Sigma, München)
Polyvinylpyrrolidon (Sigma, München)
PonceaurotS (Sigma, München)
Proteinase K (Merck, Darmstadt)
Rinderserumalbumin, BSA reinst (Serva, Heidelberg)
Select Agar (Gibco-BRL, Eggenstein)

Select Yeast Extract (Gibco-BRL, Eggenstein)
TEMED; N,N,N',N'-Tetramethylaminomethan (Merck, Darmstadt)
Tris; Tris-hydroxymethylaminomethan (Merck, Darmstadt)
Triton X-100 (Serva, Heidelberg)
Trypsin-Inhibitor aus Sojabohne (Sigma, München)
Tween 20, Polyethylensorbitanmonolaurat (Sigma, München)
Wasserstoffperoxid; Perhydrol H₂O₂ 30 % (Merck, Darmsatdt)

2.1.13 Geräte

Axiophot Mikroskop mit Epifluoreszenz- und Phasenkontrastausrüstung (Zeiss, Oberkochen)
Biofuge 17RS Kühlzentrifuge (Heraeus Sepatech, Fellbach)
Biofuge A Tischzentrifuge (Heraeus Sepatech, Fellbach)
Flachbettelektrophoresekammern (Pharmacia Freiburg; BioRad, München; Stratagene, Heidelberg)
Geltrockner 543 (BioRad, München)
GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Weiterstadt)
Hybaid Hybridisierofen (MWG-Biotech, Ebersberg)
Konfokales Laser-Mikroskop Leitz DM RBE (Leitz, Bensheim) mit Leica TCS 4D (Leica, Heidelberg)
Kühlultrazentrifuge Sorvall RC5B mit Rotoren SS34 und GSA (DuPont/NEN, Bad Homburg)
Labsonic Ultraschallgerät (B. Braun, Melsungen)
Pneumatic Pico Pump PV820 Injektionsanlage (Bachofer, Reutlingen)
Sequenzier 383A (Applied Biosystems, Inc., Weiterstadt)
Spannungsgerät 200/2.0 (BioRad, München)
Vibratom Series 1000 (Technical Products International, Inc., St.Louis, USA)

2.1.14 Sonstiges

3MM-Filterpapier (Whatman, London)
Dialyseschläuche Spectra/Por 1 (Spectrum, Houston, USA)
Ektachrome 160 Farbumkehrfilm (Kodak AG, Stuttgart)
ELISA 96-Loch Flachboden Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden)
Ilford HP5 Schwarzweißfilm (Ilford, Ltd., Moberley, GB)
Mikroinjektionsnadeln (Bachofer, Reutlingen)
Objektträger und Deckgläschen diverser Hersteller

Präparierpinzetten Nr.5

Sterilfilter Millex GS 0,22 und 0,45 µm (Millipore, Eschborn)

X-Omat AR 5 Röntgenfilm (Kodak AG, Stuttgart)

2.2 Arbeiten mit Material von *Xenopus laevis*

2.2.1 Puffer und Medien

Oocyte Culture Medium (OCM, modifiziert): 50 % Leibowitz L15 (l-Glutamin minus): 15 mM HEPES; 1mM l-Glutamin; 0,4 mg/ml BSA; 50 µg/ml Gentamycinsulfat; 50 U/ml Nystatin; 10 % Fetales Kälberserum; pH 7,8; sterilfiltriert; Lagerung bei -20°C

HCG (humanes Choriongonadotropin): 1 mg/ml in 0,5 % NaCl, sterilfiltriert

1xMBS: 10 mM HEPES; 88 mM NaCl; 1 mM KCl; 0,33 mM Ca(NO₃)₂; 0,41 mM CaCl₂; 0,82 mM MgSO₄; 2,4 mM NaHCO₃; pH 7,4

Vectashield Mounting Solution Medium for fluorescence H-1000; Vector Lab. Inc., Burlingame CA/USA

1xPBS: 0,137 M NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; DEPC-H₂O; pH 7,5; zum Blockieren werden 3 mg/ml BSA zugesetzt

60 % L15/ 1 % BSA/1:100 PenStrep: 60 % Leibowitz-Zellkulturmedium in DEPC-H₂O; 1mg/ml BSA; 1:100 Penicillin/Streptavidin; ggf. Zusatz von 20 U/ml Activin A

Daniilchik's SolutionCMF (calcium- und magnesiumfrei; modifiziert nach Shih): 53 mM NaCl; 10 mM Na₂CO₃; 4,25 mM Kaliumglukonat; 6 mM Bicin; pH 8,3 mit Bicine oder HCl; lagern in Aliquots bei -20°C

2.2.2 Induktion der Ovulation und Gewinnung von Embryonen

Geschlechtsreifen Weibchen werden je nach Größe 500-800 U HCG subkutan in den Rückenbereich injiziert. Nach der Induktion beginnt die Eiablage bei 18°C Umgebungstemperatur etwa 16 Stunden später. Die Eier werden durch Massage oder sanften Druck des Hinterleibes gewonnen. Durch mehrmalige Wiederholung dieses Vorganges lassen sich in zeitlich kurzen Abständen mehrere Ablagen eines Weibchens erhalten.

2.2.3 In vitro Fertilisation

Zur Gewinnung von Froschspermien wird ein Männchen nach 30 minütiger Ruhigstellung auf Eis dekapitiert und die Hoden entnommen. Ihre Lagerung kann für etwa zwei Wochen in OCM bei 4°C erfolgen. Ein Stück des Hodens wird in einer kleinen Petrischale mazeriert und in wenig 1xMBS suspendiert. Zur Aktivierung der Spermien wird auf 0,1xMBS mit H₂O verdünnt und die Suspension über die Eier verteilt. Nach 10 Minuten wird mit 0,1xMBS aufgefüllt. Die kortikale Rotation als Zeichen der erfolgreichen Befruchtung tritt nach ca. 30 Minuten ein. Die Entfernung der Gallerthülle erfolgt 1 h nach der Befruchtung durch 3-5 minütige Behandlung mit 2 % Cysteinchlorid in 0,1xMBS, pH 8,2. Nach wiederholtem Spülen mit 0,1xMBS, werden die Embryonen bis zu ihrer Verwendung bei adäquater Temperatur gehalten. Die Stadienbestimmung folgt dabei der Einteilung nach Nieuwkoop und Faber (1967).

2.2.4 Embryonenpflege

Der Medienwechsel insbesondere bei manipulierten Embryonen ist 1-2 Mal täglich erforderlich. Dabei sind Temperatursprünge des 0,1xMBS zu vermeiden. Die Entwicklungsgeschwindigkeit ist temperaturabhängig und kann den jeweiligen Erfordernissen des Experimentes angepaßt werden.

2.2.5 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion von Embryonen erfolgt mittels eines zeitgesteuerten Stickstoffpulses und feinst ausgezogenen Glaskapillaren. Pro Zelle werden dabei nicht mehr als 5-10 nl injiziert. Die Embryonen werden in Netzschälchen gegen Wegrollen gesichert und bleiben während und bis 2 h nach der Injektion in einer hochmolekularen 4 % Ficoll, 1xMBS-Lösung. Hierdurch wird ein Auslaufen der Embryonen verhindert und die Wundheilung gefördert. Injektionszeitpunkt und -stelle werden je nach experimentellem Ansatz ausgewählt. Die weitere Kultivierung erfolgt dann wieder in 0,1xMBS.

2.2.6 Whole Mount Blastocoeldach Immunfluoreszenzfärbung

Vor der Präparation zu manipulierende Embryonen werden zentral in die Nähe der Teilungsfurche animal in beide Blastomeren des Zweizellstadiums unterhalb des Cortex mit der entsprechenden RNA mikroinjiziert, um eine möglichst umfassende Diffusion der Transkripte im animalen Areal zu gewährleisten. Mittels feinen Pinzetten werden in

0,1xMBS ab Stadium 9,5 bis etwa Stadium 11,5 die Vitellinmembranen der Embryonen entfernt und möglichst große Kappenexplantate geschnitten. Zur Fixierung werden die Kappen in Schnappdeckelgläschen überführt und zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken (Belly Dancer) in 2 % TCA/0,1xMBS inkubiert. Nach zweimaligem Spülen für je fünf Minuten in 1xTBST, wird zwei Stunden unter leichter Bewegung in 5 % Milchpulver/1xTBST blockiert. Hierzu werden die Gläschen nur halb gefüllt. Durch wiederholtes Auffüllen mit 1xTBST, vorsichtiges Aufschütteln und Absaugen der Flüssigkeit wird mehrmals gespült. In 24-Loch-Platten wird 1xTBST vorgelegt und die Kappen nach experimentellem Ansatz getrennt in die Löcher überführt; ein Loch sollte dabei Kappen nicht injizierter Embryonen zur Kontrolle des sekundären Antikörpers enthalten. Der Primärantikörper mAb4H2 (Maus, Stamm 10 mg/ml) wird 1:10 in PBS verdünnt und sterilfiltriert (Filter 0,22). Nach erneuter 1:1000 Verdünnung in 3 % BSA/1xTBST (i.e. 1 µg/ml) werden je 250 µl zu jedem Ansatz gegeben und über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach einmaligem Spül in 1xTBST erfolgt unter mehrmaligem Wechsel der Lösung über 2-3 Stunden das Waschen der Kappen. Der Sekundärantikörper GAM-FITC (Hyclone) wird 1:100 verdünnt in 3 % Ziegenserum/1xTBST für zwei Stunden abgedunkelt bei Raumtemperatur mit den Kappen inkubiert, anschließend wird in 1xTBST gespült und zweimal 30 Minuten in 1xTBST gewaschen. Mit einem Austausch von 1xTBST gegen 50 % Glycerin sind die Embryonen für den Transfer auf die Objektträger vorbereitet. Die Überführung von jeweils fünf Kappen erfolgt in einen Tropfen "Vectashield Mounting Solution" auf einem Objektträger. Die Kappen werden unter dem Binokular mit einem Pinselhaar vorsichtig mit der Innenseite nach oben ausgerichtet. Zum Eindeckel werden lange Deckgläschen an den Ecken mit Vaselinetröpfchen versehen und unter leichtem Druck auf den Objektträgern positioniert. Es ist darauf zu achten, daß die Kappen beim Ausrichten und Eindeckeln nicht zerbrechen. Die Auswertung erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop bei zehner- oder vierzigfacher Vergrößerung. Eine Lagerung über längere Zeit ist nicht möglich.

2.2.7 Zelldissoziation animaler Kappenexplantate

Sollen die Zellen der animale Kappe vor der Präparation manipuliert werden, wird zentral in die Nähe der Teilungsfurche animal in beide Blastomeren des Zweizellstadiums unterhalb des Cortex injiziert. Die Präparation animaler Kappen erfolgt mit feinen Pinzetten im Stadium 8-9 nach manueller Entfernung der Vitellinmembran. Zur Darstellung und anschließenden Dissoziation der Kappen in Einzelzellen werden beschichtete Petrischalen (1 % Agarose in 1xDanilchik'sCMF) und ein calcium- und magnesiumfreies Medium (1xDanilchik'sCMF) verwendet. Die Dissoziation ist nach 30-60 Minuten abgeschlossen und

kann während dieser Zeit mechanisch durch Anblasen mit einer gelben Pipettenspitze unterstützt werden.

2.2.8 Adhäsionsassay

96-Loch-Flachbodenplatten werden bei 4°C über Nacht oder mindestens 2 h bei Raumtemperatur mit 50 µl Fibronectin oder Fusionsanteilen des Proteins (50 µg/ml) pro Loch beschichtet. Nach einmaligem Waschen mit 80 µl 1xPBS wird 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 80 µl 1xPBS/3 % BSA blockiert. Kontrollansätze enthalten BSA ohne Fibronectin. Nach zwei weiteren Waschgängen mit 60 % L15/1 % BSA/1:100 PenStrep wird mit 200 µl 60 % L15/1 % BSA/1:100 PenStrep/+ oder - Activin A (20 U/ml) aufgefüllt. Das Aussäen dissoziierter Zellen erfolgt unter Sichtkontrolle in einem Volumen von 10 µl mit einer gelben Pipettenspitze. Es werden die Zellen zweier Kappen pro Loch ausgesät. Man läßt bei Raumtemperatur stehen, bis Kontrollembryonen etwa das Stadium 10 erreicht haben. Durch Auszählen und/oder Fotografieren wird die Zellzahl eines ganzen Loches oder eines umgrenzten Bereiches ermittelt. Zur Abtrennung nichtadherenter Zellen werden die Löcher soweit aufgefüllt, daß ein luftblasenfreier Meniskus entsteht. Eine komplementäre Platte wird entsprechend vorbereitet und luftblasenfrei Flüssigkeit auf Flüssigkeit vorsichtig auf die Platte mit den Zellen gelegt. Beide Platte werden um 180° gedreht und nicht adherente Zellen 10-15 Minuten absinken gelassen. Die komplementäre Platte wird entfernt; die beschichtete um 180° gedreht. Die Zahl adherenter Zellen kann nun erneut ermittelt werden. Zusätzlich werden auf diese Weise Zellen erfaßt, die in Folge des Activin A-Signals eine Spreitung zeigen. Eine Fixierung der Zellen kann durch Zugabe von 1/10 Volumen 37 % Formaldehydlösung erreicht werden.

2.3 Molekularbiologische Bearbeitung von DNA

2.3.1 Medien, Puffer und Lösungen

Medien, Puffer und Lösungen für Bakterienkulturen:

LB-Medium:

1 % NaCl; 1 % Casein-Hydrolysat; 0,5 % Yeast-Extract; autoklaviert

2xTY-Medium:

0,5 % NaCl; 1,6 % Casein-Hydrolysat oder Trypton; 1 % Yeast-Extract; autoklaviert

Zur Herstellung von Agarplatten werden den Medien 1,5 % Agar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50°C können Antibiotika zur Selektion zugesetzt werden.

IPTG:

24 mg/ml in H₂O

X-Gal:

2 % in Dimethylformamid

Vorhybridisierlösung:

5xSSC; 0,1 % SDS; 5xDenhardt's, 100 µg/ml Lachssperma-DNA

Puffer und Lösungen zur Bearbeitung von DNA:

1xTE:

10 mM Tris/Cl; 1 mM EDTA; pH 7,5

50xTAE:

242 g Tris; 57,1 ml Essigsäure; 50 mM EDTA; mit H₂O ad 1 l

Ethidiumbromid:

10 mg/ml in H₂O

DNA-Probenpuffer:

30 % Glycerin; 0,25 % Bromphenolblau

Phenol:

Kommerziell erhaltenes gesättigtes Phenol wird mit den mitgelieferten Lösungen oder mit 1xTE äquilibriert. Zur Oxidationsvermeidung werden Aliquots bei -80°C eingefroren.

Lösungen zur Plasmidisolierung (Mini/Midipräp):

Lösung 1 (GET):

50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris/Cl; pH 8,0; sterilfiltriert

Lösung 2 (NaOH/SDS):

0,2 % NaOH; 1 % SDS

Lösung 3 (KAc):

60 ml 5 M KAc; 11,5 ml Essigsäure; 28,5 ml H₂O

2.3.2 Phenolextraktion von DNA

Zur Vermeidung einer Proteinkontamination bei der Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren wird die zu reinigende Probe mit 1 Volumen TE-gesättigtem Phenol/Chloroform (1:1) auf dem Vortex-Rüttler vermischt und durch Zentrifugation die Phasen getrennt. Unter Vermeidung der Interphase wird die wäßrige Phase erneut einer Chloroformextraktion unterworfen, um Spuren von Phenol zu entfernen. Zur Erhöhung der Ausbeute ist eine Reextraktion der ersten organischen Phase mit einem kleinen Volumen 1xTE oder H₂O möglich.

2.3.3 Präzipitation von DNA

Der phenolextrahierten DNA werden 0,1 Volumen 3 M NaAcetat pH 5,2 und 2,5 Volumen 96 % Ethanol zugesetzt. Nach Vermischung erfolgt die Fällung für mindestens 30 Minuten durch Stehenlassen. Durch Wahl der Fällungstemperatur kann die Ausbeute und der Salzgehalt des Präzipitats beeinflußt werden. In der Regel wurde in dieser Arbeit Fällungen bei -20°C über Nacht durchgeführt. Zur Vermeidung zu hoher Salzkonzentrationen wurde bei der Aufarbeitung von DNA mittels Ionenaustauschersäulen der Fällungsschritt mit Isopropanol bei Raumtemperatur durchgeführt. Die gefällte DNA wird durch Zentrifugation pelletiert, das erhaltene Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft oder in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 1xTE oder H₂O aufgenommen.

2.3.4 Analyse von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Der analytische Standardansatz enthält neben der gelösten DNA 10 U der Restriktionsendonuklease, 1 µl 10xInkubationspuffer und H₂O ad 10 µl. Für präparative Zwecke muß das Reaktionsvolumen entsprechend der eingesetzten DNA- und Enzymmengen erhöht werden. Die Enzymlösungen sollten dabei im Gesamtansatz mindesten 1:10 verdünnt vorliegen, um einer Hemmung der Enzymaktivität durch enthaltenes Glycerin entgegenzuwirken. Bei Doppelansätzen wird ein gemeinsames Puffersystem gewählt, ansonsten lassen sich die Reaktionen auch nacheinander ausführen. Die Reaktion erfolgt für 2

h oder über Nacht im Temperaturoptimum der Enzyme. Das Ergebnis wird durch gelelektrophoretische Auftrennung der erhaltenen DNA-Fragmente ermittelt.

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Das Standardgel enthält 1 % (w/v) Agarose in 1xTAE. Zur Auftrennung kleiner DNA-Fragmente wird der Agaroseanteil erhöht. Die Agarose wird durch Aufkochen gelöst, kurz abgekühlt, mit wenig Ethidiumbromidlösung versetzt und in die vorbereitete Gelapparatur gegossen. Die Proben werden vor dem Auftragen mit 1/5 Volumen DNA-Probenpuffer vermischt. Das enthaltene Bromphenolblau läßt auf die zurückgelegte Laufstrecke schließen (Laufverhalten entspricht etwa 500 bp DNA). Als Längenstandard dient Hind III-geschnittene -DNA. Die Banden entsprechen dabei folgenden Fragmentgrößen (und Absolutmengen aus 1 µg -DNA):

23,1 kb (0,47 µg); 9,4 kb (0,19 µg); 6,6 kb (0,136 µg); 4,6 kb (94,5 ng); 2,3 kb (47,2 ng); 2,0 kb (41,1 ng); 0,56 kb (11,5 ng); 0,12 kb (2,5 ng).

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in 1xTAE bei 50-90 Volt. Nach der Elektrophorese wird das Gel auf einem UV-Leuchttisch ausgewertet und fotografisch dokumentiert.

2.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Wieslander, 1979)

Die DNA wird in einem mit Ethidiumbromid versetzten Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Unter langwelliger UV-Strahlung (310 nm) wird vor oder hinter dem zu isolierenden Fragment eine möglichst schmale Tasche ausgeschnitten und mit 1 % (w/v) Low Melting Agarose gefüllt. Nach dem Erstarren wird die Elektrophorese unter Sichtkontrolle fortgesetzt, bis das gewünschte Fragment vollständig in die Tasche eingelaufen ist. Der Low Melting Agarose-Block wird entnommen und mit 1/10 Volumen 5 M NaCl bei 65°C aufgeschmolzen. Es wird sofort zweimal mit salzgesättigtem Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert. Nach Fällung in 2,5 Volumen 96 % Ethanol, wird das erhaltene Pellet in einem kleinen Volumen H₂O aufgenommen.

2.3.7 Dephosphorylierung freier DNA-Enden

Das enzymatisch geschnittene DNA-Fragment wird nach Phenol/Chloroform-Extraktion mit Ethanol präzipitiert und in H₂O aufgenommen. Es wird ein adäquates Volumen 1xSAP-Puffer und 0,1 Unit Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP, Amersham/USB) pro 1 µg DNA hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt im Anschluß durch eine 15 minütige Inkubation bei 65°C und Phenol/Chloroform-Extraktion.

2.3.8 "Fill in" von 5'-überhängenden Enden

Die Erzeugung glatter ("blunt") DNA-Enden erfolgt mittels des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I aus E. coli. Der Standardansatz setzt sich aus dem DNA-Fragment in 6 µl H₂O, 2 µl dNTPs (je 2 mM), 1 µl 10xKlenow-Puffer sowie 1µl Klenow DNA-Polymerase (5 U) zusammen. Es wird 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Hitzeinaktivierung für 15 min bei 65-70°C gestoppt.

2.3.9 Entfernen 3'-überhängender Enden

Zur Entfernung 3'-überhängender DNA-Enden werden das DNA-Fragment, 2 µl dNTPs (je 2mM), 1 µl 10xLigase-Puffer und 1 U T4 DNA-Polymerase mit H₂O ad 10 µl vermischt. Das für die Enzymaktivität erforderliche ATP ist bereits im Ligase-Puffer enthalten und braucht daher nicht gesondert zugesetzt zu werden. Man inkubiert 10 min bei 12°C, 30 min bei Raumtemperatur und inaktiviert das Enzym durch 10 min Erhitzen auf 75°C.

2.3.10 Ligation mit T4 DNA-Ligase

Eine äquimolare Mischung der zu ligierenden DNA-Fragmente wird 5 min bei 45°C erwärmt, um etwaige nichtkovalente Bindungen zu trennen. Sodann werden 1 µl 1xLigase-Puffer, T4-DNA-Ligase (1 Weiss-U/µl) und H₂O ad 10 µl zugegeben. Für die Ligation glatter Enden wird die Ligase unverdünnt, für die Ligation überhängender Enden 1:5 verdünnt eingesetzt. Der Kontrollansatz enthält H₂O statt DNA. Die Reaktion erfolgt bei 14°C über Nacht. Eine zweistündige Inkubation bei 37°C erfolgt mit einer geringeren Effizienz. Der Ansatz kann entweder bei -20°C gelagert oder direkt zur Transformation von 200 µl Suspension kompetenter Bakterienzellen eingesetzt werden.

2.3.11 Herstellung kompetenter E. coli-Zellen

30 ml einer log-Kultur von E. coli in geeignetem Medium ($OD_{260}:0,5$) werden 10 min bei 3000 rpm in einem sterilen Corexröhrchen abzentrifugiert und das Pellet in 15 ml 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert. Man stellt 30-60 min auf Eis, zentrifugiert erneut und resuspendiert die Bakterien in 3 ml 100 mM $CaCl_2$. Die Zellen können entweder sofort für Transformationen eingesetzt oder unter Erhöhung der Kompetenz maximal 24 h bei 4°C gelagert werden.

2.3.12 Transformation von Bakterienzellen

Die dargestellte Methode folgt der Beschreibung von Mandel und Higa (1970) und Cohen et al. (1972). Ein Aliquot des Ligationsansatzes (maximal 50 ng DNA) werden mit 200 μ l kompetenten Bakterienzellen vermischt und für 30-60 min auf Eis inkubiert. Nach 2-3 min Hitzeschock bei 42°C wird 5 min auf Eis gekühlt und mit 1,5 ml Medium, welches ein geeignetes Antibiotikum enthält, vermischt. Während einer 45 minütigen Inkubationsdauer bei 37°C erholen sich die Bakterien und exprimieren infolge des Hitzeschocks den Plasmid-Resistenzmarker Es werden 50-400 μ l Bakterienzellsuspension auf LB- oder 2xTY-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Selektion plasmidhaltiger Bakterien erfolgt über die Antibiotika enthaltende Agarschicht der platten (z.B. Ampicillin 50 mg/ml), eine Identifizierung inserthaltiger Plasmide über Blau-Weiß-Selektion mittels je 40 μ l IPTG und X-Gal. Zur Kontrolle des Antibiotikums kann zusätzlich auf eine antibiotikafreie Platte ausgestrichen werden.

2.3.13 Identifizierung rekombinanter Plasmide in Bakterienkulturen

Diese Methode nach Buluwela et al. (1989) stellt eine Alternative zum etablierten in situ-Hybridisierungsprotokoll von Grunstein und Hogness (1975) dar und ermöglicht ein schnelles Durchmustern einer großen Anzahl von Bakterienklonen. Auf Agarplatten gewachsene Bakterienklone werden durch Auflegen eines runden Nylonfilters auf diesen übertragen. Die Agarplatten müssen gegebenenfalls erneut für 2 h bei 37°C bebrütet werden, um die Kolonien wieder hochwachsen zu lassen. Die Filter werden mit den Kolonien nach oben auf Whatman No 1 Papier gelegt und von unten 2 min mit 2xSSC/5 % SDS getränkt. Die Filter werden zusammen mit dem Papier für 2,5 min in der Mikrowelle bei 600 Watt erhitzt, wobei die Bakterien lysieren, die DNA denaturiert und auf der Membran fixiert wird. Nach erneutem Befeuchten mit 5xSSC/0,1 % SDS werden die Filter in einer

Hybridisierröhre im Hybridisierofen für 30 min bei 65°C mit Vorhybridisierungspuffer behandelt; für 10 Filter werden etwa 15 ml benötigt.

2.3.14 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Zur Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden wird das Random Primers Labeling System (BRL) verwendet. Mindestens 25 ng der zu markierenden Insert-DNA als Matrize werden in einem Volumen von 20 µl 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und anschließend unverzüglich auf Eis gestellt. Es werden je 2 µl 0,5 mM dATP, dGTP und dTTP, 15 µl Random Primers Puffer, 5 µl ³²P-dCTP (50 µCi), sowie 1 µl Klenow DNA-Polymerase I zugesetzt. Die Markierungsreaktion erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur.

Der Markierungsansatz wird erneut 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und sofort zu den vorhybridisierten Filtern pipettiert. Die Hybridisierungsreaktion erfolgt für mindestens 4 h unter schwacher Rotation bei 65°C im Hybridisierofen. Die Hybridisierungslösung kann bei -30°C gelagert und mehrmals verwendet werden. Es schließen sich vier zehnmütige Waschrunde mit je 250 ml 0,1xSSC/0,1 % SDS bei 65°C an, entweder in Hybridisierröhrchen oder in einer Waschwanne im Wasserbad. Die noch feuchten Filter werden in Folie verpackt und mittels Phosphorimagersystem ausgewertet. Die Anregung der Imaging Plates erfolgt dabei innerhalb von 15-30 min in einer lichtdichten Kassette. Um die Zuordnung positiver Signale zu den Bakterienkolonien zu erleichtern, wird der Screen auf Folie ausgedruckt und mit den Kolonien auf den Agarplatten zur Deckung gebracht. Positive Kolonien werden so mittels Folienschwärzung identifiziert.

2.3.15 Anlegen von Glycerinkulturen

Zur Konservierung von Bakterienklonen werden 700 µl einer Übernachtskultur mit 300 µl Glycerin versetzt, sofort gut vermischt und bei -80°C eingefroren. Eine kurzzeitige Erwärmung des Glycerins in der Mikrowelle erleichtert dabei den Pipettiervorgang. Bei Entnahme eines Aliquots sollten die Glycerinkulturen nicht auftauen.

2.3.16 Präparation von Plasmid-DNA

2.3.16.1 Präparation im Kleinmaßstab (Minipräp) nach Birnboim und Doly (1979)

1,5 ml einer Übernachtskultur E. coli in geeignetem Medium werden aliquotiert und 5 min bei 1300 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wird restlos entfernt und das

Bakterienpellet in 100 µl GET-Puffer resuspendiert. Nach 5 min auf Eis wird die Suspension nach Zugabe von 200 µl NaOH/SDS durch mehrmaliges Schwenken vermischt. Man läßt 5 min auf Eis lysieren und neutralisiert mit 150 µl eiskalter 5M KaAc-Lösung durch sofortiges kräftiges Vortexen. Sodann wird 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, und der Überstand mit je 450 µl Phenol/Chloroform extrahiert. Zur wäßrigen Phase gibt man 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 und 2 Volumen eiskaltes 96 % Ethanol. Die Fällung erfolgt bei -20°C für 2 h oder über Nacht. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C wird das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 50 µl TE-Puffer, 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Der RNase-Verdau läuft 2 h oder, eventuell zusammen mit einem Restriktionskontrollverdau, über Nacht bei 37°C. Die Lagerung von Plasmid-DNA erfolgt bei 4°C.

2.3.16.2 Präparation im Großmaßstab (Midipräp)

Mit 1 ml einer Übernachtskultur von E. coli werden 100 ml geeignetes Medium angeimpft und erneut über Nacht in einem Schüttelinkubator wachsen gelassen. Die Bakterien werden in einem Corex-Röhrchen 5 min bei 4°C und 5000 rpm pelletiert. Der Überstand wird restlos verworfen. Das Pellet wird in 2 ml GET-Puffer durch Vortexen resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zu den Bakterien werden 4 ml NaOH/SDS gegeben, gut gemischt und 5 min auf Eis gestellt. Die Neutralisation erfolgt mit 3 ml 5 M KaAc-Lösung für 5 min auf Eis. Es wird erneut bei 11000 rpm und 4°C pelletiert und der Überstand vorsichtig mit einer Glaspipette in ein neues Corexröhrchen überführt. Bei lockerem Niederschlag kann entweder ein zweites Mal zentrifugiert oder der Überstand mit einem Faltenfilter filtriert werden. Es wird mit 9 ml Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend erneut bei 11000 rpm und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wird in ein neues Corexröhrchen überführt und 2 min mit 2 Volumen 96 % Ethanol bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wird durch eine 45 minütige Zentrifugation bei 11000 rpm und 4°C präzipitiert und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach quantitativer Entfernung des Ethanols wird das Pellet 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 150-300 µl TE-Puffer, 40 µg/ml DNase-freier RNase I gelöst. Der RNase-Verdau erfolgt über Nacht bei 37°C. Ein Aliquot kann parallel für einen Restriktionskontrollverdau eingesetzt werden. Die Lagerung von Plasmid-DNA erfolgt bei 4°C.

2.3.16.3 Präparation mit Quiagensäulen im Midi(Maxi)maßstab

Zur optimalen Ausnutzung der Säulenkapazität sollte die Kombination von "High-copy" bzw. "Low-copy"-Plasmiden und dem verwendeten Medium vor dem Ansatz abgestimmt und zur Erhöhung der Selektion auf plasmidhaltige Bakterien ein geeignetes Antibiotikum zugesetzt werden.

Aus einer einzelnen Kolonie einer Agarplatte oder einem Aliquot einer Glycerinkultur werden bei 37°C und 300 rpm 25(100) ml Übernachtskultur angezogen. Die Bakterien werden durch 15 minütige Zentrifugation bei 6000 g und 4°C geerntet und nach restloser Entfernung des Mediums in 4(10) ml Puffer 1 komplett resuspendiert. Es werden 4(10) ml Puffer 2 hinzugefügt, mehrmals vorsichtig durch Invertieren gemischt und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von eiskaltem Puffer 3 wird sofort in gleicher Weise gemischt und 15(20) min auf Eis inkubiert. Der sich bildende Niederschlag aus genomischer DNA, Proteinen, Zelltrümmern und SDS wird 30 min bei 20000 g und 4°C präzipitiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Während dieses Zentrifugationsschrittes wird die Anionenaustauschersäule mit 4(10) ml Puffer QBT equilibriert und anschließend mit dem Überstand beladen. Nach Durchlauf des Überstandes wird zweimal mit 10(30) ml Puffer QC gewaschen und die DNA sodann mit 5(15) ml Puffer QF eluiert. Die Präzipitation der DNA erfolgt durch Mischen mit 3,5(10,5) ml Isopropanol bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 15000 g und 4°C für 30 min. Die Verwendung von Isopropanol bei Raumtemperatur dient der Vermeidung eines erhöhten Salzanteils des DNA-Präzipitats. Nach Waschen des Pellets mit eiskaltem 70 % Ethanol wird an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen. Die so gewonnene DNA ist frei von RNase A, RNA und Ribonukleotiden. Die Lagerung von Plasmid-DNA erfolgt bei 4°C.

2.3.17 Sequenzierung nach der Didesoxymethode (Sanger und Coulson, 1977)

An die zu sequenzierende DNA werden fluoreszenzmarkierte Primer hybridisiert und durch DNA Polymerase verlängert. Der dabei erfolgende Einbau von 2´3´-Didesoxynukleotiden führt jeweils zum Abbruch der DNA-Synthese. Für jede der vier Nukleotide wird eine eigene Reaktion gestartet. Die Konzentration der Didesoxynukleotide ist dabei so gewählt, daß die Kettenabbrüche statistisch über mehrere hundert Basenpaare verteilt erfolgen. Die Verwendung einer thermostabilen Polymerase (Sequenase) und eines Thermocyclers erhöhen dabei die Signalstärke (Cycle-Sequenzierung). Die so erhaltenen Fragmente werden auf einem Sequenziergel aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt dabei für alle vier Ansätze in einer

Spur, da die gekoppelten Farbstoffe der einzelnen Primer bei jeweils unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren. Für die Sequenzierreaktion wird ein Kit von Amersham verwendet; die Auftrennung und Auswertung der erhaltenen Fragmente erfolgt vollautomatisch mit dem Sequencer Modell 383A von Applied Biosystems.

2.3.18 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.3.18.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Embryonen (Chomczynski und Sacci, 1987)

Es können entweder frische oder bei -80°C gelagerte Embryonen für dieses Protokoll verwendet werden. Alle Arbeitsschritte werden, soweit möglich, auf Eis durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen und Arbeitsmittel, die mit RNA in Kontakt kommen, müssen RNase-frei sein (siehe RNase-freies Arbeiten). 5 Embryonen werden in 0,5 ml Denaturierlösung mit einer blauen Pipettenspitze und einer orangefarbenen Injektionskanüle durch mehrmaliges Aufziehen resuspendiert und anschließend gevortext. Die Vermischung mit 400 μl eiskaltem Ethanol und 5 minütige Inkubation auf Eis vermindert die Kontamination mit genomischer DNA. Nach 15 min Zentrifugation bei 15000 rpm und 4°C wird das Pellet erneut in 150 μl Denaturierlösung mit einer gelben Pipettenspitze resuspendiert und nach Zugabe von 15 μl 3 M NaAc pH 5,2 mit 200 μl Phenol/Chloroform durch gründliches Vortexen extrahiert. Man läßt 10 min auf Eis stehen, zentrifugiert 10 min bei 4°C und 15000 rpm, und unterwirft den wäßrigen Überstand ohne Interphase einer erneuten Extraktion mit 200 μl Chloroform. Nach Zentrifugation wird mit 300 μl eiskaltem Isopropanol gefällt. Bei diesem Schritt eventuell mitpräzipitierende genomische DNA kann mit einer Pipette entfernt werden. Die Fällung erfolgt bei -20°C für 2 h, besser aber über Nacht. Die Nukleinsäuren werden wie oben präzipitiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, 3 min an der Luft oder im Heizblock bei 37°C getrocknet und in 25 μl DEPC- H_2O aufgenommen. Zum Lösen des Pellets kann kurzzeitig auf 70°C im Heizblock erhitzt werden. Zur Entfernung der DNA werden 4 μl 0,1 M NaAc pH 5,5, 5 μl 25 mM MgCl_2 und 1 μl RNase-freie DNase I (10 U) zugefügt und 10 min bei Raumtemperatur, dann 20 min bei 37°C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung der DNase erfolgt für 5 min bei 70°C im Heizblock. Zur Entfernung des Proteins werden 50 μl DEPC- H_2O hinzugefügt, einmal mit 80 μl Phenol/Chloroform und einmal mit 80 μl Chloroform extrahiert. Es wird erneut unter Zugabe von 3 μl NaAc pH 5,2 und 300 μl Ethanol (Raumtemperatur) gefällt und sofort 20 min bei 4°C und 15000 rpm pelletiert. Das RNA-Pellet wird kurz an der Luft getrocknet und in 30 μl DEPC- H_2O gelöst. Zur Kontrolle der RNA wird 1 μl in einer Gelelektrophorese und 1 μl in einer 1:100-Verdünnung zur Messung der Absorbtion bei 260 nm eingesetzt. Die

Bestimmung der Konzentration über die optische Dichte ist dabei nur ein ungefährender Anhaltspunkt über den Gehalt an RNA, da die aus dem DNase-Verdau erhaltenen Desoxynukleotide ebenfalls mitgemessen werden.

2.3.18.2 RT-PCR (Rupp und Weintraub, 1991)

Für die RT-PCR wird die Gesamt-RNA aus *Xenopus* Embryonen auf eine Konzentration von 0,2 µg/10 µl vorverdünnt. Für die RT-Reaktion werden davon im Standardansatz 0,5 µg eingesetzt. Zu jedem RT-Ansatz mit Reverser Transkriptase (RT+) wird ein Kontrollansatz ohne Reverse Transkriptase gefahren (RT-); sollten in der anschließenden PCR für RT-Banden erhalten werden, so sind diese auf eine Verunreinigung mit genomischer DNA zurückzuführen.

2.3.18.3 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (Random Hexamer Primed)

10 µl Gesamt-RNA (0,5 µg) werden zusammen mit 1 µl Random Hexamerprimern (0,1 µg) 4 min bei 65°C denaturiert und bis zum unmittelbaren Start der Reaktion auf Eis gestellt. In einem zweiten Reaktionsgefäß werden pro Reaktion 4 µl 5x RT-Puffer, 2 µl 10 mM DTT, 1 µl dNTP (je 10 mM), 1,3 µl DEPC-H₂O, 0,5 µl RNase-Inhibitor und 0,25 µl Reverse Transkriptase (für RT- ohne Transkriptase) vorgelegt, gemischt und zur denaturierten RNA gegeben. Die Reaktion erfolgt für 30 min bei 42°C im Heizblock. Der Ansatz kann direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

2.3.18.4 Amplifizierung von cDNA mittels PCR

Für jeden PCR-Ansatz werden 4 µl cDNA eingesetzt, d.h. aus jedem RT-Ansatz lassen sich neben der obligaten Standardprobe EF1 oder Histon H4 noch vier weitere Proben einsetzen. 4 µl der cDNA werden mit 2 µl des jeweiligen Primergemisches (1 µl 25 mM 5'-3' und 1 µl 25 mM 3'-5') versetzt und auf Eis gestellt. Der Reaktionsmix für eine Reaktion wird aus 5 µl 10xTaq-Puffer (Mg-frei), 1 µl dNTP (je 5 mM), 3,5 µl 25 mM MgCl₂, 33,5 µl DEPC-H₂O zusammenpipettiert und mit der cDNA vereinigt. Um während der Reaktion einer Verdampfung des Wassers und damit einer Verschiebung der Ionenbedingungen vorzubeugen, wird der Ansatz mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Nach 3 min Denaturierung im Thermocycler wird bei 80°C 1 µl Taq-Polymerase (1U) zugefügt (Heißstart) und die PCR-Reaktion gestartet. Je nach verwendetem Marker werden 30-40 Zyklen mit 0,5 min bei 94°C, 1 min bei 55°C und 0,5 min bei 72°C gefahren. Am Reaktionsende wird noch einmal 5

min bei 72°C inkubiert. Zur Auswertung werden von jedem PCR-Ansatz 12 µl auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard dient eine 100 bp Leiter. Das Gel wird auf einem UV-Leuchttisch über ein Videokamerasystem gelesen und auf einem Datenträger gespeichert. Bei der Auswertung geht man davon aus, daß die Bandenintensität des PCR-Produktes direkt proportional zu dem Anteil der mRNA an der Gesamt-RNA ist, vorausgesetzt die Zyklenzahl der PCR-Reaktion liegt nicht im Sättigungsbereich. Die Vergleichbarkeit bezüglich eines Markergens ergibt sich aus der in die Reaktion eingesetzten gleichen RNA-Menge und einem als Standard amplifizierten ubiquitär exprimierten Gen, dessen PCR-Produkte bei allen Ansätzen eine identische Stärke aufweisen sollten.

2.4 Molekularbiologische Bearbeitung von RNA

2.4.1 Puffer und Lösungen

RLT, RPE: Quiagen; keine Herstellerangaben

TEN:

20 mM Tris pH 7,5; 20 mM EDTA; 100 mM NaCl; DEPC-H₂O

PBS-Tween:

0,137 M NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; DEPC-H₂O; pH 7,5; 0,1 % Tween 20 (v/v)

0,1 M Triethanolamin:

5,58 g Triethanolamin in 300 ml DEPC-H₂O; 180 µl NaOH; frisch ansetzen

Hybridisierungspuffer:

50 % Formamid (v/v); 5xSSC; 1 mg/ml Torula Hefe RNA; 100 µg/ml Heparin; 1xDenhardt´s; 0,1 % Tween 20 (v/v); 0,1 % CHAPS (w/v); 5 mM EDTA; DEPC-H₂O; eine Woche bei 4°C haltbar

20xSSC:

3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat; DEPC-H₂O

50xDenhardt´s:

1 g Ficoll Typ 400; 1 g Polyvinylpyrrolidon; 1 g BSA Fraktion V; DEPC-H₂O ad 100 ml; lagerfähig bei -20°C

1xMAB:

100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; DEPC-H₂O; pH 7,5

AP-Puffer:

100 mM Tris pH 9,5; 50 mM MgCl₂-6 H₂O; 100 mM NaCl; 0,1 % Tween 20 (v/v)

1xMEMFA:

0,1 M MOPS; 10 mM EGTA; 5 mM MgSO₄; DEPC-H₂O; zur Fixierung von Embryonen werden 3,7 % (v/v) Formaldehyd frisch zugesetzt

2.4.2 RNase-freies Arbeiten

Zur Vermeidung einer Kontamination durch körpereigene RNasen werden bei allen Arbeiten Einmalhandschuhe getragen und von Zeit zu Zeit erneuert. Alle verwendeten Glaswaren werden über Nacht bei 220°C ausgeheizt, Plastikwaren soweit möglich autoklaviert oder frisch den Originalpackungen entnommen. Gelkammern werden komplett mit Gießvorrichtung und Kämmen für 30 min in 50 mM NaOH submers behandelt, anschließend ausreichend mit autoklaviertem H₂O gespült, getrocknet und bis zur Verwendung in Folie eingeschweißt. Alle verwendeten Lösungen werden mit DEPC-behandeltem H₂O angesetzt. Hierzu wird Diethylpyrocarbonat (DEPC) 1:1000 in H₂O verdünnt, über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert. Für Extraktionen verwendetes Phenol wird aliquotiert bei -80°C gelagert; dies erspart den Zusatz von Antioxidantien.

2.4.3 In vitro Transkription

Zur Darstellung von in vitro Transkripten mit mCAP-Struktur für die Mikroinjektion von Xenopus Embryonen wurde das mCAP™ mRNA Capping Kit von Stratagene verwendet. Zur Erstellung des linearisierten Templates werden 10 µg über Quiagen-Anionenaustauschersäulen aufgereinigte Plasmid-DNA mit 50-80 U des geeigneten Restriktionsenzym, 10 µl des zugehörigen 10xPuffers und H₂O ad 100 µl über Nacht bei 37°C geschnitten. Ein Aliquot des Ansatzes wird zur Kontrolle des quantitativen Verlaufs der Reaktion einer Gelelektrophorese unterworfen. Der Ansatz wird mit 1 Volumen Phenol/Chloroform extrahiert, die organische Phase erneut mit 0,5 Volumen DEPC-H₂O reextrahiert und beide wäßrigen Phasen nochmals mit Chloroform extrahiert. Nach Zugabe von 15 µl 3 M NaAc pH 5,2 wird mit 400 µl eiskaltem Ethanol bei -20°C für 2 h oder über Nacht gefällt. Das Template wird pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknung

in 20 µl DEPC-H₂O aufgenommen. 1 µl wird zur Konzentrationsbestimmung erneut auf ein Gel aufgetragen.

Pro 25 µl Reaktionsansatz werden 5 µl 5xTranskriptionspuffer, 11,5 µl DEPC-H₂O, 1 µl rNTP, 2,5 µl mCAP, 1 µl 0,75 M DTT, 1 µl RNase-Inhibitor sowie 1 µl SP6-RNA Polymerase (10 U) zu 2 µl des linearisierten Templates (1 µg) gegeben. Mit Ausnahme der Enzyme werden alle Lösungen des Kits vor dem Zusammenpipettieren auf 37°C erwärmt, um eine Fällung des Templates durch das in dem Puffer enthaltene Spermidin zu vermeiden. Die Reaktion erfolgt für 2 h bei 37°C, wobei nach 1 h erneut 1 µl Polymerase zugegeben wird. Das Template wird im Anschluß durch Zugabe von 1 µl RNase-freier DNase I (10U) und 15 min Inkubation bei 37°C entfernt.

2.4.4 Aufreinigung von in vitro Transkripten

2.4.4.1 Aufreinigung durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Der Transkriptionsansatz wird mit H₂O ad 100 µl aufgestockt und zweimal mit 100 µl Phenol/Chloroform extrahiert. Nach einer weiteren Extraktion mit einem Volumen Chloroform wird mit 15 µl 3 M NaAc pH 5,2 angesäuert und durch Zugabe von 400 µl kaltem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Es wird 30 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert und das erhaltene RNA-Pellet in 25 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt photometrisch über die Absorption bei 260 nm. Diese Methode birgt den Nachteil einer durch vorhandene Nukleotide zu höheren Werten verfälschten Konzentrationsbestimmung. Vorhandene Phenolreste erhöhen zudem die Toxizität der Transkripte im Embryo. Entsprechend mußten bis zur Verfügbarkeit der folgenden Aufreinigungsmethode zehnfach erhöhte Konzentrationswerte eingesetzt werden.

2.4.4.2 Aufreinigung über Silica Gel-Säulen

Zur Aufreinigung von in vitro Transkripten mit mCAP-Struktur wurden das RNeasy™ Total RNA Kit von Qiagen verwendet. Die selektive Bindung von RNA auf eine auf Silica Gel basierende Membran resultiert dabei in hochreinen Transkripten, die frei von Desoxynukleotiden, Oligoribonukleotiden, Phenol und Ethanol eine sehr genaue Quantifizierung erlauben und direkt für die Mikroinjektion eingesetzt werden können. Vier identische Transkriptionsansätze werden ad 100 µl vereinigt und mit 350 µl RLT-Puffer vermischt. Es werden 250 µl Ethanol zugefügt und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipettenspitze vermischt. Die Säule wird mit dem Gemisch beladen und 15 sek bei 10000

rpm zentrifugiert. In gleicher Weise wird zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Die letzte Zentrifugation wird für 2 min durchgeführt, um sämtliche im RPE-Puffer enthaltene Ethanolreste zu entfernen. Die Elution erfolgt in zwei Schritten mit jeweils 30 µl DEPC-H₂O für 1 min bei 10000 rpm in ein neues Reaktionsgefäß. Die Messung der optischen Dichte bei 260 nm einer 1:50 Verdünnung ergibt die Konzentration; eine qualitative Kontrolle der RNA erfolgt über die Gelelektrophorese.

2.4.5 Kombinierte in vitro Transkription und Translation

Diese Methode bietet die Möglichkeit, Plasmidkonstrukte auf ihre Transkribierbarkeit und Translatierbarkeit in einem Ansatz zu testen. Es wurde das Promega TNT Coupled Reticulocyte System verwendet. Für einen 12,5 µl-Ansatz werden 6,25 µl TNT-Lysat, 0,5 µl TNT Reaktionspuffer, 0,25 µl Aminosäuremix (minus Methionin), 1 µl ³⁵S-Methionin (1 Ci/mmol; 10 mCi/ml), 0,25 µl RNase-Inhibitor (10 U) und 3,5 µl DEPC-H₂O zu 0,5 µl des zirkulären DNA-Templates (0,25 µg) gegeben, vermischt und 2 h bei 30°C im Heizblock inkubiert. Als Kontrolle dient ein separater Ansatz mit einem Luciferase DNA-Konstrukt. Das erhaltene Protein kann entweder mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie analysiert oder bei -80°C gelagert werden.

2.4.6 Whole Mount in situ Hybridisierung von Xenopus Embryonen

2.4.6.1 Darstellung der Digoxigenin-markierten antisense-Probe

Das Template muß für diese Reaktion frei von RNA und RNase sein. 3'-Überhänge werden durch Behandlung mit Klenow-DNA Polymerase entfernt. Der Reaktionsansatz für die in vitro Transkription enthält neben 1 µg linearisierter Template-DNA 2 µl Boehringer Transkriptionspuffer, 2 µl 40 mM NTP-Mix (je 10 mM ATP, CTP und GTP, 6,5 mM UTP und 3,5 mM DIG-UTP), 0,5 µl RNase-Inhibitor (10 U), 1 µl der entsprechenden RNA-Polymerase (SP6, T3 oder T7) und DEPC-H₂O ad 20 µl. Nach 1 h Inkubation bei 37°C im Heizblock wird erneut Polymerase zugegeben und eine weitere Stunde inkubiert. Identische Ansätze werden vereinigt und mit 1xTranskriptionspuffer ad 100 µl aufgefüllt. Pro Transkriptionsansatz werden 2 µl RNase-freie DNase I hinzugefügt und 15 min bei 37°C inkubiert.

2.4.6.2 **Aufreinigung der Probe über Gelfiltration** (Sambrook et al., 1989)

Freies DIG-markiertes UTP oder markierte Oligoribonukleotide aus vorzeitigen Strangabbrüchen können zu einem erhöhten Hintergrund in der Hybridisierung führen. Eine alternative Aufreinigung der Transkripte durch Phenolextraktion führt unter Umständen zu einer Reaktion des Phenols mit der DIG-Markierung. Als Säulenmatrix für die Gelfiltration dient Sephadex G-50, welches Nukleotide und Oligonukleotide bis zu einer Größe von 20 bp zurückhält.

Das Säulenmaterial wird in DEPC-H₂O quellen gelassen, mehrmals gewaschen und mit TEN-Puffer equilibriert. Als Säulen dienen sterile 1ml-Einmalspritzen, die am unteren Ende mit steriler Glaswolle verschlossen und durch sukzessive Zentrifugation für 5 min bei 1600 rpm mit 0,8 ml Säulenmaterial befüllt werden. Vor dem Beladen der Säule wird einmal mit TEN-Puffer gewaschen. 100 µl der markierten RNA wird auf das Säulenmaterial gegeben und 5 min bei 1600 rpm in ein neues Reaktionsgefäß zentrifugiert. 5 µl werden für ein Kontrollgel aliquotiert. Die restliche RNA wird mit 200 µl Ethanol versetzt und auf Trockeneis oder 1 h bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 15000 rpm und 4°C wird das Pellet kurz getrocknet und in 100 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen. Die so gewonnene Probe ist bei -20°C lagerfähig.

2.4.6.3 **Hybridisierungsprotokoll**

Zur Durchführung der Hybridisierung dient ein selbst erstelltes Kammersystem mit lösungsdurchlässigen Einsätzen, welches die parallele Bearbeitung einer Vielzahl von Embryonen erlaubt. Alle aufgeführten Arbeitsschritte werden zur Erhöhung der Durchmischung bei 50-80 rpm auf einem Rotator durchgeführt. Die zu verwendenden Embryonen lagern nach Injektion und Fixierung mit 1xMEMFA/3,7 % Formaldehyd (2 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht) in Ethanol bei -20°C in 2ml Eppendorfgefäßen. Sie werden zunächst durch schrittweisen Austausch des Ethanols durch DEPC-H₂O rehydratisiert. Es folgen fünf Waschschrte in PBS-Tween. Durch 20 min Inkubation bei Raumtemperatur mit 1 µg/ml Proteinase K in PBS-Tween wird die Vitellinmembran der Embryonen permeabilisiert. Es wird zweimal 5 min mit 0,1 M Triethanolamin gewaschen und zweimal für 5 min 2,5 µl Essigsäureanhydrid pro ml Triethanolamin zugegeben. Nach zwei weiteren Waschschrten mit PBS-Tween wird 20 min mit 4 % Paraformaldehyd/PBS-Tween nachfixiert und das Fixativ durch fünfmaliges Waschen mit PBS-Tween entfernt. Während der Inkubation in 20 % Hybridisierungspuffer/80 % PBS-Tween erfolgt die Überführung der Einsätze in sterile 12 ml-Einmalröhrchen, um eine spezifische

Bearbeitung der Embryonen zu gewährleisten. Die Embryonen werden über Nacht bei 60°C im Schüttelwasserbad mit je 1 ml Hybridisierlösung vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt unter gleichen Bedingungen in 0,9 ml Hybridisierpuffer und 0,1 ml Digoxigeninmarkierter Probe. Die Probenlösung wird entfernt und kann zur mehrmaligen Verwendung bei -20°C gelagert werden. Nach 10 min bei 60°C mit 1 ml Hybridisierpuffer wird zweimal für weitere 10 min, zunächst bei 50°C dann bei 25°C, 1 ml 2xSSC hinzugegeben. Die Einsätze werden zur gemeinsamen Bearbeitung wieder in das Kammerensystem überführt und zweimal 20 min bei 37°C mit 2xSSC gewaschen. Bei unvollständigem RNase I-Verdau schließt sich optional eine Behandlung mit RNase H an, welche DNA/RNA-Hybride spaltet. Einzelsträngige nichthybridisierte RNA wird mit 20 µg/ml RNase A und 10 U/ml RNase T1 in 2xSSC bei 37°C gespalten, und die Embryonen anschließend 10 min bei Raumtemperatur mit 2xSSC und 30 min bei 60°C mit 0,2xSSC bei zunehmender Stringenz gewaschen. Man überführt zweimal 10 min bei Raumtemperatur in 1xMAB.

2.4.6.4 Antikörperinkubation

Nach 15 min Blockieren bei 25°C mit 1xMAB/0,2 % BSA/0,1 % Triton X-100 werden die Einsätze wieder in sterile Röhrchen überführt und 1 h bei 25°C mit 20 % Lammserum/1xMAB inkubiert. Die Antikörperreaktion erfolgt nach Zugabe von 100 µl 20 % Lammserum/1xMAB mit 0,5 µl Alkalische Phosphatase-gekoppeltem Antidioxigenin-Antikörper über Nacht bei 4°C. Vier Waschschritten mit 1xMAB für 1 h bei 25°C schließt sich ein weiterer bei 4°C über Nacht an.

2.4.6.5 Farbreaktion

Nach zweimaligem Spül mit AP-Puffer werden die Embryonen vorsichtig in kleine Petrischalen überführt und mit je 0,5-1 ml BM-Purple Färbereagenz unter Lichtabschluß gefärbt. Die Reaktion wird durch 1 h Nachfixage mit 1xMEMFA gestoppt, eine erhöhte Hintergrundfärbung durch Inkubation in Methanol oder Methanol-H₂O₂ (2+1 Volumenteile) vermindert. Die Embryonen können durch Behandlung mit Benzyl-Benzoat:Benzyalkohol (2:1) dursichtig gemacht und in Methanol bei 4°C gelagert werden.

2.5 Proteinbiochemische und immunchemische Methoden

2.5.1 Puffer und Lösungen

Stammlösungen und Puffer für Polyacrylamidgelelektrophoresen:

Gelkomponenten:

Sol A: 24 % Acrylamid; 0,64 % Bisacrylamid

Sol B: 1,5 M Tris pH 8,8

Sol C: 10 % (w/v) SDS

Sol D: 0,5 M Tris pH 6,8

Elektrodenpuffer:

25 mM Tris/Cl pH8,3; 192 mM Glycin; 1 % (w/v) SDS

APS: 10 % Ammoniumperoxodisulfat

SDS-Probenpuffer, reduzierend:

0,5 M Tris/Cl pH 6,8; 0,025 % Bromphenolblau oder Pyronin Y; 10 % SDS; 20 % (v/v) Glycerol; 25 % -Mercaptopropandiol

Coomassie-Färbelösung:

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 9,1 % (v/v) Eisessig; 45,4 % (v/v) Methanol

Coomassie-Entfärbelösung:

9,1 % (v/v) Eisessig; 45,4 % (v/v) Methanol

Proteinbestimmung:

Bradford-Reagenz:

0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,8 % (v/v) Ethanol; 8,5 % (v/v) Phosphorsäure; dunkel lagern und frisch filtriert verwenden

Puffer für den Western Blot:

Transferpuffer:

25 mM Tris pH 8,3; 192 mM Glycin; 10 % (v/v) Methanol

PBS/Tween:

2,6 mM KCl; 137 mM NaCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; pH 7,2; 0,1 % (v/v) Tween 20

Blockierpuffer:

10 % Magermilchpulver in PBS

Puffer für die Anreicherung von Glycoproteinen:

Extraktionspuffer:

10 mM HEPES; 150 mM NaCl; 2 mM CaCl₂; 1 % (v/v) NP-40; pH 7,4; lagern bei -20°C;
vor Gebrauch Proteaseinhibitorzugabe

NOP:

PBS mit 1 % Triton X 100; 1 % NP-40; 2 mM CaCl₂

RIPA:

10 mM Tris pH 7,5; 2 mM CaCl₂; 0,15 M NaCl; 1 % Triton X 100; 1 %
Natriumdesoxicholat; 0,1 % SDS

Low Salt:

10 mM Tris pH 7,5; 2 mM CaCl₂

High Salt:

0,5 M NaCl; 10 mM Tris pH 7,5; 2 mM CaCl₂

Puffer und Lösungen für die Immunpräzipitation:

Protein A-Sepharose:

Protein A-Sepharose CL 4B von Pharmacia zu 10 % (w/v) in IP-Puffer bei 4°C quellen
lassen; nach Zentrifugation bei 2000 rpm dreimal mit dem gleichen Volumen IP-Puffer
waschen; bei 4°C lagern

Lysepuffer:

PBS mit 0,5 % Triton X 100; 0,5 % NP-40; 2 mM CaCl_2 ; 1 mM PMSF (direkt vor der Verwendung zugeben)

IP-Puffer:

50 mM Tris/Cl pH 8,5; 2 mM CaCl_2 ; 0,5 M NaCl; 0,05 % NP-40; 0,02 % NaN_3 ; 1 mg/ml Ovalbumin; lagerfähig bei -20°C

Puffer A:

50 mM Tris/Cl; 3 M NaCl; pH 7,8-8

Puffer zur Aufreinigung von Fusionsproteinen:

PBS:

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 6,5 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,5

50 % Glutathion Sepharose 4B Suspension für 1 ml Bettvolumen:

1,33 ml 75 % Suspension 5 min bei 500 g pelletieren und Überstand entfernen; mit 10 ml kaltem PBS vermischen; zentrifugieren und Überstand entfernen; in 1 ml PBS resuspendieren; die so erhaltene 50 % Suspension hält sich bei 4°C etwa einen Monat

Glutathion-Elutionspuffer:

10 mM reduziertes Glutathion; 50 mM Tris/Cl pH 8,0; aliquotiert lagerfähig bei -20°C

100xProteaseinhibitorenstammlösung:

0,1 mM Aprotinin; 200 mM Iodacetamid; 0,2 mM Leupeptin; 100 mM N-Ethylmaleimid; 0,2 mM Pepstatin; 0,25 mM PMSF in Ethanol

2.5.2 Maßnahmen gegen proteolytischen Abbau

Endogene Proteasen stellen durch proteolytischen Abbau ein Problem bei der Proteinaufreinigung aus Embryonalgewebe dar. Die Aufarbeitungen werden daher auf Eis und in Gegenwart eines Cocktails aus verschiedenen Proteaseinhibitoren durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen werden, soweit möglich, gekühlt eingesetzt und bei -20°C gelagert.

2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen folgt dem Verfahren der diskontinuierlichen Elektrophorese nach Laemmli (1970). Es wird das Kammersystem von BioRad verwendet. Für die Herstellung mehrerer kleiner Gele ergeben sich für die Lösungen folgende Mengen:

Lösungen	Sammelgel		Trenngel	
	3 %	4,3 %	7,5 %	10 %
Gelanzahl ca.	4	4	3	3
Sol A (ml)	1,25	1,8	4,8	6,3
Sol B (ml)	- - -	- - -	3,75	3,75
Sol D (ml)	2,5	2,5	- - -	- - -
H ₂ O (ml)	6,15	5,6	6,3	4,8
Sol C (µl)	100	100	150	150
10 % APS (µl)	50	50	50	50
TEMED (µl)	50	30	25	25

Der Elektrophoreselauf der denaturierten Proben findet in Elektrophoresepuffer bei 60 V (Sammelgel) bis 140 V (Trenngel) statt.

2.5.4 Coomassie-Gelfärbung

Das Gel wird etwa 30 min bei Raumtemperatur mit Coomassie-Färbelösung unter Schwenken gefärbt, danach der überfärbte Hintergrund mit Entfärbelösung unter Sichtkontrolle entfärbt. Die Trocknung als Sandwich zwischen Whatman-Papier und Einmachfolie erfolgt unter Vakuum und Wärmeeinwirkung in einem Geltrockner. Alternativ kann das Gel in 10 % (v/v) Essigsäure bis zur weiteren Bearbeitung verbleiben. Die Nachweisgrenze für die Färbung einzelner Banden liegt bei dieser Methode bei etwa 0,5 µg.

2.5.5 Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen

Anhand in der Elektrophorese mitgelaufener Proteinstandardmischungen lassen sich die Molekulargewichte der einzelnen Proteinbanden näherungsweise bestimmen. Es werden je nach Größenbereich der aufzutrennenden Proteine unterschiedliche Mischungen verwendet. Der "High Molecular Weight"-Proteinmarker von Sigma enthält Myosin (205 kd), - Galaktosidase (116 kd), Phosphorylase b (97,4 kd), Rinderserumalbumin (66 kd),

Ovalbumin (45 kd) und Carboanhydrase (29 kd); der "Low Molecular Weight"-Marker die Größen 66, 45, 36, 29, 24, 20 und 14 kd. Für Autoradiographieanwendungen dient ein ^{14}C -markierter Standard mit 200, 97, 4, 69, 45, 30 und 14,2 kd.

2.5.6 Quantitative Proteinbestimmung

2.5.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Diese Standardmethode wird durch Pufferchemikalien oder reduzierende Stoffe kaum gestört, ist aber empfindlich gegenüber Substanzen, die in der phosphorsauren Lösung einen Niederschlag bilden können, z.B. höhere Konzentrationen von SDS oder Triton X-100. Der sich an die Proteine anlagernde Farbstoff Coomassie G 250 führt zu einer Verschiebung der Absorption von 465 nach 595 nm. Der Farbumschlag ist dabei allerdings nicht streng proportional zur Proteinmenge, sondern wird ebenfalls durch Mikroheterogenität und Aminosäurezusammensetzung des Proteins beeinflusst. Zur Auswertung wird in Dreifachbestimmung eine Eichgerade mit BSA erstellt, für die Proben werden Doppelbestimmungen vorgenommen. Der Konzentrationsbereich sollte dabei bei 1-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ liegen. Die Reaktion wird im Kleinmaßstab in 96-Loch-Platten angesetzt. Hierzu werden auf 1-10 μg BSA bzw. 5 μl Probe 200 μl Bradford-Reagenz gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vermessung der Proben geschieht automatisch in einem ELISA-Reader bei 595 nm.

2.5.6.2 Proteinbestimmung durch UV-Absorption

Die UV-Absorption bei 280 nm läßt nur eine grobe Ermittlung der Proteinkonzentration zu, ist aber gerade für die Bestimmung von Proteinen mit bereits bekanntem Absorptionsverhalten eine sehr schnelle Methode. Dieses hängt entscheidend vom Anteil aromatischer Aminosäuren im Protein ab. Die Messung wird gegen den jeweiligen Puffer als Leerwert durchgeführt. Bei den in dieser Arbeit vermessenen bakteriellen Fusionsproteinen ergibt sich erfahrungsgemäß ein Verhältnis von $1 A_{280} = 0,5 \text{ mg}/\text{ml}$.

2.5.7 Autoradiographie von SDS-Proteingelen

Das Gel wird ohne vorherige Trocknung dicht in Folie verpackt und mittels Phosphoimagersystem ausgewertet. Die Anregung der Imaging Plates erfolgt dabei innerhalb von 1 bis 48 h in einer lichtdichten Kassette. Die Abschätzung der Molekulargewichte aufgetrennter radioaktiv markierter Proteine gelingt über einen mitgelaufenen ^{14}C -

markierten Proteinstandard. Zum Erreichen einer erhöhten Auflösung kann anschließend auf Röntgenfilm für längere Zeit erneut autoradiographiert werden.

2.5.8 Aufreinigung von Fusionsproteinen

Bei dieser Methode wurde auf das Glutathion S-Transferase (GST) Gen Fusionssystem von Pharmacia zurückgegriffen. Die Aufreinigung wird dabei über eine affinitätschromatografische Bindung des GST-Fusionsproteinanteils an Glutathion Sepharose als Matrix erreicht. Das verwendete pGEX-Vektorsystem enthält neben dem durch IPTG chemisch induzierbaren taq-Promotor und einem internen lac Iq Gen zur Verwendung in beliebigen E. coli-Stämmen eine Thrombin- oder Faktor Xa-Proteaseerkennungsstelle zur Abspaltung des Proteins vom Fusionsanteil. Für die Aufarbeitung innerhalb dieser Arbeit wurde der E. coli-Stamm BL21 verwendet; auf eine Abspaltung des Fusionsanteils konnte hier verzichtet werden.

2.5.8.1 Kleinmaßstab

Der Kleinmaßstab dient der Überprüfung der Fusionsprotein-Expression pGEX-rekombinanter Bakterienklone und sollte vor einer Aufarbeitung im Großmaßstab durchgeführt werden, um die Ausbeute nicht durch die Verwendung schwach exprimierender Klone zu vermindern. 2 ml 2xTY/ 100 mg/ml Ampicillin werden mit dem entsprechenden Bakterienklon beimpft und 6 h bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl 100 mM IPTG (ad 0,1 mM Endkonzentration des Induktors) werden weitere 2 h inkubiert und die Zellen anschließend 5 sek bei 4°C und 15000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert. Das Pellet wird in 300 µl eiskaltem 1xPBS resuspendiert und ein Aliquot von 10 µl für ein SDS-Gel abgenommen. Durch 10 sek Ultraschallbehandlung mit einem Sonikator (Schaumbildung vermeiden) werden die Zellen aufgebrochen und die Zelltrümmer im Anschluß 5 min bei 4°C und 15000 rpm pelletiert. Dem Pellet wird ein 10 µl Aliquot für die Elektrophorese entnommen und der Überstand mit 20 µl 50 % Glutathion Sepharose 4B 5 min bei mäßiger Durchmischung inkubiert. Die Sepharose wird dreimal mit je 100 µl PBS durch kurzes Vortexen und 5 sek Zentrifugation in der Tischzentrifuge gewaschen und anschließend in 10 µl Glutathion-Elutionspuffer resuspendiert. Nach 5 min Inkubation wird 5 min zentrifugiert und der Überstand in neues Reaktionsgefäß überführt. 10 ml des Überstandes werden in die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt.

2.5.8.2 Großmaßstab

Aus einer 20 ml Vorkultur des Bakterienklones werden 400 ml 2xTY/100 mg/ml Ampicillin angeimpft und bei 37°C und 260 rpm über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl 100 mM IPTG wird erneut 6 h inkubiert, sodann 10 min bei 7700 g und 4°C (Sorvall GSA: 8500 rpm) zentrifugiert. Das Pellet wird auf Eis in 20 ml eiskaltem PBS resuspendiert und in 50 ml PPN-Röhrchen überführt. Es schließt sich eine Ultraschallbehandlung mit jeweils kurzen Pulsen an, um Schaumbildung und Erwärmung zu vermeiden. Nach Zugabe von 1 ml Triton X-100 wird 30 min bei 4°C gemischt und die Zelltrümmer in Corex-Röhrchen 10 min bei 12000 g und 4°C (Sorvall SS34: 11200 rpm) pelletiert. Der Überstand wird mit 0,5 ml 50 % Glutathion Sepharose Suspension in einem 50 ml PPN-Röhrchen bei Raumtemperatur 30 min gemischt und bei 500 g 5 min zentrifugiert. Die Sepharose wird dreimal mit 2,5 ml PBS gewaschen und mit 250 µl Glutathion-Elutionspuffer 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß abgenommen, und der Vorgang noch dreimal wiederholt. Alle vier Fraktionen werden im Anschluß vereinigt.

2.5.9 Schlauchdialyse

Die Dialyseschläuche mit einer Ausschlußgröße von 6-8 kD werden nach ausreichender Behandlung in H₂O mit den einzuengenden Proteinlösungen befüllt und gegen ein tausendfaches Volumen PBS bei 4°C zunächst 3 h, dann nach Wechseln des Lösemittels weitere 12 h dialysiert. Diese klassische Methode minimiert gegenüber den Zentrifugenmikrokonzentratoren die Gefahr des plötzlichen Ausfallens des Proteins.

2.5.10 In vivo Markierung von Proteinen mit ³⁵S-Methionin

Zur in vivo Markierung von Proteinen aus exogener RNA wird eine Mischung von RNA und ³⁵S-Methionin in beide Blastomeren des Zweizellstadiums koinjiziert. Bei Verwendung von DNA statt RNA wird diese zunächst in beide Blastomeren des Zweizellstadiums und ³⁵S-Methionin später im Stadium 8,5 (MBT) injiziert. Es wird ³⁵S-Methionin der Firma Amersham verwendet (in vivo cell labelling grade, # SJ 1015, 37 MBeq, 1 mCi). Um eine möglichst hohe Aktivität in der injizierten Probe zu erhalten wird die zu injizierende RNA direkt in der Methioninlösung verdünnt. Für die Koinjektion von XB/U e349-RNA und ³⁵S-Methionin ergaben sich entsprechend 0,2 ng RNA und 89,13 nCi pro 10 nl. Zum Nachweis der Translation exogen applizierter RNA werden bis 20 nl pro Blastomere mikroinjiziert.

2.5.11 Aufreinigung von Proteinen aus Embryonenlysaten

Diese Methode folgt der Beschreibung von Choi und Gumbiner (1989). Sie bietet zwar keine saubere, aber dafür eine schnelle Aufarbeitung zur Expressionsanalyse.

1-10 Embryonen werden in 40 µl Extraktionspuffer durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer gelben Pipettenspitze homogenisiert und die Zelltrümmer 25 min bei 4°C und 13000 rpm pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig, ohne die obere Lipidphase, in ein neues Gefäß überführt und direkt in die Gelelektrophorese eingesetzt. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

2.5.12 Aufreinigung von Glykoproteinen mit Con A-Sepharose

Das der Schwertbohne entstammende Lektin Concanavalin A (Con A) bindet spezifisch Mannose-, Glucose- und N-Acetylglucosaminreste in Oligosacchariden. Durch Inkubation von Proteinextrakten mit sepharosegebundenem Con A lassen sich glycosylierte Proteine abtrennen.

20 Embryonen werden in 200 µl NOP-Puffer/Proteaseinhibitormix durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer gelben Pipettenspitze und einer grauen Injektionskanüle homogenisiert. Es wird anschließend bei 4°C im Vortexaufsatz kräftig geschüttelt und die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt. Dotteranteile werden durch einmalige Freonextraktion entfernt. Der Überstand wird mit 40 µl gepufferter Con A Sepharose-Suspension 90 min bei 4°C und leichter Durchmischung inkubiert. nach dreimaligem Waschen mit RIPA-Puffer und je einmal mit High Salt und Low Salt werden die Proteine durch Zugabe von Probenpuffer und Erhitzen auf 95°C von der Sepharose abgetrennt. Der Ansatz wird direkt in die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt.

2.5.13 Immunpräzipitation von Proteinen

Bakterielles Protein A bindet an Fc-Termini von Antikörpern. Protein A-gekoppelte Sepharose erlaubt daher nicht nur die Isolierung von Antikörpern, sondern auch von Antigen-Antikörper-Komplexen.

30 Embryonen werden in 150 µl Lysepuffer mit einer gelben Pipettenspitze durch mehrmaliges Auf- und Abziehen homogenisiert. Es wird 20 min bei 4°C auf einem Vortexaufsatz geschüttelt, 10 min bei 4°C ruhen gelassen und die Zelltrümmer durch 5 min Zentrifugation bei 15000 rpm und 4°C abgetrennt. Der Überstand wird mit einem Volumen Freon extrahiert und 150 µl der wäßrigen Phase mit 30 µl Protein A Sepharose-Suspension 15 min bei 4°C gemischt. Nach anschließender Sedimentation bei 3000 rpm, wird der

Überstand mit 10-15 µl Antikörperlösung 45 min bei 4°C auf dem Rüttler inkubiert, danach 15 min stehen gelassen. Der Ansatz wird erneut mit 50 µl Protein A Sepharose 30 min bei 4°C im Rüttler inkubiert, die Sepharose bei 3000 rpm kurz pelletiert und dreimal mit IP-Puffer gewaschen. Vor dem dritten Waschgang wird das Sediment in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die gewaschene Sepharose wird mit 6 µl 5xProbenpuffer für 5 min bei 95°C erhitzt. Durch kurzes Öffnen und anschließende Inkubation auf Eis entsteht ein leichter Unterdruck. Das Eppendorfggefäß wird unten punktiert, und die Probe bei 10000 rpm in ein neues Gefäß eluiert. Das gesamte Eluat wird in die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt.

2.5.14 Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose

Zur Erhöhung der Effektivität kann der verwendete Antikörper bereits vor dem Einsatz in der Immunpräzipitation an Protein A-Sepharose gekoppelt werden.

Die Lösung mit 2-5 mg des Antikörpers wird mit 0,17 g/ml NaCl auf 3 M eingestellt. Der pH sollte bei 8 liegen, andernfalls muß er eingestellt werden. 1 ml Protein A Sepharose-Suspension werden zweimal mit Puffer A equilibriert und anschließend mit dem Antikörper für mindestens 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert. Nach Sedimentation bei 2500 rpm wird dreimal mit Puffer A gewaschen. Der Antikörperüberstand kann mehrmals verwendet werden. Die kurzzeitige Lagerung der Antikörper-gekoppelten Sepharose erfolgt bei 4°C.

2.5.15 Western Blot Analyse

Das auf Towbin et al. (1979) zurückgehende Verfahren erlaubt die Identifizierung bestimmter Proteinantigene in komplexen Gemischen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung werden die Proteine durch ein angelegtes elektrisches Feld vom Gel auf eine Nylonmembran transferiert. Der Absättigung proteinarmer Stellen auf der Membran folgt die Inkubation mit spezifischen primären Antikörpern. Die Detektion erfolgt mittels enzymgekoppelter sekundärer Antikörper durch eine katalysierte Farbstoffreaktion oder Lumineszenz.

2.5.15.1 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen

Je Gel werden vier Whatman-Papiere und ein Nitrocellulosefilter auf wenig mehr als Trenngelgröße zurechtgeschnitten und zusammen mit dem Gel und zwei Faserpolstern in

Transferpuffer getaucht. Die Blotapparatur wird wie folgt naß und ohne eingeschlossene Luftblasen zusammengesetzt:

Kathode

Faserpolster

2 x Whatman-Papier 7,5 X 9,5 cm

Trenngel (Ecke als Orientierungshilfe entfernen)

2 x Whatman-Papier 7,5 X 9,5 cm

Luftblasen entfernen

Nitrocellulosemembran 7 X 9 cm

Faserpolster

Anode

Der Transfer der negativ geladenen Proteine erfolgt in einer Tankblotkammer in Transferpuffer bei 111 V für etwa 90 min. Durch reversible Färbung der Proteine mit Ponceau S lassen sich die Positionen von Markerbanden und Gelspuren identifizieren. Der Blot wird in PBS/Tween entfärbt.

2.5.15.2 Immunfärbung

Freie Proteinbindungsstellen werden durch 20 min Blockieren mit Magermilch abgesättigt, und der Blot 30 sek in PBS/Tween gewaschen. Doppelt eingeschweißt inkubiert der Blot bei 4°C über Nacht auf der Drehscheibe mit 3-5 ml des primären Antikörpers (z.B. affinitätsgereinigter mAb6D5 1 µg/ml i.e. 1:500 in PBS). In der Schale wird dreimal 10 min mit PBS/Tween gewaschen und anschließend 2 h bei Raumtemperatur erneut mit einem sekundären Antikörper-Konjugat inkubiert (z.B. GAM-POD 1:20000 in PBS). Es wird dreimal 10 min mit PBS/Tween gewaschen und kurz in H₂O geschwenkt.

2.5.15.3 Immundetektion mittels Chemilumineszenz

Zum Nachweis von Meerrettich-Peroxidase-Konjugaten wurde das Lumineszenzsystem ECL von Amersham verwendet. Der feuchte Nitrocellulosefilter wird in einer 1:1-Mischung der Reaktionslösungen 1 min geschwenkt, unverzüglich in Folie verpackt und zur Detektion des entstehenden Lumineszenzsignals ein Röntgenfilm aufgelegt (Kodak XOMAT-AR). Die Belichtungszeiten liegen zwischen 1-45 min; allerdings nimmt die Chemilumineszenz bereits nach 1 min stetig ab.

2.6 Histologische Techniken

2.6.1 Puffer und Lösungen

APBS:

103 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,15 mM KH_2PO_4 ; 0,7 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,5

APBS/ CaCl_2 :

2 mM CaCl_2 in APBS

APBS/ CaCl_2 /PFA:

3 % (w/v) Paraformaldehyd in APBS/ CaCl_2 ; bei 60°C lösen; lagerfähig bei -20°C

APBS/ CaCl_2 /Triton:

0,1 % Triton X-100 in APBS/ CaCl_2

APBS/ CaCl_2 /Triton/BSA:

1 % (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) in APBS/ CaCl_2 /Triton; lagerfähig bei -20°C

Elvanol:

3 g Elvanol (Polyvinylalkohol 25/140, FP 80000) werden 16 h bei Raumtemperatur unter Rühren in 40 ml PBS gelöst, 15 ml konzentriertem Glycerol zugegeben und weitere 16 h gerührt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 12000 rpm wird 1,2-Phenylendiamin zu einer Konzentration von 1 mg/ml unter Lichtausschluß gelöst, und die Lösung auf pH 8,0 eingestellt. Durch schrittweise Zugabe von -Mercaptoethanol wird die Lösung klar und kann aliquotiert werden. Die Lagerung ist bei -20°C bis zu 8 Monaten möglich.

2.6.2 Fixieren von Embryonen

Zur Fixierung für die Antikörperfärbung ganzer Embryonen wird zunächst die Vitellinmembran früher Stadien mechanisch entfernt. Spätere Embryonalstadien werden vor dem Fixiervorgang mit MS 222 betäubt. Die Embryonen werden 1 h bei Raumtemperatur in APBS/ CaCl_2 /PFA unter leichter Bewegung in Petrischälchen fixiert. Alternativ zu einer direkten Weiterbearbeitung können die Embryonen nach folgender Prozedur bei -20°C gelagert werden: nach Überführen in APBS/ CaCl_2 wird fünfmal ein Drittel Volumen durch Ethanol ersetzt und jeweils 10 min geschwenkt. Sodann wird komplett in Ethanol überführt. Zur Weiterverarbeitung wird fünfmal ein Drittel Volumen durch APBS/ CaCl_2 /Triton

ersetzt, jeweils 10 min geschwenkt und anschließend komplett in APBS/CaCl₂/Triton überführt.

2.6.3 Immunhistologische Färbung ganzer Embryonen

Die Embryonen werden zunächst 1 h in der Schale, dann eine weitere Stunde in 2 ml-Eppendorfgefäßen mit APBS/CaCl₂/Triton gespült. Nach 1 h Blockieren mit APBS/CaCl₂/Triton/BSA bei Raumtemperatur erfolgt die Inkubation mit 400 µl primärem Antikörper (z.B. Zellkulturüberstand 6D5) über Nacht bei 4°C unter stetiger Durchmischung. Die Antikörperlösung wird abgenommen und kann zur mehrmaligen Verwendung bis -20°C gelagert werden. Die Embryonen werden 2 h, bei Inkubation des sekundären Antikörper-Konjugates über Nacht den gesamten Vortag, mit APBS/CaCl₂/Triton gespült, wobei die Lösung stündlich gewechselt wird. Es folgt ein finaler Spül mit APBS/CaCl₂ für 1 h. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (z.B. GAM-CY3 1:400 in APBS/CaCl₂) erfolgt für 4-5 h bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4°C. Unter gleichen Bedingungen erfolgt ein Spül mit APBS/CaCl₂/Triton unter mehrmaligem Lösungswechsel. Es wird 30 min bei Raumtemperatur nachfixiert, 1 h in APBS/CaCl₂ gewaschen. Die Embryonen können direkt zur Einbettung verwendet oder nach aufsteigender Ethanolreihe in Ethanol überführt und bei 4°C gelagert werden. Gelagerte Embryonen werden vor ihrer weiteren Verwendung durch eine absteigende Ethanolreihe wieder in APBS/CaCl₂ überführt.

2.6.4 Einbetten und Schneiden von Embryonen in Agarose

Kleine Schiffchen aus Aluminiumfolie werden mit aufgeschmolzener Agarose befüllt (1,5 % in APBS/CaCl₂). Die Viskosität sollte dabei so gewählt werden, daß die Embryonen nach dem Eintrag nicht ganz zu Boden sinken, auf der anderen Seite aber mit einer Präpariernadel noch rechtwinklig ausgerichtet werden können. Der bei 4°C auspolymerisierte Agaroseblock wird mit einem Skalpell zurechtgeschnitten und mit Sekundenkleber auf einem Schneidblock fixiert. Die Schnitte werden submers in H₂O mit einem Vibratom zu einer Stärke von 50 µm geschnitten, mit einem dünnen Pinsel aufgefangen und auf wasserbeschichtete silanisierte Objektträger übertragen. Nach Ausrichtung der Schnitte unter einem Binokular wird das Wasser vorsichtig entfernt und durch einige Tropfen Elvanol ersetzt. Das Eindeckeln erfolgt durch luftblasenfreies Auflegen eines Deckgläschens. Überschüssiges Elvanol wird mit einem Filterpapier abgesogen, und die Präparate bei Raumtemperatur leicht getrocknet.

2.6.5 Einbetten und Schneiden von Embryonen in Paraffin

Für die Anfertigung histologischer Färbungen werden die Embryonen in 3 % PFA/2,5 % Glutaraldehyd/APBS/CaCl₂ fixiert und anschließend in APBS/CaCl₂ gespült. Es wird je 30 min in Ethanol; Xylol/Ethanol 1:1 und in Xylol überführt. Nach Erwärmen auf 60°C wird schrittweise Paraffin zugegeben. Je 1 h wird in Xylol/Paraffin 1:1 und 1:2 inkubiert, bevor komplett auf Paraffin umgestellt wird. Nach mehrmaligem Wechseln des Paraffins wird über Nacht inkubiert. Die Einbettung erfolgt in Papierschliffchen auf einem mit Paraffin vorgegossenen Boden. Nach vollständigem Aushärten der Paraffinblöcke über mehrere Tage können die Schnitte mit einem Ultramikrotom angefertigt werden. Die Schnitte werden auf gelatinebeschichteten Objektträgern aufgefangen. Letztere erhält man durch Eintauchen sauberer Träger in 1 % Gelatinelösung und anschließende Trocknung bei Raumtemperatur über Nacht.

2.6.6 Histologische Färbung

Zur Entfernung des Paraffins werden die angefertigten Schnitte 5 min in Xylol, danach jeweils 5 min in 100 %, 90 %, 70 %, 50 % und 30 % Ethanol überführt. Es wird 1 h in Borax-Carmin-Lösung gefärbt und anschließend je 5 min in HCl-Ethanol (i.e. 0,25-0,5 % (v/v) HCl in 70 % Ethanol), 70 und 50 % Ethanol, und in H₂O gespült. Nach 30-45 min Behandlung mit 5,10-Phosphorwolframsäure wird zweimal mit H₂O gespült und 20 min in Anilinorange gefärbt. Zum Schluß werden die Schnitte 2-3 min in Ethanol behandelt, an der Luft getrocknet und eingedeckelt (Histosec-System).