

3 Methoden

3.1 DNA-Präparationen

DNA aus Plasmiden für Klonierungen, Sequenzanalysen und Herstellung der RNA-Sonden für *in-situ*-Hybridisierungen wird durch Säulenchromatographie nach Protokollen der Bezugsfirma (Qiagen) isoliert.

3.1.1 Genomische DNA-Präparation aus Mausschwanzspitzen

Verwendeter Puffer:

Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA; 1% SDS; 100 mM NaCl)

Mausschwanzspitzen werden in 500 µl Lysis-Puffer mit 20 mg/ml Proteinase K über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach Abkühlung auf RT werden 200 µl 6M NaCl zugegeben. Nach kurzem schütteln wird die Lösung 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß erfolgt eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 8 min. Der Überstand wird mit 1 ml Ethanol gemischt. Das Präzipitat wird für 15 min bei RT abzentrifugiert. Die genomische DNA wird bei 65°C in 100 µl TE resuspendiert.

3.2 Isolierung von RNA

Um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden, werden die üblichen Vorkehrungen eingehalten (Ausubel et al. 1987-1999; Sambrook et al. 1989).

3.2.1 RNA-Präparationen

Die Aufreinigung von gesamt-RNA erfolgt strikt nach den Angaben des Herstellers. Bei -80°C gelagertes Gewebe wird in flüssigem Stickstoff zermörsert und nach vollständiger Evaporation des Stickstoffs wird das Gewebe in TRIzol-Reagenz (GibcoBRL) mit feinen Kanülen homogenisiert und nach dem Protokoll des Herstellers weiter aufgearbeitet. Die Gesamt-RNA wird in 100 µl RNase-freiem H₂O gelöst.

Polyadenylierte-RNA (polyA-RNA) wird mit dem PolyAttract-Kit (Promega) aus der gesamt-RNA aufgereinigt.

3.3 Reverse Transkription

Die Umschreibung von RNA in cDNA wird mit dem SuperScript-Kit (Gibco-Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Reaktion werden jeweils 2 µg gesamt-RNA eingesetzt.

3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur DNA- bzw. RNA-Mengenbestimmung der einzelnen Präparationsansätze wird mit dem Spektralphotometer die optische Dichte bei 260 nm gemessen. Dabei werden folgende Werte zugrunde gelegt:

DNA (doppelsträngig) $OD_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml

RNA $OD_{260} = 1$ entspricht 40 µg/ml

3.5 Gelelektrophoresen

3.5.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird sowohl für analytische Zwecke als auch zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Verwendet werden folgende Puffer:

50 x TAE-Puffer (2 M Tris-Essigsäure pH 7,5 - 8,0; 50 mM EDTA)

10 x Gel-Lade-Puffer (GL): (15 % Ficoll (Type 400); 0,25 % Bromphenolblau;
6 mM EDTA pH 8)

Entsprechend der Größen der aufzutrennenden Fragmente werden 0,8 bis 2% Agarosegele in 1 x TAE-Puffer verwendet. Zur Färbung der DNA wird dem Gel 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben.

Die Proben werden vor dem Laden mit 10 x GL-Puffer versetzt und anschließend bei 6-8 V/cm für 1 bis 3 Stunden elektrophoretisch getrennt. Nach dem Lauf werden die aufgetrennten DNA-Fragmente im UV-Licht (254 nm) analysiert und dokumentiert. DNA-Fragmente, die zur Klonierung oder Sequenzierung eingesetzt werden sollten, werden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Gelextraktionskits nach Protokollen der Hersteller (Qiagen, Biozym) aufgereinigt.

3.5.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Verwendete Puffer:

20 x MOPS-Puffer (0,4 M MOPS; 0,1 M Na-Acetat; 10 mM EDTA)

RNA-GL-Puffer: 1,0 µl 20 x MOPS; 3,5 µl Formaldehyd;

10,0 µl Formamid; 5,5 µl H₂O

Zur Auftrennung der gereinigten Gesamt-RNA für die Herstellung von Northern Blots werden 1,3% Agarosegele mit 1,1% Formaldehyd in 1 x MOPS-Puffer verwendet, wobei pro Spur 20 µg RNA eingesetzt werden. Zum Laden wird ausgefällte RNA in 20 µl RNA-GL-Puffer resuspendiert und 15 min bei 68°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgt bei 9 V/cm für 3 bis 4 h. Die Gele werden nach der Elektrophorese 20 min in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt (1,0 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x MOPS) und für 45 min in H₂O entfärbt. Die Banden der 28S- und 18S-rRNA sind im UV-Licht sichtbar.

3.5.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von RNase-Protection Assay Produkten werden denaturierende Polyacrylamid-Minigele (Invitrogen (Novex), Goningen, NL) verwendet.

Verwendeter Laufpuffer:

10 x TBE-Puffer (0,9 M Tris-Borat pH 8,0; 20 mM EDTA)

denaturierende Harnstoffgele:

6M Harnstoff; 4-12% Polyacrylamid

denaturierender Ladepuffer:

10 mM NaOH; 95 % Formamid; 0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Xylencyanol

Die Proben werden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/5 Vol. denaturierendem Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TBE-Puffer bei 150V für 50 min. Nach Abschluß der Gelelektrophorese wird das Gel mit Hilfe einer Geltrocknungsapparatur (Biorad) für 60 min unter Vakuum auf einem Whatman-Papier getrocknet.

Die radioaktiv markierten Einzelstränge werden durch Exposition über Nacht in einer Röntgenkassette mit einem Film (Kodak, X-OMAT) sichtbar gemacht.

3.6 Transfer von DNA und RNA

3.6.1 Southern Blot

Verwendete Transferlösung:

0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl; 1M Na-Phosphat-Puffer; 4,0 ml/l konz. H_3PO_4

Zum Transfer von DNA aus Agarosegelen wird der Kapillar-Blot durchgeführt (Southern 1975). Die Übertragung mit alkalischer Transferlösung erfolgt auf ungeladene Nylonmembranen (Hybond) für 16 bis 18 Stunden. Im Anschluß wird die Membran 1 min in 40 mM Na-Phosphatpuffer neutralisiert und zur endgültigen Fixierung der DNA mit UV-Licht einer Wellenlänge von 245 nm bestrahlt (Auto-Crosslink, Stratalinker, Stratagene).

3.6.2 Northern Blot

Verwendete Transferlösung:

10xSSC (150 mM Natriumcitrat, 1,5 M NaCl, pH 7,0)

Es werden denaturierende Gele verwendet (s. 3.5.2). Es wird für 30 min eine alkalische Hydrolyse der RNA mit NaOH im Gel durchgeführt (0,05 M NaOH, 1,5 M NaCl). Anschließend erfolgt die Neutralisation mit 0,5 M Tris, 1,5 M NaCl (pH 7,4). Der Northern-Transfer wird analog zum Southern-Blot durchgeführt (Ausubel et al. 1987-1999). Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgt durch Crosslinken.

3.6.3 Radioaktive Markierung von DNA und Filterhybridisierung

Proben für die Hybridisierung von Northern- oder Southern Blots werden nach der Random Priming-Methode markiert (Ausubel et al. 1987-1999). Hierfür wird das RediPrime Kit (Amersham, Braunschweig) benutzt. Es wurden ^{32}P -Nukleotide verwendet.

Zur Prähybridisierung werden die Nylonmembranen mit 2 ml/100 cm² Hybridisierungslösung (ExpressHyb, Clontech) in Hybridisierungsflaschen gegeben und bei 68°C für mindestens 30 min inkubiert. Anschließend wird die markierte Probe 5 min bei 95°C denaturiert. Die Sonde wird dann zu den Filtern in die Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgt ü/n bei 68°C. Die Filter werden danach Zweimal 5 min bei 42°C mit 2xSSC und 0,1% SDS unstringent gewaschen. Der hochstringente Waschschrift erfolgt darauf bei 42°C mit 0,2xSSC und 0,1% SDS. Zur Autoradiographie werden die Membranen in Röntgenkassetten mit Verstärkerfolie für einige Stunden bis zu 2 Tagen bei -80°C exponiert (Ausubel et al. 1987-1999; Sambrook et al. 1989).

3.7 PCR-Methoden

3.7.1 Präparative PCR

Mittels PCR werden spezifische DNA-Fragmente mit Primern amplifiziert, durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, aufgereinigt und zur weiteren Klonierung eingesetzt (Saiki et al. 1985; Mullis et al. 1986; Mullis und Faloona 1987).

PCR-Ansatz:

- 10 ng Plasmid-DNA;
- 4 µl 10 x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9, 500 mM MgCl₂, 1% Triton-X 100, 2 mg/ml BSA);
- 0,2 µl 25 mM dNTPs;
- 2 µl 10 µM Primer 1;
- 2 µl 10 µM Primer 2;
- 0,5 µl 5 U/µl Taq bzw. Pfu DNA-Polymerase ad 40 µl H₂O

Bedingungen: 5 min 94°C; 30 Zyklen von 30 sec 94°C, 30 sec jeweilige Annealingtemperatur, 30 sec bis 2 min 72°C; finaler Schritt: 10 min 72°C.

3.7.2 Analytische PCR

Für die Analyse von DNA wird obiger PCR-Ansatz halbiert und Taq DNA-Polymerase verwendet. Als Matrize können neben gereinigter DNA auch Bakterienkolonien oder -kulturen nach Transformation mit rekombinanter DNA verwendet werden. Dazu werden 10 ng einer DNA-Präparation oder 1 µl Bakterienkultur direkt in den PCR-Ansatz gegeben.

3.7.3 PCR zur Genotypisierung von transgenen Mäusen

Zur Analyse des Genotyps von transgenen Mäusen wird die PCR verwendet. Es wurden 100 ng genomische DNA eingesetzt, sowie 20 nM Primer, 250 µM dNTPs, 0,5 U Taq sowie 1xPCR Puffer.

Bedingungen für Col-II-Gal4 Mäuse: 94°C für 5 min; 40 Zyklen von 94°C für 30 s, 58°C für 30 s, 72°C für 30s; finaler Schritt 72°C für 5 min. Das Vorhandensein eines 322 bp Amplifikates zeigt einen transgenen Genotyp an.

Bedingungen für UAS-Ihh Mäuse: 94°C für 5 min; 35 Zyklen von 94°C für 30 s, 72°C für 1 min; finaler Schritt 72°C für 10 min. Das Vorhandensein eines 300 bp Amplifikates zeigt einen transgenen Genotyp an.

Bedingungen für Ihh -/- Mäuse: 94°C für 5 min; 40 Zyklen von 94°C für 1 min, 61°C für 1 min, 72°C für 1 min; finaler Schritt 72°C für 5 min. Das Vorhandensein eines 307 bp Amplifikates zeigt einen transgenen Genotyp an.

3.8 PCR-basierte cDNA-Subtraktion

Zur Identifizierung differentieller Genexpression in eukaryotischen Zellen wird das PCR-Select-Kit (Clontech, Palo Alto, USA) genutzt (Duguid und Dinauer 1990; Liang und Pardee 1992). Diese Methode erlaubt es, zwei mRNA-Populationen miteinander zu vergleichen. Dabei werden Klone von Genen isoliert, die lediglich in einer mRNA-Population enthalten sind (Ausubel et al. 1987-1999). Die Methode wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zunächst werden bei dieser Methode 2 µg polyA-RNA aus zwei zu vergleichenden Geweben gereinigt. In dieser Arbeit wurde die RNA aus 120 Gliedmaßenkulturen von E 14,5 Mausembryonen gereinigt. Dieser Kulturansätze sind mit Shh oder Cyclopamin behandelt. Die polyA-RNA aus diesen Ansätzen wird unter Verwendung eines polyT-Primers in cDNA revers transkribiert. Anschließend wird die cDNA mit RsaI blunt gespalten. Die zu untersuchende cDNA, der Tester, wird darauf in zwei Portionen aufgeteilt. Jede dieser Portionen wird mit einem spezifischen Adapter ligiert. Die Enden der Adaptern haben keine Phosphat-Gruppe, so daß nur ein Strang eines jeden Adapters mit dem 5'-Ende der cDNA ligieren kann. Im Anschluß werden zwei Hybridisierungen durchgeführt. Im ersten Schritt wird im Überschuß die Referenz cDNA, der Driver, zu jeder Portion Tester gegeben. Die Ansätze werden denaturiert und über Nacht hybridisiert. Bei diesem Schritt wird die Konzentration von Transkripten, die in hoher oder niedriger Kopienzahl vorliegen, equalisiert, d.h. normalisiert. Dies geschieht aufgrund der Hybridisierungskinetik (James und Higgins, 1985). Da der Driver im Überschuß zugegeben wird, ist es wahrscheinlich, daß nicht-differentielle cDNAs mit komplementären Driver cDNAs Hybride bilden und somit später nicht mehr amplifizierbar sind. Während dieser Hybridisierung werden einzelsträngige Tester-Fragmente angereichert, die nicht im Driver-Pool repräsentiert sind. Während der zweiten Hybridisierung werden die beiden primären Hybridisierungsansätze ohne neuerliche Denaturierung zusammengegeben. Nun können die einzelsträngigen Tester cDNAs miteinander hybridisieren. Diese neu entstandenen Hybride verfügen nun über zwei verschiedene Adaptern. Gleichzeitig wird noch einmal denaturierter Driver zugegeben. Diese neuerliche Driver-Zugabe dient der weiteren Anreicherung differentieller cDNA-Fragmente. Nach Auffüllen der

Enden mit DNA-Polymerase wird der gesamte Hybridisierungsansatz zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen unterzogen. Dieser Schritt dient der Amplifikation differentiell vorhandener Sequenzen. Die PCR-Produkte sind für differentielle Transkripte angereichert und können im Anschluß kloniert werden.

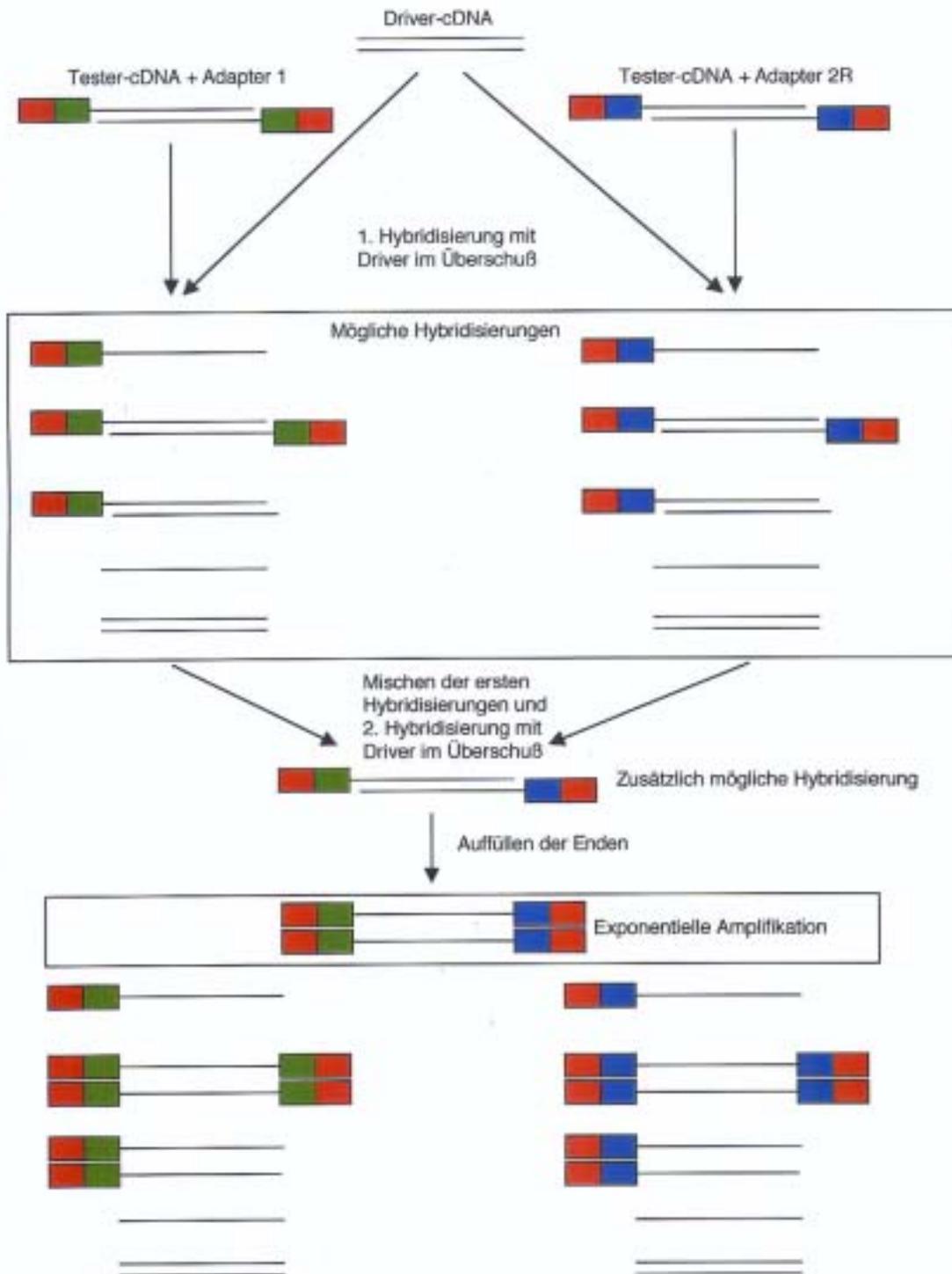


Abb. 7: Schematische Darstellung der subtraktiven PCR-basierten Hybridisierung

Beschreibung siehe Text.

3.9 Quantifizierung der mRNA mit dem RNase-Protection Assay

Verwendete Puffer:

5 x RPA- Hybridisierungs-Puffer (200 mM Pipes pH 6,4, 2 M NaCl, 5 mM EDTA)

RNase Digestion-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5 U/ μ l RNase T1, 4 μ g/ μ l RNaseA)

Für das RNase-Protection Assay werden 500 ng radioaktiv markierter antisense-RNA-Sonden und 1,5 μ g Gesamt-RNA in 1 x RPA-Hybridisierungs-Puffer im 20 μ l Ansatz vereint, 5 min bei 95°C denaturiert und über Nacht bei 40°C hybridisiert. Nach Degradation der nicht hybridisierten RNA für 45 min bei 37°C mit 330 μ l RNase-*Digestion*-Puffer, wurden 20 μ l 10 % SDS zugegeben und mit 3 μ l Proteinase K (20 μ g/ μ l) für 15 min bei 37°C die enthaltenen Proteine verdaut. Die Ansätze wurden mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und die wässrige Phase mit 1 ml 100% Ethanol und 1 μ g Glycogen gefällt. Nach Zentrifugation bei 22700 x g bei 4°C für 30 min wird das Präzipitat mit 500 μ l 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 μ l Ladepuffer aufgenommen. Die Proben werden auf einem denaturierenden 6% TBE-Urea-Polyacrylamidgel (Novex) ca. eine Stunde bei 20 mA aufgetrennt. Nach dem Trocknen des Gels wird ein X-OMAT Röntgenfilm über Nacht aufgelegt und am nächsten Tag entwickelt.

3.10 DNA-Klonierungstechniken

3.10.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur analytischen sowie präparativen Spaltung von Plasmid-DNA wird jeweils 1 U/ μ g DNA des entsprechenden Restriktionsenzym eingesetzt. Puffer und Reaktionsbedingungen werden gemäß den Herstellerangaben (NEB Biolabs, Boston, USA) gewählt.

3.10.2 Ligation von DNA

Für die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit kompatiblen, überhängenden oder glatten Enden wird die T4 DNA-Ligase verwendet. Die Konzentration der zu ligierenden Fragmente wird so gewählt, daß das molare Verhältnis von Vektor zu Insert 1:3 bis 1:10 beträgt. Zur Vermeidung der Selbstligation von Vektor-Fragmenten mit identischen Enden werden die 5'-Phosphatgruppen durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestinal phosphatase, CIP) abgespalten. Dazu wird nach dem Restriktionsverdau dem Ansatz 1 U CIP zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Abtrennung des Enzyms wird die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und das Fragment aus dem Gel gereinigt. Für den Ligationsansatz werden etwa 100 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 20 μ l eingesetzt. Die Ligation erfolgt in 1 x Ligase-Puffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, pH 7,8) mit 5 U T4 DNA-Ligase mehrere Stunden bei 16°C oder Raumtemperatur.

3.11 Transformation kompetenter Bakterien

Aus dem Ligationsansatz werden 20-100 ng DNA in der anschließenden Transformation eingesetzt. Für die Transformation wird der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α oder TOP 10 verwendet. Die Transformation wird mit Hitze-Schock nach (Ausubel et al. 1987-1999; Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Zur Transformation werden 50 μ l kompetente Zellen mit der zu transformierenden DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschockbehandlung des Zell-DNA-Gemisches für 3 min bei 37°C und sofortiger Abkühlung auf Eis, werden 250 μ l LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden auf Selektionsplatten ausplattiert und 14 bis 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.11.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

SOB Medium pH 7,6

20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 2,5 mM KCl; 10 mM NaCl

Vor Gebrauch 20 ml/l 1 M MgSO₄ zugeben.

TB-Puffer pH 6,7

10 mM PIPES; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl

55 mM MnCl₂ zugeben und steril filtrieren

DH5 α -Zellen werden auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Zehn Kolonien werden isoliert und in 250 ml SOB Medium unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wird die Kultur bei 2500 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und wie oben abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 20 ml TB-Puffer resuspendiert und vorsichtig DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% zugegeben. Nach 10 min Inkubation auf Eis wird die Zellsuspension aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wird von der Firma MWG-Biotech, Martinsried durchgeführt.

3.13 Analyse und Reinigung von Proteinen

3.13.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die vertikale Elektrophorese von Proteinen wird ein Mini-Gel-System der Firma Invitrogen (Novex) verwendet (Laemmli 1970). Es werden Gradientengele (8-16%) sowie denaturierende Harnstoffgele (6%) dieses Herstellers verwendet. Der Aufbau und die Ausstattung der Gelapparatur erfolgt nach den vom Hersteller empfohlenen Richtlinien.

Die SDS-PAGE wird unter denaturierenden/nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die aufzutragenden Proben werden mit 5-fachem Probenpuffer (0,3M Tris-HCl, pH 6,8, 15% SDS, 50% Glycerin, 0,015% Bromphenolblau) versetzt. Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung von 130 V. Als Größenstandard dient entweder der Molekulargewichtsstandard Prestained high Marker von Sigma (Deisenhofen) oder BenchMark Protein Ladder von Gibco-BRL (Detroit, USA).

3.13.2 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliant-Blue

Proteine im Gel können mit Coomassie-Brilliant-Blue sichtbar gemacht werden. Dafür wird das Gel für 10 min in 35°C warmer Coomassie-Färbelösung (40% Methanol, 10% Essigsäure, 1 g Serva-Blue G-250) gefärbt und anschließend in 35°C warmer Entfärbelösung (40% Methanol, 10% Essigsäure) mit mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung wieder entfärbt bis Proteinbanden sichtbar werden.

3.13.3 Western Blot

Der Proteintransfer vom Gel auf Nitrozellulosemembranen wird auch als Western-Blotting bezeichnet (Towbin et al. 1979). Es werden Blotapparaturen und MES-Laufpuffer der Firma Invitrogen verwendet. Im Anschluß an die Elektrophorese wird der Sandwich-Blot gemäß den Anweisungen des Herstellers zusammengesetzt. Der Transfer findet bei 4°C und einem konstanten Strom von 60 mA für 60 min statt.

3.13.4 Färbung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen mit Ponceau S

Um die Qualität des Proteintransfers beurteilen zu können, werden die auf die Membran übertragenen Proteine mit Ponceau S-Färbelösung (0,2% Ponceau-Rot, 1,5% TCA, 1,5% Sulfosalicylsäure, 0,1% Essigsäure) angefärbt. Dazu wird der Blot 1 min in Färbelösung getaucht und dann in aqua bidest. solange entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar werden. Die Entfärbung erfolgt in PBS.

3.13.5 Spezifischer Proteinnachweis durch Antikörper mittels Alkalischer Phosphatase

Alle genannten Wasch- und Inkubationsschritte werden, soweit nicht anders vermerkt, in PBS- 0,1% Tween, pH 7,8 durchgeführt.

Zum Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrozellulosemembran wird diese zunächst in 10% (w/v) Magermilchpulver für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper (z.B. anti-Fab Maus-IgG; Verdünnung 1:2000) über Nacht bei 4°C. Nach fünfmaligem Waschen erfolgt die Inkubation mit dem zweiten AP-konjugierten Antikörper (Verdünnung 1:5000 - 1:10000) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach fünf weiteren Waschschritten wird der Blot einmal in PBS ohne Tween gewaschen und mit NBT/BCIP als AP-Substrat detektiert.

3.13.6 Proteinbestimmung (BCA-Methode)

Für die Durchführung von Proteinbestimmungen bei Zellsolubilisaten wird der BCA-Test-Kit (Pierce, Rockford, USA) verwendet. Anhand einer Eichreihe aus Rinder-Serum-Albumin (BSA) kann die Proteinkonzentration der zu testenden Probe ermittelt werden.

3.13.7 Aufreinigung von Maus IgG1 aus Ascites

Für die affinitätschromatographische Aufreinigung von Maus IgG1 wird das Immunopure (G) IgG Purification Kit (Pierce) genutzt. Bei dieser Methode wird das Maus IgG an durch Sepharose immobilisiertes Protein G gebunden, gewaschen und bei niedrigem pH-Wert eluiert (Bjorck und Kronvall, 1984; Akerstrom et al., 1985).

Es werden die Angaben des Herstellers befolgt.

3.13.8 Spaltung von Maus IgG1 in Fab- und Fab₂-Fragmente

Die Spaltung von Maus IgG1 in die Fab- und Fab₂-Fragmente wird mit dem Immunopure IgG1 Fab and F(ab')₂ Preparation Kit (Pierce) durchgeführt. Durch die an Sepharose gebundene Thiol-Protease Ficin wird gesamt-IgG in Abhängigkeit zur Cystein-Konzentration gespalten (Leiner und Friedenson, 1970; Mariani et al., 1991; Milenic et al., 1989). Bei hoher Konzentration von milden reduzierenden Stoffen wie Cystein, Sulfid, Sulfit oder Cyanid findet eine Aktivierung von Ficin statt. Unter diesen Bedingungen (10 mM Cystein) wird das IgG in Fab-Fragmente gespalten. Wird die Cystein-Konzentration auf 1 mM verringert, findet bei gleichen Bedingungen die Spaltung in Fab₂-Fragmente statt. Es werden die Angaben des Herstellers befolgt.

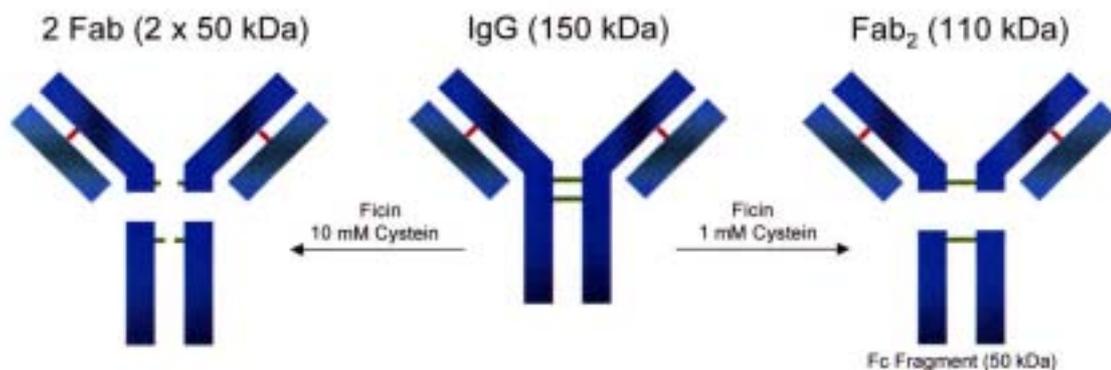


Abb. 8: Schema der Fragmentierung von IgG in Fab₂- und Fab-Fragmente

In Abhängigkeit zur Cysteinkonzentration findet eine Spaltung des IgG in Fab₂- oder Fab-Fragmente durch immobilisiertes Ficin statt.

3.14 Gewebe-Präparationen und -Kulturen

3.14.1 Präparation gezielt angepaarter Mausembryonen

Für die Präparation von Mausembryonen zur *in-situ*-Hybridisierung werden NMRI-Mäuse über Nacht verpaart und die Weibchen auf einen Vaginalplug kontrolliert. Der Zeitpunkt der Plugkontrolle wird als Embyonaltag 0,5 (E 0,5) gesetzt. Trächtige NMRI-Weibchen werden durch cervikale Dislokation getötet. Der Uterus wird in PBS überführt und die Embryonen freipräpariert.

3.14.2 Präparation und Kultur von Maus-Gliedmaßenanlagen

Für die Organkultur werden Mausembryonen zum Zeitpunkt E 14,5 oder E 16,5 in PBS-Medium mit Antibiotic/Antimycotic (Gibco BRL) aus dem Uterus freigelegt und die Gliedmaßenanlagen herauspräpariert. Bei den Gliedmaßen werden Haut und Muskelgewebe entfernt.

3.14.3 Präparation von Hühnerembryonen

Bruteier werden bei 38°C und 65% Luftfeuchtigkeit bis zur Entwicklungsstufe HH 30 inkubiert (Hamburger und Hamilton 1951). Die Hühnerembryonen werden in PBS präpariert und in 4% PFA (PBS, 4% Paraformaldehyd) über Nacht fixiert.

3.14.4 Gliedmaßenorgankulturen

Nach der Präparation werden die Gliedmaßenanlagen auf einen Milliporefilter (Typ AA) aufgelegt. Daraufhin wird 1ml BGJ B-Medium mit 0,1% BSA sowie 0,5 mg/ml Antibiotic/Antimycotic (Gibco BRL) in die Kulturschale (Falcon) gegeben. Der Filter wird auf einem Edelstahlsieb platziert. So wird die Gliedmaßenanlage an der Flüssigkeits/Atmosphären-Grenzschicht gehalten. Die Kultur erfolgt unter sterilen Bedingungen für 1 bis 4 d im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in BGJ B-Medium. (Vortkamp et al. 1996). Nach der Kultur werden die Gliedmaßen für 24 h in 4% PFA über Nacht fixiert oder die RNA aus dem Gewebe aufgereinigt.

3.15 Einbett- und Schnitt-Techniken

3.15.1 Einbetten und schneiden von Gliedmaßen in Paraffin

Fixierte Gliedmaßenanlagen werden 10 min in PBS gewaschen. Sie werden in einer ansteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 85%, 95%, 2 mal 100%) je 15 min dehydriert. Im Anschluß wird der Ethanol durch Xylol ausgetauscht (2 mal 30 min in reinem Xylol) und dann für 30 min über Xylol/Paraffin (1:1) inkubiert. Dann werden die Gliedmaßen unter Vakuum bei 60°C in Paraffin inkubiert und in frisches Paraffin überführt. Die Gliedmaßen werden in frischem Paraffin in Blöcke eingebettet und bei 4°C gelagert. 5 µm Paraffin-Schnitte werden mit dem Mikrotom geschnitten, im 37°C Wasserbad gestreckt und auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Nach Trocknen bei 42°C werden die Objektträger bei 4°C aufbewahrt.

3.16 RNA *in-situ*-Hybridisierung von Paraffinschnitten

In-situ-Hybridisierung auf Gewebeschnitten ist eine Methode zur Untersuchung des zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters von Genen. Einzelsträngige, zur zellulären mRNA komplementäre (antisense) RNA, wird dazu radioaktiv markiert und als Hybridisierungsprobe verwendet.

3.16.1 Herstellung radioaktiv-markierter RNA-Proben durch *in-vitro*-Transkription

Für die Herstellung von antisense RNA-Sonden müssen sich die zu analysierenden DNA-Fragmente in Plasmidvektoren oder in PCR-Produkten mit RNA-Polymerase Bindungsstellen (T3,- T7- oder SP6-Promotoren) befinden. Für die Transkription werden 500 ng DNA-Matrize eingesetzt. Die Transkription erfolgt über 1 h bei 37°C. Es wird ein Ribonukleotidmix verwendet, der ³³P-UTP enthält. Die DNA wird durch DNase-Verdau im Transkriptionsansatz für 30 min bei 37°C entfernt. Die Transkripte werden durch Zugabe von 20 ng Gykogen, 0,1 Vol. 5 M LiCl₂ und 2,5 Vol 100% Ethanol gefällt. Die Fällung erfolgt bei -20°C für 30 min und anschließender Zentrifugation bei 14,000 rpm für 15 min bei 4°C. Das Pellet wird mit 80% Ethanol gewaschen und in 50 µl H₂O resuspendiert. Die Lösung wird mit 1 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen und bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Probe

wird bis zur Verwendung auf Eis gehalten (Ausubel et al. 1987-1999; Sambrook et al. 1989).

3.16.2 *In-situ*-Hybridisierung

Die *in-situ*-Hybridisierung gliedert sich in vier Stufen: Prähybridisierung, Hybridisierung, Waschen und Signaldetektion.

Prähybridisierung:

Die Deparaffinierung der Schnitte erfolgt durch Inkubation in Xylol für 30 min. Die Rehydrierung erfolgt durch eine absteigende Ethanolreihe (100%, 95%, 80%, 75%, 50%, 30%) für je 2 min und 0,85% NaCl für 5 min. Im Anschluß wird für 5 min in PBS gewaschen und in 4% PFA für 30 min fixiert. Die Schnitte werden darauf für 5 min mit 0,02 mg Proteinase K/ml behandelt und für 5 min mit PBS gespült. Es folgt eine zweite Fixierung mit 0,2% Glutaraldehyd / 4% PFA für 10 min. Nach einer weiteren PBS-Spülung (5 min) werden die Schnitte in 0,25% Essigsäureanhydrid für 10 min inkubiert und mit PBS (5 min) und 0,85% NaCl (5 min) gewaschen. Die Dehydrierung erfolgt durch eine aufsteigende Ethanolreihe (30%, 50%, 75%, 80%, 95%, 100%) für je 2 min. Die Schnitte werden 15 min bei RT getrocknet.

Hybridisierung:

Für die Hybridisierung werden 50 µl transkribierte Riboprobe in Hybridisierungspuffer auf den trockenen Objektträger aufgebracht. Die Schnitte werden mit 0,05 mm dicker Polypropylen-Folie (Roth) abgedeckt und bei 70°C im Hybridisierungsofen in humider Atmosphäre hybridisiert.

Waschen:

Die Schnitte werden initial für 30 min in 5xSSC (75 mM Natriumcitrat, 750 mM NaCl, pH 7,0) gewaschen, wobei die Folie entfernt wird. Es folgt eine Inkubation in 2xSSC für 30 min und 20 mg RNase A in RNase-Waschpuffer (4 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, 0,05 M EDTA, pH 7,5) für 30 min. Darauf erfolgt stringentes Waschen mit 2xSSC / 50% Formamid für 30 min und 2xSSC für weitere 30 min. Die Waschschriffe finden bei 55°C, der RNase-Verdau findet bei 37°C statt. Die Schnitte werden nun in einer

aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 75%, 95%) für je 2 min und in 100% Ethanol für 15 min dehydriert.

Signaldetektion:

Die getrockneten Schnitte werden ü/n in einer Röntgenkassette einem X-OMAT Röntgenfilm (Kodak) exponiert. Nach Entwicklung des Filmes und Abschätzung der Signalintensität werden die Schnitte in Photoemulsion (NBT-2, Kodak) getaucht. Dafür wird die Photoemulsion auf 40°C vorgewärmt. Nach dem Überschichten der Oberfläche mit Photoemulsion erfolgt die Trocknung der Objektträger über Nacht. Die Schnitte werden für 1-14 Tage bei 4°C in absoluter Dunkelheit exponiert. Die Entwicklung erfolgt durch D-76 Entwickler (Kodak) für 5 min bei 15°C. Nach kurzem Waschen in Wasser wird die Photoemulsion für 20 min fixiert (Kodak, saures Fixiersalz). Die Schnitte werden in 0,2% Toluidin-Blau (Sigma) in Wasser gegengefärbt und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 75%, 80%, 95%, 100%) für je 2 min dehydriert. Nach Inkubation für 20 min in Xylol werden die Schnitte mit einem Deckglas versehen. Hierfür wird DPX (Fluka) als Medium verwendet. Die Schnitte werden mit einem Mikroskop im Dunkelfeld fotografiert und digital weiterverarbeitet.

3.17 Überexpression von Genen in Hühnerembryonen mit Hilfe replikationskompetenter Retroviren

Der hier verwendete Retrovirus (RCAS-BPA) basiert auf dem Rous-sarcoma-Virus, welcher ein Proto-Oncogen in sein Genom aufgenommen hat, das daraufhin unter Kontrolle der viralen Promotor- und Enhancerelemente in allen infizierten Zellen exprimiert wird. Da diese Sequenz für die Replikation des Virus keine Rolle spielt, kann sie durch jede beliebige andere kodierende Sequenz ersetzt werden (Morgan und Fekete 1996; Logan und Tabin 1998).

3.17.1 Klonierung der Injektionskonstrukte

Die Injektions-Konstrukte werden im pSlax-Vektor aus PCR Fragmenten zusammengesetzt. Die Expressionskassette wird im Anschluß aus pSlax13 mit ClaI herausgeschnitten und in die ClaI-Site des viralen Vektors RCAS-BPA ligiert und restriktionsanalytisch orientiert.

3.17.2 Produktion der Retroviren

Die RCAS-Konstrukte werden in Hühnerfibroblasten (DF-1), unter Verwendung von Lipofectamin (Gibco-Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transfiziert (Logan und Tabin 1998). Die Zellen werden passagiert, bis sechs Zellkulturschalen (TPP) (Durchmesser: 15cm) konfluent bedeckt sind. Diese werden mit je 12 ml Medium bedeckt und über Nacht inkubiert. Dann wird der Virusüberstand abgenommen und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren. Diese Prozedur wird insgesamt pro Platte dreimal wiederholt. Der eingefrorene Virusüberstand wird bei 37°C aufgetaut und durch 0,45 µm Nitex-Filter (Nalgene) sterilfiltriert. Anschließend werden die Viruspartikel durch Ultrazentrifugation bei 22.000 rpm für 3 h bei 4°C pelletiert, das Medium dekantiert und in Restmedium gelöst. Der Virusüberstand wird in 25 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.17.3 Titration der Retroviren

Zunächst werden von den aufkonzentrierten Retrovirus-Überständen Verdünnungen von 1×10^{-3} bis 1×10^{-6} angesetzt. DF1 Zellen (70-80% konfluent) in 12-well Mikrotiterplatten werden mit jeweils 1 µl der Verdünnungen infiziert und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Virusinfizierte Zellen werden mit dem monoklonalen Antikörper 3C2 (Logan and Tabin, 1998), der gegen Virus-Hüllproteine gerichtet ist, markiert und mit dem Vectastain Kit (Vector Laboratories) nach Angaben des Herstellers angefärbt. Dabei entspricht die Zahl der gefärbten Zellen (N) in der 10^{-5} -Verdünnung einem Virustiter von $N \times 10^8$ IU (infectious units) pro ml. Für eine effiziente Infektion sind mindestens 1×10^8 IU/ml erforderlich.

3.17.4 Injektion in Hühnerembryonen

SPF-Hühnereier werden von Charles River bezogen. Die Eier werden bei 38°C im Sicherheitsinkubator (Ehret) bebrütet. Der konzentrierte Virusüberstand wird in die rechten Gliedmaßenanlagen von Hühnerembryonen der Stufe HH 20 (Hamburger and Hamilton, 1952) injiziert (Prior-Mikroinjektor). Die linke Extremität bleibt uninfiziert und dient als interne Kontrolle. Die Injektion selbst erfolgt wie beschrieben (Morgan und Fekete 1996). Nach der Injektion werden die Eier mit Klebefilm versiegelt und weiter bei 38°C inkubiert, bis sie das Stadium HH 36 zur Auswertung erreicht haben. Im Anschluß erfolgt die Fixierung der Gliedmaßen und die Genexpressionsanalyse mittels *in-situ*-Hybridisierung.