

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Nematoden

In dieser Arbeit wurde der *C. elegans* Wildtypstamm Variation Bristol (N2) verwendet. Dieser konnte 1946 erstmals in Großbritannien isoliert werden (Briggs, 1946) und hat sich mittlerweile weltweit als Testorganismus durchgesetzt.

Zur Vermeidung einer Kontamination mit Fremdorganismen wurden alle Arbeiten mit den Nematoden unter sterilen Bedingungen (Sterilbank von Ehret, autoklavierte Medien und Substanzen) durchgeführt.

2.1.1. Stammkonserven

Für die Stammerhaltung von *C. elegans* wurden Stammkonserven angelegt, die bei -80°C gelagert werden können. Dazu wurden Nematoden im L1 Stadium in einem Einfriermix, bestehend aus gleichen Teilen M9-Puffer (Brenner, 1974) und Einfrierpuffer (siehe 2.6.) suspendiert, je 0,5 ml davon in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

2.1.2. Vorkultur auf Agar-Platten

Für die Vorkultur, die der Vermehrung der Nematoden diene, wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens mit einer *C. elegans* Stammkonserve (2.1.1.) aufgetaut und auf einer mit OP50-Bakterien (siehe 2.2.) beimpften NGM-Agar-Platte (Nematode Growth Medium nach Sulston und Hodgkin, 1988; zur Herstellung siehe auch 2.6.) ausgegossen. Anschließend wurden die Nematoden auf der Platte für drei Tage bei 20°C kultiviert.

Nachdem sich die Nematoden auf dieser Stammplatte ausreichend vermehrt hatten, wurden aus dieser Platte unter der Sterilbank kleine Agarblöcke ausgeschnitten und mit der Nematoden bewachsenen Seite nach unten auf weitere mit OP50-Bakterien beimpfte NGM-Platten gelegt. Diese Platten wurden ebenfalls für drei Tage bei 20°C inkubiert. Nachdem auch auf diesen ausreichend Nematoden gewachsen waren, konnten die Platten, sollten sie nicht direkt weiter verwendet werden, bei 15°C für die Stammhaltung auf Platten aufbewahrt werden. Aus diesen wurden bei Bedarf durch Ausschneiden von kleinen Agarblöckchen neue Platten mit Nematoden angesetzt.

2.1.3. Synchron-Flüssigkultur und Ernte der Kulturen

Für die Flüssigkultur wurde eine ausreichende Anzahl von mit OP50-Bakterien beimpfter NGM-Platten aus einer Nematodenstammplatte (2.1.2.) angesetzt. Diese wurden drei Tage bei 20°C inkubiert, anschließend wurden die Nematoden mit 2-3 ml Basalmedium ohne Zusätze (2.6.) von den Platten gespült und die Suspension in einem sterilen Gefäß gesammelt. Die Dichte der Nematodensuspension wurde durch Auszählen unter dem Mikroskop ermittelt. Dazu wurde ein Aliquot der Wurm suspension so mit A.bidest. verdünnt, dass sich in einem Tropfen von 10 µl eine auszählbare Menge von nicht mehr als 40 Nematoden befand. Sechs bis acht dieser Tropfen wurden auf einen Objektträger pipettiert, ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Zur weiteren Kultivierung wurden in 200 ml Basalmedium mit Zusätzen (2.6.) mindestens eine Mio. Nematoden in 2l-Glaskolben eingesetzt. Als Nahrungsquelle wurden 1,25 g gefriergetrocknete und in Basalmedium suspendierte OP50-Bakterien in den Ansatz gegeben. Die Kultur wurde zwei bis drei Tage bei ca. 23°C geschüttelt, bis die Nematoden das adulte eiertragende Stadium erreicht hatten. Für die Synchronisation der Nematoden wurde nun eine Behandlung mit einer Hypochloritlösung (2.6.) durchgeführt. Dazu wurden die Nematoden zunächst in ein Becherglas überführt und für 1 h zum Absedimentieren auf Eis gestellt. Der wurmfreie Überstand wurde mittels einer Saugpumpe auf ein Volumen von unter 50 ml abgesaugt und anschließend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) überführt, mit einer 0,1 M NaCl-Lösung auf 50 ml zum Waschen aufgefüllt und bei 200 x g in einer Tischzentrifuge (Sigma, 3-1) für 4-5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vorsichtig abgesaugt und pro Volumen Nematoden ein Volumen der Hypochloritlösung zugegeben. Zur vollständigen Lyse der Nematoden (und damit Gewinnung der Eier) wurde das Zentrifugenröhrchen für bis zu 10 min mit einem Vortexer (VortexGenie, Winn) gevortext, zwischendurch wurde der Verlauf der Lyse unter dem Mikroskop überprüft. Nach dem vollständigen Auflösen der Nematoden wurde mit M9-Puffer die Eier-Hypochlorit-Lösung auf ein Volumen von 50 ml verdünnt, um eine Zerstörung der Eier durch das Hypochlorit zu verhindern. Zum endgültigen Auswaschen des Hypochlorits wurden anschließend die Eier bei 200 x g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Röhrchen erneut mit M9-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Dieser Waschschrift wurde insgesamt vier Mal wiederholt und die Eier anschließend in 20 ml M9-Puffer aufgenommen und ausgezählt.

Für die jetzt folgende Synchronkultur wurden die Eier in Basalmedium mit Zusätzen, aber ohne OP50-Bakterien in 2l-Glaskolben so eingesetzt, dass die Nematodendichte 10.000 Eier/ ml betrug und bei ca. 23°C geschüttelt. Frühestens nach 24 h (wenn aus mindestens 80% der Eier L1 ausgeschlüpft sind) wurden 1,25 g gefriergetrocknete OP50-Bakterien (vorher in Basalmedium suspendiert) pro 200 ml Medium hinzugegeben. Diese relativ späte Bakterienzugabe verzögert das Wachstum von sehr früh geschlüpften Nematoden und trägt dazu bei, die Kultur synchron zu halten. Nach weiteren 2-3 Tagen wurden die Nematoden geerntet. Dazu wurde die Kultur zunächst in ein Becherglas überführt und für eine Stunde zum Absedimentieren auf Eis gestellt. Der wurmfreie Überstand wurde mittels einer Saugpumpe abgesaugt, sodass das Volumen auf unter 50 ml reduziert wurde. Diese Wurmsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit einer 0.1 M NaCl-Lösung auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Nematoden bei 200 x g für 5 min abzentrifugiert, der wurmfreie Überstand abgesaugt und wieder mit der NaCl-Waschlösung auf 50 ml aufgefüllt. Dieser Waschschrift wurde insgesamt zwei- bis dreimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig möglichst vollständig abgenommen und das Wurmpellet anschließend bei -80°C eingefroren.

Da sich die Hypochloritbehandlung zur Synchronisation der Wurmulturen als schwierig und aufwendig herausstellte und mit großen Wurmverlusten verbunden war, wurde nach einer Alternative gesucht. Diese fand sich in Form eines Filtrationsgerätes (Sartorius SM 16510/11), welches mit einem 10 µm Membranfilter bereits im Haus zur Wurmfiltration erprobt wurde. Auf Grund dieser Filterporengröße konnten Nematoden im L1-Stadium aus einer Wurmsuspension mit gemischten Entwicklungsstadien sicher und zuverlässig herausgefiltert werden, ohne dass die Nematoden dabei durch den Einsatz von Hypochlorit geschädigt wurden. Durch den Einsatz dieser Methode war es möglich von einer größeren Anzahl (100-180) mit Nematoden besetzter NGM-Platten direkt eine ausreichende Anzahl an Nematoden im L1-Stadium zu gewinnen. Die Nematoden wurden dazu mit Basalmedium von den Platten abgespült und die Wurmsuspension anschließend direkt gefiltert. Die durch die Filtration gewonnenen L1-Würmer wurden mit Basalmedium und Zusätzen (2.6.) sowie OP50-Bakterien in Kultur gebracht und konnten nach weiteren 72 h geerntet werden.

Die Wurmernte wurde durch einen Saccharosebehandlungsschritt ergänzt, mit dem sichergestellt wurde, dass sich wirklich nur Nematoden im späteren Pellet befinden. Dazu wurde die Wurmsuspension nach zwei ersten Waschschrritten mit M9-Puffer mit einer eisgekühlten Mischung aus gleichen Teilen 60%er (w/v) Saccharoselösung und M9-Puffer versetzt. Während einer anschließenden 5-minütigen Zentrifugation bei 200 x g flotierten die Nematoden in die obere Phase. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase mit Hilfe einer Pipette abgenommen und in ein frisches 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die sich noch im abgenommenen Wurmüberstand befindliche Saccharose wurde durch drei Waschschrritte mit M9-Puffer entfernt, bevor das Wurmpellet bei -80°C eingefroren wurde.

2.2. Bakterien

Als Nahrungsquelle für die Nematoden diente der *Escherichia coli* Stamm OP50, eine Uracil-Mangelmutante, die nur im Labor gehalten werden kann. Zur Vermeidung von Fremdinfektionen wurden auch hier alle Arbeiten unter der Sterilbank sowie unter Einsatz autoklavierter bzw. steriler Medien durchgeführt. Die Bakterien wurden den Nematoden in zwei verschiedenen Formen dargeboten.

Für die Plattenkultivierung der Nematoden wurden aus einer Bakterienflüssigkultur zwei bis drei Tropfen auf eine NGM-Platte aufgetropft und anschließend mit einem Drigalskispatel gleichmäßig über die gesamte Platte verteilt. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und konnte dann mit Nematoden beimpft werden. Für das Ansetzen der Bakterienflüssigkultur wurde zunächst aus einer Stammkultur mit Hilfe einer Impföse durch einen Verdünnungsausstrich eine LB-Platte (nach Sambrock et al., 1989) angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag konnte wieder mit Hilfe einer Impföse von dieser Platte eine Einzelkolonie abgenommen werden und in einen Kolben mit 50-100 ml DYT-Medium (2.6.) überführt werden. Der Kolben wurde über Nacht bei 37°C und 140 rpm geschüttelt. Anschließend konnte er bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und bei Bedarf für das Animpfen von NGM-Platten für die Nematodenkultivierung verwendet werden. Da sich mit der Zeit unerwünschte Fremdinfektionen in der Bakterienkultur einstellten, wurde die Bakterienflüssigkultur in einem wöchentlichen Turnus aus einer sauberen, mit OP50-Bakterien beimpften LB-Platte neu angesetzt.

Für die Flüssigkultivierung der Nematoden wurde eine tiefgefrorene *E. coli*-Suspension als Nahrungsquelle verwendet. Dazu wurden aus einer Bakterienflüssigkultur weitere Kulturen mit einem Verdünnungsfaktor von 1/ 100 angelegt und 24 h bei 37°C geschüttelt. Diese *E. coli*-Suspensionen wurden anschließend für 15 min bei 4000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen, danach die Pellets mit A.bidest. resuspendiert und erneut für 15 min bei 4000 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Pellets vereinigt, gewogen und in A.bidest so resuspendiert, dass sich eine Konzentration von 0,5 g/ ml ergab. Von dieser Suspension wurden je 12 ml in eine Petrischale mit 60 mm Ø (Sarstedt) gefüllt, bei –80°C mindestens über Nacht eingefroren, lyophilisiert und anschließend bei –20°C aufbewahrt. Zur Verwendung als Nahrungsquelle in der Nematodenflüssigkultur wurde eine definierte Menge dieser gefrorenen OP50-Bakterien in ca. 10 ml Basalmedium aufgenommen, suspendiert und der Wurmkultur zugegeben.

2.3. Xenobiotika

Zur Gewährleistung eines möglichst vielfältigen Anwendungsbereiches für den Celegans Toxchip, wurden bei seiner Entwicklung und Testung sieben unterschiedliche Xenobiotika aus sechs verschiedenen Stoffgruppen ausgewählt:

Stoffklasse	Chemikalie	Lieferant
PAK	β-Naphtoflavon reinst	Serva
	Fluoranthen 98%	Aldrich
Arzneimittel	Clofibrinsäure	Sigma
Synthet. Östrogen	Diethylstilbestrol (DES)	Sigma
Herbizid	Atrazin 99,0%	Riedel de Haën
Fungizid	Tributylzinnchlorid 96%	Aldrich
Insektizid	Endosulfan 99,8%	Riedel de Haën

Für die Herstellung der Xenobiotika-Stammlösungen wurde die entsprechende Menge an Substanz mit Hilfe einer Analysenwaage (Sartorius, 1602 MP) abgewogen und anschließend in Lösung gebracht. Da die eingesetzten Schadstoffe nicht oder nur gering wasserlöslich sind, wurde als Lösungsvermittler DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck) verwendet.

Wie El Jay (1996) in seiner Untersuchung zeigen konnte, hat DMSO als Lösungsmittel bei Endkonzentrationen im Medium bis 0,5 % nur geringe Effekte und ist daher gut als organischer Lösungsvermittler geeignet.

Für die gesamtgenomischen DNA-Microarray Experimente, die der Selektion relevanter Gene für den Celegans Toxchip dienten, wurden fünf unterschiedliche Schadstoffe ausgewählt, die zum einen bereits als gute Induktoren für die Genexpression bekannt sind (Menzel et al., 2001), bzw. zum anderen Repräsentanten möglichst unterschiedlicher Stoffgruppen darstellen, um das Spektrum der durch Schadstoff induzierbaren Gene auf dem Celegans Toxchip möglichst breit zu halten. Die eingesetzten Konzentrationen orientierten sich an der berechneten EC10 für die Reproduktion und beziehen sich auf einen Reproduktionstest, der schon vorher hier im Haus durch Frau Forêt durchgeführt wurde, bzw. auf die Ergebnisse von Rödel (2002). Die Auswahl des Konzentrationsbereichs erfolgte auch hier mit dem Hintergrund, Gene selektieren zu können, die anschließend auf dem Celegans Toxchip auch durch geringe Schadstoffkonzentrationen induzierbar sind. Die Xenobiotikalösungen wurden so zur Nematodenkultur gegeben, dass sich eine Konzentration des Lösungsvermittlers DMSO im Medium von 0,5 % ergab. Die Zugabe der Xenobiotikalösungen und von DMSO für die Kontrollen erfolgte im L1-Stadium der Nematoden und wirkte während der Entwicklung zum jungen adulten Tier auf die Nematoden ein, was in der Regel einer Expositionszeit von 48h entsprach. Die Kontrollkulturen wurden nur mit DMSO versetzt, wobei sich auch hier eine DMSO-Konzentration im Medium von 0,5 % ergab. Folgende Xenobiotika wurden verwendet:

Atrazin:	Endkonzentration im Medium: 25 mg/ l
β-Naphtoflavon:	Endkonzentration im Medium: 5 mg/ l
Clofibrat:	Endkonzentration im Medium: 10 mg/ l
DES:	Endkonzentration im Medium: 0,5 mg/ l
Fluoranthen:	Endkonzentration im Medium: 0,5 mg/ l

Für den Celegans Toxchip wurden zusätzlich zu den bereits genannten fünf Xenobiotika noch Endosulfan und Tributylzinnchlorid mit in die Untersuchung aufgenommen. Alle sieben Xenobiotika wurden in drei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, wobei sich die höchste gewählte Konzentration wieder

an der errechneten EC10 bezogen auf die Reproduktion orientierte. Für die beiden nächst geringeren Konzentrationen wurden Werte gewählt, die 20 % der jeweils höheren Konzentration entsprachen.

Damit ergeben sich für die im Medium eingesetzten Endkonzentrationen folgende Werte:

Atrazin:	25/ 5/ 1 mg/ l
β-Naphtoflavon:	5/ 1/ 0,2 mg/ l
Clofibrat:	10/ 2/ 0,4 mg/ l
DES:	0,5/ 0,1/ 0,02 mg/ l
Endosulfan:	1,5/ 0,3/ 0,06 mg/ l
Fluoranthen:	0,5/ 0,1/ 0,02 mg/ l
Tributylzinn:	0,06/ 0,012/ 0,0024 mg/ l

Die Endkonzentration des Lösungsvermittlers DMSO im Medium wurde für die Celegans Toxchip Experimente auf 0,3 % gesenkt, da Rödel (2002) nachweisen konnte, dass DMSO erst bei dieser Konzentration keine messbaren Effekte zeigt.

Die Zugabe der Xenobiotikalösungen zu den Nematodenkulturen, sowie von DMSO zu den Kontrollkulturen erfolgte 24h nachdem die Nematoden in Kultur gesetzt worden waren. Nach weiteren 48h wurden die Nematoden im jungen adulten Stadium geerntet..

Die Untersuchungen der Auswirkung von Fluoranthen mit Hilfe des Celegans Toxchips wurden von Frau Saul im Rahmen ihrer Diplomarbeit hier am Institut durchgeführt (siehe auch Saul, 2004).

2.4. Gesamtgenomischer DNA-Microarray von *C. elegans*

Die Experimente mit dem gesamtgenomischen DNA-Microarray von *C. elegans* dienten der Auswahl relevanter Gene für den *C. elegans* Toxchip und wurden durch eine Kooperation mit dem Labor von Stuart Kim an der Stanford University in Kalifornien, USA möglich. Für diese Experimente wurde aus den entsprechenden Nematodenkulturen die mRNA hier in Deutschland präpariert und die Proben in der Regel anschließend mittels eines Kurierdienstes auf Trockeneis nach Stanford versendet, wo die eigentlichen Array-Experimente und die Auswertung abliefen. Für einen Teil der Experimente war es für mich möglich, persönlich in die USA zu fliegen und die Experimente eigenhändig durchzuführen. Für jedes untersuchte Xenobiotikum wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt mit Ausnahme von Atrazin, Fluoranthen und DES. Für Atrazin und Fluoranthen wurde jeweils die mRNA aus vier und für DES aus zwei unabhängigen Kulturen präpariert und für die Hybridisierungsexperimente eingesetzt.

2.4.1. RNA-Präparation

Die RNA wurde ursprünglich mit dem RNEasy Maxi Kit (Qiagen) präpariert. Da sich diese Methode jedoch als recht aufwendig und als nicht immer erfolgreich herausstellte, wurde das Verfahren im Verlauf dieser Arbeit geändert und der Aufschluss mit Trizol (Invitrogen) nach Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt.

RNA Präparation mit dem RNEasy Maxi Kit (Qiagen)

Die Nematodenpellets (siehe auch 2.1.3.) wurden auf Eis dem -80°C Tiefkühlschrank entnommen und das Probenvolumen bestimmt. Anschließend wurde der RLT-Puffer mit Mercaptoethanol (Sigma) unter dem Abzug in einem Verhältnis von 10 μl Mercaptoethanol pro 1ml RLT-Puffer versetzt und beides miteinander vermischt. Dieses Gemisch wurde auf die Proben in einem Verhältnis von 2,5 ml pro 1 ml Probe gegeben und alles gut gevortext. Da die Proben nicht warm werden durften, wurden sie zwischendurch immer wieder auf Eis gestellt. Pro 1 ml Wurmpellet wurden nun 1,5 ml Glasperlen in ein Homogenisationsfläschchen gefüllt, die Probenmischung darauf gegeben und das Fläschchen gut verschlossen. Das Homogenisieren erfolgte in einem Homogenisator (Typ 853032, Braun) in fünf Zyklen à 30 s, wobei darauf zu achten war, dass die Proben sich weder erwärmten, noch einfroren. Anschließend wurden die Proben in neue 50 ml Zentrifugenröhrchen

überführt, dabei wurden der sich bildende Schaum und die Flüssigkeit vorsichtig so in das Röhrchen gefüllt, dass möglichst keine Glasperlen mitkamen. Die restliche Probenflüssigkeit aus dem Homogenisationsfläschchen wurde mit Hilfe einer 100er oder einer 10er Pipette vorsichtig abgenommen und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Um möglichst wenig von dem homogenisierten Wurmpellet zu verlieren, wurden die Glasperlen anschließend noch zweimal mit je 5 ml RLT-Mercaptoethanol-Puffer gespült und der Überstand jeweils wieder vorsichtig vollständig in das Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurden die Zentrifugenröhrchen bei 4.000 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand in neue 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit gleichem Volumen 70 % Ethanol aufgefüllt. Anschließend wurden nach und nach bei Raumtemperatur 15 ml der mit Ethanol versetzten Probe auf im Kit enthaltene Säulenröhrchen gegeben. Diese wurden 5 min bei 4000 x g abzentrifugiert, die Säule entnommen, das Zentrifugat abgegossen, die Säule wieder auf das Röhrchen gesteckt und der Vorgang solange wiederholt, bis der gesamte Probeninhalt über die Säule gelaufen war. Zum Waschen wurde zunächst 15 ml RW1-Puffer auf die Säule aufgetragen, alles für 5 min bei 4000 x g zentrifugiert, das Zentrifugat anschließend verworfen, dann 10 ml RPE-Puffer auf die Säule aufgetragen, alles bei 4000 x g für 2 min zentrifugiert und das Zentrifugat wieder verworfen. Der Schritt mit dem RPE-Puffer wurde dann noch einmal wiederholt und abschließend die Säule bei 4000 x g für 5 min trocken zentrifugiert. Zum Eluieren wurde die Säule auf ein neues Röhrchen gesteckt, dann 1 ml RNase freies Wasser auf die Säule gegeben, das Ganze für 1 min stehen gelassen und abschließend bei 4000 x g für 3 min abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt. Danach wurde ein Aliquot entnommen und daraus eine geeignete Verdünnung für die Bestimmung der optischen Dichte (OD) am Fotometer hergestellt (siehe 2.4.3.).

RNA Präparation mit Trizol nach Chomczynski und Sacchi (1987)

Da Trizol (Invitrogen) Guanidinisothiocyanat und Phenol enthält, war es aus gesundheitlichen Gründen unabdingbar, die Präparationsschritte, bei denen das Trizol noch in den Proben enthalten war, unter dem Abzug durchzuführen.

Nach der Nematodenernte (2.1.3.) erfolgte direkt die Zugabe von vier Volumen Trizol pro einem Volumen Wurmpellet, die Lösung wurde 30 s gevortext und anschließend zur Lagerung bei -80°C eingefroren. Für die Weiterbearbeitung wurde die Lösung im

Wasserbad bei 37°C aufgetaut und dann direkt wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dieser Schritt wurde sechsmal wiederholt und diente dazu, die Nematodenzellen aufzubrechen. Anschließend wurden die Proben bei -80°C mindestens über Nacht eingefroren, am nächsten Tag aufgetaut und sechsmal für je 30 s gevortext. Die Proben wurden in neue 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann mit 2 ml Chloroform pro 1 ml Wurmpellet versetzt. Nach 15 s Schütteln mit der Hand, wurden die Proben 5 min bei 4000 x g zentrifugiert und die RNA aus der oberen wässrigen Phase in ein neues Röhrchen abpipettiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und die wässrige Phase diesmal in ein steriles 15 ml Corexröhrchen überführt. Nach Zugabe von einem Volumen Ethanol wurden die Proben bei -20°C über Nacht inkubiert und damit die RNA gefällt. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 4°C 20 min bei 10.000 x g in der Kühlzentrifuge (Sorvall, SS34 Rotor) zentrifugiert, der Überstand abgegossen, die Pellets mit 15 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, kurz bei 70°C im Wasserbad erwärmt und 5 min bei 10.000 x g in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt und die Pellets anschließend an der Luft getrocknet. Zum Eluieren wurde 200-1500 µl RNase freies A.bidest. in die Röhrchen gegeben und durch vorsichtiges Pipettieren das Pellet im Wasser resuspendiert. Zum weiteren Lösen wurde das Röhrchen für 1 min in ein 65-70°C heißes Wasserbad gehalten und das Eluat anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Für die Bestimmung der optischen Dichte (OD) am Fotometer wurde ein Aliquot entnommen und daraus eine geeignete Verdünnung hergestellt (siehe 2.4.3.)

2.4.2. mRNA-Präparation

Die Präparation erfolgte mit Hilfe des Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen), bzw. mit dem NucleoTrap mRNA Mini Kit (Macherey & Nagel) aus GesamtRNA (2.4.1.). Dieser Wechsel erfolgte aus finanziellen Erwägungen, da der Kit von Macherey & Nagel preiswerter war. Die Präparationsmethode ist für beide Kits nahezu identisch und unterscheidet sich lediglich in der Bezeichnung der zu verwendenden Puffer, sodass hier exemplarisch nur die Präparation mit Hilfe des Oligotex mRNA Mini Kits von Qiagen dargestellt wird.

Eine definierte Menge an RNA ($\leq 0,25$ mg) wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 250 µl gebracht und mit 250 µl OBB-Puffer und 15 µl Oligotexsuspension versetzt. Nachdem die Lösungen durch

vorsichtiges Pipettieren ausreichend miteinander vermischt waren, wurde das Reaktionsgefäß für 3 min bei 70°C in einem Heizblock (Eppendorf, Thermomixer 5436) erwärmt und anschließend bei Raumtemperatur für 10 min stehen gelassen. Dieser Schritt diente dazu, die Poly-A-Schwänze der mRNA mit den Oligotex-Partikeln zu verbinden. Zum Waschen der Proben wurden sie nach dem Pelletieren durch Zentrifugation bei 13.000 x g (Biofuge 13, Heraeus) für 2 min, wieder in 400 µl OW2-Puffer resuspendiert, die Suspension auf ein Zentrifugationssäulchen gegeben, für 1 min bei 13.000 x g zentrifugiert und der Waschschrift wiederholt. Das Eluieren erfolgte mit zweimal 20 µl auf 70°C erhitztem OEB-Puffer, dazu wurden 20 µl Puffer auf die Säule gegeben, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren das Oligotex resuspendiert, für 1 min bei 13.000 x g zentrifugiert und der Schritt wiederholt. Aus dem Eluat wurde ein Aliquot für die Bestimmung der mRNA-Konzentration entnommen und mittels eines Fotometers die optische Dichte bestimmt (siehe 2.4.3.).

2.4.3. Bestimmung der RNA- und mRNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA- und mRNA-Konzentration erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) am Spektralfotometer. Für diese Arbeit wurden zwei unterschiedliche Geräte verwendet, da im Verlauf der Arbeit ein neues Fotometer angeschafft werden konnte. Bei den Geräten handelt es sich zum einen um das Uvikon 810 von Kontron und zum anderen um das Specgene von Techne.

Zur Kalibrierung des Gerätes vor den eigentlichen Messungen wurde das Wasser, mit dem auch die Verdünnung der Proben angesetzt wurden, gemessen und als Nullwert festgesetzt. Aliquots der zu bestimmenden RNA-Proben wurden verdünnt und bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm vermessen. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass der OD-Wert für 260 nm zwischen 0,1 und 0,3 lag. Aus dem gemessenen OD-Wert bei 260 nm, der durch die Lichtabsorption der Basen hervorgerufen wird, wurde der RNA-Gehalt berechnet, dabei entspricht eine OD bei einzelsträngiger RNA einer Konzentration von 40 mg/ l. Für die Berechnung der konkreten RNA- und mRNA-Konzentration ergibt sich daraus folgende Gleichung:

$c \text{ RNA (mRNA) in mg/ l} = \text{gemessene OD bei 260 nm} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Die OD bei 280 nm gibt die Absorption der aromatischen Aminosäuren wieder und wird benutzt, um eine Aussage über die Reinheit der Probe zu erhalten. Idealerweise liegt das Verhältnis des OD₂₆₀-Wertes zum OD₂₈₀-Wert zwischen 1,8 und 2,0.

2.4.4. Reverse Transkription und Hybridisierung

Das eigentliche Array-Experiment bestand aus zwei Arbeitsschritten. Der erste Schritt umfasste die Umschreibung der mRNA (bei gleichzeitiger Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen) zu cDNA durch die Reverse Transkription. Der zweite Schritt war die eigentliche Hybridisierung, d.h. das Binden der markierten cDNA an die auf den Glasträger gespotteten DNA-Fragmente. Für die Markierung der Proben wurden die Fluoreszenzfarbstoffnukleotide Cy3-dUTP für die Kontrollprobe und Cy5-dUTP für die schadstoffinduzierte Probe verwendet. Der gesamte Umgang mit den Farbstoffen musste möglichst unter Lichtausschluss erfolgen, um ein vorzeitiges Ausbleichen zu vermeiden.

Reverse Transkription

Die Reverse Transkription ist ein Prozess, bei dem einsträngige RNA in komplementäre DNA umgeschrieben wird. Mit Hilfe eines Oligo (dT)-Primers, der an die Poly-A-Struktur am 3'-Ende der einzelsträngigen mRNA hybridisiert oder eines spezifischen Primers kann die Reverse Transkriptase die komplementäre cDNA synthetisieren (siehe Abbildung 6) und dabei u.a. farbstofftragende Nukleotide für die spätere Detektion mittels Fluoreszenzscanners einbauen. Bei der Reversen Transkriptase handelt es sich um ein genetisch verändertes Enzym, das aus bestimmten RNA-Tumorviren gewonnen wird. Das RNase-H-aktive Zentrum dieses Enzyms ist durch eine Deletion so verändert, dass die RNase-H-Aktivität um den Faktor 106-107 reduziert ist, die Polymerase-Aktivität jedoch voll erhalten bleibt.

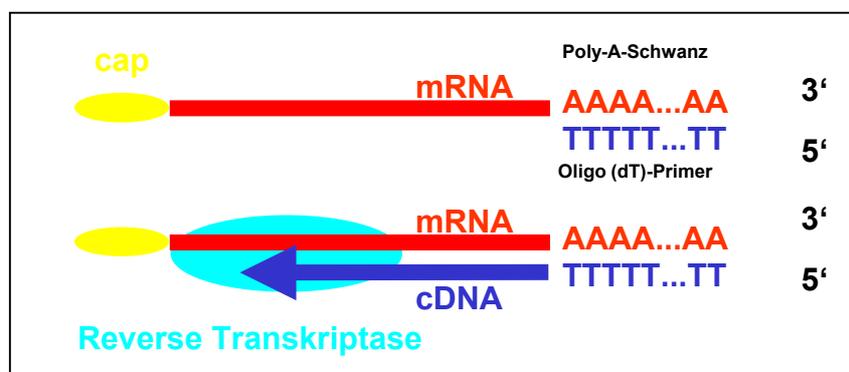


Abb. 6: Schematische Darstellung der Reversen Transkription
Die doppelsträngige cDNA wird aus der einzelsträngigen mRNA durch die Reverse Transkriptase synthetisiert. Als Startpunkt für die Reverse Transkriptase dient der Oligo (dT)-Primer, der an den Poly-A-Schwanz hybridisiert.

Eine definierte Menge an mRNA aus der Kontrollprobe und der korrespondierenden schadstoffinduzierten Probe von 3-5 µg in einem Volumen nicht größer als 5-8 µl wurde mit 1,5 µl eines 22-mer Oligo (dT)-Primer (TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTXN, wobei T = Thymin, X = jede Base außer T, N = jede Base bedeutet) in einer Konzentration von 2 µg/ µl (Operon) jeweils in ein RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit DEPC behandeltem A.bidest. auf ein Gesamtvolumen von 9,5 µl gebracht. Anschließend wurden sie im Heizblock bei 70°C für 10 min erhitzt und dann für 8 min auf Eis abgekühlt. Nach dem Abkühlen wurden zu den Proben folgende Substanzen hinzugegeben:

DEPC behandeltes A.bidest.	4,4 µl
Cy-dUTP 3/5 (25 mM, Amersham)	3 µl
RNase Inhibitor (40 U/ µl, Amersham)	1 µl
Superscript II Enzym (Invitrogen)	2 µl
Trimix (siehe 2.6.)	9,6 µl

Danach wurden die Proben bei 42°C im Heizblock für 1,5 h inkubiert. Zum Degradieren der RNA wurde 1,5 µl 1 M NaOH zugegeben, alles bei 65°C im Heizblock für 10 min inkubiert, anschließend sofort mit 1,44 µl 1 M HCl neutralisiert und zügig mit 35 µl 10 mM Tris (pH=7,4) (siehe auch 2.6.) verdünnt. Beide Proben wurden nun zusammengefasst, mit 500 µl Puffer PB (Qia-quick PCR Purification Kit, Qiagen) auf eine Qia-quick-Säule gegeben und 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, dann 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und alles 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der sich bildende Durchfluss wurde erneut verworfen und der letzte Schritt wiederholt. Anschließend wurde die Säule 1 min bei 14.000 x g trocken zentrifugiert und auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt. Zum Eluieren wurde 30 µl 10 mM Tris auf die Säule gegeben, das Ganze zum Einwirken für 1 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann die Säule mit dem Reaktionsgefäß für 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert und abschließend das Eluat in der SpeedVac eingetrocknet. Die eingetrocknete Probe wurde dann mit 17,5 µl 10 mM Tris gelöst, 1 µl carrierDNA (Hefe tRNA 20 µg/ µl, Roche), 4 µl 20x SSC (2.6.) und 0,5 µl 10% SDS (2.6.) hinzugefügt, die Probe bei 100°C für 1-2 min erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur für ca. 10 min abgekühlt.

Hybridisierung

Für die Hybridisierung, d.h. das Binden der markierten Proben an die gespotteten Fragmente auf dem Array, wurde der den Array tragende Objektträger in eine Hybridisierungskammer (Monterey Industries, siehe auch Abbildung 7) mit der Arrayseite nach oben gelegt. Um das Austrocknen des Arrays zu verhindern, wurde vorsichtig 50 µl 1x SSC an den Rand der Kammer pipettiert und abgewartet, dass es sich unter den Objektträger zieht. Anschließend wurde die Probe auf den Array aufgetragen, der Array mit einem staubfreien Deckgläschen abgedeckt, die Hybridisierungskammer gut verschlossen und zum Hybridisieren für 20 h ins Wasserbad bei 65°C gelegt.

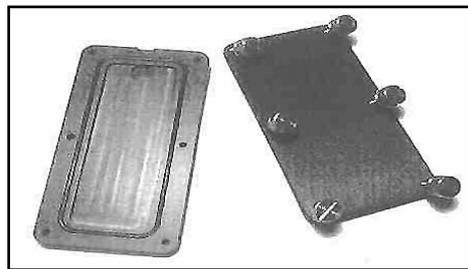


Abb. 7: Hybridisierungskammer

Nach der Hybridisierung mussten die Objektträger noch gewaschen werden. Dazu wurden drei unterschiedliche Waschpuffer hergestellt, deren Zusammensetzung Tabelle 2 zu entnehmen ist.

Tab. 2: Zusammensetzung der Waschpuffer

Waschpuffer	1	2	3
A.bidest.	840 ml	990 ml	1000 ml
20x SSC	150 ml	10 ml	-
10% SDS	10 ml	-	-
Zeit	1 min	1 min	1 min

Die drei Waschpuffer wurden in Färbekammern mit einem Volumen von 250 ml gefüllt, die Objektträger mit Deckgläschen in ein passendes Färbegestell überführt und für 1 min im Waschpuffer 1 hin- und hergeschwenkt, wobei u.a auch die Deckgläschen von den Objektträgern abgeschwemmt wurden. Anschließend wurden die Objektträger in ein neues Färbegestell überführt und für 1 min im Waschpuffer 2 gewaschen. Aus dieser Färbekammer wurde das Gestell mit den Objektträgern direkt in die letzte Färbekammer, gefüllt mit Waschpuffer 3, getaucht und dort ebenfalls für 1 min gewaschen. Abschließend wurde das Gestell mit den Objektträgern in einer

Klinikzentrifuge für 5 min bei 600 rpm trocken zentrifugiert und die Objektträger bis zum Scannen dunkel und trocken aufbewahrt.

2.4.5. Datengewinnung und Auswertung

Zur Gewinnung von Daten wurden die Arrays mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners (Axon) gescannt und die erhaltenen Bilder mit dem Programm Genepix Pro 3.0 bearbeitet. Die so ermittelten Daten wurden in die Stanford Microarray Datenbank (SMD: <http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/login.pl>) eingeladen und, wie bei Sherlock et al. (2001) beschrieben, analysiert. Die eigentliche Evaluation der Daten erfolgte nach den Richtlinien auf der Homepage von Stuart Kim (http://cmgm.stanford.edu/~kimlab/data_analysis.html). Wie bei anderen Autoren beschrieben (Coller et al., 2000; Bartosiewicz et al., 2001; Larkin et al., 2003) wurden bei der Auswertung nur Gene berücksichtigt, deren Expression oder Repression gleich oder über dem zweifachen Wert im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen lagen. Die Induktionsdaten werden als Mittelwert \pm Standardfehler vom Mittelwert (SEM) von allen Experimenten dargestellt.

2.5. Celegans Toxchip

Für die Entwicklung des Celegans Toxchips war ursprünglich eine Kooperation mit der Firma Biotex geplant, deren Genchips auch Verwendung in dieser Arbeit finden sollten. Das Grundprinzip dieser Chips bestand darin, auf einen mit Streptavidin beschichteten Objektträger in vorgegebene Vertiefungen die mit einem Biotinanhang versehenen selektierten Genfragmente mit Hilfe einer Pipette, bzw. eines Handspotters aufzutragen. Dieses System inklusive eines Protokolls für die eigentliche Hybridisierung stellte sich jedoch nach einigen Vorversuchen als nicht erprobt heraus und wurde nach persönlichen Gesprächen mit Mitarbeitern des Labors von Stuart Kim und Pat Brown von der Stanford University in Kalifornien, USA, sowie durch eigene Literaturrecherchen durch ein bereits etabliertes System ersetzt. Neben der Möglichkeit, standardisierte Protokolle zu erhalten, besitzt dieses etablierte System den großen Vorteil, dass es weltweit in den verschiedensten Laboren erprobt ist und damit auch die gewonnenen Daten besser vergleichbar sind. Diese Systemumstellung auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasobjektträger machte es jedoch nötig, eine Kooperation mit einem Institut zu etablieren, die geeignete Spottinggeräte und Fluoreszenzscanner für die Auswertung der Genchips, sowie die

entsprechende Auswertungssoftware zur Verfügung stellen konnten. Durch persönliche Kontakte fand sich mit dem Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, sowie im späteren Verlauf mit dem Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité diese Möglichkeit.

2.5.1. Die Gene des Celegans Toxchips

2.5.1.1. Genselektion und Auswahl von Kontrollen für den Celegans Toxchip

Die Genselektion für den Celegans Toxchip erfolgte auf Grundlage der Experimente mit dem gesamtgenomischen DNA-Array des Labors von Stuart Kim in Stanford, Kalifornien (siehe 2.4.), wurde ergänzt durch Hinweise aus der Literatur sowie durch Ergebnisse aus Untersuchungen von Menzel et al. (2001). Es konnten insgesamt 66 Gene selektiert werden (eine ausführliche Aufstellung der Gene findet sich unter 3.2.1., Tabelle 10), wobei zwei davon, das *ama-1* und *act-3*, als so genannte Housekeeping-Gene fungieren. Housekeeping-Gene sind solche Gene, die konstitutiv expremiert werden (Grundfunktionen des Stoffwechsels und zelluläre Struktur, z.B. Aktin) und können für die Expressionskontrolle als quantitativer Standard eingesetzt werden. Zusätzlich zu den ausgewählten Genen wurden Kontrollen auf den Chip gespottet, um eine Rückmeldung über die Güte der Hybridisierung zu erhalten. Sie beinhalten sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen. Eine Auflistung der Kontrollen enthält Tabelle 3.

Tab. 3: Auf den Celegans Toxchip aufgespottete Hybridisierungskontrollen

Bezeichnung	Beschreibung	Konzentration.
K10	Genom. DNA	10 µg
K6	Genom. DNA	6 µg
K4	Genom. DNA	4 µg
K2	Genom. DNA	2 µg
K1	Genom. DNA	1 µg
K0,5	Genom. DNA	0,5 µg
14/ 4,0	C44H4.3	4 µg
14/ 2,0	C44H4.3	2 µg
14/ 1,0	C44H4.3	1 µg
14/ 0,5	C44H4.3	0,5 µg
56/ 2,0	F59D8.1	2 µg
56/ 1,0	F59D8.1	1 µg
56/ 0,5	F59D8.1	0,5 µg
SP-1	Spottingpuffer	-
SP-2	Spottingpuffer	-
SP-3	Spottingpuffer	-

2.5.1.2. Genamplifikation

Die Amplifikation der ausgewählten Gene (siehe Abschnitt 3.2., Tabelle 10) in ausreichender Konzentration für das spätere Spotten der Genfragmente auf den Objektträger erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Dabei musste jedoch zuerst für jedes ausgewählte Gen ein passendes Primerpaar entworfen werden (2.5.1.3.), welches dann bei der PCR eingesetzt, das entsprechende Genfragment amplifizierte.

Für Genfragmente, die sich mit Hilfe der PCR nur schwierig amplifizieren ließen, wurde eine Klonierung (2.5.1.6.) in ein Plasmid vorgenommen, da sie sich dadurch anschließend deutlich leichter in ausreichender Konzentration herstellen ließen.

Es wurden Testspaltungen (2.5.1.7.) durchgeführt, um sicherzustellen, dass es sich bei den Genfragmenten um die richtigen Fragmente handelt. Am Ende wurden die Proben gereinigt (2.5.1.8.), um zu verhindern, dass unerwünschte Beiprodukte wie Primer oder Nukleotide beim Spotten mit auf den Array kamen sowie die Konzentration der Proben bestimmt (2.5.1.9.).

2.5.1.3. Primerdesign

Primer sind kurze Nukleinsäuremoleküle, sog. Oligonukleotide, die an einer vorhandenen Nukleinsäure-Matrize hybridisieren und an die z.B. während der Polymerase Kettenreaktion (PCR) eine DNA-Polymerase ansetzen kann. Durch den Einsatz spezifischer Primer kann so die zu amplifizierende Zielsequenz festgelegt werden.

Für das Design der Primer wurden zunächst die entsprechenden gespliceten, d.h. die kodierenden Regionen enthaltenden Sequenzen der selektierten Gene aus der Wormbase Datenbank (www.wormbase.org/) in das Programm SEC Central eingeladen und dort mit Hilfe des Primer Designers die entsprechenden Primersequenzen ausgewählt. Diese Sequenzen wurden nun mit Hilfe der Online Datenbank Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) auf ihre möglichen Bindungsstellen im Gesamtgenom von *C. elegans* überprüft, um sicherzustellen, dass die Primer wirklich nur an den entsprechenden Genorten binden. Nachdem diese Kontrolle erfolgreich war, konnten die Primer über entsprechende Anbieter (Invitrogen, Biotex, Operon, Sigma Ark) bezogen werden. Die Lieferung der Primer erfolgte in kristalliner Form, sodass sie für die weitere Verwendung zunächst mit RNase freiem A.bidest. in Lösung gebracht werden mussten. Die Zugabe des

A. bidest erfolgte dabei so, dass sich eine Endkonzentration der Primerlösung von jeweils 50 μ M ergab.

Für 21 Primerpaare der insgesamt 63 war es nicht möglich, das richtige Genprodukt zu amplifizieren. Durch eine Kooperation mit Joanne Staines vom Sanger Institut in Hinxton, England, konnten jedoch neue Primersequenzen bezogen werden, die eine erfolgreiche Amplifizierung möglich machten. Für drei der Vitellogenin Gene (*vit-3* = F59D8.1, *vit-4* = F59D8.2 und *vit-5* = C04F6.1) konnten die Primer nur so entworfen werden, dass das entstehende Produkt für alle drei Gene identisch ist. Gleiches gilt für die beiden Cytochrom P450 Gene 31A1 (= C01F6.3) und 31A2 (= H02I12.8).

Eine ausführliche tabellarische Übersicht über die Produktlänge der durch die spezifischen Primer gebildeten Genfragmente, sowie die Sequenz der Primer findet sich im Anhang.

2.5.1.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, auch geringste Mengen an DNA zu amplifizieren, sodass sie anschließend in nachweisbaren Konzentrationen vorliegt. Die gesamte Reaktion basiert dabei auf drei Teilschritten mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen. Im ersten Schritt (Denaturierung) wird die als Template eingesetzte doppelsträngige DNA oder cDNA in Einzelstränge aufgeschmolzen. Beim zweiten Schritt (Annealing) hybridisieren die beiden Primer mit den einzelsträngig vorliegenden DNA-Strängen und dienen damit im dritten Schritt (Extension) der DNA-Polymerase als Startmoleküle für das Kopieren der beiden Stränge. Durch die beständige Wiederholung dieser Schritte kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der Produktkonzentration, also zu einer deutlichen Anreicherung der Produkte im Reaktionsgefäß.

Als Template wurden in dieser Arbeit verschiedene cDNAs von *C. elegans* sowie im späteren Verlauf auch die PCR-Produkte aus diesen cDNAs verwendet. Weiterhin wurde mit zwei unterschiedlichen Polymerasen gearbeitet, zum einen mit der HotStarTaq-Polymerase von Qiagen, zum anderen mit der Taq-Polymerase von Promega.

Für einen 20 μ l PCR Ansatz wurden folgende Substanzen in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

Substanz:	HotstarTaq	Promega Taq
MgCl ₂ -Puffer (15mM MgCl ₂)	2,0 µl	2,0 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,4 µl	0,4 µl
Polymerase	0,1 µl	0,15µl
A.bidest.	16,1 µl	14,85µl
Primer 1 (50 µM)	0,2 µl	0,2 µl
Primer 2 (50 µM)	0,2 µl	0,2 µl
Template (cDNA)	1,0 µl	1,0 µl

Andere Templatevolumen konnten durch Ausgleich der Differenz mit dem entsprechenden Volumen A. bidest. eingesetzt werden. Für den Ansatz mehrerer PCRs gleichzeitig bewährte sich das Herstellen eines Mastermixes aus A. bidest., Puffer, dNTP-Mix und Polymerase.

Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt, wobei dabei drei Geräte mit unterschiedlichen Fassungskapazitäten zur Verfügung standen (UNO von Biometra, Progene und Touchgene Gradient von Techne), die je nach Verfügbarkeit oder Größe des Ansatzes eingesetzt wurden. Es wurden 25-35 Zyklen gefahren, die jeweils drei Schritte beinhalteten:

1. Denaturierung: 1 min bei 94°C
2. Annealing: 1 min bei 45-64°C
3. Extension: 1 min bei 72°C

Nach dem letzten Zyklus wurde ein Endsyntheseschritt von 10 min bei 72°C angehängt. Für die HotStarTaq-Polymerase musste vor dem ersten Denaturierungsschritt einmalig ein Hitzeschritt von 15 min bei 95°C für die Aktivierung der Polymerase durchgeführt werden. Die Annealingtemperaturen für die einzelnen Primer waren unterschiedlich, da sie vom Gehalt an Guanin (G) und Cytosin (C) des jeweiligen Primers, sowie von seiner Länge abhängig sind. Die Berechnung der Annealingtemperatur T_s erfolgte nach Sambrook et al. (1989) unter Verwendung folgender Gleichung:

$$T_s = 69,3 + 0,41 (G+C) - 650/n$$

G+C: prozentualer Anteil G und C des Primers
n: Primerlänge in Basen

In der Praxis wurden Primer mit ähnlichen Annealingtemperaturen in Gruppen zusammengefasst und jeweils die niedrigste Temperatur abzüglich einem Grad Celsius als Annealingtemperatur für die Gruppe ausgewählt. Die Qualität der durch die PCR gewonnenen Produkte wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese (2.5.1.5.) überprüft und die Proben anschließend bei -20°C gelagert.

2.5.1.5. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese kam in vielen Bereichen dieser Arbeit zur Anwendung, u.a. wurde sie zur Größen- und Qualitätsbestimmung, aber auch für die Reinigung von PCR-Produkten eingesetzt.

Die Konzentration des Agarosegels wurde in Abhängigkeit der Größe der zu untersuchenden Fragmente ausgewählt. Für Fragmente bis 500 Basenpaare (Bp) wurde ein 1,5%iges, für Fragmente im Bereich von 500-1500 Bp ein 1%iges und für Fragmente von Längen weit über 1000 Bp ein 0,7%iges (w/v) Agarose-Gel eingesetzt. Die Agarose (SeaKem LE, BMA) wurde in 1x TAE-Puffer (Sambrook et al., 1989) unter Erhitzen gelöst, nach Abkühlen auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid (Roth) versetzt (Endkonzentration 0,75 µg/ ml) und in den zusammengesetzten Gelträger gegossen. Da Ethidiumbromid als krebserregend gilt, wurden alle Gelarbeiten mit Nitrilhandschuhen (Roth) durchgeführt um eine eventuelle Aufnahme des Stoffes durch die Haut auszuschließen. Nachdem das Gel bei Raumtemperatur fest geworden war, wurde es mit dem Gelträger in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer soweit mit 1x TAE-Puffer gefüllt, bis das Gel gerade bedeckt war. Die aufzutragenden Proben wurden im Verhältniss von 1:10 mit Probenverdünnungspuffer (Sambrook et al., 1989) vermischt, von oben einzeln in die Taschen des Gels hineinpipettiert und bei einer Spannung von rund 100 V getrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein Größenstandard (1 Kb DNA Ladder, Invitrogen) auf das Gel aufgetragen und gemeinsam mit den Proben laufen gelassen. Das in das Gel gegebene Ethidiumbromid, welches durch Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert, lagert sich dabei zwischen die Basen der laufenden Proben ein und ermöglicht später bei der Auswertung die Detektion der Banden.

Zur Dokumentation wurde das Gel anschließend aus der Elektrophoresekammer genommen, die einzelnen Banden durch UV-Licht (Multimage Light Cabinet, Alpha Innotech) sichtbar gemacht, das Gel mittels einer Kamera aufgenommen und dieses Gelbild in einen an die Kamera angeschlossenen Rechner geladen. Dort konnte es mit Hilfe des Alphamager Programms (Alpha Innotech) bearbeitet und ausgewertet werden.

2.5.1.6. Klonierung

Für einige Gene war es schwierig, durch PCR allein eine ausreichende Konzentration für das spätere Spotten auf dem Celegans Toxchip zu gewinnen. Für diese Gene wurde das durch PCR gewonnene gereinigte Produkt in das *E. coli* Plasmid pGEM-T (Promega) kloniert, um anschließend mit diesen Plasmiden als Template die PCR durchführen zu können. Dieses führte zu einer deutlich höheren Ausbeute an Amplimeren. Gleichzeitig ermöglichte dieses Verfahren das Anlegen einer stabilen Templatekonserve für das entsprechende Genfragment. Die Klonierung umfasste insgesamt vier Schritte, zum einen das Herstellen chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen, die Ligation des fraglichen Fragments in den Vektor pGEM-T und die daran anschließende Transformation in die kompetenten *E. coli*-Zellen, sowie abschließend die Präparation des Genfragmenttragenden Plasmids aus *E. coli*.

Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen

Für die spätere Transformation wurden *E. coli*-Zellen benötigt, deren Membranen temporär für Fremd-DNA durchlässig sein mussten. Für die Herstellung dieser so genannten chemisch kompetenten Zellen wurde 0,1 ml einer Glycerolstammlösung des *E. coli*-Stamms TOPO10F (Invitrogen) in 10 ml LB-Medium (siehe 2.6.) gegeben und mindestens drei Stunden bei 37°C geschüttelt. 1 ml dieser Kultur wurden in 50 ml LB-Medium überführt und so lange bei 37°C geschüttelt, bis die OD bei 600 nm einen Wert von 0,4 bis 0,6 erreicht hatte. 40 ml dieser Kultur wurden in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt, 15 min auf Eis abgekühlt und bei 4°C mit 3000 x g für 8 min zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde in 20 ml eiskaltem TFB-Puffer (siehe 2.6.) resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut für 8 min bei 4°C mit 3000 x g abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 4 ml eiskaltem TFB-Puffer resuspendiert und für 5 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde die Zellsuspension tröpfchenweise mit 140 µl DTD-Lösung (siehe 2.6.) versetzt, alles vorsichtig geschwenkt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Wiederholung dieses Vorgangs waren die Zellen bereit für die Transformation.

Ligation und Transformation

Zunächst musste das zu klonierende Fragment in einen Vektor ligiert werden. Dazu wurde folgender Ansatz mit Hilfe des pGEM-T-Vektor-Kits (Promega) in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

2 x Rapid Ligationspuffer	5 μ l
pGEM-T-Vektor (50 ng)	0,5 μ l
PCR-Produkt	3,5 μ l
T4 DNA Ligase (3 units/ μ l)	1 μ l

Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

Für die Transformation wurden zum Ligationsansatz 200 μ l der kompetenten Zellen zugegeben, alles für 30 min auf Eis inkubiert, dann für 90 s in einem Heizblock bei 42°C erhitzt und anschließend weitere 2 min auf Eis abgekühlt. Nach dem Abkühlen wurde 1 ml eines auf 37°C erwärmten SOC-Mediums zugefügt und der Ansatz 1 h bei 37°C im Schüttelheizblock inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz 5 min bei 1500 x g zentrifugiert, der Überstand bis auf 100 μ l verworfen und das Sediment darin resuspendiert. Für die spätere Selektion wurde jede Probe auf einer mit Ampicillin-Stammlösung (siehe 2.6.) versetzten LB-Platte mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert. Zur Durchführung des Blau/ Weiß-Tests wurde bereits 30 min vorher auf jeder Platte 40 μ l X-GAL (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid, 20 mM, Sigma) und 4 μ l IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid, 1 M, Sigma) ausgespatelt. Die Platte wurde über Nacht im Brutschrank bei 37°C bebrütet.

Da der zur Ligation eingesetzte Vektor ein Gen zur Ampicillinresistenz enthält, überlebten nur Bakterien, die diesen Vektor enthielten und es konnten so die Zellen, bei denen die Transformation nicht funktioniert hat, ausselektiert werden. Der Blau/ Weiß-Test diente zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation. Der pGEM-T-Vektor enthält ein *lacZ*-Gen, in welchem sich die Klonierungsstelle befindet. War die Ligation erfolgreich, so konnte das *lacZ*-Gen keine funktionierende β -Galactosidase mehr exprimieren, da es durch das eingesetzte Fragment unterbrochen wurde und die entsprechenden Kolonien erschienen weiß. Besaß eine Kolonie noch ein intaktes *lacZ*-Gen, wurde dieses durch das aufgespatelte IPTG induziert und die synthetisierte β -Galactosidase hydrolysierte das als Substrat dienende X-GAL zu einem blauen unlöslichen Farbstoff, woraufhin die Kolonien blau erschienen.

Plasmidpräparation aus E. coli

Die Plasmidpräparation nach Del Sal et al. (1988) wurde zur Isolierung der Plasmide aus den Kolonien eingesetzt. Dazu wurde eine weiße Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher von der oben erwähnten LB-Platte gepickt, in ein Reagenzglas mit 2 ml LB-Medium und Ampicillin (50 µg/ml) gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Zur Ernte wurden 1,5 ml der Bakterienkultur in ein Reaktionsgefäß überführt und 30 s bei 13.000 x g zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus). Der Überstand wurde mit einer Vakuumpumpe entfernt, das Zellpellet in 0,2 ml STET-Puffer (siehe 2.6.) und 10 µl Lysozym-Stammlösung (20 mg/ml, Sigma) aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Protein-Denaturierung wurde die Suspension 90 s im Heizblock erhitzt, anschließend 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert und das sich bildende Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Zum Überstand wurden 8 µl 37°C warmes CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid, kationisches Detergenz, 5% w/v, Sigma) gegeben, gemischt und 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und das Pellet in 300 µl 1,2 M NaCl gelöst. Die Lösung wurde mit 750 µl Ethanol (100%) versetzt, über Kopf geschüttelt und 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit 250 µl Ethanol (70%) gewaschen. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 13.000 x g wurde der Überstand vollständig abpipettiert und das Pellet getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 25 µl TE-Puffer und 0,05 µl Rnase A-Stammlösung (siehe 2.6.) 5 min angelöst, gemischt, 20 min bei 37°C inkubiert, erneut gemischt und kurz abzentrifugiert.

Zusammen mit einer Plasmidkontrolle wurden die Proben mit Hilfe der Gelelektrophorese (2.5.1.5.) überprüft und anschließend mittels PCR amplifiziert.

2.5.1.7. Testspaltung

Um abzusichern, dass das erhaltene PCR-Produkt auch dem gewünschten Genfragment entspricht, wurden Testspaltungen durchgeführt. Die in Frage kommenden Sequenzen der Genfragmente wurden aus der Datenbank WormBase (www.wormbase.org/) in das Programm SECentral (Scientific Educational Software) geladen, die entsprechenden Restriktionsorte ausgewählt und die durch das Schneiden entstehenden Fragmentlängen für die spätere Auswertung mittels Gelelektrophorese bestimmt. Bei Festlegung der Restriktionsorte ist darauf zu achten, dass die entstehenden Fragmente nicht zu klein und gut voneinander zu trennen sind und die entsprechend den ausgewählten Orten vorgegebenen Restriktionsenzyme mit demselben Puffer arbeiten können. Für die Testspaltung wurde folgender Ansatz pipettiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert:

PCR-Produkt	1 µl
Puffer	1,5 µl
Restriktionsenzym 1	0,2 µl
Restriktionsenzym 2	0,2 µl
A.bidest.	12,1 µl

Die Größe der durch die Restriktion erhaltenen Fragmente wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese (2.5.1.5.) ermittelt und die so erhaltenen Längen mit denen durch das Programm SECentral berechneten verglichen. Als Größenstandard wurde eine 200 Bp-Leiter verwendet. Die Abbildung 8 zeigt am Beispiel des Gens K09D9.2 die Ergebnisse einer Restriktionsanalyse.

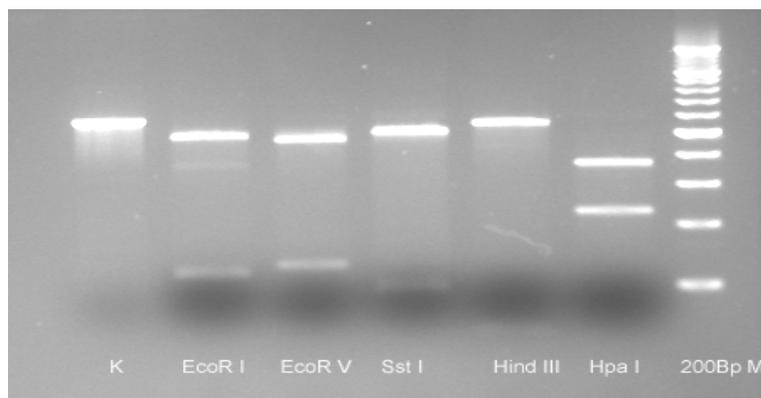


Abb. 8: Restriktionsanalyse des Gens K09D9.2 mit den Restriktionsenzymen EcoR I und V, Sst I, Hind III und Hpa I, wobei K das ungeschnittene Fragment ist und M der Marker.

2.5.1.8. Reinigung der Genfragmente

Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick 8 PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt, um z.B. überschüssige Primer zu eliminieren. Diese Vorgehensweise gewährleistete, dass beim späteren Spotten wirklich nur die jeweiligen Genfragmente auf den Chip aufgebracht wurden.

Die 6 x 8 Säulen fassende Apparatur wurde mit Hilfe eines Vakuumregulators (Qiagen) an eine Vakuumpumpe angeschlossen, die gewünschte Anzahl an Säulen in die entsprechenden Halterungen gesteckt, die zu reinigenden Proben auf die Säulen gegeben und mehrmals mit den jeweils vorgesehenen Puffer gewaschen. Dabei wurden Fragmente ab einer Länge von 100 Bp von dem Säulenmaterial zurückgehalten und kleinere Fragmente wie Primer und Nukleotide, aber auch Polymerasen und Salze ausgewaschen. Die vom Säulenmaterial zurückgehaltenen Genfragmente wurden abschließend zweimal mit 20 bis 40 µl A.bidest (pH 7,5) eluiert. Für spätere Konzentrationsberechnungen wurde das Volumen des Eluats notiert. Eine ausführlichere Anleitung befindet sich im QIAquick Spin Handbuch (Qiagen, Stand März 2001).

Eine weitere Möglichkeit der Reinigung, die nur für einzelne Genfragmente eingesetzt wurde, ist die Reinigung aus dem Agarosegel. Dazu wurde die zu reinigende Probe zunächst auf ein Agarose-Gel aufgetragen und nach Beendigung der Gelelektrophorese (2.5.1.5.) das Gel zum Sichtbarmachen der Banden auf einen UV-Leuchttisch (FluoLink) gelegt, die zu reinigende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Reinigung wurde mit dem von Amersham erhältlichen „GFX PCR DNA und Gel Band Purification Kit“ durchgeführt. Das Gelstück wurde zusammen mit dem im Kit enthaltenen Capture Buffer bei 60°C gelöst und auf eine GFX-Säule gegeben. Es wurde kurz zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus) und mit einem Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurde zweimal mit je 25 µl A.bidest eluiert. Eine detaillierte Beschreibung ist im Amersham-Handbuch nachzulesen.

Mit Hilfe der Gelelektrophorese (2.5.1.5.) wurde die Qualität der gereinigten Fragmente im Hinblick auf Verunreinigungen, aber auch auf korrekte Fragmentlänge überprüft.

2.5.1.9. Konzentrationsbestimmung der Genfragmente

Zur Quantifizierung der gereinigten PCR-Fragmente wurde zunächst eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 ng/ μ l hergestellt. Dazu wurden 10 μ l des DNA QuantStandard (100 ng/ μ l, 1000 Bp, Gensura) und 90 μ l TE-Puffer in ein Reaktionsgefäß pipettiert und gut miteinander vermischt. Die als Konzentrationsreihe eingesetzten Standards von 10, 20, 40 und 80 ng wurden wie folgt hergestellt:

Standard	Stammlösung	PVP	TE-Puffer
10 ng:	1 μ l	1 μ l	7 μ l
20 ng:	2 μ l	1 μ l	6 μ l
40 ng:	4 μ l	1 μ l	4 μ l
80 ng:	8 μ l	1 μ l	—

Je 2 μ l einer gereinigten PCR-Probe wurden mit 0,2 μ l Probenverdünnungspuffer (PVP, siehe 2.6.) vermischt und zusammen mit den Mengenstandards und einem Größenstandard (1 Kb-Leiter, Gibco BRL) auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die Konzentration in den einzelnen Proben wurde mit Hilfe des Programms AlphaImager (AlphaInnotech, USA) im Abgleich mit den mitgeführten Standards anhand der Leuchtintensität der Banden ermittelt. Der Gesamtgehalt sollte bei ca. 5000 ng liegen, um für das Spotten eine Konzentration von 300 ng/ μ l bei einem Volumen von 20 μ l zu erreichen. Bis zur Herstellung der Genchips wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.5.2. Herstellung des Celegans Toxchips

Die Herstellung der Genchips untergliederte sich in drei Phasen. Zunächst wurden die verwendeten Glasobjektträger mit Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet (2.5.2.1.) um eine gute Bindekapazität für die aufzuspottenden Genfragmente zu erhalten. Anschließend wurden die Genfragmente auf die beschichteten Objektträger gespottet (2.5.2.2.) und die kovalente Bindung zwischen den Genfragmenten und der beschichteten Chipoberfläche durch so genanntes Crosslinken mit UV-Strahlung fixiert (2.5.2.3.).

2.5.2.1. Beschichtung der Objektträger mit Poly-L-Lysin-Lösung

Bevor die Objektträger (25 x 75x 1 mm, SuperFrostPlus, Menzel-Gläser) mit Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet werden konnten, mussten sie zunächst gereinigt werden. Dazu wurde eine Waschlösung aus 61,25 g NaOH, 245 ml A.dest. und 367,5 ml Ethanol (100%) hergestellt. Die Waschlösung wurde auf eine große und eine kleine Färbekammer aufgeteilt, 30 Objektträger in zwei Objektträgerhalter eingeordnet und diese in die Kammern gestellt. Nachdem sie zwei Stunden auf einem Orbitalshaker (Typ VX7, Janke & Kunkel) geschüttelt worden waren, wurden die Objektträger in neue, mit frischem A.dest. gefüllte Kammern überführt und gewaschen. Dieser Waschvorgang wurde viermal mit frischem Wasser wiederholt. Für die Herstellung der Poly-L-Lysin-Lösung wurden 52,5 ml Poly-L-Lysin (0,1% w/v in Wasser, Sigma), 52,5 ml PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma) und 420 ml A.dest. zusammengegeben und gut vermischt. In der Lösung wurden die Objektträger ca. 60 min geschüttelt. Danach wurden die Objektträger zweimal mit A.dest. gewaschen, einzeln in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) 5 min bei 40 x g zentrifugiert (Zentrifuge 3-1, Sigma) und abschließend in einem Vakuumofen (Hybaid, Biometra) bei 45°C 10 min gut getrocknet.

2.5.2.2. Spotten der Arrays

Das Spotten wurde am MPI für Infektionsbiologie, Berlin, in der Microarrayabteilung von Dr. Mollenkopf von Jörg Angermann durchgeführt.

Vor dem Spotten wurden die gereinigten Genfragmente in einer Speedvac eingetrocknet, um dann in Spottingpuffer (0,01% Sarcosyl, 15 mM Natriumphosphatpuffer) aufgenommen und in eine 384 Multiwellplatte überführt zu werden. Für das Spotten wurde der Spottingroboter MicroGrid II von BioRobotics

(siehe Abbildung 9) verwendet. Dieser platziert mittels Kapillarkraft die einzelnen Spots in definierter Reihenfolge auf die mit Poly-L-Lysin-Lösung beschichteten Chips. Jedes Gen wurde dabei pro Array viermal nebeneinander gespottet. Pro Genchip wurden zwei Arrays angelegt.



Abb. 9: Spottingroboter MicroGrid II von BioRobotics

2.5.2.3. Nachbehandlung der Arrays

Um die Ergebnisse der späteren Hybridisierung zu optimieren, wurden die Chips zunächst über Wasserdampf gehalten, bis sie beschlugen. Anschließend wurden sie auf einer Heizplatte mit der Array tragenden Seite nach oben bei ca. 80°C einige Sekunden getrocknet. Das Fixieren der kovalenten Bindung zwischen den PCR-Produkten und der beschichteten Chipoberfläche erfolgte durch Crosslinken unter UV-Licht bei einer Energie von 240 mJ. Zum Blocken freier Valenzen wurden die Chips 20 min unter Rühren in eine Lösung aus 3,3 g Bernsteinsäureanhydrid (Aldrich), 205 ml 1-Methyl-2-pyrrolidinone (Aldrich) und 4,6 ml Natriumborat (1 M, pH 8,0) getaucht. Danach wurden die Chips zum Denaturieren und Waschen mehrmals in 95°C heißem A.bidest. geschwenkt und abschließend getrocknet.

2.5.3. RNA-Präparation

Die RNA-Präparation erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) wie bereits unter 2.4.1. beschrieben. Eine anschließende mRNA-Isolierung erwies sich in ersten Vortests als unnötig, da äquivalente Ergebnisse mit weniger Kosten- und Zeitaufwand mit der Gesamt-RNA erzielt werden konnten.

2.5.4. Reverse Transkription und Hybridisierung

Da die Reverse Transkription und Hybridisierung bereits ausführlich unter 2.4.4. beschrieben wurde, wird im Folgenden nur näher auf die speziellen Modifikationen des Celegans Toxchip eingegangen. Da erste Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip u.a. unter Verwendung des CyScribe cDNA Post Labelling Kits (Amersham) sowie später durch direkte Verwendung des Stanforder Protokolls (2.4.4.), nicht zum erwünschten Erfolg führten, wurde das Verfahren nach Gesprächen mit Mitarbeitern des MPI für Infektionsbiologie sowie mit Mitarbeitern des MPI für Molekulare Genetik wie nachfolgend dargestellt erfolgreich abgewandelt. Vor Verwendung der RNA wurde diese mittels Gelelektrophorese überprüft, um sicherzustellen, dass sie nicht degradiert ist (Abbildung 10).

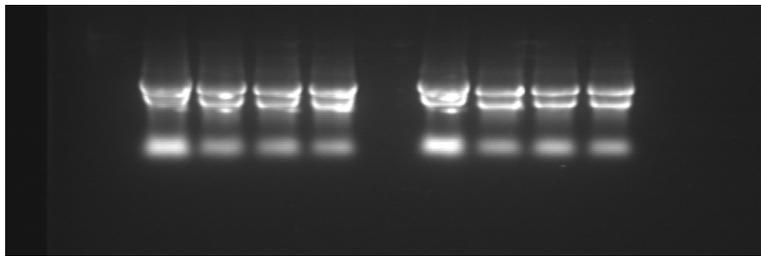


Abb. 10: Isolierte RNA aufgetragen auf ein 0,7%iges Agarose-Gel. Die distinkten Banden stellen die rRNA dar, die ca. 75-80% der Gesamt-RNA ausmacht. Die oberste Bande wird durch die 28S-rRNA, die mittlere durch die 18S-rRNA und die unterste Bande durch die 5,8S-rRNA hervorgerufen. Diese charakteristischen Banden der Proben zeigen, dass die RNA nicht durch Abbauprozesse degradiert worden ist.

Weiterhin wurde durch eine Bestimmung der optischen Dichte am Fotometer (2.4.3.) direkt vor Verwendung der RNA abgesichert, dass für die Reverse Transkription Gesamt-RNA in einer Menge von 25 µg in einem Volumen von 5-6,5 µl eingesetzt wurde. Nach der cDNA-Synthese und anschließender RNA-Degradation wurden die Proben mit 1,44 µl 1M HCl neutralisiert und mit 500 µl TE-Puffer (2.6.) verdünnt. Jede Probe wurde nun auf eine Microcon-30-Säule (Amicon) gegeben und alles 12 min bei 12.000 x g zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus). Nach einem Waschen der Säulen mit 500 µl TE-Puffer und anschließender Zentrifugation von 12 min bei 12.000 x g, wurden die Säulen umgedreht in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und 5 min bei 700 x g zentrifugiert. Dann wurden die jeweilige Kontrolle und Probe zusammen in ein Reaktionsgefäß gegeben, 1 µl Hefe tRNA (20 µg/ µl) hinzugefügt und in der Speedvac soweit eingeeengt, bis sie fast trocken war. Anschließend wurde sie mit ca. 30 µl DigEasyHyb-Puffer (Roche) wieder

aufgenommen, zum Auftrennen der Doppelstränge für 3 min bei 95°C im Heizblock erhitzt, dann 2 min auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Für die Hybridisierung wurde die Probe auf den Array gegeben und mit einem HybriSlip HS22 (22x22 mm, Sigma) abgedeckt. Die den Chip tragende Hybridisierungskammer (Monterey Industries, USA) wurde gut verschlossen und zum Hybridisieren für 16 h ins Wasserbad bei 42°C gelegt.

Nach der Hybridisierung wurden die Genchips in drei unterschiedlichen Waschpuffern jeweils für 10 min gewaschen. Die Zusammensetzung der Waschpuffer ist Tabelle 4 zu entnehmen.

Tab. 4: Zusammensetzung der Waschpuffer

Waschpuffer	1	2	3
A.bidest.	950 ml	990 ml	1000 ml
20x SSC	50 ml	10 ml	2,5 ml
10% SDS	6 ml	-	-
Zeit	6-10 min	6-10 min	6-10 min

Ein Teil des Waschpuffers 1 wurde in eine Spritzflasche gegeben und diente zum Abspülen der Hybrislips. Dann wurden die Chips in eine mit Waschlösung 1 gefüllte Färbekammer gesetzt und mit Hilfe eines Rührfisches 6-10 min unter Rühren gewaschen. Dieser Vorgang wurde dann mit Waschlösung 2 und schließlich mit Waschlösung 3 wiederholt. Dabei war darauf zu achten, dass die Chips zwischendurch nicht trockneten. Nach dem dritten Waschschrift wurden die Chips einzeln in neue Zentrifugenröhrchen überführt und 4 min bei 300 x g trocken zentrifugiert. Bis zum Scannen wurden die Chips dunkel und trocken gelagert.

2.5.6. Datengewinnung und Auswertung

Das Scannen der Chips wurde am MPI für Infektionsbiologie, Servicegruppe Microarrays, mit Hilfe eines Fluoreszenzlaserscanners (Agilent) (Abbildung 11), später im Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité durchgeführt.



Abb. 11: Agilent Microarray Scanner

Dabei wurde durch den Scanner ein Bild erzeugt und auf einen Rechner transferiert, welches die durch den Laser angeregten Spots zeigt. Die Intensitäten und Ratios der einzelnen Spots wurden mit dem Programm ImaGene5 Standard (BioDiscoveries) berechnet und die so erhaltenen Rohdaten mit Hilfe des Programms GeneSight 3.2 (BioDiscoveries) ausgewertet. Die Normalisierung der Daten erfolgte dabei durchgehend auf das Housekeeping-Gen *act-3*. Die Berechnung der Mittelwerte aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten sowie die Ermittlung des Standardfehlers erfolgten mit Hilfe des Programms SigmaPlot 8.0. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert \pm Standardfehler vom Mittelwert (SEM) aller Experimente.

Wie bereits unter 2.4.5. beschrieben, wurden bei der Auswertung nur Gene berücksichtigt, deren Expression gleich oder über dem zweifachen Wert im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen lag. Durch den Einsatz unterschiedlicher Software für die Auswertung der Ergebnisse der gesamtgenomischen Microarray und der Celegans Toxchip Experimente ergab sich für die Darstellung der Ergebnisse reprimierter Gene eine unterschiedliche Schreibweise (siehe auch 2.4.5.). Die Datenauswertung des gesamtgenomischen DNA-Microarrays für *C. elegans* zeigt Werte größer 2 als reprimiert, was einer 0,5 fachen Repression entspricht. Für die Auswertung der Celegans Toxchip Experimente galten Gene als reprimiert, die Werte kleiner gleich der 0,4 fachen Induktion im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen.

2.6. Verwendete Medien

Hier werden alle verwendeten Medien aufgeführt, die nicht über Literaturangaben zitierbar waren.

- Ampicillin-Stammlösung

Für 1 ml:

10 mg D(-)- α -Aminobenzylpenicillin (Sigma)

mit A.bidest. auf 1 ml auffüllen, steril filtrieren und bei -20°C lagern.

- Basalmedium

Für 500 ml:

6 ml Na_2HPO_4 (0,5 M, pH=6,0) (Merck)

22 ml NaH_2PO_4 (1 M) (Merck)

2,9 g NaCl (Merck)

470 ml A.dest.

Die Lösung wurde autoklaviert und anschließend folgende sterile, bzw. autoklavierte Lösungen hinzugegeben:

5 ml Natriumcitrat (1 M) (Merck)

1,5 ml CaCl_2 (1 M) (Merck)

1,5 ml MgSO_4 (1 M) (Merck)

0,125 ml Nystatinlösung (100 mg/ ml DMSO) (Sigma)

0,5 ml Cholesterollösung (5 mg/ ml 95% Ethanol) (Sigma)

- DTD-Lösung

Für 10 ml:

100 mM Dithiothreitol

90% DMSO

10 mM KOAc (pH 7,5)

mit A.bidest. auf 10 ml auffüllen.

- DYT-Medium

Für 1 l:

16 g Bactotrypton (Casein Hydrolysat Pepton No. 140) (BD)

10 g Bacto Yeast Extract (BD)

5 g NaCl (Merck)

mit A.dest. auf 1 l auffüllen

- Einfrierpuffer

Für 50 ml:

0,29 g NaCl (Merck)

0,34 g KH_2PO_4 (Merck)

15 g Glycerin (Merck)

0,056 ml NaOH (5N)

mit A.dest. auf 50 ml auffüllen und anschließend autoklavieren

- Hypochloritlösung

Für 50 ml:

6 ml Natriumhypochloritlösung (Roth)

2,5 ml KOH (5 N) (Merck)

mit A.dest. auf 50 ml auffüllen

- NGM-Agar

Für 500 ml (reicht für 20 Platten a 92 mm Ø, Sarstedt):

1,5 g NaCl (Merck)

8,5 g Agar-Agar (High gel-strength) (Serva)

1,25 g Bactopecton (BD)

486 ml A.dest.

Die Lösung wurde im Erlenmeyerkolben mit Rührfisch autoklaviert und nachdem sich der Agar auf ca. 60°C abgekühlt hatte, wurden folgende sterile, bzw. autoklavierte Lösungen unter der Sterilbank hinzugegeben:

0,5 ml Cholesterollösung (5 mg/ ml 95% Ethanol) (Sigma)

12 ml Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH=6) (Merck)

0,5 ml CaCl_2 (1 M) (Merck)

0,5 ml MgSO_4 (1 M) (Merck)

- PVP (Probenverdünnungspuffer)
10 mM Bromphenolblau
40% Saccharose

- Rnase A-Stammlösung
10 mg Ribonuklease A (Sigma)
1 ml TE-Puffer
15 min auf 95°C erhitzen, abkühlen lassen und bei -20°C lagern.

- SDS 10%
Für 1 l:
100 g SDS (Sodiumdodecylsulfat) (Merck)
in 900 ml A.bidest. lösen (ein Erwärmen auf 68°C hilft beim Lösen), den pH-Wert mit wenigen Tropfen konzentrierter HCl auf 7,2 einstellen und mit A.bidest. auf 1 l auffüllen.

- SOC-Medium
Für 1 l:
20 g Bactotrypton (Casein Hydrolysat Pepton No. 140) (BD)
5 g Bacto Yeast Extract (BD)
0,5 g NaCl
950 ml A.dest.
10 ml KCl (250 mM)
alles gut lösen und den pH-Wert mit 5 N NaOH auf 7,0 einstellen, mit A.dest. auf 1 l auffüllen und autoklavieren.
Nach dem Abkühlen Zugabe von:
5 ml MgCl₂ (2 M) (autoklaviert)
20 ml Glucose (1 M) (steril filtriert)

SSC 20 x

Für 1 l:

175,3 g NaCl (Merck)

88,2 g Nacitrat (Merck)

in 800 ml A.bidest. lösen, den pH-Wert mit wenigen Tropfen 10N NaOH auf 7,0 einstellen und mit A.bidest. auf 1 l auffüllen, anschließend die Lösung autoklavieren.

- STET-Puffer

50 mM Tris/ HCl (pH 8,0)

50 mM EDTA

8% Saccharose

0,1% TritonX-100

autoklavieren.

- TE-Puffer

10 mM Tris/ HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA

- TFB-Puffer:

0,39 g Morpholinoethansulfonsäure (10 mM, pH 6,3)

1,78 g MnCl₂ (45 mM)

0,29 g CaCl₂ (10 mM)

1,49 g KCl (100 mM)

0,16 g Hexaminkobaltchlorid (3 mM)

mit 5 M KOH auf pH 6,3 einstellen, mit A.bidest. auf 200 ml auffüllen und steril filtrieren.

- Trimix für die Reverse Transkription

0,6 µl 25 mM dATP-, dCTP-, dGTP-/ 10 mM dTTP-Mix (Rapidozym)

6 µl 5x 1st Strand Buffer (Invitrogen)

3 µl 0,1 M DTT (Invitrogen)

Für eine vereinfachte Handhabung wurde der Trimix als Vorratslösung vorab in einer größeren Menge angesetzt.

- Tris 10 mM

Für 1 l einer 1 M Stammlösung:

121,1 g Tris

(AppliChem)

in 800 ml A.bidest. lösen, den pH-Wert mit 70 ml konzentrierter HCl auf 7,4 einstellen und mit A.bidest. auf 1 l auffüllen.

Für die 10 mM Tris 10 ml 1M Tris mit 990 ml A.bidest. auffüllen.