

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

|   |                                |
|---|--------------------------------|
| Adenosine 5'-Triphosphat  | Sigma, Deisenhofen             |
| Agarose   | Sigma, Deisenhofen             |
| Ammoniumacetat  | Sigma, Deisenhofen             |
| Ammoniumsulfat  | Sigma, Deisenhofen             |
| Ampicillin  | Hybaid, Heidelberg             |
| Bacto Trypton   | Difco, Detroit, MI             |
| Bacto Agar  | Difco, Detroit, MI             |
| Bacto Hefe Extrakt  | Difco, Detroit, MI             |
| Bernsteinsäureanhydrid  | Fluka, Deisenhofen             |
| Betain, Monohydrat  | Sigma, Deisenhofen             |
| Chloroform  | Merck KGaA, Darmstadt          |
| 2'-Deoxyadenosin 5'-Triphosphat   | Sigma, Deisenhofen             |
| 2'-Deoxycytidin 5'-Triphosphat  | Sigma, Deisenhofen             |
| 2'-Deoxyguanosin 5'-Triphosphat   | Sigma, Deisenhofen             |
| 2'-Deoxythymidin 5'-Triphosphat   | Sigma, Deisenhofen             |
| Deoxycytidin 5'-[ $\alpha$ - <sup>33</sup> P]-triphosphat<br>250 $\mu$ Ci (9,25 MBq)/25 $\mu$ l; 3000 Ci (110 TBq)/mmol | Amersham Bioscience, Freiburg  |
| Dextransulfat   | Sigma, Deisenhofen             |
| 1,2-Dichlorethan (DCE)  | Fluka, Deisenhofen             |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC)  | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| Dikaliumhydrogenphosphat 3-Hydrat   | Merck KGaA, Darmstadt          |
| Dimethylformamid  | Fluka, Deisenhofen             |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )   | Merck KGaA, Darmstadt          |
| Dithiothreitol (DTT)  | Merck KGaA, Darmstadt          |
| DNA Marker GeneRuler™ 100 bp / 1 kb   | MBI Fermentas, St. Leon-Rot    |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)   | Invitrogen GmbH, Karlsruhe     |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)   | Merck KGaA, Darmstadt          |
| N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-3-popanesulfonsäure (EPPS)   | Sigma, Deisenhofen             |

---

|   |                                  |
|---|----------------------------------|
| Essigsäure  | Merck KGaA, Darmstadt            |
| Ethanol   | Riedel-de Haen, Seelze           |
| Ethidiumbromid (10 mg/ml)                         | Sigma, Deisenhofen               |
| Fetales Kälberserum (FCS)                         | Invitrogen GmbH, Karlsruhe       |
| Ficoll <sup>®</sup> 400                           | Amersham Bioscience, Freiburg    |
| FluoroLink <sup>™</sup> Cy3/Cy5-dCTP              | Amersham Bioscience, Freiburg    |
| Formamid  | Merck KGaA, Darmstadt            |
| Glucose   | Merck KGaA, Darmstadt            |
| Glycerin, 87% (v/v)                               | Fluka, Deisenhofen               |
| Glykogen  | Sigma, Deisenhofen               |
| Hefe-tRNA (10 mg/ml)                              | Roche Applied Sciences, Mannheim |
| Hemin   | Sigma, Deisenhofen               |
| HMI-9   | Invitrogen GmbH, Karlsruhe       |
| Hoechst 33258                                     | Sigma, Deisenhofen               |
| Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot      |
| Isoamylalkohol (IAA)                              | Merck KGaA, Darmstadt            |
| Isopropanol                                       | Merck KGaA, Darmstadt            |
| Kalbsthymus-DNA, genomisch                        | Amersham Bioscience, Freiburg    |
| Kaliumchlorid                                     | Merck KGaA, Darmstadt            |
| Kaliumdihydrogenphosphat                          | Merck KGaA, Darmstadt            |
| Kresolrot (o-Kresolsulfonphthalein)               | Sigma, Deisenhofen               |
| Lambda-DNA, genomisch                             | Invitrogen GmbH, Karlsruhe       |
| Lithiumchlorid                                    | Sigma, Deisenhofen               |
| Magnesiumchlorid                                  | Merck KGaA, Darmstadt            |
| Magermilchpulver                                  | Fluka, Deisenhofen               |
| Magesiumsulfat 7-Hydrat                           | Merck KGaA, Darmstadt            |
| MEM-Pros (DTM)                                    | Invitrogen GmbH, Karlsruhe       |
| 2-Mercaptoethanol                                 | Merck KGaA, Darmstadt            |
| Mineralöl   | Sigma, Deisenhofen               |
| Mixed Bed Resin                                   | Sigma, Deisenhofen               |
| Natriumacetat                                     | Sigma, Deisenhofen               |
| Natriumchlorid                                    | Merck KGaA, Darmstadt            |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                        | Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg   |
| Natriumhypochlorit, 13% (v/v)                     | Fluka, Deisenhofen               |

---

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| Nonidet P-40   | Sigma, Deisenhofen             |
| Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer  | Invitrogen GmbH, Karlsruhe     |
| Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)  | Invitrogen GmbH, Karlsruhe     |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)   | Sigma, Deisenhofen             |
| Poly-L-Lysin (P8920)   | Sigma, Deisenhofen             |
| Polyvinylpyrrolidon  | Sigma, Deisenhofen             |
| Rinderserumalbumin (20 mg/ml)  | MBI Fermentas, St. Leon-Rot    |
| Roti <sup>®</sup> -Phenol/Chloroform<br>(Phenol/Chloroform/IAA; 25:24:1; v/v/v; P/C/I) | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| Roti <sup>®</sup> -Phenol, pH 4,5  | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| Salzsäure, 32% (v/v)   | Riedel-de Haen, Seelze         |
| Trizma <sup>®</sup> Base   | Sigma, Deisenhofen             |
| Trizma <sup>®</sup> Hydrochlorid   | Sigma, Deisenhofen             |
| TRIzol <sup>®</sup>  | Invitrogen GmbH, Karlsruhe     |
| Zinkchlorid  | Merck KGaA, Darmstadt          |

### 2.1.2. Reagenziensätze

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| QIAquick <sup>®</sup> PCR-Reinigungs Kit         | Qiagen GmbH, Hilden                |
| QIAEX <sup>®</sup> II Agarosegel-Extraktions Kit | Qiagen GmbH, Hilden                |
| Oligotex <sup>®</sup> mRNA Kit                   | Qiagen GmbH, Hilden                |
| TA-Cloning <sup>®</sup> Kit                      | Invitrogen, Carlsbad, CA           |
| RiboGreen <sup>®</sup> RNA-Quantifizierungs Kit  | Molecular Probes, Inc., Eugene, OR |

### 2.1.3. Enzyme

|   |  |
|---|--|
| <i>DpnII</i>                                      | New England Biolabs GmbH, Frankfurt    |
| <i>E.coli</i> DNA-Ligase (10 U/μl)                | Invitrogen GmbH, Karlsruhe             |
| <i>E.coli</i> DNA-Polymerase I (10 U/μl)          | Invitrogen GmbH, Karlsruhe             |
| <i>E.coli</i> RNase H (2 U/μl)                    | Invitrogen GmbH, Karlsruhe             |
| Lysoszym (28262)                                  | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| <i>Mung bean nuclease</i> (10 U/μl)               | New England Biolabs GmbH, Frankfurt    |
| RNasin <sup>®</sup> RNase-Inhibitor               | Promega, Heidelberg                    |
| Superscript <sup>®</sup> II Reverse Transkriptase | Invitrogen GmbH, Karlsruhe             |
| <i>Taq</i> DNA-Polymerase (1 U/μl)                | MBI Fermentas, St. Leon-Rot            |
| <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/μl)                | Qiagen GmbH, Hilden                    |

T4 DNA-Ligase (400 U/μl)

New England Biolabs GmbH, Frankfurt

#### 2.1.4. Oligonukleotide

Alle Primer wurden bei Interactiva, Ulm oder MWG Biotech AG, Ebersberg gekauft und in 1 mM Tris-HCl [pH 7,2] gelöst.

##### 2.1.4.1. Repräsentative Differenzanalyse

|          |                                    |
|----------|------------------------------------|
| R-Bam-12 | 5'-GAT CCT CGG TGA                 |
| R-Bam-24 | 5'-AGC ACT CTC CAG CCT CTC ACC GAG |
| J-Bgl-12 | 5'-GAT CTG TTC ATG                 |
| J-Bgl-24 | 5'-ACC GAC GTC GAC TAT CCA TGA ACA |
| N-Bgl-12 | 5'-GAT CTT CCC TCG                 |
| N-Bgl-24 | 5'-AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAA |

##### 2.1.4.2. Amplification der *T. brucei* Bibliothek

|      |                                   |
|------|-----------------------------------|
| L377 | 5'-TTG TAA AAC GAC GGC CAG TG     |
| R499 | 5'-GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GA |

##### 2.1.4.3. RT-PCR

|             |                                |
|-------------|--------------------------------|
| B06 Forward | 5'- ATC CGT GAG ATG ATT CTG GC |
| B06 Reverse | 5'- CCT CAC TTA CCG CAA TAG CC |
| H08 Forward | 5'- TGC TTC ATT GGC ATC ATC G  |
| H08 Reverse | 5'- GAA GG CAC CAA CAA GTC CG  |
| D11 Forward | 5'- GTA ATT CGT CAG ATG CGT GC |
| D11 Reverse | 5'- TCT TCG ACA CAA CGG TTA CG |
| D11 Forward | 5'- GTA ATT CGT CAG ATG CGT GC |
| D11 Reverse | 5'- TCT TCG ACA CAA CGG TTA CG |
| D11 Forward | 5'- GTA ATT CGT CAG ATG CGT GC |
| D11 Reverse | 5'- TCT TCG ACA CAA CGG TTA CG |
| D11 Forward | 5'- GTA ATT CGT CAG ATG CGT GC |
| D11 Reverse | 5'- TCT TCG ACA CAA CGG TTA CG |

#### 2.1.5. Bakterienstämme und Zelllinien

*E. coli* ElektroMax DH10B

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

TREU (*Trypanosomiasis Research, Edinburgh*)

## 2.1.6. Lösungen und Puffer

### 2.1.6.1. Allgemein

|                          |   |
|--------------------------|---|
| DEPC-Wasser              | 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat<br>Inkubiert bei 37°C über Nacht und autoklaviert  |
| 10× <i>DpnII</i> -Puffer | 100 mM NaCl, 50 mM BisTris-HCl [pH 6,0], 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT   |
| 5× Erststrang-Puffer     | 250 mM Tris-HCl [pH 8,3], 375 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub>   |
| Formamid (deionisiert)   | 10 g Mixed Bed Resin pro 100 ml Formamid; 1 h bei RT inkubieren; Mixed Bed Resin durch Filtration entfernen.  |
| 10× HMFM                 | Lösung 1: 0,76 g Magnesiumsulfat 7-Hydrat, 4,5 g Trinatriumcitrat 2-Hydrat, 9 g Ammoniumsulfat, 440 g Glycerin ad 800 ml dH <sub>2</sub> O<br>Lösung 2: 18 g Kaliumdihydrogenphosphat, 61,6 g Dikaliumhydrogenphosphat 3-hydrat ad 200 ml dH <sub>2</sub> O<br>Lösung 1 und Lösung 2 wurden nach dem autoklavieren gemischt |
| IPTG-Lösung              | 20% (w/v) IPTG in dH <sub>2</sub> O   |
| LB-Medium                | 1% (w/v) Bacto Trypton, 0,5% (w/v) Bacto Yeast Extract, 1% (w/v) NaCl, [pH 7,0]   |
| 1× PBS                   | 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,2 g KCl, 8 g NaCl ad 1 l dH <sub>2</sub> O, [pH 7,4]   |
| 10× PCR-Puffer           | 0,1 M Tris-HCl [pH 8,3], 0,5 M KCl, 22,5 mM MgCl <sub>2</sub>   |
| RNA-Probenpuffer         | 62,5% (v/v) deionisiertes Formamid, 1,14 M Formaldehyd, 1,25× MOPS-EDTA Natriumacetat-Puffer, 200 µg/ml Bromphenol Blau, 200 µg/ml Xylene Cyanol, 50 µg/ml Ethidiumbromid   |
| 6× Probenpuffer          | 2 mg/ml Bromphenol Blau, 2 mg/ml Xylene Cyanol, 60% (v/v) Glycerin, 60 mM EDTA; MBI Fermentas   |
| SOC-Medium               | 2% (w/v) Bacto Trypton, 0,5% (w/v) Bacto Yeast Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, [pH 7,0], autoklavieren, 20 mM Glucose und 20 mM MgCl <sub>2</sub> vor Gebrauch zugeben   |
| 10× T4 Ligase-Puffer     | 500 mM Tris-HCl [pH 7,5], 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM DTT, 10 mM ATP, 250 µg/ml BSA   |
| 50× TAE-Puffer           | 0,4 M Tris Base, 0,4 M Essigsäure, 20 mM EDTA [pH 8,0]  |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| 10× TNE-Puffer        | 100 mM Tris-HCl [pH 7,4], 10 mM EDTA, 2 M NaCl   |
| X-Gal-Lösung          | 2% (w/v) X-Gal in N,N'- Dimethylformamid   |
| 2YT-Medium (Agar)     | 1,6% (w/v) Bacto Trypton, 1% (w/v) Bacto Yeast Extract, 0,5% (w/v) NaCl, (1,5% (w/v) Bacto Agar), [pH7,0]  |
| 5× Zweitstrang-Puffer | 100 mM Tris-HCl [pH 6,9], 23 mM MgCl <sub>2</sub> , 450 mM KCl, 0,75 mM β-NAD <sup>+</sup> , 50 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |

#### 2.1.6.2. *cDNA-RDA*

|                   |   |
|-------------------|---|
| C/I               | Chloroform/Isoamylalkohol, 24/1 (v/v)   |
| 3× EE             | 30 mM EPPS, 3 mM EDTA [pH 8,0]  |
| 10× Ligase-Puffer | 0,5 M Tris-HCl [pH 7,8], 0,1 M MgCl <sub>2</sub> , 0,1 M DTT, 10 mM ATP   |
| 10× MBN-Puffer    | 500 mM Natriumacetat [pH 5,0], 300 mM NaCl, 10 mM ZnCl <sub>2</sub>   |
| 5× PCR-Puffer     | 335 mM Tris-HCl [pH 8,8], 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 80 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 166 µg/ml BSA |
| TE-Puffer         | 100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 10 mM EDTA [pH 8,0]   |

#### 2.1.6.3. *DNA-Macroarrays*

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Denaturierungs-Puffer   | 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH  |
| Formamid-Puffer         | 63% (v/v) deionisiertes Formamid, 9% (w/v) SDS, 1,25% (w/v) Sarcosyl NL-30, 6,25× SSC, 62,5 mM Na-Phosphat-Puffer [pH 7,2], 2,5% (w/v) Magermilchpulver |
| Neutralisierungs-Puffer | 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl [pH 7,2], 1 mM EDTA  |
| Stripping-Puffer        | 2,5 mM Na-Phosphat-Puffer [pH 7,2], 0,1% (w/v) SDS  |
| Wasch-Puffer            | 40 mM Na-Phosphat-Puffer [pH 7,2], 0,1% (w/v) SDS   |

#### 2.1.6.4. *DNA-Microarrays*

|                       |   |
|-----------------------|---|
| 100× Denhardt's       | 10 g Ficoll 400, 10 g Polyvinylpyrrolidon, 10 g BSA ad 500 ml dH <sub>2</sub> O               |
| Hybridisierungspuffer | 5% (w/v) Dextransulfat, 3× SSC, 1% (w/v) SDS, 5× Denhardt's, 50% (v/v) deionisiertes Formamid |
| Poly-L-Lysin-Lösung   | 10% (v/v) Poly-L-Lysin, 0,1× PBS  |
| Reinigungslösung      | 100 g NaOH in 400 ml dH <sub>2</sub> O lösen, 600 ml 95% Ethanol zugeben                      |
| 2× Spotting-Puffer    | 6× SSC, 3 M Betain  |
| 20× SSC               | 3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat [pH 7,0]   |

**2.1.7. Geräte**

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| BioGrid II   | BioRobotics Ltd., Cambridge, UK       |
| Elektroporator, <i>E. coli</i> TransPorator <sup>®</sup> | BTX, San Diego, CA                    |
| Fluorometer, FLUOstar Galaxy                             | BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg   |
| Fluoreszenz Image Analyzer, FLA-3000                     | Raytest GmbH, Straubenhardt           |
| Geldokumentationssystem, GelDoc 1000                     | BioRad, München                       |
| Microarrayscanner, ScanArray5000                         | PE Applied Biosystems, Boston, MA     |
| Microarrayspotter, SDDC-2                                | BioRad, München                       |
| Photometer, Ultraspec 2000                               | Amersham Bioscience, Freiburg         |
| Picking Roboter  | MPI für Molekulare Genetik, Berlin    |
| Rotationsofen  | H. Saur Laborbedarf, Reutlingen       |
| Scintillationszähler, LS1801                             | Beckman Coulter, Unterschleissheim    |
| Thermocycler, PTC-200                                    | MJ Research Inc., Waltham, MA         |
| Transilluminator, Chroma                                 | Vetter GmbH, Wiesloch                 |
| UV-Crosslinker, UVC 500                                  | Amersham Bioscience, Freiburg         |
| Vakuumkonzentrator, Alpha I-6                            | Bachofer, Reutlingen                  |
| Zentrifuge, Biofuge pico                                 | Kendro Laboratories, Hanau            |
| Zentrifuge, Megafuge 1.0R                                | Kendro Laboratories, Hanau            |
| Zentrifuge, Sorvall <sup>®</sup> Super T21               | Kendro Laboratories, Hanau            |
| Zentrifuge, 2K15   | Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode |

**2.1.8. Verbrauchsmaterial**

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| Blottingpapier Filtrak BF2                             | Neolab Migge, Heidelberg       |
| CMT-GAPS <sup>™</sup> Objektträger                     | Corning Inc., Corning, NY      |
| Deckgläser (24 × 60 mm)                                | Menzel-Gläser, Braunschweig    |
| ELISA 8-well F-Strips, schwarz                         | Greiner, Solingen              |
| Klebefolie für Microtiterplatten                       | Nalge Nunc Int., Rochester, NY |
| Microseal <sup>™</sup> 96/384, V-Boden, PP             | MJ Research Inc., Waltham, MA  |
| Objektträger (76 × 26 mm)                              | Menzel-Gläser, Braunschweig    |
| OmniTray <sup>®</sup> (128 × 86 mm), 1-well, PS        | Nalge Nunc Int., Rochester, NY |
| Pall Biodyne <sup>™</sup> B Nylonmembran (115 × 76 mm) | Nalge Nunc Int., Rochester, NY |
| PCR-Platte, 96/384-well, PP                            | Steinbrenner, Neckargemünd     |
| PCR-Platten Klebefolie (AB0558)                        | Abgene House, Surrey, UK       |

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| PCR-Platten Microseal™ "A" Wachsfolie            | MJ Research Inc., Waltham, MA  |
| Platte, 96/384-well, PS, 120 µl/300 µl           | Nalge Nunc Int., Rochester, NY |
| Platte, 384-well, PS, großes Volumen (X7001)     | Genetix, Christchurch, UK      |
| Polyfiltronics™ Uniplate®, 384-well, V-Boden, PP | Whatman Inc., Clifton, NJ      |
| UVette® 220-1600 nm                              | Eppendorf, Hamburg             |
| Verpackungsfolie "Saran wrap"                    | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| Zellkulturschalen Nunclon™ 75 cm <sup>2</sup>    | Nalge Nunc Int., Rochester, NY |

## 2.1.9. Software und Internetadressen

### 2.1.9.1. Software

|  |   |
|--|---|
| AIS-Array Vision 4.0                                 | Imaging Research Inc., Toronto, Canada  |
| DNASar Softwarepaket                                 | DNASTAR, Inc., Madison, WI              |
| GenePix Pro 3.0.5                                    | Axon Instruments, Inc., Union City, CA  |
| MIDAS TM4  | TIGR, Rockville, MD                     |
| STAT Plus  | Berk, Carey (Brooks/Cole), Belmont, CA, |
| SAM ( <i>Significance Analysis for Microarrays</i> ) | Stanford University, CA.                |

### 2.1.9.2. Internetadressen

|         |   |
|---------|---|
| BLAST   | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>   |
| Primer3 | <a href="http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi/">http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi/</a> |
| SAM     | <a href="http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM">www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM</a>  |
| MIDAS   | <a href="http://www.tigr.org/software/tm4/midas.html">http://www.tigr.org/software/tm4/midas.html</a>                                   |

## 2.1.10. Weitere Materialien und Hilfsmittel

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| Agarplatten (22×22 cm)                 | Nalge Nunc Int., Rochester, NY       |
| Elektrophoresekammer, horizontal, groß | PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Elektrophoresekammer, horizontal, mini | Renner, Dannstadt                    |
| Elektroporationsküvette, 1 mm          | Equibio, Ashford, UK                 |
| Hybridisierungskammern                 | TeleChem Inc., Sunnyvale, CA, USA    |
| Hybridisierungsflaschen                | Glasbläserei, DKFZ, Heidelberg       |
| 12-Kanal-Pipetten Biohit Proline®      | Biohit, Helsinki, Finnland           |
| Phosphoscreens mit Kassetten           | Raytest GmbH, Straubenhardt          |
| Replikator, 96-pin, Metall             | Steinbrenner, Neckargemünd           |
| Replikator, 96/384-pin, PP             | Genetix, Christchurch, UK            |



---

SMP3-Nadeln

TeleChem Inc., Sunnyvale, CA, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1. Kultivierung von *T. brucei*

Für die Generierung der Blutbahnform von *T. brucei* wurde der *T. brucei brucei* Klon TREU927/4 in HMI-9 mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) und 100 U/ml (1%) Penicillin/Streptomycin kultiviert (Hirumi und Hirumi, 1989). Für die Generierung der prozyklischen Form von *T. brucei* wurde TREU927/4 in MEM-Pros (DTM) mit Hemin, 10% (v/v) FCS und 100 U/ml (1%) Penicillin/Streptomycin kultiviert (Overath *et al.*, 1986). Um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten, wurden sie regelmäßig subkultiviert.

### 2.2.2. Isolierung von RNA

#### 2.2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA mit TRIzol<sup>®</sup>

Dieses Protokoll wurde für die Isolierung von Gesamt-RNA aus der Blutbahnform und prozyklischen Form von *T. brucei* verwendet. Die Zellen wurden für die Isolation der RNA in der exponentiellen Wachstumsphase gehalten. Die Zelldichte betrug vor der Isolation der RNA maximal  $1 \times 10^6$ /ml für die Blutbahnform bzw.  $2 \times 10^6$ /ml für die prozyklische Form. Zur Präparation der RNA wurde der Inhalt einer 75-cm<sup>2</sup> Zellkulturschale in ein 50 ml Zellkulturröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde anschließend bei 2500 rpm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden das Zellpellet in 20 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 4 ml TRIzol<sup>®</sup> resuspendiert und in ein 15 ml Röhrchen überführt und für einige Minuten bei RT inkubiert. Um die Zellen zu lysieren wurden sie für 1 min mit Vortexer geschüttelt und bei -80°C eingefroren. Für die Isolierung von ca. 120 µg Gesamt-RNA wurden 1,6 ml der Zellsuspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Separation der Phasen wurden 400 µl Chloroform zugegeben. Diese Lösung wurde erneut für 1 min kräftig mit einem Vortexer gemischt und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Die Trennung in eine wässrige und organische Phase war nach einer Zentrifugation für 30 min bei 14000× g (4°C) sichtbar. Die obere wässrige Phase (ca. 1 ml) wurde in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA wurden 1× Volumen (1 ml) Isopropanol (4°C) zugegeben und durchmischt. Die Probe wurde für 30 min bei -80°C und anschließend über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach der Fällung wurden die Probe für 1 h bei 14000× g (4°C) zentrifugiert. Die RNA wurde mit 1 ml 75% Ethanol (-

20°C) überschichtet und für weitere 15 zentrifugiert. Nach dem Waschen wurde das Ethanol entfernt und die RNA für ca. 10 min bei RT getrocknet. Die RNA wurde nach dem Trocknen in 50 µl DEPC-Wasser gelöst.

#### **2.2.2.2. Isolierung von PolyA<sup>+</sup>-RNA**

Alle Arbeitsschritte wurden wie im Oligotex™ Handbuch 07/99 (Qiagen) beschrieben durchgeführt. Für die Reinigung wurden 5 µg Gesamt-RNA in 200 µl DEPC-Wasser gelöst. Es wurden 200 µl Bindepuffer (OBB) und 46 µl Oligotex™-Suspension zugegeben. Um Sekundärstrukturen der RNA zu zerstören wurde diese Mischung für 3 min bei 70°C in einem Heizblock erhitzt. Die Hybridisierung zwischen polyA-Sequenzen und den Oligo-dT<sub>30</sub> der Oligotex™-Partikel erfolgte während einer Inkubation der Probe bei RT für 10 min. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde anschließend auf eine Säule gegeben und für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Oligotex™ Partikel wurden zweimal mit 400 µl OW2-Puffer gewaschen. Zur Elution der polyA<sup>+</sup>-RNA wurden 20 µl OEB-Puffer (70°C) auf die Säule pipettiert. Durch mehrmaliges Pipettieren wurde die Oligotex™-Partikel resuspendiert. Die Säulen wurden anschließend für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Um eine hohe Ausbeute zu erhalten, wurde nochmals mit 20 µl OEB-Puffer (70°C) eluiert.

#### **2.2.2.3. Fluorometrische Bestimmung der RNA-Konzentration**

Zur Quantifizierung von RNA wurde der RiboGreen® RNA-Quantifizierung Kit verwendet. Zwei verschiedene RiboGreen®-Konzentrationen im Probenpuffer waren erforderlich um den vollen dynamischen Bereich der Methode ausnutzen zu können. Für die meisten Anwendungen wurde die Konzentration für den oberen Meßbereich (20 ng/ml - 1 µg/ml) verwendet. Für diesen Bereich wurde der RiboGreen®-Farbstoff 1/200 in TE-Puffer verdünnt. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde ribosomale RNA in TE und RiboGreen®-Lösung verdünnt. Insgesamt wurden pro Meßbereich 4 Konzentrationen verwendet (Oberer Meßbereich: 1000 ng/ml, 500 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml). Die Proben wurden ebenfalls mit TE und der RiboGreen®-Lösung verdünnt. Die Verdünnungen der Standardkurve und Proben wurde direkt in ELISA 8-well F-Strips (Greiner) angesetzt, gemischt und vor dem Messen für 5 min bei RT unter Lichtabschluß inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit einem FLUOstar Galaxy Fluorometer (BMG) bei einer Anregungs-Wellenlänge von 480 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 520 nm.

#### **2.2.2.4. RNA Agarose-Gelelektrophorese**

Die Analyse der RNA-Qualität erfolgte mit einer vereinfachten Formamid/Agarose-Gelelektrophorese, bei der statt einem MOPS/Formamid Elektrophorese-Puffer 1× TAE verwendet wurde. Zum Auftragen der Proben auf das Gel wurde ein Formamid-Probenpuffer verwendet. Vor der Gelelektrophorese wurde das Zubehör in 3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 1 h behandelt. Die Konzentration der Agarosegels betrug 2,5% (w/v). 100 ng RNA wurden mit 5× RNA-Probenpuffer gemischt, bei 65°C für 10 min denaturiert und für 5 min auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h bei 8 V/cm.

#### **2.2.3. Repräsentative Differenzanalyse**

##### **2.2.3.1. Erststrang cDNA-Synthese**

2-5 µg polyA<sup>+</sup>-RNA und 5 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (0,5 µg/µl) wurden auf ein Volumen von 20 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O gebracht. Dieser Ansatz wurde 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Für die reverse Transkription wurden 10 µl 5× Erststrang-Puffer, 2,5 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM), 40 U RNasin<sup>®</sup> RNase-Inhibitor und 5 µl Superscript<sup>®</sup> II Reverse Transkriptase (200 U/µl) zugegeben. Der Ansatz wurde bei 37°C für 1 h inkubiert.

##### **2.2.3.2. Zweitstrang cDNA-Synthese**

Für die Zweitstrang-Synthese wurde zur Erststrang-Synthese folgende Komponenten zugegeben: 61 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 30 µl 5× Zweitstrang-Puffer, 3 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM), 1 µl *E.coli* Ligase (10 U/µl), 4 µl *E.coli* DNA-Polymerase (10 U/µl) und 1 µl RNaseH (2 U/µl). Die Reaktion wurde zuerst bei 16°C für 2 h und anschließend bei 22°C für 1 h inkubiert. Um die Enzyme zu inaktivieren, wurde der Ansatz für 10 min auf 70°C erhitzt. Zum Fällern der DNA wurden 5 µg Glycogen, 15 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 450 µl 100% Ethanol zugegeben. Nach einer Inkubation bei -20°C für 15 min wurde der Ansatz 45 min bei 14000× g (4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 30 µl TE-Puffer resuspendiert.

##### **2.2.3.3. Restriktionsverdau der cDNA mit DpnII**

Der Verdau von 2 µg cDNA erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 100 µl. Pro Ansatz wurden 10 µl 10× *DpnII*-Puffer und 10 µl *DpnII* (10 U/µl) eingesetzt. Die Reaktion wurde 4 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden durch zweimaliges extrahieren mit 100 µl P/C/I und

einmaligem extrahieren mit C/I gereinigt. Zur Konzentrierung wurden 2 µl Glykogen (1 µg/µl), 50 µl 10 M Ammoniumacetat und 650 µl 100% Ethanol zugegeben, 20 min auf Eis inkubiert und bei 14,000× g für 15 min zentrifugiert (4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol (4°C) gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl TE-Puffer gelöst.

#### **2.2.3.4. Ligation der R-Bam-Adaptoren**

Der R-Bam Adaptor wurde in diesem Schritt an die zuvor verdaute cDNA ligiert. Diese 60 µl Reaktion enthielt 1,2 µg cDNA, 6 µl 10× T4-DNA-Ligase-Puffer, 8 µl R-Bam-24 (1 mg/ml), 4 µl R-Bam-12 (1 mg/ml). Um die Oligonukleotide an die cDNA zu hybridisieren, wurde dieser Ansatz zuerst auf 50°C für 1 min erhitzt und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 1°C/min auf 10°C abgekühlt. Danach wurden 3 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl) zugegeben und über Nacht bei 14°C inkubiert. Die Ligation wurde abschließend mit 140 µl TE-Puffer verdünnt.

#### **2.2.3.5. Herstellung der Repräsentation**

Die Amplifikation erfolgte in 96 unabhängigen 100 PCR-Reaktionen. Jede dieser Reaktionen enthielt 20 µl 5× PCR-Puffer, 8,5 µl dNTP-Mix (jeweils 4 mM), 1 µl R-Bam-24 (1 mg/ml) und 1 µl der Ligation. Um das Oligonukleotid R-Bam-12 vom Ligationsprodukt zu entfernen, wurde die 96-well Platte in einem Thermocycler für 3 min auf 72°C erhitzt. Mit einer 12-Kanalpipette wurden anschließend 2,5 µl *Taq* DNA-Polymerase (1 U/ µl; MBI Fermentas) zugegeben. Um die Enden aufzufüllen, wurde die Reaktion für weitere 5 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde die cDNA mit 20 Zyklen amplifiziert. Bei dieser Zyklenzahl werden weitgehend alle Fragmente exponentiell amplifiziert. Der Denaturierungsschritt erfolgte bei 95°C für 1 min und die Anlagerungs- und Polymerisationsphase bei 72°C für 3 min. Die abschließende Polymerisation erfolgte bei 72°C für 10 min. Zur Reinigung der PCR-Produkte wurden alle Reaktionen in ein 50 ml Falcon®-Röhrchen gemischt und zweimal mit 10 ml P/C/I und einmal mit 10 ml C/I extrahiert. Für die Präzipitation der DNA wurden 1 ml 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 10 ml Isopropanol zugegeben, 20 min auf Eis inkubiert und bei 14,000× g für 15 min zentrifugiert (4°C). Der Überstand wurde abgehoben und das Pellet mit 10 ml 70% Ethanol (4°C) gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer gelöst.

### 2.2.3.6. Herstellung des Drivers

Für die Herstellung der *Driver* wurde von jeder Repräsentation 240 µg DNA mit *DpnII* in einem Reaktionsvolumen von 1,4 ml verdaut. Pro Ansatz wurden deshalb 480 µl Repräsentation (0,5 mg/ml), 140 µl 10× *DpnII*-Puffer und 50 µl *DpnII* (10 U/µl) eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 37°C für 4 h inkubiert. Jeder Verdau wurde durch zweimaliges Extrahieren mit 1,4 ml P/C/I und einmaliges Extrahieren mit 1,4 ml C/I gereinigt. Zur Fällung der DNA wurden 140 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 1,6 ml 100% Isopropanol zugegeben, 20 min auf Eis präzipitiert und bei 14,000× g für 15 min zentrifugiert (4°C). Der Überstand wurde abgehoben und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol (4°C) gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet, mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 0,5 µg/µl eingestellt. 20 µg des *Drivers* wurden für die Herstellung des *Testers* verwendet.

### 2.2.3.7. Herstellung des Testers

Um den *Tester* herzustellen, wurden 20 µg (40 µl) des *Drivers*, mit 40 µl TE und 16 µl 6× DNA-Probenpuffer gemischt und auf 3 Taschen eines 1,2% Agarosegels verteilt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V bis die Bromphenolblaubande ca. 2 cm ins Gel gewandert war. Nach dem Färben des Gele mit Ethidiumbromid (1 µg/ml), wurde die *Tester*-DNA auf dem Gel ausgeschnitten. Zurück blieb der R-Bam-24 Adaptor, der unterhalb der *Tester* DNA als diskrete Bande zu erkennen war. Das ausgeschnittene Gelstück wurde in ein zuvor gewogenes 50 ml Falcon®-Röhrchen gegeben. Durch erneutes Wiegen wurde das ungefähre Volumen des Gelblocks bestimmt. Für Reinigung der DNA wurde der QIAEX® II Agarose Gel Extraktion Kit verwendet. Zum Lösen der Agarose wurden zuerst das 3-fache Volumen des Gelblocks an QX1 zugegeben. Nach der Zugabe von 60 µl QIAEX® II Partikel wurde der Mix für 20 min bei 50°C inkubiert. Nachdem sich die Agarose aufgelöst hatte, wurden die Mischung bei 3345× g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die QIAEX® II Partikel anschließend mit 1 ml QX1-Waschpuffer gewaschen. Die gewaschenen Partikel wurde bei RT getrocknet. Die Elution der DNA von den Partikeln erfolgte durch die Zugabe von 120 µl TE-Puffer. Nach der Inkubation von 5 min bei 37°C wurde erneut zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. An die gereinigte DNA wurde der J-Bgl-24 Adaptor ligiert, indem 2 µg DNA, 6 µl 10× Ligase-Puffer, 8 µl J-Bgl-24 (1 mg/ml), 4 µl J-Bgl-12 (1 mg/ml) mit Wasser auf ein Volumen von 57 µl gebracht wurde und anschließend, wie bereits bei der Ligation der R-Bam-24 Adaptoren beschrieben, die Oligonukleotide an die DNA hybridisiert und kovalent gebunden wurden. Nach der

Inkubation über Nacht wurde der J-Bgl-24 ligierte *Tester* mit 120  $\mu\text{l}$  TE-Puffer auf eine Konzentration von 10 ng/ $\mu\text{l}$  verdünnt.

#### **2.2.3.8. Erste subtraktive Hybridisierung**

Für die erste subtraktive Hybridisierung wurden 80  $\mu\text{l}$  des *Drivers* (40  $\mu\text{g}$ ) mit 40  $\mu\text{l}$  *Tester* (0,4  $\mu\text{g}$ ) gemischt und mit 120  $\mu\text{l}$  P/C/I extrahiert. Anschließend wurde 30 ml 10 M Ammoniumacetat und 380  $\mu\text{l}$  100% Ethanol (RT) zugegeben, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 10 min präzipitiert und bei  $14,000 \times g$  für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol ( $4^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen, getrocknet und in 4  $\mu\text{l}$   $3 \times$  EE gelöst. Durch wiederholtes Pipettieren für mindestens 2 min und durch eine Inkubation der Probe bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 5 min wurde der Lösungsvorgang unterstützt. Danach wurde die Probe mit 35  $\mu\text{l}$  Mineralöl überschichtet und in einem Thermocycler bei  $98^{\circ}\text{C}$  für 5 min denaturiert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf  $67^{\circ}\text{C}$  wurde sofort 1  $\mu\text{l}$  5 M NaCl durch das Mineralöl hindurch direkt in die Probe gegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 20 h bei  $67^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.2.3.9. Herstellung des ersten Differenzproduktes (DPI)**

Nach der Hybridisierung wurde das Mineralöl entfernt und die Probe stufenweise durch Zugabe von zunächst 10  $\mu\text{l}$  TE-Puffer mit 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  tRNA, dann 25  $\mu\text{l}$  TE-Puffer und schließlich 360  $\mu\text{l}$  TE-Puffer verdünnt. Für jede Hybridisierung wurden acht PCR Reaktionen mit 100  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen angesetzt. Jede dieser Reaktionen enthielt 20  $\mu\text{l}$   $5 \times$  PCR-Puffer, 8,5  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (jeweils 4 mM) und 10  $\mu\text{l}$  der verdünnten Hybridisierung. Um nicht-kovalent gebundene Oligonukleotide zu entfernen, wurde der Ansatz in einem Thermocycler auf  $72^{\circ}\text{C}$  für 3 min erhitzt. Das PCR-Programm wurde danach unterbrochen, um 2,5  $\mu\text{l}$  *Taq* DNA Polymerase (1 U/ $\mu\text{l}$ ) zuzugeben. Zum Auffüllen der universellen Enden wurde die Reaktion bei  $72^{\circ}\text{C}$  für 5 min inkubiert. In einer zweiten Pause wurde 1  $\mu\text{l}$  J-Bgl-24 Primer (1 mg/ml) zugegeben. Die Amplifikation enthielt folgende Schritte: 1 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  und 3 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  für 10 Zyklen; abschließende Polymerisation für 10 min bei  $72^{\circ}\text{C}$ . Im Anschluß an die Amplifikation wurden alle Reaktionen in einem 2 ml Reaktionsgefäß gemischt und zweimal mit 800  $\mu\text{l}$  P/C/I und einmal mit 800  $\mu\text{l}$  C/I extrahiert. Es wurden 2  $\mu\text{l}$  Glykogen (1 mg/ml), 75  $\mu\text{l}$  3 M Ammoniumacetat, 800  $\mu\text{l}$  Isopropanol zugegeben und für 20 min auf Eis präzipitiert. Die Fällung wurde bei  $14,000 \times g$  für 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500  $\mu\text{l}$  70% Ethanol ( $4^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen, bei RT getrocknet und in 40  $\mu\text{l}$   $0,2 \times$  TE-Puffer resuspendiert.

Die PCR-Produkte wurden mit *Mung Bean Nuklease* (MBN) verdaut, um nicht hybridisierte einzelsträngige DNA zu entfernen. Für den Verdau wurden 20 µl PCR-Produkt, 4 µl 10× MBN-Puffer, 14 µl Wasser und 2 µl MBN (10 U/µl) für 35 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 160 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,9) und das anschließende Erhitzen auf 98°C für 5 min gestoppt.

Für die zweite Anreicherung wurden ebenfalls acht PCR Reaktionen mit 100 µl Reaktionsvolumen angesetzt. Jede Reaktion enthielt folgende Komponenten: 10 µl DNA, 20 µl 5× PCR-Puffer, 8,5 µl dNTP-Mix (jeweils 4 mM), 1 µl J-Bgl-24 Primer (1 mg/ml). Das PCR-Programm startete mit einer Denaturierungsphase bei 95°C für 1 min. Der Ansatz wurde anschließend auf 80°C abgekühlt und für die Zugabe von 2,5 µl *Taq* DNA-Polymerase (1 U/µl) konstant bei 80°C gehalten. Die Amplifikationsbedingungen waren: 1 min bei 95°C und 3 min bei 70°C für 18 Zyklen; Polymerisation für 10 min bei 72°C. Die Reaktionen wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß gemischt und zweimal mit 800 µl P/C/I und einmal mit 800 µl C/I extrahiert. Es wurden 75 µl 3 M Ammoniumacetat und 800 µl Isopropanol zugegeben und für 20 min auf Eis präzipitiert. Die gefällte DNA wurde bei 14,000× g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol (4°C) gewaschen, bei RT getrocknet und in 100 µl TE resuspendiert (DP1).

#### **2.2.3.10. Austausch der Adaptoren (J-Bgl-24 Adaptor → N-Bgl-24 Adaptor)**

Das DP1 wurde mit *DpnII* verdaut: 10 µg DNA, 30 µl 10× *DpnII*-Puffer, 7,5 µl *DpnII* (10 U/µl) wurden gemischt und bei 37°C für 4 h inkubiert. Jeder Verdau wurde durch zweimaliges Extrahieren mit 300 µl P/C/I und einmaliges Extrahieren mit 300 µl C/I gereinigt. Zur Fällung der DNA wurden 33 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 800 µl 100% Ethanol zugegeben, 20 min bei -20°C präzipitiert und bei 14,000 × g für 15 min zentrifugiert (4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 0,5 ml 70% Ethanol (4°C) gewaschen. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in 10 µl TE-Puffer gelöst. Die DNA-Konzentration wurde mit 1× TE eine Konzentration von 0,5 µg/µl eingestellt. Für die Ligation des N-Bgl-24 Adaptors wurden 200 ng des mit *DpnII* verdauten DP1 eingesetzt. Die Reaktion wurde bereits oben beschrieben. Statt der J-Bgl-24 und J-Bgl-12 Oligonukleotide wurden N-Bgl-24 und N-Bgl-12 eingesetzt.

### **2.2.3.11. Zweite subtraktive Hybridisierung und Herstellung des zweiten Differenzproduktes (DP2)**

Die Ligationsreaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl TE-Puffer auf 1,25 ng/µl verdünnt. 40 µl (50 ng) der Ligation wurden anschließend mit 80 µl (40 µg) *Driver* gemischt. Dies entspricht einem *Tester/Driver* Verhältnis von 1/800. Die Subtraktion und Herstellung des zweiten Differenzproduktes erfolgte nach der gleichen Vorgehensweise wie bei Differenzprodukt 1. Für den PCR Annealing- und Elongationsschritt wurde für den N-Bgl-24 Primer eine Temperatur von 72°C statt 70°C verwendet. Um eine komplexere RDA-Bibliothek zu erhalten, wurde auf die Herstellung eines dritten Differenzproduktes verzichtet.

### **2.2.3.12. Fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die DNA Konzentration während der RDA wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33258 durchgeführt. Zwei verschiedene Hoechst33258 Konzentrationen waren erforderlich, um den vollen dynamischen Bereich der Methode ausnutzen zu können. Der untere Meßbereich wurde für DNA-Konzentrationen zwischen 10 ng/ml und 500 ng/ml verwendet. Der Farbstoff (1 mg/ml) wurde in diesem Bereich 1/10000 in 1× TNE-Puffer verdünnt. Für DNA-Konzentrationen zwischen 100 ng/ml und 5000 ng/ml wurde der Farbstoff 1/2000 verdünnt. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde Kalbsthymus DNA in 4 verschiedenen Konzentrationen in 1× TNE-Puffer mit Hoechst33258 gelöst. Als Leerwert wurde 1× TNE-Puffer mit Hoechst33258 verwendet. Die Proben wurden im gleichen Puffer verdünnt. 2× 200 µl jeder Verdünnung wurde in ELISA 8-well F-Strips (Greiner) pipettiert und mit einem FLUOstar Galaxy Fluorometer (BMG) vermessen. Die Anregungswellenlänge für den Hoechst33258 Farbstoff betrug 352 nm. Die Wellenlänge für die Messung der Emission betrug 520 nm.

## **2.2.4. Erstellung von geordneten Klonbibliotheken**

### **2.2.4.1. RDA-Bibliothek**

Die angereicherten RDA-Genfragmente wurden in den pCR<sup>®</sup>2.1 Plasmid Vektor (Invitrogen) kloniert. Dieses Vektorsystem (TA-Cloning<sup>®</sup>) ermöglicht die Klonierung von frisch PCR-amplifizierten DNA Fragmenten. Für die Erstellung von RDA-Bibliotheken wurde das zweite Differenzprodukt verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden wie in der Vorschrift des TA-Cloning<sup>®</sup> Kits beschrieben durchgeführt. Für die Ligation wurde 0,5-1 µl PCR-Produkt (~10 ng) eingesetzt. Neben der DNA enthielt die Ligationsreaktion 1 µl 10× Ligationspuffer,



2 µl pCR<sup>®</sup> 2.1 (25 ng/µl) und 1 µl T4-DNA-Ligase (4 Weiss U/µl). Die Ligationsreaktion wurde über Nacht bei 14°C inkubiert. Für jede Transformation wurden 50 µl gefrorene One Shot<sup>®</sup> Zellen (E.Coli INVαF<sup>'</sup>) 5 min auf Eis aufgetaut. 2 µl der Ligationsreaktion wurden direkt zu den kompetenten Zellen pipettiert und mit der Pipettenspitze gemischt. Die Zellen wurden für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für exakt 30 sec in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (37°C) wurden die Bakterien 1 h bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. 125 µl der Bakteriensuspension wurden anschließend auf zwei 22×22 cm 2YT Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Um die Blau/Weiß-Selektion durchzuführen zu können, wurden der Agarplatten (480 cm<sup>2</sup>) zuvor mit 400 µl 2% (w/v) X-Gal bestrichen. Einzelne weiße Kolonien wurden anschließend in flüssiges 2YT-Medium mit 1× HMFM und 50 µg/ml Ampicillin überführt. 80 µl dieses Mediums wurde in 384-well Microtiterplatten (Nunc) vorgelegt. Pro Transformation wurden 384 verschiedene Klone angeimpft. Mit einem 384-well Kunststoffreplikator (Genetix) wurden von jeder Platte zwei Replikate hergestellt. Die Replikate enthielten ebenfalls 80 µl 2YT-Medium mit 1× HMFM und 50 µg/ml Ampicillin. Zusätzlich wurde für die Amplifikation der PCR-Produkte ein Replikat ohne 1× HMFM hergestellt. Statt dessen wurden 10% (v/v) 87% Glycerin verwendet. Die Platten wurden nach dem Animpfen mit Frischhaltefolie eingepackt und für ca. 6 h bei 37°C inkubiert. Alle Platten wurden bei -70°C gelagert.

#### **2.2.4.2. Genomische *T. brucei* Bibliothek**

Zur Herstellung der genomischen *T. brucei* Bibliothek wurde genomische DNA des Stamms TREU927/4 fragmentiert, gröbenselektiert (2-2,5 kb) und in die *Sma I* Schnittstelle des pUC18 Vektors kloniert (N. El-Sayed, TIGR, Rockville, MD). Anschließend wurden *E. coli* DH10B mit den ligierten Plasmiden durch Elektroporation transformiert. Dazu wurden die kompetenten Zellen unmittelbar vor der Elektroporation 5 min auf Eis inkubiert. 2 µl des 1/5 verdünnten Ligationsansatzes wurden zu den Zellen gegeben. Diese Mischung wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette gegeben und nochmals für 1 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend im Elektroporator (BTX) für 5 msec einer Spannung von 1,4 kV ausgesetzt. Sofort nach dem Elektroschock wurden 960 µl 37°C warmes SOC-Medium zugegeben. Der Elektroporationsansatz wurde dann in ein 1,5 ml Röhrchen überführt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine 1/10 Verdünnung des Elektroporationsansatzes hergestellt, von der jeweils 400 µl auf 22x22 cm 2YT-Agarplatten

ausgestrichen wurden. Der Agar enthielt 50 µg/ml Ampicillin. Die Platten wurden vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes mit 4 µl 20% (v/v) IPTG und 40 µl 2% (w/v) X-Gal bestrichen. Nach dem Ausplattieren des Transformationsansatzes wurden die Agarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert. Die transformierten Kolonien wurden mithilfe eines Roboters (MPI für Molekulare Genetik) in mit LB-Medium und HMFM-Lösung gefüllte 384-well-Platten transferiert. Diese Platten wurden für 16 h bei 37°C inkubiert. Mit einem 384-well Kunststoffreplikator (Genetix) wurden alle Klonplatten zweimal repliziert. Die 384-well Replikplatten (Nunc) enthielten 200 µl 2YT-Medium mit 1× HMFM und 50 µg/ml Ampicillin. Zusätzlich wurde für die Amplifikation der PCR-Produkte ein Replikat ohne 1× HMFM hergestellt. Stattdessen wurden 10% (v/v) 87% Glycerin verwendet. Die Platten wurden nach dem Animpfen für ca. 16 h bei 37°C inkubiert. Alle Platten wurde bei -80°C gelagert.

## **2.2.5. PCR-Amplifikation von Klonbibliotheken**

### **2.2.5.1. PCR-Amplifikation**

Die Amplifikation der *T. brucei* und RDA Bibliotheken erfolgte in 384-well Mikrotiterplatten. Für die Inokulation der PCR wurden die Replikate verwendet, die statt HMFM-Lösung 8,7% (v/v) Glycerin enthielten. Die Amplifikation der Inserts erfolgte in 96-well oder 384-well PCR Platten. Das Reaktionsvolumen für den 96-well Maßstab betrug im allgemeinen 100 µl. Alle Reaktion in den 384-well Platten hatten ein Volumen von 25 µl. Der PCR-Mix setzte sich für beide Formate folgendermaßen zusammen: 1,5 M Betain, 0,1 mM Kresolrot, 0,2 mM jedes dNTPs, 1× PCR-Puffer, 0,2 µM Primer 1, 0,2 µM Primer 2 und ca. 2 U *Taq* DNA-Polymerase. Falls nur ein Primer für die Amplifikation verwendet wurde, betrug die Endkonzentration 0,4 µM. Die Reaktion wurde direkt mit 0,5-1 µl Bakterienkulturen angeimpft. Für die Amplifikationen im 96-well Maßstab wurden dafür ein 96-pin Metallreplikator (Steinbrenner) verwendet. Die 384-well Platten wurden mit 384-pin Kunststoffreplikatoren (Genetix) angeimpft. Nach dem Animpfen der PCR-Reaktion wurden die 96-well PCR Platten mit Microseal™ "A" Wachsfolie (MJ Research) und die 384-well Platten mit Klebefolie (Abgene House) verschlossen. Für die Amplifikation im 96-well Maßstab wurde die Deckeltemperatur des Thermocyclers auf konstant 105°C eingestellt. Bei den 384-well Platten wurde die Deckeltemperatur auf konstant 85°C eingestellt. Die Programme für beide Formate waren identisch. Für die Amplifikation der RDA-Bibliothek mit dem Oligonukleotid J-Bgl-24 wurde folgendes Program verwendet: Denaturierungsphase,

94°C, 4 min; 35 Zyklen, Denaturierungsphase, 94°C für 1 min, Anlagerungsphase und Polymerisationsphase, 70°C, 3 min; abschließende Polymerisationsphase, 72°C, 10 min. Die Amplifikation der genomischen *T. brucei* Bibliothek mit den beiden Primern L337 und R499 unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturierungsphase, 94°C, 4 min; 35 Zyklen, Denaturierungsphase, 94°C für 1 min, Anlagerungsphase 65°C, 1 min, Polymerisationsphase, 70°C, 2 min; abschließende Polymerisationsphase, 72°C, 10 min.

#### **2.2.5.2. Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit einem Elektrophoresesystem von PeqLab Biotechnologie GmbH durchgeführt. Mit dieser Einheit konnten 192 Proben gleichzeitig pro Gel analysiert werden. Da sich die Größenverteilung der PCR-Produkte in den verschiedenen Bibliotheken unterscheidet, betrug die Konzentration der Agarose bei den RDA-Bibliotheken 2% und bei den *T. brucei* Klonen 1%. Pro Gel wurden 200 ml Agarose benötigt. Die Proben wurden mit einer 12-Kanal Pipette in die Taschen pipettiert. Da die Ausbeute der PCR vom Reaktionsvolumen abhängt, wurde bei 25 µl Ansätzen ein 2 µl Aliquot und bei 100 µl Ansätzen ein 5 µl Aliquot aufgetragen. Auf die Zugabe von Probenpuffer vor dem Auftragen auf das Agarosegel konnte verzichtet werden, da die PCR-Reaktion bereits Betain und Kresolrot enthielt. In einem Abstand von 24 Proben wurde ein 100 bp DNA-Längenstandard (MBI Fermentas) mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 1× TAE-Puffer bei 10V/cm für ca. 20 min.

#### **2.2.6. Herstellung von DNA-Arrays**

##### **2.2.6.1. Herstellung von DNA-Macroarrays**

Die DNA-Macroarrays wurden durch die Immobilisierung von PCR-Produkten auf Nylonmembranen hergestellt. Die PCR-Produkte wurden vor dem Aufbringen mit dem QIAquick® PCR-Reinigung Kit gereinigt und mit Wasser auf eine Konzentration von 50 ng/µl eingestellt. Das Gesamtvolumen der DNA-Lösung betrug 30 µl. Die PCR-Produkte wurden auf Pall Biodyne™ B Membranen (115×76 mm) immobilisiert. Die Membranen wurden allerdings zuerst für 5 min in Wasser befeuchtet und anschließend für 20 min in Denaturierungspuffer inkubiert. Die benetzten Membranen wurden blasenfrei auf Blotting-Papier gelegt, das zuvor ebenfalls mit Denaturierungspuffer befeuchtet wurde. Zum Auftragen der PCR Produkte auf die Nylonmembranen wurde der BioGrid II (BioRobotics) verwendet. Die Proben wurden mit 384 Nadeln (0,4 mm Durchmesser) gleichzeitig aus einer 384-well

Microtiterplatte (Genetix) entnommen und anschließend auf der Nylonmembran abgesetzt. Um genügend DNA auf die Membran zu überführen, wurde dieser Vorgang insgesamt 15× wiederholt. Der Durchmesser eines mit diesen Nadeln erzeugten Spot betrug ca. 0,7 mm. Der Abstand zwischen den Spots betrug bei einem 2×2-Raster 2,25 mm. Innerhalb des 2×2-Rasters wurde jedes PCR-Produkt im Duplikat aufgebracht. Nach dem Spotten wurden die Membranen für 30 min auf Blotting Papier gelegt, das mit Neutralisationspuffer befeuchtet wurde. Nach dem Neutralisieren wurden die Membranen über Nacht bei RT getrocknet. Die Membranen wurden zuletzt für 2 h bei 80°C gebacken und mit 25 mJ/cm<sup>2</sup> UV-Licht bestrahlt.

#### **2.2.6.2. Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin**

Vor der Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin mußte die Glasoberfläche zuerst gereinigt werden. Dazu wurden jeweils 20 Objektträger in ein Färbegestell eingeordnet und für 1 Stunde in 350 ml einer Reinigungslösung geschwenkt. Nach der Behandlung wurden die Objektträger mindestens 4× für jeweils 10 min in 350 ml Wasser gewaschen. Die Objektträger wurden zur Beschichtung für 30 min in einer Poly-L-Lysin-Lösung geschwenkt und für 15 min in ein Ultraschallbad gestellt. Das überschüssige Poly-L-Lysin wurde durch wiederholtes Eintauchen des Färbegestells in 350 ml Wasser entfernt. Die Objektträger wurden zuerst mit Stickstoff getrocknet und anschließend 10 min bei 45°C inkubiert. Vor der Verwendung der Objektträger wurden sie bei 4°C für mindestens 2 Wochen in Plastikbehältern gelagert.

#### **2.2.6.3. Spotten von DNA-Microarrays**

Die DNA wurde auf Poly-L-Lysin- oder Aminosilan- (CMT-GAPST<sup>TM</sup>) beschichtete Objektträger mit dem SDDC-2 DNA MicroArrayer aufgebracht. Dieser Roboter hat eine Halterung für 4×12 spezielle Nadeln (Pins). Für das Spotten der DNA wurden SMP3 Pins (TeleChem) verwendet. Die Größe der Spots betrug mit diesen Pins im Durchschnitt 110 µm. Der Abstand zwischen dem Mittelpunkt der Spots konnte variabel eingestellt werden. Er lag für die meisten Anwendungen zwischen 200 µm und 220 µm. Weiterhin konnte die Roboterarmbeschleunigung und Luftfeuchtigkeit eingestellt werden. Alle langen Spotprozesse wurden bei 60% der Maximalbeschleunigung durchgeführt. Die Luftfeuchtigkeit variierte um 50%. Vor dem Spotten wurden die Proben mit 2× Spotting-Puffer 1/2 verdünnt und in 384-well Microtiterplatten (Polyfiltronics<sup>®</sup>) transferiert. Das Volumen der verdünnten Proben in der Platte lag zwischen 5 und 10 µl. Wurde Betain als Zusatz für die PCR verwendet und die DNA nach der PCR nicht gereinigt, konnte auf den

Zusatz von Spotting-Puffer verzichtet werden. Stattdessen wurde das Volumen der PCR-Reaktionen auf 1/3 des Ausgangsvolumens reduziert. Dazu wurden die PCR-Platten für 2-3 Tage offen in einem Kühlschrank stehen gelassen. Vor dem Aufbringen der DNA auf die Glasobjektträger wurden 5,5 µl der PCR-Reaktion mit 2,5 µl 1,5 M Betain gemischt und ebenfalls in 384-well Microtiterplatten transferiert.

#### **2.2.6.4. Nachbehandlung von DNA-Microarrays**

Die Objektträger wurden nach dem Aufbringen der DNA für mindestens 12 h bei RT gelagert. Nach der Inkubation wurden die Objektträger für ca. 1 min mit den Spots nach oben auf die glatte Fläche eines 80°C warmen Heizblocks gelegt. Die getrockneten Objektträger wurden dann mit einer Energiemenge von 60 mJ in einem UV-Crosslinker bestrahlt. Für die Herstellung der Blocklösung wurde 1 g Bernsteinsäureanhydrid in 200 ml wasserfreiem 1,2-Dichlorethan gelöst und unmittelbar vor dem Eintauchen der Objektträger 2,5 ml N-Methylimidazol zugegeben. Die Blocklösung wurde vor jeder Blockreaktion frisch angesetzt. Die Objektträger wurden in der Blocklösung für 1 h auf einem Schüttler inkubiert. Nach dieser Reaktion wurden die Objektträger zweimal kurz in frischem 1,2-Dichlorethan gewaschen und direkt danach für 2 min in siedendes Wasser (98°C) getaucht. Die Objektträger wurden anschließend für wenige Sekunden in 100% Ethanol getaucht und bei RT getrocknet.

#### **2.2.7. Markierung von RNA**

##### **2.2.7.1. Radioaktive Markierung von RNA**

Die Markierung von RNA für die Hybridisierungen auf Macroarrays erfolgte durch direkten Einbau von [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-dCTP während einer reversen Transkription. 1 µg Gesamt RNA und 0,6 µg Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer wurden in 15 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und für 10 min bei 70°C denaturiert. Die Probe wurde anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Während des Abkühlens wurden 13 µl einer Mischung mit folgender Zusammensetzung vorbereitet: 6 µl 5× Erststrang-Puffer, 3 µl 0,1 M DTT, 1 µl C-dNTP-Mix (AGT jeweils 20 mM; C 120 µM), 1 µl 40 U RNasin® RNase-Inhibitor, 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] dCTP und 1 µl Superscript® II (200 U/µl). Diese Mischung wurde zu den 13 µl RNA-Lösung pipettiert und für 2 h bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1,2 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Um die RNA zu degradieren, wurden 10 µl 1 M NaOH zugeben und für 15 min bei 65°C inkubiert. Die

Reaktion wurde anschließend mit 15 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,2) und 10 µl 1 M HCl neutralisiert.

#### **2.2.7.2. Fluoreszenz Markierung von RNA**

RNA wurde durch den Einbau von modifizierten Nukleotiden (Cy3- bzw. Cy5-dCTP) während einer reversen Transkription markiert. Für jede 30 µl Reaktion wurden zuerst 30-60 µg Gesamt-RNA, 3-6 µg Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 15 µl gebracht. Die RNA wurde für 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. In der Zwischenzeit wurde eine Mischung vorbereitet, die pro Reaktion folgende Zusammensetzung hatte: 6 µl 5× Erststrang-Puffer, 3 µl 0,1 M DTT, 0,6 µl C-dNTP-Mix (AGT jeweils 0,5 mM; C 0,2 mM), 30 U RNasin<sup>®</sup> RNase-Inhibitor, 3 µl Cy3- oder Cy5-dCTP (1 mM) und 2 µl Superscript<sup>®</sup> II (200 U/µl). 15 µl dieser Mischung wurden zu den 15 µl RNA gegeben und für 2 h bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1,2 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Um die RNA zu degradieren, wurden 10 µl 1 M NaOH zugeben und für 15 min bei 65°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 15 µl 1 M Tris-HCl (pH7,2) und 10 µl 1 M HCl neutralisiert.

#### **2.2.7.3. Reinigung der Markierungsreaktionen**

Die markierte DNA wurde mit dem QIAquick<sup>®</sup> PCR Reinigungs Kit von nicht eingebauten Nukleotiden und Pufferkomponenten getrennt. Alle Arbeitsschritte wurden wie im QIAquick<sup>®</sup> Spin Handbuch 03/01 beschrieben durchgeführt. Zur Markierungsreaktion wurde das 5-fache Volumen an PB-Puffer gegeben und auf eine QIAquick<sup>®</sup> Säule pipettiert. Um die DNA an das Säulenmaterial zu binden, wurde die Säule für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zum Waschen der DNA wurden 0,75 ml PE-Puffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchlaufs wurde die Säule erneut bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt. Um die DNA zu eluieren wurden 50 µl EB-Puffer auf die Säule pipettiert und nach einer Inkubationszeit von 1 min bei RT für 1 min zentrifugiert.

#### **2.2.7.4. Bestimmung der Einbaurate von Fluoreszenzmolekülen**

Die Bestimmung der Einbaurate von modifizierten Nukleotiden in cDNA erfolgte durch Berechnung des Anteils der eingebauten Cy3- bzw. Cy5-modifizierten Nukleotide an der Gesamtmenge der synthetisierten cDNA. Die Menge der eingebauten modifizierten Nukleotide und der cDNA wurden durch die Messung der optischen Dichte bei verschiedenen Wellenlängen mit einem Photometer bestimmt. Nach der Elution von den QIAquick<sup>®</sup> Säulen

wurden jeweils 50 µl Probe in eine UVette<sup>®</sup> (Eppendorf) pipettiert. Cy3 wurde bei 550 nm, Cy5 bei 650 nm und DNA bei 260 nm Wellenlänge gemessen. Die optische Dichte des Elutionspuffers (EB-Puffer, Qiagen) ohne DNA wurde jeweils von den gemessenen Werten abgezogen. Die Einbaurrate wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Einbaurrate[\%]} = \frac{M_{\text{Cy3/Cy5}} \times A_{550/650} \times 100\%}{A_{260} \times E_{\text{Cy3/Cy5}} \times L \times 33}$$

- A Extinktion [-]  
 L Länge [cm]  
 E Extinktionskoeffizient [1/(M\*cm)]  
   Cy3: 150,000/(M\*cm)  
   Cy5: 250,000/(M\*cm)  
 M Molekular Masse [g/mol]  
   Cy3: 1152 g/mol  
   Cy5: 1178 g/mol

## 2.2.8. Hybridisierungen

### 2.2.8.1. Hybridisierungen auf Macroarrays

Die Hybridisierung der Macroarrays erfolgte in Hybridisierungsröhren mit einer Länge von 15 cm und einem Durchmesser von 3,5 cm. Die Membran lag mit der DNA enthaltenden Seite nach innen an der Gefäßwand. Um unspezifische Bindungen auf der Membran zu reduzieren, wurde die Membran in 20 ml Formamid-Puffer und 200 µl tRNA (10 mg/ml) für 2 h bei 65°C vorhybridisiert. Während der Hybridisierung wurden die Röhren permanent in einem Rotationsofen gedreht. Für die eigentliche Hybridisierung wurde der alte Puffer abgeschüttet und anschließend 5 ml frischer Formamid-Puffer (auf 65°C vorgewärmt) in die Röhre gegeben. Zu diesem Puffer wurden dann 1 µg der radioaktiv-markierten Sonde gegeben. Die Sonde wurde zuvor bei 95°C für 5 min denaturiert und bis zur Verwendung auf Eis gekühlt. Die Hybridisierungsröhre wurde 16 h bei 65°C permanent gedreht. Nach der Hybridisierung wurde die Membran mit 2× 20 ml (65°C) Wasch-Puffer für 30 min bei 65°C gewaschen. Zur Messung der Radioaktivität wurde die Membran blasenfrees mit einer dünnen Frischhaltefolie "Saran" bedeckt, auf einen Phosphoscreen gelegt und in einer lichtundurchlässigen Kassette bei Raumtemperatur für 18 h inkubiert. Nach der Exposition des Phosphoscreens wurden die gebundenen markierten Sonden abgewaschen. Dazu wurde die Membran dreimal in 100 ml siedendem Stripping-Puffer für wenige Sekunden inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Membranen solange im Stripping-Puffer inkubiert, bis er auf RT abgekühlt war. Die Membranen wurde anschließend getrocknet und bei RT gelagert.

### **2.2.8.2. Hybridisierungen auf Microarrays**

Auf einen Microarray wurden gleichzeitig Cy3- und Cy5-markierte Proben hybridisiert. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde 1 µl Hefe-tRNA (10 µg/µl) zugegeben. Die Proben wurden anschließend in einem Vakuumkonzentrator auf ein Volumen <2 µl konzentriert. Das Pellet wurde in 3,5-4,5 µl Hybridisierungspuffer pro cm<sup>2</sup> Deckglasfläche aufgelöst. Die DNA wurde bei 80°C für 10 min denaturiert und direkt auf den Objektträger pipettiert. Um dem Hybridisierungspuffer gleichmäßig und blasenfrei auf dem Microarray zu verteilen, wurde ein gereinigtes Deckglas mit einer Pinzette auf den Objektträger gelegt. Der Objektträger wurde anschließend in eine Hybridisierungskassette gelegt, in der sich zum Befeuchten der Kammer ca. 10 µl Wasser befanden. Die Kassette wurde verschlossen und in einem Wasserbad bei 42°C für 16-48 Stunden inkubiert. Der Objektträger wurde nach der Hybridisierung wieder aus der Kassette herausgenommen und zum Ablösen des Deckglases in 50 ml Waschlösung 1 (2× SSC, 0,1% (w/v) SDS) ca. 2 min inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger in einem Färbegestell eingeordnet und in 500 ml Waschlösung 2 (1× SSC) für 2 min geschwenkt. Danach wurde der Objektträger für wenige Sekunden in Waschlösung 3 (0,2× SSC) eingetaucht und sofort durch Zentrifugation bei 500 rpm für 5 min getrocknet.

### **2.2.9. Auswertung von Macroarrays**

Die Phosphoscreens wurde nach der Exposition mit einem Phosphoimager (FLA-3000, Fuji) ausgewertet. Der Screen wurde dazu mit einer Wellenlänge von 635 nm angeregt. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 390 nm gemessen. Die Auflösung für die Erstellung des Bildes betrug 50 µm. Das Bild wurde im 16-bit TIFF-Format abgespeichert. Mit der Software "Array Imaging Station" (AIS, Imaging Research Inc.) wurde das Bild weiter ausgewertet. Mit dieser Software wurde ein Datensatz erzeugt, der die Position und Signalintensität (Gesamtintensität) jedes Spots enthält. Zur Bestimmung des globalen Hintergrundsignals wurde die Signalintensität von 20 Spots gemittelt, die um den Array willkürlich verteilt waren.

### **2.2.10. Auswertung von Microarrays**

#### **2.2.10.1. Bilderzeugung**

Zur Messung von Cy3- und Cy5-markierten Probe auf einem Objektträger wurde der konfokale Laser-Scanner ScanArray5000 verwendet, der für jeden Farbstoff ein separates 16-bit TIFF-Bild erstellt. Dieser Scanner verwendet einen roten und grünen Helium-Neon Laser.



Der Cy5-Farbstoff wurde bei 633 nm und der Cy3-Farbstoff bei 543 nm angeregt. Gemessen wurde die Emission für Cy5 bei 670 nm und für Cy3 bei 570 nm. Die Photomultipliierverstärkung und Laserleistung wurden für die beiden Farbstoffe so eingestellt, daß die Signalintensitäten für die meisten Spots ausgeglichen waren und nicht über dem Sättigungswert von 65535 (16-bit) lagen. Weiterhin wurde immer zuerst das photoinstabilere Cy5 und anschließend Cy3 gemessen.

#### **2.2.10.2. Bildauswertung**

Die Spoterkennung und die Quantifizierung der Hybridisierungssignale erfolgte mit dem Bildanalyse-Programm GenePixPro (Axon). Mit dieser Software wurde für jeden Array ein Datensatz erzeugt, der die Position, Klonidentifikationsnummer, Signalintensität (Mittelwert und Median aller Spotpixel), Standardabweichung der Signalintensität und den lokalen Hintergrund $\pm$ Standardabweichung für beide Wellenlängen jedes Spots enthält. Ebenfalls mit angegeben wurde der Prozentsatz der Spotpixel, die mehr als 2 Standardabweichungen über der Hintergrundintensität lagen. Spots, die durch visuelle Inspektion als Artefakte identifiziert wurden oder die durch das Programm nicht gefunden werden konnten, wurden mit einer Markierung versehen.

#### **2.2.10.3. Datenbearbeitung**

Die aus der Bildauswertung resultierenden Dateien wurden als in Microsoft Excel importiert. Die Signalintensitätswerte der markierten Spots wurden herausgefiltert. Als Signalintensitätswerte wurden die Medianwerte der Spotpixel für F633 (Cy5) und F543 (Cy3) nach Subtraktion des lokalen Hintergrundsignals verwendet.

#### **Globale Mittelwert-Normalisierung**

Für die globale Mittelwert-Normalisierung wurde das arithmetische Mittel der Signalintensitätswerte für jede Wellenlänge eines Arrays bestimmt. Durch Division der beiden Werte (Cy5/Cy3) wurde ein Korrekturfaktor bestimmt, mit dem die Cy3-Werte multipliziert wurden. Aus den normalisierten Signalintensitätswerten wurde durch Division des Cy5-Wertes durch den Cy3-Wert und anschließender Logarithmierung zur Basis 2 der Differenzwert gebildet.

#### **LOWESS-Normalisierung**

Für die LOWESS-Normalisierung wurde das Programm MIDAS aus dem Programmpaket TM4 (TIGR, Rockville, USA) verwendet. Die Datensätze wurden dazu in das Format TAV (txt) umgewandelt. Aus den LOWESS-normalisierten Signalintensitätswerten wurde mithilfe

von Microsoft Excel durch Division des Cy5-Wertes durch den Cy3-Wert und anschließender Logarithmierung zur Basis 2 der Differenzwert gebildet.

### **Filterung**

Alle Datenfilterungen wurden mit Microsoft Excel vorgenommen. Die normalisierten Daten wurden anhand ihrer Signalintensitätswerte gefiltert. Zur Filterung der Signalintensitäten wurde das Produkt beider Signalintensitäten berechnet. Zur Filterung wurden alle Differenzwerte herausgefiltert, deren zugehöriges Signalintensitätsprodukt unterhalb der 5% Perzentile aller Werte eines Arrays lag. Zur Filterung nach PP-Wert ( $\text{Pixel\%} > \text{Hintergrund} + 2\text{SD}$ ) wurden die Differenzwerte herausgefiltert, wenn der jeweils größere Wert beider Fluorophore weniger als 40 betrug.

#### **2.2.10.4. Datenanalyse**

Zur Berechnung von Standardabweichungen und Korrelationskoeffizienten wurde die Microsoft Excel-Funktionen STABW und PEARSON verwendet. Zur Generierung von Normalverteilungsplots und Boxplots wurde das Excel-Add-in Paket STATplus verwendet.

#### **2.2.10.5. Identifikation von differenziell exprimierten Genen**

Zur Identifikation differenziell exprimierter Gene wurde das Programm SAM verwendet. Das Programm ist ein Excel-Add-in. Zur Analyse der Daten wurden die Differenzwerte aller Hybridisierungen mit der zugehörigen Klonidentifikationsnummer in einer Excel-Tabelle zusammengefasst. Leere Werte wurden zuvor mithilfe der Sortierfunktion aus dem Datensatz entfernt. Für die SAM-Analyse wurde der *row average imputer* aktiviert. Als *response data format* wurde *one class* gewählt.

### **2.2.11. RT-PCR Analyse**

#### **2.2.11.1. Primerdesign**

Für die Auswahl der Primer wurde Primer3 (MIT, [http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi/](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi/)) verwendet. Die Grundlage bildeten die Nukleotidsequenzen der sequenzierten Klone der *T. brucei* Bibliothek. Es wurden folgende Kriterien für die Selektion der PCR-Primer verwendet: Optimale Produktgröße 200 bp  $\pm$  2 bp und optimale  $T_m$  65°C  $\pm$  1°C.

### **2.2.11.2. LiCl-Fällung von Gesamt-RNA**

Um eventuelle Kontamination mit genomischer DNA zu beseitigen, wurde die Gesamt-RNA mit LiCl gefällt. Dazu wurde zu einer wässrigen RNA-Lösung (>1 µg/µl) ein äquivalentes Volumen von einer 5 M LiCl-Lösung (in TE-Puffer) geben. Zur Präzipitation wurde die RNA über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 1 Stunde bei 14,000× g (4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol (-20°C) überschichtet und für weitere 15 min zentrifugiert. Nach dem Trocknen der RNA bei RT wurde sie in DEPC-Wasser erneut gelöst.

### **2.2.11.3. RT-PCR**

Die reverse Transkription wurden mit 3 verschiedene Verdünnungen (1/10, 1/100, 1/1000) der LiCl-gereinigten RNA durchgeführt. Jede 50 µl Reaktion enthielt 10 µl 5× Erststrang-Puffer, ca. 6 µg Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer, 5 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTP-Mix (jeweils 25 mM), 40 U RNasin<sup>®</sup> RNase-Inhibitor und 75 U Superscript<sup>®</sup> II. Die Reaktionen wurden für 1 h bei 42°C inkubiert. Die Amplifikation der cDNA erfolgte in 20 µl Reaktionsvolumen. Alle drei cDNA-Synthesen wurden für die PCR-Amplifikation verwendet. Jede dieser Reaktionen enthielt 2 µl 10× PCR-Puffer (Qiagen), 0,04 µl dNTP-Mix (jeweils 25 mM), 1,4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl Primer (jeweils 5 µM), 0,2 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl; Qiagen) und 2 µl 1/5 verdünnte cDNA-Synthese. Das Programm für die Amplifikation begann mit einer Denaturierung bei 94°C für 4 min. Darauf folgten 25 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt bei 94° für 1 min, einer Anlagerungsphase bei 58°C für 1 min und einer Polymerisationsphase bei 72°C für 1 min. Die abschließende Polymerisation erfolgte bei 72°C für 10 min. Für die Analyse der PCR-Produkte wurden 10 µl der Reaktion auf ein zweiprozentiges Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt.