

2 Material

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- Acrylamid (research grade)	Serva, Heidelberg
- Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
- Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
- Bacto-Agar	Difco, Detroit
- Bacto-Trypton	Difco, Detroit
- Borsäure	Merck, Darmstadt
- Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
- Chloramphenicol	Roche, USA
- Desoxycytidin 5'- [α - ³² P] Triphosphat	Amersham, (Braunschweig)
- Desoxyribonukleotide (dNTP's), Ultra-pure	Pharmacia, Upsala
- DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, München
- DNA-Längenstandards (100bp und 1kb Leiter)	Gibco-BRL, Paisley
- DNase I	Boehringer, Mannheim
- Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva, Heidelberg
- Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson Labware, USA
- Filterpapier 3MM	Whatman, Maidstone, Kent
- Ficoll 400	Pharmacia, Uppsala
- Ficoll Separation Solution (Dichte: 1,077)	Seromed, Berlin
- Filme für die Autoradiographie (Kodak MS und - Kodak XOMAT AR)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- Formamid	Serva, Heidelberg
- Glucose	Sigma, München
- Glyzerin	Serva, Heidelberg
- Harnstoff	Sigma, München
- Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Merck, Darmstadt
- Kanamycinsulfat	Sigma, München
- Leucosep Röhrchen	Greiner Labortechnik (Kremsmünster)
- N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
- Mineralöl	Sigma, München
- Mischbettionenaustauscher AG501X8D	BioRad, Richmond
- mRNA Separator Kit	Clontech, Palo Alto (USA)
- Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
- Nylonmembranen Hybond- TM N+	Amersham Pharmacia Biotech
- Nirocellulose-Membran (zur Dialyse) Typ: 0,025 μ m; White VSWP, 25 mm	Millipore Corporation, Bedford
- Pico Green	Molecular Probes, Niederlande
- Phenol, Tris equilibrated pH=8	USB, Cleveland USA
- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, München

- Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, München
- RNAGents [®] Total RNA Isolation System	Promega, USA
- RNAGuard	Pharmacia, Upsala
- Sephadex G50	Pharmacia, Uppsala
- Strip-EZ DNA labelling kit (α [³² P] dATP)	Ambion, USA
- SYBR-Green	Molecular Probes, Niederlande
- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
- Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Pharmacia Biotech
- TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen Niederlande
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma, München
- XGAL (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid)	Boehringer, Mannheim
- Xylencyanol	BioRad, USA
- Yeast Extract	Difco, USA

2.2 Enzyme

- Ex Taq Polymerase	Takara, Japan
- KlenTherm Polymerase	Gene Craft (Deutschland)
- Pyrobest DNA-Polymerase	TaKaRa, Japan
- Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim New England Biolabs (NEB), Frankfurt
- RNase A	Boehringer, Mannheim
- SuperScript [™] II (Reverse Transcriptase)	Gibco-BRL, Paisley

2.3 Medien

- LB-(Luria-Bertani) Medium
 - 10 g Bacto-Trypton
 - 5 g Yeast Extract
 - 10 g NaCl
 - 0,5 ml 2M NaOH
 - 15 g Bacto-Agar
 - ad 1 l Wasser

Nach Bedarf folgte nach Autoklavieren und Abkühlen des Mediums die sterile Zugabe von 100 μ g/ml Ampicillin, 50 μ g/ml Kanamycin oder 12 μ g/ml Chloramphenicol.

- SOB-Medium

20 g Bacto-Trypton
5 g Bacto-Yeast
0,584 g NaCl
0,186 g KCl
ad 1l Aqua dest.

- SOC-Medium

ad 1 l Aqua dest.
1 l SOB
10 ml MgCl₂ (1M) steril
7,2 ml Glucose (50%) steril

2.4 Lösungen und Puffer

2.4.1 Lösungen für die Isolierung von genomischer DNA

- PBS-Puffer (Phosphate buffered Saline)

8 g Na₂HPO₄
0,47 g NaH₂PO₄
2,55 g NaCl
ad 1 l Aqua dest.
pH 7,2

- Extraktionspuffer

0,6 g TRIS
18,6 g EDTA Na-Salz
ad 500 ml Aqua dest.
→ mit NaOH auf pH8 einstellen
2,5 g SDS
5 mg RNase (aus Rinderpankreas)

2.4.2 Lösungen für die Arbeit mit Bakterien

- IPTG-Lösung

100mM IPTG in Aqua bidest:
→Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

- X-Gal-Lösung

20mg/ml X-Gal in Dimethylformamid

- Einfriermedium

30g Glycerin auffüllen auf 100ml mit Aqua dest., je 600 µl in 2ml-Schraubgefäße abfüllen, autoklavieren

- Chloramphenicol-Lösung

12,5 mg Chloramphenicol in 1 ml 7,5%igem Glycerol

2.4.3 Lösungen für die Plasmidisolierung

- Resuspensions-Puffer

6,06 g TRIS
3,72 g EDTA-Na-Salz

→ in 800ml H₂O lösen; pH mit HCl auf 7,6 einstellen und auf 1 l auffüllen danach 100mg RNase zugeben. Aufbewahrung bei 4°C

- Lyse-Puffer

8 g NaOH
100 ml 70%ige SDS-Lösung

→ auffüllen auf 1 l

- Neutralisations-Puffer

294,5 g Kaliumacetat

→ in 500 ml Aqua dest. lösen; pH 5,5 einstellen mit konzentrierter Essigsäure; anschließend mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen; Aufbewahrung bei 4°C

- RNase Stammlösung

10 mg/ml RNase A (Rinderpankreas)
10 mM Tris/HCl pH 7,5
15 mM NaCl

→ 15 Minuten bei 100°C kochen, aliquotiert bei -20°C aufbewahren

- RNase-Lösung

3 µl RNase-Stammlösung
200 mM Tris/Cl
50 mM EDTA

2.4.4 Elektrophoreselösungen

- Acrylamid-Stammlösung (40%)

38,6 % (w/v) Acrylamid
1,4 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

500 ml dieser Lösung wurden mit 3g Mischbettionenaustauscher (AG 501-X8D) 1h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ionenaustauscher über einen Membranfilter (0,45 µm Porengröße) abfiltriert. Die fertige Lösung wurde in einer lichtgeschützten Flasche bei 4°C aufbewahrt.

- Acrylamid-Lösung (10%)

50 ml TBE 10x
125 ml Acrylamid 40%
325 ml ddH₂O

- APS-Lösung (10%)

100 mg Ammoniumpersulfat
→ auf 1ml mit H₂O auffüllen

- Färbelösung

300 ng/ml Ethidiumbromid in 0,25 x TBE

- Ladepuffer für Acrylamid- und Agarose-Gele (5x)

6 g Saccharose
2 g Ficoll
50 mg Bromphenolblau
50 mg Xylencyanol
→ auf 20 ml mit Aqua dest. auffüllen

- Seq-STOP Puffer

95 % Formamid
10 mM EDTA
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

- TBE- (Tris-Borat-EDTA)-Puffer 10 x

108 g Tris
55 g Borsäure
40 ml EDTA (0,5M, pH 9)
→ auffüllen auf 1 l mit H₂O

- TAE-(Tris-Acetat-EDTA)-Puffer 10x

48 g	Tris
11 ml	Eisessig
20 ml	EDTA (0,5 M, pH 7,5)

2.4.5 Lösungen für die Arbeit mit DNA

- Ammoniumacetat-Lösung

8,5 M	Ammoniumacetat
-------	----------------

→ gelöst in Aqua dest.

- EDTA 0,5 M, pH 9

146 g	EDTA Na-Salz
-------	--------------

→ mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen und auf pH 9 einstellen

- Natriumacetatlösung 5x

1,5 M	Natriumacetat in Aqua dest.
-------	-----------------------------

- PMSF-Lösung (Proteinaseinhibitor)

17,4 mg	PMSF
---------	------

→ in 10 ml Isopropanol lösen

- Proteinase-K Stammlösung

20 mg/ml	Proteinase K in Aqua dest.
----------	----------------------------

→ aliquotiert bei -20°C aufbewahren

- TE- (Tris-EDTA)-Puffer 10x

100 mM	Tris/HCl pH 7,5
10 mM	EDTA

2.4.6 Lösungen für Southern-Blotting und Hybridisierungen

- Depurinierungslösung

250 mM	HCl
--------	-----

- Denaturierungspuffer (4x)

2 M	NaOH
4 M	NaCl

- SSC-Puffer (20x)

- | | |
|-------|---------------|
| 3 M | NaCl |
| 0,3 M | Natriumcitrat |
- mit 0,1 M HCl auf pH 7,0 einstellen und durch einen 0,45 µm Membranfilter filtrieren

- STOP-Lösung

- | | |
|-------|-------------|
| 0,5 M | EDTA pH 7,5 |
|-------|-------------|

- Block-Lösung

- | | |
|--------|---|
| 100 ml | TE-Puffer |
| 500 µg | DNA (aus Lachssperma, E.coli, oder menschlicher Plazenta) |

- Hybridisierungslösung nach Church und Gilbert (Church und Gilbert 1984)

- | | |
|-------|----------------------------------|
| 0,5 M | NaH ₂ PO ₄ |
| 1 mM | EDTA |
- auf 190 ml mit Aqua dest. auffüllen; mit 0,1 M NaOH auf pH 7,2 einstellen
- | | |
|-----|-----------|
| 1 % | BSA (w/v) |
|-----|-----------|
- lösen bei 68°C
- | | |
|-----|-----------|
| 7 % | SDS (w/v) |
|-----|-----------|
- lösen bei 68°C
- die Lösung wird warm durch ein 0,8 µm Membranfilter filtriert und als 50 ml Aliquots bei -20°C eingefroren

- SDS-Lösung

- | | |
|------|-------------------|
| 10 % | SDS in Aqua dest. |
|------|-------------------|

2.4.7 Lösungen für die Polymerasekettenreaktion

- Nukleotidmix für PCR 10x

- | | |
|------|------|
| 2 mM | dATP |
| 2 mM | dCTP |
| 2 mM | dGTP |
| 2 mM | dTTP |
- in Aqua bidest. verdünnen und aliquotiert bei -20°C lagern

2.5 Geräte

- Agarosegel-Laufkammern 24 x 19 cm 13 x 10 cm 10 x 8 cm	Gibco BRL Eigenherstellung Pharmacia Biotech
- Blautisch Flu-O-blu	Biozym, Hess. Oldendorf
- Brutschrank für Mikroorganismen	BT5042, Heraeus
- Feinpipetten	Eppendorf
- Gene-Pulser für Elektroporation	BioRad
- Feinwaagen	PC440, Mettler PC4400, Mettler
- Gelkammern	Höfer Scientific Instruments
- Glasgeräte	Schott
- Heizwasserbad	Analytec, Tübingen Julabo Labortechnik, GMBH
- Kippschüttler	Heidolph
- Kühlzentrifuge	Centricon H401, Kontron
- Modell 4000 DNA-Sequencer	Licor
- Lyophilisationsanlage	Christ - Gefriertrocknungsanlagen, Osterode
- Magnetrührer	Janke&Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen
- Netzgeräte	Biorad 500/200 Consort E 554 P24 Biometra
- Polyacrylamidgelelektrophorese	2001, LKB
- Photometer	Uvicon 820, Kontron LP1 (560 nm), Dr. Lange
- PCR-Stripes	Sarstedt, Nümbrecht
- Schüttler	HAT, Infors
- Spectro Fluor Plus Microtiterplattenreader	Tecan (Schweiz)
- Thermocycler	Biometra, Göttingen
- Tischzentrifuge	5414S, Eppendorf
- Ultrazentrifuge	Centricon T-2070
- Vortex	Bender&Hobein AG IKA Works, Wilmington

2.6 Oligonukleotide (Primer)

CHIR all Fw01	TGCTCCTGCCTCATGGCA
CHIR all Fw02	TGCCCGACCCTCCCTGT
CHIRA Rv	CACCCGTCTCTAATTTACCGAAA
CHIRB Rv	ACAGTGCCAGTGTGCTCGGTGTGCTCA
KIR 2DL4 bov Fw	GGCCAAGCCCCGTGGT
KIR 2DL4 bov Rv	CCACAATCTCCAGGGGGTCA
M13 Fw IRD-markiert	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13 Rv IRD-markiert	CAGGAAACAGCTATGACC
M13AP Fw	GCTATTACCGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTG
M13AP Rv	CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCG
NKp46 bov Fw	ATGCTCTCGAAACCTGCC
NKp46 bov Rv	TGTTACCACCAGCTCCAGAG
NKp46 mus Fw	ACTCTCCCGAAACCCATCATC
NKp46 mus Rv	GGGGGTTGCTCGACTTIG
PolyT-Smart	GAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
SMART Tag 1	GAAGCAGTGGTAACAACGCAGA
SMART Tag 2	GTGGTAACAACGCAGAGTACTTT

2.7 Sonden

- ILT1-cDNA-Sonde (LILRA2):

Zur Verfügung gestellt von Marco Colonna

- KIR2DL1-, KIR2DL3-, KIR3DL1-, KIR3DL2-Sonden:

Zur Verfügung gestellt von Marco Colonna

- CHIR-A-Sonde:

PCR auf Hühner-cDNA mit den Primerpaaren CHIR_Fw01/CHIRA_Rv

- CHIR-B-Sonde:

PCR auf Hühner-cDNA mit den Primerpaaren CHIR_Fw01/CHIRB_Rv

- ILT2-cDNA-Sonde (LILRB1):

Zur Verfügung gestellt von Hagen Wende

- NKp46-humane Sonde:

Zur Verfügung gestellt von Hagen Wende

- NKp46-murine Sonde:

PCR auf Mäuse-DNA mit den Primerpaaren NKp46_mus_Fw/ NKp46_mus_Rv

- FCAR-Sonde:

Zur Verfügung gestellt von Hagen Wende

2.8 Vektoren

pCR2.1-TOPO, pCR-II-TOPO, pUC18-Kontroll-Vektor; alle Vektoren stammen von der Firma Invitrogen.

2.9 DNA-Bibliotheken

Hühner-BAC-Bibliothek

Hergestellt von Richard Crooijmans (Niederlande).

DNA-Quelle: Blut einer Henne der Rasse „White Leghorn“; Vektor: pECBAC1 (Modifizierung des pBeloBAC11-Vektors); Anzahl Klone: ca. 50000. Durchschnittliche insert-Größe: 130kb. Bakterienstamm: Escherichia coli. DH10B (Gibco/BRL).

Hühner-cDNA-Bibliothek

mRNA aus der Bursa von zwei Wochen alten Küken; Zellen: B-Zellen; Stamm: „CB inbred“; Vektor: pSPORT1; Bakterienstamm: Escherichia coli DH10B (Gibco/BRL).

Anzahl Klone: 55296.

2.10 Gewebe

Spezies:

Huhn (*Gallus gallus domesticus*)

H2LCL (*Homo sapiens*)

Schimpanse (*Pan troglodytes*)

Pavian (*Papio sp.*)

Grüne Meerkatze (*Chlorocebus aethiops*)

Rind (*Bos taurus*)

Schwein (*Sus scrofa*)

Schaf (*Ovis orientalis aries*)

Pferd (*Equus caballus*)

Katze (*Felis catus*)

Hund (*Canis lupus familiaris*)

Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*)

Hamster (*Mesocricetus auratus*)

Ratte (*Rattus norvegicus*)

Maus (*Mus musculus*)

Schlammröhrenwürmer (*Tubifex sp.*)

Fliege (*Drosophila melanogaster*)

Forelle (*Salmo trutta fario*)

Frosch (*Xenopus laevis*)

Gewebe:

Blut

B-lymphoblastoide Zelllinie

B-lymphoblastoide Zelllinie

B-lymphoblastoide Zelllinie

Nieren-Zelllinie

Leber

Blut

Blut

Blut

Blut

Blut

Leber

Leber

Leber

Leber

Ganze Tiere

Zelllinie S2 (Invitrogen)

Leber

Leber, Niere

3 Methoden

3.1 Probengewinnung und –aufarbeitung

Es wurden bei der Schlachtung eines sechs Monate alten Huhnes der Rasse „White Leghorn“ 50 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen aufgefangen. Anschließend wurden die Mononukleären Zellen (MNZ) mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten von Erythrozyten und Plasma abgetrennt. Die erhaltenen Zellen wurden mehrfach in PBS/0,1%BSA bei 4°C gewaschen, in einem kleinen Volumen PBS/0,1%BSA aufgenommen und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die entsprechend benötigte Menge Zellen wurde dann bei der weiteren Verarbeitung (s. Abschnitte 3.2, 3.13) eingesetzt.

Gewebe bzw. Gewebeteile wurden grob zerkleinert, die Zellen mit Hilfe eines Potters aufgeschlossen und wie in Abschnitt 3.2 weiter verarbeitet.

3.2 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit Hilfe der Phenolextraktion sowohl aus Blut (s. Abschnitt 3.1) als auch aus verschiedenen Geweben (s. Abschnitt 2.10 und 3.1) gewonnen. Die dafür verwendeten Zellen wurden nach 5 Minuten Zentrifugation bei 500xg in 1xPBS aufgenommen (ca. 5×10^7 Zellen/ml) und in einen Erlenmeyer-Kolben überführt, in dem bereits Extraktionspuffer (2ml pro 10^7 Zellen) vorgelegt war. Die Suspension wurde unter vorsichtigem Schwenken bei 37°C für eine Stunde lysiert. Im Anschluß wurden 5µl Proteinase-K-Lösung pro Milliliter Gesamtlösung hinzugefügt und der Ansatz für 3 Stunden bei 50°C inkubiert. Dann wurde ein gleichgroßes Volumen Tris-äquilibriertes Phenol (pH 8) hinzugegeben, der Erlenmeyer-Kolben geschwenkt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die DNA-enthaltende, wäßrige Phase durch Zentrifugation (10 Minuten, 3000rpm, 10°C) von der Phenolphase getrennt und mit einer Pipette mit großem Spitzendurchmesser (um Scherkräfte zu vermeiden) in einen neuen Erlenmeyer-Kolben überführt. Eine erneute phenolische Extraktion wurde durchgeführt. Dann wurden 0,2 Volumen 10 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol zugegeben, das Gefäß vorsichtig geschwenkt und die ausgefallene DNA mit einem Glashaken herausgeangelt. Es erfolgte ein Waschschrift mit 70% Ethanol, die Überführung in 1 x TE und eine weitere Fällung mit 0,2 Volumen 3M Natriumacetat und 2 Volumen Ethanol. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 70% Ethanol, die Trocknung, und das Lösen der DNA in 1 x TE.

3.3 Bakterienkulturen

Bakterien wurden in unterschiedlichen Volumina über Nacht gezüchtet. Es wurden entweder 5 ml- oder 50 ml-Kultur mit LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum angesetzt. Die Bakterienklone wurden mit einer sterilen Impföse entweder aus einer Dauerkultur (s. Abschnitt 3.4) oder direkt von einer Agarplatte angeimpft (s. Abschnitt 3.19). Die Kulturen wurden in einen Schüttler überführt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde, wenn nötig, eine Dauerkultur der Klonen angelegt (s. Abschnitt 3.4).

3.4 Dauerkulturen

Von einer über Nacht inkubierten Kultur wurden 100 µl in ein steriles, 600 µl 30% Glycerin enthaltendes Schraubgefäß überführt, dieses vorsichtig geschwenkt und dann bei -80°C eingefroren.

3.5 Plasmidisolierung

3.5.1 (Mini)- Plasmid-Präparation

Eine 5 ml-Kultur (s. Abschnitt 3.3) wurde bei 4000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, das überstehende Medium verworfen, das Pellet in 300 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 300 µl Lysepuffer hinzugegeben, das Gefäß verschlossen und vorsichtig geschwenkt. Die Probe wurde für 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend wurden 300 µl Neutralisationspuffer hinzugegeben. Die Probe wurde gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann für 30 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt und durchmischt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm für 30 Minuten. Dann wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in 100 µl TRIS (0,2M)/ EDTA (0,5M) gelöst. Es wurden 3 µl RNase A (40 µg/ml) hinzugegeben, die Probe für 20 Minuten bei 37°C inkubiert und eine Ethanol-Fällung (s. Abschnitt 3.7.1) durchgeführt. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde in 30 µl 1xTE aufgenommen und zur weiteren Verwendung entweder bei 4 oder -20°C aufbewahrt.

3.5.2 (Midi)-Plasmid-Präparation

Eine 50 ml-Kultur wurde in ein geeignetes Zentrifugationsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Es erfolgte die Zugabe der drei Präparationspuffer wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, nur betrug das Volumen der einzelnen Puffer 4 ml. Während der

20-minütigen Inkubation auf Eis wurde eine ausgestanzte Fritte (90µm, Mobicol) in eine 20 ml-Spritze verbracht (der Stempel wurde verworfen) und über ein passendes Reaktionsgefäß gehängt. Der Präparationsansatz wurde vorsichtig in die Spritze gegeben und über die Fritte filtriert; dadurch wurde die Plasmid-DNA-Lösung von Proteinen und genomischer DNA getrennt. Das Filtrat wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt (s. Abschnitt 3.5.1). Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Dann wurden 280 µl TRIS (0,2M)/ EDTA (0,05M) und 30µl RNase A (40µg/ml) hinzugegeben und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Ethanol-Fällung (s. Abschnitt 3.7.1). Das Pellet wurde anschließend in 100 µl 1xTE gelöst.

3.6 Restriktionsendonuklease-Verdau

Nach Bestimmung der DNA-Konzentration der zu schneidenden DNA (s. Abschnitt 3.11) wurde eine geeignete Menge in ein Reaktionsgefäß überführt und mit dem für das Enzym passenden 10x-Reaktionspuffer und BSA versetzt. Es folgte die Zugabe von destilliertem Wasser und Restriktionsenzym; von letzterem wurden 2 Units pro µg DNA zugegeben. Dabei wurden jedoch mindestens 1 µl und höchstens ein Zehntel des Gesamtvolumens des Restriktionsansatzes zugegeben. Die Probe wurde gemischt und bei der für das Enzym geeigneten Temperatur für 1,5-2 Stunden inkubiert.

3.7 Fällung von Nukleinsäuren

Fällungen wurden zur Reinigung oder Volumenverringern der verwendeten DNA genutzt.

3.7.1 Ethanol-Fällung

Die zu fällende DNA wurde mit 1/5 Vol 3M Natriumacetat und 2 Vol Ethanol versetzt, für 20 Minuten bei -80°C aufbewahrt und anschließend für 20 Minuten bei 14000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das trockene Pellet wurde in einem geeigneten Puffer (z.B. 1 x TE) oder Wasser aufgenommen.

3.7.2 Isopropanol-Fällung

Bei großen Volumina wurde die Isopropanol-Fällung angewendet. Dabei wurden 1/5 Volumen 1,5M NaOAc und 0,7 Vol. Isopropanol zu der DNA-Lösung zugegeben, die Probe gemischt und für 20 bis 30 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und er-

neut für 20 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert (Achtung: das Pellet löst sich sehr leicht von der Wand des Reaktionsgefäßes). Das getrocknete Pellet wurde in einem geeigneten Volumen Puffer oder Wasser aufgenommen.

3.8 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe. Sie wurde eingesetzt, um Restriktionsverdau zu analysieren oder PCR-Produkte (s. Abschnitt 3.15) nachzuweisen. Welche Art von Elektrophorese verwendet wurde, hing von der Größe der aufzutrennenden Fragmente ab.

3.8.1 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese lassen sich Moleküle einer Größe von 500-20000 Basenpaaren auftrennen; es wurden entweder Gele von 12 x 11 cm Größe verwendet (für eine schnelle Kontrolle von z.B. Restriktionsendonuklease-verdauter DNA, s. Abschnitt 3.6), oder Gele mit einer Größe von 20 x 22 cm (z.B. für Southern-Blotting). Es wurden 0,7 %ige Gele hergestellt und verwendet. Dazu wurde die geeignete Menge Agarose in einem Becherglas abgewogen, mit 1 x TAE aufgefüllt, ein Magnetstäbchen hinzugegeben, das Glas abgedeckt und bis zur völligen Lösung der Agarose in der Mikrowelle erhitzt. Unter Rühren wurde die Agarose auf ca. 60°C abgekühlt und möglichst luftblasenfrei in die entsprechende Gelform gegossen. Vorher wurde ein passender Kamm (11-50 Zähne) in die Gelapparatur eingehängt. Vorhandene Luftblasen wurden vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Nach Erkalten des Geles wurde dieses in die Pufferkammer gegeben und der Kamm vorsichtig gezogen. Dann wurde die Kammer mit 1 x TAE gefüllt und zwar so, daß das Gel vollständig mit Puffer bedeckt war. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen des Ladepuffers versetzt und nacheinander in die Gel-taschen pipettiert. Als Standard wurde in eine Tasche 15 µl eines 1kb-Standards pipettiert.

Für kleine Gele wurde eine Spannung von maximal 120V, für große eine Spannung von maximal 150 Volt angelegt. Für eine besonders gute Auftrennung (wenn das Gel z.B. im Anschluß geblottet werden sollte [s. Abschnitt 3.10]) erfolgte die Elektrophorese über Nacht bei 45 V.

3.8.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von kleinen DNA-Molekülen (50 bis 1000 Basenpaare), die vor allem bei der PCR entstehen (s. Abschnitt 3.15).

Es wurden 10% Acrylamid-Gele hergestellt und verwendet. Dabei wurden in ein Becherglas 30 ml 10 %ige Acrylamid-Lösung, 300µl APS (10%iges Ammoniumpersulfat, nicht älter als eine Woche) und 30 µl TEMED vermischt und dann schnell zwischen zwei in einer Halterung befindliche Glasplatten gegossen. Zuletzt wurde der passende Kamm eingesetzt und die vollständige Polymerisation (30 Minuten) abgewartet. Danach wurde vorsichtig der Kamm gezogen, die Taschen mit 1 x TBE gespült und die mit 1/5 Ladepuffer versetzten Proben mit einer Hamilton-Pipette auf das Gel aufgetragen. Als Standard wurden 15 µl einer 1kb-Leiter aufgetragen. Der Pufferbehälter wurde aufgesetzt, das Gel in die entsprechende Gelkammer mit 1 x TBE gehängt, das Pufferreservoir vorsichtig mit 1 x TBE gefüllt und die Elektrophorese bei 50 Watt für 45 Minuten durchgeführt.

3.8.3 Polyacrylamid-Gel für Sequenzanalysen

Bei der Auftrennung von Sequenzierreaktionen (siehe Abschnitt 3.16) muß die DNA einzelsträngig aufgetrennt werden; dies wird einerseits durch den Zusatz von Harnstoff zum Gel (denaturierendes Gel) und andererseits durch die Erhitzung der Proben auf 95°C kurz vor dem Auftrag erreicht.

Es wurden 4 %ige denaturierende Polyacrylamidgele hergestellt. Dazu wurden 4 ml Acrylamid-Lösung (40 %ig), 4ml 1 x TBE und 20g Harnstoff in ein Becherglas gegeben und auf 40 ml mit Wasser aufgefüllt. Um den Harnstoff zu lösen, wurde die Lösung kurz in der Mikrowelle erwärmt, mit Hilfe eines Magnetrührers gemischt und anschließend entgast. Dann wurden 240 µl APS (10 %ig, nicht älter als eine Woche) und 16 µl TEMED hinzugegeben, vorsichtig gemischt und das flüssige Gel zügig mit einer Spritze durch einen 0,2 µm Membranfilter (Schleicher und Schuell) gegeben und zwischen zwei 40cm lange und 25cm breite Glasplatten gegossen. Es wurde ein „Haifischzahn“-Kamm eingefügt und das Gel mindestens 1 Stunde ruhen gelassen.

Anschließend wurde das Gel in die Laufkammer des Sequenzierapparates (Licor) gegangen und vorsichtig der Kamm gezogen. Nach Beschickung mit 1 x TBE mußte das Gel für 30 Minuten vorlaufen, um eine Temperatur von 50°C zu erreichen (1500 V, 37 mA, 50 W, 50 °C). Anschließend wurden die Taschen gespült und 1 µl der vorbereiteten Sequenzierproben (s. Abschnitt 3.16) mit einer Achtkanal-Hamiltonpipette auf das Gel aufgetragen. Das Gel lief unter den gleichen Bedingungen wie beim Vorlauf für 10 Stunden. Unter diesen Bedingungen war eine Leseweite von 800-1000 Basenpaaren möglich.

3.9 Färbung von Agarose- und Polyacrylamidgelen

Bei Etidiumbromid (EtBr) handelt es sich um einen Stoff, der sich zwischen die Basen von DNA lagert und bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht fluoresziert.

Die Gele wurden je nach Größe für die unten angegebene Zeit in der Etidiumbromid-Färbelösung geschwenkt. Danach wurde die Färbelösung gegen Wasser getauscht und das Gel entfärbt. Kleine Agarosegele und Polyacrylamidgele wurden jeweils 15 Minuten, große Agarosegele 30 Minuten gefärbt und entfärbt. Zur Sichtbarmachung und Dokumentation des Ergebnisses wurden die Gele auf einen UV-Transilluminator gelegt; dabei wird das EtBr bei 300 nm angeregt und die Fluoreszenz (590 nm) mit einer Kamera (BioDoc, Biometra) aufgenommen und auf High-Density-Papier (UPP-110HD, Sony) ausgedruckt.

3.10 Southern-Blotting

In der vorliegenden Arbeit wurden nur Agarosegele dem Blotting unterzogen, weshalb hier nur das gravitationsunterstützte Blotting beschrieben wird.

Die Methode (Southern 1975) wurde angewendet, um DNA auf eine positiv geladene Nylon-Membran zu transferieren, welche dann später bei der Hybridisierung (s. Abschnitt 3.12.3) verwendet werden konnte. Nach Dokumentation des Ergebnisses (s. Abschnitt 3.9) wurde das Gel mit Depurinierungspuffer bedeckt und für 8 Minuten geschwenkt. Anschließend wurde die Lösung abgegossen, das Gel kurz mit Wasser gespült, 2 x 20 Minuten in Denaturierungspuffer geschwenkt und dann für 5 Minuten mit 20 x SSC bedeckt. In der Zwischenzeit wurde eine Nylon-Membran passender Größe zurechtgeschnitten, auf der Rückseite beschriftet, in bidestilliertes Wasser eingeweicht und dann mit 10 x SSC inkubiert. Das Gel wurde mit den Taschenöffnungen nach unten auf eine Glasplatte gelegt, mit 1 ml 20 x SSC benetzt und die Nylon-Membran möglichst luftblasenfrei aufgelegt. Überschüssige Flüssigkeit und Lufteinschlüsse wurden durch Anrollen mit einer 10 ml-Pipette entfernt. Auf die Membran wurden drei Lagen in 20 x SSC eingeweichtes Filterpapier und ein Stapel Papiertücher aufgelegt. Den Abschluß des Aufbaus bildete eine zweite Glasplatte. Die gesamte Konstruktion wurde gewendet und mit ca. 500g Gewicht beschwert. Am nächsten Tag wurde die Membran in einer Plastikschaale 2 mal mit 2xSSC gewaschen und anschließend mit der DNA-Seite nach oben auf Haushaltstücher gelegt und getrocknet.

3.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.11.1 Photometrische Messung

Diese Methode wurde angewendet, um die Konzentration wässriger DNA und RNA-Lösungen zu bestimmen. Die DNA- und RNA-Lösungen werden bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen das Lösungsmittel in einem Photometer vermessen, wobei eine Optische Dichte von eins 50 µg DNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml entspricht. Um die Reinheit festzustellen, wird der Quotient OD_{260}/OD_{280} ermittelt; dieser sollte größer als 1,7 sein.

3.11.2 Picogreen-Messung

Picogreen (Molecular Probes) ist ein Farbstoff, der vor allem an doppelsträngige DNA bindet und mit dem man kleinere DNA-Konzentrationen (1-80 ng/µl) bestimmen kann.

Für die Messung wurde eine 1:50 mit 1xTE verdünnte Picogreen-Lösung verwendet. 9 µl dieser Lösung wurden mit 1 µl der zu messenden Probe in einer Terasaki-Platte (NUNC™ Brand Products) vermischt. In einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Tekan, Crailsheim) erfolgte die Anregung (488nm) und Messung (542nm) der Probe.

3.12 Radioaktive Markierung und Hybridisierung

3.12.1 Sondenherstellung

Einige verwendete Sonden wurden mit Hilfe der PCR generiert und in einen Vektor kloniert. Um diese und andere Sonden für die Hybridisierung einsetzen zu können, wurden sie mit den passenden Restriktionsnukleasen vom Vektor freigesetzt, gelelektrophoretisch aufgetrennt, isoliert und nach der Konzentrationsbestimmung für die radioaktive Markierung verwendet.

3.12.2 Radioaktive Markierung von Sonden

3.12.2.1 Radioaktive Markierung mit dem Megaprime-Kit

Das Megaprime-Kit von Amersham beruht auf der Methode von Feinberg und Vogelstein (Feinberg und Vogelstein 1984), bei der Oligonukleotide (Nonamere) an einzelsträngige DNA binden und der zweite, komplementäre Strang mit Hilfe des Klenow-Fragments der Polymerase 1 (E. coli) unter Zugabe von radioaktiven Nukleotiden synthetisiert wird.

20 ng der Sonde wurden mit 5 µl des Nukleotidmixes versetzt (drei der vier nötigen Nukleotide), 8 Minuten bei 95°C denaturiert und danach sofort schockgefroren. Danach wurden der Reaktion 10 µl Puffer, 5µl α [³²P]dCTP und 2µl Klenow-Enzym zugegeben. Die Probe wurde gut durchmischt, kurz zentrifugiert und dann für 10 Minuten in ein 37°C Wasserbad überführt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 5µl 0,5 M EDTA gestoppt und 60 µl E.coli-DNA zugegeben. 0,8µl des Ansatzes wurden auf ein Filterpapier gegeben und der Reaktionsansatz mit Hilfe einer Sephadex-G50-Säule (Abschnitt 3.17.1) gereinigt. Im Anschluß wurde die Probe wiederum gemischt und erneut 0,8µl auf ein Filterpapier gegeben. Die Effizienz der Reaktion wurde durch vermessen der Filterpapiere mit dem LKB-Counter bestimmt; dabei besitzt frische Aktivität einen Vollwert von ca. 300000 cpm. Die Sonde wurde verworfen, wenn der Meßwert unter 10000 cpm lag.

Die radioaktiv markierte Sonde wurde 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend mit 1 ml Hybridisierungspuffer versetzt. Die Sonde wurde bei 65°C für 30 Minuten vorhybridisiert.

3.12.2.2 Radioaktive Markierung mit dem StripEZ-labelling-Kit

Das StripEZ-labelling Kit von Ambion hat folgenden Vorteil gegenüber dem Megaprime-Kit: Während der radioaktiven Markierung der Sonde wird ein modifiziertes Nukleotid eingebaut, das es nach der Hybridisierung erlaubt, die Sonde zu zerstören und so leicht von der Hybridisierungsmembran zu entfernen. Dies ermöglicht es, den gleichen Blot nach einer Hybridisierung schnell erneut zu verwenden, ohne daß die Restaktivität der letzten Hybridisierung einen negativen Einfluß auf das Hybridisierungsergebnis hat.

Sowohl die Hybridisierung als auch das Waschen des Blottes erfolgt nach dem üblichen Protokoll (s. Abschnitt 3.12.3). Hier werden nur die von der Markierung mit dem Amersham-Kit abweichenden Schritte beschrieben, alles Weitere ist dem Abschnitt 3.12.2.1 zu entnehmen.

Ein üblicher Ansatz mit dem Ambion-Kit setzte sich wie folgt zusammen:

DNA-Sonde	9,0µl
10 x Primer	2,5µl
5 x Puffer –dATP/–dCTP	5,0µl
10 x dATP	2,5µl
[α - ³² P]dCTP	5,0µl
Klenow-Enzym	1,0µl
25µl-Ansatz	

Der Ansatz wurde analog zu 3.12.2.1 behandelt. Zum Entfernen von Rest-Aktivität nach der Hybridisierung und Signaldetektion wurde der Blot in einer Plastikschißel mit „1 x Pro-

be Degradation Buffer“ bedeckt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Schale in ein 68°C warmes Wasserbad überführt und für 10 Minuten dort belassen (die Membran verfärbte sich orange). Der Puffer wurde entsorgt, der Blot mit „1 x Reconstitution Buffer“ bedeckt und ebenfalls 10 Minuten bei 68°C inkubiert (danach war die Membran wieder weiß). Es folgte noch ein Waschschriff mit 0,1%iger SDS-Lösung, danach konnte die Membran für weitere Experimente verwendet werden.

3.12.3 Radioaktive Hybridisierung

In eine Hybridisierungsröhre wurden 7 ml Hybridisierungspuffer (Church und Gilbert 1984) vorgelegt, die zu hybridisierende Membran mit der DNA-Seite nach innen aufgerollt, in die Röhre transferiert und dort luftblasenfrei entrollt. Die Röhre wurde bei einer Hybridisierungstemperatur von 65°C in den Hybridisierungsofen gehängt und dort 30 Minuten inkubiert. Im Anschluß wurden der Röhre 100 µl einer denaturierten DNA-Blocklösung hinzugegeben und weitere 15 Minuten inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe der vorbereiteten radioaktiv markierten DNA-Sonde (s. Abschnitt 3.12.2). Die Membran wurde über Nacht mit der Sonde hybridisiert.

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung entsorgt, 10 ml Waschlösung (1 x SSC, 1 % SDS) hinzugegeben und die Röhre für 5 Minuten bei 68°C wieder in den Hybridisierungsofen gehängt. Anschließend wurde die Waschlösung entsorgt, 10ml Waschlösung (1 x SSC, 0,1 % SDS) hinzugegeben und ein erneuter Waschschriff in der Röhre für 30 Minuten durchgeführt. Nach Abgießen der Lösung wurde die Membran aus der Röhre genommen, in einer flachen Plastikschrille mit der DNA-Seite nach oben entrollt und die Strahlung detektiert. Je nach Grad der Radioaktivität wurden weitere Waschschriffe mit 300ml folgender Lösungen für 15 Minuten bei 68°C durchgeführt: 0,5 x SSC, 0,1 % SDS; 0,2 x SSC, 0,1 % SDS; 0,1 x SSC, 0,1 % SDS.

Nach Beendigung der Waschschriffe wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen, um eine Austrocknung und die damit verbundene irreversible Bindung der Sonde an die Membran zu verhindern. Die Vorderseite der Membran wurde beschriftet und diese Beschriftung wurde mit einem phosphoreszenzstreifen hinterlegt.

3.12.4 Signaldetektion

Die so präparierte Membran wurde für 20 Minuten mit der DNA-Seite nach unten in eine Filmkassette gelegt, um die Intensität des Phosphoreszenzstreifens abzuschwächen. Dann wurde ein Röntgen-Film (XOMAT-AR oder MS, Firma Kodak) zwischen Intensivierungs-

screen und Membran gelegt, die Kassette verschlossen und für wenige Stunden oder bis zu mehreren Tagen bei -80°C aufbewahrt.

3.13 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Hühner-Blut (s. Abschnitt 3.1) erfolgte mit dem ‚RNA-gents[®] Total RNA Isolation System‘ von Promega. Ca. 10^7 Zellen wurden in ein Zentrifugengefäß überführt, in dem bereits 1 ml Denaturierungslösung vorgelegt war. Das Gefäß wurde verschlossen, geschüttelt und anschließend wurden die von Promega empfohlenen Mengen Natriumacetat und Phenol/Chloroform/Isoamyalkohol-Gemisch hinzugegeben. Die Probe wurde gemischt und für 15 Minuten auf Eis gestellt. Um die wäßrige von der phenolischen Phase zu trennen, folgte ein Zentrifugationsschritt mit $10000\times g$ für 30 Minuten bei 4°C . Die wäßrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, ohne die Interphase (DNA-haltig) mitzupipettieren. Anschließend wurden 0,7 Vol. Isopropanol zugegeben, gemischt und für 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Dann wurde die Probe für 10 Minuten bei $10000\times g$ zentrifugiert, der Überstand entfernt, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die RNA wurde in Wasser aufgenommen, so daß die aus der Zellzahl abgeschätzte Konzentration etwa 1mg/ml betrug. Es folgte eine Konzentrationsbestimmung. Die RNA wurde aliquotiert und Proben, die nicht für die sofortige Weiterverarbeitung bestimmt waren mit 1/10 Vol NaOAc und 2 Vol Ethanol versetzt und bei -80°C gelagert. Mit dem Aliquot, welches sofort verwendet wurde, wurde noch ein DNase-Verdau durchgeführt, um eventuell vorhandene Reste genomischer DNA zu entfernen. Hierfür wurden $17\ \mu\text{l}$ RNA-Lösung, $2,5\ \mu\text{l}$ DNase-Puffer und $5\ \mu\text{l}$ DNase vereint, gemischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden 0,2 Vol. ‚DNase Inactivation Buffer‘ zugegeben und die Probe für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei $10000\ \text{rpm}$ für eine Minute, der Überstand wurde abgenommen und ein Aliquot der cDNA-Synthese unterzogen.

3.14 cDNA-Synthese

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase ist es möglich, von einzelsträngiger RNA, unter Verwendung eines Oligo(dT)Primers (bindet an den Poly-A-Schwanz der mRNA), einen DNA-Gegenstrang zu synthetisieren (complementary DNA, cDNA). Um eine solche einzelsträngige DNA herzustellen, wurden $1\text{-}5\ \mu\text{g}$ Gesamt-RNA in einem Volumen von $5\ \mu\text{l}$ Wasser aufgenommen, $20\ \text{pmol}$ ‚First-strand‘-Primer (z.B. PolyT-Smart) hinzugegeben und der Ansatz mit Wasser auf $12\ \mu\text{l}$ aufgefüllt. Es erfolgte eine Erhitzung der Probe auf 70°C für 10 Minuten

(um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen) und eine anschließende Inkubation auf Eis für 2 Minuten. Danach wurden 4 µl 5 x First-strand-Puffer, 2 µl 0,1M DTT und 1 µl 10mM dNTP Mix zugegeben, die Probe gemischt und 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 200U (1µl) Reverse Transkriptase (Superscript II™) erfolgte die cDNA-Synthese bei 42°C für 60 Minuten. Durch Erhitzung auf 80°C für 15 Minuten wurde die Reaktion gestoppt (das Enzym inaktiviert); Das entstandene RNA-DNA-Hybrid konnte anschließend direkt für weiterführende PCRs (s. Abschnitt 3.15) eingesetzt werden.

3.15 Polymerase-Kettenreaktion

Um einen bestimmten DNA-Abschnitt mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis et. al. 1992) vervielfältigen zu können, müssen die flankierenden Sequenzen bekannt sein. Die Strangsynthese erfolgt durch eine thermostabile DNA-Polymerase, welche ursprünglich aus dem Archaeobacterium *Thermus aquaticus* stammt.

Der Ablauf der PCR läßt sich in drei Schritte unterteilen. Zunächst wird die DNA in der Reaktion denaturiert (einzelsträngig gemacht); das gibt den ebenfalls einsträngigen Oligonukleotiden (Primer) die Möglichkeit, an die passende Stelle der DNA komplementär zu binden. Die Bindungstemperatur hängt von den Eigenschaften des Primers ab. Anschließend folgt die Synthese des Gegenstrangs bei einer für die DNA-Polymerase optimalen Temperatur (72°C). Dieser aus drei Schritten bestehende Zyklus wird sooft (20-35 mal) wiederholt, bis die gewünschte DNA-Menge erreicht ist.

Prinzipiell sollte bei der PCR sauber gearbeitet werden, um eine Kontamination mit anderen DNA-Fragmenten zu verhindern. Ein PCR-Reaktionsansatz wurde immer auf Eis pipettiert und die DNA-Polymerase erst kurz vor dem Start der Reaktion zur Probe gegeben.

Ein üblicher Reaktionsansatz bestand aus 20 µl. Er setzte sich aus der DNA (ca. 100ng), 2 µl 10 x PCR-Puffer, je 10 pmol der beiden Primer, je 0,2 mM der Desoxyribonukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP und 1 Unit DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) zusammen. Die Reaktionsansätze wurden verschlossen, in einen bereits auf 94°C erhitzten Thermocycler gestellt und die Temperatur für 4 Minuten gehalten; erst dann wurde das eigentliche PCR-Programm gestartet. Am Schluß der Reaktion folgte ein siebenminütiger Syntheseschritt bei 72°C, um unvollständige Fragmente zu vervollständigen.

3.16 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde mit Hilfe des „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ von Amersham durchgeführt. Wie bei der

PCR wurde das Pipettieren des Ansatzes auf Eis durchgeführt. Pro zu analysierender DNA wurden in einer Mikrotiter-Platte jeweils 4x 1,5µl ddATP-, ddCTP-, ddGTP- und ddTTP-Reaktionsgemisch vorgelegt. 150 ng Plasmid-DNA je Kilobasenpaar wurden mit 4 pmol IRD-markierter Sequenzier-Primer und 1 µl DMSO gemischt und auf 20 µl mit Wasser aufgefüllt. Nach dem Mischen des Ansatzes wurden 4,5µl zu jedem der vier vorgelegten Reaktionsgemische gegeben. Die Reaktionsansätze wurden mit Mineralöl überschichtet und in einen auf 94°C vorgeheizten Thermocycler überführt. Die Reaktion erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm:

4 min	94°C	

30 s	94°C	
20 s	54°C	25 Zyklen
40 s	68°C	

7 min	68°C	

Im Anschluß an die Reaktion wurden jeweils 5 µl STOP-Puffer zugegeben und wenn nötig die Proben bis zum Auftrag auf das Sequenziergel (s. Abschnitt 3.8.3) lichtgeschützt aufbewahrt.

Die Auftrennung und Absorptionsmessung der IRD-markierten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des „model 4000 DNA-Sequencer“ (Licor). Die automatische Auswertung des Gelbildes, das Lesen der einzelnen Gelbanden, sowie die Korrektur eventueller Fehler der automatischen Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe des Programmpaketes Base ImagIR (Licor) auf OS2-Ebene.

3.17 Entfernung niedermolekularer Stoffe aus DNA-Proben

Neben der Fällung von DNA-Molekülen (s. Abschnitt 3.7) wurden auch Gelfiltrationen und Dialysen angewendet, um niedermolekulare Stoffe (freie Nukleotide, Salze, Ethanol usw.) aus DNA-Lösungen zu entfernen.

3.17.1 Gelfiltration

Die Spitze einer Insulinspritze wurde mit einer Fritte (45 µm, Mobicol) verschlossen und mit einer 1 ml-Eppendorf-Pipette eine Sephadex-G50-Suspension (in 1xTE-Puffer) eingefüllt. Diese wurde in ein 12,5ml-Falcon-Röhrchen gehängt und bei 2000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der abzentrifugierte Puffer verworfen, die Sprizenspitze in ein 0,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und wiederum in ein Falcon-Röhrchen gegeben. Die zu reinigende DNA wurde auf die Säule aufgetragen und selbige nochmals mit 2000 rpm

für 10 Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen, das Reaktionsgefäß verschlossen und die darin enthaltene Probe durchmischt.

3.17.2 Dialyse

Eine Nitrocellulose-Membran der Firma Millipore (0,025 µm Porengröße) wurde vorsichtig in ein Becherglas auf die Oberfläche von bidestilliertem Wasser gelegt. Die DNA-Lösung wurde auf die Membran pipettiert und für eine Stunde dort belassen. Dann wurde sie mit einer geeigneten Pipette wieder aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt.

3.18 Klonierung

Der Vorteil des „TOPO-TA-Kloning-Kits“ (Invitrogen) liegt in der Schnelligkeit, mit der man Ligationen von PCR-Produkten vornehmen kann. Das System kommt ohne eine Ligase aus.

Ein Ansatz setzte sich aus 0,5-4 µl PCR-Produkt, 1 µl Salzlösung (Invitrogen) und Wasser (auffüllen auf 5 µl falls nötig) zusammen, Anschließend wurde 1 µl pCR[®]II-TOPO[®] hinzupipettiert, der Ansatz gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Transformation wie in Abschnitt 3.19 beschrieben.

3.19 Transformation von Bakterienzellen

3.19.1 Hitzeschock

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 2µl des TOPO-Klonierungs-Gemisches (s. Abschnitt 3.18) hinzupipettiert und die Reaktion für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden, danach wurde die Probe sofort wieder auf Eis gestellt und 250 µl SOC-Medium hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 37°C, anschließend wurden 10-100 µl der Zellsuspension auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

3.19.2 Elektroporation

Die zu transformierende DNA (1ng-1µg) wurde auf Eis zu einem Aliquot kompetender Zellen pipettiert. Die Zellsuspension wurde in eine E-Küvette (2mm, Biozym Diagnostik) überführt, zwischen die beiden Elektroden des Elektroporationsgerätes (BioRad) gestellt und ein Puls von 2,5kV, 200Ω, und 2,5µF ausgelöst. Sofort wurden auf Eis 1 ml SOC-Medium in die Küvette pipettiert, die Zellen in ein Schraubdeckelgefäß überführt und für 1 Stunde bei 37°C in-

kubiert. Im Anschluß wurden 10-100µl der Zellen auf eine LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.20 Angewendete Programme

Das Programm Multalin (Corpet 1988) wurde verwendet, um Sequenzen miteinander zu vergleichen (Sequenz-*Alignment*). Mit dem BLAST-Programm (Altschul et. al. 1990) wurden zu analysierende Sequenzen mit im Internet veröffentlichten Sequenzen verglichen, um homologe Sequenzen zu identifizieren. Die Suche nach homologen Bereichen in zwei verschiedenen DNA- oder Proteinsequenzen wurde mit Hilfe des Programms „Dotter“ durchgeführt (Sonnhammer und Durbin 1995). Das Programm vergleicht Sequenzen miteinander und zeigt das Ergebnis in Form eines Dot-Plots an (siehe z.B. Abb. 13). Diagonale Linien zeigen, daß in diesen Bereichen die beiden Sequenzen sehr ähnlich oder identisch sind. Der Verlauf der Linie (von links oben nach rechts unten oder rechts oben nach links unten) macht zudem eine Aussage über die Orientierung der Homologie innerhalb der Sequenzen. Der Grauton der einzelnen Punkte gibt den Grad der Sequenzübereinstimmung an. Mit Hilfe des Internet-Programms „Emboss-Isochore“ wurde der Verlauf des G-C-Gehaltes innerhalb der BAC-Sequenzen bestimmt (Bernardi 2000). Zusätzlich wurden die Sequenzen mit Hilfe des Programms „Repeatmasker“ auf ihren Gehalt an repetitiven Elementen untersucht (Smit et. al. 2004). Die Vorhersage von Proteindomänen wurde mit Hilfe von SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) durchgeführt (Schultz et. al. 1998; Letunic et. al. 2002). Stammbäume wurden mit dem Programm Phylowin (Galtier et. al. 1996) erstellt. Die Berechnung synonyme und nicht-synonyme Austausche erfolgte mit Hilfe des SNAP-Programms (Ota und Nei 1994), die Proteinvariabilität wurde nach der Methode von Wu und Kabat berechnet (Wu und Kabat 1970). Die Strukturmodellierung der CHIR-Rezeptoren erfolgte mit SWISS-Model und Deep-View (Guex und Peitsch 1997) und die Abbildungen wurden mit Pymol erstellt (DeLano 2002).