

2 Material / Methoden

2.1 Tiere

Die in dieser Doktorarbeit untersuchte ND (Norrie disease)-Mauslinie wurde durch homologe Rekombination erzeugt. Dabei wurde im Norrie disease pseudoglioma homolog (*Ndph*)-Gen das Startkodon (ATG) in Exon 2 und der 3'-gelegene Teil dieses Exons inklusive der Spleißdonorstelle durch eine Neomycinkassette ersetzt und so die *Ndph*-knockout-Mausmutante erzeugt (Berger et al., 1996). Die Mäuse wurden durch die Verpaarung heterozygoter Weibchen mit C57BL/6-Männchen erzeugt und wann immer möglich, Geschwister für die Experimente verwendet. Die DNA wurde aus Schwanzbiopsien gewonnen (2.3.6) und der jeweilige Genotyp durch PCR (2.3.7) bestimmt. Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Regelungen für Tierexperimente der Bundesrepublik Deutschland und der Schweizer Regierung durchgeführt. Die Genotypen sind in dieser Arbeit wie folgt dargestellt: Norrie disease pseudoglioma homolog (*Ndph*)-Wildtyp-Männchen: *Ndph*^{y/+}; Knockout (hemizygoten)-Männchen: *Ndph*^{y/-}; Wildtyp-Weibchen: *Ndph*^{+/+}; Heterozygotes Weibchen: *Ndph*^{+/-}; Homozygotes Knockout-Weibchen: *Ndph*^{-/-}.

2.2 Gewebepräparation und histologische Techniken

Tabelle 1: Histologie - Lösungen und Verbrauchsmaterialien

„Serras“ – Fixativ	60% Ethanol 30% 37% Formaldehyde (= 11,1 %) 10% Essigsäure (100%)
4% Formalin in PBS (1x)	4% Formaldehyd in 1 x PBS
Chloroform	# 102445.1000; Merck
Eosin-Färbelösung	3% Eosin B (#E8017; Sigma) 95% Ethanol (v/v)
Ethanol (2,5 l)	# 1.00983.2500; Merck
Isopropanol (2,5 l)	# 109634.2500; Merck
Mayers Hämlaunlösung	#1.09249.0500; Merck
Paraffin (Histowax (12 x 1kg))	# 14 037432123; Leica
Paraffin-Öl, 1 Liter	# 9190.1; Roth
Roti Histokitt, 100ml	# 6638.1; Roth
Rotihistol	# 6640.1; Roth
Superfrost/ Plus Objektträger, 72 STK	# H867.1; Roth

Tabelle 2: Histologie-Geräte

Axioplan 2 imaging Mikroskop; motorisiert	Zeiss
Digitalkamera AxioCam HRc	Zeiss
Kühlplatte EG1140 C	Leica

Mikrotom-Einwegklingen Typ N 35 H Extrem Hart	# 207500007; Feather (bezogen über Stehelin)
Mikrotom-Einwegklingen Typ N 35 Hart	# 207500006; Feather (bezogen über Stehelin)
Paraffin-Strecktisch HI1220	Leica
Paraffinausgießstation EG1140H; beheizt	Leica
Rotationsmikrotom RM2145	Leica
Stereomikroskop MZ6	Leica
Wasserbad HI1210	Leica

2.2.1 Entnahme und Verarbeitung von Geweben

Die Gewebe (Augen, Retinae, Gesamthirn, Gehirnregionen (Olfaktorischer Bulbus, Cortex (Großhirn), Cerebellum (Kleinhirn), Hirnstamm, Hippokampus, Hypophyse), Leber und Deziduae) wurden aus *Ndph*-knockout-Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren präpariert. Für die RNA-Isolation wurden die Präparationen auf Eis durchgeführt, die Gewebe direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C gelagert. Für histologische Untersuchungen bzw. für die Einbettung in Paraffinblöcke wurde das Gewebe direkt nach der Präparation in das jeweils zu verwendende Fixativ überführt.

2.2.2 Fixierung und Paraffineinbettung von Gewebe

Das Gewebe wurde im Fixativ über Nacht bei 4°C fixiert. Große Gewebe, wie z.B. das Gehirn, wurden nach 2 h sagittal in zwei Hälften geschnitten und das Fixativ gewechselt, um das ausgetretene Gewebewasser zu entfernen. Das Gewebe wurde dann durch eine Isopropanolreihe entwässert (mindestens jeweils 3 x 2 h 70% und 100% Isopropanol) und in Paraffin eingebettet (3 x 2 h Chloroform; 2 h Paraffinöl (60-62 °C), 3 x mindestens 2 h Paraffin (60-62 °C); Paraffinausgießstation). Anschließend wurden die eingebetteten Gewebe mit Hilfe des Rotationsmikrotoms RM2145 geschnitten (7 µm), auf die SuperFrost Plus Objektträger transferiert und über Nacht bei 42 °C auf einem Strecktisch für Paraffinschnitte liegen gelassen. Diese Schnitte wurden sowohl für histologische Färbungen als auch für RNA-*in situ* Hybridisierungen verwendet.

2.2.3 Hämalaun/Eosin-Färbung

Die Schnitte wurden nach einer Hämalaun/Eosin-Prozedur gefärbt. Dafür wurden die Paraffinschnitte zweimal 10 min in Rotihistol (Alternative zu Xylol) entparaffiniert. Anschließend wurde das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2 min 100% (2 x), 90%, 70%, 50% Isopropanol) und dann mit bidestiliertem Wasser hydratisiert. Die eigentliche

Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hämatoxylin (Mayer's hemalum solution) für 5 min. Anschließend wurden die Schnitte zweimal kurz in bidestilliertes Wasser gestellt. Die Färbung des Zytoplasmas erfolgte mit Eosin in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50% Ethanol, 70% Ethanol + NH₄OH (8 Tropfen auf 200 ml), 70% Ethanol und 95% Ethanol, 0,3% Eosin in 95% Ethanol, 95% Ethanol (2 x)). Die Gewebeschnitte wurden für das Einbetten mit dem Rotihistokitt durch 2 x 5 min Behandlung mit Rotihistol-Lösung vorbereitet. Im Hellfeld eines Zeiss Axioplan 2 Mikroskops wurden die Schnitte untersucht und die Bilder mit der Digitalkamera AxioCam HRc dokumentiert.

2.3 DNA-Techniken

Tabelle 3: DNA-Techniken – Lösungen

BigDye™ Terminator v 1.1 v3.1 5 x sequencing buffer	# 4336697; Applied Biosystems
Essigsäure 100%	#100063.2511; Merck
Ethanol pro Analysis (2,5 l)	# 1.00983.2500; Merck
Ethidiumbromid (10 mg/ml in Wasser)	# 1.11615.0001; Merck
Formaldehydlösung mind. 37% in Wasser	# 104003.1000; Merck
Genetic Analyser buffer mit EDTA (10 x)	# 402824; Applied Biosystems
PBS, 10 x, 1 l	80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid 14,4 g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Polymermatrix POP-6™ (Performace optimized polymer-6)	# 4316357; Applied Biosystems
Proteinase K Puffer (1 ml) (1 ml Puffer für ½ Mausschwanz)	100 µl 1 M Tris HCl pH 7,5 => 100 mM 10 µl 0,5 M Na ₂ EDTA pH 8,0 => 5 mM 20 µl 10 % SDS => 0,2 % 40 µl 5 M NaCl => 200 mM 830 µl dH ₂ O Proteinase K (10 mg/ml) + 100 µl
Proteinase K, rekomb.PCR Grad (10 mg/ml)	#3115801; Roche
Sephadex™ G-50 Medium	# 17-0043-01 Amersham in TE
SSC, 20 x, 1 l	175,3 g Natriumchlorid + 88,2 g Natriumcitrat + pH 7,0 mit 1 M Natriumhydroxid einstellen ad 1 l bidest. Wasser
TAE, 50 x	242 g Tris 57,1 ml 100% Essigsäure 100 ml 0,5 M Na ₂ EDTA pH 8,0 ad 1000 ml ddH ₂ O
TE-Puffer	10 mM Tris HCl pH 7,5 1 mM Na ₂ EDTA pH 8,0

Tabelle 4: DNA-Techniken - Enzyme

AmpliTaq® geliefert mit 10 x PE-PCR-Puffer II 25 mM MgCl ₂	# N8080167; Applied Biosystems
AmpliTaq® Gold ; 6 x 250 U geliefert mit 10 x PE-PCR-Puffer II 25 mM MgCl ₂	# N8080243; Applied Biosystems
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas

Tabelle 5: DNA-Techniken - Kits

ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	# 4336917; Applied Biosystems
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (25)	#12163; Qiagen
QIAGEN® Plasmid Midi Kit (50)	#12144; Qiagen
QIAprep® 8 Turbo BioRobot Kit (48)	# 962134; Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit (50)	# 28104; Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit (250)	#28706; Qiagen

Tabelle 6: DNA-Techniken – PCR-Klonierungs-Kits, Klonierungsvektoren und kompetente Zellen

pBluescript SK(-)	# 212206; Stratagene
pCMV-SPORT2	cDNA Bibliotheken Vektor; Invitrogen
pCR®2.1-TOPO®	Invitrogen
pCR®-Blunt II – TOPO (3519 bp)	Invitrogen
pCR®II-TOPO®	Invitrogen
pGEM®-T Easy Vector System	#A1360; Promega
pT7T3D-PAC	cDNA Bibliotheken; Vektor; M.B. Soares
TOPO TA Cloning® Kit	# K4500-01
TOPO TA Cloning® Kit Dual Promotor	# K4600-01
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	#K2800-20; Invitrogen
DH5α chemisch kompetente Zellen; Genotyp F ⁻ φ80lacZM15 Δ(lacZYA- argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻	#18265-017; Invitrogen
TOP10 Zellen, chemisch kompetent; Genotyp F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φlacZΔM15 ΔlacZX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	#C4040-10; Invitrogen
XL1-Blue chemisch kompetente Zellen; Genotyp recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	#200130; Stratagene
XL1-Blue MRF' Elektroporation – kompetente Zellen; Genotyp Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)].	#200158; Stratagene

Tabelle 7: DNA-Techniken - Geräte

3100 Capillary Array 50 cm	#4315930; Applied Biosystems
ABI Prism 7000 Sequence Detector	Applied Biosystems
ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems
Bio Robot 9600	Qiagen
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer
DNA Thermal Cycler PE 9700	Perkin Elmer
Eppendorf Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf
Geldokumentationssysteme Image Master® VDS	Pharmacia Biotech.
Horizon® 11-14 Gelelektrophorese Apparatur	GibcoBRL Life Technologies
Horizon® 20-25 Gelelektrophorese Apparatur	GibcoBRL Life Technologies
Horizon® 58 Gelelektrophorese Apparatur	GibcoBRL Life Technologies
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research
PTC-225 Peltier Thermal Cycler DNA Engine Tetrad	MJ Research

2.3.1 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Die DNA wurde je nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäurefragmente auf 0,8-2%igen Agarosegelen in Elektrophoresekammern (Horizon 58, Horizon 11-14, Horizon 20-25) nach einem Standardverfahren aufgetrennt (Sambrook J et al., 1989). Als Nachweissystem wurde der Agarose Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 250 ng/ml zugesetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 x TAE als Laufpuffer bei einer Spannung von 70-100 V und einer Dauer von 30-120 min. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Geldokumentationssysteme Image Master® VDS dokumentiert.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der spezifischen *in vitro* Amplifikation von DNA (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988). Dazu wurden verschiedene temperaturstabile DNA-Polymerasen verwendet und die Reaktion in Ansätzen mit einem Gesamtvolumen von 25 µl oder 50 µl durchgeführt. Für die Amplifikation ausgehend von genomischer DNA wurden etwa 0,5-1 µg DNA, ausgehend von Plasmid DNA etwa 200 ng DNA und ausgehend von cDNA wurde jeweils 1 µl des entsprechenden cDNA-Synthese-Reaktionsmixes eingesetzt. Für das jeweils zu analysierende Gen wurde ein genspezifisches Primerpaar (je 1 µl einer 10 µM Lösung) verwendet, wobei die verwendeten Primer mit ihren Sequenzen im Anhang 10.2 aufgeführt sind. Der 10 x PCR-Puffer (2,5 oder 5 µl), die MgCl₂-Lösung (1-6 mM

Endkonzentration) sowie 1 µl einer 10 mM dNTP-Lösung und 2-5 U (units = U; Einheiten) der thermostabilen Polymerase wurden dem Reaktionsansatz zugegeben. Nach einer initialen Denaturierung, die in Abhängigkeit der Komplexität der Matrizen-DNA sowie der benötigten Zeit für die Aktivierung des verwendeten Enzyms (*Hot Start PCR* (Chou et al., 1992)) zwischen 1-15 min dauerte, wurde die Reaktion in 15-35 Zyklen durchgeführt, die sich aus folgenden Temperaturschritten zusammensetzten.

Denaturierung	94 °C	1 min
Hybridisierung	$T_m - 2$ °C	1 min
DNA Polymerisation (Synthese)	72 °C	1 min/kb

T_m ist die Temperatur, bei der 50% der Oligonukleotide spezifisch mit der komplementären Sequenz hybridisiert sind und 50% frei vorliegen. Die Schmelztemperatur (T_m -Wert) der PCR-Primer wurde näherungsweise nach folgender Formel berechnet.

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 4 \times (N_G + N_C) + 2 \times (N_A + N_T)$$

N_x ist die Anzahl der jeweiligen Nukleotide in der Sequenz des PCR-Primers. Nach Abschluss der Zyklen schloss sich ein fünfminütiger Schritt bei 72 °C an. Diese Reaktion erfolgte in den PCR-Maschinen DNA Thermal Cycler 480, PE 9700, PTC-200 oder PTC-225. Jeweils 10 µl Aliquots der PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert.

2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde je nach der gewünschten Menge des zu präparierenden Plasmids mit einem geeigneten Kit anhand der beiliegenden Beschreibungen aus transformierten Bakterienkulturen isoliert. (Bis zu 10 µg: QIAprep® 8 Turbo BioRobot Kit (48); Bis zu 100 µg: QIAGEN® Plasmid Midi Kit; bis zu 500 µg Plasmid DNA QIAGEN® Plasmid Maxi Kit).

2.3.4 Manipulation von DNA und Transformation von Bakterien

Methoden zur Manipulation von DNA (wie z.B. Restriktionen, Ligationen und Klonierungen), wie auch die chemische Transformation und die Anzucht von Bakterienzellen (XL1 blue; DH5α; TOP 10 Zellen) in Kultur (LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) oder

Kanamycin (50 µg/ml)) erfolgten nach Standardverfahren (Sambrook J et al., 1989). Für die schnelle Klonierung von PCR-Produkten wurden verschiedene Kits verwendet. PCR Produkte, die mit *Taq*-Polymerase ohne „proof reading“ (Korrekturlese)-Funktion hergestellt wurden, haben an den 3'-Enden ein einzelnes freies Deoxyadenosin (A), welche man für die TA-Klonierung nutzt. Dieses Prinzip lag den Klonierungen mit den beiden Kits, „TOPO TA Cloning“ (Invitrogen) und pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) zu Grunde. Für die Klonierung von PCR-Produkten mit glatten „Blunt“-Enden wurde das Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen) verwendet.

2.3.5 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde mit Hilfe der Kettenabbruchmethode von Sanger durchgeführt (Sanger et al., 1977). Dabei werden während der Sequenzierreaktion fluoreszenzmarkierte Dideoxynukleotide (ddNTPs) zufällig in den DNA-Strang eingebaut, was zum Abbruch der Reaktion führt. Für die Sequenzreaktion wurden der ABI PRISM®BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit verwendet. Die Sequenzanalyse erfolgte auf einem ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser. Dabei wurden für die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente parallel 16 Kapillaren (3100 Capillary Array; 50 cm) mit der Polymermatrix POP-6™ verwendet (Laufpuffer: 1 x Genetic Analyser buffer mit EDTA).

Für die Sequenzierreaktion wurden etwa 10 ng/100 bp PCR-Produkt bzw. 200 ng Plasmid-DNA eingesetzt, die Reaktion dann nach folgendem Schema pipettiert und in einem Thermocycler (PTC-225) mit dem unten aufgeführten PCR-Programm prozessiert.

DNA	x µl
10 µM Primer	0,8 µl
dH ₂ O	ad 7,5 µl
ABI PRISM®BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Ready Mix	1,5 µl
BigDye™ Terminator v1.1v3.1 5 x Sequencing buffer	<u>1,0 µl</u> 10 µl

PCR Programm:

1 min 96 °C	
20 sek 96 °C	-
10 sek 52 °C	25 x
4 min 60 °C	-
∞ 10 °C	

Zur Abtrennung der nicht eingebauten fluoreszenzmarkierten ddNTPs wurde der Reaktionsansatz über eine Sephadex G50 Matrix durch eine Zentrifugation aufgereinigt. Das Eluat wurde direkt für die Injektion in die Kapillaren eingesetzt.

2.3.6 Isolation von DNA aus Mausschwanzbiopsien

Für die Isolation der DNA aus Mausschwanzbiopsien wurde zunächst das Gewebe enzymatisch mit Proteinase K in einem entsprechenden Puffer für 1-3 h bei 55 °C unter kräftigem Schütteln (1200 Upm; Eppendorf Thermomixer compact) verdaut. Anschließend wurden durch eine Zentrifugation bei 13000 Upm und 4 °C in einer Eppendorfszentrifuge 5417 R für 1 h eventuell verbliebene Verunreinigungen abgetrennt. Die DNA wurde dann aus dem Überstand mit einer Isopropanol-Fällung (1:1 v/v Isopropanol; 30 min; 4 °C; 13000 Upm in Eppendorf-Zentrifuge 5417R) pelletiert, in 70%igem Ethanol gewaschen und die DNA in TE-Puffer gelöst.

2.3.7 PCR zur Genotypisierung des *Ndph*-Wildtyp- oder Knockout-Allels und zur Geschlechtsbestimmung (*Sry*)

Die Bestimmung des Genotyps der einzelnen Tiere erfolgte mit Hilfe einer Multiplex-PCR (Berger et al., 1996). Die Primer SL 107 und SL 108 flankieren das Exon 2 des *Ndph*-Gens und amplifizieren ein 486 bp großes PCR-Produkt auf Wildtyp-DNA. Die Primer SL 105 und SL 106 binden in der Sequenz der Neomycin-Kassette und sorgen so in Kombination mit den Primern SL 107 und SL 108 für die Amplifikation zweier kleinerer PCR-Produkte mit den Größen von 214 bp (SL 106 mit SL 108) und 271 bp (SL 105 mit SL 107) vom *Ndph*-knockout-Allel. Zur Geschlechtsbestimmung wurde eine PCR für das *Sry*-Gen, die geschlechtsdeterminierende Region auf dem Y-Chromosom, durchgeführt. Die Ansätze für die einzelnen Reaktionen sind im folgenden Schema aufgeführt:

<i>Ndph</i>		<i>Sry</i>	
10 x PE PCR-Puffer II	2,5 µl		2,5 µl
25 mM MgCl ₂	6,0 µl		3,0 µl
0,1 M DTT	1,25 µl		-----
dNTPs (4 mM)	3,0 µl		3,0 µl
SL 105 (10 µM)	0,25 µl	mSryfor (10 µM)	1,0 µl
SL 106 (10 µM)	0,25 µl	mSryrev (10 µM)	1,0 µl
SL 107 (10 µM)	0,25 µl		
SL 108 (10 µM)	0,25 µl		
dH ₂ O	10,09 µl		13,3 µl
AmpliTaq Gold (2,5 U/ µl)	<u>0,16 µl</u>		<u>0,2 µl</u>
	24 µl		24 µl

Es wurde dann jeweils 1 µl DNA aus den Mausschwanzpräparationen zugegeben und die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

<i>Ndph</i>	10 min	95 °C	} 35 x	<i>Sry</i> :	10 min	95 °C	} 35 x	
	1 min	95 °C				1 min		95 °C
	1 min	62 °C				1 min		56 °C
	1 ½ min	72 °C				1 ½ min		72 °C
	5 min	72 °C				5 min		72 °C
		4 °C				4 °C		

Anschließend wurden die jeweiligen PCR-Produkte auf einem 1,2%igen Agarosegel gelelektrophoretisch analysiert.

2.4 RNA-Techniken

Alle Arbeiten mit RNA wurden mit RNase-freien Geräten und Reagenzien durchgeführt. Glasgeräte wurden über Nacht hitzebehandelt (240°C) und Einweggeräte aus speziellen Vorräten verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, welches über Nacht mit Diethylpyrocarbonat (DEPC 0,01% (v/v)) inkubiert und anschließend zweimal autoklaviert wurde. Bei sämtlichen Arbeiten wurden Handschuhe getragen.

Tabelle 8: RNA-Techniken - Lösungen und Verbrauchsmaterialien

0,24 – 9,5 Kb RNA Ladder; 1 µg/µl (Größenstandard)	# 15620-016; Invitrogen
3MM Chr Chromatographiepapier (46 x 57 cm)	#3030917; Whatman
ABI PRISM® 96 – Well Optical Reaction Plates	# N801-0560, Applied Biosystems
ABI PRISM® Optical adhesive covers	# 4311971, Applied Biosystems
Bindungspuffer Dynabeads, 2 x	20 mM Tris pH 7,5 1 M LiCl 2 mM EDTA 0,7% SDS
BioRad AG® 501-X8 Resin (Ionenaustauscher)	# 142-6424; BioRad
Chloroform	# 102445.1000; Merck
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	# D5758; Sigma
DNase I Reaktionspuffer, 10 x	200 mM Tris-HCl (pH 8,4) 20 mM MgCl ₂ 500 mM KCl
DTT, 0,1 M	Invitrogen (mit den Enzymen geliefert)
Eppendorf UVette	#Z605050; Sigma

First Strand buffer, 5 x (Erststrangsynthesepuffer)	250 mM Tris HCl pH 8,3 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂ Invitrogen (mit den Enzymen geliefert)
Formaldehydlösung mind. 37% in Wasser	# 104003.1000; Merck
Formamid	# 109684.1000; Merck
Hexanukleotid-Primer pd(N) ₆ , 50 U, 100 ng/μl in Nuklease-freiem Wasser	# 27-2166-01; Amersham Bioscience
Hybond N+ Nylonmembran	# RPN203B; Amersham
MOPS-Puffer, 10 x	a.) MOPS: 3-[N-Morpholino]-propanesulfonicacid) 10 ml 1 M MOPS, pH 7,0 + 0,83 ml 3M Natriumacetat, pH 4,8 + 1 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 + 38,17 ml DEPC behandeltes Wasser b.) MESA – Puffer (MOPS-EDTA-Natrium Acetate Buffer) fertige Mischung von MOPS, EDTA und Natriumacetat für 1 l 10 x MOPS Puffer. #M5755; Sigma
Na ₂ EDTA, 25 mM, pH 8,0	Invitrogen (mit den Enzymen geliefert)
Natriumacetat Lösung, 3 M, pH 5,6 (1 l)	3 M Natriumacetat trihydrat (408,1 g) pH 5,6
Nuclease free water	# 9938; Ambion
Quick Hyb hybridization solution	#201220; Stratagene
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	# N2511; Promega
Roti® Phenol	# 0038.2; Roth
Roti® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	# A156.2; Roth
rRNasin RNase Inhibitor, 2500 U	# N251A; Promega
SSC (1 l), 20 x	3 M Natriumchlorid (175,32 g) 300 mM Natriumcitrat (88,23 g) pH 7,0 einstellen
TaqMan Ribosomal RNA Control Reagent	# 4308329, Applied Biosystems
TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, 200 Reaktionen	#4324018, Applied Biosystems
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM Na ₂ EDTA in DEPC-Wasser
Termination Mix, 10x	0,1 M Na ₂ EDTA 1 mg/ml Glykogen
Waschpuffer Dynabeads	10 mM Tris, pH 7,5 0,15 M LiCl 2 mM EDTA 0,3% SDS

Tabelle 9: RNA-Techniken - Enzyme

DNase I; amplifikation grade (1 U/μl)	# 18068-015; Invitrogen
SuperScript™ II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase (RT) (200 U/μl)	# 18064-014; Invitrogen
SuperScript™ III RNase H ⁻ RT (200 U/μl)	# 18080-044; Invitrogen

Tabelle 10: RNA-Techniken - Total-RNA/mRNA-Extraktions-Kits

Absolutely RNA™ Microprep Kit	# 400805; Stratagene
Dynabeads® Oligo(dT) ₂₅	# 610.02; Dynal Biotech
Micro-Fast Track™ 2.0 Kit for Isolation of mRNA from Small Samples	# K1520-02; Invitrogen
RNeasy® Midi Kit	# 75144; Qiagen
Rneasy® Mini Kit	# 74104; Qiagen

Tabelle 11: RNA-Techniken – Geräte

ABI Prism®7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
BioPhotometer	Eppendorf
Dynal MPC®-S Magnetic Particle Concentrator for Microcentrifuge Tubes	# 120.20; Dynal Biotech
Gelelektrophoresekammer	# 163027; BIOplastics BV
Polytron PT 3100	VWR International
UV Stratalinker™	Stratagene

2.4.1 RNA-Extraktion

Total-RNA wurde je nach Menge bzw. Gewicht des Mausgewebes und der zu erwartenden Ausbeute mit verschiedenen RNA-Extraktionskits (RNeasy, Qiagen oder Absolutely RNA™ Microprep Kit; Stratagene) isoliert.

Generell wurden die Gewebe in einem guanidiniumisothiocyanathaltigen Lyse-Puffer (RLT - Puffer, Kit) durch die Verwendung des Polytron PT 3100 homogenisiert und dabei die Zellen aufgeschlossen. Die Homogenate wurden im Verhältnis 1:1 mit 70% Ethanol versetzt und dann auf die RNA-Extraktionssäulen gegeben, an deren Silicagelmatrix die RNA bindet. Nach den Waschschritten wurde die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert.

Für die direkte Isolation von **mRNA** aus Gewebe wurde das Micro-Fast Track™ 2.0 Kit von Invitrogen verwendet, während für die Isolation der mRNA aus Total-RNA die Dynabeads verwendet wurden. Beide Methoden beruhen auf der Hybridisierung der PolyA-Enden der mRNA an Oligo(dT)-Oligonukleotide, die an eine immobilisierbare Trägersubstanz gekoppelt sind. Für das Micro-Fast Track™ 2.0 Kit binden die mRNA-Moleküle nach der Lyse des Gewebes an Oligo(dT)-Zellulose, die sich durch Zentrifugation präzipitieren lässt, während die Dynabeads die mRNA in einem 1 x Bindungspuffer binden und dann durch einen Magneten (Magnetic Particle concentrator) immobilisiert wurden. Nachfolgende Waschschrritte trennten verunreinigende Substanzen und die ribosomale RNA ab, so dass nach der Elution die mRNA in stark angereicherter Form in RNase-freiem Wasser bzw. Elutionspuffer (10 mM Tris, pH 7,5) vorlag. Alle RNA-Proben wurden bei - 80 °C für eine spätere Verwendung gelagert. Alternativ wurde die PolyA⁺-RNA von den Dynabeads durch

Inkubation bei 65 °C in Formamid/Formaldehyd-Ladepuffer eluiert und direkt für die denaturierende Gelelektrophorese auf einem Formaldehyd-enthaltenden Agarosegel verwendet.

2.4.2 Quantifizierung der RNA

Die RNA-Ausbeute wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde 1 µl der extrahierten RNA in RNase-freiem Wasser (1:50) verdünnt und die OD_{260nm} in einer geeigneten Küvette gemessen. Die RNA-Konzentration wurde dann nach folgender Formel bestimmt.

$$[\text{RNA}] = (\text{OD}_{260\text{nm}}) \times (0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}) \times D \quad (D = 50; \text{Verdünnungsfaktor})$$

Die Ausbeute ergab sich durch die Multiplikation der RNA-Konzentration mit dem Elutionsvolumen. Die Absorption bei 260nm (OD_{260nm}) sollte größer als 0,05 sein, um verlässliche Werte für die RNA-Konzentration zu erhalten.

Alternativ und insbesondere für Mikroarray-Experimente wurde die RNA mit Hilfe eines Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer analysiert. Diese Methode erlaubte es, die zu analysierende Menge der RNA auf ein Minimum zu reduzieren und deren Qualität und Konzentration zu bestimmen.

2.4.3 DNase I-Behandlung von Total-RNA

Die DNase I-Behandlung der RNA für eine nachfolgende reverse Transkription erfolgte in folgendem Reaktionsansatz:

12 µl (500 ng – 1 µg)	Total-RNA + RNase-freies Wasser
1,5 µl	10 x DNase I Reaktionspuffer
<u>1,5 µl</u>	DNase I (1 U/µl)
15 µl	

Dieser Ansatz wurde 15-30 min bei 25 °C inkubiert. Die Inaktivierung der DNase I erfolgte durch Zugabe von 1,5 µl einer 25 mM Na₂EDTA-Lösung pH 8,0 und eine zehnmünütige Inkubation bei 70 °C. Die RNA konnte direkt für eine cDNA-Synthese verwendet werden. Im Anschluss an die DNase I-Behandlung wurde im Bedarfsfall die RNA-Konzentration erneut durch OD_{260nm}-Messung bestimmt.

2.4.4 DNase I-Behandlung von Total-RNA (20 µg) mit anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion

20 µg Total-RNA wurden in einem 50 µl Ansatz mit 2,5 U DNase I bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Termination-Mix gestoppt und direkt die Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurden 80 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zum Ansatz gegeben und vorsichtig gevortext. Anschließend wurde 10 min bei 4 °C und 14000 Upm in einer Eppendorf-Kühlzentrifuge (5417R) zentrifugiert. Die obere Phase (55 µl) wurde zusammen mit 55 µl Chloroform vorsichtig gevortext und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Anschließend wurden 55 µl der oberen Phase mit 5 µl 2 M Natriumacetat pH 5,2 und 137,5 µl absolutem Ethanol versetzt, vorsichtig gevortext und 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die RNA 15 min bei 4 °C und 14000 Upm in einer Eppendorf-Kühlzentrifuge (5417R) gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig mit 80%igem Ethanol überschichtet und erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 23 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

2.4.5 cDNA-Synthese

Total-RNA oder PolyA⁺-RNA wurde, wie im Abschnitt RNA-Extraktion (2.4.1) beschrieben, präpariert und für die cDNA-Synthese verwendet. Für einige Experimente wurde die RNA zuvor mit DNase I behandelt, um DNA-Kontaminationen auszuschließen. 500 ng bis 1 µg Total-RNA oder 200 ng PolyA⁺-RNA wurden für die Reverse Transkription mit der SuperScript II oder III RNase H⁻ Reverse Transkriptase (RT) eingesetzt. Die Reaktion wurde in Gegenwart von Hexanukleotid-Primern (pd(N)₆) durchgeführt, nachdem die RNA zusammen mit den Primern und den dNTPs zuvor für 5 min bei 70 °C erhitzt wurde, um RNA-Sekundärstrukturen aufzubrechen.

Reaktionsansatz:

1 µg (DNase I-behandelte) Total-RNA + Nuklease-freies Wasser	24	µl
10 mM dNTPs	2	µl
pd(N) ₆ 100 ng/µl	6	µl
5 x 1 st Strand buffer	10	µl
0,1 M DTT	5	µl
rRNasin RNase Inhibitor	<u>1</u>	<u>µl</u>
	48	µl

Dieser Ansatz wurde in zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt und beide bei 42 °C für 2 Minuten inkubiert. Nur dem „+RT“-Ansatz wurde 1 µl des Enzyms (SuperScript II oder III (200 U/µl)) hinzugefügt. So wurde für jede Reaktion eine „+ RT“ und eine „- RT“-Kontrolle mit identischen Reaktionskomponenten durchgeführt. Die reverse Transkription erfolgte für 1 h bei 42 °C, der eine 15-minütige Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70 °C folgte. Um die Qualität der cDNA-Synthese zu überprüfen, wurde eine PCR (Annealing Temperatur: 59 °C; 2,5 mM MgCl₂; AmpliTaq) mit 1 µl des „+“- und „- RT“-Reaktionsmixes mit einem *Gapd* spezifischen Primerpaar (For: WB2049/*Gapd*for und Rev: WB2050/*Gapd*rev; Produktlänge: 452 bp) durchgeführt.

2.4.6 TaqMan-Real Time-PCR

Für die quantitative Expressionsanalyse mittels Real Time-RT-PCR wurde das ABI Prism 7000 Sequence Detection System verwendet. Die Detektion der Transkripte erfolgte mit den genspezifischen TaqMan MGB (minor groove binding)-Sonden für das jeweilige Gen, welche von entsprechenden genspezifischen Primern flankiert waren (Tabelle 12). Diese Sonden wurden mit Hilfe des „Assay by design“-Angebots synthetisiert (Applied Biosystems). Für die relative Quantifizierung wurde zur Normalisierung auf die cDNA-Menge eine 18S rRNA TaqMan-Sonde für jede cDNA auf jeder Reaktionsplatte neu mit in den Ansatz eingeschlossen (TaqMan Ribosomal RNA Control Reagent). Für jede Probe wurden drei Replikate der Reaktion durchgeführt und ebenfalls für jedes Gen eine Leerkontrolle (Wasser) mit einbezogen. Die Real Time-PCR erfolgte dann mit Hilfe des TaqMan Universal Master Mix in 96-well-Mikrotiterplatten (MicroAmp Optical Plates), die mit einer Klebefolie (adhesive covers) verschlossen wurden, unter folgenden Bedingungen: 2 min 50 °C; 10 min 95 °C; 45 Zyklen (15 sek 95 °C; 1 min 60 °C). Die Daten wurden mit Hilfe der ABI Prism 7000 SDS Software und einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel) analysiert. Die relative Expression der Transkripte wurde wie folgt berechnet:

Relative Expression = $2^{-[(Ct(\text{Untersuchtes Gen}) - Ct(18S\ rRNA(\text{Untersuchtes Gen})) - (Ct(\text{Kompetitor}) - Ct(18S\ rRNA(\text{Kompetitor})))]}$, wobei der Ct-Wert (Gen, Kompetitor) der Anzahl der Zyklen entspricht, bei der die Fluoreszenz des PCR-Produktes den gesetzten Schwellenwert erreichte. Der Kompetitor ist das Gen, relativ zu welchem die Expression des untersuchten Gens bestimmt wurde.

Tabelle 12: Sequenzen der MGB-TaqMan-Sonden und der flankierenden Primer, die für die Expressionsstudien verwendet wurden. Die Kombinationen von Primern und Sonden überspannen Exon-Exon-Übergänge, um die Amplifikation von DNA zu verhindern.

TaqMan Assay	TaqMan Sonde 5'– 3'	Forward Primer 5'– 3'	Reverse Primer 5'– 3'
<i>Agpt1</i>	ACCCAGGTACTAAATCA	CCGAAAAGCTGACAGATGTTGAG	CAGTTGTATTCAAGTCGGGATGTT
<i>Agpt2</i>	CAACTCCAAGAGCTC	TCAACAGCTTGCTGACCATGAT	GGTTTGCTCTTCTTACGGATAGC
<i>EfnB2</i>	TAGAACCTGGATTGGC	AGAAGTTCAACAACAAGTCCCTTTG	AATGCCCCGCGCTGTT
<i>EphB4</i>	TCCTCCCACTGGCC	CGGATCTGAAATGGGTGACTTAC	TCATCCAGGCCGCTTAGC
<i>Fzd4</i>	AGCTGCAGTTCTTC	CACGCCGCTCATCCAGTAC	ATTGGCACATAAACCGAACAAG
<i>Gh</i>	AGAGTTCGAGCGTGCC	GCTGGCTGCTGACACCTACA	CGCTGTCCCTCGGGAAT
<i>Igf1b</i>	AGAAGTCCCCGTCCCT	CCACACTGACATGCCCAAGAC	AGCTTCGTTTTCTGTTTGTGCGAT
<i>Igf2</i>	CTTCCGGACGACTTC	CCGAGAGGGACGTGTCTACCT	CCAGGTGTCATATTGGAAGAAGCTTG
<i>Itgav</i>	TGGCAAGGTCAGTCA	CGGTGGTCTGGTAGCTTTTAT	TCTGCCACTTGGTCCGAAA
<i>Itgb3</i>	CCCATGGCCGGAAC	TCCTGCGTCCGCTACAAAAG	ACGCAGTCCCCACAGTTACATT
<i>Ndph</i>	CAAAGATGGTGCTCCTG	TCGATTCTATCAGTCACCCACTGTA	GCAGTGCCCCCTCACATCTG
<i>Pdgfb</i>	CCCCATCTTCATCTAC	CGCTGCTGCACAGAGACT	TGCTCGGGTCATGTTCAAGTC
<i>PdgfRb</i>	CTCCAGGTGTCATCCA	ACAGGGAAGTGGACTCCGATACT	CACGGCATTACAGAGACGTT
<i>Tie1</i>	ACCTGCCTCACCATC	TGGTCTGGCTGTGGTAGGT	CGGATACACACCAAGGCTAAAAG
<i>Tie2</i>	ACAATGGGAAGGCTC	CACGAGGTCAAGAAGTGTATGTGAA	AGTGATTGATTGCCATCCAA
<i>Vegfr1</i>	CCTCCCCTCTGCACTT	AAGCAGGCCAGACTCTTTTCTC	CGTGGGCAGAGACCATGAGT
<i>Vegfr2</i>	CCATGCGCTCTAGGAT	TGCCTGGTCAAACAGCTCATC	TCCAGATTCCGGTGATCATG
<i>Vegfa</i>	CCCATGAAGTGATCAAG	CACGACAGAAGGAGAGCAGAAGT	TTCGCTGGTAGACATCCATGAA

2.4.7 Nicht radioaktive RNA-*in situ* Hybridisierung (DIG) auf Gewebeschnitten

Tabelle 13: RNA-*in situ* Hybridisierung – Lösungen und Verbrauchsmaterialien

Acetylierungslösung; frisch	125 µl Essigsäureanhydrid 746 µl Triethanolamin ad 50 ml mit DEPC H ₂ O
AG 501-X8 Resin (Ionenaustauscher)	#142-6424; BioRad
Anti DIG AP Fab fragments, 150 U	# 1093274; Roche
Blockierungslösung (DIG-Nachweis)	1 x Blocking solution in Puffer 1 10% Normal Sheep serum
Blocking reagent, 50 g	# 1096176; Roche
Blocking solution, 10 x	Das Blocking reagent wurde in Maleinsäure-puffer mit einer Endkonzentration von 10% (w/v) durch Erhitzen und Schütteln in Lösung gebracht, autoklaviert und in Aliquots bei - 20°C gelagert.
BM Purple, 100 ml (Farbsubstrat für die alkalische Phosphatase)	#1442074; Roche
Denhardts 50 x	#D2532; Sigma
Detektionspuffer	100 mM TrisHCl pH 9,5 100 mM NaCl ad 800 ml ddH ₂ O pH 9,5 einstellen mit HCl ad 1 l autoklavieren
Dextransulfat 50 g	#D8906; Sigma
DIG labelled control RNA 50 µl	#1585746; Roche

DIG RNA labelling Mix	# 1277073; Roche
DNase I, RNase free 10 U/ μ l 10000 U	# 776785; Roche
DTT 25 g (1 M Stammlösung)	#V3155; Promega
Essigsäureanhydrid	# 1.00042.1000; Merck
Faramount Mounting Medium Aqueous	#S3025; Dako
Formamid, deionisiert	#109684.1000; Merck; behandelt mit Ionenaustauscher AG 501-X8 Resin; BioRad
Glykogen MB grade 20 mg/ml	# 901393; Roche
HSD (Hering Sperma DNA) (20 mg/ml)	#223646; Roche
Levamisole, 1 M (Tetranisole hydrochloride (mammalian AP inhibitor) 5g	#T1512; Sigma
LiCl, 4 M, 50 ml	#105679.0250; Merck 8,478 g Lithiumchlorid in 50 ml DEPC - H ₂ O
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5 mit NaOH einstellen
Na ₂ EDTA, 0,5 M, pH 8,0	#1.08418.1000; Merck
Normal Sheep serum	S3772; Sigma
NTE-Puffer, 1 l	500 mM NaCl (100 ml 5 M NaCl) 10 mM Tris pH 8,0 (10 ml 1 M Tris pH 8,0) 1 mM Na ₂ EDTA pH 8,0 (2 ml 0,5 M Na ₂ EDTA pH 8,0)
Paraformaldehyd	# 1.04005.1000; Merck
PBS, 10 x in DEPC-H ₂ O, 1 l	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ 800 ml DEPC H ₂ O pH 7,4 mit HCl ad 1 l; autoklavieren
PFA, 4% in 1 x PBS, 1l	40 g Paraformaldehyd 100 ml PBS (10x; in DEPC H ₂ O angesetzt) ad 800 ml DEPC-Wasser pH 7,5 mit NaOH ad 1 l (50 ml Aliquots bei - 20°C lagern.)
Proteinase K 500 mg	# 1000144; Roche
Proteinase K-Lösung	0,2 M Tris HCl pH 7,5 (10 ml 1M Tris HCl pH7,5) 2 mM CaCl ₂ (50 μ l 2 M CaCl ₂) variierende Menge Proteinase K + 20 - 90 μ g/ ml Prot. K
Puffer 1 (DIG-Nachweis)	100 mM TrisHCl pH 7,5 150 mM NaCl

RNA- <i>in situ</i> Hybridisierungs-Mix	50% deionisiertes Formamid 4 x SSC 10 % Dextransulfat 1 x Denhardts 0,5 µg/µl total Yeast RNA 10 mM DTT (Kann bei - 20°C gelagert werden)
RNA Yeast 100 g (10mg/ml)	#109223; Roche
RNase A 100 mg (10 mg/ml)	#109169; Roche
RNase Inhibitor 10000 U	#799025; Roche
SSC, 20 x in DEPC-H ₂ O	3 M Natriumchlorid (175,32 g) 300 mM Natriumcitrat (88,23 g) 800 ml DEPC H ₂ O pH 7,0 mit NaOH einstellen ad 1 l autoklavieren
TE-Puffer pH 8,0	10 mM Tris HCl pH 8,0 1 mM Na ₂ EDTA pH 8,0
Transkriptionspuffer, 10 x	Wird mit den RNA-Polymerasen geliefert.
Triethanolamin	#1.08379.0250; Merck
Xylol	#1.08681.1000; Merck

Tabelle 14: RNA-*in situ* Hybridisierung – Enzyme

SP6 RNAPolymerase 1000 U	# 810274; Roche
T3 RNA Polymerase 1000 U	# 1031163; Roche
T7 RNA Polymerase 1000 U	# 881767; Roche

Die Technik der RNA-*in situ* Hybridisierung ermöglicht die spezifische Detektion einer mRNA in morphologisch intakten Gewebeschnitten, wodurch diese in Zellschichten bzw. sogar in Zellen spezifisch lokalisiert werden kann. Der Nachweis beruht auf einem Reporter-Molekül, welches direkt an die zu detektierende mRNA bindet, und dann unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden kann. In dieser Arbeit wurde das nicht radioaktive DIG-Markierungssystem mit dem DIG-RNA labelling-Mix von Roche verwendet (Eisel, 1996). Digoxigenin ist ein Steroid, welches aus den Pflanzen *Digitalis purpurea* und *Digitalis lanata* gewonnen wird und das durch spezifische F(ab)₂-Antikörperfragmente nachgewiesen werden kann. Die sense und die antisense RNA-Sonden wurden durch *in vitro* Transkription von einer linearisierten Plasmid-DNA hergestellt. Geeignete Vektoren (z.B. TOPO pCRII) enthalten flankierend zu ihrer Klonierungsstelle Promotoren für RNA-Polymerasen (T3-, T7- und SP6-RNA-Polymerase). Je nach Orientierung des Insert-Fragments entsteht eine RNA-Sonde in sense oder antisense Orientierung. Nach der Hybridisierung dieser RNA-Sonden auf die Gewebeschnitte und dem Abbau ungebundener Sondenmoleküle durch RNase A wurden die gebundenen DIG-RNA-Sonden durch die F(ab)₂-Antikörperfragmente nachgewiesen. Diese waren mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, die das chromogene Substrat BM purple

in einen farbigen, präzipitierenden Niederschlag umwandelte, der unter dem Mikroskop sichtbar war.

2.4.7.1 Präparation der DNA-Sonde

Die Linearisierung von 20 µg der jeweiligen Plasmid-DNA erfolgte in einem 100 µl Reaktionsansatz für 90 min durch ein geeignetes Restriktionsenzym im Überschuss (100 U). Für die anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion wurde der Restriktionsansatz nach Abschluss des Verdauens mit DEPC-behandeltem Wasser auf 400 µl aufgefüllt und dann nacheinander jeweils im Verhältnis 1:1 mit RotiPhenol, mit RotiPhenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform extrahiert. Der Überstand wurde dann mit einem 2,5fachen Volumen (1 ml) Ethanol und 10% 3 M Natriumacetat (150 µl einer 3 M Natriumacetat pH 5,6-Lösung) versetzt und die DNA für 20 min bei 15300 x g und 4 °C gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 200 µl 70%igen Ethanol gewaschen, bevor es in 20 µl DEPC-behandeltem oder Nuklease-freiem Wasser resuspendiert wurde. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde mit Hilfe einer DNA-Agarosegelelektrophorese bestimmt.

2.4.7.2 DIG-Markierung der RNA-Sonden durch RNA-*in vitro* Transkription

Es wurden zwei getrennte *in vitro* Transkriptionen, eine für die sense und eine für die antisense RNA-Sonde, durchgeführt. 1 µg des entsprechenden aufgereinigten und linearisierten Plasmids aus der DNA-Sondenpräparation wurde in einem 20 µl Ansatz zusammen mit der entsprechenden RNA-Polymerase (SP6, T3 oder T7), DIG-modifizierten Ribonukleotiden (1 x DIG RNA labelling Mix) und dem RNase Inhibitor (2U/µl) in 1 x Transkriptionspuffer für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das DNA-Template durch eine 15minütige DNase I-Behandlung (+1 µl RNase freie DNase I (10 U/µl)) bei 37 °C entfernt und die Reaktion mit 2 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt. Die *in vitro* Transkriptionsansätze wurden auf 100 µl mit DEPC-behandeltem Wasser aufgefüllt und die RNA mit Ethanol (+ 250 µl Ethanol) und Lithiumchlorid (+ 10 µl 4 M LiCl) in Gegenwart von Glykogen (+ 1 µl 20 mg/ml Glykogen) als Trägersubstanz gefällt. Die Fällung erfolgte für mindestens 30 min bei - 70 °C mit anschließender Zentrifugation (15300 x g) bei 4 °C für 1 h. Das RNA-Pellet wurde einmal in 80%igen Ethanol gewaschen und anschließend in 100 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die DIG-markierten RNA-Sonden wurden bei - 70 °C gelagert. Die Qualität und die Ausbeute der *in vitro* Transkription wurde durch die Analyse eines Aliquots auf einem Agarosegel kontrolliert, während die DIG-Markierung durch einen „Spot-Test“ mit einer RNA-Verdünnungsreihe im Vergleich zu einer DIG-

markierten Kontroll-RNA überprüft wurde ((Eisel, 1996); „Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual“ 2nd Edition).

2.4.7.3 Vorbehandlung der Paraffinschnitte für die RNA-*in situ* Hybridisierung

Bevor die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte (7 µm) für die RNA-*in situ* Hybridisierung verwendet werden konnten, musste das Paraffin entfernt und das Gewebe zugänglich für die RNA-Sonden und die Antikörper-Fragmente, die die RNA-Sonden nachweisen sollten, gemacht werden. Dazu wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten zweimal für 10 min in Xylol inkubiert, das das Paraffin löste. Anschließend wurden die Gewebe durch eine je dreiminütige Inkubation mit 100%igem; 95%igem, 90%igem und 70%igem Ethanol hydratisiert. Um die Gewebestruktur und die RNA in den nachfolgenden Schritten zu schützen, wurde das Gewebe 5 min mit 4% Paraformaldehyd in 1 x PBS vorfixiert. Nach fünfminütigem Waschen in 1 x PBS wurden die Proteine durch eine zehnminütige Behandlung der Schnitte mit 0,2 M Salzsäure (HCl) und zweimaliger Behandlung mit 2 x SSC für 10 min denaturiert. Die Permeabilisierung des Gewebeverbandes wurde durch Proteinase K-Behandlung erreicht. Dabei wurden in Abhängigkeit vom Gewebe und des nachzuweisenden Transkripts die Proteinase K-Konzentration (20-90 µg/ml) und die Inkubationszeit (10 min–30 min) variiert. Anschließend wurde das Gewebe erneut für 5 min in 4% PFA in PBS fixiert und für 5 min in 1 x PBS gewaschen. Um den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren, wurden die Schnitte mit der frisch angesetzten Acetylierungslösung behandelt und anschließend für zweimal 5 min in 2 x SSC gewaschen. Die Schnitte wurden drei Minuten mit 70% Ethanol behandelt und dann die Objektträger bis zur Verwendung bei - 20 °C gelagert.

2.4.7.4 RNA-*in situ* Hybridisierung

Für jede DIG-markierte RNA-Sonde wurden 4 Objektträger mit Gewebeschnitten (7 µm) verwendet, wobei ein Objektträger das eigentliche Experiment darstellte. Dieser wurde mit der antisense RNA-Sonde inkubiert, die mit der mRNA, die in sense Orientierung in den Zellen vorliegt, hybridisierte. Die drei anderen Objektträger stellten Kontrollen da, die überprüfen sollten, ob die RNA (Sense RNA-Sonde) oder die Anti-DIG F(ab)₂-Antikörperfragmente (Kontrolle ohne RNA-Sonde) unspezifisch an das Gewebe gebunden wurden, oder ob es in dem untersuchten Gewebe eine intrinsische Aktivität von alkalischen Phosphatasen (Kontrolle ohne Antikörper) gab. Für jede Hybridisierung wurden die entsprechenden Objektträger durch eine zehnminütige Inkubation in 4 x SSC rehydriert.

Parallel dazu wurde der Hybridisierungsmix mit denaturierter Hering Sperma-DNA (10 min bei 95 °C; Endkonzentration 1 mg/ml) versetzt und die entsprechenden RNA-Sonden (100 ng/100 µl Hybridisierungsmix) für die verschiedenen Objektträger vorbereitet. Anschließend wurden jeweils 100 µl des jeweiligen Hybridisierungsmixes mit der RNA-Sonde auf einen Objektträger gegeben und die Gewebe mit Parafilm bedeckt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht für mindestens 16 h in einer feuchten Kammer (Papier getränkt mit 4 x SSC; 50% Formamid) bei 42 °C in einem Ofen.

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger unter stringenten Bedingungen gewaschen. Dazu wurde zuerst der Parafilm in 2 x SSC abgelöst. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Objektträger mit den verschiedenen Sonden in diesem Schritt getrennt behandelt wurden. Anschließend wurden die Objektträger schrittweise viermal für 5 min bei Raumtemperatur, zweimal für 15 min bei 37 °C in 2 x SSC und zweimal für 15 min in 1 x SSC gewaschen. Durch einen anschließenden RNase A-Verdau für 30 min mit 20 µg/ml RNase A in 1 x NTE-Puffer und zwei anschließenden 30-minütigen Waschschritten in 0,1 x SSC wurde nicht gebundene und zelluläre einzelsträngige RNA abgebaut.

2.4.7.5 Immunologischer Nachweis von Digoxigenin

Für den immunologischen Nachweis des in die RNA-Sonden eingebauten Digoxigenins wurden die Objektträger zuerst in Puffer 1 für 5 min äquilibriert. Anschließend wurden die einzelnen Objektträger in einer feuchten Kammer mit je 300 µl Blockierungslösung (inklusive 10% normales Schafsserum) überschichtet und 30 min stehen gelassen. Nach dem Abgießen der Blockierungslösung wurden die Schnitte für 2 h bei Raumtemperatur mit einer 1:500 Verdünnung der Anti-DIG F(ab)₂-Antikörperfragmente in 1 x Blockierlösung (inklusive 10% normales Schafsserum) bedeckt und anschließend zweimal 10 min in Puffer 1 gewaschen. Die folgende zehnmünütige Inkubation der Schnitte in Puffer 2, dem Detektionspuffer, sorgte für die Aktivierung der Alkalischen Phosphatase, die an die F(ab)₂-Fragmente gebunden ist. Als Substrat für die Alkalische Phosphatase wurde die unverdünnte BM purple-Lösung verwendet, die zusätzlich 1 mM Levamisole, einen Inhibitor der Säuger-alkalischen Phosphatasen, enthielt. Von dieser Farbsubstratlösung wurden je 200 µl auf einen Objektträger pipettiert und diese dann für 2–48 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgreicher Farbentwicklung wurde die Reaktion durch fünfminütiges Waschen in TE pH 8,0 gestoppt und die Präparate mit wässrigem Montier-Medium (Faramount Mounting Medium Aqueous; DAKO) eingebettet. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Zeiss Axioplan 2 Mikroskops und der digitalen Kamera AxioCam HRc.

2.4.8 Genexpressionsstudien mit Northern Blots oder *virtuellen* Northern Blots

2.4.8.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA wurde ein denaturierendes Agarosegel verwendet, welches Formaldehyd enthielt (Sambrook J et al., 1989). Die RNA (~ 3 µg mRNA oder 20–25 µg Total-RNA) wurde in einem Volumen von 11 µl aufgenommen. Als Marker wurde die 0,24-9,5 Kb-RNA-Leiter (6 µg) verwendet.

Zu RNA- und Marker-Probe (in je 11µl) wurden jeweils 5 µl 10 x MOPS-Puffer, 25 µl deionisiertes Formamid und 9 µl Formaldehyd zugesetzt und diese Mischung für 10 Minuten bei 65-70 °C denaturiert. Nach Zusetzen des entsprechenden Volumens 5 x Probenpuffer und von 3 µl Ethidiumbromid zum Marker wurden die Proben auf das 1%ige Agarosegel (1g Agarose in 100 ml (72 ml DEPC Wasser, 10 ml 10 x MOPS-Puffer, 18 ml 37% Formaldehyd) aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte für 4 h 30 min bis 5 h bei 50-100 V in 1 x MOPS-Puffer in einer vorher mit 10% SDS- und DEPC-behandeltem Wasser gewaschenen Elektrophoresekammer (BIOplastics BV). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 3 x 7 min in DEPC-behandeltem Wasser geschwenkt, um das Formaldehyd zu entfernen.

2.4.8.2 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (*Northern Blot*)

Das Gel wurde zusammen mit einem Lineal unter UV-Licht dokumentiert, so dass eine Zuordnung der Marker-Banden zu den realen Laufstrecken im Gel später möglich war. Das Gel mit der RNA wurde für 10 Minuten in 10 x SSC (Transferpuffer) äquilibriert und die Taschen abgeschnitten. Anschließend wurde es auf ein feuchtes, dickes Whatmanpapier gelegt, welches mit einem Pufferreservoir (500 ml 10 x SSC-Transferpuffers) verbunden war. Die Nylonmembran (Hybond N+) wurde in exakt der Größe des Geles zugeschnitten und so markiert, dass ihre Orientierung eindeutig nachzuvollziehen war. Das Gel wurde mit der in 2 x SSC angefeuchteten Membran und mit zwei angefeuchteten Whatmanpapieren luftblasenfrei bedeckt. Darauf wurden drei weitere Whatmanpapiere und eine ausreichende Zahl an Zellstofftüchern gelegt, die oben von einem Gewicht beschwert wurden (Sambrook J et al., 1989). Der Transfer erfolgt durch Kapillarkräfte von unten nach oben über Nacht. Anschließend wurde die RNA mit UV-Licht (2 x Autocross link Programm (2 x 1200 µJoule x 100; UV Stratalinker™, Stratagene) mit der Membran quervernetzt und dann schließlich für

2 h bei 80 °C inkubiert. Die Membran war nun für die Hybridisierung mit einer markierten Sonde vorbereitet.

2.4.8.3 Transfer von SMART-cDNA auf Nylonmembranen (*Virtueller Northern Blot*)

Tabelle 15: *Virtueller Northern Blot* – Lösungen und Marker

1 kb DNA ladder	# 15615-016; Invitrogen
3MM Chromatographiepapier (46 x 57 cm)	#3030917; Whatman
Denaturierungs-Lösung, 1l	0,5 M NaOH 20 g 1,5 M NaCl 87,7 g
Neutralisierungslösung, 300 ml	50 mM PO ₄ ³⁺ 30 ml 0,5 M Stammlösung 270 ml ddH ₂ O
Roti®-Nylon plus Transfermembran	# K058.1; Roth

Ein *virtueller* Northern Blot ersetzte dann den Northern Blot, wenn die Ausgangsmengen an Total-RNA oder mRNA limitiert waren. Zur Herstellung eines *virtuellen* Northern Blots wurden 15 µl der SMART-PCR-cDNA (2.5.1.1) gelelektrophoretisch aufgetrennt bis die 1018 bp große Bande des DNA-Größenstandards (1 kb DNA ladder) eine Laufstrecke von 7 cm zurückgelegt hatte. Dieses Gel wurde zusammen mit einem Lineal als Längenreferenz dokumentiert, so dass man die Laufstrecken der Markerbanden später auf die Nylonmembran übertragen konnte. Die Markerbahnen wurden abgeschnitten, das Gel ausgemessen und anschließend 2 x 30 min in Denaturierungslösung geschüttelt. Die auf die Größe des Geles zugeschnittene NylonPlus Membran wurde 5 min in Wasser und 5 min in Denaturierungslösung gelegt. Das Gel wurde mit der Unterseite nach oben auf eine mit Frischhaltefolie bezogene Glasplatte gelegt und dann mit der angefeuchteten Membran und drei Lagen ebenfalls angefeuchtetem und zugeschnittenem 3 MM Whatman Chromatographiepapier bedeckt. Obenauf kam eine ausreichende Menge an saugfähigem Zellstoff, bevor der Blotaufbau mit einer Glasplatte und einem etwa 250 g schwerem Gewicht abgeschlossen wurde. Der Transfer der cDNA aufgrund der Kapillarkräfte erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Beendigung des Transfers wurde die Position der Taschen mit einem weichen Bleistift auf der Nylonmembran markiert und diese 2-3 min in Neutralisierungslösung gewaschen. Die Nylonmembran wurde noch im feuchten Zustand mit UV-Licht (1200 J; UV Stratalinker™, Stratagene) bestrahlt und somit die cDNA kovalent an die Membran gebunden. Nachdem die Membran bei Raumtemperatur getrocknet war, war sie bereit für die Hybridisierung mit einer markierten Sonde.

2.4.9 Herstellen radioaktiv markierter DNA-Sonden und Hybridisierung von Nukleinsäureblots

2.4.9.1 „Random priming“: Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde

Tabelle 16: Radioaktive Markierung von DNA-Sonden – Lösungen und Verbrauchsmaterialien

$\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 250 μCi / 25 μl	#AA0085-250 μCi ; Amersham
BSA (50 mg/ml) (1:5 verdünnt) (Bovine serum albumine)	#15561-020; GibcoBRL Life Technologies
DNA Polymerase I, <i>E.coli</i> (cloned) Klenow Fragment ; 1500 U; 5 U / μl	# E2141Z; Amersham
Mouse Cot-1 DNA (1 mg/ml)	#18440-016; Gibco BRL Life Technologies
Oligo Labelling Buffer, 5 x (5 x OLB)	Je 0,1 mM dATP;dGTP;dTTP ; Li-Salze 1 M HEPES pH 6,6 0,425 mM 5'-pd(N) ₆ Natriumsalz 0,025 MgCl ₂ 0,25 M Tris/HCl 0,36% (v/v) β -Mercaptoethanol
Sephadex™ G-50 Medium	# 17-0043-01 Amersham in TES
Stopplösung	Dextranblau (# 31393 ;Biochemica) Phenolrot (# 77650 ; Fluka) In TES
TES-Puffer	5 mM Na ₂ EDTA pH 8,0 10 mM Tris HCl pH 7,5 0,2% SDS

Die Herstellung radioaktiv markierter Sonden erfolgte mit Hilfe des „*random prime labellings*“ (Feinberg and Vogelstein, 1983). Dazu wurden etwa 20 ng der entsprechenden DNA in Wasser 10 min bei 95 °C denaturiert und dann direkt auf Eis abgekühlt. Hinzugefügt wurden nun 5 μl 5 x OLB, 1 μl BSA, 2 μl $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (= 20 μCi) und 1 μl (= 5 U) Klenow Enzym, woraufhin der ganze 25 μl Ansatz 1–2 h bei 37 °C inkubiert wurde. Um die Reaktion zu stoppen, wurde der Reaktionsansatz mit 100 μl Stopplösung versetzt und die radioaktiv markierte Sonde durch eine Gelfiltration mit einer Sephadex G-50 Säule (2.4.9.2) von den nicht eingebauten Nukleotiden getrennt. Die Aktivität der gesammelten Sonden-Fraktion (300–400 μl) wurde auf 20 cm Entfernung mit einem MFG004 Mini-Monitor 900EP15 (Uehlinger Pfiffner AG, Schöftland, Deutschland) gemessen und dann direkt für die Hybridisierung eingesetzt.

Bei der Hybridisierung von Sonden mit repetitiven Sequenzen wurde die radioaktiv markierte Sonde präassoziert. Das diente zum Blockieren repetitiver Elemente in der Sonde und ermöglichte so ein spezifischeres Signal nach der Hybridisierung. Bei der Verwendung von Maus-Sonden wurden diesen etwa 200 μg Maus-Cot-1-DNA zugesetzt und sie dann in 2 ml

Hybridisierungslösung 90 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz dann für die Hybridisierung verwendet.

2.4.9.2 Gelfiltration (Sephadex G-50)

In eine Pasteurpipette aus Glas (ca. 150 mm, Brand GmbH) wurde eine kleine Glasperle in den Anfang der Spitze gegeben, um anschließend das Gelbett gießen zu können. Die Säule wurde mit Sephadex G-50 gepackt, indem zuerst 500 µl der Suspension in die Pasteurpipette gegeben und solange gewartet wurde, bis sich ein großer Teil davon auf der Glasperle abgesetzt hatte. Daraufhin wurde der Rest der Säule mit Sephadex G-50 unter Fluss gepackt. Anschließend wurde diese Mini-Säule mit 2-3 ml TES gespült, oben mit Parafilm verschlossen und für mindestens 20 min stehen gelassen. Dies erlaubte es dem Gelbett sich vollständig abzusetzen. Der Puffer wurde dann bis zum oberen Gelbettrand abgelassen, um beim Probenauftragen ein Aufschwemmen der Sepharose G-50 zu minimieren.

Diese Säule diente der Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide von den radioaktiv markierten Nukleinsäuren. Die Probe wurde aufgetragen und erst in das Gelbett einlaufen gelassen, bevor man die Säule nach und nach mit TES-Puffer eluierte. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Gelmatrix nicht trocken lief. Die Lauffront der großen Moleküle wurde durch den Farbstoff Dextranblau, der sich im Stopppuffer befand, kenntlich gemacht. Die Fraktionen wurden anhand des empirisch ermittelten Laufverhaltens der Sonden im Vergleich zur Dextranblau-Front in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen.

2.4.9.3 Prähybridisierung und Hybridisierung von Nukleinsäure Blots

Tabelle 17: Hybridisierungs- und Waschlösungen für Nukleinsäureblots

BioMax MS Scientific imaging film	Kodak
GeneScreen-Hybridisierungslösung	0,5 M Na ₃ PO ₄ 7% SDS 1 mM Na ₂ EDTA 0,1% HSD (10mg/ml)
Heringsperma DNA 1g; HSD (10 mg/ml)	#223646; Roche Diagnostics; Lösen in Millipore Wasser 10 mg/ml; autoklavieren
QuickHyb® Hybridization Solution (Prähybridisierung und Hybridisierung von Northern Blots)	# 201220; Stratagene
Super RX (Fuji Medical X-Ray Film)	Fuji
Waschlösung I	40 mM Na ₃ PO ₄ 1% SDS
Waschlösung II	2 x SSC 0,1% SDS

Die Prähybridisierung und die Hybridisierung erfolgten je nach Größe der Blots in Glasröhrchen oder in 50 ml Falcon-Gefäßen. Dabei war immer zu beachten, dass die Membran luftblasenfrei von den Lösungen benetzt wurde. Die Prähybridisierung der virtuellen Northern Blots erfolgte mit der GeneScreen-Hybridisierungslösung 90 min bei 65 °C mit einem Volumen von etwa 1 ml pro Bahn der Membran. Für die folgende Hybridisierung wurde die GeneScreen-Hybridisierungslösung ausgetauscht und frisch radioaktiv markierte und bei 95 °C für 10 min denaturierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierung der Sonde erfolgte über Nacht bei 65 °C.

Für Northern Blots wurde hingegen für die Prähybridisierung und die Hybridisierung die QuickHyb® Hybridization Solution verwendet. Die Prähybridisierung erfolgte für 15-20 min bei 65 °C. Für die Hybridisierung von Northern Blots wurde die Prähybridisierungslösung nicht ausgetauscht, sondern die radioaktiv markierte Sonde zusammen mit denaturierter Hering-Sperma-DNA (10 min; 95 °C, Endkonzentration: 0,1%) zugegeben. Die Hybridisierung dauerte 90 bis 120 Minuten.

2.4.9.4 Waschen der Nukleinsäure Blots

Die Membranen wurden 3-4 x für ca. 15 min in der entsprechenden Waschlösung gewaschen. Am Ende jeden Waschschrilles wurde die Radioaktivität der Waschlösung überprüft. Sie sollte in etwa der Hintergrundstrahlung entsprechen. War dies nicht der Fall, mussten weiter Waschschrilles durchgeführt werden. Für die virtuellen Northern Blots wurde Waschlösung I und für die Northern Blots Waschlösung II verwendet.

2.4.9.5 Autoradiographie

Die Wahl des Röntgenfilmes (BioMax oder SuperRX) und die Dauer der Exposition des Filmes mit der Nylonmembran bei - 80 °C hing von der Sondenaktivität und der Häufigkeit der nachzuweisenden Nukleinsäuren auf der Membran ab. Die Autoradiographien dienen dem Nachweis und der Dokumentation der Signale.

2.5 Herstellen einer SMART-cDNA-Subtraktionsbank

Tabelle 18: cDNA-Subtraktion – Lösungen und Verbrauchsmaterialien

96er U-Bodenmikrotiterplatten für Glycerolkulturen	# 9291.1; Roth
Chroma Spin - 1000 Chromatographiesäule	#K1334; Clontech
EDTA/Glykogen Mix, 20 x	0,2 M Na ₂ EDTA 1 mg/ml Glykogen
Gene Pulser/Micro Pulser Cuvettes 0,1cm (50)	#165-2089; BioRad
Glycerol, 87%	# 3104094.2500; Merck
Hybridisierungs-Mix, 4 x (PCR-Selected™ cDNA Subtraction Kit)	# K1804-1; Clontech
IPTG, 100 mM Isopropylthio-β-D-galactosid (1g)	# I5502; Sigma
LB/amp Platten (Ø9cm); (22 cm x 22 cm)	1 % Pepton oder Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl pH 7,5 mit 1 M NaOH einstellen. 1,5% Agar autoklavieren; auf 55 °C abkühlen 50 µg/ml Ampicillin
LB-Medium	1 % Pepton/oder Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl pH 7,5 mit 1 M NaOH einstellen.
MF VSWP 0,025 µm	#VSWP 01300; Millipore
SOC-Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ + 20 mM Glukose
TNE, 1 x	10 mM Tris HCl pH 8,0 10 mM NaCl 1 mM Na ₂ EDTA
Verdünnungspuffer (PCR-Selected™ cDNA Subtraction Kit)	20 mM HEPES HCl pH 8,3 50 mM NaCl 0,2 mM Na ₂ EDTA pH 8,0
X-Gal, 20 mg/ml (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galctosid) in Dimethylformamid (DMF) (100 mg)	#V3941; Promega

Tabelle 19: cDNA - Subtraktion - Enzyme

Advantage® II Polymerase Mix, 100 rxn	#8430-1; BD Clontech
Restriktionsendonuklease <i>Rsa</i> I (1000U) (10 U/µl)	#R0167S; New England BioLabs (NEB)
SuperScript™ II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase (200 U/µl)	# 18064-014; Invitrogen

Tabelle 20: cDNA - Subtraktion – Kits

Advantage® cDNA PCR Kit	# K1905-1,-y; Clontech
Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	# K1804-1; Clontech
NucleoSpinExtract® 2-1	#PT3180-2; BD Clontech (Machery & Nagel)
pGEM®-T Easy Vektor	#A1380; Promega
SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	# K1052-1; Clontech

Tabelle 21: cDNA -Subtraktion - Geräte

Micro™Pulser Electroporator	# 165-2100; BioRad
Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer

Die SMART-cDNA-Subtraktion dient dazu, zwei mRNA-Populationen miteinander zu vergleichen und differentiell exprimierte Gene zu identifizieren. Mit Hilfe dieser Technik werden cDNA-Fragmente von Genen kloniert, die in der “Tester”(Experimentellen)-mRNA-Population vorhanden sind, nicht aber in der “Driver”(Referenz)-mRNA-Population auftreten oder dort nur stark reduziert vorkommen.

Die Methode beruht auf einer subtraktiven Hybridisierung von cDNA-Fragmenten in Kombination mit einer „Suppression PCR“ („suppression subtractive hybridization“, SSH). Dabei wird der Suppressionseffekt der PCR durch zwei lange, invertierte Repeats („long terminal inverted repeats“) in den Adapter-Oligonukleotiden an den Enden der cDNA-Fragmente vermittelt. Treten zwei identische, invertierte Adaptersequenzen innerhalb eines einzelsträngigen cDNA-Fragmentes auf, hybridisieren sie intramolekular stabil miteinander und können so während der PCR nicht durch Primer gebunden und amplifiziert werden. Dadurch werden diese cDNA-Fragmente aus der jeweiligen cDNA-Population eliminiert. Insgesamt umfasst die SSH sechs aufeinander folgende, experimentelle Schritte (I – VI, Abbildung 9).

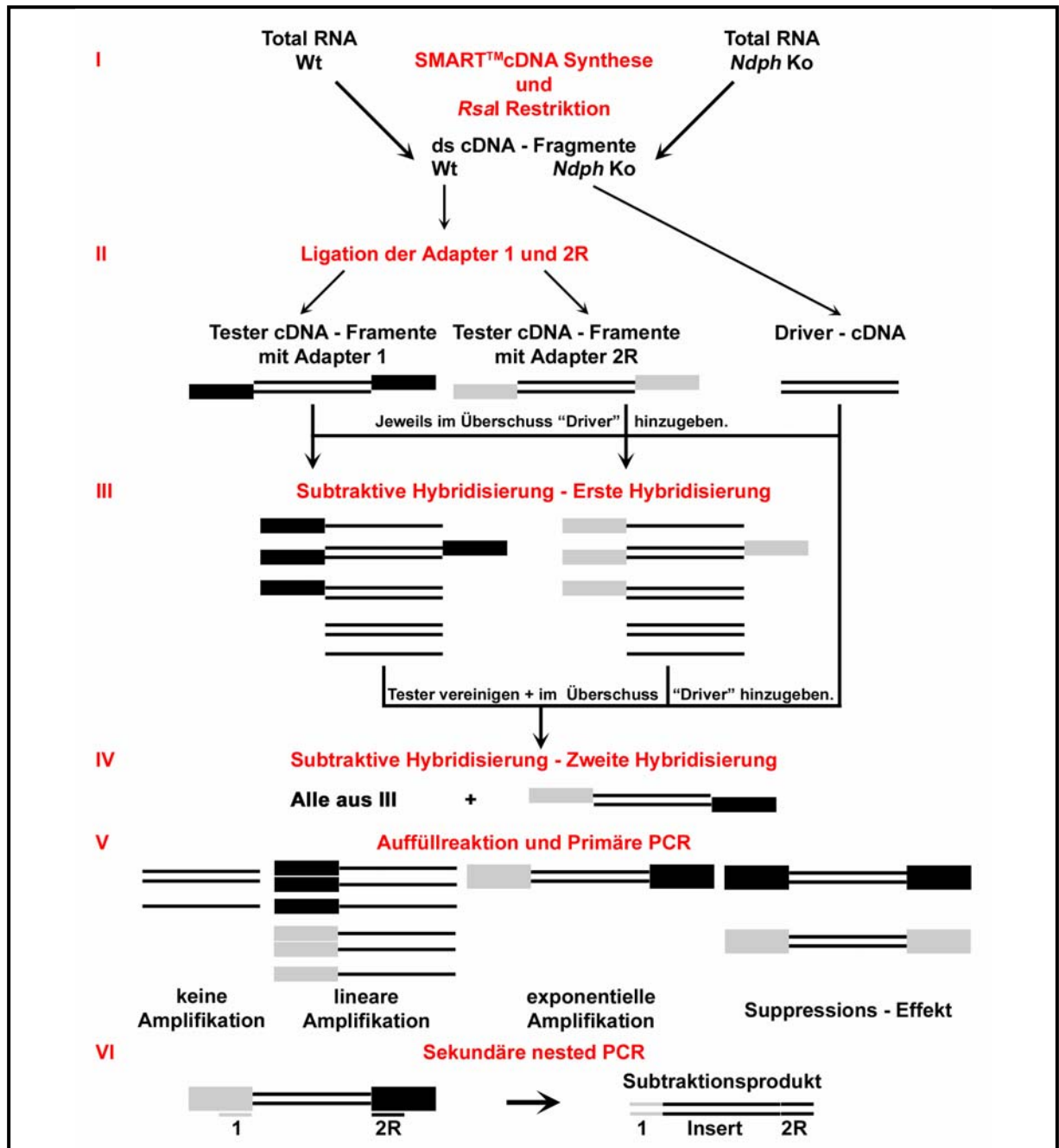


Abbildung 9: Übersichtsschema für die PCR-basierte SMART-cDNA-Subtraktion ("suppression subtractive hybridization"). Das Protokoll umfasst sechs verschiedene experimentelle Schritte. **I:** Für beide, die „Tester“ und die „Driver“ mRNA, wird doppelsträngige cDNA hergestellt und diese mit *RsaI* verdaut, um cDNA-Fragmente optimaler Größe für die Hybridisierung zu erzeugen. **II:** Zwei verschiedene Tester werden durch die Ligation der Adapter 1 und 2R hergestellt und mit einem Überschuss an Driver gemischt. **III:** Diese Mischung wird in der „Ersten Hybridisierung“ prozessiert. Dabei entstehen verschiedene Kombinationen an Homo- und Hetero-Hybriden, wobei die einzelsträngigen cDNA-Fragmente der differentiell exprimierten Gene normalisiert und angereichert werden. **IV:** Die beiden Reaktionen aus der Ersten Hybridisierung werden vereinigt und erneut mit Driver im Überschuss versetzt. Dabei entsteht, zusätzlich zu den Kombinationen aus III, doppelsträngige cDNA-Fragmente mit beiden Adaptern 1 und 2R. **V:** Die durch die Auffüllreaktion erhaltenen Templates für die „Suppression PCR“ sind hier dargestellt und werden aufgrund ihrer Adapter-Ausstattung in der primären PCR unterschiedlich amplifiziert. Dabei wird für differentiell exprimierte Gene angereichert. **VI:** Durch eine sekundäre nested PCR wird weiter angereichert und das SMART-cDNA-Subtraktionsprodukt erhalten. Dargestellt ist hier nur die „Forward“-Orientierung der cDNA-Subtraktion.

Zunächst wurde aus der Tester- und der Driver-RNA-Population mit Hilfe der SMART-cDNA-Synthese doppelsträngige cDNA hergestellt (2.5.1 und 2.5.1.1) und mit einer *RsaI*-Restriktion cDNA-Fragmente optimaler Größe für die Hybridisierung erzeugt (2.5.2). Im darauf folgenden Schritt wurden die Driver-cDNA- genauso wie die Tester-cDNA-Populationen für die subtraktive Hybridisierung vorbereitet. Dabei wurden zunächst die *RsaI*-verdauten cDNA-Fragmente gereinigt und aufkonzentriert und so der Driver hergestellt (2.5.3). Ebenfalls ausgehend von den aufgereinigten, *RsaI*-verdauten cDNA-Fragmenten wurden dann durch eine Ligation mit zwei verschiedenen Adaptermolekülen (1 und 2R) zwei Tester-Populationen erzeugt (2.5.4). Für die subtraktive Hybridisierung (2.5.5) wurden beide Tester-Populationen mit einem Überschuss an Driver versetzt und denaturiert, so dass in diesem ersten Hybridisierungsschritt (2.5.5.1) die Einzelstrangmoleküle in allen möglichen Kombinationen hybridisieren können (III, Abbildung 9). Dabei bleiben zunächst die Moleküle einzelsträngig, die alleine im Tester vorhanden sind, da alle anderen cDNA-Fragmente, die sowohl im Tester als auch im Driver vorkommen, doppelsträngige Hetero-Hybride (zwischen Tester und Driver) bilden. So kommt es zu einer Anreicherung der differentiell exprimierten Gene. Unter den verbliebenen Tester-cDNA-Molekülen kommt es zusätzlich zu einer Bildung von Homo-Hybriden (zwischen Tester und Tester). Dabei ist zu beachten, dass die Kinetik dieses Hybridisierungsschrittes dazu führt, dass die häufigen Testermoleküle sehr schnell miteinander hybridisieren, während die seltenen Testermoleküle ihren Hybridisierungspartner nicht finden und so einzelsträngig bleiben. Dadurch kommt es zu einer Normalisierung der Tester-cDNA, da sich die Konzentrationen der häufigen und seltenen cDNA-Fragmente angleichen, so dass die Repräsentanz aller Gene in der späteren Subtraktionsbank etwa vergleichbar sein sollte.

In dem direkt anschließenden zweiten Hybridisierungsschritt (2.5.5.2) werden die beiden Hybridisierungsansätze, „Tester mit Adapter 1“ und „Tester mit Adapter 2R“ vereinigt und neu denaturierter Driver hinzugefügt. In diesem Schritt stehen nur die einzelsträngigen Moleküle aus dem ersten Hybridisierungsschritt und die denaturierten neuen Driver-Moleküle für die Hybridisierung zur Verfügung. Neben den aus der ersten Hybridisierung noch vorhanden Kombinationen an Molekülen können jetzt nur entsprechende Homo-Hybride aber auch ein neues Hybridmolekül gebildet werden. Diese besteht aus den differentiell exprimierten cDNA-Fragmenten mit verschiedenen Adaptoren an beiden Seiten und wird in diesem Schritt angereichert (IV, Abbildung 9).

Nach der zweiten Hybridisierung wird der Ansatz als Template für die „Suppression PCR“ (2.5.6) verwendet. Dabei werden die Enden der doppelsträngigen Hybridmoleküle (Homo-

Hybride und Hetero-Hybride der Tester und die Hybride der Tester mit dem Driver) *in situ* aufgefüllt, so dass verschiedene Templates mit unterschiedlichen Adapterkombinationen an ihren Enden entstehen. Nur diese enthalten Bindungsstellen für den PCR-Primer 1, der für die primäre PCR (2.5.6.1) verwendet wird. Unter diesen Molekülen werden aber nur die einzelsträngigen Tester-Moleküle der in der zweiten Hybridisierung neu entstandenen cDNA-Hybride (Hetero-Hybride der Tester) exponentiell amplifiziert, da sie auf ihren beiden Seiten die unterschiedlichen Adapter 1 und 2R tragen und so nicht dem Suppressionseffekt unterliegen. Dieser eliminiert in dieser PCR alle cDNA-Fragmente mit den gleichen Adaptern an beiden Enden, d.h. die jeweiligen Homo-Hybride der Tester. Zuletzt werden auch die Hybride zwischen Tester und Driver eliminiert, da diese in dieser PCR nur linear amplifiziert werden können, weil sie nur auf einer Seite einen der Adapter tragen.

In einer sekundären „nested PCR“ (2.5.6.2) wurden dann die schon in der primären PCR angereicherten, differentiellen cDNA-Fragmente weiter bevorzugt amplifiziert und so der Hintergrund reduziert. Das Ergebnis dieser PCR ist das finale SMART-cDNA-Subtraktionsprodukt, welches die cDNA-Fragmente der Gene enthält, die im Tester exprimiert sind und nicht, oder nur in sehr geringem Ausmaß im Driver.

Dieses Subtraktionsprodukt wurde anschließend kloniert, in Bakterien transformiert und dann eine SMART-cDNA-Subtraktionsbank aus vereinzelt Bakterienklonen angelegt (2.5.7).

In dieser Arbeit sollte diese Technik zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene im Auge von Wildtyp und der *Ndph*-knockout-Mäusen des Stadiums p21 (postnataler Tag 21) verwendet werden. Dabei wurden beide Orientierungen, einmal die Forward-Orientierung mit Wildtyp = Tester und *Ndph*-Knockout = Driver sowie die Reverse-Orientierung mit *Ndph*-Knockout = Tester und Wildtyp = Driver durchgeführt. Zusätzlich wurde das komplette Protokoll mit im SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit enthaltener humaner Plazenta-Total-RNA als Kontrolle durchgeführt. Vor der ersten Hybridisierung wurde dem daraus resultierenden „Kontroll-Tester“ *Hae*III-verdaute ϕ X174DNA (aus dem Clontech PCR Select™ cDNA Subtraction Kit) zugefügt. Nach den beiden Hybridisierungsschritten und der primären sowie sekundären PCR sollte hauptsächlich nur diese DNA auf einem Kontrollgel zu sehen sein, da der gesamte Tester von dem Driver derselben Ursprungspopulation gebunden werden sollte und so bei erfolgreicher Subtraktion kein SMART-cDNA-Subtraktionsprodukt in dieser Kontrolle entstehen sollte.

2.5.1 Erststrang-SMART-cDNA-Synthese (Smart PCR cDNA Synthesis Kit)

Die SMART-cDNA wurde jeweils ausgehend von 1 µg Total-RNA hergestellt. Dabei wurden die zu vergleichenden Wildtyp- und Knockout-Proben gleichzeitig hergestellt, um die experimentelle Variabilität zu minimieren. Die SMART-cDNA-Synthese wurde anhand des folgenden Pipettierschemas in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Tabelle 22: SMART-cDNA- Erststrang-Synthese A

	Wildtyp-Probe	Knockout-Probe
Total-RNA (1 µg)	x µl	x µl
cDNA Synthesis (CDS) Primer (10 µM)	1 µl	1 µl
SMART II Oligonukleotid (10 µM)	1 µl	1 µl
Deionisiertes Wasser	ad 5 µl	ad 5 µl
	5 µl	5 µl

Dieser Ansatz wurde vorsichtig gevortext, kurz zentrifugiert und dann 2 Minuten bei 70 °C in einer PCR-Maschine (PE 480 DNA Thermal Cycler) inkubiert. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

Tabelle 23: SMART-cDNA-Erststrang-Synthese B

	Wildtyp-Probe	Knockout-Probe
5 x First Strand Buffer	2 µl	2 µl
DTT (20 mM)	1 µl	1 µl
50 x dNTPs (je 10 mM)	1 µl	1 µl
SuperScript II RT (200 U / µl)	1 µl	1 µl
	10 µl	10 µl
Mineralöl	1 Tropfen	1 Tropfen

Dieser Reaktionsansatz wurde kurz gemischt und 1 h bei 42 °C im PE 480 DNA Thermal Cycler inkubiert. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Ansätze mit 40 µl TE pH 7,5 versetzt und die Reverse Transkriptase 7 min bei 72 °C (PE 480 DNA Thermal Cycler) inaktiviert. Die Ansätze wurden dann bei - 20 °C gelagert.

2.5.1.1 SMART-PCR-cDNA-Synthese

Die SMART-PCR-cDNA-Synthese wurde als „Hot Start PCR“ durchgeführt. Sie diente nicht nur dazu, den zweiten Strang für die in der Einzelstrang-Synthese in cDNA umgeschriebene RNA zu synthetisieren, sondern auch zur Amplifikation dieser doppelsträngigen cDNA. Es

handelt sich bei dieser PCR um eine „long distance PCR“. Diese ermöglicht aufgrund ihrer langen Elongationszeiten auch die Synthese sehr langer PCR-Produkte. Auch hier wurden immer die zu vergleichenden Proben gleichzeitig für die Synthese eingesetzt. Für die jeweils zu verwendende Reaktionsanzahl wurden Master Mixe pipettiert. In der folgenden Tabelle ist der einfache Reaktionsansatz wiedergegeben:

Tabelle 24: SMART-PCR-cDNA-Synthese

PCR-Reaktionsmix	1 x Ansatz
Erststrang cDNA (Template)	1 μ l
ddH ₂ O	83 μ l
Advantage 2 PCR Puffer	10 μ l
dNTPs (10 mM)	2 μ l
PCR-Primer (10 μ M)	2 μ l
50 x Advantage PCR Polymerase Mix	2 μ l
Gesamtvolumen	100 μ l

Die Reaktionsansätze wurden gemischt und dann jeweils 100 μ l in einzelne 0,5 μ l Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Für jede SMART-cDNA-Synthese wurde ein zusätzliches Reaktionsgefäß als Test-Reaktion vorbereitet, das dazu diente, die optimale Zyklenzahl für die Amplifikation der SMART-cDNA zu bestimmen. Alle Reaktionsansätze wurden mit je 2 Tropfen Mineralöl überschichtet und die Reaktion in dem auf 95 °C vortemperierten Thermoblock mit folgenden PCR-Bedingungen gestartet.

Denaturierung	1 Minute	95 °C	} 13 Zyklen
Denaturierung	15 Sekunden	95 °C	
„Annealing“	30 Sekunden	65 °C	
Elongationsphase	6 Minuten	68 °C	

Nach 13 Zyklen wurden alle Reaktionsgefäße bis auf die Test-Reaktionsgefäße aus der PCR-Maschine genommen und bei 4 °C gelagert. Aus den Test-Reaktionsgefäßen wurde ein 15 μ l Aliquot entnommen und das dann jeweils nach 3 weiteren Zyklen wiederholt, so dass man am Ende der Reaktion Aliquots der Amplifikationen nach 13, 16, 19 und 22 PCR-Zyklen erhielt. Diese wurden in einem 1,2%igen Agarosegel analysiert und die optimale Zyklenzahl bestimmt. Ziel dabei war es, die PCR in der exponentiellen Phase zu stoppen, um möglichst viel spezifisches Produkt zu erhalten. Unspezifische Produkte können nach einigen Zyklen nach Erreichen der Plateauphase der PCR im hochmolekularen Bereich entstehen. Das Plateau der PCR ist dann erreicht, wenn die Ausbeute an PCR-Produkt nicht mehr zunimmt.

Die optimale Zyklenzahl wurde dann auf einen Zyklus vor dem Erreichen der Plateauphase festgelegt. Zur zusätzlichen Kontrolle wurde dieses Gel geblottet (*Virtueller Northern Blot*; 2.4.8.3) und dann die Membran mit einer radioaktiv markierten Sonde (2.4.9) aus der cDNA-Sequenz der cAMP-abhängigen, regulatorischen Proteinkinase Typ I alpha (Prkar1a) hybridisiert, welche ein gleiches Expressionsniveau in Wildtyp- und in *Ndph*-knockout-Augen aufweist, um die gleichmäßige Synthese der SMART-cDNA bei der gewählten Zyklenzahl für die verschiedenen Proben zu verifizieren. Nach der Bestimmung der optimalen Zyklenzahl wurden die bei 4 °C gelagerten Reaktionsgefäße einer entsprechenden Anzahl zusätzlicher Zyklen unterzogen und die Reaktion durch die Zugabe von 2 µl 0,5 M Na₂EDTA abgestoppt. Die Proben wurden dann bis zur Weiterverwendung bei - 20 °C gelagert.

2.5.2 *RsaI*-Restriktion der SMART-cDNAs

Für die *RsaI*-Restriktion der SMART-cDNAs wurden zunächst anhand von Hybridisierungsergebnissen die geeigneten SMART-cDNAs vereinigt. Dabei wurde für die beiden zu untersuchenden SMART-cDNAs (Wildtyp und *Ndph*-Knockout) und für die Kontroll-SMART-cDNA (humane Plazenta) je ein Pool hergestellt. Bevor die SMART-cDNA aber für die Reaktion zur Verfügung stand, musste sie durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt werden. Dazu wurden je 200 µl Wildtyp- und *Ndph*-knockout- und 100 µl Kontroll-SMART-cDNA aus den Pools entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und gevortext. Anschließend wurden die Ansätze bei 15300 x g für 10 min in einer Eppendorfzentrifuge 5417R zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und dann der wässrigen Phase ein 3,5faches Volumen an n-Butanol zugesetzt und gevortext. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 15300 x g in einer Eppendorfzentrifuge 5417R konnte die obere (!) n-Butanolphase möglichst vollständig abgenommen und verworfen werden. Das Volumen der wässrigen Phase sollte jetzt etwa auf ein Drittel des Ausgangsvolumens reduziert worden sein.

Diese Proben wurden dann auf die mit 1 x TNE-Puffer äquilibrierten ChromaSpin 1000 Säulen aufgetragen und einlaufen gelassen, bevor sie mittels 1 x TNE-Puffer in drei Fraktionen (150 µl; 320 µl; 75 µl) von der Säule eluiert wurden. Diese Gelfiltration diente der Aufreinigung der Proben und der Abtrennung von nicht eingebauten Nukleotiden. Je ein 10 µl Aliquot einer jeden Fraktion wurde auf einem Agarosegel analysiert und dann die Eluate vereinigt, die SMART-cDNA enthielten.

Ein weiteres 10 µl Aliquot wurde für einen späteren Vergleich mit den Produkten des folgenden Verdau mit dem Restriktionsenzym *RsaI* aufbewahrt. Für diese Restriktion wurden jeweils die kompletten Ansätze eingesetzt und mit 20 U *RsaI* in einem Gesamtvolumen von 420 µl 1 x NEB Puffer 1 für 3 h bei 37 °C verdaut. Nach 2-3 h wurden den Restriktionsansätzen je 10 µl Aliquots entnommen und zusammen mit den Aliquots von vor der Reaktion auf einem Agarosegel überprüft, ob die Restriktion komplett verlaufen war. Man sollte eine deutliche Verschiebung der Größenverteilung der cDNA-Fragmente vor (0,5-10 kb) und nach (0,1–2 kb) dem Verdau erkennen. Nach dem vollständigen Verdau wurde die Reaktion durch Zugabe von je 9,5 µl 0,5 M Na₂EDTA abgestoppt und bei -20 °C gelagert oder direkt für die folgenden Schritte verwendet.

2.5.3 Herstellung des Drivers

Bei den Restriktionsprodukten handelt es sich im Prinzip schon um die als Driver verwendeten Moleküle. Sie mussten nur aufgereinigt und aufkonzentriert werden. Daher wurden die Restriktionsansätze mit dem Nuclear Spin Extract® 2-1 System aufgereinigt, wobei das Protokoll für die direkte Aufreinigung von PCR-Produkten verwendet wurde. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Säule jeweils für 1 min bei 15300 x g in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Die Reaktionsansätze wurden mit TE-Puffer pH 8,0 auf 1 ml aufgefüllt und dann mit 4 ml Puffer NT2 (Bindungspuffer) gemischt. Diese 5 ml wurden nach und nach auf eine Säule (15 µg Bindungskapazität) geladen. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 750 µl Waschpuffer NT3 gewaschen und einmal leer zentrifugiert, um sie von Ethanolresten zu befreien. Die Elution erfolgte in zwei Elutionsschritten mit jeweils 50 µl NE-Puffer, die dann vereinigt wurden. Für eine spätere Analyse wurden je 3 µl des Eluats abgenommen. Der SMART-cDNA in den 100 µl Eluaten wurde dann mit Ethanol (+ 50 µl 4M Ammoniumacetat; + 525 µl Ethanol) gefällt. Das Pellet wurde mit 80%igem Ethanol gewaschen, der Überstand vollständig entfernt und das Pellet 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Es wurde in 6,7 µl 1 x TNE Puffer resuspendiert. 1,2 µl dieser resuspendierten cDNA wurden mit 11 µl 1 x TNE gemischt und dann 10 µl dieser Mischung für eine OD_{260nm} DNA-Konzentrationsbestimmung und 2,2 µl für eine Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Aus den verbleibenden 5,5 µl *RsaI*-verdauten-SMART-cDNA-Fragmenten wurden 4,5 µl mit 1 x TNE auf eine DNA-Konzentration von 300 ng/µl verdünnt und als „Driver-SMART-cDNAs“ bei -20 °C gelagert.

Für die Herstellung des Testers wurde je 1 µl der verbliebenen, aufgereinigten *RsaI*-verdauten SMART-cDNA-Fragmente mit 5 µl Wasser versetzt und diese Verdünnung als Ausgangspunkt für die Herstellung der Tester verwendet.

2.5.4 Herstellen der Tester

Für jede cDNA-Population wurden je zwei Tester durch die Ligation von zwei verschiedenen „Adapteroligonukleotiden“ (1 und 2R) an die cDNA-Fragmente hergestellt.

Adapter 1: 5'-ctaatacgcactcactatagggctcgagcggcggccggcagggt-3'

PCR – Primer 1 nested PCR – Primer 1

Adapter 2R: 5'-ctaatacgcactcactatagggcagcgtggtcgcgccgagggt-3'

PCR – Primer 1 nested PCR – Primer 2R

Diese zwei Adaptersequenzen enthielten spezifische Bindungsstellen für Primer, mit denen nach der subtraktiven Hybridisierung die *RsaI*-Fragmente der Tester spezifisch amplifiziert werden können. Um später die subtraktive Hybridisierung kontrollieren zu können, wurde hier schon der humanen Plazenta-SMART-cDNA *HaeIII*-verdaute φX 174-DNA zugesetzt.

Der eigentliche Reaktionsmix für die Ligation der Adapter wurde für alle Ligationen zusammen angesetzt und bestand pro Reaktion aus 3 µl sterilem Wasser; 2 µl 5 x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl), die in dem cDNA-Subtraktions-Kit enthalten waren. Die neun Ligationen wurden nach folgendem Schema angesetzt:

Tabelle 25: cDNA-Subtraktionsbank – Adapterligation T: Tester ; wt : Wildtyp; ko : Knockout; K1: Kontrolle 1

Ligationsansätze	T (wt) 1-1	T (wt) 1-2	T (ko) 2-1	T (ko) 2-2	T (K1) 3-1	T (K1) 3-2
Verdünnte <i>RsaI</i> -SMART-cDNA - Fragmente	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Adapter 1 (10µM)	2 µl	-	2 µl	-	2 µl	-
Adapter 2R (10µM)	-	2 µl	-	2 µl	-	2 µl
Reaktionsmix	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Aliquots entnehmen	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
	Vereinigen		Vereinigen		Vereinigen	
	4 µl		4 µl		4 µl	
Ligationsansätze	T (wt) 1C		T (ko) 2C		T (K1) 3C	

Alle neun Reaktionsansätze [T(wt) 1-1, T(wt) 1-2, T(ko) 2-1, T(ko) 2-2, T(K1) 3-1, T(K1) 3-2, T(wt) 1C, T(ko) 2C und T(K1) 3C] wurden 16 h bei 16 °C inkubiert und anschließend die Ligation durch je 1 µl des 10 x Termination Mix und das fünfminütige Erhitzen auf 72 °C gestoppt. Von den drei Ligationsansätzen T(wt)1C; T(ko)2C und T(K1)3C wurde je 1 µl abgenommen und mit 1 ml sterilem Wasser gemischt. Diese Verdünnungen wurden für eine spätere Verwendung bei - 20 °C aufbewahrt. Auch aus den anderen sechs Ligationsansätzen (T(wt)1-1; T(wt)1-2; T(ko)2-1; T(ko)2-2; T(K1)3-1; T(ko)3-2) wurde 1 µl entnommen und mit 200 µl sterilem Wasser versetzt. Diese Verdünnung diente als Template für die PCR, mit der die Ligation der Adapter an die *RsaI*-verdaute SMART-cDNA überprüft werden sollte. Es wurden je vier einzelne PCR-Kontrollen für die 2 Adapterligationen pro cDNA-Population nach folgendem Schema angesetzt:

Tabelle 26: cDNA-Subtraktionsbank - Kontroll-PCR Adapterligation

	1	2	3	4
Tester 1-1, 2-1 oder 3-1	1 µl	1 µl	-	-
Tester 1-2, 2-2 oder 3-2	-	-	1 µl	1 µl
G3PDH 3' Primer (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
G3PDH 5' Primer (10 µM)	-	1 µl	-	1 µl
PCR-Primer 1	1 µl	-	1 µl	-
Reaktionsmix	22 µl	22 µl	22 µl	22 µl
Gesamtvolumen	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

Der Reaktionsmix bestand pro Reaktion aus 18 µl sterilem Wasser, 2,5 µl 10 x PCR-Reaktionspuffer, 0,5 µl 10 mM dNTP-Mix und 0,5 µl 50 x Advantage cDNA Polymerase Mix und wurde gemeinsam für alle Reaktionen angesetzt.

Die PCR-Reaktion wurde für 20 Zyklen (94 °C 30 sek; 65 °C 30 sek; 68 °C 2,5 min) in einem PE DNA Thermal Cycler 480 durchgeführt und dann 5 µl des PCR-Ansatzes auf einem 2%igen Agarosegel analysiert. Waren die Produkte schwach, wurde die PCR um je 5 Zyklen verlängert, bis die Produkte gut zu erkennen waren. Dabei war es wichtig zu überprüfen, ob die PCR-Produkte mit den genspezifischen Primern in etwa eine gleiche Intensität aufwiesen wie die PCR-Produkte, die mit einem genspezifischen und einem Adapterprimer (PCR-Primer1) entstanden. Damit wurde sichergestellt, dass die Adapterligation vollständig abgelaufen war. Bei erfolgreicher Adapterligation war die Herstellung der Tester und der Kontrollen T(wt)1C, T(ko) 2C und T(K1) 3C abgeschlossen. Dabei gab es für alle drei cDNA-Populationen zwei Tester mit je einem unterschiedlichen Adapter (Adapter 1 und

Adapter 2R) und zusätzlich je eine Kontrolle „C“, die nach der subtraktiven Hybridisierung als nicht subtrahierte Tester-Kontrolle dienen.

2.5.5 Subtraktive Hybridisierung

2.5.5.1 Erste Hybridisierung

Die erste Hybridisierung wurde für jeden Tester (T(wt)1-1, T(wt)1-2, T(ko)2-1, T(ko)2-2, T(K1) 3-1, T(K1) 3-2) und für die Kontrollen T(wt) 1C, T(ko) 2C und T(K1) 3C) nach folgendem Schema angesetzt:

Tabelle 27: cDNA-Subtraktion - Erste Hybridisierung x = Probe 1 (wt), 2 (ko) oder 3 (K1)

	Hybridisierungsprobe x-1	Hybridisierungsprobe x-2
<i>RsaI</i> verdaute „Driver- SMART- cDNA“	1,5 µl	1,5 µl
Adapter-1- ligierter „Tester“ (x-1)	1,5 µl	-
Adapter-2R- ligierter „Tester“ (x-2)	-	1,5 µl
4 x Hybridisierungspuffer	1,0 µl	1,0 µl
Gesamtvolumen	4,0 µl	4,0 µl

Dabei wurden folgende Kombinationen von Testern mit den Drivern verwendet.

Tabelle 28: cDNA Subtraktion – Tester- und Driver-Kombinationen – Erste Hybridisierung

Hybridisierung	Tester	Driver
1	T(wt)1-1	<i>RsaI</i> -SMART-cDNA (ko)
2	T(wt)1-2	<i>RsaI</i> -SMART-cDNA (ko)
3	T(ko)2-1	<i>RsaI</i> -SMART-cDNA (wt)
4	T(ko)2-2	<i>RsaI</i> -SMART-cDNA (wt)
5	T(K1)3-1	<i>RsaI</i> -humane Plazenta SMART-cDNA/ <i>HaeIII</i> -verdauete ϕ X174-DNA
6	T(K1)3-2	<i>RsaI</i> -humane Plazenta SMART-cDNA/ <i>HaeIII</i> -verdauete ϕ X174-DNA

Die Hybridisierungsansätze wurden bei 98 °C für 90 sek im PE DNA Thermal Cycler 480 denaturiert und dann für 8 h bei 68 °C inkubiert. An diese erste Hybridisierung schloss sich sofort die zweite Hybridisierung an.

2.5.5.2 Zweite Hybridisierung

Als Vorbereitung für diesen Hybridisierungsschritt wurde zunächst 1 µl der entsprechenden *RsaI*-verdauten Driver mit 1 µl 4 x Hybridisierungspuffer und 2 µl sterilem Wasser gemischt. 1 µl dieser Mischung wurde dann zusammen mit einem Tropfen Mineralöl in einer PCR-Maschine denaturiert. Um zu erreichen, dass die beiden Hybridisierungsproben 1 und 2 sich gleichzeitig und nur in Gegenwart des frisch denaturierten Drivers mischten, wurde eine Pipette auf 15 µl eingestellt und die Hybridisierungsprobe 2 aufgezogen. Im selben Pipettierschritt wurde dann ein wenig Luft in die Pipettenspitze gezogen und der frisch denaturierte Driver ebenfalls aufgezogen. Die Luft zwischen den Proben verhinderte, dass sich der Driver und der Tester schon in der Pipettenspitze mischten. Beide Proben wurden zusammen in die Hybridisierungsprobe 1 pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren der ganze Ansatz gut gemischt. Die zweite Hybridisierung erfolgte dann bei 68 °C über Nacht. Diese Hybridisierung wurde durch die Zugabe von 200 µl Verdünnungspuffer und der Inkubation des durch Pipettieren gemischten Ansatzes bei 68 °C für 7 min beendet. Die Ansätze wurden dann bei - 20 °C gelagert.

2.5.6 „Suppression PCR“-Amplifikation der differentiellen Tester cDNA-Fragmente

2.5.6.1 Primäre PCR

Die in der zweiten Hybridisierung erhaltenen Proben wurden für die „Suppression PCR“ eingesetzt. Je 1 µl der folgenden Proben diente als Template für die primäre PCR:

„Forward“-Subtraktion:

1-1: Tester: Wildtyp, Driver: *Ndph*-Knockout

1-C: nicht subtrahierte Tester Kontrolle 1 C (Verdünnung 1:1000)

„Reverse” - Subtraktion:

2-1: Tester: *Ndph*-Knockout, Driver: Wildtyp

2-C: nicht subtrahierte Tester Kontrolle 2 C (Verdünnung 1:1000)

Experimentelle Kontroll-Subtraktion:

3-1: Tester: humane PlazentaK1 + *HaeIII*-verdauete ϕ X 174DNA, Driver: humane PlazentaK1

3-C: nicht subtrahierte Tester Kontrolle 3 C (Verdünnung 1:1000)

Zusätzlich wurde 1 µl der im Kit enthaltenen Subtraktions-Kontrolle für eine Reaktion verwendet. Eine weitere Reaktion ohne Template diente als Leerkontrolle für die PCR. Der Reaktionsmix wurde für alle Reaktionen gemeinsam angesetzt und bestand pro Ansatz aus 19,5 µl sterilem Wasser, 2,5 µl 10 x PCR-Reaktionspuffer, 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), 1,0 µl des PCR-Primers 1 (10 µM) und 0,5 µl des 50 x Advantage cDNA Polymerase Mixes.

Jede dieser 25 µl PCR-Ansätze wurde für 5 min bei 75 °C inkubiert und so die einzelsträngigen Enden aufgefüllt und die Bindungsstellen für die Primer generiert. Direkt an diese Auffüllreaktion schlossen sich 27 PCR-Zyklen mit dem folgenden Temperaturprofil an:

94°C 30 sek
66°C 30 sek
72°C 90 sek

Nach Abschluss dieser primären PCR wurden aus jedem Ansatz 8 µl für eine Agarosegelelektrophorese auf einem 2%igen Gel entnommen und je 3 µl in sterilem ddH₂O verdünnt.

2.5.6.2 Sekundäre PCR

Je 1 µl der verdünnten Ansätze aus der primären PCR diente als Template für die sekundäre „nested PCR“, welche eine weitere Anreicherung der differentiell exprimierten Sequenzen und eine Reduktion des Hintergrundes bewirkte. Der Reaktionsmix für eine Reaktion bestand in diesem Fall aus 18,5 µl sterilem Wasser, 2,5 µl 10 x PCR-Reaktionspuffer, 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), 1,0 µl des „nested PCR“-Primers 1 (10 µM), 1 µl des „nested PCR“-Primers 2R (10µM) und 0,5 µl des 50 x Advantage cDNA Polymerase Mixes. Diese zweite „nested PCR“ wurde für 10 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

94°C 30 sek
68°C 30 sek
72°C 90 sek

Auch hier wurden den „nested PCR“-Ansätzen je 8 µl Aliquots für eine Gelelektrophorese auf einem 2%igen Agarosegel entnommen, die dann im Vergleich zu denen aus der ersten PCR analysiert wurden. Das Ergebnis der sekundären PCR ist das SMART-cDNA-Subtraktionsprodukt. Davon wurden in dieser Arbeit drei verschiedene hergestellt:

„Forward“-Subtraktionsprodukt : Tester: Wildtyp, Driver: *Ndph*-Knockout

„Reverse“-Subtraktionsprodukt : Tester: *Ndph*-Knockout, Driver: Wildtyp und

Experimentelle Kontroll-Subtraktionsprodukt: Tester: humane PlazentaK1 + *HaeIII*-verdaute φX174-DNA, Driver: humane PlazentaK1

2.5.7 Herstellen der Forward- und der Reverse-SMART-cDNA- Subtraktionsbanken

Diese Subtraktionsprodukte wurden in den T/A-Klonierungsvektor pGEM[®]TEasy von Promega kloniert. Dafür wurden drei Ligationsansätze wie folgt angesetzt:

Tabelle 29: Ligation der Subtraktionsprodukte in pGemT Easy:

	Forward-Subtraktion	Reverse-Subtraktion	Kontroll-Subtraktion
Steriles ddH ₂ O	-	-	3 µl
„Nested PCR“-Produkt	3 µl	3 µl	-
2 x Rapid Ligationspuffer	5 µl	5 µl	5 µl
Vektor pGemT Easy	1 µl	1 µl	1 µl
T4 DNA Ligase (3 U/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl	10 µl	10 µl

Die Ligation wurde für 24 h bei 4 °C durchgeführt und die Ligationsansätze dann bei - 20 °C bis zur Transformation gelagert. Für die Transformation wurden die Ligationsansätze auf Eis aufgetaut und 1:1 mit sterilem ddH₂O verdünnt. Anschließend wurden sie durch eine Mikro dialyse in einer Petrischale mit ddH₂O auf einem MF-Millipore Filter VSWP 0,025 µm für 20 min entsalzt. Die Ansätze wurden jeweils in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 5 µl Chloroform versetzt, gevortext und für 3 min bei 15300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und je 2 µl für die Transformation mittels Elektroporation mit 40 µl elektrokompetenten Zellen des *E.coli* Stamms XL1-Blue MRF' gemischt. Die Elektroporation erfolgte in BioRad GenePulser/*E.coli* (0,1 cm) Küvetten bei 1,7kV und 25 µF mit Zeitkonstanten τ unter 5 ms im Micro[™]Electroporator (BioRad).

Die Küvetten wurden anschließend mit 1 ml SOC-Medium ausgespült und die Ansätze für 1 h bei 37 °C (225 Upm) inkubiert. 100 µl dieser Ansätze wurden auf LB/amp/X-Gal (40µl)/IPTG 100 µl)-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Für das Ausplattieren auf die großen 22 cm x 22 cm LB/amp-Platten, auf denen zuvor 750 µl IPTG (100mM) gleichmäßig verteilt worden waren, wurden die 1 ml Transformationsansätze nach der Inkubation bei 37 °C nochmals mit 1 ml LB- Medium verdünnt. Von diesen 2 ml Bakterienkulturen wurden je 1 ml mit 300 µl X-Gal (20 mg/ml) vermischt und auf die auf 37 °C vorgewärmten Kulturplatten gegeben und gut verteilt. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Sobald die Klone eine gut sichtbare Größe erreicht hatten, wurden die Platten für 2 h bei 4 °C inkubiert, so dass der X-Gal-Farbstoff gut zu sehen war. Anhand dieses „Blue-White-Screenings“ wurden von den Platte mit den Forward(F)- und den Reverse(R)-Subtraktionsbanken je 1056 (11 x 96) einzelne Klone gepickt. Jeder Klon wurde

über Nacht bei 37 °C in einer Vertiefung einer 96-well-Mikrotiterplatte angezogen und dann eine Replikatplatte mit einem 96er Stempel angeimpft. Anschließend wurden in allen Platten durch Zugabe von 100 µl sterilen 87%igen Glycerols Glycerolkulturen der einzelnen Klone angelegt und diese SMART-cDNA-Subtraktionsbanken bei - 80 °C gelagert.

2.6 cDNA-Mikroarray-Techniken

Tabelle 30: Mikroarray-Techniken – Lösungen und Verbrauchsmaterialien

96-well-PCR-Mikrotiter Platten PE	# N 801-05060; ABI Perkin Elmer
96-well-V-Bodenmikrotiterplatten zum Spotten	# 9292.1; Roth
Bernsteinsäure(Succinic)-anhydrid/ Natriumborat (frisch ansetzen)-Lösung (Corning slide procedure)	5 g Bersteinsäureanhydrid 315 ml Methylpyrrolidone 35 ml 0,2 M Natriumborat
Blockierungslösung für differentielles Screening, 1ml	0,7 ml 10mg/ml HSD 75 µl SL 134 (1 µg/µl) = NPp1 75 µl SL 135 (1 µg/µl) = NPp2r 75 µl SL 136 (1 µg/µl) = NPp1-rev 75 µl SL 135 (1 µg/µl) = NPp2r-rev
BSA, (Bovine serum albumine) (10 g; Fraction V; Cell culture tested)	#A-9418; Sigma
CMT-GAPS™ aminosilane coated slides	#2549; Corning- Microarray Technology
Denhardt's Solution, 50 x, 5 ml	#D2532; Sigma
dNTPs, 100 mM	#27-2035-02; Pharmacia
Fällungsmix (Mikroarray) pro 96-well-Mikrotiterplatte	10 ml Ethanol 450 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2
Heringsperma DNA 1 g (10 mg/ml HSD)	#223646; Roche Diagnostics Lösen in Millipore Wasser 10mg/ml direkt autoklavieren
Hybridisierungsmix A (vor Gebrauch auf 37 °C erwärmen)	50% Formamid 500 µl 6 x SSC 300 µl 20 x SSC 0,5% SDS 50 µl 10% SDS 5 x Denhardt's 100 µl 50 x Denhardt's ad 1ml Millipore-Wasser
low dT dNTP Mix, 10x, 500 µl	0,5 mM dGTP (25 µl (100 mM dGTP)) 0,5 mM dATP (25 µl (100 mM dATP)) 0,5 mM dCTP (25 µl (100 mM dCTP)) 0,2 mM dTTP (25 µl (100 mM dTTP)) 415 µl ddH ₂ O
MicroAmp 12er caps/strip	#N 801-0534; Perkin Elmer
Mix B	Ohne dTTP 0,33 mM dATP 0,33 mM dCTP 0,33 mM dGTP
Mouse Cot-1 DNA (1mg/ml), 500 µg 20 µg/µl in SpeedVac einengen	#18440-016; Gibco BRL Life Technologies
MPI Taq DNA Polymerase 10 U/µl	MPI Taq DNA Polymerase 10 U/µl

Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (500 µg/ml)	#27-7858-01; Pharmacia
pd(A) ₄₀₋₆₀	# 27-7988-01; Amersham Pharmacia 10 µg/µl in SpeedVac einengen; 5 U
Prähybridisierungslösung, 1 l BSA-Blockierung	1% BSA 6 x SSC 0,5% SDS, in Millipore Wasser
SDS, 10%, 1 l	10 g SDS in Millipore Wasser lösen pH 7,2 einstellen
SSC, 20 x, 1 l	175,3 g Natriumchlorid (3 M) 88,2 g Natriumcitrat (0,3 M) pH 7,0 einstellen ad 1 l Millipore – Wasser
Waschlösung X	0,1% SDS 0,2 x SSC
Waschlösung YI	0,2 x SSC
Waschlösung YII	0,2 x SSC

Tabelle 31: Mikroarray-Techniken - Enzyme und Kits

3DNA™Submicro™ Expression Array Detection Kits	#A100731 Cy3 Kit; Genisphere #A100741 Cy5 Kit; Genisphere
DecaLabel™ DNA Labelling Kit	# K0622; MBI Fermentas
Easypure™DNA Purification Kit	#390001; Biozym
FluoroLink Cy3 dUTP (1 mM)	#PA 53022; Amersham
FluoroLink Cy5 dUTP (1 mM)	#PA 55022; Amersham
Hybridisierungsmix (Genisphere; vial 7)	40% Formamid 4 x SSC 1% SDS
Quiaquick PCR Purification Kit	#28104; Qiagen
Superscript II Reverse Transkriptase wurde geliefert mit 5 x Erststrang-Reaktionspuffer 0,1 M DTT	#18.064-014GibcoBRL Life Technologies

Tabelle 32: Mikroarray-Techniken - Geräte

96-Pin-Replikator	# 250520; Nunc
A4800 Micro Array System (Spotter)	Beecher Instrument's
Eppendorffzentrifuge 5810 R	Eppendorff
G24 Environmental Inkubator Shaker	New Brunswick
Genetic Microsystems GMS 418 oder 428 Array Scanner	Affymetrix
PE 9700 PCR Thermal Cycler	Perkin Elmer
Vakuumkonzentrator 5301	Eppendorff

Der große Vorteil der Mikroarray-Technologie ist, dass eine Vielzahl von Analysen parallel durchgeführt, miniaturisiert und automatisiert werden kann. Die Technik basiert hauptsächlich auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren, aber auch Proteine und andere Biomoleküle können mit ihr analysiert werden. Zu den Anwendungen zählen z.B. die

parallele Analyse einer Vielzahl einzelner Nukleotidpolymorphismen (engl.: single nucleotide polymorphism, SNP) im Genom oder die globale Genexpressionsanalyse. Dabei ist insbesondere das Erstellen von Genexpressionsprofilen mit Hilfe von cDNA-Mikroarrays im Vergleich zu Mikroarrays mit genomischen Proben von Vorteil, da die Komplexität der immobilisierten Proben deutlich geringer ist (Nur ca. 3% des Genoms besteht aus exprimierten Sequenzen). Zudem liefern insbesondere diese Expressionsanalysen Einblicke in die funktionellen Prozesse, die den Unterschieden in den biologischen Proben zu Grunde liegen (Skena et al., 1998).

Auch in dieser Arbeit sollte diese cDNA-Mikroarrays genutzt werden. Einerseits sollte mit einem cDNA-Mikroarray ein globales Genexpressionsprofil für die Gehirne von Wildtyp- und *Ndph*-knockout-Mäusen erstellt werden, um mit ihnen differentiell exprimierte Gene in diesem Gewebe zu identifizieren. Andererseits sollte ein cDNA-Mikroarray mit den Klonen der SMART-cDNA-Subtraktionsbanken hergestellt werden, die dann für eine effiziente, da parallele, Analyse mit Hilfe dieses Mikroarrays zur Verfügung standen.

2.6.1 Amplifikation der SMART-cDNA-Subtraktionsbanken zur Herstellung von Mikroarrays

Jedes cDNA-Insert der in den SMART-cDNA-Subtraktionsbanken repräsentierten Klone wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern M13-20tg und M13rev amplifiziert. Dieses Primerpaar flankiert die Klonierungsstelle im Vektor pGEM[®]TEasy und ermöglichte so eine Amplifikation der Inserts bei gleichen PCR-Bedingungen. Die PCR-Reaktionen wurden in 50 µl Ansätzen in 96-well-PCR-Mikrotiterplatten durchgeführt.

Ein Master Mix für alle Reaktionen wurde aus dem hier dargestellten Ansatz für eine einzelne Reaktion berechnet, auf Eis angesetzt und in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert.

Tabelle 33: Kolonie-PCR - Amplifikation der cDNA-Inserts der Subtraktionsbanken

Komponenten	1 x Reaktionsansatz
10 x PCR Puffer II (PE)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl (1,5 mM)
100 µM M13-20tg Primer	0,1 µl
100 µM M13rev Primer	0,1 µl
dNTPs (20 mM)	0,5 µl
ddH ₂ O	40,8 µl
MPI Taq DNA Polymerase (10 U/µl)	0,5 µl (5 U)
Gesamtansatz	50 µl

Die Reaktionsansätze wurden je zweimal mit einem 96er-Stempel (96-Pin-Replikator), d.h. mit ca. 2 µl Volumen, aus den entsprechenden Glycerolkulturplatten der cDNA-Subtraktionsbanken angeimpft und mit den 12er cap stripes verschlossen. Bis zur PCR mit folgendem Temperaturprofil in PE 9700 PCR-Maschinen, wurden die Platten bei - 20 °C gelagert.

94 °C	5 min	
94 °C	45 sek	-
54 °C	90 sek	30 x
72 °C	2 min	-
72 °C	10 min	
4°C	∞	

Anschließend wurden je 5 µl auf einem 1,2%igen Agarosegel zur Qualitätskontrolle und Bewertung der PCR analysiert.

2.6.2 Herstellen der cDNA-Mikroarrays

Jeweils 100 µl Fällungsmix wurden in spezielle 96-well-Mikrotiterplatten mit v-förmigen Boden vorgelegt, die verbliebenen 45 µl der PCR-Ansätze aus dem Abschnitt „Amplifikation der SMART-cDNA-Subtraktionsbank“ (2.6.1) zugegeben und die DNA bei - 80 °C über Nacht gefällt. Nach einer Zentrifugation (1h; 3000 Upm; 4 °C) wurde der Fällungsmix mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Pellet mit 100 µl 70%igem Ethanol für 40 min bei 37 °C in einem Plattenschüttler gewaschen. Die Mikrotiterplatten wurden erneut zentrifugiert (45 min; 3000 Upm; 4 °C) und das 70%ige Ethanol abgesaugt. Die DNA-Pellets wurden im Brutschrank bei 42 °C getrocknet und dann bei - 20 °C gelagert. 16-24 h vor dem Transfer der DNA wurden die DNA-Pellets in je 7 µl 3 x SSC unter Schütteln (G24 Environmental Inkubator Shaker) resuspendiert. Die PCR-amplifizierten Inserts der SMART-cDNA-Subtraktionsbanken waren dann bereit für den Transfer (Spotten) auf die CMT-GAPS™ Aminosilan-beschichteten Glasobjektträger (Corning).

Die resuspendierten PCR-Produkte wurden mit dem Roboter A4800 Micro Array System in einem geordneten Raster auf die Glasobjektträger übertragen. Dabei wurden vier geschlitzte Nadeln in linearer Anordnung verwendet, deren Aufnahmevolumen ca. 500 nl betrug. Jeweils 2 bis 5 nl davon wurden in die separaten, räumlich begrenzten Spots transferiert. Nach dem Transfer wurden die Nadeln zweimal jeweils 2 sek in einer Waschstation mit MilliQ-Wasser gewaschen und 5 Sek. durch Vakuum getrocknet. Der Roboter, die Mikrotiterplatten und die Objektträger befanden sich in einer geschlossenen Kammer, in der die Luftfeuchtigkeit bei

70% gehalten wurde. Die Objektträger wurden in der Reihenfolge der Herstellung nummeriert. Nach dem Transfer der PCR-Produkte wurden Objektträger für 4 h bei 50 °C und erhöhter Luftfeuchtigkeit in einen Wärmeschrank gestellt. Nach der nicht kovalenten Bindung der DNA an die Oberfläche der Objektträger wurden die PCR-Produkte bei 110 °C für 15 min durch Hitze fixiert und konnten dann für mehrere Monate aufbewahrt werden.

2.6.3 In dieser Arbeit hergestellte bzw. verwendete cDNA-Mikroarrays

In den beiden folgenden Tabellen ist die Herkunft der Klone aufgeführt, die für die Herstellung der zwei, in dieser Arbeit eingesetzten Mikroarrays verwendet wurden.

SMART-cDNA-Subtraktionsbanken-Mikroarray

Tabelle 34: SMART-cDNA-Subtraktionsbanken-Mikroarray Jede Subtraktionsbank enthielt 11 x 96 Klone. Die F-Klone stammen aus der Forward- und die R-Klone aus der Reverse- Subtraktionsbank.

Herkunft der Klone	Klone
Forward-SMART-cDNA-Subtraktionsbank (11 x 96 F-Klone)	1056 Klone angereichert für an p21 im Wildtyp im Vergleich zum <i>Ndph</i> -Knockout höher exprimierte Gene
Reverse-SMART-cDNA-Subtraktionsbank (11 x 96 R-Klone)	1056 Klone angereichert für an p21 im <i>Ndph</i> -Knockout im Vergleich zum Wildtyp höher exprimierte Gene
IMAGE cDNA-Klonsammlung (amp-resistent); RZPD cDNA- Bibliothek 998	446 Haushaltsgene als Kontrollen für nicht differentiell exprimierte Gene (davon 154 Klone mit FL3 Primern)
Pflanzenspezifische cDNA-Klone (Gerste und Mauerblümchen) F. Thümmler, Ls. f. Pflanzenbau und -züchtung H. Eickhoff, MPI für Molekulare Genetik	17 Kontrollgene für unspezifische Bindung an cDNAs, die nicht in Säugern vorkommen. (15 x Gerste + 2 x Arabidopsis)

Gehirnspezifischer Maus cDNA-Mikroarray (Landgrebe et al., 2002)

Tabelle 35: Gehirnspezifischer Maus-cDNA-Mikroarray

Die Klone wurden so ausgewählt, dass die 3'-Bereiche der jeweiligen cDNA auf dem Mikroarray repräsentiert waren, da die Markierung mittels Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primern erfolgte.

Herkunft der Klone	Klone
IMAGE EST-Bibliotheken (ZNS);RZPD (Resource Centre and Primary Database of the Human Genome Project in Berlin)	3180 ESTs und cDNAs aus dem Zentralnervensystem von Mäusen
IMAGE cDNA-Klonsammlung (amp-resistent); RZPD cDNA- Bibliothek 998	339 Haushaltsgene als Kontrollgene für nicht differentiell exprimierte Gene

Die einzelnen Klone sind in GIPO (gene in plate order)-Dateien den jeweiligen Positionen in den Mikrotiterplatten zugeordnet. Diese GIPO-Dateien werden während des Spottens der PCR-amplifizierten Inserts (2.6.1 und 2.6.2) verwendet, um die Zuordnung der Spots auf dem Mikroarray zu den jeweiligen Klonen zu gewährleisten.

2.6.4 Vorbehandlung der Mikroarrays für die Hybridisierung

Für das Absättigen der unspezifisch-bindungsfähigen Oberfläche der Mikroarrays vor deren Hybridisierung wurden zwei alternative Vorbehandlungsmethoden verwendet.

Die erste Vorbehandlungsmethode beruhte auf dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit BSA. Dazu wurden die Mikroarrays in vorgewärmter Prähybridisierungslösung bei 42 °C für 25 min im Wärmeschrank abgesättigt und anschließend bei Raumtemperatur fünfmal für 10 sek mit MilliQ-Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie direkt in 95 °C heißem MilliQ-Wasser für 2 min inkubiert und so die auf der Oberfläche immobilisierte DNA denaturiert. Zum Schluss wurden die Arrays bei Raumtemperatur für 10 min getrocknet und dann direkt für die Hybridisierung verwendet.

Alternativ wurden die die Mikroarrays über heißes MilliQ-Wasser gehalten bis sich ein leichter Kondensfilm gebildet hatte und so die DNA hydratisiert. Dann wurden sie für 3 sek auf einer heißen Heizplatte (95 °C) getrocknet und anschließend die DNA durch UV-Behandlung mit der Oberfläche kovalent verbunden (2 x Autocross link Programm (2 x 1200 μ Joule x 100; UV Stratalinker™, Stratagene). Die so behandelten Mikroarrays wurden 15 min in frisch angesetzter Bernsteinsäure(Succinic)anhydrid/ Natriumborat-Lösung inkubiert und fünfmal mit MilliQ-Wasser gewaschen. Die Flüssigkeit wurde durch Zentrifugation bei Raumtemperatur und 900 Upm für 3 min (Eppendorffzentrifuge 5810R mit Mikrotiterplatteneinsätzen) entfernt und die DNA auf den Arrays für 3 sek auf einer heißen Platte denaturiert. Auch diese Mikroarrays wurden direkt für die Hybridisierung mit den „Targets“ eingesetzt.

vorbereitet. Nach der Entnahme von 10 µl für den parallelen Kontrollansatz mit Plasmid-DNA erfolgte die Restriktion beider Ansätze bei 37 °C für 1 h. Es folgte ein Aufreinigungsschritt mit dem Qiagen PCR Purification Kit, wobei die Restriktionsansätze in 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5 eluiert wurden. Diese Eluate konnten direkt für die Markierungsreaktion eingesetzt werden, nachdem die erfolgreiche Restriktion und somit die Aktivität der Restriktionsenzyme mit Hilfe einer gelelektrophoretischen Analyse der Kontrollaliquots auf einem 1,2%igen Agarosegel bestätigt worden war.

2.6.5.2 SMART-cDNA

Wie die SMART-cDNA-Subtraktionsprodukte wurden auch die SMART-cDNA-Pools nach ihrer Synthese für die Markierung aufgereinigt. Für die Aufreinigung der SMART-cDNA wurde das Qiagen PCR Purification Kit verwendet und die SMART-cDNA in 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5 eluiert. Die Eluate wurden direkt für die Markierungsreaktion eingesetzt.

2.6.6 Markierung der Targets

2.6.6.1 Markierung von SMART- cDNA und SMART-cDNA-Subtraktionsprodukten

Die SMART-cDNAs und die SMART-cDNA-Subtraktionsprodukte wurden durch „Random Priming“ (Feinberg and Vogelstein, 1983) mit Hilfe des DecaLabel™DNA Labelling Kit markiert. Dabei lagerten sich die Dekanukleotide, die aus 10 Deoxyribonukleotiden in zufälliger Reihenfolge bestanden, statistisch verteilt an die Einzelstränge der denaturierten cDNA an. Diese Dekaoignonukleotide dienten als Primer für das Klenow-Enzym, welches während der Verlängerung des DNA-Strangs durch die 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität die fluoreszenzmarkierten Cy3- bzw. die Cy5-dUTP-Moleküle in diesen einbaut.

Für die Eluate der SMART-cDNAs und die der SMART-cDNA-Subtraktionsprodukte wurden die DNA-Konzentrationen photometrisch (OD_{260nm}) bestimmt und dann für die jeweiligen Cy3- und Cy5-Markierungsreaktionen entweder je 600 ng SMART-cDNA-Subtraktionsprodukt oder 1,5 µg SMART-cDNA eingesetzt. Die weiteren Reaktionskomponenten und die Inkubationsschritte der Markierungsreaktion sind in Tabelle 36 zusammengestellt.

Tabelle 36: Mikroarray-Techniken - Random priming Fluoreszenzmarkierung von SMART-cDNA und SMART-cDNA-Subtraktionsprodukten

cDNA in Wasser	50 µl (600 ng Subtraktionsprodukt oder 1,5 µg SMART-cDNA)
Dekanukleotide in 5 x Reaktionspuffer	10 µl
Gesamtvolumen	60 µl
Denaturierung	10 min 95 °C
Mix B (dNTP je 0,33 mM; ohne dTTP)	3 µl
FluoroLink Cy3 dUTP (1 mM) oder FluoroLink Cy5 dUTP (1 mM)	1 µl
Klenow Fragment,exo ⁻ (5 U/µl)	1 µl
Gesamtvolumen	65 µl
Inkubation	15 min 37 °C
dNTP Mix (je 0,25 mM)	4 µl
Gesamtvolumen	69 µl
Inkubation	15 min 37 °C
Inaktivierung	20 min 65 °C

2.6.6.2 Markierungsmethoden für RNA

Die RNA, die für die Hybridisierung auf Mikroarrays eingesetzt wurde, musste von sehr guter Qualität sein. Um unlösliche Aggregate und Kontaminationen mit z.B. Kohlenhydraten zu vermeiden, wie sie häufiger bei Ethanolpräzipitationen auftreten, wurde die RNA, wie im Abschnitt RNA-Extraktion beschrieben (2.4.1), mit dem geeigneten RNeasy Kit extrahiert.

Die Wahl der Markierungsmethode hing von der zur Verfügung stehenden RNA-Menge ab. Für Mengen zwischen 25-100 µg Total-RNA wurde die RNA direkt markiert. Zuvor wurde sie aber analog zu Abschnitt 2.4.4 mit DNase I behandelt sowie mit Phenol/Chloroform extrahiert, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch DNA zu minimieren. Je ein Aliquot der behandelten Total-RNA wurde durch eine Agarosegelelektrophorese auf ihre Integrität überprüft und die RNA-Konzentration (2.4.2) bestimmt.

Die eigentliche Markierungsreaktion erfolgte dann während einer einzelnen Reaktion mit reverser Transkriptase, wobei fluoreszenzmarkierte dUTP-Moleküle (Cy3 (wt) oder Cy5 (ko)) in die entstehende cDNA eingebaut werden. Als Primer für die reverse Transkriptase diente oligo(dT)₁₂₋₁₈. Der 40µl Reaktionsansatz war wie folgt zusammengesetzt, wobei die RNA zuletzt zugegeben und der Ansatz vor der Zugabe des Enzyms für 5 min bei 65 °C inkubiert wurde.

Tabelle 37: Markierungsreaktion für 25-100 µg Total-RNA

5 x Erstrangreaktionspuffer	8 µl
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (500 µg/ml)	2 µl
10 x low dT dNTP Mix	4
Cy3 oder Cy5 Fluor dUTP (1 mM)	4
0,1 M DTT	4
RNasin	1
Vortexen	
Total-RNA (25,50 oder 100 µg)	17 µl
SuperScript II	2 µl
Inkubation bei 42 °C für 25 min	
+ erneut SuperScript II	2 µl
Inkubation bei 42 °C für 35 min	
Gesamtvolumen	44

Nach Abschluss der Reaktion wurden 5 µl 500 mM Na₂EDTA und anschließend 10 µl 1 M NaOH zugesetzt und der Ansatz für 60 min bei 65 °C inkubiert, um die verbliebene RNA zu hydrolysieren. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 25 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 zugesetzt, um den pH-Wert zu neutralisieren. Der Ansatz wurde mit dem PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt und die markierte cDNA in 30 µl Wasser eluiert.

Bei sehr geringen Ausgangsmengen an Total-RNA (1-5 µg) wurde ein indirektes Markierungsverfahren mit einer speziellen Technik der Signalverstärkung angewendet. Hier wurde das **3DNA™ Submicro™ Expression Array Detection Kit (Genisphere)** verwendet. Für die Synthese der cDNA während der reversen Transkription wurden Primer verwendet, die eine bestimmte Sequenz, die „Capture“-Sequenz, beinhalten. An diese jeweils für die beiden Fluoreszenzfarbstoffe spezifischen Sequenzen konnten sich während des Prähybridisierungsschrittes durch komplementäre Bindung Dendrimer-Komplexe mit jeweils 250 Fluorochromen des entsprechenden Farbstoffes anlagern.

Cy3™ RT- Primer „Capture“-Sequenz: 5'-ggc cga ctc act gcg cgt ctt ctg tcc cgc c-3'

Cy5™ RT- Primer „Capture“-Sequenz: 5'-cct gtt gct cta ttt ccc gtg ccg ctc cgg t-3'

Die Markierung der eingesetzten 2,5 µg Total-RNA erfolgte in folgendem Reaktionsansatz. Dabei wurde zuerst die RNA mit dem entsprechenden RT-Primer gemischt, dieser Ansatz dann für 10 min bei 80 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Parallel wurde der Reaktionsmix angesetzt und dann mit dem RNA-RT-Primer-Mix gemischt.

Tabelle 38: Markierungsreaktion für 1-5µg Total-RNA 3DNA™Submicro™ Expression Array Detection Kit (Genisphere)

2,5 µg Total-RNA in Nuklease-freiem Wasser	7 µl
Entsprechender RT-Primer (0,2 pmol) (vial 2) mit spezifischer „Capture“-Sequenz	3 µl
RNA-RT-Primer Mix	10 µl
5 x RT-Puffer (vial 5)	4 µl
dNTP Mix (vial 4)	1 µl
RNase-freies Wasser	4 µl
Reverse Transkriptase (200 U/ µl) (vial 3)	1 µl
Reaktionsmix	10 µl

Die gut gemischten Ansätze wurden für 2 h bei 42 °C inkubiert und die Reaktion im Anschluss durch Zugabe von 3,5 µl 0,5 M NaOH/50mM Na₂EDTA gestoppt. Die DNA/RNA-Hybridmoleküle wurden durch eine Inkubation bei 65 °C für 10 min denaturiert und die RNA hydrolysiert. Mit 5 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 wurden die Ansätze neutralisiert.

Für die Kohybridisierung zweier Proben wurde die eine mit der „Cy3-capture“- Sequenz und die andere cDNA mit der „Cy5 Capture“-Sequenz synthetisiert. Die beiden Ansätze wurden jetzt im Verhältnis 1:1 vereinigt und das leere Reaktionsgefäß mit 10 µl 10mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen, die dann ebenfalls zu der cDNA-Mischung gegeben wurden. Für die folgende Ethanol-fällung wurden 1 µl Glykogen (20 mg/ml), 175 µl 3 M Ammoniumacetat und 625 µl 100%iges Ethanol dem Ansatz zugesetzt und dieser bei - 80 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die cDNA durch eine Zentrifugation bei 10000 x g für 30 min gefällt und der Überstand quantitativ abgenommen. Das cDNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 20 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in einem Vakuumkonzentrator bei 47 °C für 10 min getrocknet. Dieses cDNA-Pellet wurde dann für die Kohybridisierung der beiden cDNAs auf einen Mikroarray eingesetzt.

2.6.7 Kohybridisierung verschiedener Targets auf cDNA-Mikroarrays

Bei der Kohybridisierung zweier Targets (fluoreszenzmarkierter cDNA-Populationen) auf einen Mikroarray wurden diese zuerst denaturiert, damit sie einzelsträngig vorlagen und mit den einzelsträngigen, immobilisierten cDNA-Molekülen auf den Mikroarrays hybridisieren konnten. Sequenzen im Target oder in den immobilisierten cDNAs, die eine unspezifische Bindung der beiden cDNA-Populationen verursachen und so zu falsch positiven Signalen führen könnten, sollten durch den Zusatz von Maus-Cot1-DNA (repetitive

Nukleinsäuresequenzen), pd(A)₄₀₋₆₀-Oligonukleotide (Oligo(dT)-Sequenzen) und durch die „Blockierlösung für das differentielle Screening der Subtraktionsbanken“ gesättigt werden und damit die unspezifische Interaktion zwischen Target und immobilisierten cDNAs verhindert werden.

Die aufgereinigten und zu kombinierenden, fluoreszenzmarkierten Targets wurden im Verhältnis 1:1, bezogen auf die Menge und nicht auf das Volumen der Probe, gemischt und dann in einem Vakuumkonzentrator fast bis zur Trockne eingengt. Diese fluoreszenzmarkierten cDNAs oder das cDNA Pellet aus dem **3DNA™ Submicro™ Expression Array Detection Kit (Genisphere)** wurden in auf die entsprechende Hybridisierungstemperatur vorgewärmtem Hybridisierungsmix A bzw. Hybridisierungslösung (Genisphere) aufgenommen und mit den entsprechenden Kompetitoren versetzt. Die verschiedenen Ansätze für die unterschiedlichen Hybridisierungen sind hier aufgeführt:

Tabelle 39: Mikroarray-Techniken - Hybridisierungsansatz für SMART-cDNA-Subtraktionsprodukte

Cy3/Cy5 markierte SMART cDNA Subtraktionsprodukte im Verhältnis 1:1	Fast bis zur Trockne eingengt.
Hybridisierungsmix A	30 µl
Maus Cot-1 DNA (20 µg/µl)	1 µl
pd(A) ₄₀₋₆₀ Oligonukleotide (10µg/µl)	1 µl
Blockierlösung für differentielles Screening	1 µl
Gesamtvolumen	33 µl

Tabelle 40: Mikroarray - Techniken - Hybridisierungsansatz für SMART-cDNAs

Cy3/Cy5 markierte SMART cDNAs (1:1)	Fast bis zur Trockne eingengt.
Hybridisierungsmix A	30 µl
Maus Cot-1 DNA (20 µg/µl)	1 µl
pd(A) ₄₀₋₆₀ Oligonukleotide (10µg/µl)	1 µl
Blockierlösung für differentielles Screening	1 µl
Gesamtvolumen	33 µl

Tabelle 41: Mikroarray - Techniken - Hybridisierungsansatz für Total-RNA

Cy3/Cy5 markierte cDNAs im Verhältnis 1:1	Fast bis zur Trockne eingengt.
Hybridisierungsmix A	22 µl
Maus Cot-1 DNA (20 µg/µl)	1 µl
pd(A) ₄₀₋₆₀ Oligonukleotide (10µg/µl)	10 µl
Gesamtvolumen	33 µl

Alle drei Ansätze wurden je 3 min bei 95°C denaturiert und dann auf den Mikroarray gegeben.

Tabelle 42: Mikroarray-Technik - Hybridisierungsansatz für Total-RNA mit 3DNA™Submicro™Expression Array Detection Kit (Genisphere)

Gefällte Cy3-/Cy5- mit „capture“-Sequenz markierte cDNA im Verhältnis 1:1	cDNA-Pellet
Hybridisierungslösung (vial 7)	25 µl
Cy3™ 3DNA capture reagent (vial 1)	2,5µl
Cy5™ 3DNA capture reagent (vial 1)	2,5µl
Oligo-(dT) (vial 9)	2 µl
Anti Fade (vial 8)	0,35 µl
Maus-Cot-1-DNA (10 mg/ml)	1 µl
Gesamtvolumen	33 µl

Dieser Hybridisierungsansatz musste vor der Hybridisierung auf den Mikroarray für 20 min bei 47 °C präinkubiert werden, um den Cy3™- und den Cy5-„capture“-Dendrimern Zeit zur Hybridisierung an die mit der entsprechenden „Capture“-Sequenz markierten cDNAs im Target zu geben.

Alle Hybridisierungsansätze wurden dann in der Mitte eines Deckgläschens aufgetragen, mit dem die Fläche des cDNA-Mikroarrays abgedeckt wurde. Der Objektträger wurde in eine Hybridisierungskammer gelegt, die zusätzlich am Rand mit ca. 30 µl sterilfiltriertem MilliQ-Wasser versehen wurde, um eine hohe Luftfeuchtigkeit in der Kammer zu erzeugen. Die Hybridisierung erfolgte in der abgeschlossenen, feuchten Hybridisierungskammer für 16 bis 20 h bei 42 °C oder bei 52 °C für mit dem 3DNA™Submicro™Expression Array detection Kit (Genisphere) markierten Proben im Wasserbad.

2.6.8 Waschen der Mikroarrays nach der Hybridisierung

Die Mikroarrays wurden nach der Hybridisierung je 5 min in Waschlösung X, Y I und Y II bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend 5 Min. bei 500 Upm und 4 °C in einer Eppendorffzentrifuge 5810R zentrifugiert. Durch ein Abpusten mit Stickstoff wurde restliches Wasser und Fussel vom Mikroarray entfernt, die andernfalls das Fluoreszenzsignal beeinträchtigen würden.

2.6.9 Bildgewinnung und Analyse der Mikroarraydaten

Die Fluoreszenzintensitäten der beiden Kanäle wurden mit Hilfe des Genetic Microsystems GMS 418 oder 428 Array Scanner detektiert, wobei die Einstellungen des Scanners so gewählt wurden, dass die vollständige Sättigung der Intensitäten für die Spots möglichst vermieden wurden. Daher waren die gemessenen Intensitäten immer unterhalb dem

Sättigungslimit des Scanners von 65536 Einheiten. 16bit-TIF-tagged-Bilder wurden für jeden Farbstoff (Cy3 und Cy5) aufgenommen und mit Hilfe einer Version der Bildanalyse-Computersoftware IPLab Spectrum überlagert. Die hintergrundkorrigierte, mittlere Intensität für jeden Spot eines jeden prozessierten Bildes wurde dabei durch die Verwendung des Algorithmus von Chen et al. (Chen et al., 1997) erhalten. Die erhaltenen Daten für die Gene, die von der Software als potentiell differentiell exprimierte Gene identifiziert worden sind („Outlier“-Listen), wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel transferiert und dort weiter ausgewertet. Die jeweiligen Wiederholungen der Experimente wurden kombiniert und dann zusammen ausgewertet.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

Tabelle 43: Proteinbiochemische Methoden - Lösungen

Ammoniumperoxidisulfat, 10 % (w/v) >98%, P.A., 50g	in ddH ₂ O gelöst und bei - 20°C gelagert # 9592.3; Roth
Blockingpuffer für Western Blots	5% Protifar Milchpulver in PBST
Blotpuffer, 1x	20 ml 5 x Blotpuffer 20 ml Methanol mit 60 ml ddH ₂ O auf 100 ml aufgefüllt
Blotpuffer, 5x	29,1 g Tris 14,65 Glycin 1,88 g SDS
Coomassie – Entfärber	10% Isopropanol 12 % Essigsäure 1 % Glycerol
Coomassie – Färbelösung	0,1 (w/v) Coomassie-Brilliant Blue R-250 7,0% (w/v) Essigsäure 12% Methanol
Elutionspuffer C	Stammlösung mit pH 5,9
Elutionspuffer D	Stammlösung mit pH 4,5
Entwickler - Silberfärbung von Proteinen	25 g Natriumcarbonat ad 1000 ml mit ddH ₂ O Kurz vor Gebrauch für 50 ml: + 15 µl 37% Formaldehyd
Färbelösung - Silberfärbung von Proteinen	1,0 g Silbernitrat (Lsg. vor Licht schützen) ad 1000 ml mit ddH ₂ O Kurz vor Gebrauch für 50 ml: + 15 µl 37% Formaldehyd
Fixierer - Silberfärbung von Proteinen	30% Ethanol (300 ml) 15 % Eisessig (150 ml) ad 1000 ml mit ddH ₂ O

Homogenisierungspuffer (10 ml) für Gewebe (RIPA-Puffer)	50mM Tris HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1mM EDTA pH 8,0 0,2% NP-40 NP 40 (Roche) 1x Complete Protease Inhibitors - Tablette
Imidazolhaltiger, nativer Lysepuffer, 1l	50 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (6,9 g) 300 mM NaCl (17,54 g) 10 mM Imidazol (0,68 g) pH 8,0
Inkubationslösung - Silberfärbung von Protein	41,0 g Natriumacetat in wenig bidest lösen 250 ml Ethanol ad 1000 ml mit ddH ₂ O Kurz vor Gebrauch für 50 ml 0,1 g Natriumthiosulfat 250 µl Glutaraldehyd
IPTG, 0,84 M (Induktion)	2 g IPTG auf 10 ml Wasser; sterilfiltrieren
Lysepuffer B + TritonX-100	100 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (13,8 g) 10 mM Tris/HCl (1,2 g) 8 M Harnstoff (480,5g) pH 8,0 + 2% (v/v) Triton X-100
PBS, 10 x, 1 l	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ 800 ml ddH ₂ O pH 7,4 mit HCl ad 1 l autoklavieren
PBST, 1 x	KCl 2,68 mM KH ₂ PO ₄ 1,4 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 11,5 mM NaCl 0,2 mM Tween20 0,05% (v/v)
Puffer C (Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung)	Stammlösung mit pH 6,1
SDS-Lösung, 10% (w/v) Sodiumdodecylsulfat	10 g SDS in 100 ml ddH ₂ O lösen # 8.17034.1000; Merck
SDS-PAGE-Laufpuffer, 5 x, 1 l	125 mM Tris/HCl pH 8,3 (15,1 g) 200 mM Glycin (72 g) 0,1% (w/v) SDS (5g) auf 1000 ml ddH ₂ O aufgefüllt
SDS-Probenpuffer, 6 x, 10 ml	7 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 (0,35 M) 3,45 ml 87% Glycerol (30%) 1 g SDS (10%(w/v)) 0,93 g DTT (0,6 M) 1,2 g Bromphenolblau (0,0012% (w/v)) auf 10 ml ddH ₂ O aufgefüllt
Stammlösung (Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung)	100 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (13,8 g) 10 mM Tris/HCl (1,2 g) 8 M Harnstoff (480,5g)

Stopplösung - Silberfärbung von Proteinen	18,6 g Na ₂ EDTA ad 1 l mit ddH ₂ O
Tris/HCl, 1,0 M, pH 6,8 (Für Sammelgele)	121,14 g Tris in ddH ₂ O lösen; pH einstellen; ad 1 l #1.08382.0500; Merck
Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8 ,1l, für Trenngele Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	181,71 g Tris in ddH ₂ O lösen; pH einstellen; ad 1l #1.08382.0500; Merck

Tabelle 44: Proteinbiochemische Methoden - Verbrauchsmaterialien

Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit	#B9643; Sigma
Centricon YM-10 Säulen	#4241; Millipore
Complete TM Protease Inhibitors (20)	#1697498; Roche
Coomassie® Brillantblau R250, 25g	#27816; Fluka
Kaleidoscope Polypeptide Standard 3,7 kDa – 36 kDa	#161-0325; BioRad
Lumi- Film, Chemiluminescent, Detection Film, 100 films	#1 666 916; Roche
N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin, (TEMED)100ml	#2367.1; Roth
Ni-NTA-Agarose, 25 ml	#30210; Qiagen
Nonidet NP 40	#1332473; Roche
Polypropylen Säulen, 5 ml Kapazität	#34964; Qiagen
Prestained Protein Molecular Weight Marker 19kDa–119 kDa	#SM0441; Fermentas
PVDF-Western Blot Membran, 1 Rolle	#3010040/001; Roche
Renaissance WesternBlot Chemiluminescence Reagent Plus Kit ECL	#NEL 103001EA; Perkin Elmer
Rinderserumalbumin BSA (1 mg/ml) Protein Standard Solution	#P0914; Sigma
Rotiphorese®Gel 30 (1l) (30% Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)	#3029.1; Roth
Semi Micro Cuvet PP1,5-3,0 ml 340-800 nm	#Z33041-8; Sigma
Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette (Extra Strength) 10000 MWCO (0,5- 3ml)	#66380; Pierce

Tabelle 45: Proteinbiochemische Methoden – Expressionsvektoren und Enzyme

<i>Pfu</i> – DNA - Polymerase 2-3 U / μ l	#M7741; Promega
pQE30 Vektor; Ampicillin Resistenz QIAexpress Type IV Kit	#32149; Qiagen
T4 DNA Ligase 1-3 U/ μ l	#M1801; Promega
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	#K2800-20; Invitrogen

Tabelle 46: Proteinbiochemische Methoden - Bakterienstämme

XL1-Blue chemisch kompetente Zellen Genotype recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	#200130; Stratagene
---	---------------------

<i>E.coli</i> Stamm M15[pREP4] ; Das pREP4 Repressorplasmid trägt ein Kanamycinresistenzgen	#34210; Qiagen
<i>E.coli</i> Stamm SG13009[pREP4]; Das pREP4 Repressorplasmid trägt ein Kanamycinresistenzgen	#34210; Qiagen

Tabelle 47: Proteinbiochemische Methoden - Antikörper

Anti-rabbit Ig, horseradish peroxidase linked F(ab') ₂ fragment (from donkey) 1 ml (1: 2000) (sekundärer Antikörper)	#NA9340; Amersham Bioscience
GH (L-20) Affinity-purified goat polyclonal antibody (1:200)	#SC-10364; Santa Cruz Biotechnology
Mouse Anti RGS (His) ₄ , 100 µg (1:2000)	#34650; Qiagen
Mouse Growth Hormone (Gh) antiserum; from rabbit; 50 µl (1:500)	#4750-2809; ANAWA Trading SA

Tabelle 48: Proteinbiochemische Methoden - Geräte

BioPhotometer	Eppendorf
Mini-Homogenisator, Volumen 0,1 ml	# FB 56673; Fisher
Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis System	#165-3301; BioRad
Sonopuls Ultraschall Homogenisator	Bandelin
Sorvall RC5C Zentrifuge mit GSA-Rotor o. SS-34 Rotor	Sorvall Instruments
Trans-Blot®SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	#170-3940; BioRad

2.7.1 Proteinpräparation aus Gewebe

Für die Präparation von Proteinen aus Organen (Retina bzw. Gehirn) wurde das Gewebe je nach Menge in einem Mini-Homogenisator (Volumen 0,1 ml) für Retina oder in einem größerem Homogenisator (Volumen 5 ml) für Gehirn in einer entsprechenden Menge Homogenisierungspuffer (RIPA-Puffer) auf Eis (4 °C) homogenisiert. Anschließend wurden die Ansätze für 1-3 h im Kühlraum (4 °C) über Kopf rotiert. Um die unlöslichen Komponenten zu entfernen, wurden die Ansätze dann für 30 min bei 4 °C und 15300 x g (Eppendorffzentrifuge 5417 R) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und so wie die pelletierte Fraktion bei – 20 °C gelagert.

2.7.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay; 560 nm)

Die Proteinkonzentration von Proteinhomogenaten wurde mit dem BCA-Assay bestimmt. Er beruht auf der Bildung von Cu^{2+} -Komplexen mit den vorhandenen Proteinen unter alkalischen Bedingungen, was zu einer Reduktion des Cu^{2+} zu Cu^{1+} führt. Die reduzierte Menge des Kupfer(II) ist proportional zu der vorhandenen Menge an Protein. Bicinchoninsäure bildet im Alkalischen einen violetten bis blauen Komplex mit Kupfer(I), der bei der Messung der Optischen Dichte bei 562 nm ($\text{OD}_{562\text{nm}}$) nachgewiesen werden kann. Der lineare Bereich des BCA-Assays, in dem die Farbentwicklung proportional zur Proteinmenge ist, liegt zwischen 200-1000 $\mu\text{g/ml}$. Als Vergleichsstandard mit bekannten Proteinkonzentrationen (Eichkurve) wurde eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) angesetzt.

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurden in Doppelbestimmungen je 50 μl der Proteinlösungen mit 1 ml der BCA-Assay-Lösung (Lösung A (1 ml) + B (20 μl)) versetzt und gut gemischt. Anschließend wurde diese Mischung für 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert und dann die $\text{OD}_{562\text{nm}}$ gemessen und mit den Werten für die Eichreihe verglichen.

2.7.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) und die Präparation der Polyacrylamidgele mit 10-15%igen Trenngelen und 5%igen Sammelgelen wurde nach den Angaben in Sambrook et al. (Sambrook J et al., 1989) und mit Hilfe des Mini-PROTEAN® 3 Systems von BioRad durchgeführt. Das maximale Probenvolumen, welches auf die Mini-Gele (Schichtdicke 0,75 mm) geladen werden konnte, betrug 20 μl . Die Proteinlösung wurde mit 6 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe kurz zentrifugiert (2 min; 11000 Upm; Eppendorfzentrifuge 5417 R), um ausgefallene Proteine abzutrennen, die das Auftragen erschweren. Alle in dieser Arbeit durchgeführten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, so dass der Probenpuffer immer ein reduzierendes Agens (DTT bzw. β -Mercaptoethanol) enthielt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V für 30-50 min. Als Größenstandards wurden der „Kaleidoscope Polypeptide Standard“ für Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 3,7 und 36 kDa und der „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ für Proteine zwischen 19 und 119 kDa verwendet.

2.7.4 Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Sowohl die Coomassie-Färbung als auch die Silberfärbung von Proteinen diente dem Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (Sambrook J et al., 1989). Die Silberfärbung ist mit einer Nachweisgrenze von 5 bis 30 ng Protein pro Bande etwa 10fach sensitiver als die Coomassie-Färbung mit 200 bis 400 ng.

Für eine Coomassie-Färbung wurde das Gel direkt nach der SDS-PAGE für 30-60 min in der Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend das Gel mit dem Coomassie-Entfärber entfärbt.

Die Silberfärbung beginnt mit einem einstündigen Fixationsschritt in Fixierer. Anschließend wird das Gel in der Inkubationslösung für 1-2 h geschüttelt und dann 3mal mit bidestiliertem Wasser gewaschen. Eine 30-minütige Inkubation mit der silbernitrat-haltigen Färbelösung sorgt dafür, dass sich das Silber an die Proteine anlagerte. Dieses Silber kann dann durch die Zugabe des Entwicklers sichtbar gemacht werden. Sobald die Färbung intensiv genug war, wurde die Reaktion durch die Stopplösung beendet. Die Silberfärbung konnte auch im Anschluss an eine Coomassie-Färbung durchgeführt werden.

2.7.5 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western Blot)

Für die spezifische, immunologische Detektion von Proteinen wurden die Proteinhomogenate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel für 15 min in 1 x Blotpuffer gelegt. Die auf die Größe des Gels zugeschnittene Membran wurde kurz in Methanol, dann für 5 min in Wasser und anschließend 5 min in 1 x Blotpuffer geschwenkt. Der Blot wurde wie folgt in der Trans-Blot®SD Semi Dry Electrophoretic Transfer Cell aufgebaut.

Aufbau des Blots: (oben) 3 x Whatmanpapier (Dicke 3MM)

Gel

Membran (PVDF)

(unten) 3 x Whatmanpapier (Dicke 3MM)

Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte durch einen Elektroblot im Semi-Dry Verfahren für 20 min bei 15 V und 200mA.

Anschließend wurde die Membran kurz in PBST gelegt und dann in 5% Milchpulver in 1 x PBST pH 7,2 für 1 h inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte dann in Blockingpuffer für Western Blots in den jeweils antikörperspezifischen Verdünnungen (1:200-1:5000) für

entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min in 1 x PBST gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper, an den die Peroxidase (horseradish peroxidase) gekoppelt war, in einer 1:2000 Verdünnung in PBST inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran erneut dreimal für 5-20 min in 1 x PBST gewaschen und dann der Nachweis mit dem Renaissance WesternBlot Chemiluminescence Reagent Plus Kit und dem Lumi-Film durchgeführt. Für den Nachweis von rekombinant exprimierten Proteinen war nach 10 sek ein deutliches Signal zu sehen, wogegen das Signal in Proteinhomogenaten aus Geweben durchaus auch erst nach 10 min oder länger sichtbar werden konnte.

2.7.6 Rekombinante Ndp (,,Norrin“-)Proteinexpression in *Escherichia coli*

Für die rekombinante Proteinexpression wurde das QIAexpress System von Qiagen verwendet (The QIAexpressionist™; QIAexpress® Detection and Assay Handbook).

2.7.6.1 Klonierung der Expressionskonstrukte

Für die Klonierung der Expressionskonstrukte wurde der pQE30-Vektor verwendet. Dieser Vektor beinhaltet eine für eine RGS-His-Erkennungssequenz kodierende DNA-Sequenz 5' zu der multiplen Klonierungstelle. Drei Bereiche der *Ndp*-cDNA wurden mit Hilfe von PCR-Primern von dem die *Ndp*-cDNA enthaltenden Plasmid pmnC2 amplifiziert. Dabei handelte es sich um die Bereiche des offenen Leserahmens, die einmal für das gesamte Protein ohne das Signalpeptid (Aminosäuren 25-131; Signalpeptid: 1-24) kodierten und des weiteren um den N-terminalen Teil (Aminosäuren 25-75) sowie den C-terminalen Teil (Aminosäuren 76-131). Die verwendeten Primer enthielten in ihren Sequenzen Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme (5'- Primer *SacI*; 3'- Primer *HindIII*), so dass die PCR-Produkte im Anschluss durch einen Restriktionsverdau mit diesen Enzymen und einer anschließenden Ligation mit T4-Ligase in den mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor pQE30 gerichtet kloniert werden konnten. Die Sequenzen der verwendeten Primer (NDpQE30for; NDpQE30revHindIII; NDpQE30revNHindIII; NDpQE30forC) sind im Anhang 10.2 aufgeführt.

Für die PCR wurden jeweils 5 µl 10 x *Pfu*-Puffer; 1 µl 10 µM 5'-Primer, 1 µl 10 µM 3'-Primer, 1 µl 10 mM dNTPs, 0,5 µl *Pfu*-DNA-Polymerase und 10 ng Plasmid-DNA als Template in einem 50 µl Ansatz gemischt und dann die Reaktion unter den jeweiligen, im folgenden für die einzelnen Primerkombinationen aufgeführten Bedingungen durchgeführt:

WND (Aminosäuren 25 -131):	Primerkombination:	NDpQE30for NDpQE30revHindIII
und		
NND (Aminosäuren 25 – 75)	Primerkombination:	NDpQE30for NDpQE30revNHindIII
PCR-Programm:	94 °C 5 min	
	94 °C 45 sek	-
	54 °C 1 min	30 Zyklen
	72 °C 45 sek	-
	72 °C 5 min	
CND (Aminosäuren 76 – 131):	Primerkombination:	NDpQE30forC NDpQE30revHindIII
PCR-Programm:	94 °C 5 min	
	94 °C 45 sek	-
	61 °C 1 min	30 Zyklen
	72 °C 45 sek	-
	72 °C 5 min	

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese auf einem 1,2%igen Agarosegel analysiert und mit dem QiagenGel ExtractionKit aus dem Gel isoliert. Anschließend wurde der Verdau der PCR-Produkte und parallel dazu der des pQE30 Vektors mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *HindIII* in einem Doppelverdau durchgeführt.

Die Restriktionsansätze wurden auf einem 1,2%igen Agarosegel aufgetragen und die entsprechenden Fragmente erneut extrahiert. Die DNA-Konzentration der Inserts und des Vektors wurden anschließend bestimmt, die Inserts mit dem linearisierten Vektor im Verhältnis 3:1 gemischt und mit T4-DNA-Ligase in 1 x T4-Ligasepuffer für 2 h bei Raumtemperatur in einem 10 µl Ansatz inkubiert. Alternativ wurde das ungeschnittene PCR-Produkt zunächst in den TOPO Blunt Vektor kloniert, das Insert durch einen *SacI*- und *HindIII*-Doppelverdau aus dem Vektor isoliert und dann für die Ligation verwendet.

Je 1 µl der Ligationsansätze wurde jeweils mit 100 µl kompetenten Bakterienzellen dreier verschiedener *E.coli* Stämme (XL1 Blue; M15[pREP4] und SG13009[pREP4]) gemischt, dann für 30 min auf Eis inkubiert und für 45 sek auf 42 °C erhitzt. Dieser Ansatz wurde auf Eis abgekühlt, mit 900 µl 37 °C warmem LB-Medium gemischt und für 1 h bei 225 Upm geschüttelt. 100 µl dieses Ansatzes wurden dann auf eine selektionierende LB/amp (für XL1 Blue) und auf LB/amp/kan (für M15[pREP4] und SG13009[pREP4]) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C angezogen.

Die Identifikation der Klone mit einem Insert wurde mit Hilfe von Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei wurden die gleichen PCR-Bedingungen wie für die Amplifikation der PCR-Produkte von Plasmid-DNA verwendet, nur dass anstatt der Plasmid-DNA hier die

Bakterien direkt als Template dienten. Die einzelnen für die Kolonie-PCR verwendeten Bakterienklone wurden geordnet auf einer zweiten Kulturplatte (LB/amp/kan) über Nacht angezogen und waren so direkt den PCR-Ergebnissen zuzuordnen.

Von den mit Hilfe der Kolonie-PCR identifizierten Klonen wurden 5 ml-Übernachtskulturen in LB/amp oder LB/amp/kan angezogen und Glycerolstocks angelegt. Aus dem Rest der LB-Kulturen wurden die Plasmide mit dem Qiaprep 8 Turbo BioRobot Kit isoliert und zur Kontrolle der Sequenz mit dem ABI PRISM®BigDye™ Terminators v3.1 Cycle Sequencing Kit und dem ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser sequenziert (2.3.5).

2.7.6.2 Expression des Ndph-Proteins (Norrin)

Für die Expression des Ndph-Proteins (Norrin) in den *E.coli*-Zellen wurden 5 ml-Kulturen in LB/amp- bzw. LB/amp/kan-Medium mit den Glycerolstocks inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter konstantem Schütteln (225 Upm) angezogen. Anschließend wurden 0,5 ml dieser Starterkultur in 10 ml LB/amp/kan Medium transferiert und dieses solange bei 37 °C unter Schütteln (225 Upm) inkubiert, bis die OD_{600nm} bei etwa 0,5-0,7 lag. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Expression in dieser Kultur durch die Zugabe von 12 µl 0,84 M IPTG (finale Konzentration 1 mM) induziert und dann für 4-5 h bei 37 °C fortgesetzt. Anschließend wurden die Bakterien durch 5 min Zentrifugation bei 15000 x g (Sorvall Zentrifuge SS-34 Rotor) geerntet und der Überstand verworfen. Die Zellpellets konnten bei - 20 °C für eine spätere Verarbeitung gelagert werden.

Für die präparative Expression des Proteins wurde eine Starterkultur von 100 ml und eine präparative LB/amp/kan-Kultur von 1,2 Litern verwendet, die mit der entsprechend höheren Menge an IPTG (1,55ml einer 0,84 M Lsg. in 1,3 l) induziert wurde. Bei diesem großen Ansatz wurden die Zellen durch Zentrifugation in einer Sorvall Zentrifuge bei 4000 x g für 20 min (GSA Rotor) geerntet.

2.7.6.3 Lyse der Bakterienzellen

Die Lyse der Bakterienzellen diente dem Freisetzen des Proteins aus dem Inneren der Bakterienzellen. Sie erfolgte in analytischen Ansätzen sowohl unter nativen, wie auch unter denaturierenden Bedingungen. Für die Präparation großer Mengen des Proteins wurden nur denaturierende Bedingungen verwendet.

Zunächst wurde das Bakterienpellet in dem entsprechenden nativen imidazolhaltigen Lysepuffer bzw. dem denaturierenden Lysepuffer B resuspendiert (1 ml bei analytischen, 5-10 ml bei präparativen Ansätzen). Für die native Lyse wurden die Ansätze dann mit 1 mg

Lysozym (1 mg/ml) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis für 2 x 2 min mit Ultraschall (Output control: 3; Duty control: constant) behandelt und Zelltrümmer durch 20 min Zentrifugation bei 4 °C und 10000 x g in einer Eppendorffzentrifuge vom Überstand getrennt. Beide Fraktionen wurden für die Analyse mittels Western Blot bei – 20 °C gelagert.

Unter denaturierenden Bedingungen wurden die resuspendierten Zellen für 30 min auf Trockeneis eingefroren und dann in einem Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Ultraschallbehandlung erfolgte hier für 3 x 2 min auf Eis (Output control: 3; Duty control: constant). Wie oben beschrieben wurden die Zelltrümmer (Pellet) vom Überstand abgetrennt und ebenfalls bei - 20 °C gelagert.

2.7.7 Affinitätschromatographische Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit Ni-NTA-Agarose über einen RGS-His-Tag

Die Aufreinigung der mit der RGS-His-Erkennungssequenz (engl.: tag) versehenen Proteine erfolgte mit Hilfe einer Metall-Chelat-Affinitätschromatographie unter Verwendung von Nickel-NTA-Agarose (Porath et al., 1975). Dabei wird das Nickel von der Matrix komplexiert, die aber 2 Stellen in diesem Komplex für eine Interaktion mit den Histidinen des 6 x His-tags im rekombinanten Protein frei lässt. Diese Komplexbildung ermöglichte durch ihre relative Stabilität eine Affinitätsaufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine innerhalb eines Schrittes. Da die Komplexbildung des Nickels pH abhängig ist, wurden die Waschschrte und die Elution des Proteins mit Lösungen unterschiedlichen pH-Werts durchgeführt. Drei Volumen des Rohlysates (17,4 ml) aus der Lyse der Zellen wurden mit einem Volumen (5,8 ml) Nickel-NTA-Agarose gemischt und für mindestens 2 h (oder über Nacht) bei 4 °C kontinuierlich über Kopf rotiert. Dieses Gemisch, welches das an die Ni-NTA-Agarose gebundene, rekombinante Protein enthielt, wurde auf eine Polypropylensäule (5 ml Volumen) gegeben und der Durchfluss gesammelt. Die Matrix auf der Säule wurde mit mindestens dem 6-fachen Volumen Puffer C gewaschen und der entsprechende Durchfluss verworfen. Die Elution des Proteins erfolgte mit den Elutionspuffern D (1x 3,6 ml; 2x 9,6 ml) und E (1x 3,6 ml; 2x 9,6 ml; 2 x 4,8 ml) in zwei pH-Schritten, wobei die einzelnen Fraktionen getrennt gesammelt wurden. Anschließend wurde die Gegenwart des Proteins mit Hilfe von SDS-PAGE auf 15%igen Gelen, nachfolgender Silberfärbung und Western Blot Analysen verifiziert. Die Fraktionen, die das Protein in möglichst reiner Form enthielten, wurden vereinigt und mit Hilfe einer Ultrafiltration in Centricon-10-Säulen durch Zentrifugation

aufkonzentriert. Diese Proteinkonzentration wurde im Vergleich zu einer Ribonuklease A Eichreihe auf einem Silber-gefärbten Gel bestimmt.

2.7.8 Immunisierung von Kaninchen mit rekombinantem Norrin zur Antikörpergewinnung

Die aufkonzentrierten, rekombinanten Proteine wurden auf ein präparatives 15%iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Im Vergleich zu den Markerbanden wurden die durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemachten Proteine aus dem Gel ausgeschnitten und diese Gelstücke direkt für die Immunisierung von Kaninchen der Firma EUROGENTEC zugeschickt, die die Immunisierung durchführte.

Für die Auswahl der zu immunisierenden Kaninchen wurden deren Präimmunsereen getestet und dann die Tiere ausgewählt, deren Seren mit dem Rohlysat bzw. dem aufgereinigten Protein im Western Blot kein Signal im erwarteten Größenbereich von 9–20 kDa zeigten. Die Immunisierung erfolgte pro Injektion mit 100 µg WND- und mit 200 µg NND-Protein in je zwei Kaninchen nach einem festgelegten Zeitplan. Dieser beinhaltete neben den Injektionen auch definierte Zeitpunkte der Blutentnahme. Die gewonnenen Immunsereproben wurden im Western Blot (2.7.5) auf die Reaktion mit den rekombinanten Proteinen getestet.

2.7.9 Renaturierung des rekombinanten WND-Proteins für die Verwendung in einem Cornea-Vaskularisations-Assay

Die aufkonzentrierten Proteinlösungen aus der Affinitätsaufreinigung mit Ni-NTA-Agarose (2.7.7) wurden durch Dialyse mit den Slide-A-Lyzer[®] Dialyse Kassetten in nativem Puffer (in 1 l 1 x PBS über Nacht bei 4 °C; 2 x 3 h in 1 l 1 x PBS; 4 °C) umpuffert. Das WND-Protein wurde anschließend lyophilisiert und in einem Kooperationsprojekt für einen Cornea-Vaskularisations-Assay in Ratten eingesetzt.

2.8 Datenbankanalysen und Computerprogramme

In dieser Arbeit wurden folgende Datenbanken und Computerprogramme verwendet:

Tabelle 49: Datenbanken und Computerprogramme

Datenbank / Softwarepaket	Internetadresse / Hersteller
ABI PRISM Sequence Detection System Software	Applied Biosystems
ABI PRISM [®] DNA Sequencing Analysis Software v 3.7	Applied Biosystems
RZPD – resource center/primary database)	http://www.rzpd.de/
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org/
Excel	Microsoft
GCG sequence analysis package	Genetics Computer Group (GCG); now Accelrys
ImaGene [™] ; Mikroarray Image processing Software	BioDiscovery
IP lab Spectrum	Scanalytics
Mouse genome informatics (MGI)	http://www.informatics.jax.org/
NCBI - National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
OMIM [™] -Online Mendelian Inheritance in Man [™]	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM
Primer3-Primerdesign	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
SeqScape [®] Software v1.1	Applied Biosystems
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/