

3 Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterialien und Kits

ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequenzierungs-kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
PCR-Tubes	Biozym, Oldendorf, D
Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Plastikwaren	Falcon BD, Franklin Lakes, USA
Elektrophorese-Kammer	Gibco BRL, Eggenstein, D
Mischplatte	Greiner, Nürtingen, D
PCR-Platte	Nunc, Roskilde, DK
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Messbecher	Schott Duran, Mainz, D
Potter-Gefäße	Wheaton, Millville, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Molekulargenetische Methoden

Alle molekulargenetischen Arbeitsschritte wurden unter Beachtung der geltenden Sicherheitsvorschriften durchgeführt. Reagenzien, Enzyme und Proben wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt. Verwendete Lösungen, Medien und Puffer wurden grundsätzlich mit bidestilliertem Wasser angesetzt und zur Sterilisation entweder autoklaviert oder sterilfiltriert.

3.2.2 DNA-Präparation

Die DNA-Präparation erfolgt nach einem Standardprotokoll (Miller et al. 1988) durch Salzektraktion aus weißen Blutzellen.

3.2.2.1 Chemikalien, Lösungen und Geräte

Chemikalien	Hersteller
EDTA	Merck, Darmstadt, D
SDS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Herbeta, Berlin, D
1x TE-Puffer	Merck, Darmstadt, D

Lysis-Puffer, pH 7,4	NH ₄ Cl	155 mM
	KHCO ₃	10 mM
	Na ₂ EDTA	0,1 mM
SE-Puffer, pH 8,0	NaCl	75 mM
	Na ₂ EDTA	25 mM
TE-Puffer, pH 8,0	Tris-HCl	10 mM
	Na ₂ EDTA	1 mM

Gerät	Hersteller
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, D
Minishaker	Heidolph, Schwabach, D

3.2.2.2 Arbeitsschritte

Alle Arbeitsschritte werden in einem 50 ml Falcon Röhrchen auf Eis durchgeführt. 10 ml EDTA-Blut werden mit 30 ml Lysis-Puffer vermischt und nach der Lyse der Erythrozyten 10 Minuten bei 670 g zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wird das Pellet der weißen Blutzellen mit 10 ml Lysis-Puffer gewaschen. Anschließend werden nach Dekantieren des Überstandes 5 ml SE-Puffer hinzugefügt. Zu der Suspension gibt man 1 mg Pronase E pro Ansatz und 250 µl 20%iger SDS-Lösung hinzu und inkubiert das

Gemisch bei 37 °C über Nacht. Am Folgetag werden erneut 5 ml SE-Puffer hinzugefügt und für 5 –10 Minuten bei 55 °C inkubiert. Zur Proteinfällung werden 3 ml einer 6 molaren NaCl-Lösung hinzugefügt und dann für 20 Sekunden gemischt. Nach der Zentrifugation bei 1500 g für 15 Minuten wird der klare Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Zwei Volumenteile reinen Alkohols werden dann zur DNA-Fällung hinzugeben. Die gefällte DNA wird in 70%igen Alkohol gewaschen und durch Zentrifugation pelletiert. Das DNA-Pellet wird bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 1xTE-Puffer gelöst. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wird die Endkonzentration auf 200 ng/µl eingestellt.

3.2.3 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

3.2.3.1 PCR-Primerdesign

Es wurden Oligonucleotid Primer mit Hilfe des Programms „Primer for the Mac v1.3“ (1997) entworfen. Folgende Bedingungen wurden angegeben: (1) Schmelztemperatur ca. 60 °C und weniger als 2 °C Unterschied zwischen den Annealing-Temperaturen beider Primer eines Paares, (2) GC-Gehalt zwischen 20 und 80%, (3) Länge zwischen 18 und 30 bp. Position der Primer im Intron mindestens 50 bp von der Intron/Exon Grenze entfernt. (4) Das letzte Nukleotid am 3'-Ende des Oligonucleotids sollte ein G oder C sein, wobei (wenn möglich) das 3'-Ende insgesamt eher A/T-reich sein sollte.

Die Software „Amplify 1.2“ von Bill Engels (1993) wurde zur Überprüfung der Oligonucleotid Primerpaare eingesetzt insbesondere zur Aussonderung von Primerpaaren, welche zur Bildung von Primerdimeren neigten.

3.2.3.2 Intronsche und exonische Primer für die *CLN3*-Amplifikation

Exon	Primer (5´- 3´) Vorwärts-Primer (oben) Rückwärts-Primer (unten)	Größe des PCR Produk- tes (bp)	MgCl [25mM] (µl)	Annealing Temperatur
1+2	5'-GCT CTG CTT GCT CCC ACC CGC TC-3' 5'-CAG CGA GTG ACA ATG GCA TGA GAA GAG G-3'	778	3	61°
3	5'-GGG CAC AGG TAA GGG AAG GTT TGG CAC A-3'	227	2.6	55°

	5'-TGG TTA GTC CCT GTG GGA AGA-3'			
4	5'-GGA GCC AGG CTC TGT GTG TCT AT-3' 5'-CAC TCC CAG CCC TTC ACT ACC-3'	216	2.6	61°
5+6	5'-AGC TCC TGC CTC TCC TTG GCC AC-3' 5'-CCC AGA GGA AAG GGA TTC ATT-3'	467	2.6	55°
7+8	5'-TAT GAG CTG ATA CTG AGG AGG CCA-3' 5'-GAG GGA GAG GGG TCC AAG GA-3'	441	2.6	61°
9	5'-AAG TGG CCT AGA TGG TCC CTG-3' 5'-GGG TTT GGC CTT TTC CTC TC-3'	229	2.6	61°
10-13	5'-GCC GAG TCT TCA GTG TGA AAA CT-3' 5'-CAG CTT GGC TCC CAG CTT CCC CAA ACC-3'	673	2.6	55°
14+15	5'-CTC CTT CCC TGC CCC GCC CTG GT-3' 5'-GGA CTG AAG CCT CAC CCC TG-3'	719	2.6	55°
PIRA	5'-GGG GAG CTG GGC TGC TGG GGG CCC TGT CGT A-3' 5'-CCA CTC GAC GGG ACT CGG CCC TCC CTC TCC-3'		3.5	58°

3.2.3.3 Chemikalien, Lösungen und Geräte

Chemikalien	Hersteller
10x PCR-Puffer	Promega, Mannheim, D
MgCl	Promega, Mannheim, D
dNTP	Promega, Mannheim, D
Oligonukleotide	TIB MOLBIOL, Berlin, D
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim, D
BSA	Boehringer, Ingelheim, D

TE-Puffer, pH 8,0	Tris-HCl	10 mM
	Na ₂ EDTA	1 mM

Gerät	Hersteller
Thermocycler Primus 96 plus	MWG-Biotech AG, Ebersberg, D

3.2.3.4 Arbeitsschritte

Zuerst wird die DNA-Matrize (=Patienten DNA) mit TE Puffer auf eine Standardkonzentration von 100 ng/µl verdünnt. Die PCR-Reaktion findet in einem Volumen von 25 µl statt. Als nächstes wird der Primer-Mastermix erstellt. Dazu benötigt man jeweils 0.1 µM eines Vorwärts- und eines Rückwärts-Primers, welche die zu amplifizierende Gensequenz nach 5' und 3' begrenzen. Ein spezifisches pH-Milieu wird erreicht, indem man 2.5 µl eines 10x PCR-Puffers hinzufügt. Da Magnesium-Ionen der Taq-Polymerase als Cofaktoren dienen, werden je nach PCR-Reaktion zwischen 1 und 5 µl eines 25 mM MgCl₂-Gemisches hinzugefügt. Die richtige Magnesiumkonzentration muss gelegentlich in einer Versuchsreihe mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 1 und 5 mM experimentell bestimmt werden. Es werden 0.5 µl einer 10 mM dNTP-Suspension (Desoxy-Nucleotide) als Bausteine verwendet. Zur Verdünnung werden 14,2 µl Wasser hinzugegeben, um ein Volumen von 19 µl zu erlangen. Der Ansatz des Enzym-Gemisches erfolgt separat. Die Taq-Polymerase (1 IE = 0.2 µl) bevorzugt ein eiweißreiches Milieu für ihre volle Funktionsfähigkeit, deshalb gibt man 0.4 µl bovines Serumalbumin (BSA, 20mg/ml) in 4.4 µl Wasser.

Je nach Bedarf kann die Menge der beiden Gemische proportional vergrößert werden. In die Eppendorfgefäße werden zunächst 19 µl des Master-Mixes gegeben, um anschließend mit 1 µl der DNA-Matrize vermischt zu werden. Die Gefäße werden dann leicht verschlossen in den Thermocycler gestellt, dessen Deckel vorher auf 110 °C vorgeheizt wurde, um eine Kondensation des Inhaltes am Deckel zu vermeiden. Während der Heizblock sich auf 94 °C zur Denaturierung erwärmt, werden 5 µl des Taq-BSA-Mix innerhalb von 5 Minuten in die Eppendorf Gefäße pipettiert, die daraufhin fest verschlossen werden. Dieser letzte Schritt wird erst so spät durchgeführt, damit möglichst

wenige unspezifische Amplifikate entstehen. Eine Standard-PCR hat die folgende Abfolge: 5 Minuten Denaturierung bei 94 °C dann 38 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, Annealing bei 55 °C für 30 Sekunden und Elongation bei 72 °C für 60 Sekunden, am Ende 72°C für 10 Minuten, um alle Elongationen zu beenden.

3.2.4 Optimierung der PCR-Bedingungen (OptiTaq®)

Zur Optimierung einer PCR-Reaktion wurde ein sogenanntes OptiTaq-Assay eingesetzt. Das Kit besteht aus 15 Puffern mit unterschiedlichen Ionenkonzentrationen (NaCl, KCl, AmmoniumCl, MgCl₂). Höhere Ionenkonzentrationen verhindern das Coiling der DNA, welches die Anlagerung der Taq-Polymerase behindert. Nach der Durchführung der Standard-PCR Reaktion konnte durch Inspektion des Bandenmusters der optimale Puffer ermittelt werden.

3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Molekülgröße in einem Bereich zwischen 50 bp und 20 kbp (Fisher und Dingman, 1971)

3.2.5.1 Chemikalien, Lösungen und Geräte

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Roche, Rotkreuz, CH
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München, D
Tris-Base	Sigma-Aldrich, München, D
Borsäure	Merck, Darmstadt, D
Na ₂ EDTA	Merck, Darmstadt, D

10xTBE-Lösung	Tris-Base	0,9 M
	Borsäure	0,9 M
	Na ₂ EDTA	0,02 M

Gerät	Hersteller
Elektrophoresekammer	Gibco BRL, Eggenstein, D
Minishaker	Heidolph, Schwabach, D

3.2.5.2 Arbeitsschritte

Für ein 1%iges Gel mischt man 500 mg Agarose mit 50 ml TBE. Bei mittlerer Rührstellung lässt man die Mischung kurz aufkochen und auf ca. 50°C abkühlen. Nach Hinzugabe von 5 µl einer 10 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung wird das Gel in den vorbereiteten Gelschlitten gegossen. Nach Einstecken des Slot-Kamms lässt man das Gel erstarren.

3.2.6 Automatische Sequenzierung

Zur Ermittlung der Nukleotidsequenz der DNA wird die Dideoxy-Kettenterminationmethode nach Sanger verwendet (Sanger et al. 1977). Sie macht von der Möglichkeit Gebrauch, mit Hilfe der DNA-Polymerase an Einzelstrang-DNA von einem Primer aus einen neuen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Die Synthese erfolgt in Gegenwart von Nukleotidtriphosphaten, denen in niedriger Konzentration Dideoxynukleotide (ddNTPs), d.h. Nukleotide, deren 3'-Hydroxylgruppe an der Desoxyribose fehlt, beigefügt sind. Es kommt unter diesen Bedingungen zum Abbruch der DNA-Synthese, sobald ein ddNTP in den neu synthetisierten Strang eingebaut wird, da wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose kein weiteres Nukleotid angefügt werden kann. Lee et al. (1992) verbesserten diese Sequenzierungsmethode durch Gebrauch fluoreszierender ddNTPs. Die unterschiedlich langen fluoreszenzmarkierten DNA-Sequenzabschnitte wurden dann mit einem automatischen Sequenziergerät (ABI 377) auf einem denaturierenden Harnstoffgel aufgetrennt und am unteren Ende mittels Laser detektiert.

3.2.6.1 Reinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung

Mittels des QIAquick PCR Purification Kits mit Vakuumextraktor wird DNA in Anwesenheit einer chaotropen Salzlösung an Glaswolle gebunden und anschließend mit TE-Puffer eluiert. Dieser Reinigungsschritt entfernt Primer, Nukleotide, Enzyme, Mineralöle, Salze, Ethidiumbromid und andere Verunreinigungen, die mit der Elektrophorese im Sequenzierungsgerät interferieren könnten.

3.2.6.1.1 Kit

Kit	Hersteller
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, D

3.2.6.1.2 Arbeitsschritte

Fünf Volumenteile Puffer PB werden zu einem Volumenteil PCR-Produkt geben und gemischt. Um die DNA zu binden, werden die Proben in die QIAquick-Säulen am Vakuumextraktor überführt. Ein Vakuum wird aufgebaut bis die Proben durchgesaugt sind. Anschließend wäscht man nacheinander mit 250 µl Puffer PB, 750 µl Puffer PE und 250 µl Puffer PE. Die Säulen werden in die Sammelröhrchen gesteckt, dann wird bei 14.000 g für 2 Minuten zentrifugiert, um das restliche Ethanol zu entfernen. Für die Elution der DNA werden die Säulen in 1.5 ml – Eppendorfgefäße gestellt und 20 µl EB-Puffer hinzugefügt. Nach einer Minute wird wieder zentrifugiert. Der Durchfluss enthält dann die gereinigten DNA-Fragmente.

3.2.6.2 Cyclesequencing mit dem BigDye-Terminator-Protokoll

Bei dieser Reaktion werden in den Ansatz Didesoxynukleotide hinzugegeben, die je nach Base unterschiedlich fluoreszenzmarkiert sind. Bei deren Einbau kommt es zum Kettenabbruch (entsprechend der Sanger-Methode).

3.2.6.2.1 Kit und Gerät

Kit	Hersteller
dRhodamine Terminator Cycle Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA

Gerät	Hersteller
Thermocycler	MWG-Biotech AG, Ebersberg, D

3.2.6.2.2 Arbeitsschritte

Zu 5 µl des gereinigten PCR-Produkts wird der folgende Reaktionsmix hinzugegeben.

Puffer	1,0 µl
DT-Puffer	1,5 µl
H ₂ O	0,5 µl
BigDye Terminator Mix	1,0 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	4,0 µl

Die Proben durchlaufen dann im Thermocycler das Cycle Sequencing-Programm (32 x 96 °C (30 sec) und 58 °C (120 sec)).

3.2.6.3 Reinigung der Cycle Sequencing Produkte durch Gelfiltration

Die Proben werden durch Ausschlusschromatographie über eine Sephadex G50-Säule gereinigt. Zu den Cycle Sequencing-Produkten wird je 10 µl Wasser hinzugefügt. In Aqua bidest aufgeschwemmtes Sephadex wird in die Zentrisept-Columns gefüllt und anschließend durch Zentrifugation leicht getrocknet. Das verdünnte PCR-Produkt wird dann komplett entnommen und in die Mitte des Sephadex-Granulats pipettiert. Die Zentrisept-Columns werden in große Eppendorfgefäße gestellt und dann kurz zentrifugiert. Dabei wird die DNA in das Eppendorfgefäß eluiert. Anschließend wird die DNA im

Speedvak getrocknet und bei -20°C gelagert.

3.2.6.4 Giessen eines Polyacrylamidgels für die automatische Sequenzierung

3.2.6.4.1 Chemikalien und Lösungen

Chemikalie	Hersteller
Ionenaustauscher Resin	Applied Biosystems, Foster City, USA
Harnstoff	Sigma-Aldrich, München, D
Long-Ranger	FMC Bio Products, Philadelphia, USA
APS	Merck, Darmstadt, D
TEMED	BioRad, München, D

10xTBE-Lösung	Tris-Base	0,9 M
	Borsäure	0,9 M
	Na ₂ EDTA	0,02 M

3.2.6.4.2 Arbeitsschritte

Es werden 9 g Harnstoff, 0,25 g Anionenaustauscher Resin, 10 ml H₂O und 4,2 ml Long-Ranger-Acrylamid-Lösung in ein Becherglas gegeben. Der Harnstoff wird unter Rühren aufgelöst. Zuerst wird der Filter mit 3 ml TBE angefeuchtet und anschließend wird die Harnstoff-Acrylamidlösung durch den Membranfilter in einen Vakuumkolben gesaugt. Zur Entgasung der Acrylamidlösung lässt man das Vakuum so lange anliegen, bis kaum noch Luftblasen aufsteigen. Dann wird der Inhalt des Kolbens vorsichtig in eine 50 ml Spritze gefüllt, 175 µl APS und 7,5 µl TEMED hinzugefügt, die Luft herausgedrückt und dann die Spritze geschwenkt. Der Inhalt der Spritze wird zügig und ohne Luftblasen zwischen die vorbereiteten Sequenzierplatten gespritzt. Anschließend wird der Kamm für die Ladetaschen befestigt und das Gel für ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur polymerisieren gelassen.

3.2.6.5 Laden der Proben

3.2.6.5.1 Chemikalie und Gerät

Chemikalie	Hersteller
Formamid	Applied Biosystems, Foster City, USA

Gerät	Hersteller
ABI Prism 377 DNA-Sequencer	Applied Biosystems, Foster City, USA

3.2.6.5.2 Arbeitsschritte

Vor dem Laden muss man sicherstellen, dass sich keine Luft und kein Harnstoff in den Slots befinden. Hierfür werden die Slots mit einem Druckstrahl aus einer Spritze gereinigt. Um die Proben zu konzentrieren, werden die in Wasser gelösten Sequenzierproben zunächst mit Alkohol gefällt. Die Pellets werden dann in 4 µl Formamid aufgenommen und für 5 Minuten zur Denaturierung auf 96°C erhitzt, schockgekühlt (um ein Reannealing zu verhindern) und dann mit einer Mikroliterpipette aufgeladen.

3.2.6.6 Auswertung der Sequenziererergebnisse (Software)

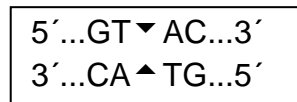
Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese und die Auswertung erfolgen mit Hilfe einer automatischen Sequenzierapparatur (ABI377, Weiterstadt, D) und der mitgelieferten Software (Sequence Navigator v1.0.1. und Sequencing Analysis v3.4.1, ABI Prism, Perkin Elmer, USA)

3.2.7 Nachweis von Mutationen mittels Restriction-Fragment-Length-Polymorphism (RFLP) Analyse

Nach Detektion einer Sequenzvariante in der automatischen Sequenzierung wird diese zur Bestätigung noch mit einer zweiten davon unabhängigen Methode nachgewiesen. Dieser Mutationsnachweis erfolgt durch die Spezifität der Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme, die sich an der Stelle der Mutation zwischen Normalkontrolle und Patient unterscheidet.

3.2.7.1 Auswahl des Restriktionsenzym

Die zu verdauende DNA muss eine Erkennungssequenz für die ausgewählte Restriktionsendonuklease haben. Restriktionsendonukleasen mit kurzer Erkennungssequenz schneiden die DNA öfter als solche mit längerer Erkennungssequenz. Für diese Analyse wurde das Restriktionsenzym *Rsa I* aus *Rhodopseudomonas sphaeroides* ausgewählt. Es schneidet Doppelstrang-DNA an der folgenden Erkennungssequenz:



3.2.7.2 Primer Induced Restriction Analysis (PIRA)

Da keine natürliche Schnittstelle in der zu untersuchenden DNA-Sequenz vorhanden war, musste eine künstliche Schnittstelle für *Rsa I* geschaffen werden. Dazu wird eine PCR durchgeführt mit einem Vorwärts-Mismatch-Primer, in der eine einzelne Base am 3'-Ende ausgetauscht wurde (5'- GGG AGC TGG GCT GCT GGG GGC CCT GCT **G**TA- 3'). Durch diese PCR wird in der interessierenden DNA-Sequenz eine Schnittstelle für *Rsa I* geschaffen. In der anschließenden Restriktionsanalyse schneidet das Restriktionsenzym nun bei Vorhandensein des Wildtyps. Trifft das Restriktionsenzym allerdings auf eine Mutation, so erkennt es ihre Schnittstelle nicht und schneidet nicht. Diese Methode bezeichnet man als Primer-Introduced-Restriction-Analysis (PIRA).

3.2.7.2.1 Chemikalie

Chemikalie	Hersteller
<i>Rsa I</i>	New England BioLabs, Ipswich, USA
NEB-Puffer	New England BioLabs, Ipswich, USA

3.2.7.2.2 Arbeitsschritte

Für einen 20 µl-Ansatz werden 1 µl *Rsa I* (=10U) mit 2 µl NE Puffer I vermischt, zu 17 µl PCR- Produkt gegeben und gemischt. Anschließend wird die Probe für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Endonuklease schneidet DNA-Stränge an den für sie spezifischen Schnittstellen. Die dabei entstehenden Fragmente werden dann gelelektrophoretisch getrennt, unter der UV-Lampe dargestellt und dokumentiert. Bei Abwesenheit der Muta-

tion finden sind zwei Fragmente von ca. 600 bp und 150 bp. Bei Anwesenheit der Mutation ist das Fragment ungeschnitten ca. 750 bp lang.

3.2.8 Züchtung von immortalisierten lymphoiden Zelllinien

Transformation von B-Lymphozyten durch Epstein-Barr-Virus (EBV) *in vitro*: *In vitro* kann das EBV selektiv B-Lymphozyten in sich kontinuierlich teilende lymphoblastoide Zellen transformieren (Neitzel, 1986). Die in diesen Zellen produzierte RNA kann dann für molekulargenetische Analysen genutzt werden.

3.2.8.1 Kultivierung der lymphozytären Starterzelllinie B 95-8 und EBV-Gewinnung

3.2.8.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
RPMI 1640 (1 x mit L-Glutamin)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Fötale Kalbserum	Gibco BRL, Eggenstein, D

Streptomycin	Grünenthal, Aachen, D
Penicillin	Grünenthal, Aachen, D
Cyclosporin A	Sandoz, Ismaning, D

3.2.8.1.2 Arbeitsschritte

Eine mycoplasmenfreie lymphozytäre Starterzelllinie B95-8 mit einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml wird in einem Kulturmedium kultiviert. Nach 5 Tagen Kultivierung wird der Überstand entfernt, welcher EBV Viruspartikel enthält. Der Überstand wird dann bei 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend über einen 0.45 µm Membranfilter filtriert, um restliche B95-8 Zellen zu entfernen. Die Filtration wird wiederholt und anschließend wird das Filtrat 1:1 mit frischem RPMI 1640 verdünnt, welches mit 20%igem fötalem Kalbsserum, 2 mM L-Glutamin, Antibiotika und Cyclosporin A angereichert wurde.

3.2.8.2 Isolierung von Leukozyten aus Vollblut mittels Ficoll® Trennung

3.2.8.2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Liquemin	Roche, Rotkreuz, CH
Macrodexlösung 6%	Knoll AG, Ludwigshafen, D
PBS	Biochrom KG, Berlin, D
Ficoll-Trennlösung	Seromed, Wien, D

3.2.8.2.2 Arbeitsschritte

Mit einer heparinisierten Spritze entnimmt man venöses Blut und gibt ca. 4 ml einer 6%igen Macrodexlösung hinzu. Die Spritze wird anschließend senkrecht bei Raumtemperatur in eine Sterilbank gestellt. Nach einer Stunde wird der nahezu erythrozytenfreie Überstand mit einer zweiten Spritze entnommen und 1:1 mit PBS versetzt. Zur vollständigen Isolierung der mononukleären Zellen gibt man 3 ml Ficoll-Trennlösung in ein Zentrifugenröhrchen und schichtet 4 ml der Blutüberstand/PBS-Lösung vorsichtig auf das Trennmedium. Eine Phasenvermischung sollte vermieden werden. Nach dem Verschließen des Röhrchens wird die Probe bei 400 x g 30 min zentrifugiert. Dabei entstehen vier Phasen: die oberste Schicht bildet das Plasma, darauf folgt ein weißlicher Ring mit mononukleären Zellen, dann das Lymphozytentrennmedium und das Pellet am Boden besteht aus den restlichen Erythrozyten und Granulozyten. Mit einer Pasteurpipette verwirft man die oberste Phase. Die mononukleären Zellen werden mit einer Pasteurpipette entnommen und in ein anderes Zentrifugenröhrchen pipettiert. Anschließend werden die Leukozyten mit calcium- und magnesiumfreiem PBS gewaschen und bei ca. 100 x g 10 min zentrifugiert. Der Überstand enthält noch restliche Thrombozyten und wird verworfen. Der Waschvorgang wird einmal wiederholt.

3.2.8.3 Anlegen der Kultur

3.2.8.3.1 Arbeitsschritte

Die isolierten Leukozyten werden im Transformationsmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wird nun in entsprechende Kulturgefäße gegeben. Durch Inkubation in 5% CO₂ bei 37°C stellt sich ein pH-Wert von 6.8 ein. Die Beigabe von 1 µg/ml Cyclosporin zum Kulturmedium verhindert die Aktivierung von T-Lymphozyten. Einmal wöchentlich wird das Medium erneuert, indem die Hälfte des Mediums und durch ein neues Medium ersetzt wird. Die Kultur wird für mindestens 2-3 Wochen angelegt.

3.2.9 RNA-Extraktion aus immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinien (LCL)

3.2.9.1 RNA-Isolierung

Die Zellen einer Kultur immortalisierter lymphoblastoider Zellen werden in einem 15 ml Falcon Röhrchen bei 1050 g pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wird das Pellet mit Hilfe eines Handhomogenisators in 1 ml TRI-Reagent homogenisiert, in ein 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen überführt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Addition von 200 µl Chloroform wird die Probe für 15 Sekunden geschüttelt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird bei 12.000 g und einer Temperatur von 12°C für 15 Minuten zentrifugiert. Dabei entstehen drei Phasen: die rote organische Phase enthält Protein, die Interphase enthält DNA und die obere wässrige Phase enthält die RNA. Die wässrige Phase wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol vermischt und über Nacht bei -80°C stehen gelassen. Am Folgetag wird die gefällte RNA bei 12.000 g für 15 Minuten pelletiert. Das Pellet wird dann dreimal in 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 55°C ca. 5 Minuten getrocknet. Das trockene Pellet wird dann in DEPC-Wasser aufgenommen und die Konzentration bestimmt.

3.2.10 Reverse Transkription in cDNA

Zur Umschreibung der RNA-Sequenzen in DNA wird die aus Retroviren isolierte reverse Transkriptase verwendet. Dies ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und kann

als Matrize sowohl RNA- als auch DNA-Einzelstränge verwenden. Die reverse Transkription wird durch Anhybridisierung eines poly-Thymin-Oligonukleotids and den poly-A Schwanz der mRNAs gestartet, das als Ausgangspunkt der Kettenverlängerung dient. Nach der Synthese des ersten DNA-Stranges wird der RNA-Stang mittels RNAseH hydrolysiert und somit entfernt. Nun kann der cDNA-Einzelstrang zur PCR eingesetzt werden.

3.2.10.1 RT-PCR zur Amplifikation von cDNA

Durchführung mittels RT-PCR-System von GibcoBRL: Beim ersten Schritt der cDNA-Synthese werden ein Gesamt-RNA-Extrakt aus lymphoblastoiden Zellen und Oligo-dT-Primer verwendet. Die Kontroll-PCR wird mit gen-spezifischen Primern durchgeführt.

3.2.10.1.1 Kit

Kit	Hersteller
Thermo Script RT-PCR-System	Gibco BRL, Eggenstein, D

3.2.10.1.2 Arbeitsschritte

Oligo-dT-Primer	1,0 µl
RNA (1 ng = 2 µl)	2,2 µl
DEPC-H ₂ O	6,8 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	10,0 µl

Denaturierung bei 65°C für 5 Minuten, dann den Ansatz auf Eis stellen und anschließend 10 µl der folgenden Mischung hinzufügen.

5 x cDNA-Synthese-Puffer	4,0 µl
DTT (0,1 M)	1,0 µl
Rnase-Inhibitor	1,0 µl
DEPC-H ₂ O	1,0 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2,0 µl
Thermoscript RT	1,0 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	10 µl

Die cDNA-Synthese erfolgt bei 55°C für 60 min und wird durch Inkubation bei 85°C für 5 min beendet.

3.2.10.2 cDNA-Kontroll-PCR

Die an die Reverse Transkription anschließende PCR zum Nachweis einzelner mRNA-Transkripte wird mit mRNA-spezifischen Primern wie eine Standard-PCR durchgeführt, wobei 5 µl aus der Reversen Transkription als DNA-Matrize eingesetzt werden.