

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Chemikalien

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: Zusammenstellung der verwendeten (Radio)Chemikalien mit Angabe der Bezugsquelle

Substanz	Bezugsquelle
[γ - ³² P]ATP	Amersham Pharmacia
[α - ³² P]dCTP	Amersham Pharmacia
[α - ³² P]UTP	Amersham Pharmacia
Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1	Roth
Agarose	Invitrogen
Aminosäuren	Sigma
Ampicillin	Sigma
APS (Ammoniumpersulfat)	Biorad
Aqua ad iniectabilia	Baxter
3-AT (3-Amino-1,2,4-Triazol)	Sigma
Bacto-Agar	Difco
Bromphenolblau	Serva
BSA (bovines Serumalbumin)	Serva
Chloroform	Merck
DABCO (1,4-diazobicyclo-2,2,2-octane)	Sigma
DAPI	Serva
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
Dextranblau	Fluka
dNTPs	Fermentas
EDTA (Titriplex III)	Merck
Essigsäure 100%	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Serva
Ficoll	Pharmacia
Formaldehydlösung 37%	Merck
Gelatine	Difco
Glucose-Monohydrat	Merck

Glycerin	Merck
Glycin	Merck
Hefeextrakt	Difco; Merck
Hefe Stickstoff Base ohne Aminosäuren	Difco; Becton Dickinson
HEPES	Sigma
Heringsperma-DNA	Boehringer Roche
Isopropanol	Merck
β -Mercaptoethanol	Merck
Magnesiumchlorid	Merck, Perkin Elmer
Mineralöl	Sigma
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
pd(N) ₆ (zufällige Hexanukleotide)	Amersham Pharmacia
Pepton aus Casein	Merck
Phenol	Roth
Phenolrot	Fluka
Salzsäure 32%	Merck
Sephadex G-50	Amersham Pharmacia
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	GibcoBRL
<i>tri</i> -Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Trizol	Invitrogen
Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat)	Sigma
Trypton	Difco
Xylencyanolblau	Sigma

2.1.2 Puffer und Lösungen

Acrylamid/Piperazin	3,5 g Acrylamid; 0,3 g Piperazin Diacrylamid; in 20 ml bidest
Diacrylamid-Lösung	
Agarose-Puffer	25 ml Tris-Puffer; 174 ml 0,1% SDS; filtriert; aliquotiert in 9,95 ml Portionen und bei -20°C gelagert

2. Material und Methoden

10% APS	10% w/v APS in Wasser, aliquotiert und bei -20°C gelagert.
Blocking-Puffer	5% Milchpulver in PBST
5 x Blotting-Puffer	29,1 g Tris; 14,65 g Glycin; 18,75 ml 10% SDS; ad 1 l bidest
1 x Blotting-Puffer	20 ml 5 x Blotting-Puffer; 20 ml Methanol; 60 ml bidest
Carrier Ampholyt Mix	8 ml Ampholine pH 3,5-10; 8 ml Servalyt pH 2-11; 24 ml Pharmalyte pH 4-6,5; 16 ml Pharmalyte pH 5-8; 8 ml Pharmalyte pH 6,5-9
Denaturierungspuffer I	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Denaturierungspuffer II	0,05 N NaOH
DEPC-H ₂ O	2-fach destilliertes Wasser wurde mit 0,1% DEPC versetzt, über Nacht unter dem Abzug gerührt und anschließend autoklaviert.
10 x Dropout-Lösung	200 mg/l L-Adenin Hemisulfat Salz, L-Arginin HCl; L-Histidin HCl Monohydrat, L-Methionin, L-Tryptophan, L-Uracil; 300 mg/l L-Isoleucin, L-Lysin HCl, L-Tyrosin; 500 mg/l L-Phenylalanin; 1000 mg/l L-Leucin; 1500 mg/l L-Valin; 2000 mg/l L-Threonin; in 1l Bidest; autoklavieren
-TL Dropout-Lösung	10 x Dropout Lösung ohne Leucin und Tryptophan
-HTL Dropout-Lösung	10 x Dropout Lösung ohne Histidin, Leucin und Tryptophan
Equilibrierungslösung	125 mM Tris-Puffer; 40% Glycerol; 65 mM DTT; 3% SDS
Ethidiumbromid	10 mg/ml EtBr
Ethylendiamin-Puffer	5% v/v Ethylendiamin; 54% Urea; 5% Glycerol
Genescreen-	0,1 M Natriumdihydrogenphosphat, 0,4 M di-
Hybridisierungspuffer	Natriumhydrogenphosphat, 7% w/v SDS, 1 mM EDTA
Heringsperma-DNA	10 mg/ml HSD
IP1-Puffer	150 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,5; 1% NP40
IPTG	100 mM in Aqua dest.
10 x Laemmli-Puffer	150 g Tris; 720 g Glycin; 500 ml 10% SDS
Ladepuffer	0,25% Xylencyanolblau oder 0,25% Bromphenolblau, 10 mM EDTA, 15% Ficoll
LB Medium	45 g Agar, 30 g Trypton, 15 g Hefeextrakt, 30 g NaCl, Aqua dest. ad 3 l, anschließend autoklavieren. Zugabe von 3 ml Ampicillin (50 mg/ml)
10 x LiAc	1 M Lithium Acetat; pH 7,5 mit verd. Essigsäure einstellen
10-fach MOPS	0,4 M MOPS, 0,1 M Natriumacetat, 10mM EDTA, pH 7,0

2. Material und Methoden

Mikrotubuli Assembly (MT) Puffer	0,1 M Pipes pH 6,8; 1 mM MgSO ₄ ; 2 mM EGTA; 2 mM DTT; 0,1 mM GTP
Mounting Medium	90% Glycerol; 0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 2,3% DABCO; 0,5 µg/ml DAPI
Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH auf 7,5 einstellen
OLB	je 0,1 mM dATP, dGTP, dTTP; 1 M HEPES pH 6,6; 0,425 mM Hexanukleotide, 25 mM MgCl ₂ ; 250 mM Tris pH 8,0; 0,36% v/v β-Mercaptoethanol
ONPG in Z Puffer	4 mg/ml ONPG in Z Puffer; pH 7,0; 1-2 Stunden rühren
3,7% Paraformaldehyd	in 1,2 x PEM bei 95°C lösen; Lagerung bei -20°C
50% PEG	in sterilem H ₂ O
PEG/LiAc	8 ml 50% PEG; 1 x TE; 1 x LiAc
10x PEM	1 M PIPES; 0,05 M EGTA; 0,02 M MgCl ₂ ; pH 7,0
1x PBS (pH 7,3)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄
PBST	1 x PBS; 1:1000 Tween 20
Phosphorsäurepuffer	7,27% w/v Phosphorsäure; 18% (3 M) Urea
Proteinpuffer I	1,5 M Tris; 0,4% SDS; pH 8,8
Proteinpuffer II	0,5 M Tris; 0,4% SDS; pH 6,8
RNA Ladepuffer	12,5 µl 2x Loading Dye Solution (Fermentas); 2,5 µl 10x MOPS, 4,5 µl Formaldehyd
10x RT-Puffer	100 mM Tris, 500 mM Kaliumchlorid, 0,1% w/v Gelatine
Sample Protection Solution	6 g Urea; 1 g Glycerol; ad 19 ml Bidest
Selektionsmedium	6,7 g Hefe Stickstoff Base ohne Aminosäuren; 20 g Bacto-Agar (nur für Platten); 850 ml H ₂ O; 100 ml der entsprechenden sterilen 10 x Dropout Lösung; pH 5,8; autoklavieren; 50 ml 40% Glucoselösung zugeben; bei -HTL 8 ml 1 M 3-AT zugeben
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH auf 7,0 mit 1M HCl einstellen, autoklavieren.
Stopmix	5 Spatelspitzen Dextranblau, 1 Spatelspitze Phenolrot, in 10 ml TES
Sucrose-Lösung	0,2 g Sucrose ; 280 µl MT-Puffer ; bei 37°C schüttelnd lösen ; 4µl dGTP ; 1 µl Taxol zusetzen
50x TAE-Puffer	50 mM EDTA, 5,71% v/v Essigsäure, 2 M Tris

2. Material und Methoden

TE	10 mM Tris HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA
TES	10 mM Tris HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 0,2% SDS
Tris-Puffer	30,275 g Tris in Bidest ; Titrierung mit Phosphorsäure ; pH 6,8 bei 20°C ; in 250 ml
0,2% Triton	in 1x PBS
Waschpuffer A	2x SSC, 0,1% SDS
Waschpuffer B	0,1x SSC, 0,1% SDS
X-Gal	20 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid in N-N-Dimethylformamid
YPD-Medium	20 g/L Pepton aus Casein ; 10 g/L Hefeextrakt ; 20 g/L Bacto-Agar (nur für Platten)
Z Puffer	16,1 g/L Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O ; 5,5 g/L NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; 0,75 g/L KCl; 0,246 g/L MgSO ₄ x 7H ₂ O ; pH 7,0
Z Puffer + β-Mercaptoethanol	100 ml Z Puffer ; 0,27 ml β-Mercaptoethanol

2.1.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs oder von Fermentas erworben. Die Restriktionsverdau wurden mit den mitgelieferten Puffern anhand des entsprechenden Protokolls durchgeführt. Alle anderen Enzyme sind tabellarisch aufgelistet:

Tabelle 2.2: Verwendete Enzyme mit Angaben zur jeweiligen Konzentration und Bezugsquelle

Enzym	Konzentration	Bezugsquelle
Advantage 2 Polymerase Mix	50x	Clontech
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	5 U/μl	USB
M-MLV reverse Transkriptase	200 U/μl	GibcoBRL
Cloned Pfu	2,5 U/μl	Stratagene
Pfu Turbo	2,5 U/μl	Stratagene
Proteinase K	10 mg/ml	Boehringer Roche
RQ1 DNase	1 U/μl	Promega
RNAguard	30,2 U/μl	Amersham Pharmacia
Rnase A	10 mg/ml	Boehringer Roche
Superscript II reverse Transkriptase	200 U/μl	Invitrogen
Taq DNA-Polymerase	10 U/μl	Service-Gruppe MPI

2.1.4 Primer

Die Primer für PCR-, RT-PCR- und Race-Experimente wurden von MWG Biotech, Invitrogen und TIB MOLBIOL erworben.

Tabelle 2.3: Verwendete Primer für RT-PCR- und Race-Experimente im humanen *MIDI*-Gen mit Angabe der Reaktionsbedingungen (T_a =Annealing-Temperatur)

Exon	Primer Richtung	Sequenz (5'→3')	T_a (°C) RT	T_a (°C) Race	MgCl ₂ - Konz (mM)
1	2RT8 for	TTTTGTGACCAGGATCCTGC	57		3
1	2RT9 for (nested)	ACGCTGTGAAGACCTGTGTC	57		3
5	2RT11 rev	AGGAATTAGAACCTGGGAGG	57		3
5	2RT10 rev (nested)	TGCAGTTGCCATGGAGACTC	57		3
9	2RT19 rev	TCACGGCAGCTGCTCTG	55		3
9	2RT18 rev (nested)	CCAAATGGTCTGGGATAGGG	55		3
1a	Ex1a3race for	GCATGGCAGCACAGGAGAAAAAGTACCAC		68	
1a	Ex1a5race rev	GTGGTACTTTTTCTCCTGTGCTGCCATGC		68	
1a	Ex1aRT3 rev	ACTGTTCTGGAAAGCCTGTC		60	
1a	Ex1a-f1 rev	AGCCTTCGCAATTTCTTCAG	55		3
1a	Ex1a-f2 rev (nested)	AGAATTTGCTCTAGAGGCAC	55		3
1a	Ex1a-f1/r for	CTGAAGAAATTGCGAAGGCT		60	
1a	Ex1a-f4/r for	GGCAGCACAGGAGAAAAAGTA	55		3
1a	Ex1a-f3/r for (nested)	GCAAAGGCAATGCATGTATG	55		3
1c	Ex1b3race for	TCTAAACTCTCAAGGCCCTCTTCTTGGG		68	
1c	Ex1b5race rev	CCCAAGAAGAGGGCCTTGAGAGTTTAGA		68	
1c	Ex1b3 for	AGCCTGAAAGCATGGAAGAC		60	
1c	Ex1b3 rev	ACTGTCCAGAGCACAGGATTC		60	
2c	Ex2a3race for	CCCCGATCCTGACAAACCTCAACAGACC		68	
2c	Ex2a5race rev	GGTCTGTTGAGGTTTGTGTCAGGATCGGGG		68	
2c	Ex2an5race rev	TCAGGGTTGTGGGAAGGGAG		60	
2c	Ex2a-f1 rev	CTGGGAAACAGAATGGTCTG	55		3
2c	Ex2a-f2 rev (nested)	GTTGAGGTTTGTGTCAGGATCG	55		3
2c	Ex2a-f2/r for	CGATCCTGACAAACCTCAAC	55		3
2c	Ex2a-f1/r for (nested)	CAGACCATTCTGTTTCCAG	55	60	3
2d	Ex2b3race for	TACTGTTTCCCAGAGTTGCCCAATGGGG		68	
2d	Ex2bs1 rev	CCCATTGGGCAACTCTGGGAAACAGTAC		68	
2d	Ex2b-f1 rev	TGGGCAACTGGAGATTAACC	55		3
2d	Ex2b-f2 rev (nested)	ATTGGGCAACTCTGGGAAAC	55		3
2d	Ex2b-f3 rev	CTCTGGGAAACAGTACAGAAC		60	
2d	Ex2b-f2/r for	TTTCCCAGAGTTGCCCAATG	55		3
2d	Ex2b-f1/r for (nested)	TAATCTCCAGTTGCCCAAGG	55	60	3
2e	193f2 rev	TGATATGAGGGTGCTTTGGG	55		3
2e	193f1 rev (nested)	CAGCTGTGATGAACATTCCAG	55		3
2e	193r1 for	CTGGAATGTTTCATCACAGCTG	55		3
2e	193r2 for (nested)	ACCCAAAGCACCCTCATATC	55		3
2f	Ex2c3race for	CCCTACAGGCAAGACTGATGGGGAGAAG		68	
2f	Ex2cs1 rev	CTTCTCCCCATCAGTCTTGCCTGTAGGG		68	
2f	Ex2c-f1 rev	GAGTCAGTTTCTTTCGCGTC	55		3
2f	Ex2c-f2 rev (nested)	CTTGAAATGCATCTTCTCCCC	55		3
2f	Ex2c-f3 rev	GACCCACTTCTCCTATTC		60	
2f	Ex2c-f2/r for	GGGGAGAAGATGCATTCAAG	55		3
2f	Ex2c-f1/r for (nested)	GACGCGAAAGAAAAGTACTGACTC	55	60	3
2g	Ex2e3race for	AAGGAGGAGACTGATGGCACAAAAGTGG		68	
2g	Ex2e5race rev	GTTCTGGTGTCTTAGTTCCCAGGTTTGG		68	
2g	Ex2ef2 for	TCTGCATCCTTAGATTGGCC		60	
2g	Ex2er2 rev	AAGCTAGCAGCTCCTGGTTATG		60	
3a	Ex3a3race for	TCTAAAGAACCAGATGGTGGGGCCTTCTG		68	
3a	Ex3as1 rev	AGAAGGGCCCCACCTCCGTTCTTTAGAC		68	
3a	Ex3a-f1 rev	AGACAGGGGCAAAATAAGGC	55		3
3a	Ex3a-f2 rev (nested)	ATTCTGCCTGGTTCTTGCTC	55		3
3a	Ex3a-f3 rev	CCACCATCCGTTCTTTAGAC	55		3

2. Material und Methoden

3a	Ex3a-f4 rev (nested)	AGACTCAATGCCCTCAGTTG	55	60	3
3a	Ex3a-f2/r for	GCAAGAACCAGGCAGAATTG	55	60	3
3a	Ex3a-f1/r for (nested)	TGCCTTATTTTGCCCCCTGTC	55		3
3a	Ex3a-f4/r for	CTGAGGGCATTGAGTCTAAAG	55		3
3a	Ex3a-f3/r for (nested)	GTCTAAAGAACGGATGGTGG	55		3
4a	Ex4a3race for	GGAGACTCTCCTTTGAAGTGGATCAGGG		68	3
4a	Ex4a5race rev	GTATTTAACAGTCTGGCCCCGGTCACGTC		68	
4a	In4-f1 rev	TGTTCTTTTCAGACGCAACC	55	60	3
4a	In4-f2 rev (nested)	CCACTTCAAAGGAGAGTCTC	55		3
4a	In4-f1/r for	GAGACTCTCCTTTGAAGTGG	55		3
4a	In4-f2/r for (nested)	ATCAGGGTTGCGTCTGAAAAG	55	60	3
i6	In6RT1 rev	CATGTGGTTTGCTAGAGGTC	55		3
i6	In6RT2 rev (nested)	GGCTTCTTCCCCTAACATCC	55		3

Tabelle 2.4: Verwendete Primer für RT-PCR- und Race-Experimente im Maus-*mid1*-Gen mit Angabe der Reaktionsbedingungen

Exon	Primer Richtung	Sequenz (5'→3')	T _a (°C) RT	T _a (°C) Race	MgCl ₂ - Konz (mM)
m1	mEx13race for	GTGCCTGAAAGCCACTCACCCGAATAAG		68	
m1	mEx1f2 for	AAGCCACTCATCCGAACCAAG	55		3
m1	mEx1f1 for (nested)	TACAGGCCATCGTCTGATTG	55	60	3
m5	mEx5r1 rev	TTTCGGGAATTAGGACCTGG	55		3
m5	2RT10 rev (nested)	TGCAGTTGCCATGGAGACTC	57		3
mi2	mIn2f1 rev	AGGAGGATGTCAGTTCTCTG	55		3
mi2	mIn2f2 rev (nested)	TTAAGCCATCGCTCTAGCTC	55		3
m2a	3racemEx2a for	GAGGAAAATAACATTTCCCGTGCTAGCGG		68	
m2a	5racemEx2a rev	TGAGTTTTCTTAGCTCCCGCTAGCACGG		68	
m2a	mEx2ar1 for	GAGTCTGAGAATTCGTGAGG	55		3
m2a	mEx2ar2 for (nested)	AGCGGGAGCTAAGAAAACCTC	55	60	3
m2a	mEx2af2 rev	TGAGTTTTCTTAGCTCCCGC	55		3
m2a	mEx2af1 rev (nested)	CCTCACGAATTCTCAGACTC	55	60	3
m2b	3racemEx2b for	CTGGAATGTTTCATCACGGCTGCCTTTGG		68	
m2b	5racemEx2b rev	CTGCCGACCAGGTGCAAAGAGAAATATG		68	
m2b	mEx2br1 for	AACCAAAGCACCCCTCAGATC	55	60	3
m2b	mEx2br2 for (nested)	TTTCTCTTTGCACCTGGTCCG	55		3
m2b	mEx2bf2 rev	CGACCAGGTGCAAAGAGAAA	55		3
m2b	mEx2bf1 rev (nested)	ATATGAGGATCTGAGGGTGC	55	60	3
m4b	mEx4a3race for	AGAGATGCCTGAAGCTGTGCGCTTCTGG		68	
m4b	mEx4a5race rev	CCAGAAGCGCACAGCTTCAGGCATCTCT		68	
m4b	mEx4af2 for	GTGTGAAGAGATGCCTGAAG	55		3
m4b	mEx4af1 for (nested)	GTCAAATACACAGCAGCACG	55	60	3
m4b	mEx4ar1 rev	CTTCAGGCATCTCTTCACAC	55		3
m4b	mEx4ar2 rev (nested)	TCTGGGAAACTGTCTGTTCC	55	60	3

Tabelle 2.5: Verwendete Klonierungs- und Sequenzierungsprimer mit Angabe der Reaktionsbedingungen

Primernamen	Sequenz (5'→3')	T _a (°C)	Enzym
Ex2bMut-f	CAGGCCATCGTCTGATTGAGCCAATTCCGG	55	Pfu Turbo
Ex2bMut-r	CCGGAATTGGCTCAATCAGACGATGGCCTG	55	Pfu Turbo
M13 for	GTTTTCCCAGTCACGACG	55	
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGACC	55	
SmaI1 for	TTCCCGGGGGAAACACTGGAGTCAGAAGT	59	cloned Pfu
SaI1r1 rev	AGGTCGACGTGGGAGCTGTAAGGTAATCC	59	cloned Pfu
SaI1r2	AGGTCGACGCATGTGGTTTGCTAGAGGTC	57	cloned Pfu
Ex4f1	GAATGATCATGCGCGTTTCC	57	cloned Pfu
Ex2bTag2	AGGTCGACGTAAACCCATTGGGCAACTCTGGGAAACAG TACAGAACA	55	Advantage
KL1Tag	CCAAGCTTGAAGATGGAAACACTGGAGTCAGAAGT	55	Advantage
KL2	TGTCGACCTGCCAGCTGTTTTTACTAATG	55	Advantage
KL3	TGTCGACCTACCCATTGGGCAACTCTGG	55	Advantage

2.1.5 Vektoren

PCR-Produkte wurden in den pGem-T Easy-Vektor (Promega) kloniert. Konstrukte für die Immunfluoreszenz wurden in die P_{CMV} Promotor multiple cloning site des pBudCE4 Vektors (Invitrogen) kloniert. Für die Durchführung des β -Galaktosidase Flüssigassays wurden die entsprechenden trunkierenden *MIDI*-cDNAs in den pBTM116 Vektor kloniert. $\alpha 4$ im pGAD10 Vektor (Clontech) und *MIDI* und die BBox1 im pBTM116 Vektor wurden von Rainer Schneider, Institut für Biochemie, Innsbruck bereitgestellt.

2.1.6 Zelllinien

Alle Zellkulturmedien (Dulbecco's modified essential medium (DMEM) (GibcoBRL), Minimum essential medium (MEM) (GibcoBRL)) werden standardmäßig mit 1000 U/ml Penicillin/Streptomycin (GibcoBRL), 2 mM Glutamin (GibcoBRL) angesetzt.

Tabelle 3a: verwendete Fibroblasten-Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Nährmedium
18/98	humane embryonale Fibroblasten 8.Schwangerschaftswoche	MEM, 10% FCS
165/98	humane kindliche Fibroblasten OS Patient, männlich	DMEM, 10% FCS
166/98	humane kindliche Fibroblasten	MEM, 10% FCS

Tabelle 3b: verwendete adhärenente Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Nährmedium
COS7	affenartige Zelllinie aus der Niere Ursprung: grüne Meerkatze (<i>cercopithecus aethiops</i>)	MEM, 10% FCS

2.1.7 Biologisches Material

Für Hitzeschock-Transformationen wurden *E. coli* DH5 α -Zellen oder *E. coli* XL1 blue-Zellen verwendet. Die Mäuse, aus denen verschiedene Organe entnommen wurden, wurden von Dr. Reinald Fundele bereitgestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die jeweiligen Proben wurden mit 10% Bromphenolblau- oder Xylencyanolblau-Ladepuffer versetzt und auf ein 1% Agarosegel (1 g Agarose in 100 ml 1x TAE, 5 μ l Ethidiumbromid) aufgetragen. Als Standard wurden 0,5 μ g eines 1 kb Markers (GibcoBRL) verwendet. Der Gellauf erfolgte bei 100-150 V. Nach dem Gellauf wurde das Gel auf einem UV-Schirm analysiert und fotografiert.

2.2.1.2 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Die Herstellung eines 1% RNA-Gels erfolgte folgendermaßen: 72 ml DEPC-H₂O wurden zu 1 g Agarose gegeben und aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurden 10 ml 10x MOPS und 18 ml 37% Formaldehyd zugegeben. Die Proben wurden in der Vakuumzentrifuge auf 5,5 μ l eingedampft, mit 19,5 μ l RNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in 1x MOPS bei 100 V für 3,5-4 Stunden

2.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Fibroblasten

50 bis 100 x 10⁶ Zellen wurden in 4,75 ml Nukleus Puffer resuspendiert und mit 55 μ l Proteinase K und 250 μ l 10% SDS versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

Nach der vollständigen Lyse erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Hierfür wurde das Zellysate mit 5 ml Phenol versetzt und bei Raumtemperatur für 30 min invertiert.

Anschließend wurde für 10 min bei $17.210 \times g$ zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, worauf die Extraktion mit 5 ml Phenol/Chloroform und anschließend mit 5 ml Chloroform wiederholt wurde.

Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit $100 \mu\text{l}$ 5 M NaCl versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 3 ml Isopropanol, worauf das Reaktionsgefäß einige Male invertiert wurde. Die ausgefallene DNA wurde mit einer Öse herausgefischt, zweimal in 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 1 ml TE gelöst. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei 4°C .

2.2.1.4 Plasmid-DNA-Isolierung

5 ml LB Medium wurden mit einer E.coli Kolonie mit dem entsprechenden Plasmid angeimpft und bei 37°C schüttelnd über Nacht in Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem Minipräp Kit (Qiagen).

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen, wurden 5 ml LB Medium mit einer Kolonie angeimpft und für ca. 8 Stunden inkubiert. 0,5 ml der 5 ml Kultur wurden entnommen und in 100 ml LB Medium gegeben. Diese Kultur wurde über Nacht inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgte hier mit dem Maxipräp Kit (Qiagen).

Um das Insert zu überprüfen wurde nach der Plasmidpräparation ein Restriktionsverdau (mit EcoRI im Falle des pGemT Easy Vektors) durchgeführt.

2.2.1.5 DNA-Isolierung aus Agarose

Die entsprechenden Banden wurden aus dem 1% Agarose Gel ausgeschnitten, mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) aufgereinigt und mit $30 \mu\text{l}$ H_2O eluiert.

2.2.1.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Die DNA wurde mit 30 µl H₂O eluiert.

2.2.1.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien

Die Zellpellets wurden mit 1x PBS gewaschen und die Zellen im Lysis-Puffer mit dem QIAshredder Kit (Qiagen) aufgeschlossen. Die Präparation erfolgte mit dem RNeasy Midi Kit (Qiagen). Die RNA wurde mit 300-500 µl RNase-freiem H₂O (im Kit enthalten) eluiert. Die Qualität der RNA wurde in der Gelelektrophorese untersucht.

2.2.1.8 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgeweben

Die Organe wurden aus den Mäusen entnommen und in einem Mörser zerkleinert (der Mörser wurde zuvor mit flüssigem Stickstoff gekühlt). Die zerkleinerten Gewebe wurden in Trizol-Reagenz überführt und nach den Angaben des Herstellers weiter verarbeitet. Die RNA wurde in 100 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Die Qualität der RNA wurde in der Gelelektrophorese untersucht.

2.2.1.9 Isolierung von PolyA⁺ RNA aus Gesamt-RNA

Die Isolierung erfolgte mit dem Oligotex mRNA Spin-Column Protokoll (Qiagen). Die RNA wurde mit 2x 50 µl Elutionspuffer eluiert.

2.2.1.10 Standard PCR

Die Standard-PCR wurde für die meisten im Rahmen dieser Arbeit zu amplifizierenden Sequenzen verwendet. Sie erfolgte in einem Testvolumen (TV) von 50 µl: x µl DNA, 5 µl PCR-Puffer II (Perkin Elmer), x µl 25 mM Magnesiumchlorid, 2 µl dNTP Mix (2,5 mM), 1 µl

forward und 1 µl reverse Primer (je 10 pmol/µl), 1 µl *Taq* Polymerase, x µl Aqua ad iniectabilia. Nach Denaturierung der DNA bei 94°C für 3 min wurden 30 Zyklen des folgenden PCR-Programms angeschlossen: 94°C 30 sec, Anlagerungstemperatur der Primer 1 min, 72°C 1,5-3 min. Die PCR wurde mit einem Zyklus von 72°C für 10 min abgeschlossen.

2.2.1.11 RT-PCR

Wenn nötig wurde die Gesamt RNA zunächst einem DNase Verdau unterzogen um Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden. Dazu wurden 20 µg Gesamt RNA mit 20 µl RQ1 DNase und 5 µl RQ1 DNase Puffer versetzt und mit x µl DEPC-H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Es wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform Extraktion. Die Extraktion erfolgte mit Phenol/Chloroform und anschließend mit Chloroform unter Verwendung von Phase Lock Gel Light 1,5 ml Eppis (Eppendorf) nach den Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 10-20 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Für die cDNA-Synthese wurden 2 µg RNA in 4,75 ml DEPC-H₂O bei 65°C 10 min lang denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Folgende Reagenzien wurden anschließend zugefügt: 2 µl 10 x RT-Puffer, 4 µl 25 mM Magnesiumchlorid, 8 µl dNTP-Mix (2,5 mM), 1 µl pd(N)₆ und 0,25 µl RNAGuard. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Danach wurden 10 µl des Ansatzes in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und mit 0,5 µl M-MLV reverser Transkriptase oder 0,5 µl Superscript II reverser Transkriptase versetzt. Der Rest des Ansatzes wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 37°C für 1 Stunde und wurde mit 6 min bei 99°C beendet.

Zur Amplifizierung der jeweiligen cDNA-Abschnitte wurde nach der 1.PCR eine nested PCR angeschlossen.

Für die erste PCR wurden 40 µl des folgenden PCR-Mixes zu den 10 µl aus der cDNA-Synthese pipettiert: 2 µl 25 mM Magnesiumchlorid, 4 µl RT-Puffer, je 1 µl der jeweiligen Primer (10 pmol/µl), 1 µl *Taq*-Polymerase und 31 µl DEPC-H₂O. In die nested PCR wurde 1 µl aus der ersten PCR eingesetzt. Das PCR-Programm für die erste PCR sowie Reaktionsansatz und PCR-Programm der nested PCR entsprachen denen der Standard-PCR. Die Sequenzen der in den RT-PCR-Experimenten eingesetzten Primer sind den Tabellen 2.3 und 2.4 zu entnehmen.

2.2.1.12 3' und 5' Race

Die 3' und 5' Race-Experimente wurden mit dem SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 1 µg Gesamt RNA eingesetzt (Mensch und Maus: Gesamt RNA aus Testis). Die cDNA-Synthese sowie die Ansätze für die erste PCR und die nachfolgende nested PCR erfolgten exakt nach den Vorgaben des Kits. Die Sequenzen der in den Race-Experimenten eingesetzten Primer sind den Tabellen 2.3 und 2.4 zu entnehmen. Für die erste PCR wurde folgendes „touchdown“ PCR-Schema angewandt:

5 Zyklen:
94°C 30 sec
72°C 3 min

5 Zyklen:
94°C 30 sec
70°C 30 sec
72°C 3 min

25 Zyklen:
94°C 30 sec
68°C 30 sec
72°C 3 min

1 Zyklus:
72°C 10 min

Für die nested PCR wurde das Produkt der ersten PCR 1:10 verdünnt. Von dieser Verdünnung wurde 1 µl eingesetzt. Die PCR verlief nach folgendem Schema:

15-30 Zyklen:
94°C 30 sec
60°C 30 sec
72°C 3 min

1 Zyklus:
72°C 10 min

2.2.1.13 In vitro Mutagenese der Isoform Ex2d.7 (im pGemT easy Vektor)

Die in vitro Mutagenese erfolgte mit dem „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene. In der PCR-Amplifikation des Plasmids wurden zwei Ansätze mit 10 ng und 50

ng DNA verwendet. Der forward Primer war Ex2bMut-f und der reverse Primer Ex2bMut-r (siehe Tabelle 2.5). Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und die Zyklen-Parameter wurden exakt nach den Angaben des Kits gewählt. Nach 16 Zyklen wurden sowohl im 10 ng Ansatz als auch im 50 ng Ansatz Banden erhalten. Aufgrund der stärkeren Bande wurde mit dem 50 ng Ansatz weitergearbeitet. Zu diesem wurde 1 µl des Restriktionsenzym *Dpn* I (10 U/µl) gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde auf ein 1% Agarose Gel aufgetragen, die Bande ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die anschließende Transformation in Epicurian Coli XL1-Blue Zellen erfolgte wie im Kit beschrieben. Lediglich das im Kit angegebene NZY⁺-Medium wurde durch LB-Medium ersetzt. Rekombinante Klone wurden mittels Kolonie-PCR identifiziert, von denen Plasmid-DNA isoliert wurde. Der Einbau der Mutation wurde durch Sequenzierung überprüft.

2.2.1.14 Sequenzierung

Zur Analyse auf 'ABI Prism 377 DNA Sequencer' oder 'ABI Prism 3700 DNA Analyzer' Geräten in der Servicegruppe von R. Reinhardt am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin wurden Plasmide mit dem 'ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit' (Perkin Elmer Biosystems) sequenziert. Hierfür wurde die DNA (10 ng pro 100 bp Länge) in 7 µl H₂O aufgenommen und mit 1 µl Primer (10 pmol/µl) und 2-3 µl 'Terminator Ready Reaction Mix' in PCR-Reaktionsgefäßen gemischt. Die Sequenzreaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers in 'MJ Research PTC-200 Geräten'. Nicht eingebaute, farbstoffmarkierte Nukleotide wurden anschließend durch Ethanolpräzipitation abgetrennt.

2.2.1.15 TA-Klonierung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.2.2) und in den pGemT Easy Vektor (Promega) kloniert. Der Ligationsansatz erfolgte in einem TV von 10 µl. Das Verhältnis Vektor zu Insert betrug 1 zu 2 bis 1 zu 5. Der Ligationsansatz enthielt: 1 µl Vektor (c = 50 ng/ml), 1 µl Ligasepuffer, 1 µl T4-Ligase, x µl Insert, x µl Aqua ad iniectabilia. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht oder für mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur.

2.2.1.16 Klonierung der *MIDI*-Konstrukte in den *pBTM116* Vektor

Exi6.1:

Zu Beginn der Klonierungen lag uns die gesamte *MIDI*-cDNA im pBluescript Vektor (Stratagene) vor. Das PCR-Produkt eines Teils der *MIDI*-cDNA, der die Exons 1-5 umfasste, wurde zunächst gerichtet in den *pBTM116* Vektor kloniert. Hierfür wurden *SmaI*- (forward Primer *SmaI*f1) und *SalI*- (reverse Primer *SalI*r1) Restriktionssequenzen an das 5'-Ende der Oligonukleotide eingebaut. Das PCR-Produkt und der *pBTM116* Vektor wurden mit den Enzymen geschnitten und ligiert. Rekombinante Klone wurden mittels PCR-Analyse der Bakterienkolonien identifiziert, die Plasmid-DNA wurde wie beschrieben isoliert (2.2.2). Im nächsten Schritt wurde ein Bereich von Exi6.1, der die *MIDI*-Exons 4-6 sowie das alternativ gespleißte Exon i6 umfasste, amplifiziert. Für diese PCR wurde cDNA verwendet. An das 5'-Ende des reverse Primers (*SalI*r2) wurde eine *SalI*-Restriktionssequenz eingebaut. Der forward Primer (*Ex4*f1) enthielt keine Restriktionssequenz. Sowohl das PCR-Produkt von Exi6.1 als auch der *pBTM116* Vektor mit dem darin integrierten Teil der *MIDI*-cDNA wurden anschließend mit den Enzymen *SalI* und *NcoI* geschnitten. Das Enzym *NcoI* schneidet die *MIDI*-cDNA in Exon 4. Auf diese Art wurde der 3' Bereich der *MIDI*-cDNA aus dem *pBTM116* Vektor herausgeschnitten. Anschließend wurde das PCR-Produkt von Exi6.1 in den *pBTM116* Vektor mit dem darin verbliebenen 5' Bereich der *MIDI*-cDNA kloniert. Rekombinante Klone wurden mittels Kolonie-PCR identifiziert, Plasmid-DNA wurde isoliert.

Ex2f.1:

Für die Klonierung von Ex2f.1 in den *pBTM116* Vektor wurde zunächst das in den *pGemT easy* klonierte PCR-Produkt von Ex2f.1 sowie der *pBTM116* Vektor mit dem darin enthaltenen Exi6.1 mit den Restriktionsenzymen *PshAI* und *NcoI* geschnitten. *PshAI* schneidet im Exon 1 der *MIDI*-cDNA. Aus Exi6.1 wurde so ein Teil zwischen Exon 1 und Exon 4 herausgeschnitten und in der anschließenden Ligation durch den entsprechenden Teil von Ex2f.1 ersetzt.

Ex2d.7:

Das in den *pGemT easy* Vektor klonierte PCR-Produkt von Ex2d.7 enthielt eine Punktmutation, die zunächst durch in vitro Mutagenese rückmutiert wurde (Abschnitt 2.2.6).

Danach folgte eine PCR mit den Primern 2RT9 (forward Primer) und Ex2bTag2 (reverse Primer). An das 5'-Ende des Primers Ex2bTag2 wurde eine *SalI*-Restriktionssequenz eingebaut. Anschließend wurden das PCR-Produkt von Ex2d.7 und der pBTM116 Vektor mit dem darin enthaltenen Exi6.1 mit den Restriktionsenzymen *PshAI* und *SalI* geschnitten. Aus Exi6.1 wurde so der Bereich 3' zur *PshAI*-Schnittstelle in Exon 1 herausgeschnitten und in der anschließenden Ligation durch den entsprechenden Teil von Ex2d.7 ersetzt.

2.2.1.17 Umklonierung der Isoformen Ex2d.7, Ex2f.1 und Exi6.1 vom pBTM116 Vektor in den pBudCE4 Vektor

Die Isoformen Ex2d.7, Ex2f.1 und Exi6.1 (im pBTM116 Vektor) wurden in einer PCR-Reaktion amplifiziert. An die 5'Enden der hierfür verwendeten Primer wurden *HindIII*- (forward Primer KL1Tag) bzw. *SalI*-Restriktionssequenzen (reverse Primer Ex2d.7: KL3; Ex2f.1, Exi6.1: KL2) eingebaut. Die PCR-Produkte wurden mit den Enzymen geschnitten und in den entsprechend verdauten pBudCE4 Vektor (Invitrogen) kloniert.

2.2.1.18 Southernblot

DNA (z.B. verdaute genomische DNA) wurde auf einem Agarosegel über Nacht bei 30 V aufgetrennt. Die Gele wurden mit einem Lineal als Längenreferenz fotografisch dokumentiert und die Spur des verwendeten DNA-Größenstandards abgetrennt. Anschließend wurden die Gele zweimal 30 Minuten in Denaturierungspuffer I und zweimal 20 Minuten in Neutralisierungspuffer geschwenkt. 3 Lagen Whatman Chromatographiepapier (Maidstone) und eine Nylonmembran (Roti-Nylon plus, Roth) wurden in der Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Nylonmembran wurde für 2 Minuten auf Bidest gelegt, nach 2 Minuten für 10 Minuten unter Wasser gebracht und anschließend für 10 Minuten in Neutralisierungspuffer gelegt. Die 3 Lagen Whatman-Papier wurden mit Neutralisierungspuffer angefeuchtet. Beim Blotaufbau wurde das Gel auf eine Brücke aus Whatmanfiltern gelegt, deren Enden in den Transferpuffer (10 x SSC) hingen und mit der Nylonmembran, den drei Lagen Whatman-Papier und mehreren Lagen Zellstoff luftblasenfrei bedeckt. Auf den Zellstoff wurde eine Glasplatte gelegt und mit Gewichten beschwert. Das Blotten erfolgte über Nacht. Nach Beendigung wurde der Blot mit einem weichen Bleistift

beschriftet, 2-3 Minuten mit 50 mM Phosphatpuffer gespült, mit UV-Licht bestrahlt (1 mal mit 1200 μ Joule durch das „Autocrosslink“ Programm des Stratalinkers, Stratagene) und zwischen Whatman-Papier getrocknet.

2.2.1.19 Markierung und Aufreinigung radioaktiver DNA-Sonden für die Southernblot Hybridisierung

DNA-Proben wurden nach der Methode der degenerativen Hexanukleotidprimer (Feinberg und Vogelstein, 1983, 1984) radioaktiv markiert. Dazu wurden in einem TV von 21 μ l 20-100 ng DNA mit x μ l Aqua ad iniectabilia und 5 μ l OLB-Puffer gemischt und bei 95°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 1 μ l BSA (1 mg/ml), 1 μ l Klenow-Fragment und 2 μ l [α -³²P]dCTP zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für ca. 1 Stunde.

Die überschüssigen Nukleotide wurden über eine Sephadex-G50 Gelfiltrationssäule von der markierten Sonde getrennt. Zur Herstellung der G50-Säule wurden in einer Pasteurpipette ein Glaskügelchen und ein Tropfen Chelex vorgelegt. Der Rest der Pasteurpipette wurde mit Sephadex-G50 und TES aufgefüllt. Die markierte Sonde wurde mit 50 μ l Stoppmix versetzt und auf die Säule geladen. Der blaue Anteil mit der darin enthaltenen Sonde wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.2.1.20 Southernblot-Hybridisierung

Zur Prähybridisierung wurden 60-100 μ l Heringssperm DNA bei 95°C für 10 Minuten denaturiert, zusammen mit der Membran und 6-10 ml Genescreen-Hybridisierungspuffer in ein Glasröhrchen gegeben und im Hybridisierungssofen bei 65°C für ca. 1 Stunde rollend inkubiert. Anschließend wurde die radioaktiv markierte und aufgereinigte DNA-Sonde (2.2.1.19) bei 95°C für 10 Minuten denaturiert und in das Glasröhrchen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht.

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen bei 65°C je nach experimentellen Bedingungen für 2 x 10 Minuten und 1 x 30 Minuten mit Waschpuffer A und gegebenenfalls für 2 x 10 Minuten mit Waschpuffer B gewaschen.

2.2.1.21 Northernblot

Die Herstellung eines denaturierenden RNA-Gels und der Gellauf sind in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel mit einem Lineal als Längenreferenz unter UV-Licht fotografiert und die Spur des Größenstandards abgetrennt. Anschließend wurde das Gel zur Entfernung des Formaldehyds dreimal für sieben Minuten in DEPC-H₂O geschwenkt, für 20 Minuten in Denaturierungspuffer II und für 45 Minuten in 20 x SSC geschüttelt. Der Blotaufbau und die Equilibrierung der Nylon-Membran (Hybond XL, Amersham Pharmacia) erfolgten wie beim Southernblot beschrieben. Als Transferpuffer wurde 20 x SSC verwendet. Es wurde über Nacht geblottet. Nach Beendigung des Blottens wurde der Blot mit einem weichen Bleistift beschriftet und anschließend mit der RNA-Seite nach oben auf ein mit 20 x SSC angefeuchtetes Whatman-Papier gelegt. Die RNA wurde unter UV-Licht (1 x 1200 µJoule; entspricht dem einmaligen Ausführen des „Autocrosslink-Programms“ des Stratalinkers, Stratagene) auf der Membran fixiert und die Membran anschließend zur Entfernung etwaiger Gelreste kurz in 2 x SSC geschwenkt.

2.2.1.22 Markierung und Aufreinigung radioaktiver DNA-Sonden für die Northernblot-Hybridisierung

Die Markierungsreaktion erfolgte wie unter 2.2.1.18 beschrieben. Zur Aufreinigung wurde der Qiagen Nucleotide Removal Kit in einer modifizierten Version verwendet. Die Sonde wurde mit 10 Volumen PN-Puffer gemischt, auf die Säule gegeben und bei 6000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde mit 400 µl PE-Puffer gewaschen, bei 6000 rpm für eine Minute zentrifugiert und nach Abkippen des Durchflusses erneut bei 13.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die Sonde wurde mit 200 µl EB-Puffer bei 13.000 rpm für eine Minute von der Säule eluiert. Die Aktivität der Sonde wurde mit dem Geigerzähler überprüft. Sie sollte zwischen 80 und 120 cpm liegen.

2.2.1.23 Markierung und Aufreinigung radioaktiver RNA-Sonden für die Northernblot-Hybridisierung

Das der RNA-Sonde komplementäre DNA-Fragment wurde in den pGEMT easy Vektor kloniert. Dieser Vektor enthält T7 und SP6 RNA-Polymerase Promotoren. Um ausschließlich Transkripte der Insert-DNA zu erhalten wurde das Plasmid an einer geeigneten Restriktionsschnittstelle linearisiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform Extraktion wie unter 2.2.1.10 beschrieben. Die in vitro Transkription erfolgte abhängig von der Orientierung des Inserts im Vektor mit SP6 oder T7 RNA-Polymerase. Dabei wurde das „Riboprobe in vitro transcription system“ (Promega) verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus x μl H_2O ; 4 μl 5x TSC-Puffer; 2 μl DTT (100 mM); 1 μl RNasin (20 U); 4 μl aus einem Mix von rATP, rGTP und rCTP (je 2,5 mM); 1 μg linearisiertes Plasmid; 2 μl [α - ^{32}P]rUTP (50 μCi) und 1 μl SP6 oder T7 Polymerase (15 U). Das TV betrug 20 μl . Die Inkubation erfolgte bei 37°C für eine Stunde. Nach der in vitro Transkription wurde die DNA-Vorlage durch Inkubation mit 1 U DNase I für 15 Minuten bei 37°C verdaut. Überschüssige Nukleotide wurden entweder wie in 2.2.1.22 beschrieben entfernt oder durch Dialyse auf Millipore VM 0,05 μm Filtern (Millipore) gegen DEPC- H_2O abgetrennt. Die Inkubation erfolgte hier für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

2.2.1.24 Markierung und Aufreinigung von Oligonukleotidproben für die Northernblot-Hybridisierung

Als Oligonukleotidproben wurden 28-mer Primer verwendet. Es wurden sowohl Primer für die Hybridisierungen gepoolt als auch einzelne Primer hybridisiert. Der Reaktionsansatz enthielt 2-4 μl Primer (100 pmol/ μl); 3 μl 10 x Reaction buffer A (Fermentas); 1,5 μl T4 Kinase (Fermentas); x μl H_2O und 5 μl [γ - ^{32}P]ATP. Das TV betrug 30 μl . Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 Minuten. Anschließend wurden die markierten Oligonukleotide mit Ethanol präzipitiert. Der Reaktionsmix setzt sich zusammen aus den 30 μl Oligonukleotiden, 10 μl H_2O , 240 μl NH_4OAc (5 M) und 750 μl Ethanol. Nach einer Inkubation für 30 Minuten bei -20°C wurden die gefällten Oligonukleotide bei 4°C für 20 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 500 μl 70% Ethanol zum Pellet zugegeben und bei Raumtemperatur 10 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde danach getrocknet, in 100 μl TE gelöst und die Aktivität mit dem Geigerzähler gemessen.

2.2.1.25 Northernblot-Hybridisierung

DNA-Sonden: Die Prähybridisierung erfolgte mit dem Hybridisierungspuffer QuickHyb (Stratagene) im Glasröhrchen für mindestens 20 Minuten bei 65°C. Die radioaktive DNA-Sonde wurde mit 100 µl Heringsperm-DNA versetzt und 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Sonde wurde zu der Membran gegeben und bei 65°C 1 bis 1,5 Stunden hybridisiert.

RNA-Sonden: Die Prähybridisierung erfolgte mit dem Hybridisierungspuffer ExpressHyb (Clontech) und 100 µl für 10 Minuten bei 95°C denaturierter Heringsperm-DNA für mindestens 20 Minuten bei 65°C. Anschließend wurde die radioaktiv markierte RNA-Sonde zu der Membran gegeben und bei 65°C für 1-1,5 Stunden hybridisiert.

Oligonukleotid-Sonden: Die Prähybridisierung erfolgte mit dem Hybridisierungspuffer ExpressHyb (Clontech) für mindestens 20 Minuten bei 37°C. Die Oligonukleotidsonde wurde zu der Membran gegeben und bei 37°C für 1-1,5 Stunden hybridisiert.

Die Membranen wurden mit Waschpuffer A und/oder B solange gewaschen, bis die auf den Membranen gemessene Aktivität deutlich niedriger als vor dem Waschen war.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Abgleichung der Proteinmengen wurde zunächst eine Eichreihe in 1:1000 verdünntem Puffer (hier: IP1-Puffer) erstellt. Dazu wurde BSA (10 µg/ml) mit dem 1:1000 verdünnten Puffer auf Konzentrationen von 1, 2, 4, 5 und 7,5 µg/ml verdünnt. Das TV betrug jeweils 200 µl. Die Proben wurden mit Bidest 1:1000 verdünnt.

Anschließend wurden 80 µl der verdünnten Proben und 80 µl der jeweiligen BSA-Verdünnungen für die Eichreihe in eine Mikrotiterplatte mit flachem Boden pipettiert (Falcon) und mit 20 µl des Bradford-Reagenz (Sigma) mit einer Mehrkanalpipette gemischt. Sowohl die Proben als auch die Eichreihe wurden doppelt pipettiert. Die Messung der Absorption bei 595 nm erfolgte im Spektralphotometer „Spectra Max 250“ (Molecular Devices). Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden über eine Standardkurve bestimmt.

2.2.2.2 Westernblot

Zur Herstellung eines 10% SDS-Polyacrylamidgels wurde zunächst das Trenngel aus 1,9 ml Bidest, 1,7 ml Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1 Mix, 1,35 ml Proteinpuffer I, 0,05 ml APS und 0,002 ml TEMED vorbereitet. Dieses wurde zwischen zwei Glasplatten, die in einem Gießgestell fixiert worden waren (Biorad), bis zur Markierung gegossen und mit 100-200 µl Isopropanol überschichtet. Das Sammelgel wurde aus 1,4 ml Bidest, 0,33 ml Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1 Mix, 0,27 ml Proteinpuffer II, 0,02 ml APS und 0,002 ml TEMED vorbereitet. Nach der Aushärtung des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm zwischen die beiden Glasplatten gesteckt.

Zu den Proben wurden soviel 5 x SDS Page Puffer und 10 x Laemmli-Puffer zugegeben, dass eine 1-fache Endkonzentration der Puffer erreicht wurde. Die Proben wurden bei 95°C für fünf Minuten gekocht und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in 1 x Laemmli-Puffer bei 200 V für 45-75 Minuten.

Nach Beendigung des Gellaufs wurden nicht genutzte Spuren des Gels abgeschnitten und das Gel in 1 x Blotting-Puffer für ca. 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die PVDF-Membran (Roche) und 6 Lagen Whatman-Papier (Maidstone) auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Membran wurde für 2 Sekunden in Methanol, dann für zwei Minuten unter Bidest und danach für ca. 15 Minuten in 1 x Blotting-Puffer equilibriert. Das Whatman-Papier wurde in 1 x Blotting-Puffer angefeuchtet. Der Blotaufbau erfolgte in einer „Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell“ (Biorad) nach folgendem Schema: Die Membran wurde auf drei Lagen Whatman-Papier gelegt, darauf folgte das Gel. Dieses wurde wiederum mit drei Lagen Whatman-Papier überschichtet. Der Aufbau erfolgte möglichst luftblasenfrei. Geblottet wurde bei 15 V für 30 Minuten.

Nach dem Blotten wurde die Membran mit einem Kugelschreiber beschriftet und für 30 Minuten in Blocking-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz mit PBST gespült und danach mit dem 1. Antikörper in PBST und 1%BSA über Nacht bei 4°C rollend inkubiert. Die hier verwendeten C- bzw. N-terminalen MID1-Antiseren wurden in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt. Nach der Inkubation mit dem 1. Antikörper wurde die Membran dreimal für ca. fünf Minuten mit PBST gewaschen und für 30 Minuten mit dem zweiten, an HRP (Horseradish Peroxydase) gekoppelten Antikörper (hier: donkey anti-rabbit; 1:2000 Verdünnung; Amersham) in PBST bei Raumtemperatur rollend inkubiert. Danach

wurde die Membran wiederum dreimal für ca. fünf Minuten mit PBST gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem „Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus“ (Perkin Elmer).

2.2.2.3 Immunfluoreszenz

Transfektion der Zellen:

Einen Tag vor der Transfektion wurden 1×10^5 Zellen pro Deckgläschen in 6 well-Platten ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und 1,5 ml neues Medium auf die Zellen gegeben. Pro Deckgläschen wurden 1,5 µg DNA, 100 µl Optimem (serumfreies Medium; GibcoBRL) und 10 µl Polyfect (Qiagen) gemischt, bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert und mit 0,6 ml Medium versetzt. Anschließend wurde das Gemisch zu den Zellen gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Immunfluoreszenz

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit 1,2 x PEM gewaschen. Danach wurden die Zellen durch Inkubation in 3,7% Paraformaldehyd (in PEM) für 10 Minuten fixiert. Die Zellen wurden kurz mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch Inkubation in 0,2% Triton (in PBS) für 10 Minuten. Die Zellen wurden 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Durch 20 Minuten Inkubation in PBS mit 0,5% BSA sollten unspezifische Bindungsstellen abgedeckt werden. Der erste Antikörper wurde in PBS+0,5% BSA verdünnt, mit 1 µl Proteinextrakt pro Ansatz versetzt und 10 Minuten inkubiert. Pro Deckgläschen wurden 50 µl Antikörperlösung auf Parafilm getropft. Die Deckgläschen wurden mit den Zellen nach unten auf den Parafilm gelegt und eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Der zweite Antikörper wurde in PBS verdünnt, mit 1 µl Proteinextrakt versetzt und 10 Minuten inkubiert. Die Inkubation der Deckgläschen mit dem zweiten Antikörper erfolgte wie beim ersten Antikörper. Es wurde für 30 Minuten in einer feuchten Kammer (dunkel) inkubiert. Anschließend wurde 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen und die Deckgläschen in 10 µl Mounting Medium eingebettet.

2.2.2.4 Mikrotubuli-Präparation

$1,6 \times 10^7$ embryonale Fibroblasten wurden 2 x mit je 10 ml eiskaltem PBS gewaschen und jeweils für 10 Minuten bei 1.000-1.200 rpm zentrifugiert. 10 ml Microtubuli Assembly (MT) Puffer wurden mit einer Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche) versetzt. 1,8 ml dieses Puffers wurden zu den Zellen gegeben. Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Glaspotter. Anschließend wurde das Lysat durch Ultrazentrifugation (1 Stunde bei 60.000g; 4°C) geklärt. Der Überstand wurde mit 18 µl dGTP (100 mmol) und 7,2 µl Taxol (5 mg/ml) versetzt, für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, mit 180 µl Sucrose-Lösung versetzt und für 30 Minuten bei 40.000g, 37°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl MT-Puffer und 0,5 µl dGTP resuspendiert, mehrere Minuten im Kühlschrank inkubiert, in Eppis aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2.5 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese wurde nach der Ampholyt-Methode (J. Klose) durchgeführt. 20 µl der aufgereinigten Mikrotubuli (20 µg) wurden mit 20 mg Urea, 1,4 µl 1M DTT und 2 µl Ampholyte, pH 2-4 gemischt. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert und für 5 Minuten entgast.

Der Gelmix für die erste Dimension wurde aus 10 ml Acrylamid/Piperazin Diacrylamid-Lösung, 5 ml Carrier Ampholyt-Mix, 27 g Urea, 8,75 ml Glycerol und 5 ml TEMED hergestellt. Der Gelmix wurde filtriert, in 0,975 µl Portionen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Zur Herstellung der ersten Dimension wurde ein 0,975 µl Aliquot aufgetaut, mit 25 µl 0,8% APS versetzt und in die Kapillare gezogen. Der Ethylendiamin-Puffer wurde unten in die Kammer gegossen und ca. 60 ml des Phosphorsäurepuffers oben in die Kammer. Nach dem Polymerisieren der Gellösung für die erste Dimension wurden die Proben aufgetragen. Danach wurden je 25 µl Sample Protection Solution auf die Proben gegeben und Phosphorsäure oben drauf pipettiert. Alle Schritte wurden luftblasenfrei durchgeführt. Die Verbindung der Elektrophoresekammer mit dem Netzgerät erfolgte so, dass das obere Pufferfach die Kathode und das untere die Anode war. Der Gellauf erfolgte bei 100 V für 45 Minuten, bei 200 V für 1 Stunde, bei 400 V für 1 Stunde, bei 600 V für 1 Stunde, bei 800 V für 10 Minuten und anschließend bei 1000 V für 5 Minuten.

Nach dem Gellauf wurde die erste Dimension mit Glycerin aus der Kapillare gedrückt und 10 Minuten in Equilibrierungspuffer inkubiert.

Für die zweite Dimension wurde ein 10% SDS-Trenngel wie unter 2.2.2.2 beschrieben hergestellt und bis zum oberen Rand der Glasplatte gegossen. Das flüssige Trenngel wurde danach mit 100-200 µl Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde die erste Dimension auf die zweite Dimension gelegt und mit 1% Agarose (im Agarose-Puffer) überschichtet, wobei eine Tasche für den Protein-Standard geformt wurde. Der Gellauf der zweiten Dimension erfolgte in 1 x Laemmli-Puffer bei 200 V für 45-75 Minuten.

Der Transfer der zweiten Dimension nach dem Gellauf auf die PVDF-Membran erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben.

Nach dem Blotten wurde die Membran in 2 x PBS, 0,2% Tween, 1% Polyvinylpyrrolidon und 2% BSA geblockt. Die Phospho-Serin Antikörper 4H4 und 16B4 (Biomol) wurden mit einer Konzentration von jeweils 0,1 µg/ml in 3 ml 2 x PBS, 0,2% Tween, 1% Polyvinylpyrrolidon und 2% BSA gepoolt. Die Antikörperinkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach der Inkubation der ersten Antikörper wurde 5 x 5 Minuten mit Tris-HCl Puffer gewaschen. Die Inkubation des zweiten Antikörpers (goat Anti-mouse-HRP) erfolgte in einer Verdünnung von 1:2000 in PBST für 30 Minuten. Anschließend wurde mit PBST für 2 Stunden gewaschen, wobei altes PBST einige Male durch neues ersetzt wurde.

Die Detektion der Signale erfolgte mit dem „Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus“ (Perkin Elmer).

2.2.3 β -Galaktosidase-Assay

2.2.3.1 Hefe-Transformation

Es wurden zwei Bleistiftspitzen Hefe des L40-Stammes von der Platte abgenommen und in je 1 ml YPD-Medium gegeben. Die Hefe wurde durch 3 Minuten Schütteln auf dem Vortex im Medium gelöst und anschließend in 2 x 50 ml YPD-Medium überführt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für 16 Stunden in einem Schüttelinkubator bei 225 rpm.

Jeweils 19 ml der Übernachtskulturen wurden mit jeweils 300 ml YPD (2 l Kolben) versetzt und die OD₆₀₀ gemessen. Bei einer Ausgangs-OD₆₀₀ von 0,2-0,3 wurden die Kulturen für insgesamt 3,5 Stunden bei 30°C im Schüttelinkubator bei 225 rpm inkubiert, wobei nach 2

2. Material und Methoden

Stunden jede halbe Stunde die OD₆₀₀ gemessen wurde. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 wurden die Zellen in 50 ml Gefäße (Falcon) umgefüllt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 1.000 x g abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Zellen vereinigt, mit 50 ml TE gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellen in 1,5 ml frisch zubereiteten 1 x TE/1 x LiAc resuspendiert. Danach wurden 0,1 µg Plasmid-DNA und 0,1 mg „herring testes carrier DNA“ (vorher für 20 Minuten bei 95°C denaturiert) in einem neuen Eppi gemischt und mit 0,1 ml der kompetenten Hefe-Zellen auf dem Vortex gemischt. Es wurden 0,6 ml sterile PEG/LiAc Lösung zugegeben und auf dem Vortex für 10 sec geschüttelt. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 30°C.

Anschließend wurden 70 µl DMSO zugesetzt und durch vorsichtiges Invertieren vermischt. Es folgte der Hitzeschock für 15 Minuten bei 42°C und die Abkühlung der Zellen in Eiswasser für 1-2 Minuten.

Die Zellen wurden für 5 sec bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 0,5 ml sterilem 1 x TE-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden auf Platten mit –TL Selektionsmedium ausplattiert und für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert.

Um auf die Interaktion der beiden Plasmide zu selektionieren wurden einige Kolonien auf Platten mit –HTL Selektionsmedium plattiert und erneut für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.3.2 ONPG-Flüssigassay

Eine Hefe-Übernachtskultur wurde folgendermaßen angesetzt: Einige Hefekolonien von den –TL oder –HTL Platten wurden in 5 ml des entsprechenden Selektionsmediums überführt, auf dem Vortex gelöst und bei 30°C für 16-18 Stunden im Schüttelinkubator bei 225 rpm inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das ONPG mit einer Konzentration von 4 mg/ml in Z Puffer gelöst (durch 1-2 Stunden rühren). Die Übernachtskultur wurde auf dem Vortex für 0,5-1 Minute geschüttelt, so dass sich Zellklumpen lösen. Anschließend wurde soviel der Übernachtskultur in frisches YPD-Medium überführt, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,2-0,3 aufwies. Das Volumen der Kultur betrug 10 ml. Die frische Kultur wurde bei 30°C für 3-5 Stunden im Schüttelinkubator bei 225 rpm inkubiert. Nach 2 Stunden wurde jede halbe Stunde die OD₆₀₀ gemessen, bis die Zellen in der mid-log Phase (OD₆₀₀ 0,5-0,8) waren. Der genaue OD₆₀₀ Meßwert wurde protokolliert.

2. Material und Methoden

1,5 ml der Kultur wurde in je drei 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 14.000 rpm (10.000 x g) für 30 sec zentrifugiert. Die Überstände wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Zellpellets wurden in je 1,5 ml Z Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in je 300 µl Z Puffer resuspendiert. 0,1 ml der Proben wurden in ein frisches Eppi überführt und für 1 Minute in flüssigen Stickstoff gehalten. Anschließend wurden die gefrorenen Eppis für 1 Minute in ein 37°C Wasserbad gestellt. Dieser Zyklus von Einfrieren und Auftauen wurde zweimal wiederholt um sicherzugehen, dass der Zellaufschluß erfolgreich war.

Für den Nullabgleich wurden 100 µl Z Puffer in ein 1,5 ml Eppi pipettiert. Zu den Proben und dem Nullabgleich wurden 0,7 ml Z Puffer + β-Mercaptoethanol gegeben. Gleichzeitig mit der Zugabe von 160 µl ONPG in Z Puffer wurde die Stoppuhr gestartet und die Proben und der Nullabgleich bei 30°C inkubiert.

Nach der Gelbfärbung der Proben wurden 0,4 ml Na₂CO₃ zu den Proben und dem Nullabgleich zugegeben um die Reaktion zu stoppen. Die verstrichene Zeitspanne zwischen der Zugabe des ONPGs und dem Stoppen der Reaktion wurde protokolliert.

Das Photometer wurde gegen den Nullabgleich bei der Wellenlänge von 420 nm kalibriert und die OD₄₂₀ der Proben gemessen.

Nach folgender Formel wurden die β-Galaktosidase-Einheiten berechnet:

$$1.000 \times OD_{420} / (t \times V \times OD_{600})$$

t = Zeitspanne der Inkubation bis zum Abstoppen der Reaktion

V = 0,1 ml x Konzentrationsfaktor (hier: 5)

OD₆₀₀ = A₆₀₀ von 1 ml Kultur

2.2.4 Sequenzanalyse

Die Einzelsequenzen aus den RT-PCR- und Race-Experimenten wurden mit dem in der Programmpackung STADEN (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Option/staden.html>) enthaltenen Programm gap4 zu Konsensussequenzen zusammengesetzt. Konsensussequenzen wurden mit dem in dem Programm GCG enthaltenen Programm fasta auf Nukleotid- und Proteinebene verglichen.

2. Material und Methoden

Neue Exons in der genomischen *MIDI*-Sequenz von Mensch und Maus wurden mit dem Softwareprogramm NIX (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/NIX/>) vorhergesagt. Repetitive Sequenzen wurden mit dem Repeatmasker-Programm (<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>) identifiziert. Der Vergleich der genomischen *MIDI*-Sequenz des Menschen mit der genomischen *MIDI*-Sequenz der Maus erfolgte mit dem Softwareprogramm PipMaker (<http://bio.cse.psu.edu/pipmaker/>). Proteinsequenzen wurden mit dem Softwareprogramm GeneQuiz (<http://columbia.ebi.ac.uk:8765/ext-genequiz/>) nach funktionellen Motiven und Domänen abgesucht.