
4 Methoden

4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

4.1.1 Kultivierung von WEHI Zellen

WEHI Zellen, eine IL-3 produzierende Lymphomzelllinie aus Balb/c Mäusethymus, werden in Medium mit 5 % FKS bei 37°C in 5 % CO₂ angezogen und alle 3 Tage im Verhältnis 1:5 bis 1:10 subkultiviert. Dazu werden sie 5 min bei Raumtemperatur und 800 x g zentrifugiert und anschließend in frischem Medium resuspendiert. Zur Gewinnung von IL-3-haltigem Medium werden die Zellen nach der Zentrifugation in Medium mit 0,1% FKS resuspendiert und für 4 Tage inkubiert. Der IL-3-haltige Zentrifugationsüberstand wird durch Zentrifugation gewonnen, sterilfiltriert, gesammelt, gepoolt und bei -20°C bis -80°C gelagert.

<u>WEHI (Kultivierung):</u>	RPMI	93 %
	FKS	5 %
	Glutamin	2 mM
	Penicillin/Streptomycin	10 U/ml
	β-Mercaptoethanol	50 µM

<u>WEHI (IL-3-Produktion):</u>	RPMI	98 %
	FKS	0,1 %
	Glutamin	2 mM
	Penicillin/Streptomycin	10 U/ml
	β-Mercaptoethanol	50 µM

4.1.2 Kultivierung prämyeloider Zellen

Diese Suspensionszellen sind IL-3-abhängig und werden daher in IL-3-konditioniertem Medium, bei 37°C in 5 % CO₂ angezogen und alle 2 Tage nach 5 min 800 x g Zentrifugation bei Raumtemperatur im Verhältnis 1:5 bis 1:10 bei gleichzeitigem Mediumswechsel subkultiviert. Da die Zellen das zugesetzte IL-3 verbrauchen, ist das Einhalten dieser Kultivierungsbedingungen besonders wichtig.

<u>32D Medium:</u>	RPMI	77 %
	WEHI-Kulturüberstand	10 %
	FKS	10 %
	Glutamin	2 mM
	Penicillin/Streptomycin	10 U/ml
	β-Mercaptoethanol	50 µM

4.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Von allen verwendeten Zellen werden regelmäßig Kryokonserven angelegt. Hierzu werden die Zellen nach dem Sedimentieren vorsichtig in 90 % FKS, 10 % DMSO resuspendiert, in Einfriergefäße („Kryotubes“) aliquotiert und in einem Styroporgefäß langsam (1°C/min) bei -80°C eingefroren. Die Lagerung erfolgt in Tanks mit flüssigem Stickstoff.

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, werden die Kryokonserven schnell unter leichtem Schwenken im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, aber nicht bis auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wird die Außenseite des Gefäßes mit 70 % Ethanol gesäubert. Alle weiteren Schritte erfolgen in der Laminarbox.

Die Zellsuspension wird in ein Röhrchen mit 9 ml kaltem Medium gegeben und durch mehrfaches Schwenken des Röhrchens schnell mit den aufgetauten Zellen vermischt. Danach werden die Zellen 5 min bei 800 x g sedimentiert. Der Überstand und mit diesem der größte Teil des DMSO wird abgegossen, und das Sediment wird in 5 ml kaltem Medium resuspendiert. Die Suspension wird dann in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach werden das Medium und die darin vorhandenen Zelltrümmer entfernt und durch vorgewärmtes Medium ersetzt. 3 bis 4 Tage später sind die Zellen vollständig erholt und können routinemäßig subkultiviert werden.

4.1.4 Bestimmung der Viabilität

Zur Bestimmung der Viabilität der Zellen wird zu 1 ml Zellsuspension 0,1 ml Trypanblau zugesetzt. Dieses wird von Zellen mit geschädigter Membran aufgenommen und färbt sie blau. Bei 20-facher Vergrößerung zählt man unter dem Lichtmikroskop die blaugefärbten sowie die gesamten Zellen.

<u>Trypanblau:</u>	Na _x H _{3-x} PO ₄ (pH 7,4)	20 mM
	NaCl	137 mM
	Trypanblau	0,4 %

4.1.5 Stimulierung der Zellen

Alle Zellen werden 12 h vor Versuchsbeginn in frischem Medium ausgesät. Die Stimulierung mit 10 nM PMA erfolgt bei 37°C über einen Zeitraum von 30 min. Hierzu wird PMA Stammlösung in 1 ml Medium pro Kulturflasche vorverdünnt, zur Zellsuspension zugegeben und sofort gründlich vermischt. Die Zellen werden unmittelbar nach Ablauf der Stimulation zur mRNA- oder Proteinisolierung eingesetzt oder zur späteren Verwendung mit 4°C kaltem PBS gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.2 Proteinchemische Methoden

4.2.1 Puffer und Lösungen für die Proteinchemie:

<u>Lysepuffer für SDS-PAGE:</u>	Tris/HCl (pH 6,8)	62,5 mM
	Glycerin	10 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	5 % (w/v)
	SDS	3 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,0025 % (w/v)
<u>PBS:</u>	NaCl	140 mM
	KCl	30 mM
	Na ₂ HPO ₄	6,5 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
<u>Protease Inhibitormix :</u>	Leupeptin	5 mM
	Pepstatin	100 μM
	PMSF	50 mM
		in Ethanol bei -20°C lagern
<u>PBS-PI:</u>	PBS	99 % (V/V)
	Inhibitor-Mix	1% (V/V)

4.2.2 Isolierung rekombinanter GST-Fusionsproteine

4.2.2.1 Bestimmung des optimalen Erntezeitpunkts

3 ml über Nacht gewachsene Kultur des gewünschten Bakterienklons werden in LB-Medium mit 150 µg/ml Ampicillin angezogen. 0,5 ml dieser Kultur werden 1:250 in LB mit 150 µg/ml Ampicillin verdünnt und unter Schütteln bei 37°C bei ständiger Bestimmung des OD₆₀₀ weiter inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 erfolgt die Induktion mit IPTG bei einer Endkonzentration von 1 mM. Es werden in 30-minütigem Abstand 1 ml Aliquots entnommen, sedimentiert und die enthaltenen Bakterien in 100 µl 1 x Probepuffer für SDS PAGE lysiert. Der optimale Erntezeitpunkt ist bei einer hohen Expression des rekombinanten Proteins ohne beobachteter Degradierung.

4.2.2.2 Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

500 ml Bakterienkultur werden durch 5-minütige Zentrifugation bei 7000 x g sedimentiert, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, dann in 5 ml PBS-PI resuspendiert und mit einer Ultraschallspitze durch 30 Beschallung von 1 sec Länge bei mittlerer Energie auf Eis aufgeschlossen. Die Suspension wird mit 1/19 Volumen 20 % Triton X-100 versetzt und für 10 min auf Eis gestellt. Danach werden die Zelltrümmer durch 10 min 4°C Zentrifugation bei 12.000 x g sedimentiert, und der klare Überstand wird zu 1 ml Glutathionsäule (50 % Beads, 50 % PBS) gegeben und 30 min bei 4°C geschwenkt. Danach werden die Glutathion-Beads mit dem gebundenen rekombinanten GST-Fusionsprotein dreimal bei 500 x g sedimentiert und mit dem 20-fachen Säulenvolumen eiskalten PBS gewaschen.

Das gebundene Fusionsprotein wird im Batchverfahren 15 min bei 4°C mit zwei Säulenvolumen Glutathionlösung eluiert und anschließend durch Gelfiltration über PBS-PI equilibrierte PD-10 Säulen entsalzt. Aufgrund der Absorption bei 280 nm werden die proteinhaltigen Fraktionen ausgewählt und gepoolt.

Anschließend erfolgt eine Konzentration des Proteins über Amicon Microfiltersäulen mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa. Hier wird der Puffer in einer Zentrifuge bei 4°C durch eine Membran gepresst, während die Proteine durch diese zurückgehalten werden.

Das gereinigte Protein wird mit 50 % Glycerol versetzt und bei -20°C gelagert. So können Einfrier- und Auftauvorgänge sowie die Kristallbildung beim Einfrieren verhindert werden. Müssen gereinigte Proteine verschickt werden, so friert man sie in flüssigem Stickstoff ein und versendet sie auf Trockeneis.

<u>Elutionslösung:</u>	Tris/ HCl (pH 8,0)	50 mM
	Glutathion	5 mM

4.2.3 *In vitro* Kinasereaktion

In der *in vitro* Kinasereaktion werden gereinigte potentielle PKC Substrate und reine PKC eingesetzt. Die 30 μl Reaktionsansätze enthalten neben dem potentiellen Substrat oder dem Kontrollprotein 0,2 μl gereinigte PKC in 50 % Glycerol, 3 μl 10 x Kinasepuffer, 3 μl 10 x PS-PC-PMA, 3 μl ATP (100 μM) und 0,4 μl γ - ^{32}P -ATP (1 μCi).

Die Reaktionsansätze werden auf Eis pipettiert, gut gemischt, kurz zentrifugiert und danach für 5 min bei 32°C inkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 13 μl 3 x Laemmlipuffer und kurzes Aufkochen der Proben bei 70°C gestoppt. 15 μl dieser Proben werden sofort auf ein SDS-Polyacrylamid Gel aufgetragen und aufgetrennt.

Die Elektrophorese wird gestoppt, bevor die Lauffront aus dem Gel läuft, da diese das ungebundene ATP und γ - ^{32}P -ATP enthält. Die Lauffront wird abgetrennt, und das Gel wird kurz Coomassie gefärbt und danach für 30 bis 60 min bei Raumtemperatur auf Röntgenfilm aufgelegt. Das Gel wird später fotografiert, und Foto und Autoradiogramm werden verglichen.

<u>10 x Kinasepuffer:</u>	Tris-HCl (pH 7,5)	500 mM
	CaCl_2	20 mM
	MgCl_2	50 mM
	EDTA	10 mM
	EGTA	12,5 mM
	DTT	10 mM

<u>10 x PS-PC-PMA:</u>	PS	20 μg
	PC	80 μg

in HCCl_3 : H_3COH (80:20) lösen,
im Luftstrom trocknen

im Ultraschall resuspendieren	H_2O	90 μl
	PMA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	10 μl

4.2.4 Vorbereitung von Proteinproben

Die entsprechend dem Versuchsprotokoll vorbehandelten 32D Zellen werden 5 min bei 4°C und 800 x g sedimentiert, mit kaltem PBS gewaschen und erneut wie zuvor sedimentiert. Die Zellen können nun entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert oder sofort aufgeschlossen werden.

Zum Aufschluß werden die Zellen auf Eis kurz mit einem Ultrathorax in 500 µl PBS-PI resuspendiert. Nach Abnahme eines Aliquots zur Proteinbestimmung wird die Suspension mit 500 µl zweifach konzentriertem Lysepuffer für SDS-PAGE versetzt, zum Scheren der DNA erneut kurz beschallt und 5 min bei 65°C inkubiert. Die Proteinkonzentration in den Proben ist halb so hoch wie die für das entnommene Aliquot bestimmte. Die Proben können nun bei -4 oder -20°C gelagert oder sofort über SDS-PAGE aufgetrennt werden.

4.2.5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung für die Lysate wird mit dem BCA-Reagenz (PIERCE) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Vergleich mit einer parallel erstellten Serumalbumin-Standardkurve werden die gemessenen Probenwerte in Konzentrationen umgerechnet.

4.2.6 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von der Molekülmasse. Hierbei bewirkt das im Probenpuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) ein Denaturieren der Proteine, und ebenfalls enthaltenes β -Mercaptoethanol reduziert vorhandene Disulfidbrücken. Die Anzahl der gebundenen SDS-Moleküle und damit die Summe der negativen Ladungen ist proportional zur Molekülmasse. Anhand des zugesetzten Bromphenolblau kann das Fortschreiten der Auftrennung während des Elektrophorese verfolgt werden.

Durch Radikalketten-Polymerisation von Acrylamid und dem vernetzenden Bisacrylamid wird eine poröse Gelmatrix in Laufpuffer erzeugt. Die Porengröße kann hierbei über die Konzentration der beiden Monomere variiert werden. Der Reaktionsstart erfolgt durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat und von N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin, welches die gebildeten Radikale stabilisiert und so eine gleichmäßige Polymerisation bewirkt. Je nach Größe der relevanten

Proteine wird die Acrylamidkonzentration zwischen 7 und 15 % variiert, oder es wird für komplexe Proteingemische ein Gradientengel eingesetzt.

Über das Trenngel wird ein Sammelgel mit geringerer Acrylamid/ Bisacrylamid-Konzentration und niedrigem pH geschichtet. Die Chloridionen haben eine deutlich größere Mobilität als das Glycinat. Dies bewirkt eine Verarmung an Ladungsträgern unmittelbar hinter der Chloridfront und führt so zu einem verstärkten lokalen elektrischen Feld. Die Proteine wandern zwischen Chloridfront und Glycinat und werden als scharfe Bande auf das Trenngel fokussiert.

<u>10 x Laufpuffer für SDS-PAGE:</u>	Trisbase	150 g
	Glycin	720 g
	SDS	50 g
	H ₂ O	ad 5 l

<u>Trenngel (10 %):</u>	Acrylamid/ Bisacrylamid (30 % / 0,8 % Stammlösung)	1/3 Endvolumen
	Tris/HCl (pH 8,8)	375 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	1 mg/ml
	TEMED	1 µg/µl

<u>Sammelgel (4%):</u>	Acrylamid/Bisacrylamid (30 % / 0,8 % Stammlösung)	1/7 Endvolumen
	Tris/HCl (pH 6,8)	125 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	1 mg/ml
	TEMED	1 µg/µl

4.2.7 Färbung von Proteingelen

Unmittelbar nach dem Lauf werden die Gele 30 min in 50 % Methanol und 10 % Essigsäure in ddH₂O fixiert und dann 5 bis 60 min in der gleichen Lösung mit 0,4 % Coomassie R250 gefärbt. Die Entfärbung des Gels erfolgt in 50 % Methanol und 5 % Essigsäure in ddH₂O unter mehrfachem Wechsel der Flüssigkeit, bis das Bandenmuster klar sichtbar ist.

4.2.8 Western-Transfer von Proteinen

Das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen wird auf eine vorgefeuchtete Nitrocellulosemembran gelegt und zwischen zwei Lagen Filterpapier in die Wetblot-Apparatur eingespannt. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran geschieht im Kühlraum während 60 min bei 100 V und ca. 200 mA. Das Protein bindet irreversibel an die Membran und kann mit Ponceau-S angefärbt werden, um den Transfer zu kontrollieren. Die Blots können getrocknet und bei 4°C für einige Wochen aufbewahrt werden oder sofort für die Immundetektion eingesetzt werden.

<u>Blotpuffer (pH8,3):</u>	Tris-Base	9.1 g
	Glycin	43.2 g
	Methanol	600 ml
	demineralisiertes Wasser	ad 3 l

<u>Ponceau-S:</u>	Ponceau-S	2 mg/ml
	Perchlorsäure	0,3 %
	Essigsäure	10 %

4.2.9 Immundetektion von geblotteten Proteinen

Die Nitrocellulosemembran mit den geblotteten Proteinen wird 2 h bei Raumtemperatur mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T blockiert, um unspezifische Wechselwirkungen zwischen Membran und Antikörpern zu verhindern. Der jeweilige Antikörper wird nach Herstellerangaben verdünnt und unter langsamen Schwenken über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert und danach dreimal für 20 min bei Raumtemperatur mit TBS-T gewaschen. Anschließend wird unter Schwenken 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper inkubiert und danach erneut wie oben gewaschen. Die Membran wird kurz in der ECL-Lösung geschwenkt, in Klarsichtfolie verpackt und dann in der Dunkelkammer auf Röntgenfilm aufgelegt. Der Film wird entwickelt und u.U. die Expositionszeit korrigiert, wenn die erhaltene Schwärzung des Films keine Quantifizierung für einzelne Banden zulässt.

<u>TBS:</u>	Tris-HCL pH 7,5	20 mM
	NaCL	137 mM

<u>TBS-T:</u>	Tris-HCL pH 7,5	20 mM
	NaCL	137 mM
	Tween-20	0,1 % (w/v)

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Puffer und Lösungen

<u>TE:</u>	Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA	0,1 mM
<u>20 x SSC:</u>	NaCl	3 M
	Natriumcitrat	0.3 M
	HCl	ad pH 7,0
<u>20 x MOPS (pH 8,3):</u>	MOPS	83,6 g
	NaOAc	13,6 g
	0,5 M EDTA (pH 8)	40 ml
	NaOH	3,2 g
steril filtrieren (0,2 µm)		
<u>Phenollösung:</u>	Phenol	25 g
	Hydroxychinolin	30 mg
	0,1 M Tris/HCl (pH 8,0)	bis zur Phasenbildung
<u>Chloroformlösung:</u>	Chloroform	96 %
	Isoamylalkohol	4 %
<u>3 M Natriumacetat (pH 5,6):</u>	Natriumacetat	24,61 g
	Eisessig	2,42 ml
	H ₂ O	ad 100 ml
<u>LB-Medium:</u>	Bactotrypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	900 ml
	NaOH (5 M)	ad pH 7,0
	H ₂ O	ad 1l
20 min bei 120°C autoklavieren		
<u>SOC-Medium:</u>	Bactotrypton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	0,5 g
	KCl (250 mM)	10 ml
	H ₂ O	900ml
	NaOH (5 M)	ad pH 7,0
	H ₂ O	ad 975 ml
20 min autoklavieren bei 120°C, abkühlen		
	sterile Glucose (1 M)	20 ml
	steriles MgCl ₂ (2 M)	5 ml

<u>LB-Agar (25 Platten):</u>	LB Medium	200 ml
	Agar	10 g
20 min autoklavieren bei 120°C, auf 40°C abkühlen	Antibiotika (nach Resistenz)	
<u>Zusatz von Antibiotika:</u>	Ampicillin (150 mg/ml)	1:1.000
	Kanamycin (100 mg/ml)	1:2.000

4.3.2 Reverse Transkription von mRNA

Die reverse Transkription von mRNA in der Gegenwart eines poly-dT primers erzeugt einzelsträngige cDNA, die beginnend an der 3'-poly-dA Sequenz und komplementär zur RNA synthetisiert wird. Da ribosomale RNA nicht polyadenyliert wird, ist es nicht notwendig, zunächst mRNA zu präparieren. Die Ausbeute der Reaktion kann u.U. jedoch durch den Einsatz von mRNA gesteigert werden. Zur Reaktion werden 20 µg RNA in 9 µl RNasefreiem ddH₂O aufgenommen, mit 2 µl poly-dT primer versetzt und 5 min bei 70°C denaturiert. Nach kurzer Abkühlung auf Eis und dem Zusatz von 1 µl RNasin, 4 µl 5 x RT-Puffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTP-Mix und 1 µl SuperScript IITM Enzym (200 U/µl) erfolgt die reverse Transkription während 1 h bei 37°C. Das entstehende RNA-DNA-Hybrid kann nach RNase Behandlung zur Synthese von cDNA eingesetzt werden oder wie in dieser Arbeit direkt in einer PCR-Reaktion. Unabhängig von der weiteren Verwendung muss das Hybrid zunächst jedoch phenolisiert, gefällt, gewaschen und in 10 µl H₂O aufgenommen werden. Für PCR-Amplifikationen wurde im weiteren jeweils 1 µl dieser Lösung eingesetzt.

4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Arnheim und Erlich (1992) dient der schnellen *in vitro*-Amplifizierung von DNA. Eine spezifische Sequenz zwischen den Bindestellen eines 5'-terminalen und eines 3'-terminalen Oligo-Desoxynukleotid-Primers wird hierbei in Näherung bei jedem Zyklus verdoppelt. Für das Design der Primer gelten folgende allgemein gültige Regeln:

- ✓ Die Länge der Primer beträgt 18 bis 30 Basen.
- ✓ Die Primer werden so ausgewählt, dass sie ca. 50 % GC-Gehalt und keine poly T-Bereiche aufweisen.
- ✓ Palindromische Sequenzabschnitte und 3' Komplementaritäten werden vermieden.

Primer, die zusätzlich zur Hybridisierungssequenz die Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym enthalten, können benutzt werden, um Schnittstellen für Restriktionsenzyme am 5'- und 3'-Terminus der neu synthetisierten DNA zu erzeugen.

Die Berechnung der Schmelztemperatur der Primer, bei der nur die Nukleotide berücksichtigt werden, die zur Hybridisierung beitragen, erfolgt nach folgender Formel: $T_m = [(Anzahl\ A+T) \times 2\ ^\circ C] + [(Anzahl\ G+C) \times 4\ ^\circ C]$.

Zur Amplifikation werden Ansätze mit 0, 20, 100 und 200 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von 100 μ l eingesetzt. Die Reaktion erfolgt in mitgeliefertem Pfu Turbo™ Puffer mit je 50 pmol 5'- und 3'-Primer sowie 10 nmol dNTP (A, T, G, C) und 2,5 U Pfu Turbo™ (2,5 U/ μ l).

Die DNA wird in einem Thermocycler 3 min bei 95°C denaturiert. Daneben werden etwa vorhandene Proteinverunreinigungen während dieser Zeit inaktiviert. Anschließend werden 2,5 U Cloned Pfu-DNA Polymerase zugegeben, und die DNA wird in bis zu 30 Zyklen vermehrt.

Für die Polymerase Kettenreaktion wird folgendes Profil verwendet:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Segment
1	95°C	1 min	Denaturierung
25-30	95°C Primer T_m -5°C 72°C	1 min 1 min 1 min / kB Zielsequenz	Amplifikation
1	72°C	10 min	Abschluß der Synthese

Die erhaltenen Produkte werden über Agarosegele von den Primerdimeren und u.U. entstandenen Nebenprodukten abgetrennt und mittels Qiaquick Kit nach Herstellerangaben isoliert.

10 x Pfu Turbo™ Puffer:	Tris-Cl (pH 8,8)	200 mM
	MgSO ₄	20 mM
	KCl	100 mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM
	Triton X-100	1%
	nukleasefreies BSA	1 mg/ml

<u>10mM dNTP Mix:</u>	ATP (100mM)	10µl
	CTP (100mM)	10µl
	GTP (100mM)	10µl
	TTP (100mM)	10µl
	ddH ₂ O	60µl

4.3.4 Blunt-end Klonierung von PCR-Fragmenten

2 µl Produkt aus einer 50 µl PCR Reaktion und 2 µl steriles Wasser werden vorsichtig mit 1 µl vorgeschrittenem TOPO pCR-BluntII™ Vektor gemischt und genau 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ligation des PCR Fragments mit dem Vektor erfolgt dabei über an die 3'-Strangenden des Vektors gebundene Topoisomerase. Nach dieser Zeit wird 1 µl 6 x Stopplösung zugegeben, für 10 sec gemischt und der Ligationsansatz sofort zur Transfektion eingesetzt. Ein Einfrieren des Ligationsansatzes wird vom Hersteller nicht empfohlen.

4.3.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Im analytischen Maßstab werden 0,1 bis 1 µg DNA mit 1 bis 5 U Restriktionsenzym pro µg DNA in 20 µl enzyspezifischen Restriktionspuffer 1 h bei 37°C inkubiert. Präparativ verwendet man das gleiche Restriktionsenzym zu DNA-Verhältnis, jedoch niemals mehr als 1/10 Volumen Enzymstammlösung, da das enthaltene Glycerin die Enzymspezifität stören kann. In Abhängigkeit von der verwendeten DNA kann es zu unvollständiger Spaltung kommen. In diesem Fall erhöht man die Enzymkonzentration bzw. verlängert die Inkubationsdauer.

4.3.6 Dephosphorylierung von DNA

Zur Dephosphorylierung mit bakterieller alkalischer Phosphatase aus *E. coli* (BAP) wird geschnittene DNA direkt aus dem Restriktionsansatz verwendet. Dieser wird mit 1/10 Volumen 10 x BAP-Puffer und 0,1 U BAP pro pmol 5'-Überhang DNA-Enden versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert.

<u>10 x BAP-Puffer:</u>	Tris/HCl (pH 8,0)	100 mM
--------------------------------	-------------------	--------

4.3.7 Phenolextraktion von DNA

DNA-Lösungen, die bei der Aufreinigung aus Zellysaten oder durch enzymatische Reaktionen mit Proteinen verunreinigt sind, werden phenolisiert, um diese abzutrennen. Hierzu versetzt man die Lösung mit einem Volumen Phenol, mischt intensiv und inkubiert dann für 3 min bei RT. Durch Zusatz von 1/10 Volumen Chloroform und fünfminütige Zentrifugation bei 10.000 rpm werden die Phasen voneinander getrennt. Die obere wässrige Phase wird ohne Mitnahme von Teilen der Interphase und der phenolischen Phase abgenommen und noch dreimal mit 1/10 Volumen Chloroform ausgeschüttelt und wie oben behandelt. Die DNA wird dann mit Ethanol gefällt.

4.3.8 Ethanolfällung von DNA

Die DNA-Lösung wird mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,6) und 3 Volumina Ethanol versetzt und kurz gemischt. Nach 30 min bei -20°C wird die DNA bei 15.000 g in einer Kühlzentrifuge sedimentiert, mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, für 2 min erneut zentrifugiert und dann im Vakuum getrocknet. Das Sediment kann in TE-Puffer oder H₂O aufgelöst und bei -20°C gelagert werden. Alternativ können zur Fällung auch ½ Volumen NH₄OAc und 3 Volumina Ethanol eingesetzt werden. Vorteilhaft hierbei ist, dass verbliebenes NH₄OAc in der Vakuumzentrifuge zerfällt und mit dem Ethanol-H₂O Gemisch abgezogen wird.

4.3.9 Ligation von DNA

Zur Ligation von DNA mit überstehenden komplementären Enden werden 200 ng DNA in 10 µl Ligationspuffer mit 1 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 18°C inkubiert. Bei Insertion eines doppelsträngigen DNA-Fragments in einen linearisierten, dephosphorylierten Vektor ist das optimale Insert-Vektor-Verhältnis abhängig z.B. von der Größe der eingesetzten Komponenten und kann empirisch bestimmt werden. I.d.R. erhält man aber beim Einsatz von 2 Teilen Insert pro Äquivalent linearisiertem Vektor ausreichend gute Ergebnisse. Zur Kontrolle wird unter den gleichen Bedingungen Vektor-DNA in Abwesenheit des Inserts ligiert.

1/10 Volumen der Ligationsansätze wird auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. U.U. ist aber so wenig Ligationsprodukt entstanden, dass dieses nicht durch Ethidiumbromid-Färbung nachzuweisen ist. Ligations- und Kontrollansätze werden später unter den gleichen Bedingungen zur Transfektion eingesetzt.

Wenn beide Ansätze die gleiche Anzahl transfizierter Kolonien erbringen, sollte die Ligation mit neu präparierter DNA wiederholt werden.

<u>10 x Ligationspuffer:</u>	Tris/HCl (pH 7,4)	500 mM
	Magnesiumchlorid	100 mM
	DTT	200 mM
	Spermidin	10 mM
	ATP	5 mM

4.3.10 Filterdialyse von Ligationsansätzen

Membranfilter VS (0,025 µm) werden auf ddH₂O gelegt und mit 1/10 Volumen des Ligationsansatzes beladen. Der Ansatz wird dialysiert und ist danach praktisch salzfrei, so dass er direkt zur Elektroporation eingesetzt werden kann.

4.3.11 Transfektion von *E. coli* durch Elektroporation

Zur Elektroporation verwendete DNA muss salzfrei sein. Daher wird in ddH₂O gelöste DNA oder gegen ddH₂O dialysierter Ligationsansatz verwendet. Aufgrund der hohen Effizienz dieser Methode bildet die Mindestmenge einzusetzender DNA i.d.R. kein Problem. Da die Transfektionseffizienz jedoch mit steigender Temperatur drastisch abnimmt, werden alle Schritte bei 4°C ausgeführt. Unter den im folgenden beschriebenen Bedingungen kann auch eine Vielzahl anderer Stämme transfiziert werden, wenn auch z.T. mit verminderter Effizienz.

In vorgekühlten Elektroporationsküvetten werden 25 ng DNA vorgelegt und mit 40 µl auf Eis aufgetauten, kompetenten ElectroMAX *DH10B*TM 30 sec präinkubiert. Die Elektroporation erfolgt bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω. Die Pulsdauer ist außer von den eingestellten Werten von der Salzkonzentration im Ansatz abhängig: Mit längerer Pulsdauer steigt die Zahl der transfizierten Zellen. Unter den beschriebenen Bedingungen liefert eine Pulsdauer von 4,7 sec sehr gute Ergebnisse, während eine Pulsdauer von 2 sec i.d.R. nicht zum Erfolg führt. Unmittelbar nach dem Puls werden die Bakterien in 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium gegeben und 30 min bei 37°C und 225 rpm inkubiert. In dieser Zeit erholen sich die überlebenden Zellen, und der plasmidal codierte Resistenzfaktor wird exprimiert.

5, 10, 100 und 500 µl dieser Kulturen werden mit einem Drigalskispatel auf der Oberfläche von 9 cm-Agar-Platten (LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum) verteilt und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Die gebildeten

Kolonien werden ausgezählt, und die Transfektionseffizienz, d.h. die Anzahl resistenter Kolonien je μg DNA, wird bestimmt.

Einzelne Klone werden gepickt und in Medium mit dem relevanten Antibiotikum für die Erzeugung von Kryokonserven angezogen.

4.3.12 Anlegen von bakteriellen Kryokonserven

Bakterienkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase, die mit einem einzelnen Klon angeimpft worden sind, werden mit dem gleichen Volumen 50 %-igem Glycerol gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.3.13 Plasmidpräparation

3 ml über-Nacht-Kultur des gewünschten Bakterienklons werden in LB-Medium mit $150 \mu\text{g/ml}$ Ampicillin angezogen. 2,0 ml hiervon werden in Eppendorfgefäße überführt und die Bakterien 1 min bei 5.000 g sedimentiert. Der Überstand wird verworfen, und das Sediment wird in $100 \mu\text{l}$ Puffer P1 vollständig resuspendiert. Nach Zugabe $200 \mu\text{l}$ Puffer P2 und viermaligem vorsichtigen Schwenken erfolgt die Lyse der Bakterien während 5 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von $200 \mu\text{l}$ Puffer P3 und erneutem viermaligen Schwenken werden SDS, Proteine, chromosomale DNA und sonstige Zelltrümmer während 15 min auf Eis gefällt und durch 5-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm sedimentiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wird in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wird die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 2,5 Volumina Ethanol für 30 min auf Eis gefällt und danach sedimentiert, gewaschen und getrocknet.

<u>Resuspendierungspuffer P1:</u>	Tris/HCl (pH 8,0)	25 mM
	EDTA	10 mM
	RNase-Stammlösung	$1 \mu\text{l/ml}$
<u>Lysepuffer P2:</u>	NaOH	0,2 M
	SDS	1 % (w/V)
<u>(Präzipitationspuffer) P3:</u>	KOAc/AcOH (pH 5,4)	3,1 M

4.3.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure-Konzentration wird spektralphotometrisch als Absorption bei 260 nm gegen H₂O bestimmt. Hierbei berechnet sich die Nukleinsäurekonzentration (c) wie folgt:

$$\text{RNA: } c = A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{DNA: } c = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

4.3.15 Agarosegel-Elektrophorese

Agarose bildet ein Gel, wenn sie in TE-Puffer aufgekocht wird. Die warme, flüssige Agarose wird mit Ethidiumbromid (ad 1 µg/ml) versetzt, in eine Flachbettkammer gegossen und erstarrt in dieser beim Abkühlen zu einem dreidimensionalen Polymer-Netzwerk. Man verwendet folgende Gelsysteme für gute Trennungseffizienz:

Agarosemenge im Gel (% w/w)	optimale Auftrennung linearer DNA-Moleküle (kB)
0,6	1 – 20
0,7	0,8 – 10
0,9	0,5 – 7
1,2	0,4 – 6

Die Trennung der Nukleinsäuren erfolgt durch Anlegen eines elektrischen Feldes von maximal 5 V/cm in Abhängigkeit von Molekülgröße und Agarosekonzentration, die Detektion erfolgt danach durch die Fluoreszenz des gebundenen Ethidiumbromids unter UV-Licht.

Die Größe linearer DNA kann man über ihre Migration relativ zu einem Größenstandard abschätzen. Circuläre DNA kann in Abhängigkeit vom Verwindungsgrad sowohl bei höherer als auch bei niedrigerer apparenter Molekülgröße wandern als lineare DNA gleicher Größe.

6x Probenpuffer BB: Bromphenolblau 0,25% (w/V)
Glycerol 30% (w/V)

6x Probenpuffer XC: Xylencyanol FF 0,25% (w/V)
Glycerol 30% (w/V)

6x Glycerol: Glycerol 30% (w/V)

4.3.16 Isolierung cytoplasmatischer RNA

Zur Isolierung cytoplasmatischer RNA wird der Qiaquick-Kit der Firma Qiagen mit vorgefertigten Lösungen und Puffern verwendet. $10^8 - 2 \times 10^8$ 32D Zellen werden 5 min bei 300 x g in einem RNase-freien Zentrifugenbecher sedimentiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen, da verbliebene Mediumreste die Puffer in der folgenden Aufarbeitung verdünnen und somit die Ausbeute verschlechtern. Die Präparation cytoplasmatischer RNA ist ausschließlich aus frischen Zellen, nicht aber aus gefrorenen Zellsedimenten möglich.

Die Zellen werden gelockert und in 2 ml 4°C kaltem RLN-Puffer mit DTT und RNasin gründlich resuspendiert und für 5 min auf Eis lysiert. Hierbei zeigt die Klärung der Suspension die Lyse der Zellen an. Das Lysat wird bei 4°C für 3 min bei 500 x g zentrifugiert, wobei die Zellkerne und partikuläre Lysatbestandteile sedimentiert werden.

Der Überstand wird abgenommen, mit 7,6 ml RLT-Puffer versetzt und 5 sec gevortext. 5,6 ml 96 % Ethanol werden zugegeben, und es wird erneut gemischt. RNeasy midi Zentrifugensäulen werden in 15 ml Röhrchen gestellt, mit 3,5 ml Aliquots dieser Lösung beladen und dann bei Raumtemperatur 5 min mit 3.000 - 5.000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen, und die Beladung der Säulen wiederholt. Die Säulen werden dann mit 3,8 ml RW1-Puffer und zweimal mit 2,5 ml RPE-Puffer gewaschen wie zuvor.

Die Säulen werden dann in ein frisches 15ml Röhrchen überführt und zweimal mit 500 µl RNase-freiem H₂O bei 3.000 bis 5.000 x g eluiert. Aliquots für die Konzentrationsbestimmung, sowie für die Qualitätskontrolle mittels Agarosegel Elektrophorese werden entnommen und die restliche RNA bei -70°C eingefroren.

4.3.17 Aufreinigung von RNA aus wässriger Lösung

Die wässrige Lösung wird mit drei Volumen Trizma versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Trizol trennen sich die Phasen während 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 12000 x g in einem Swing-out Rotor. Die wässrige RNA-haltige Phase wird in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem ml Trizol versetzt, gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g bildet das RNA-Sediment einen weißen Niederschlag an Röhrchenseite und-boden. Der Überstand wird verworfen, das

Sediment mit 75% Ethanol gewaschen und danach bei 7.500 x g und 4°C 5 min erneut sedimentiert, getrocknet und in RNase-freiem H₂O aufgenommen. Aliquots für die Konzentrationsbestimmung sowie für die Qualitätskontrolle mittels Agarosegel Elektrophorese werden entnommen. Die restliche RNA wird bei -70°C eingefroren.

4.3.18 Northern Analyse

4.3.18.1 Northern-Gele und Northern-Transfer

Für Northern Gele werden ausschließlich Glasgeräte und Gelkammern verwendet, die zuvor durch über Nacht Behandlung mit DEPC-H₂O RNase frei gemacht worden sind. Zur Herstellung der Gele werden 3 g Agarose in 280 ml RNase freiem Wasser aufgekocht und mit 15 ml 20 x MOPS versetzt. Die Lösung wird auf 60°C abgekühlt, mit 5,5 ml auf 37°C vorgewärmten Formaldehyd versetzt und sofort in die Gelkammer gegossen.

15 µg RNA werden mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 9 µl gebracht und mit 27 µl Denaturierungspuffer und 4 µl Ladepuffer vermischt. Die RNA wird während 15 min bei 65°C denaturiert, kurz auf Eis inkubiert und umgehend geladen. Als Profil für die Elektrophorese haben sich 60 min 100 V, 60 min 120 V und danach 130 V bewährt. Sobald die blaue Lauffront 11 cm von den Taschen entfernt ist, wird der Lauf abgebrochen und das Gel zur Dokumentation auf einem UV-Leuchttisch fotografiert.

Anschließend wird das im Gel vorhandene Formaldehyd durch 30-minütiges Schwenken mit 600 ml 10 x SSC ausgewaschen. Der Transfer der RNAs erfolgt über Nacht durch Kapillarblotten mit 600 ml 10 x SSC auf Hybond N Membran: Hierbei steigt 10 x SSC durch ein vorgefeuchtetes Filterpapier, das als Brücke dient, durch das Gel und die Membran auf und wird im Stapel Filterpapier oberhalb der Membran aufgesogen. Die dabei aus dem Gel mitgeführte RNA wird durch die Filtermembran zurückgehalten und am folgenden Morgen entweder mittels UV-Licht oder durch Backen im Vakuumofen auf der Membran fixiert.

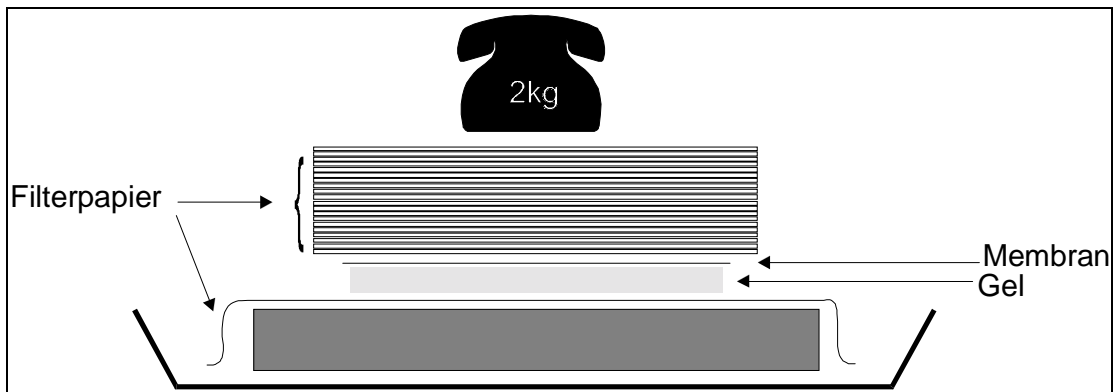


Abb. 4.1 Versuchsanordnung für das Kapillarblotting von RNA.

Der Blot wird bei 4°C in 50 % FSS und 50 % Prähybridisierungslösung aufbewahrt und vor einer Hybridisierung zur Verminderung des Hintergrundsignals und unspezifischer Wechselwirkungen der Sonde mit der Membran für mindestens 1 h bei 42°C inkubiert.

<u>Denaturierungspuffer :</u>	Formamid	620 µl
	Formaldehyd	220 µl
	20 x MOPS	62 µl
<u>Saccharose/ BPB- Stammlösung :</u>	Saccharose	5 g
	Bromphenolblau	10 mg
	1mM EDTA (RNase frei)	10 ml
<u>Ladepuffer:</u>	Saccharose / BPB	100 µl
	Ethidiumbromid (2 mg/ml)	33 µl
<u>Laufpuffer:</u>	20 x MOPS	115 ml
	ddH ₂ O	2185 ml
<u>FSS:</u>	Formamid	450 ml
	SDS (20 %)	225 ml
	ssDNA	9 ml
<u>Prähybridisierungslösung:</u>	20 x SSC	300 ml
	EDTA (0,5 M)	12 ml
	100 x Denhardts Lösung	120 ml
	ddH ₂ O	108 ml
	Na ₃ PO ₄ (1 M)	60 ml
<u>Hybridisierungslösung:</u>	Prehybridisierungslösung	600 ml
	Dextran	60 g

4.3.18.2 Herstellung der Sonden

Zur Herstellung der Sonden werden hochreine DNA-Präparationen eingesetzt. Plasmide, die die jeweilige Gensequenz enthalten, werden gespalten und in „low melt“ Agarose aufgetrennt. Die Fragmente werden ausgeschnitten und mit Hochsalz-Puffer extrahiert, präzipitiert und gewaschen. Eine Wiederholung der Elektrophorese und der folgenden Schritte kann zu einer deutlichen Verminderung des Hintergrunds führen.

An ca. 1 µg des gereinigten Fragments wird durch Random Priming in Gegenwart von α -³²P-ATP eine radioaktiv markierte Sonde synthetisiert. Zu 1 µl gereinigtem Fragment werden 6,5 µl ddH₂O, 4 µl dNTP-Mix, 12,5 µl α -³²P-ATP (5 mCi/ml) und 2,5 µl DNA Polymerase/ DNase gegeben. Die Nicktranslation erfolgt während 1 h bei 16°C und wird danach mit 22 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Zur Abtrennung des Fragments von den nicht inkorporierten Nukleotiden wird der Reaktionsansatz auf eine Gelfiltrationssäule (z.B. Probe QuantTM G-50) gegeben und 2 min zentrifugiert. Der Durchlauf enthält die markierte Sonde, während die nicht inkorporierten Nukleotide in der Säule zurückgehalten werden. Die Sonde wird umgehend für die Hybridisierung verwendet. Im Überschuss vorhandene Sonde wird bei -20°C im Überwachungsbereich gelagert und kann auch später verwendet werden, soweit die verbliebene Aktivität dies zulässt.

4.3.18.3 Northern-Hybridisierung und Detektion der Signale

1 µl der Sonde wird in 100 µl Szintillationslösungen im Szintillationszähler gemessen. 15 Millionen cpm der radioaktiv markierten Sonde werden zu 10 ml 50 % FSS und 50 % Hybridisierungslösung gegeben und gut gemischt.

Der prehybridisierte Blot wird in diesen Mix überführt und von beiden Seiten gleichmäßig benetzt. Die Hybridisierung erfolgt unter gleichmäßiger Bewegung über Nacht bei 42°C.

Am folgenden Morgen kann die Hybridisierungslösung abgezogen und für weitere Hybridisierungen verwendet werden. Der Blot wird bei Raumtemperatur zweimal für je 30 min mit 2 x SSC+SDS gewaschen, für 30 min mit 0,1 x SSC+SDS und, sofern dann noch ein breit verteiltes radioaktives Signal detektierbar ist, für weitere 10 bis 15 min in 0,1 x SSC+SDS bei 65°C gewaschen.

Der gewaschene Blot wird in Klarsichtfolie eingeschlagen, in der Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm aufgelegt und in einer Röntgenkassette bei -80°C für sechs bis

72 h exponiert. Die Schwärzung des Films kann densitometrisch quantifiziert werden. Alternativ kann zur Detektion des radioaktiven Signals auch ein Phosphorimager mit den entsprechenden Platten eingesetzt werden. Hier erfolgt die Exposition bei Raumtemperatur über einen etwa halb so langen Zeitraum. Zur Visualisierung und Quantifizierung wird dann eine mit dem Imager zusammen gelieferte spezielle Software, z.B. Image Quant, verwendet.

<u>2 x SSC+SDS:</u>	2 x SSC	1 l
	SDS	2-4 g
<u>0,1 x SSC+SDS:</u>	0,1 x SSC	1 l
	SDS	2-4 g

4.4 cDNA-Array

4.4.1 Isolierung von RNA für cDNA-Array Analysen

Auch RNA, die in konventionellen Anwendungen (z.B. RT-PCR oder Northernblot) gute Ergebnisse liefert, kann in DNA-Array Versuchen schwache Signale oder einen hohen Hintergrund liefern. Insbesondere Benzol, dass bei der Herstellung 100 %-igen Ethanols zum Einsatz kommt, oder Kohlehydrate, die häufig zusammen mit den Nukleinsäuren angereichert werden, führen zu unspezifischen Fluoreszenzsignalen bei der späteren Analyse. Eine zweistufige Prozedur mit dem RNeasy-Kit von Qiagen als erster Stufe (siehe 4.3.16) und Trizol oder Tri Reagenz als zweiter (siehe 4.3.17) hat sich bewährt. Dagegen liefert der Einsatz von polyA-RNA im Vergleich zu total RNA keine Verbesserung des Signals oder Verminderung des Hintergrunds.

4.4.2 Synthese der cDNA-Sonden

Die im weiteren beschriebene Methode orientiert sich im wesentlichen an der im Sommer 1999 vom Advanced Technology Center am National Institute of Health, Bethesda, USA, angewandten Verfahren und ist optimiert für die maximale Inkorporation von UTP-Cy3 und UTP-Cy5, nicht auf die Länge der erhaltenen Transkripte. Es sind derzeit jedoch neue Verfahren wie z.B. der Einsatz von Allyl-UTP in der Erprobung, die bei minimiertem Materialeinsatz eine hohe Inkorporationsrate und gleichzeitig eine große Transkriptlänge ermöglichen sollen.

Für die Herstellung Cy3-markierter Sonden werden 50 µg RNA in 19 µl RNase-freien H₂O eingesetzt, für Cy5-markierte Sonden 100 µg RNA im selben Volumen. Für beide Sonden wird auf Eis separat folgender Reaktionsmix angesetzt:

Komponente	Volumen (µl)
5 x first strand Puffer	8
oligo dT (20-mer, 2 µg/µl)	2
20 x niedrig-dT/NTP Mix	2
Cy3-UTP / Cy5-UTP (1 mM)	4
DTT (100 mM)	4
RNasin	1
total RNA (50 resp. 100 µg)	19
Summe	40

Die RNA wird während 5 min bei 65°C denaturiert und danach für 2 min bei Raumtemperatur gehalten.

2µl SuperScript II™ Enzym (200 U/µl) werden zugegeben und gut vermischt. Nach 25 min reverser Transkription bei 42°C werden weitere 2 µl SuperScript II™ zugegeben und die Inkubation für 35 min fortgesetzt.

Durch Zugabe von 5 µl 500 mM EDTA wird die reverse Transkription unter kurzem Vortexen gestoppt. Anschließend wird die RNA im Reaktionsansatz mit 10 µl 1 M NaOH während 60 min bei 65°C hydrolysiert.

Sobald die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wird sie mit 25 µl 1M Tris-HCl (pH 7,5) neutralisiert.

<u>20 x niedrig-dT/ dNTP Mix:</u>	ATP (100 mM)	10 µl
	CTP (100 mM)	10 µl
	GTP (100 mM)	10 µl
	TTP (100 mM)	4 µl
	ddH ₂ O	66 µl

4.4.3 Reinigung der cDNA-Sonden

Die notwendige Anzahl Microcon YM-30 Säulen werden mit je 500 µl TE (pH 7,4) für 7 – 8 min bei 13.000 rpm gewaschen und gleichzeitig auf ihre Dichtigkeit überprüft.

Die Sonden der beiden zu vergleichenden Proben (eine Cy3- die andere Cy5-markiert) werden gemeinsam in 400 µl TE (pH 7,4) aufgenommen und in eine der Säulen überführt. Das Sondenvolumen wird durch Zentrifugation auf 20-40 µl reduziert. Die Sonden werden hernach zweimal mit 400 µl TE (pH 7,4) wie oben gewaschen. Anschließend werden sie dann ein letztes Mal mit 450 µl TE (pH 7,4) gewaschen, und das Volumen wird vorsichtig auf 6- 8 µl reduziert. Beim Messen dieses Volumens mit einer Pipettenspitze darf die Säulenmembran auf keinen Fall berührt werden, da sie leicht zerstört werden kann.

Die Säule wird nun umgekehrt in ein frisches Röhrchen eingesetzt und die Sonde durch einminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit zurückgewonnen. Das Sondenvolumen wird schließlich mit TE (pH 7,4) auf 11 µl eingestellt.

4.4.4 Vorbereitung des Hybridisierungsansatzes

Die folgenden Komponenten werden zusammengegeben, durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gründlich gemischt und für 2 min bei 100°C denaturiert:

Komponente	Volumen (µl)
Cy3-Cy5 markierte Sonden in TE	11
COT-1 DNA (10 µg/µl)	1
polyA (8 µg/µl)	1
Hefe tRNA (4 µg/µl)	1
20 x SSC	3,1
10% SDS	0,5
Summe	17,6

Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge wird der Überstand ohne jedes u.U. sedimentierte Partikulat abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Hier werden die Sonden durch mehrfaches vorsichtiges Pipettieren optimal verteilt und danach sofort für die Hybridisierung eingesetzt.

4.4.5 Hybridisierung der cDNA-Arrays

Der Hybridisierungsansatz wird vorsichtig auf die Mitte des Arrays gegeben und sofort mit einem Deckglas (22 mm x 22 mm) bedeckt. Hierbei ist es wichtig, das Deckglas absolut parallel zum Array zu führen, da sonst Volumenunterschiede über den Array hinweg entstehen, die die Meßergebnisse beeinflussen können. Nach dem Auflegen des Deckglases soll sich der Flüssigkeitsfilm gleichmäßig und blasenfrei nach allen Seiten ausbreiten. Jede weitere Bewegung des Deckglases kann die Oberfläche des Chips schädigen. Der Array wird unmittelbar darauf in die Hybridisierungskammer überführt. 40 µl H₂O für die Konstanthaltung der Feuchtigkeit werden an der vorgesehenen Stelle zugegeben, und die Kammer wird verschlossen. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht (10-16 h) in einem Wasserbad bei 65°C.

Die Hybridisierungskammern werden außen abgetrocknet und dann vorsichtig geöffnet. Der hybridisierte DNA-Array wird herausgenommen, umgedreht - so dass das Deckgläschen nach unten zeigt - und vorsichtig leicht schräg in ein Gefäß mit 2 x SSC und 0,1% SDS eingetaucht, bis das Deckgläschen abfällt. Die einzelnen

Waschschritte sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt und erfolgen bei Raumtemperatur:

Waschlösung:	Dauer
2 x SSC + 0,1% SDS	bis zur Ablösung des Deckgläschens
1 x SSC	1 min
0,2 x SSC	1 min
0,05 x SSC	10-20 sec

Unmittelbar nach dem letzten Waschschritt wird der Array bei 50 – 100 x g in einem Halter für Objektträger 3 bis 4 Minuten trocken zentrifugiert oder trocken gewedelt. Keinesfalls darf die Trocknung mittels Druckluft erfolgen, da Treibgase und Aerosole die spätere Fluoreszenzmessung stören können.

Der hybridisierte und gewaschene Array wird dunkel und trocken bei Raumtemperatur verwahrt und möglichst schnell gescannt.

4.4.6 Scannen der Arrays

Zum Scannen der Arrays werden Gene Pix 4000 Scanner von Axon und die mitgelieferte GenePix 2.0 Software verwendet. Die cDNA-Arrays werden mit der Hybridisierungsseite nach unten in den Scanner gelegt. Die exakte Lage der Spots wird zunächst in einem Scan geringer Auflösung bestimmt. Während des Scannens regen dazu Laser die Fluorophore an. So wird die Verteilung der roten und grünen Fluoreszenz über den gesamten Array gemessen. Der Gene Pix 4000 verfügt über zwei unabhängige Laser, so dass die Anregung von Cy3 und Cy5 während des gesamten Scanvorgangs unabhängig voneinander verändert werden kann. Damit ist es möglich, bereits während des Scanvorgangs anhand des optischen Eindrucks eine Angleichung der durchschnittlichen Intensität bei 635 nm (Cy5) und 532 nm (Cy3) vorzunehmen. Diese Kalibrierung ist notwendig, da die Inkorporation von UTP-Cy3 und UTP-Cy5 mit unterschiedlicher Kinetik verläuft und beide Fluorophore außerdem unterschiedlich stark emittieren. Für die weitere Analyse soll der Unterschied in der durchschnittlichen Fluoreszenz nicht mehr als Faktor drei betragen. Der relative Fehler der Messung ist umso kleiner je höher die Signalintensität ist. Die Intensität der anregenden Laser wird daher möglichst groß gewählt. Dies ermöglicht außerdem die Detektion schwacher Signale, die sonst u.U. im Hintergrund verloren gehen würden. Dabei sollten jedoch maximal 1 % aller Spots so stark angeregt sein, dass es bei ihrer Messung zur Sättigung kommt.

Die erhaltenen Signale werden in Graustufenbilder konvertiert und gespeichert.

4.4.7 Auswertung der gescannten cDNA-Arrays

4.4.7.1 Analyse von einzelnen cDNA-Arrays

Die beim Scannen erhaltenen Dateien werden in IPLab eingelesen und den entsprechenden Wellenlängen zugeordnet: Cy3 emittiert bei 532 nm, Cy5 bei 635 nm. Über die Scans wird ein Raster gelegt, so dass jeder Spot in einer einzelnen Zelle liegt. Dieses Raster wird mit der zum Array gehörenden GIPO-Liste (Genes In Print Order – Liste) verknüpft. Dann werden durch die IPLab Software folgende Berechnungen vorgenommen:

- ✓ Lokalisierung der einzelnen Spots nach der Lage des Rasters, des eingestellten Hintergrundschwelliges und der Intensitätsgradienten.
- ✓ Subtraktion des lokalen Hintergrundwertes von der Spotintensität für beide Wellenlängen.
- ✓ Berechnung der durchschnittlichen Spotintensitäten für beide Kanäle und des Kalibrierungswertes für ihre Verknüpfung.
- ✓ Berechnung der Verhältnisse der Intensitäten beider Kanäle und Normalisierung dieser Werte mit dem Kalibrierungswert.
- ✓ Alle Messwerte, die außerhalb eines 99 %-igen Vertrauensintervalls liegen oder eine zu kleine Veränderung aufweisen werden ignoriert. Die übrigen Werte werden in eine Excel-Datei ausgegeben.

Die Verknüpfung der Scans mit Raster und GIPO-Liste macht eine Zuordnung der einzelnen Intensitäten und Verhältnisse zu den jeweiligen Zellen und darüber zu den gespotteten Sequenzen möglich.

Parallel dazu werden alle Werte in Fehlfarbenbilder umgesetzt und als Datei ausgegeben sowie eine Datei für die Datenbank-gestützte Analyse erzeugt.

Die als differentiell exprimiert identifizierten Sequenzen können über die Homepage von Research Genetics (<http://www.resgen.com>) abgerufen werden.

4.4.7.2 Analyse von cDNA-Array Versuchsreihen

Alle in den einzelnen Experimenten erhaltenen Daten werden in einem Arbeitsblatt vereinigt und nach Gennamen und Anordnung im Gitternetz sortiert. Der Vergleich der Expressionsverhältnisse und gemessenen Intensitäten erfolgt von Hand für jedes einzelne Gen.

Zur Analyse werden selbsterstellte Excel-Routinen verwendet, in denen Sortierungen nach Signalintensität, Signalverhältnis oder Gen möglich sind.

Daneben werden auch die ständig verbesserten netzbasierten Programme der NCI Micro Array Database im Internet (<http://www.nciarray.nci.nih.gov>) verwendet. Hier werden zunächst Projekte mit eindeutiger Zuordnung der in den einzelnen Experimenten verwendeten RNAs und ihrer Markierung erstellt. In diese einzelnen Projekte werden die aus IPLab erhaltenen Bild- und Datenbankdateien eingelesen und können dann nach den Kriterien Intensität, relative Expression und Erscheinen im relevanten Anteil der Experimente sortiert werden.

Auch die Ergebnisse dieser Auswertung werden als Excel-Dateien ausgegeben und von Hand nachbearbeitet. Das NCI bietet daneben eine direkte Verbindung zu Research Genetics, so dass die Klone für die differentiell exprimierten Sequenzen direkt abgefragt und bestellt werden können.

4.5 TaqMan®-Analyse

4.5.1 Prinzip der quantitativen RT-PCR nach TaqMan®-Prinzip

Die TaqMan®-Analyse folgt zunächst dem Prinzip der RT-PCR. Auch hier wird die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben und dann mit spezifischen Primern amplifiziert. Bei der konventionellen RT-PCR wird jedoch erst zum Ende der Reaktion gemessen. Zu diesem Zeitpunkt ist die PCR häufig schon in die Plateauphase eingetreten, so dass die wahren Mengenverhältnisse nicht korrekt wiedergespiegelt werden.

In der TaqMan®-Technologie kommt daher zusätzlich zu den beiden Primern eine ebenfalls sequenzspezifische Sonde zum Einsatz. Diese ist zweifach fluoreszenzmarkiert und trägt am 5'-Ende einen Reporter sowie am 3'-Ende einen Quencher. Wird der Reporter mit Licht der Wellenlänge λ angeregt, so strahlt er das eingefangene Licht bei der längeren Wellenlänge λ' wieder ab. In der intakten Sonde wird dieses vom Quencher aufgenommen und bei nochmals längerer Wellenlänge λ'' wieder abgestrahlt. Da der Sequenzdetektor nur die Fluoreszenz bei λ' misst, wird dieses Signal jedoch nicht detektiert.

Im Verlauf der PCR kommt es dann in jeder Annealingphase zur Anlagerung von einer Sonde pro Doppelstrangsequenz. In der folgenden Elongationsphase wird die Sonde durch die eingesetzte Polymerase zunächst vom DNA-Strang verdrängt und dann durch deren RNase H-Funktion hydrolysiert. Reporter und Quencher werden

dadurch getrennt. Das vom Reporter emittierte Licht der Wellenlänge λ' wird nicht mehr gequencht und liefert ein detektierbares Signal.

Während der gesamten Reaktion kann die Bildung des PCR-Produkts durch die Zunahme der Fluoreszenz gemessen werden. Durch die nachfolgend beschriebenen restriktiven Reaktionsparameter und Optimierungsschritte ist dabei eine praktisch vollständig verlaufende Amplifikation gewährleistet.

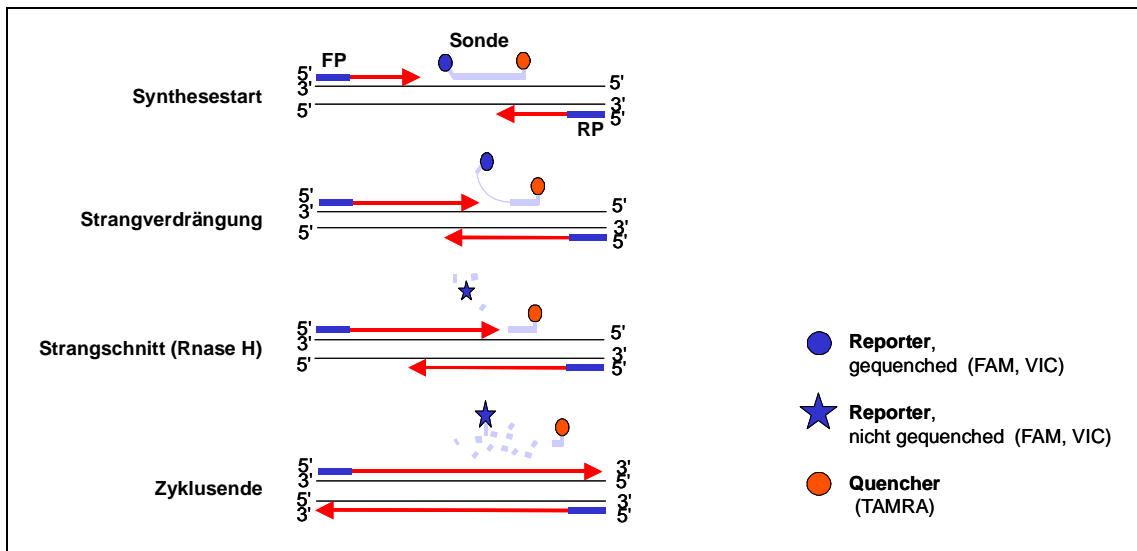


Abb. 4.2 Graphische Darstellung der TaqMan®-Reaktion.

FP steht für Vorwärtsprimer, RP steht für reverse Primer (verändert nach den Betriebsunterlagen für den PE SDS 7700).

4.5.2 Primer- und Sondendesign

Das Design der Primer und Sonden für die Amplifikation der einzelnen Gene wird durch die Primer Express Software von Perkin Elmer Applied Biosystems unterstützt. Hierbei gelten folgende Bedingungen für das Design der FAM–TAMRA-markierten Sonde:

- ✓ Das PCR-Produkt sollte eine Länge von 70 bis 85 Basenpaaren haben. Dies stellt sicher, dass die PCR in jedem Zyklus vollständig erfolgt.
- ✓ Das 5'-Ende der Sonde sollte maximal 50 Basenpaare vom 3'-Ende des Primers liegen, um sicherzustellen, dass die Sonde durch das erste gebundene Taq-Enzym hydrolysiert wird.
- ✓ Wenn möglich wird die Sonde komplementär zum C-haltigeren Strang ausgewählt.
- ✓ Sie sollte bei einer Länge von 20 bis 30 Basen einen GC-Gehalt von 40 bis 60 % und einen Schmelzpunkt von 70°C aufweisen.

- ✓ Die Sondensynthese startet mit einem FAM-gelabelten Nukleotid, niemals jedoch mit einem G, da dieses FAM auch nach der Sondenhydrolyse quenchen kann. LAN-TAMRA wird nach Abschluß der Synthese entweder anstelle eines 3'-terminalen T oder zusätzlich zur Sequenz an das 3'-Ende angefügt und durch eine Phosphorylierung des 5'-OH gegen eine Elongation blockiert.
- ✓ Daneben gilt es, Komplementaritäten zwischen den Primern sowie Sonde und Primern zu vermeiden und keine Sequenzen mit auffälliger Sekundärstruktur zu verwenden. Drei aufeinanderfolgende Basen eines Typs wirken ebenfalls negativ auf die Hybridisierung.

Die Primer werden nach den üblichen Regeln für die Erstellung von PCR-Primern ausgewählt. Es ist aber zu beachten, dass sie einen um mindestens 5°C niedrigeren Schmelzpunkt als die Sonde haben müssen. In der nachfolgenden Abbildung ist die Struktur des Amplikons graphisch dargestellt.

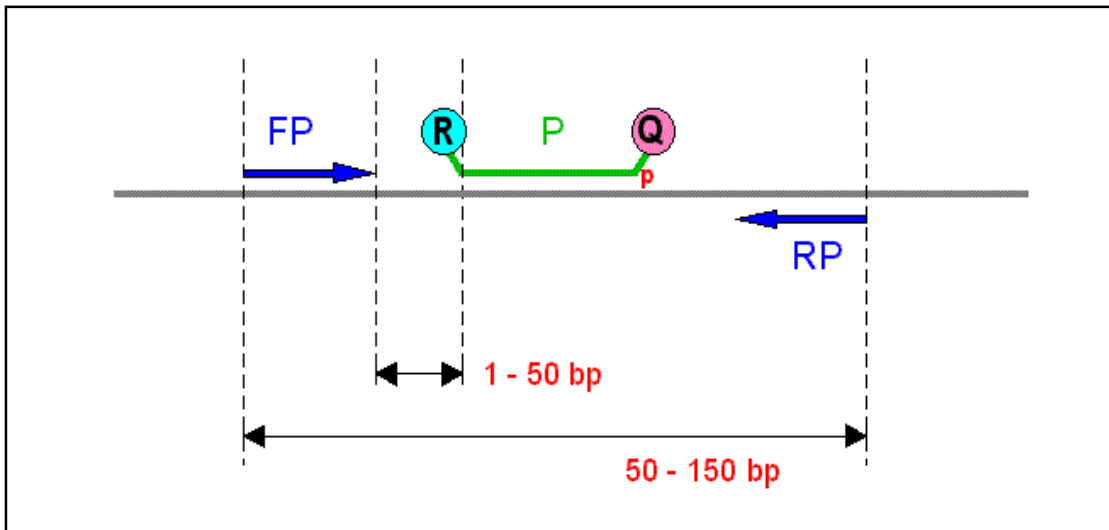


Abb. 4.3 Graphische Darstellung des Amplikons für die TaqMan®-Analyse

Die Abkürzungen bedeuten Vorwärtsprimer (FP), Reverser Primer (RP), Reporter (R) und Quencher (Q) (verändert nach den Betriebsunterlagen für den PE SDS 7700).

Die erhaltenen Primer und Sonden werden im Rahmen einer Blast-Suche auf eine mögliche Hybridisierung mit anderen Sequenzen als den Zielgenen untersucht und solche Primer-Sonden Triplets ausgewählt, die die geringste Komplementarität zu anderen Sequenzen aufweisen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Als Kontrolle wird eine Primer-Sonden Kombination für Nagetier GAPDH von PE Biosystems verwendet. Die Sonde in diesem Set ist VIC-TAMRA markiert und kann daher parallel zu FAM-TAMRA markierten Sonden gemessen werden.

4.5.3 Profil für die Durchführung der quantitativen RT-PCR

In standardisierten RT-PCR wird das folgende Profil verwendet:

Cyclen	Temperatur	Dauer	Segment
1	50°C	2 min	UNG-Inkubation
1	60°C	30 min	reverse Transkription
1	95°C	5 min	Aktivierung der Taq Polymerase
45 – 60	94°C 60°C	20 sec 1 min	Amplifikation

4.5.4 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

Parallel zur Amplifikation der Zielsequenz erfolgt die als Fluoreszenzanstieg detektierte Hydrolyse der TaqMan[®]-Sonde. Diese ist stark abhängig von der Mangankonzentration im Reaktionsansatz und muß für jedes Set neu empirisch bestimmt werden. Vorbereitete Reaktionsmixe mit Mangankonzentrationen von 2 bis 5 mM ohne RNA werden dazu auf Eis in die Reaktionsgefäße vorgelegt. Die RNA wird einzeln mit frischen Pipettenspitzen zugegeben. Grundsätzlich werden Doppel- oder Dreifachansätze pipettiert. Danach werden die Reaktionsgefäße verschlossen, kurz zentrifugiert und im PE SDS 7700 zur Reaktion gebracht. Der Standardmix für einen Reaktionsansatz hat die folgende Zusammensetzung:

Komponente	Konzentration/ Volumen
TaqMan [®] EZ Puffer (5 x)	1 x
MnOAc (25 mM)	2 – 6 mM
ATP (10 mM)	300 µM
CTP (10 mM)	300 µM
GTP (10 mM)	300 µM
UTP (20 mM)	600 µM
Zielgen, oberer Primer (10 µM)	100 nM
Zielgen, unter Primer (10 µM)	100 nM
Zielgen, Sonde (20 µM)	200 nM
AmpErase UNG (1 U/µl)	0,01 U/µl
<i>rTth</i> DNA Polymerase (2,5 U/µl)	0,1 U/µl
H ₂ O	ad 23 µl

Wenn allein durch die Optimierung der Mangankonzentration keine guten Messungen möglich werden, können zusätzlich auch die Primerkonzentrationen von 30 bis 300 nM variiert werden. Hiermit können u.U. nicht optimal abgestimmte Schmelzpunkte eines oder beider Primer ausgeglichen werden.

4.5.5 Bestimmung der differentiellen Expression einzelner Gene

Die Reaktionen zur Expressionsanalyse der Referenz- und Zielsequenz erfolgt im gleichen Reaktionsgefäß. Dies garantiert den Einsatz der gleichen Menge RNA, vermindert Pipettierfehler und erhöht so die Genauigkeit der Messung:

Komponente	Konzentration/ Volumen
TaqMan [®] EZ Puffer (5 x)	1 x
MnOAc(25 mM)	2 – 6 mM
ATP (10 mM)	300 µM
CTP (10 mM)	300 µM
GTP (10 mM)	300 µM
UTP (20 mM)	600 µM
GAPDH, oberer Primer (10 µM)	100 nM
GAPDH, unter Primer (10 µM)	100 nM
GAPDH, Sonde (20 µM)	200 nM
Zielgen, oberer Primer (10 µM)	100 nM
Zielgen, unter Primer (10 µM)	100 nM
Zielgen, Sonde (20 µM)	200 nM
AmpErase UNG (1 U/µl)	0,01 U/µl
<i>rTth</i> DNA Polymerase (2,5 U/µl)	0,1 U/µl
H ₂ O	ad 23 µl

Gelegentlich ist es notwendig, die beiden Reaktion in getrennten Gefäßen ablaufen zu lassen. Gründe hierfür sind z.B. unterschiedliche optimale Mangankonzentrationen oder unspezifische Produkte, die bei einer Kombination der Primer und Sonden für die beiden untersuchten Sequenzen entstehen können.

4.5.6 Analyse der Daten

Während der gesamten Reaktion wird die Steigerung der Fluoreszenz in den einzelnen Proben gemessen. Diese ist ein Maß für die Hydrolyse der Sonden und die Freisetzung des Reportes durch die RNase H-Eigenschaft der verwendeten *rTth*-Polymerase. Sie steigt parallel zur Menge des Amplifikationsproduktes an und verdoppelt sich daher in jedem Zyklus.

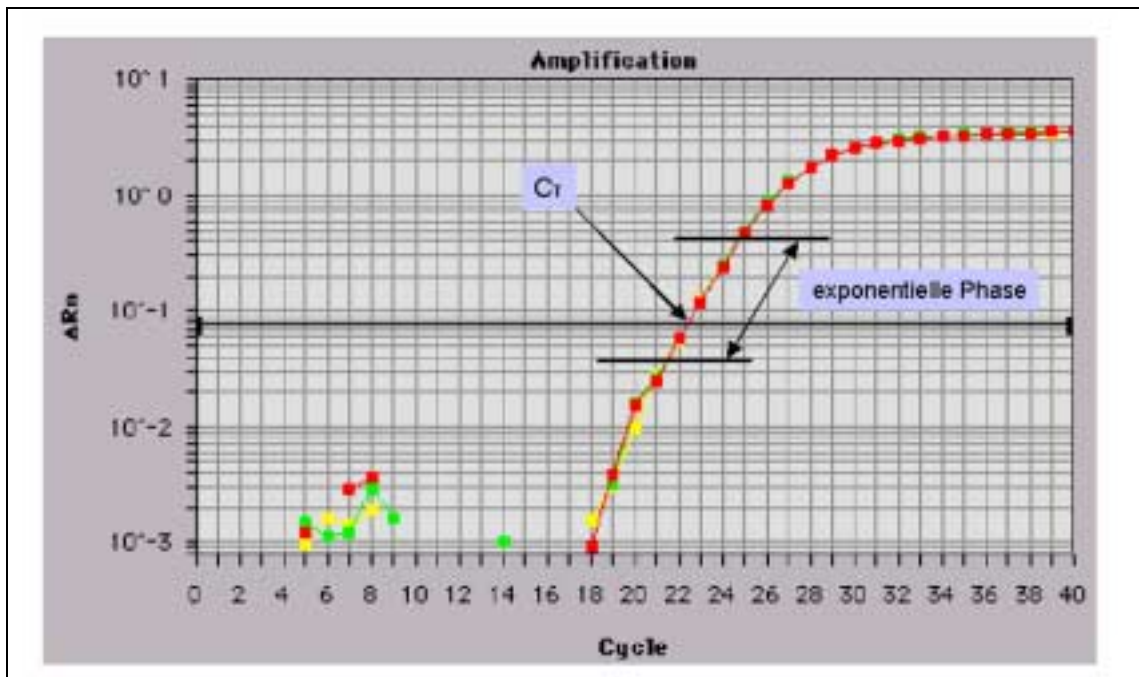


Abb. 4.4 Beispiel eines PCR-Amplifikationsplots

Die exponentielle Phase ist durch zwei horizontale Begrenzungslinien gekennzeichnet. ΔR_n steht für das normierte Reportersignal abzüglich der Hintergrundfluoreszenz, C_T für „Threshold Cycle“ (verändert nach den Betriebsunterlagen für PE SDS 7700).

Unter Einsatz der Messwerte aus der exponentiellen Phase der PCR werden Regressionsgeraden erstellt. Mit diesen wird auf den Punkt extrapoliert, an dem die Amplifikationskurven den Schwellenwert überschreiten. Diese als C_T bezeichneten Werte werden in Excel importiert und weiterbearbeitet. Hier werden folgende Schritte durchgeführt:

- ✓ Bildung der Mittelwerte der C_T für die identischen Replikate
- ✓ Normalisierung der Werte auf die Werte für das Referenzgen (GAPDH):
 $\Delta C_T = C_T(\text{Probe}) - C_T(\text{GAPDH})$
- ✓ Normalisierung der Werte auf den Kalibrator (auf den unstimulierten Zustand, auf das gesunde Gewebe, auf die Referenz-Präparation, etc.):
 $\Delta \Delta C_T = C_T(\text{stimuliert}) - \Delta C_T(\text{unstimuliert})$
- ✓ Berechnung der relativen Mengen:
 $M_{\text{rel.}} = 2^{(-\Delta \Delta C_T)}$

Dabei errechnet sich für den Kalibrator der Wert 1. Die mRNA in den Proben wird als Vielfaches der im Kalibrator vorhandenen Menge angegeben.