

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Enzyme, Vektoren, Nukleotide

Enzyme, Restriktionsendonukleasen, Polymerasen stammten von GIBCO/BRL, New England Biolabs, Boehringer Mannheim oder Perkin Elmer.

An Vektoren wurden pBlueScript der Firma STRATAGENE, Heidelberg, und pCRII-TOPO (Invitrogen, Groningen, NL) benutzt.

Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) stammten von der Firma Boehringer Mannheim, <sup>32</sup>P-markierte Nukleotide wie [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]-dCTP von den Firmen DuPont NEN (Bad Homburg) und Amersham Lifescience (Freiburg).

Oligonukleotide zur Sequenzierung, Hybridisierung oder Verwendung in der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin) synthetisiert.

#### 2.1.2. Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

#### 2.1.3. Stammlösungen und Nährlösungen

20 x SSC Lösung:

3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat, pH 7,5

10% (w/v) SDS Lösung:

100 g Natriumdodecylsulfat ad 1000 ml Aqua dest.

50 x Denhardt's Lösung:

10 g/l Ficoll 400, 10 g/l Polyvinylpyrrolidone, 10 g/l BSA (Fraktion V)

50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer:

2 M Tris-Base, 1 M Na-Acetat, 50 mM EDTA, pH 7,2

Luria-Bertani (LB)-Nährlösung:

10 g/l Bactotryptone, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, (+1,5% Agar)

10 x Tris-EDTA-Lösung, pH 8,0:

100 mM Tris-Cl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)

SM-Lösung:

NaCl 5,8 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2 g, 1 M Tris-Cl (pH 7,5) 50 ml, 2%ige Gela-  
tinelösung 5 ml ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

SOC-Nährlösung:

Trypton 20 g, Hefeextrakt 5 g, NaCl 0,5 g, 1 M Glukoselösung 20 ml ad  
1000 ml H<sub>2</sub>O

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Herstellung von Agarosegelen, Elektrophorese

Agarose wurde in Konzentrationen von 0,7 – 1,5% (w/v) durch Erwärmen in einer entsprechenden Menge TAE-Puffer in Lösung gebracht. Kurz vor Erstarren des Gels wurde dieses in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gegeben und mit TAE-Puffer bedeckt.

Die mit Probenpuffer versetzten DNA-Proben wurden in die vorbereiteten Probenschlitz aufgetragen und durch Anlegen eines elektrischen Feldes von 10 V/cm aufgetrennt. Als Größenvergleich wurde ein 1 kb-DNA-Größenstandard (GIBCO/BRL) mitgeführt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel unter ultraviolettem Licht betrachtet und fotodokumentiert.

### 2.2.2. Gel-Extraktion von DNA

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die Methode nach Vogelstein et al.<sup>30</sup> benutzt: In Anwesenheit von NaJ bindet DNA mit hoher Affinität an Glaspartikel und kann so rasch extrahiert werden.

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus einem 1%igen Agarosegel herausgeschnitten, mit dem dreifachen Volumen 6 M NaJ versetzt und bei 50°C bis zum Schmelzen der Agarose inkubiert. Es wurde 5 – 10 µl Glassmilch hinzugegeben, kurz geschüttelt und noch mal für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (10000 x g, RT, 2 s) wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet dreimal mit je 500 µl Waschlösung gewaschen (50% Ethanol, NaCl, Tris, EDTA) und

zentrifugiert (10000 x g, 2 s), der Überstand jeweils verworfen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und mit TE-Puffer resuspendiert. Durch die niedrigere Salzkonzentration dissoziiert die DNA von den Glaspartikeln, so daß nach nochmaliger Zentrifugation (10000 x g, 5 s) der DNA enthaltende Überstand abpipetiert werden konnte.

### 2.2.3. *Southern Blot*

Vor dem Southern Blot<sup>31</sup> erfolgte eine restriktionsenzymatische Spaltung der DNA und eine größenfraktionierte Auftrennung auf einem 0,7%igen bis 1%igen Agarosegel. Nach Denaturierung der DNA durch 0,25 M HCl für 8 min und anschließender Neutralisierung durch 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl sowie 0,5 M Tris (pH 7,5) und 3 M NaCl für jeweils 30 Minuten wurde die DNA auf eine Nylonmembran (Hybond N oder N<sup>+</sup>, Amersham, Braunschweig) mit 20 x SSC als Trägerlösung transferiert. Durch Kapillarkräfte wurde die DNA aus dem Agarosegel in ca. 12 – 16 Stunden fast komplett auf die Nylonmembran übertragen. Danach erfolgte eine Fixation der übertragenen DNA auf der Nylonmembran durch Vernetzung mit ultraviolettem Licht (UV-crosslinking, 1200 J) (Stratalink, Stratagene, Heidelberg) oder Hitze-fixation bei 80°C über 1 Stunde.

Zur Identifikation der DNA-Fragmente wurden [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-markierte- oder Digoxigenin-markierte DNA-Sonden benutzt.

### 2.2.4. *Markierung synthetischer Oligonukleotide mit [ $^{32}\text{P}$ ]-dCTP*

Nach Vorlage der entsprechenden Oligonukleotide und Puffer wurde mit terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) am 3'-Ende mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP für 30 Minuten markiert. Der Reaktionsstop erfolgte durch Zugabe von EDTA-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,02 M.

Die Aufreinigung des markierten Oligonukleotids wurde mit vorgefertigten Polyacrylamidgel Bio-Spin P-30 Columns (Biorad, München) oder vorgefertigten Sephadex G25 Säulen (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Eine Kontrolle der Reaktion erfolgte gelelektrophoretisch vor und nach Aufreinigung.

### 2.2.5. *Random priming von cDNA-Sonden*

Die zu markierende DNA-Sonde wurde 2 Minuten lang bei 96 °C denaturiert. Dann erfolgte durch Zugabe des Reaktionsgemischs (dATP, dTTP, dGTP und [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP, Puffer, modifiziertes „Klenow“-Fragment der DNA-Polymerase-I) und Inkubation für 30 Minuten bei 37°C der Einbau der radioaktiven Nukleotide. Nach Stop der Reaktion durch Hinzufügen von EDTA zu einer Endkonzentration von 20 mM erfolgte die Aufreinigung über vorgefertigte Polyacrylamidgel Bio-Spin P-30 Columns (Biorad, München) oder Sephadex G25 Säulen (Pharmacia, Freiburg).

Zur Kontrolle der erfolgreichen Markierung bzw. Aufreinigung wurde jeweils eine 1  $\mu\text{l}$  Probe vor und nach Aufreinigung gelelektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographiert. Hiermit ist sowohl ein erfolgreicher Einbau der [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTPs als auch eine erfolgreiche Aufreinigung der Sonde zu erkennen.

### 2.2.6. *Markierung synthetischer Oligonukleotide mit Digoxigenin-markiertem dUTP*

Zur Markierung von Oligonukleotiden mit Digoxigenin-markiertem dUTP (DIG Oligonukleotide Tailing Kit, Boehringer, Mannheim) wurden DIG-UDP und dATP im Verhältnis 1:10 zu 100 pmol des Oligonukleotids gegeben und mit 50 U TdT versetzt und für 15 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit Glykogen/EDTA-Lösung versetzt. Das EDTA dient dem Stoppen der Reaktion, das Glykogen der Ko-Präzipitation des markierten Oligonukleotids. Danach erfolgte eine Ethanol-Präzipitation für 30 min bei -80°C und anschließende Zentrifugation bei 12000 x g. Nach erneutem Waschen des Pellets mit Ethanol und Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur wurde dieses in 20  $\mu\text{l}$  sterilem bidestillierten Wasser resuspendiert.

Zur Kontrolle der Markierungs-Reaktion wurde eine Probe des mitgelieferten Kontroll-Oligonukleotids mitgeführt, das hinterher mit entsprechender Kontroll-DNA hybridisiert und detektiert wurde.

### 2.2.7. *Detektion hybridisierter Digoxigenin-markierter Oligonukleotide*

Die Detektion der Digoxigenin-markierten Oligonukleotide erfolgte durch das mit alkalischer Phosphatase konjugierte Fab-Fragment eines spezifischen Anti-Digoxigenin-Antikörpers. Die alkalische Phosphatase bewirkt nach Zugabe des Substrats CSPD (Dinatrium-3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)-

tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-yl)phenylphosphat) dessen Dephosphorylierung, was mit einer Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 477 nm einhergeht. Dieses kann mit einem Röntgenfilm detektiert werden (Kodak Biomax).

Nach Hybridisierung und stringentem Waschen der Nylonmembran sowie nach entsprechender Vorbereitung der Membran mit Blockierungslösung (Blocking reagent, Cat# 1096176, Boehringer, Mannheim) zur Vermeidung unspezifischer Antikörper-Bindungen erfolgte die Inkubation mit anti-Digoxigenin-Fab-alkalische-Phosphatase-Konjugat (DIG Luminescent Detection Kit, Boehringer, Mannheim) für 30 min.

Nach anschließendem Waschen und Equilibrieren der Membran (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) erfolgte die Inkubation mit CSPD-Lösung für 5 min. Zur Verstärkung der Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte hierauf noch eine Inkubation bei 37°C für 15 min.

#### 2.2.8. *Hybridisierung von Membranen mit markierten Oligonukleotiden*

Die Hybridisierung von auf Membranen transferierten Kolonien oder Plaques sowie Southern Blots wurde für [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-markierte bzw. Digoxigenin-markierte Oligonukleotide und [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-markierte cDNA in identischer Weise durchgeführt.

Es erfolgte eine Vorhybridisierung der in Folie eingeschweißten Membranen in 6 x SSC, 5 x Denhardt's, 0,5% SDS, 0,01 M EDTA und 100  $\mu\text{g/ml}$  Lachssperma-DNA zur Vermeidung unspezifischer Bindung der markierten DNA für 2 Stunden. Danach erfolgte der Austausch der Hybridisierungslösung und die Zugabe der markierten Hybridisierungs-DNA und Inkubation für 4 bis 10 Stunden, falls nicht anders angegeben.

Oligonukleotide wurden bei einer Temperatur von 58°C und cDNA-Fragmente bei einer Temperatur von 65°C hybridisiert.

Nach der Hybridisierung der Membranen erfolgten zwei Waschschrte mit 2x SSC, 0,1% SDS und 0,2x SSC, 0,1% SDS Lösung für jeweils 10 Minuten zur Entfernung überschüssiger, nicht hybridisierter Oligonukleotide.

### 2.2.9. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion erfolgte durch Vorlage der DNA und Hinzugeben des PCR-Gemisches (Puffer, dNTP in einer Endkonzentration von 200  $\mu$ M, Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1,0  $\mu$ M,  $MgCl_2$  in einer Endkonzentration von 2,0 mM, je 0,5 U AmpliTaq-DNA-Polymerase pro Reaktion). Das Reaktionsvolumen betrug 20  $\mu$ l oder 100  $\mu$ l, jeweils entsprechende Mengen steriles bidestilliertes Wasser wurden dem PCR-Gemisch zugegeben.

Vor der eigentlichen PCR-Reaktion wurde die zu amplifizierenden DNA bei 96°C für 60 s denaturiert und auf Eis plaziert. Danach erfolgte die Zugabe des PCR-Gemischs. Es wurden 35 Zyklen mit folgendem Ablauf durchlaufen: Binden (annealing) der Primer bei Temperaturen zwischen 54°C und 65°C (je nach Primerpaar) für 120 s, Synthese der komplementären DNA-Stränge bei 72°C für 120 s, Denaturierung der DNA-Stränge bei 96°C für 60 s. Nach Durchlaufen der 35 Zyklen wurde ein letzter Schritt (final extension) für 10 Minuten bei 72°C zur Komplettierung der DNA-Synthese durchgeführt, danach erfolgte das Abkühlen der Proben auf 4°C.

Die Kontrolle der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels.

### 2.2.10. Isolation genomischer $\lambda$ -Phagen-Klone

Zur Isolation genomischer Phagenklone des *cd30*-Gens wurde eine aus genomischer, humaner, plazentarer DNA hergestellte Phagenbank (Lambda Fix II Human Placenta Library, Stratagene, Heidelberg) mit verschiedenen [ $\alpha^{32}P$ ]-dCTP markierten synthetischen Oligonukleotiden, die homolog zu bestimmten bekannten Sequenzen der CD30-DNA sind, hybridisiert. Als Wirts-Bakterienstamm wurde XL1blue (MRA) benutzt.

Die Genbank wurde auf Agarplatten ausplattiert und die Phagenplaques durch Auflagen der Nylonmembranen (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham, Braunschweig) übertragen. Nach alkalischer Lyse (0,5 M NaOH, Raumtemperatur) der Phagen und Fixation wie unter 2.2.3 beschrieben wurden die Nylonmembranen mit den [ $\alpha^{32}P$ ]-markierten Oligonukleotiden über Nacht hybridisiert.

Nach Waschen der Membranen konnten die mit dem Oligonukleotid hybridisierten Plaques autoradiographisch nachgewiesen werden. Diese Plaques wurden

isoliert und erneut hybridisiert, bis ein einzelner Klon ohne Kontamination durch andere Klone isoliert war.

Folgende synthetische Oligonukleotide wurden zum Screening verwendet:

(Position relativ zum Startkodon der Translation im 1. Exon des *cd30*-Gens)

Sequenz des Oligonukleotids	Position
5'-GTGTCAGGGACAGGAACTACTCACATTTTCACCGT	-550 bis -515
5'-GCCTACCTGCGGGCCCGTCGGGGTCCTGGGCAG	+359 bis +392
5'-CCGATCCGCGTCCGGCAAAGCAACGCTGTGGATTG	+601 bis +636

### 2.2.11. Isolation genomischer CD30-Klone aus Cosmid-Banken

Neben der Isolation von genomischen CD30-Klone aus Phagenbanken erfolgte das Durchsuchen einer Cosmidbank (Stratagene, Heidelberg).

Hierzu wurde die Cosmidbank mit einer durch random priming [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP-markierten CD30-cDNA-Sonde hybridisiert.

Nach Ausplattieren der Cosmidbank auf Agarplatten mit nahezu konfluentem Kolonie-Wachstum wurden diese durch Auflegen von Hybond N-Nylonmembranen (Amersham, Braunschweig) auf diese übertragen. Nach alkalischer Lyse (0,5 M NaOH, 10% SDS) der Bakterien und Hitze-fixation der DNA bei 80°C für 90 Minuten wurden die Nylonmembranen mit der [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP-markierten CD30-cDNA-Sonde in Folie eingeschweißt und über Nacht bei 65°C in einem Wasserbad bei leichter Rotation hybridisiert.

Nach Waschen der Membranen konnten positive Kolonien autoradiographisch nachgewiesen werden. Positive Kolonien wurden erneut hybridisiert bis ein einzelner Klon ohne Kontamination mit anderen Klonen vorlag.

Dann erfolgte eine Präparation des Cosmids und eine Klonierung des genomischen Inserts des Cosmids in zur Sequenzierung geeignete Vektoren.

### 2.2.12. Isolation von *cd30*-Gen-Fragmenten mit Langstrecken-Polymerasekettenreaktion (LR-PCR) aus genomischen Genbanken

Humane genomische DNA wurde mit fünf verschiedenen Restriktionsenzymen (6bp-Erkennungssequenz, glatte Enden (blunt ends)) gespalten, die entstandenen Fragmente werden mit einem speziellen Adapter (spezifische Nukleinsäuresequenz) li-

giert (human GenomeWalker genomic library, Clontech, Heidelberg). Passend zu diesem Adapter werden zwei verschiedene Primer synthetisiert. Anhand eines schon bekannten Sequenzabschnitts des gesuchten Gens wurden zwei weitere Primer synthetisiert, die zusammen mit den Adapter-Primern für eine *Langstrecken-PCR* (long range nested PCR, LR-PCR) verwendet wurden. Das PCR-Produkt wird also zwischen dem Primer des bekannten Sequenzabschnitts und dem unbekanntem Sequenzbereich mit dem Adapter synthetisiert. Bei der primären PCR-Reaktion werden die äußeren Primer verwendet, zur Reamplifikation und Spezifitätserhöhung wird dann am Produkt der ersten PCR die sekundäre PCR mit den weiter innen liegenden Primerpaaren durchgeführt (nested-PCR).

Folgende Gen-spezifische Oligonukleotide wurden benutzt:

I1GSP-1	5' – gCA gCg gTA ACA gCA CCT CCT gAC Ag – 3'
I1GSP-2	5' – gTC ATA gTA gTg gCT ggg gTT TCC AT – 3'
I4GSP-1	5' – ggg TAT gCC CgT gCT gAC gCA ATg AT – 3'
I4GSP-2	5' – ATT ggT gCC AAA CgT AAT CAC gTT CT – 3'

Zur Durchführung der PCR wurde ein Polymerasegemisch aus zwei thermostabilen DNA-Polymerasen, Tth- (primäre Polymerase zur Extensionssynthese) und Vent-Polymerase (3'-5' Exonukleasefunktion zur Fehlerkorrektur falsch eingebauter Nukleotide) benutzt (Advantage Genomic PCR, Clontech, Heidelberg). Zusätzlich ist der Polymerasemix mit einem Tth-Start Antikörper versehen, der durch den ersten Denaturierungsschritt inaktiviert wird, die Tth-Polymerase dadurch funktionsfähig macht und somit einen Warmstart (hot start) zur Verminderung unspezifischen Hintergrunds ermöglicht.

Die nested-PCR Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen (im Thermocycler PerkinElmer 9600) durchgeführt: Denaturierung 94°C für 60 s, 7 Amplifikationszyklen mit 72°C Anlagerungstemperatur für 3 min, Denaturierung bei 94°C für 2 s, danach 32 Amplifikationszyklen mit 67°C Anlagerungstemperatur für 3 min, Denaturierung bei 94°C für 2 s, abschließend 67°C für 4 min, danach Abkühlung auf 4°C.



Die erhaltenen *cd30*-Genfragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Gel-Extraktion in den pCRII-TOPO Vektor (Invitrogen, Groningen, NL) kloniert.

Die polymorphe Region des *cd30*-Gens wurde ebenfalls mit der Langstrecken-PCR amplifiziert. Neben der oben genannten Tth-Polymerase wurde auch die Kombination Taq- und Pwo-Polymerase benutzt. Die Reaktionsbedingungen entsprechen den oben genannten und wurden teilweise für die zweite Anlagerungstemperatur im Bereich zwischen 58°C bis 68°C modifiziert. Folgende spezifische Oligonukleotidpaare wurden verwendet: :

TGGTTCTGTCATTATCACAGGC und TGTGGGAAGGCTCGTAGC (Position -1390/-1369 und 333/316), GGCCACCCTTAATTAGAGC und TGTGGGAAGGCTCGTAGC (Position -1029/-1010 und 333/316), TGAGAACATAGTACGAGGAGGC und TGTGGGAAGGCTCGTAGC (Position -814/-793 und 333/316), GGGAAATAAAATGATCTATAACC und TGTGGGAAGGCTCGTAGC (Position -720/-699 und 333/316), TGGTTCTGTCATTATCACAGGC und ACTTCAGGCTCCAGCACACT (Position -1390/-1369 und 164/145), TGAGAACATAGTACGAGGAGGC und ACTTCAGGCTCCAGCACACT (Position -814/-793 und 164/145), GGGAAATAAAATGATCTATAACC und ACTTCAGGCTCCAGCACACT (Position -720/-699 und 164/145), TGGTTCTGTCATTATCACAGGC und CACCTAGTCCGCACCCAACG (Position -1390/-1369 und 133/114), GGCCACCCTTAATTAGAGC und CACCTAGTCCGCACCCAACG (Position -1029/-1010 und 133/114), TGAGAACATAGTACGAGGAGGC und CACCTAGTCCGCACCCAACG (Position -814/-793 und 133/114), sowie GGGAAATAAAATGATCTATAACC und CACCTAGTCCGCACCCAACG (Position -720/-699 und 133/114) (Die Positionen der Oligonukleotide sind entsprechend der bei EMBL hinterlegten Sequenz mit der Zugriffsnummer (Acc. No.) AJ289159 angegeben).

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und in den pCRII-TOPO Vektor kloniert.

### 2.2.13. *Präparation der DNA eines Phagenklons*

Zur Maxipräparation eines Phagenklons wurden Flüssigkulturen benutzt. Hierzu wurden 250 ml LB-Nährlösung mit 1 ml frisch kultivierten XL1blue-(MRA)-Bakterien versetzt und bei 37°C und 300 Umdrehungen/min in einem Schüttler unter photometrischer Kontrolle bis zu einer Dichte von  $OD_{600} = 0,5$  wachsen gelassen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Inokulation mit  $10^{10}$  PFU (Plaque forming units, Plaque bildende Einheiten) des Phagenklons. Unter weiterer photometrischer Kontrolle erfolgte das Wachstum bis zur Lyse der Bakterienzellen. Eine komplette Lyse wurde durch Zugabe von Chloroform in einer Konzentration von 1 µl/ml Kultur und weitere zehnmütige Inkubation bei 37°C im Schüttler erreicht.

Die Präparation der Phagen-DNA erfolgte mit zwei unterschiedlichen Methoden, zum einen über einen CsCl-Gradienten und Ultrazentrifugation, zum anderen über eine Anionenaustauschchromatographie.

#### *CsCl-Gradient und Ultrazentrifugation*

Die lysierten Kulturen wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und mit DNase I und RNase, entsprechend einer Endkonzentration von 1 µg/ml, versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt dient zum Abbau der von den Bakterien freigesetzten Nukleinsäuren, da ansonsten in der viskösen Lösung eine größere Anzahl von Phagenpartikeln festgesetzt würde.

Im nächsten Schritt erfolgte im Rührer die Zugabe von NaCl zu einer Endkonzentration von 1 M, danach die Inkubation auf Eis für 60 Minuten. Durch die Zugabe von NaCl dissoziieren die Phagenpartikel von Bakteriendebris, hierdurch wird eine effiziente Präzipitation im nächsten Schritt ermöglicht. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 11000 x g für 10 Minuten bei 4°C zum Entfernen des bakteriellen Zelldebris.

Zum klaren Überstand wurde Polyethylenglycol (PEG 8000) in einer Endkonzentration von 10% (w/v) zugegeben und unter Rühren bei Raumtemperatur aufgelöst. Danach erfolgte eine Inkubation auf Eis für 60 Minuten zum Präzipitieren der Phagenpartikel.

Durch erneute Zentrifugation bei 11000 x g für 10 Minuten bei 4°C wurde das Phagenpräzipitat pelletiert, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde vorsichtig in 8 ml SM-Puffer resuspendiert.

Zum Entfernen des PEG wurde ein gleiches Volumen Chloroform (ca. 8 ml) zugegeben und für 30 s geschüttelt. Die organische Phase wurde von der wässrigen durch Zentrifugation bei 3000 x g für 15 Minuten bei 4 °C getrennt. Die wässrige Phase enthielt nun die Phagenpartikel und wurde vorsichtig abpipettiert.

Pro Milliliter des erhaltenen wässrigen Überstands wurde 0,5 g CsCl zugegeben und vorsichtig aufgelöst. Beginnend mit der größten Dichte wurden ca. 2 ml einer 1,7, 1,50 und 1,45 g/ml dichten CsCl Lösung in einem Beckmann Ultrazentrifugenröhrchen aufgeschichtet.

Als nächstes erfolgte die Ultrazentrifugation in einer Beckmann Zentrifuge mit dem SW41 Rotor bei 22000 RPM (60000 x g) für 2 Stunden bei 24°C. Nach der Ultrazentrifugation sind die Phagenpartikel am Übergang des 1,45 zum 1,50 g/ml dichten CsCl als bläulich schimmernde Bande zu erkennen. Die Bande wurde mit einer Kanüle abgenommen und zur besseren Aufreinigung auf eine 1,50 g/ml dichte CsCl Lösung gegeben und bei 33000 RPM (200000 x g) bei 24°C erneut in einer Beckmann Zentrifuge in dem Rotor SW50.1 für ca. 14 – 16 Stunden ultrazentrifugiert. Die Phagenpartikel wurden wie oben geschildert nach der Zentrifugation asserviert.

Das CsCl wurde durch zweimalige einstündige Dialyse im tausendfachen Volumen eines 10 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH 8,0), 10 mM MgCl<sub>2</sub> enthaltenden Puffers entfernt.

Zum Entzug der Mg<sup>2+</sup>-Ionen und der dadurch bedingten Dissoziation der Phagenhülle wurde die Suspension mit EDTA in einer Endkonzentration von 20 mM versetzt. Durch Zugabe von Proteinase K in einer Konzentration von 50 µg/ml und SDS in einer Endkonzentration von 0,5% erfolgte nach vorsichtigem Schütteln die Inkubation bei 56°C für 1 Stunde zum weiteren Abbau der Phagenhülle.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Trennung der Phagen-DNA von Phagendebris durch Phenol/Chloroform-Extraktion. Dazu wurde ein gleiches Volumen Phenol (pH 8,0) zur Phagensuspension gegeben und vermischt. Nach Zentrifugation bei 3000 x g für 5 Minuten zur Separation der Phasen wurde die wässrige

Phase abpipettiert. Anschließend wurde in ähnlicher Weise eine Phenol/Chloroform und abschließend eine Chloroform-Extraktion vorgenommen.

Die erhaltene klare, wäßrige Phase mit der Phagen-DNA wurde zuletzt nach Zugabe von NaOAc (pH7,0) in einer Endkonzentration von 0,3 mM mit dem zweifachen Volumen von 70%igem Ethanol gefällt. Die ausgefällte DNA wurde nochmals mit Ethanol gewaschen und nach Trocknen über Nacht bei 4°C in TE (pH 7,6) Puffer resuspendiert.

Die erhaltene DNA Menge wurde photometrisch bestimmt, zur Kontrolle wurde nach Restriktionsenzymverdau mit Not I eine Auftrennung auf einem 0,7%igen Agarsegel vorgenommen.

#### *Anionenaustauschchromatographie*

Hier erfolgte die Aufbereitung der Phagen-DNA über einen optimierten Polyethylenglycol-(PEG)-Präzipitationsschritt, gefolgt von einer Anionenaustausch-Chromatographie (Lambda Kit, Qiagen, Hilden).

Die lysierte Kultur wurde bei 11000 x g, 4°C für 10 min zentrifugiert, um Zelldebris zu entfernen. Der die Phagenpartikel enthaltende Überstand wurde mit 20 mg Rnase A und 6 mg DNase I versetzt, um die freien Bakterien-Nukleinsäuren zu degradieren. Um die Phagenpartikel zu vernetzen und damit pelletierbar zu machen, wurde der Überstand mit 6% (w/v) PEG 6000 versetzt. Nach sechzigminütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 11000 x g, 4°C, 10 min und Verwerfen des Überstands. Das Pellet wurde in 25 mM EDTA Lösung resuspendiert, anschließend mit 4% (v/v) SDS-Lösung versetzt und zur Lyse der Phagenpartikel für 20 min bei 70°C inkubiert und auf Eis gesetzt. Danach wurde durch KOAc in einer Endkonzentration von 1 M Phagendebris ausgefällt. Der Überstand wurde zweimal bei 15000 x g, 4°C für 10 min zentrifugiert, so daß ein partikelfreies, klares Lysat entstand.

Mit Hilfe der vorgefertigten Chromatographiesäule wurde die DNA aus dem Lysat separiert. Hierzu wurde die Säule mit 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol und 0,15% Triton X-100 equilibriert, das Lysat aufgebracht und anschließend zum Reinigen der DNA mit 1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol gewaschen. Die Eluierung der DNA erfolgte mit einem Puffer mit 1,5 M NaCl, 50 mM Tris-HCL (pH

8,5), 15% Ethanol, das Eluat wurde aufgefangen und Ethanol-präzipitiert. Die Resuspension erfolgte in sterilem TE-Puffer.

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

#### *2.2.14. Klonierung von DNA-Fragmenten in pBlueScript*

Geeignete DNA-Fragmente der Phagenklone wurden auf Grund der vorliegenden Southern Blot Ergebnisse durch Restriktionsverdau hergestellt, auf einem Agarosegel aufgetrennt, anschließend aufgereinigt und in einen passend geschnittenen pBlueScript-Vektor mittels T4-Ligase kloniert.

Die Kontrolle der Ligation und der Klonierung erfolgte mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese.

#### *2.2.15. Klonierung von PCR-Fragmenten in den pCR II-TOPO Vektor*

Das Topoisomerase-Klonieren ermöglicht das direkte Einklonieren eines *Taq*-Polymerase-amplifizierten PCR-Produkts in einen Vektor. Hierbei macht man sich das Prinzip zunutze, daß *Taq*-Polymerase eine Template-unabhängige terminale-Transferase-Aktivität besitzt, die an das Ende eines PCR Produkts ein einzelnes Desoxyadenosin anhängt. Der linearisierte pCR II-TOPO Vektor (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, NL) besitzt an seinen Enden einen Thymidinüberhang, versehen mit kovalent gebundener Topoisomerase-I. Die Ligaseaktivität der Topoisomerase-I sorgt für eine hocheffiziente spontane Ligation des PCR Produkts mit dem Vektor.

Für die Klonierungsreaktion wurden 1 - 2 µl frisch hergestelltes PCR-Produkt mit 1 µl pCR II-TOPO Vektor in einem Gesamtvolumen von 5 µl zusammengebracht, die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 5 min, danach sofortige Plazierung auf Eis.

#### *2.2.16. Transformation von kompetenten E. coli Zellen (TOP10)*

Zur Transformation der kompetenten TOP10 Zellen wurden diese zuerst auf Eis aufgetaut und resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl TOP10 zu 10 µl des Ligationsansatzes, Inkubation auf Eis für 30 min. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 45 s erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis für 120 s. Hiernach Zugabe

von 500 µl SOC-Medium und Inkubation bei 37°C für eine Stunde bei sanftem Schütteln. Nach kurzer Pelletierung (20 s, 13000 x g) wurden 500 µl des Überstands abgenommen und das Pellet vorsichtig resuspendiert.

Die transformierten TOP10 Zellen wurden nun in zwei verschiedenen Konzentrationen auf Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin LB-Medium ausplattiert.

pBlueScript enthält ein durch IPTG induzierbares LacZ-Gen, das zusammen mit dem  $\beta$ -Galactosidase-Genprodukt in Anwesenheit von X-Gal Kolonien blau färbt. Bei erfolgreicher Klonierung befindet sich ein inseriertes DNA-Fragment im pBlueScript-Vektor, wodurch das LacZ-Gen zerstört wird und die Kolonien nicht blau gefärbt, sondern weiß erscheinen. Zur erfolgreichen Blau-Weiß-Selektion der Kolonien wurden die Agarplatten vorher mit X-Gal- und IPTG-Lösung in einer Konzentration von 40 mg/ml bzw. 100 mM behandelt. Die Selektion der positiven Klone erfolgte durch die Ampicillinresistenz des pBlueScript-Vektors und die Blau-Weiß-Selektion der transformierten TOP10 Zellen.

Nach Inkubation der Agarplatten bei 37°C für 14 bis 16 Stunden wurden einzeln stehende weiße Kolonien in 5 ml Ampicillin-LB-Medium übertragen und erneut über 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Kontrolle der Plasmide erfolgte nach der Plasmidpräparation entweder durch restriktionsenzymatische Spaltung und Auftrennung auf einem 1%igen Agarosegel oder durch direkte Sequenzierung des Inserts des Vektors.

#### *2.2.17. Plasmidpräparation*

Zur Präparation der Plasmid-DNA aus den angelegten Flüssigkulturen wurde eine Kombination aus alkalischer Lyse<sup>32</sup> und Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine Silica-Matrix benutzt (Quantum Prep, Bio-Rad, München).

Die 2 ml Flüssigkulturen wurden bei 12000 x g, RT für 30 s pelletiert, der Überstand verworfen und die Bakterienzellen in 200 µl 10 mM EDTA resuspendiert. Danach wurden 250 µl Lysierungslösung (0,2 M NaOH, 1% SDS) hinzugegeben und gut durchmischt. Durch diesen Schritt werden die hochmolekulare bakterielle Nukleinsäuren denaturiert wohingegen die zirkuläre Plasmid-DNA intakt bleibt. Durch Hinzufügen von 250 µl Neutralisierungslösung (2,5 M KOAc, 2,5 M HOAc) wird die hochmolekulare bakterielle DNA renaturiert und fällt zusammen mit Zelldebris aus, beides

wird durch Zentrifugation (12000 x g, RT, 5 min) pelletiert und der Plasmid-DNA haltige Überstand (Lysat) abgenommen. Das Lysat wird nun mit 200 µl der Silica-Matrix-Suspension vermischt (Plasmid-DNA bindet an die Matrix, s. Gelextraktion) und über einen Spin-Filter abzentrifugiert (12000 x g, 30 s, RT). Anschließend erfolgt zweimaliges Waschen der Matrix mit Waschlösung (50% Ethanol, NaCl, Tris, EDTA) mit anschließender Zentrifugation (12000 x g, RT, 2 min). Im letzten Schritt erfolgt die Eluierung der Plasmid-DNA aus der Matrix mit 100 µl bidestilliertem Wasser durch Zentrifugation (12000 x g, RT, 1 min).

### 2.2.18. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente wurde mit dem Sequenzierautomaten 377 (DNA Sequencer, Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) durchgeführt.

Dabei wird die Sequenzierungsreaktion mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotiden (Terminatoren) durchgeführt, die während des Sequenziergellaufs automatisch optoelektronisch von einer Laserabtasteinheit abgelesen werden können. Durch die fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotide kommt es während der DNA-Synthese zum Kettenabbruch. Da der Einbau der markierten Nukleotide zufällig erfolgt, erhält man jeweils um 1 Basenpaar unterschiedlich lange DNA-Fragmente.

Zur Sequenzierung wurden außer den T7 und Sp6 Primern folgende spezifische Oligonukleotide benutzt:

Name:	Sequenz:
i5-75L.seq	5'- TCCCAACCCCCCCCCCGCGC -3'
i5-5074U.seq	5'- AAGGCAGACGGGAGGGGAGTG -3'
i5-4808U.seq	5'- CAGAAAGTGAAGCCAAGACAG -3'
i5-732U.seq	5'- CCTTCCCTTGCCCCCACTCAG -3'
i5-351U.seq	5'- AGGAGGCGGAGGTTACATTGA -3'
i5-34L.seq	5'- GAGAAGCACAGGCCCAACCAG -3'
i5-312L.seq	5'- TGCCTCAGCCTCCCGAATAGC -3'
i5-4479U.seq	5'- GGGGTTTTTGTGTTTTGATAG -3'

i5-4374U.seq	5'- CCTTGCATAGGCTGACTGTTG -3'
i6-2474U.seq	5'- GTTACCCCTACTATTTAGTAC -3'
e7-2722L.seq	5'- GTGGCTGGCTCATTAACCCTC -3'
e6-59L.seq	5'- AGGGAAGGGTACTTACCGTTG -3'
i6-186.seq	5'- TTGTTGAATACCTCTTTCATG -3'
i6-138.seq	5'- TGTCACATCCAAGCATATTCG -3'
i5-4321.seq	6'- CTAAGGCCAGGCCCTGGCCCG -3'
i5-4343.seq	5'- CCCCTGATCTCCCCAGGACCC -3'
i5-4054.seq	5'- TGAGCCTTCGTTTCTGATTTG -3'
i5-4380.seq	5'- ATAGGCTGACTGTTGACTTGG -3'
i6-696.seq	5'- ACCCCAACATCCACAACCTACC -3'
i6-378.seq	5'- AGACGGGGTTTCACTATGTTG -3'
i4-g10b-311.seq	5'- CAGTTTAGTTTTTGATTTTTACAGG -3'
i4-546.seq	5'- GTCCATAACCCACACTCATAAGC -3'
.seq	5'- TGGGGCTGGGGCTGTTTTGTG -3'
rHup.seq	5'- GGTGATCCTGGTGTGGTTGTGGTGGTCGGCTCC -3'
e4up10278.seq	5'- ATCCTGGTGTGGTTGTGGTGGTC -3'
i4low10750.seq	5'- GTCAGTTTAGTTTTGGGTTTTATC -3'
25b-05-565.seq	5'- TTTTAAATTTGGTGGAGACAGAG-3' 5
25b-5-336.seq	5'- AGAGCAGGCCCGGAGTGGTG-3'
415b-66.seq	5'- CTAGTAACGGCCGCCAGTGTGC-3'

### 2.2.19. Auswertung der Sequenzdaten

Die Auswertung der Sequenzdaten und das Zusammensetzen (Alignment) der verschiedenen DNA-Fragmente erfolgte mit dem Programmpaket HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources, EMBL Heidelberg) sowie mit dem Programmpaket *DNASar '99* (Lasergene, München, zeitlich beschränkte Demonstrationsversion).

Der Alignment-Algorithmus vergleicht dabei eine bestimmte DNA Länge (Match size) der ersten Sequenz mit der zweiten Sequenz, um mögliche Überein-



stimmungen zu finden. Dies geschieht unter der Angabe einer Zahl möglicher Lücken (gaps) in der zu vergleichenden und der zusammengesetzten Sequenz, um mögliche Mismatches auszugleichen. Außerdem muß eine minimal erforderliche Übereinstimmung in Prozent (minimal match %) angegeben werden. Dieser Algorithmus findet zuverlässig kleine Übereinstimmungen, wie sie beim Zusammensetzen vieler Sequenzfragmente vorkommen. Gerade bei den Exon-/Intron-Übergängen war dieser Algorithmus jedoch nur mit Einschränkungen oder gar nicht zuverlässig, da bei größeren Exonsequenzen und interponierten Intronsequenzen die eingefügten Lücken meist zu klein waren, um die Übereinstimmung der längeren Sequenzfragmente zu erkennen. Hier mußten Exonsequenzen ohne Hilfe des Computers durch Suchen möglicher Splice-acceptor/Splice-donor Sequenzen in den Intronsequenzen manuell eingefügt werden. Ein danach durchgeführtes computergestütztes Zusammensetzen der Sequenzfragmente bestätigte die manuell eingefügten Sequenzstücke im Vergleich mit der kompletten genomischen Sequenz.