

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Kits

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D	Filmkassetten Röntgenfilme Hybond ECL, hydrophile Membran Hybond N+, nucleid acid transfer membrane
Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, UK	ULTRAhyb-Lösung
Applied Biosystems, Foster City, USA	ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequenzierungs-kit
Biozym, Oldendorf, D	Mikrotitterplatten
Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe, D	Roti-Nylon plus pH Papier: 0-14, 0-6 und 7-14
Catalys AG, Wallisellen, CH	Dual-Glo Luciferase Assay System
Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, USA	Multiplex tissue Northern-Blot Advantage-GC PCR SMART RACE cDNA Amplification Kit
Dynal, Skøyen, N	Dynabeads Oligo (dT) ₂₅ Dynal magnetic particle concentrator
MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D	ExoIII/S1 Deletion Kit
Invitrogen, Carlsbad, USA	TOPO-Klonierungs-kit
Perkin Elmer, Zaventem, B	Western Lightning Chemiluminescence Reagent <i>Plus</i>
Pierce, Rockford, IL	SulfoLink Coupling Gel Slide A Lyzer
Qiagen GmbH, Hilden, D	Mini (8 Turbo BioRobot), Midi und Maxi Plasmid Kit QIAquick Gel Extraktions-kit QIAquick PCR Purification Kit QIAexpressionist Nickel-NTA-Agarose RNeasy Mini und Midi Kit
Roche, Rotkreuz, CH	PVDF-Western Membran
Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, Deisenhofen, D	Acid washed Glasbeads (710-1180 µm) BCA Bicinchoninic acid protein assay kit Bradford reagent
Whatman, Madison, UK	3MM Papier

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D	Ficoll 400 G50Sephadex HEPES Pd(N) ₆ (Random Hexamer)
BioRad, München, D	Harz
Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf, D	Large DNA LMT (Low Melt) Agarose
Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe, D	Roti Phenol dATP, dCTP, dGTP und dTTP

Difco, Detroit, USA	Bacto-Agar Bacto-Hefe Bacto-Tryptone Hefe Stickstoffbase Kasein-Hydrolysat
Fluka Chemika, Fluka Chemie Ag, Buchs, CH	Ammoniumsulfat Bromphenolblau Coomassie Brilliantblue R250 Dextranblau Formaldehyd L-Cysteine Natriumazid Phenylmethanethanesulfonylchloride Piperazine-1,4-bis(2-ethane sulfonic acid) (PIPES) PMSF Triethylamin
Gibco BRL Life Technology Inc., Gaithersburg, USA	Agarose Electrophoresis Grade, Ultra Pure 10 x PBS TEMED
Invitrogen, Carlsbad, USA	CHAPS ZOOM Carrier Ampholyten
MERCK, E. Merck, Darmstadt, D	Aceton Chloroform D(+)-Glucose-Monohydrat DMSO EDTA Ethanol Ethidiumbromid Glycerol Isopropanol Kaliumchlorid 2-Mercaptoethanol Methanol Natriumacetat Natriumchlorid Natriumhydroxid Natriumthiosulfat SDS Triton X 100 Tris (hydroxymethyl)-aminomethan Tween 20
Nutricia, Zoetermeer, NL	Protifar Milchpulver
Roche, Rotkreuz, CH	Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Heringsperma-DNA (HSD) RNase 10 mg/ml Nonidet P40 Pepstatin
Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG, Heidelberg, D	BSA
Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, Deisenhofen, D	Adeninhemisulfat, 6-Aminopurin NaBH ₄ BSA Bromphenolblue Na-Salz

	DAPI DEPC Desoxycholic acid Glutaraldehyd IPTG L-Tyrosin, (S)-2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)-propionsäure Mineralöl Natriumdeoxycholat
Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA	VectaShield

2.1.3 Zellkultur-Materialien

Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe, D	Deckgläser (24x24, 24x32, 24x40 und 24x60) Objektträger SuperFrost
Catalys, Wallisellen, CH	96wells Plate (Labsystem cliniplate)
Fisher Scientific, Wohlen, D	Serologische Pipetten (2, 5, 10 und 25 ml) Zellkultur Flaschen (25, 75 und 150 cm ²) TPP Zellkultur Testplatten (6er, 12er und 96er) Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml) Kryoröhrchen
Invitrogen, Carlsbad, USA	Optimem
Lab Force, Nunnigen, CH	Zellkultur Wasser L-Glutamine Penicillin-Streptomycin Lösung DMEM low Glucose w/o L-Glutamine w/Na-Pyruvate DMEM-Ham`s F12 w/o L-Glutamine w/o Heps MEM w/ Earle`s Salts w/o L-Glutamine RPMI 1640 w/stable L-Glutamine RPMI 1640 w/o L-Glutamine Trypsin-EDTA 1X w/Phenol Red HEPES Buffer Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (DPBS), w/o Mg w/o CaCl ₂
Qiagen GmbH, Hilden, D	Polyfect Transfection Reagent Effectene Transfection Reagent

2.1.4 Radiochemikalien

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D	α - ³² P-dCTP
--	---------------------------------

2.1.5 Enzyme

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	Klenow
Gibco BRL Life Technology Inc., Gaithersburg, USA	DnaseI <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI, <i>Kpn</i> I und <i>Pst</i> I Superscript II RT T4-Ligase

MBI Fermentas, Vilnius, LT	<i>XhoI</i>
Perkin Elmer, Foster City, USA	Ampli <i>Taq</i> Polymerase Ampli <i>Taq</i> Gold Polymerase
Qiagen GmbH, Hilden, D	HotStar <i>Taq</i> Polymerase Omniscrypt Reverse Transcriptase Proof Start Polymerase <i>Taq</i> Polymerase
Stratagene, La Jolla, USA	<i>Pfu</i> Polymerase

2.1.6 Antibiotika

Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, Deisenhofen, D	Ampicilin Kanamycin Chloramphenicol
--	---

2.1.7 Längenstandards

Gibco BRL Life Technology Inc., Gaithersburg, USA	1 kb ladder λ DNA mit <i>HindIII</i> geschnitten
MBI Fermentas, Vilnius, LT	Prestained Protein Molecular Weight Marker
New England Biolabs, Beverly, USA	RNA Ladder
Promega, Mannheim, D	pGem DNA mit <i>Sau3A</i> geschnitten

2.1.8 Bakterienstämme

DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Φ M15)
XL1-Blue	<i>hrdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac</i> ^q Δ M15 Tn10 8 <i>Tet</i> ' ^c]
M15 SG13009	Nal ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺
Topo 10	F' <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>
JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17, (rk, mk+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZ^q ΔM15]</i>

2.1.9 Säugetierzellen

ATCC, Manassas, USA	HeLa COS-7 NIH 3T3
---------------------	--------------------------

2.1.10 Vektoren

Invitrogen, Carlsbad, USA	pCR 2.1 Vektor pCR-Blunt II-TOPO pcDNA4/V5-His
Stratagene, La Jolla, USA	pBlueskript II SK+/-
Promega, Mannheim, D	pGL3 Basic Vektor phRL-TK Co-Reporter Vektor pGL3 Control Vector
Qiagen	pQE-30 QIAexpress Vector

2.1.11 Artificielle Chromosomen Bibliotheken

Resourcenzentrum/Primäre Datenbank (RZPD) des Deutschen Humanen Genom Projekts (DHGP), Berlin, D	YACs: CEPH 892D10, ICRF G0272 PACs und BACs : RPCI-5 1172N10, RPCI-11 258I23, RPCI-1 169I5, RPCI-5 972D6, RPCI-4 648C17, RPCI-11 163L4, RPCI-5 1174J21, RPCI-3 421H15, RPCI-11 758A3, RPCI-11 524P6, RPCI-5 1156N06, RPCI-11 548C20, RPCI-1 3008O01, RPCI-11 36B23, RPCI-11 52P6 und RPCI-3 154K9
---	---

2.1.12 Antikörper und Marker

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D	Esel, anti-Kaninchen IgG, HRP f(ab') ₂ Fragment Antikörper
DAKO, Glostrup, DK	Kaninchen, anti-Maus FITC Antikörper Schwein, anti-Kaninchen FITC Antikörper
Dianova, Hamburg, D	Ziege, anti-Kaninchen CY3 Antikörper Esel, anti-Maus CY3 Antikörper Ziege, anti-Maus IgG, HRP (H+L) Antikörper
Invitrogen, Carlsbad, USA	anti-V5 Antikörper
MolecularProbes, Leiden, NL	ER-Tracker Blue-White DPX anti-human Golgin-97, Maus Antikörper

2.1.13 Apparaturen

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D	Multiphor II Kammern
Appligene, Heidelberg, D	Mini Hybridization Oven
Applied Biosystems, Foster City, USA	ABI Prism 3100 DNA Sequenzierer
AGFA, Köln, D	Film-Entwickler und -Fixierer
Bachhofer, Reutlingen, D	BE 500 Hybridisierungssofen
BioRad, München, D	CHEF DR II, Pulsfeldgelelektrophorese-Apparatur Geltrockner Mini Protean 3 Electrophoresis Cell Protean II xi system PowerPac 200, 300 und 3000 Trans-Blot SD, Semi Dry Transfer Cell
DuPont, Newton, USA	Sorvall RC-5B Zentrifuge GSA Rotor

Eppendorf, Hamburg, D	<i>miniSpin</i> Tischzentrifuge Thermomixer 5436 Vakuumbzentrifuge
GFL, Burgwedel, D	Wasserbad
Gibco BRL Life Technology Inc., Gaithersburg, USA	Horizon 5·8 / 11·14 / 20·25 Gelelektrophoresekammern
Heraeus, Hanau, D	Brutschränke
Heidolph, Schwabach, D	Vortexer
Hettich, Tuttlingen, D	EBA12R und Rotina 48 R, Kühlzentrifuge
Kinematica, Luzern, CH	Polytron Homogenisator P.T. 3100
MetaSystems, Altussheim, D	ISIS fluorescence imaging system
MJ Research, Biozym, Oldendorf, D	PCR-Thermal Cycler
New Brunswick Scientific Inc./Edison, USA	Schüttler
Owl Separation Systems, Portsmouth, New Hampshire, USA	EasyCast Gelelektrophoresekammer
Pharmacia, Freiburg, D	GeneQuant Photometer
Qiagen GmbH, Hilden, D	BioRobot 9600
Schärfe System, Reutlingen, D	CASY1 Zellzählssystem
Stratagene, La Jolla, USA	UV-Crosslinker
UVP Inc./San Gabriel, USA	Transilluminator TM20 ChromatoVue
Wellhöfer Dosimetrie, Schwarzenbruck, D	Geigerzähler
Zeiss, Hallbergmoos, D	Axioskope 1, Axiovert 25

2.1.14 Puffer und Lösungen

2.1.14.1 Bakterienmedien

LB Medium	5 g Hefeextrakt 10 g Bacto-Trypton 5 g NaCl pH 7,2 auf 1000 ml H ₂ O _{dd} aufgefüllt
-----------	--

2.1.14.2 DNA Puffer und Lösungen

Lysepuffer (für Zellpellets)	200 ml 1 M Tris-HCl 60 ml 0.5 mM Na ₂ EDTA 15 ml 5 M NaCl 225 ml H ₂ O _{dd}
5 M Natriumperchloratlösung	17,56 g in 25 ml H ₂ O _{dd} gelöst.
20% SDS-Lösung	20 g SDS in 100 ml H ₂ O _{dd} gelöst
Lysepuffer (für Blutpellet)	1 ml 1M Tris-HCl 400 µl 0,5 mM Na ₂ EDTA pH8.0 8 ml 5 M NaCl in 95 ml H ₂ O _{dd} gelöst; pH 8,2 und auf 100 ml Gesamtvolumen auffüllen.
1 M Tris-HCl	127,0 g Tris-HCl 23,6 g Tris-Base in 1000 ml H ₂ O _{dd} gelöst und pH 7,5/8,0/9,5 mit NaOH eingestellt

YAC-Medium	55 mg Adeninhemisulfat, 6-Aminopurin 20g D(+)-Glucose-Monohydrat 8 g Hefestickstoffbase 55 mg L-Tyrosin, (S)-2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)-propionsäure in 930 ml H ₂ O _{dd} gelöst und 70 ml Kasein-Hydrolysat
Zymolyase-Mix	100 mM β -Mercaptoethanol 60 mM EDTA 100 mM Natriumcitrat, pH 7,0 1 M Sorbitol
Zymolyase-Lösung	100 μ g/ml BSA 1 mM DTT 0,1 mM EDTA 50% (v/v) Glycerol 50 mM KCl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 30 mg/ml Zymolyase
Yeast-Lysis-Mix	25 mM EDTA 500 mM NaCl 3 mM β -Mercaptoethanol 0,1% Nonidet-P40, Nonylphenylpolyethylenglycol 50 mM Tris-HCl
SE-Puffer	25 mM EDTA 75 mM NaCl
5 x PCR-Puffer	80 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM MgC ₂ 0,34 M Tris pH 8,8

2.1.14.3 RNA Puffer und Lösungen

DEPC- H₂O_{dd}	H ₂ O _{dd} wurde mit 0,01 DEPC versetzt, üN unter dem Abzug gerührt und autoklaviert
RNA-Ladepuffer	750 μ l deionisiertes Formamid 75 μ l 20-fach MOPS-Puffer 240 μ l 37% Formaldehyd 255 μ l H ₂ O
10-fach MOPS	0,4 M MOPS 0,1 M Natriumacetat 10 mM EDTA, pH 8,0
Deionisiertes Formamid	Formamid wurde mit Harz deionisiert
Poly(A)⁺-RNA Bindungspuffer	20 mM Tris pH 7,5 1 M LiCl 2 mM EDTA 0,7% SDS
Poly(A)⁺-RNA Waschpuffer	10 mM Tris, pH 7,5 0,15 M LiCl 2 mM EDTA, 0,3% SDS

2.1.14.4 Protein Puffer und Lösungen

Lysepuffer	0,32 M Sucrose 4 mM HEPES, PH 7,4 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail /10 ml 2% Mercaptoethanol
Hefelysepuffer	2% Triton X 100 100 mM NaCl 10 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail /10 ml
<i>E. coli</i> Lysepuffer	2% Triton X 100 100 mM NaCl 1 mM EDTA 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 8 M Urea 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail /10 ml pH 8,0
<i>E. coli</i> Waschpuffer	2% Triton X 100 100 mM NaCl 1 mM EDTA 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 8 M Urea 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail /10 ml pH 6,5
<i>E. coli</i> Elutionspuffer	2% Triton X 100 100 mM NaCl 1 mM EDTA 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 8 M Urea 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail /10 ml pH 4,5

2.1.14.5 Elektrophoresepuffer

50-fach TAE	242 g Tris-Base 57,1 ml Eisessig 200 ml 0,25 M EDTA, pH 8,0 auf 1000 ml H ₂ O _{dd} aufgefüllt
10-fach TBE	108 g Tris-Base 55 g Borsäure 8 ml 0,25 M EDTA, pH 8,0 auf 1000 ml H ₂ O _{dd} aufgefüllt
5-fach SDS PAGE Laufpuffer	15,1 g Tris-Base 72,0 g Glycine 5,0 g SDS; auf 1000 ml H ₂ O _{dd} aufgefüllt

2.1.14.6 SSCP-Analyse Lösungen

29:1 Gel	12 ml Acrylamide 10 x TBE 28,25 ml H ₂ O 136 µl 10% APS 75 µl TEMED
49:1 Gel	9 ml Acrylamide 10 x TBE 31,25 ml H ₂ O 136 µl 10% APS 75 µl TEMED
2-fach Probenpuffer	10 ml deionisiertes Formamid 200 µl EDTA (0,5 M) 1 Spatelspitze Xylencyanol

2.1.14.7 Lösungen für die Southern-Blot Analyse

Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Membranwaschpuffer	50 mM Na ₃ PO ₄
10-fach SSC	1,5 M NaCl 0,15 M Natriumcitrat

2.1.14.8 Lösungen für die radiokative Markierung und Hybridisierung

5-fach OLB	Je 0,1 mM dATP, dGTP und dTTP 1 M HEPES, pH 6,6 0,425 mM pd(N) ₆ (Hexanukleotide) 0,36% Mercaptoethanol
TES	5 mM (pH 8,0) EDTA 10 mM Tris (pH 7,5) 0,2% SDS
PEG Hybridisierungslösung	0,125 M Na ₃ PO ₄ 0,25 NaCl 7% SDS 1 mM Na ₂ EDTA; 10% PEG 6000
PEG Prähybridisierungslösung	PEG Hybridisierungslösung 0,1% HSD (10 mg/ml)
Waschlösung I	40 mM Na ₃ PO ₄ , 1% SDS
Waschlösung II	0,1% SDS, 0,1 x SSC

2.1.14.9 Lösungen für SDS-PAGE Gele und für Western-Blot Analyse

Sammelgel	0,125 M Tris-HCL, pH 6,8 4% Acrylamide 1% SDS 0,008 Vol. 10% APS 0,002 Vol. TEMED
Trenngel	0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 10-12% Acrylamide 1% SDS 0,005 Vol. 10% APS 0,001 Vol. TEMED

6-facher Probenpuffer	7 ml 4 x Tris-HCl, pH 6,8 3 ml 30%-iges Glycerol 1 g SDS 0,93 g DTT 1,2 g Bromphenolblau auf 10 ml H ₂ O _{dd} aufgefüllt
10% APS	10% w/v APS in H ₂ O _{dd} bei -20°C gelagert
5-facher Blottingpuffer	29,1 g Tris 14,65 Glycin 1,88 g SDS
Blockingpuffer	5% Protifar Milchpulver
PBS	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 3 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O pH 7,0
PBST	1 x PBS; 0,1% Tween 20

2.1.14.10 Färbungslösungen

SSCP Silberfärbung: Lösung A Lösung B Lösung C Lösung D	150 ml Ethanol 7,5 ml Essigsäure 0,1%-ige AgNO ₃ -Lösung 9 g NaOH 0,06 g NaBH ₄ 2,4 ml Formaldehyd 600 ml H ₂ O _{dd} 88 g Na ₂ CO ₃ ·H ₂ O auf 1000 ml H ₂ O _{dd} aufgefüllt
SDS-PAGE Silberfärbung (Protein) Lösung A Lösung B Lösung C Lösung D Lösung E Lösung F Lösung G	40% Ethanol, 10% Eisessig 30% Ethanol 0,02% Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1% AgNO ₃ 3% Na ₂ CO ₃ , 0,05% Formalin 5% Essigsäure 1% Essigsäure
SDS-PAGE Coomassie (Protein)	0,1 (w/v) Coomassie-Brilliant Blue R-250 7,0% (w/v) Essigsäure 12% Methanol

2.1.14.11 Lösungen für die Antikörper Affinitätsaufreinigung

Fällungslösung (gesättigte NH₄SO₄-Lösung)	80 g NH ₄ SO ₄ in 100 ml H ₂ O _{dd} unter Erwärmen lösen und filtrieren
Startpuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,0
Affinitätsaufreinigung Waschpuffer I	100 mM Tris-HCl, pH 8,0
Affinitätsaufreinigung Waschpuffer II	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
Eluierungspuffer	100 mM Glycin, pH 3,0
Neutralisierungspuffer	1,0 M Tris-HCl, pH 8,0
Äquillibrierungspuffer	50 mM Tris 5 mM EDTA, pH 8,5
Peptidbindungspuffer (SulfoLink)	50 mM Cystein in Tris/EDTA

Peptid Waschpuffer I	1 M NaCl
Peptid Waschpuffer II	0,05% NaN ₃
Bindungspuffer	50 mM Tris 100 mM NaCl 5 mM EDTA 0,1 mg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
PIPES-Puffer	50 mM PIPES, pH 5,8
Citratpuffer	100 mM Citrat, pH 5,0
Glycinpuffer	50 mM, pH 2,5
Triethylaminpuffer	100 mM, pH 11,5

2.1.14.12 Lösungen für die 2D-Gelelektrophorese

Lysepuffer	40 mM Tris 2% Nonidet P40
Rehydratisierungspuffer	8 M Urea 2% CHAPS 0,5 % (v/v) ZOOM Carrier Ampholyten 0,002% Bromphenolblau 20 mM DTT

2.1.14.13 Lösungen für die Immunfluoreszenzanalyse

PBS	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 3 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O pH 7,0
Fixierungslösung	2% Formaldehyd
PBGT	0,1% BSA 0,1% Gelatine 0,05% Tween 20 1 x PBS

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Verfahren

2.2.1.1 Isolierung von DNA

2.2.1.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Blut

Die genomische DNA wurde aus gefrorenem EDTA-Blut isoliert. Zur selektiven Hämolyse der Erythrozyten wurden 10 ml gefrorenes EDTA-Blut mit 40 ml 50 mM KCl Lösung versetzt, 10 min bei 37°C inkubiert und bei 3000 x g, 4°C zentrifugiert. Wenn das entstandene Pellet noch eine rote Farbe aufwies wurde dieser Schritt wiederholt. Daraufhin wurde das Sediment in 3 ml Lysepuffer, 200 µl 10% SDS und 30 µl Proteinase K (20 mg/ml) aufgenommen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Lösung einmal mit Phenol, einmal mit Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform extrahiert (Sambrook *et al.*, 1989). Der Überstand wurde mit einem Volumen Isoprpanol versetzt, die gefällte DNA mit einer Impföse aus der Lösung entnommen, kurz in 70% Ethanol gewaschen und in einem geeigneten Volumen 1 x TE gelöst.

2.2.1.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Zellpellets

Die gefrorenen Zellpellets wurden zunächst aufgetaut und mit 20 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl Rnase A (10 mg/ml) und einer 60-minütigen Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz mit 5 ml Natriumperchloratlösung versetzt und 10 bis 15 Mal über Kopf geschüttelt. Danach wurde die Lösung mehrmals mit 20 ml Chloroform extrahiert bis die obere Phase keine Spuren von Protein mehr aufwies. Daraufhin wurde die obere Phase mit einem Volumen eiskaltem Ethanol versetzt, die gefällte DNA mit einer Impföse aus der Lösung entnommen, kurz in 70% Ethanol gewaschen und in einem geeigneten Volumen in 1 x TE gelöst.

2.2.1.1.3 Isolierung von Plasmid, BAC- und PAC-DNA

Plasmid-, BAC- und PAC-DNA wurde mit verschiedenen Kits der Firma Qiagen isoliert. Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde im Allgemeinen eine Minipräparation angesetzt. Die Bakterienkulturen wurden dafür über Nacht bei 37°C in 5 ml LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Danach wurden die Zellen bei 6000 x g 10 min zentrifugiert und die DNA aus dem Pellet nach dem Protokoll des QIAprep 8 Turbo Miniprep Kit von Qiagen mit dem Qiagen BioRobot™ 9600 extrahiert. Für Präparationen im größeren Maßstab oder zur Isolierung von BAC- bzw. PAC-DNA

wurden die Bakterienkulturen über Nacht bei 37°C in 50 bzw. 100 ml mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Danach wurden die Zellen bei 6000 x g im GSA Rotor für 10 min sedimentiert. Die weitere Aufarbeitung wurde nach dem Protokoll des Midi- bzw. Maxiprep-Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.1.4 Isolierung von Gesamt-Hefe-DNA

50 µl der Hefe-Glycerinkultur wuchsen in 5 ml YAC Medium zwei Nächte im Schüttler bei 30°C und 200 rpm. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 2500 rpm (Hettich) für 10 min wurde das Pellet in 0,7 ml H₂O_{dd} resuspendiert, noch einmal bei 2500 rpm für 10 min zentrifugiert und dieses Pellet in 0,7 ml Zymolyase-Mix resuspendiert. Dieser Ansatz wurde mit 12 µl Zymolyase-Lösung bei 37°C für 2 h inkubiert und daraufhin für 5 min bei 1000 rpm in einer Eppendorf Zentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,7 ml Yeast-Lysis-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 60 µl SDS (10%) 15 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die DNA zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1), einmal mit Chloroform extrahiert und mit 560 µl Isopropanol gefällt. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 10000 rpm wurde das Pellet in 240 µl TE-Puffer bei 65°C gelöst und über Nacht einer RNase (40 µl; 10 mg/ml) Behandlung unterzogen. Die Präzipitation der DNA erfolgte nach Hinzugabe von 25 µl NaOAc und 700 µl 100% Ethanol bei -80°C für 5 Minuten. Nach dem Zentrifugieren bei 12000 rpm für 10 Minuten wurde das Pellet in 70% Ethanol gewaschen, wieder für 5 min zentrifugiert und in 50 µl TE bei 65°C für 10-20 min gelöst.

2.2.1.1.5 Isolierung von YAC-DNA durch Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

2.2.1.1.5.1 Präparation von Agarose-Blöckchen für die PFGE

50 µl der Hefe-Glycerinkultur wuchsen in 5 ml YAC Medium zwei Nächte im Schüttler bei 30°C und 200 rpm. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 2500 rpm (Hettich) für 10 min wurde das Pellet in 0,5 ml H₂O_{dd} resuspendiert, noch einmal bei 2500 rpm für 10 min zentrifugiert und dieses Pellet in 1 ml SE Puffer resuspendiert und mit 20 µl 1 M DTT-Lösung und 120 µl Zymolyase-Lösung versetzt. Bei 48°C wurden dann 0,3 ml 1,2% LMT-Agarose in SE-Puffer zugegeben, jeweils 40 µl in Plexiglasschablonen verfüllt und zum Aushärten auf Eis gestellt. Die so präparierten Agaroseblöckchen wurden in 2 ml SE-Puffer gesammelt, 40 µl 1 M DTT-Lösung und 30 µl Zymolyase-Lösung zupipettiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation der Zymolyase-Lösung wurde 3 x 2 h unter

leichtem Bewegen mit TE-Puffer gewaschen und die Blöckchen dann in 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) bei 4°C aufbewahrt.

2.2.1.1.5.2 Elektrophoretische Trennung der Agarose Blöckchen

Zur Trennung der YACs von den Hefechromosomen wurden die Agaroseblöckchen in einer Pulsfeldgelelektrophorese-Apparatur mit folgenden Parametern eingesetzt: 1% LMT-Agarosegel in 0,5 x TBE Puffer, 13 cm Laufstrecke, konstanter Reorientierungswinkel von 120°, zwei Schaltzeitblocks: 1. 18,7 h 60 s Schaltzeit, 2. 13 h 90 s Schaltzeit, konstantes elektrisches Feld von 6 V/cm bei einer Temperatur von 14°C.

2.2.1.1.5.3 YAC-DNA-Isolierung

Die durch die PFGE getrennten YACs wurden durch Färben der Agarosegele mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) in 0,5 x TBE sichtbar gemacht und an entsprechender Größe ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA aus der Agarose wurde zunächst die Agarose für 10 min bei 65°C geschmolzen und dann die DNA zweimal mit Phenol, einmal mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, mit 1 ml Ethanol und 50 µl NaOAc gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 10 µl TE aufgenommen.

Übliche Ausbeuten waren ungefähr 10 ng YAC-DNA pro Blöckchen.

2.2.1.2 Generierung von Amplikons

2.2.1.2.1 YAC-DNA-Verdau

36 ng YAC-DNA wurden in 50 µl Gesamtvolumen mit 50 Einheiten *Hind*III für 2 h bei 37°C verdaut, einmal Phenol, zweimal Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und mit Ethanol/NaOAc und Zusatz von 1 µg tRNA, als Präzipitationshilfe, gefällt, gewaschen und in 30 µl H₂O_{dd} gelöst.

2.2.1.2.2 Adapter Ligation

10 µl der DNA wurden in 29 µl Lösung mit 1,5 µg 24-mer (*RBg*III/*RHind*24) und 0,75 µg 12-mer (*RHind*12) Primer auf 50°C erhitzt und dann innerhalb 90 min auf 13°C abgekühlt. Nach Zugabe von einer Einheit T4-Ligase wurde der Ansatz über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

2.2.1.2.3 Adapter Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

10 µl Ligationsansatz wurden mit 20 µl 5 x PCR-Puffer, 60 µl H₂O_{dd}, 8 µl dNTP-Lösung (jeweils 4 mM) und 5 Einheiten Ampli *Taq* DNA-Polymerase versetzt. Überhängende 5'-Enden wurden bei 72°C für 10 min aufgefüllt. Dann wurden 2 µg des 24-mer Primers zu dem Ansatz pipettiert und für 25 Zyklen mit folgendem Temperatur-Zeit-Profil inkubiert: 1 min 95°C, 3 min 72° und abschließend 72°C 10 min.

2.2.1.3 Southern-Blot Analyse

Restringente DNA's wurden nach Auftrennung im Ethidiumbromid gefärbtem Agarosegel auf eine Trägermembran (Roti-Nylon plus) übertragen. Die Auftrennung erfolgte durch Elektrophorese im TAE Puffer in Horizon-Kammern. Die Gele wurden mit einem Lineal als Längenreferenz photographisch dokumentiert und daraufhin der verwendete DNA-Größenstandard abgetrennt. Anschließend wurde das Gel zweimal bei 30 min in Denaturierungslösung bei RT geschwenkt. Dann wurde das Gel mit den Taschen nach unten luftblasenfrei auf eine mit Frischhaltefolie überzogene Glasplatte gelegt, darauf luftblasenfrei die Membran, zwei Lagen Whatman-Papier (zuvor auch in Denaturierungslösung geschwenkt), mehrere Lagen Zellstoff und abschließend eine Glasplatte und ein Gewicht zum Beschweren. Der Transfer wurde über Nacht bei RT ausgeführt. Restliche Agarose wurde durch das anschließende Waschen der Membran in 50 mM Phosphat-Puffer entfernt. Die DNA-Seite wurde zur permanenten Fixierung der DNA an die Membran für 1,5 bis 2 min mit UV-Licht (302 nm) bestrahlt, an der Luft getrocknet und für Hybridisierungsexperimente verwendet. Durch dieses Verfahren wurden mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaute DNAs von verschiedenen CSNB Patienten auf Filtern transferiert und anschließend mit spezifischen Sonden auf Mikrodeletionen untersucht.

2.2.1.4 RNA Isolierung aus Mausgeweben

2.2.1.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

RNA aus 7 Geweben (jeweils 20 –250 mg) der Maus wurde mit dem RNeasy Midi Kit von Qiagen isoliert. Die Gewebe-Proben wurden bei -80°C gelagert und auf Trockeneis transportiert, um einen RNA-Abbau zu verhindern. Die Gewebe wurden in 2 ml Denaturierungslösung aus dem Kit aufgenommen und bei RT mit einem Polytron PT 3100 Dispergiersystem aufgeschlossen und homogenisiert. Das Homogenat wurde gemäß den Angaben des Herstellers weiter verarbeitet. Die Dauer des letzten Zentrifugationsschrittes

vor der Eluierung wurde in Abweichung von dem Protokoll um 20 min verlängert. Die RNA wurde in mehreren Schritten mit je 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert, die Menge photometrisch bestimmt (Genequant) und die Qualität auf einem 1% Agarosegel analysiert.

2.2.1.4.2 Isolierung von Poly(A)⁺-RNA

Poly(A)⁺-RNA für die Northern-Blot Analyse wurde durch Oligo(dT)-behaftete, magnetische Kügelchen namens Dynabeads Oligo (dT)₂₅ der Firma Dynal aus der oben beschriebenen Gesamt-RNA isoliert. Die Kügelchen wurden mit einem einseitig magnetischen Reaktionsgefäßständer der gleichen Firma aus Lösungen extrahiert (Dynal magnetic particle concentrator). Zunächst wurden 200 µl der sich in Lösung befindenden Kügelchen zweimal mit 400 µl 2-fach Bindungspuffer gewaschen und anschließend in 200 µl desselben suspendiert. 150 bis 300 µg zuvor isolierte Gesamt-RNA wurden in 200 µl RNase-freiem Wasser zur Hybridisierung mit den Oligo(dT)-Molekülen der vorbereiteten Kügelchen vermengt und unter gelegentlichem Mischen 10 min bei RT inkubiert. Nach Adsorption der Kügelchen an das Magnet des Reaktionsgefäßständers wurde die Lösung entfernt, die mit RNA beladenen Kügelchen dreimal mit 400 µl Waschlösung gereinigt und die gebundene Poly(A)⁺-RNA in 2 Schritten mit jeweils 20 µl RNA-Ladepuffer und 5-minütiger Inkubation bei 65°C eluiert. Die gewonnene RNA wurde für die Northern-Blot Analyse eingesetzt, während restliche noch an den Kügelchen haftende RNA mit 0,1 M NaOH hydrolysiert und in mehrmaligen Waschschrritten entfernt wurde bis der pH-Wert der Waschlösung 7,5 entsprach. Die gereinigten Kügelchen wurden mit 200 µl Bindungspuffer versetzt und bis zur erneuten Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.1.5 Northern-Blot Analyse

30 µg der oben gewonnen RNA-Proben wurden in der Vakuumzentrifuge der Firma Eppendorf auf ein Volumen von 11 µl eingengt und gemeinsam mit dem RNA-Größenstandard mit 5 µl 10-fach MOPS-Puffer, 9 µl Formaldehyd und 25 µl deionisiertes Formamid versetzt. Zusätzlich wurde dem RNA-Größenstandard 0,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ µl) hinzu gefügt. Nach Denaturierung der Proben bei 65°C für 10 min wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt und 5 bis 10 µl Gelladepuffer hinzugefügt. Für das denaturierende Gel wurden 1 g Agarose mit 72 ml DEPC-H₂O erhitzt, das Gel im Wasserbad auf 60°C abgekühlt und mit 10 ml 10 x MOPS-Puffer und 18 ml Formaldehyd versetzt. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS-Puffer, pH 7 verwendet. Nach Auftragung der

Proben wurden diese maximal 5 Stunden bei 90 bis 100 Volt unter dem Abzug in einer EasyCast Gelelektrophoresekammer aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 3 mal 7 min in DEPC-H₂O geschwenkt. Parallel dazu wurde eine Membran in der Größe des Gels (Hybond N+) vor dem Transfer 5 min in DEPC-H₂O gespült. Das Gel wurde mit 10 x SSC als Transferpuffer über Nacht geblottet. Ca. 10 Lagen trockenes 3 MM Whatman-Papier wurden mit 3 Lagen 10-fach SSC befeuchtetem Whatman-Papier, der befeuchteten Membran, dem RNA-Gel (ohne Marker), sowie 3 weiteren Lagen 10-fach SSC befeuchtetes Whatman-Papier übereinander gestapelt, wovon das oberste eine Verbindung zu einem Gefäß mit 10-fach SSC hatte. Der Blotaufbau wurde mit 200 g Gewicht gleichmäßig beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran kurz mit 2 x SSC gespült, um Gelreste zu entfernen. Die RNA-Seite wurde zur permanenten Fixierung der RNA an die Membran für 1,5 bis 2 min mit UV-Licht (302 nm) bestrahlt und zur Entfernung der Formaldehydreste 2 h bei 80°C im Hybridisierungsofen getrocknet. Die vom Gel abgeschnittene Markerbande wurde zur Dokumentation und Auswertung fotografiert.

2.2.1.6 Radioaktive Markierung von DNA-Proben

2.2.1.6.1 Markierung

Die radioaktive Markierung der Fragmente erfolgte mit degenerierten Hexanukleotidprimer (Feinberg und Vogelstein, 1983, 1984). Hexanukleotide statistischer Zusammensetzung (5'-pd(N₆)) hybridisieren an einzelsträngige DNA. Eine Neusynthese unter Einbau von [α -³²P]dCTP wird durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase 1 katalysiert. Hierzu wurde folgender Ansatz pipettiert:

20-50 ng denaturiertes DNA-Fragment

10 μ g BSA

5,0 μ l 5 x OLB-Mix

1-2 μ l [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol)

2 U Klenow

auf 25 μ l mit H₂O_{dd} auffüllen

Dieser Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.6.2 Aufreinigung der markierten Probe und Präassoziation

Nach einer 2-stündigen Markierungsininkubation wurde die Sonde über eine Sephadex-Säule (Sephadex G50) durch Elution mit farbigem TES-Puffer (je 10 mg/ml Dextranblau und Phenolrot) von nicht eingebauten Nukleotiden getrennt. Die mit einem Geigerzähler in einem Abstand von 20 cm gemessene Aktivität sollte bei 200 cps liegen. Anschließend wurde Hybridime (10 mg/ml) im ca. 20000-fachen Überschuss zum Blocken der repetitiven Sequenzen zum humanen Sondenmaterial gegeben und ein 10-minütiger Denaturierungsschritt bei 95°C durchgeführt. Danach wurde die Sonde auf Eis gestellt, mit 3 ml PEG-Lösung versetzt und 90 min bei 65°C präassoziiert.

2.2.1.7 Hybridisierung

2.2.1.7.1 Hybridisierung von Southern-Blots mit radioaktiv markierten Proben

Der zu hybridisierende Southern-Blot wurde für 30 min mit PEG-Prähybridisierungslösung und daraufhin mit der präassoziierten Sonde über Nacht bei 65°C in einer Hybridisierungsröhre im Hybridisierungssofen unter ständiger Rotation inkubiert. Danach wurde die Membran für 2-3 x mit Waschpuffer I und dann 2-3 x mit Waschpuffer II unter leichtem Schwenken von ungebundenem Sondenmaterial bei 65°C befreit, in eine Plastikfolie gewickelt, in einer Filmbox mit eingelegtem Röntgenfilm über Nacht bis zu 2 Wochen, je nach Signalstärke der radioaktiven Sonde, exponiert (Sambrook *et al.*, 1989) und dann entwickelt.

2.2.1.7.2 Hybridisierung von Northern-Blots mit radioaktiv markierten Proben

Der zu hybridisierende Northern-Blot wurde für 30 min mit einer kommerziell erhältlichen Hybridisierungslösung (ULTRAhyb-Lösung, Ambion) für 30 min prähybridisiert und daraufhin über Nacht bei 42°C mit der präassoziierten Probe in einer Hybridisierungsröhre im Hybridisierungssofen unter ständiger Rotation inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden wie unter 2.2.1.7.1 Hybridisierung von Southern-Blots mit radioaktiv markierten Proben“ aber bei 42°C anstelle von 65°C durchgeführt.

2.2.1.8 PCR auf genomischer DNA

Für die Amplifikation eines spezifischen Fragmentes wurde der folgende Ansatz pipettiert:

50-100 ng DNA (genomische humane oder Maus DNA)
2,5 µl 10 x PCR-Puffer
2,0 µl 5 mM dNTPs
je 10 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer
1.5 bis 3,5 mM MgCl₂
1,7 U Taq DNA-Polymerase
auf 25 µl mit H₂O_{dd} auffüllen

Die PCR-Reaktion wurde in Mikrotiterplatten oder in Eppendorf-Gefäßen im MJ PCR-Thermal Cycler durchgeführt. Das Temperatur-Zeit-Profil richtete sich nach den verwendeten Primern, deren berechneter Hybridisierungstemperatur und der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes. Typische Profile waren: 1x (95°C 10 min), 35 x (95°C 45 s, 58-62°C 45 s, 72°C 45 s), 1 x (72°C 10 min). Die Aufreinigung von PCR Produkten erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification oder QIAquick Gelextraction Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers.

2.2.2 Mutationsanalyse bei CSNB Patienten

2.2.2.1 SSCP (engl.: single strand conformation polymorphism)-Analyse im *CACNA1F*-Gen

Die SSCP-Analyse stellt eine kostengünstige Methode zur Erkennung von Sequenzveränderungen bei einer großen Anzahl von Patienten und/oder bei Genen mit einer großen Anzahl an Exonen dar. Das Prinzip beruht darauf, dass die Änderung eines einzelnen Nukleotids ein verändertes elektrophoretisches Laufverhalten von einzelsträngiger DNA im nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel verursacht.

Als Vorselektion für die Klonierung des *CSNBI*-Gens wurden die DNAs von 30 Patienten mit X-chromosomaler CSNB auf Mutationen in 48 Exons des *CACNA1F*-Gens mittels SSCP-Analyse untersucht. Auf genomischer DNA aus lymphoblastoiden Zelllinien der Patienten wurden 30 x 46 Fragmente mit den *CACNA1F*-Primern (siehe Material 2.1.2.1) amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Fragmente direkt auf 49:1 und 29:1 dichten Acrylamidgelen analysiert. Neben der unterschiedlichen Zusammensetzung der Gele konnte auch noch die Lauftemperatur (15°C oder 20°C) variiert werden. Zuerst wurde die

Zusammensetzung 49:1 bei 15 und 20°C und erst bei nicht eindeutigen Ergebnissen die Zusammensetzung 29:1 gewählt. 2,5 µl 2-fach Probenpuffer und 2,5 µl PCR Produkt wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert, bei 95°C denaturiert und auf Eis gekühlt. Die Gellösung wurde auf eine Trägerfolie (normale Overheadfolie) zwischen zwei Glasplatten gegossen, wobei auf der einen Seite der einen Glasplatte Platzhalter zur Bildung der Taschen klebten. Nach Aushärtung der Gele wurden sie horizontal auf die Kühlplatten der Multiphor II Kammern gelegt, die mit 1 x TBE-Puffer gefüllt wurden. Die denaturierten Proben wurden auf die Gele aufgetragen und bei 0,15 kV über Nacht in 1 x TBE aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele nach folgendem Protokoll mit Silber gefärbt:

2 x 3 min Inkubation in Lösung A

1 x 10 min Inkubation in Lösung B

2-3 x Waschen mit H₂O_{dd}

15-20 min Inkubation in Lösung D

kurzes Waschen in H₂O_{dd}

Die gefärbten Gele wurden fotografisch dokumentiert, das Bandenmuster der Proben verglichen und Fragmente mit abweichenden Mustern auf ABI Geräten sequenziert. Zur Identifizierung von nicht-pathogenen Polymorphismen wurden diese Fragmente ebenso auf der DNA von 100 X-Chromosomen amplifiziert und unter den gleichen Bedingungen untersucht.

2.2.2.2 Computer-Vorhersageprogramme und Datenbankenanalysen

Der größte Bereich des kritischen 1-2 cM Intervalls des CSNB1-Locus war während dieser Arbeit durch Sequenzdaten des Sangerzentrums (<http://webspaces.sanger.ac.uk/cgi-bin/ace/simple/Xace>) zugänglich, sodass mit YACs, PACs und BACs ein nahezu vollständiger Kontig erstellt wurde. Mittels der NIX Analyse (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/NIX>), das ein Hilfsmittel darstellt, welches die Programme GRAIL, Fex, Hexon, MZEF, Genemark, Genefinder, FGene, BLAST (gegen viele Datenbanken) Polyah, RepeatMasker und tRNAscan benutzt, konnten interessante Regionen in dem genomischen Bereich von *NYX* vorhersagt werden.

2.2.2.3 Untersuchung auf submikroskopische Veränderungen im CSNB1 Locus bei Patienten

Generierte YAC Amplikons, PACs, BACs und genspezifische Sonden wurden auf genomische Southern-Blots mit Patienten DNAs hybridisiert. Die Herstellung der Sonden erfolgte für die YAC Amplikons wie unter 2.2.1.2 beschrieben. Sowohl PAC- als auch BAC-DNA aus dem CSNB1-Kontig wurde mit *Hind*III über Nacht bei 37°C verdaut, auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und in 5 Fraktionen aufgeteilt. Diese Fraktionen wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Geextraktionskit von Qiagen extrahiert. Die Qualität der Sonden wurde jeweils auf einer Kontrollmembran getestet, die *Eco*RI geschnittene DNA einer gesunden Person enthielt. Die Sonden der GARP-homologen Sequenz des PACs RPC-1 165JI5 wurden durch Amplifikation eines ungefähr 800 bp großen Fragmentes mit der Primerkombination Ex1-2FOR/Ex1-2REV und eines gleich großen Fragmentes mit der Primerkombination F8/R6 hergestellt. Die PCR Produkte wurden mit dem QIAquick Extraktionskit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, markiert und nach Hybridisierung auf Kontrollblots auf restringierte genomische Patienten DNAs hybridisiert.

2.2.2.4 Mutationsanalysen durch SSCP-Analyse und direkte Sequenzierung

Die DNA von XLCSNB Patienten, die keine Mutation im *CACNA1F*-Gen aufzeigten, wurden im Exon 3 des *NYX*-Gens mittels SSCP-Analyse untersucht. Durch PCR wurden 7 überlappende, ca. 300 bp große Fragmente mit den folgenden Primerkombinationen amplifiziert: GARP1F/GARP1R, GARP2F/GARP2R, GARP3F/GARP3R, GARP4F/GARP4R, GARP5F/GARP5R, GARP6F/GARP6R und GARP7F/GARP7R, gereinigt und auf ein verändertes Laufverhalten im Polyacrylamidgel untersucht (siehe 2.2.2.1). Zur Identifizierung von nicht-pathogenen Polymorphismen wurden diese Fragmente ebenso von der DNA von 100 gesunden Personen amplifiziert und unter den gleichen Bedingungen untersucht.

Bei mangelnder Qualität einzelner Proben in den silbergefärbten SSCP-Gelen, in Exon 1, Exon 2 und Exon 3 und zur Verifizierung von Fragmente mit abweichenden Mustern wurde auf ABI Geräten sequenziert.

2.2.2.5 ARMS PCR

Mutationen, die durch direkte Sequenzierung identifiziert worden waren, mussten auf ihre Pathogenität untersucht werden. Eine Mutation wurde als pathogen gewertet, wenn sie nicht in 100 X-Chromosomen von gesunden Probanden auftrat. Aus Kosten- und Zeitgründen wurde hierfür die ARMS-Methode (engl.: Amplification Refractory Mutation System) gewählt. Dieses Verfahren beruht auf einer beabsichtigten Paarung, bzw. Fehlpaarung des letzten Nukleotides des 3'-Endes eines PCR-Primers unter stringenten PCR-Bedingungen. Es werden 2 Primer so synthetisiert, dass sie sich nur im letzten 3'-Nukleotid unterscheiden und die durch diese Base spezifisch für Allel 1 oder Allel 2 einer DNA-Sequenz sind. Um festzustellen, welches der beiden Allele in einer unbekanntem DNA vorhanden ist, werden zwei getrennte PCR-Reaktionen durchgeführt, mit jeweils einem der allelspezifischen Vorwärts-Primer und einem identischen Rückwärts-primer. Die Verlängerung der allelspezifischen Primer an der Ziel-DNA erfolgt nur dann, wenn das letzte Nucleotid am 3'-Ende des Primers an dieser Stelle der Ziel-DNA komplementär ist. Ist dies nicht der Fall erfolgt unter stringenten Bindungen keine Elongation des Primers in der PCR. Die Synthese eines PCR-Produktes kann also im Fall der Fehlpaarung nicht erfolgen.

Auf diese Weise konnten 3 Mutationen, die in der DNA von 3 CSNB-Patienten identifiziert worden sind, mit folgenden der Primerkombinationen überprüft werden: 1.: Kontr.109912For, bzw. Mut. 109912For mit Garp3R, 2.: Mut.2618F, bzw. Ktr.2618F mit GARP6R und 3.: Mut.2438F, bzw. Ktr.2438F mit GARP1R.

2.2.3 Klonierung des *Nyx*-Gens der Maus

2.2.3.1 Isolierung der genomischen *Nyx*-Sequenz

Eine humane ³²P-dCTP markierte *NYX*-Probe (800 bp von Exon3, Primerpaar F8/R6) wurde auf eine genomische PAC (engl.: P1-derived artificial chromosome) Bank aus genomischer DNA des Maus Stammes 129/SvevTACfBr (Bank Nr. 711, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin, D) hybridisiert. Die DNA der positiven Klone wurde mit dem Plasmid Midi Kit von Qiagen nach den Anweisungen des Herstellers isoliert, mit *EcoRI*, *HindIII*, *HincII* und *PstI* verdaut, auf eine Nylonmembran transferiert und wieder mit der humanen *NYX*-Probe hybridisiert. Ein 7 kb großes *EcoRI* Fragment, das mit der Genprobe ein positives Hybridisierungssignal ergab, wurde mit Hilfe des Gelextraktionskits von Qiagen aus dem Gel aufgereinigt und in den

Plasmidvektor pBluescript II SK kloniert. Daraufhin wurde das 7 kb *EcoRI* Insert mit *PstI* verdaut, die resultierenden Fragmente in den gleichen Vektor subkloniert und mit Standard M13 Primern sequenziert. Dadurch konnte ein Subklon isoliert werden, der einen Teil vom humanen Exon 3 des orthologen Mausgens repräsentierte. Diese Nukleotidsequenz wurde zur Synthese von Maus-spezifischen Primern für die RT-PCR und für die RACE-PCR (engl.: RACE; rapid amplification of cDNA ends) verwendet.

2.2.3.2 cDNA Synthese und RACE-PCR

Die Synthese der cDNA aus Gesamtaugen-RNA wurde mit Hilfe der SMART Technologie von Clontech nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die 3'-RACE PCR wurde mit einem Vorwärtsprimer (3'Maus RACE) und folgendem Temperatur-Zeit-Profil durchgeführt: 5 x (94°C 30 s, 72°C 3 min), 5 x (94°C 30 s, 70°C 30 s, 72°C 3 min), 20 x (94°C 30 s, 68°C 30 s, 72°C 3 min). Das 2 kb große RACE Produkt wurde in einen kommerziell erhältlichen Vektor von Invitrogen (pCR2.1-TOPO) nach den Angaben des Herstellers kloniert und mit M13 Standardprimern und einem genspezifischen Primer (3'Maus cDNA Primer) sequenziert. Die 5'-RACE PCR war nur unter Zusatz von Advantage-GC 2 Polymerase von Clontech und einer semi-nested Strategie mit dem im Kit gelieferten 5'Primer und zwei genspezifischen 3'Primern (5'RACE im 3'UTR und 5'Maus RACE) mit folgendem Temperatur-Zeit-Profil möglich: 1. PCR mit 2,5 µl RACE Ready cDNA und 1,0 M GC-Melt, 1 x (94°C 3 min), 25 x (94°C 30 s, 68°C 12 min) 1 x (68°C 12 min), 2. PCR mit 5 µl der ersten PCR und 1,0 M GC-Melt 1 x (94°C 3 min), 30 x (94°C 30 s, 68°C 12 min) 1 x (68°C 12 min). Auch hier wurden die unterschiedlich großen Fragmente (ca. 700, 500 und 300 bp) in den pCR2.1-TOPO Vektor von Invitrogen kloniert und mit M13 Standardprimern sequenziert. Auf diese Weise konnten Exon 1, Exon 2 und Exon 3 von Nyx in der genomischen Maus Sequenz ermittelt werden. Mit nested Primern in Exon 2 (5'RACE EX2) und Exon 1 (5'RACE EX1) schloss sich eine weitere 5'-RACE PCR mit folgendem Temperatur-Zeit-Profil an: mit Primer 5'-RACE Ex2 und 2,5 µl 5'-RACE Ready cDNA, 1,5 M GC-Melt: 1 x (94°C 3 min), 25 x (94°C 30 s, 68°C 12 min), 1x (68°C 12 min) und mit 5 µl Template aus der EX2 5'-RACE PCR 1 x (94°C 3 min), 40 x (94°C 30 s, 68°C 12 min), 1x (68°C 12 min). Dadurch wurde ein 2 kb großes Fragment isoliert, das mit Standardvektorprimern und genspezifischen Primern (5'-Walk27.03.01, 5'-Walk03.04.01, 5'-Walk16.04.01, 5'UTR2.5.01) sequenziert werden konnte.

2.2.3.3 Ermittlung der vollständigen genomischen Sequenz von *Nyx*

Die genomische intronische DNA Sequenz wurde sowohl durch Sequenzierung (Maus Exon3 upstream, Maus Exon 3 downstream) als auch durch Datenbankanalysen der beiden PACs: RPCIP711A10324Q2 und RP23-165J1 (Stand 17. August 2002) ermittelt (www.ensembl.org, www.celera.com).

2.2.3.4 Expressionsanalyse von *Nyx* in Mausgeweben mittels RT-PCR

Die reverse Transkription der Gesamt-RNA aus 9 unterschiedlichen Maus-Geweben wurde mit der Methode des „Random hexanucleotide priming“ mit reverser Transkriptase (Omniscript; Qiagen) von Frau Steffanie Münscher durchgeführt. Die cDNA wurde mit einem Vorwärtsprimer in Exon 2 (Maus_RTFOR (Ex2-Ex3) und einem Rückwärtsprimer in Exon 3 (Maus Exon3 upstream) mit HotStart *Taq* von Qiagen mit 5 x Q-Lösung amplifiziert. Als Positiv-Kontrolle diente *Gapdh* (GapdhF und GapdhR).

2.2.4 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen das NYX-Protein

2.2.4.1 Proteinantikörper aus Kaninchen

2.2.4.1.1 Konstrukte und Expression der Proteine

Sowohl die gesamte *NYX*-cDNA ohne Signalsequenz als auch N-terminale und C-terminale cDNA Teilsequenzen wurden mit folgenden Primerkombinationen PCR-amplifiziert. Konstrukt1.SphI.F mit Konstrukt2.HindIII für die Aminosäuren (AS) 31-481, Konstrukt1.SphI.F mit Konstrukt1.HindIII.R für die AS 31-268 und Konstrukt2.SphI.F mit Konstrukt2.HindIII für die AS 269-481. Nach Aufreinigung der Produkte mit dem Gelextraktionskit von Qiagen wurden diese in den pQE30-Vektor der gleichen Firma ligiert. Durch *SphI*-Linker an den 5'-Enden der Vorwärtsprimer und *HindIII*-Linker der Rückwärtsprimer konnte die Klonierung gerichtet durchgeführt werden. Der Vektor beinhaltet eine RBS-Erkennungsstelle und N-terminal zu den inserierten Fragmenten, einen Sequenzabschnitt, der für sechs Histidine kodiert. Die sechs Histidine ermöglichen eine Aufreinigung der überexprimierten Proteine über eine Nickelchelataffinitätschromatographie (Nickel-NTA). Die in den Vektor ligierten PCR-Produkte wurden in kompetente Zellen der *E.coli* Stämme M15 und SG13009 von Qiagen transformiert und mehrere Klone sequenziert. Die Expression der Proteine erfolgte in 100 ml Kulturen mit 25 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Ampicillin für 5 h bei 37°C, 1 mM IPTG, 220 rpm und unter guter Belüftung. Die 100 ml LB-Medium Kulturen wurden mit

1,5 ml einer Übernachtskultur beimpft und vor der Induktion mit IPTG bis zu einer $OD_{600\text{ nm}} = 0,5 - 0,7$ inkubiert. Die Zellen wurden bei $10\,000 \times g$ für 10 min pelletiert und vor der Aufreinigung des überexprimierten Proteins bis zu 30 Tagen bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4.1.2 Aufreinigung der Proteine

Aufgrund der Unlöslichkeit der in *E. coli* überexprimierten Proteine wurde die Isolierung unter denaturierenden Bedingungen und Zusatz von Detergenz durchgeführt. Das unter 2.2.4.1.1 beschriebene Pellet wurde mit jeweils 4 ml *E. coli* Lysispuffer und Ultraschallbehandlung (3 x 3 min unter Eiskühlung bei max. konstanter Leistung mit kleiner Spitze, MicroTip limit 5, Branson SONIFIER 250) lysiert. Die Zelltrümmer wurden 30 min bei $10\,000 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand mit 2 ml 50% Nickel-NTA Agarose Suspension versetzt und 1 h bei RT über Kopf geschüttelt. Danach wurde zweimal mit 1 ml *E. coli* Waschpuffer gewaschen und zweimal mit 500 μl *E. coli* Elutionspuffer eluiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Bradford der Firma Sigma-Aldrich. Die Elutionsfraktionen wurden auf ein präparatives 12% PAA-Gel aufgetragen und über Nacht aufgetrennt. Von einer Spur wurde zur Kontrolle ein Western Blot nach Standardmethoden angefertigt und mit Maus anti-RBS Antikörper und anti-Maus HRP Antikörper detektiert, während die anderen Spuren mit Silber gefärbt und die Banden mit entsprechenden Größen ausgeschnitten wurden. Diese Präparationen wurden ohne weiter Behandlung zur Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen verwendet. Die Immunisierung wurde nach Standardmethoden von der Firma BioGenes (Gesellschaft für Biopolymere mbH, Berlin) durchgeführt.

2.2.4.1.3 Spezifität der Protein Antiseren

Die Überprüfung der Antiseren erfolgte mit *E. coli* Gesamt- oder aufgereinigtem Protein im Western-Blot. Nur das Antiserum aus der Immunisierung mit C-terminalem gereinigtem Protein zeigte eine spezifische Bande mit erwarteter Größe bei einem Titer von 1:5000. Das gesamte Antiserum der Tiere wurde gewonnen, sobald der Antiserumtiter konstant blieb. Um zu prüfen, ob die Antiseren endogenes NYX-Protein erkennen, wurde Gesamtprotein aus lymphoblastoiden Zelllinien von Patienten isoliert. Hierfür wurden 40×10^6 Zellen in RPMI 1640 w/o L-Glutamine von LabForce mit 2 mM Glutamin, 10% FCS, und Streptomycin (100U/ml) und Penicilin (100U/ml) angezogen und in 1,8 ml Lysepuffer mit 5 – 7 Stöße mit einem eisgekühlten Teflon-Pistil homogenisiert. Die unlöslichen Bestandteile und Zellkerne wurden bei $10000 \times g$ für 20 min bei 4°C abzentrifugiert und die

Überstände mit einem vierfachen Volumen Aceton gefällt. Die Pellets des Überstandes und der ersten Zentrifugation wurden in 200 µl mit 6-fachen Probenpuffer versetzt und vor der Auftragung auf ein 12% PAA-Gel bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Proteine wurden nach üblichen Standardmethoden auf eine Membran transferiert und mit den Antiseren getestet. Die lymphoblastoide Zelllinie 7903 diente hierbei als Kontrolle, da bei diesem Patienten Exon 3 vollständig fehlt und somit kein Protein detektierbar sein dürfte. Der Nachweis erfolgte mit allen Antiseren und anti-Kaninchen HRP Antikörpern. Da hierbei keine Signale mit erwarteter Größe, selbst bei einer Verdünnung von 1:10, detektiert werden konnte, wurden alle Antikörper aufgereinigt werden.

2.2.4.2 Peptidantikörper aus Kaninchen

Die Immunisierung von je zwei Kaninchen mit KLH-Konjugaten (keyhole limped haemocyanine) der zwei Peptide EPO12831 (TVERGCSVRCDRAGLL) und EPO12832 (FGRSSDGLCVDPEEL) wurde nach Standardprotokollen von der Firma EUROGENTEC durchgeführt. Die Antiseren der Tiere wurden auf Dot-Blots der Peptide auf ihre Spezifität getestet und bei gleich bleibenden Titer das Gesamtserum der Tiere gewonnen. Hierfür wurden 2 µg der Peptide auf eine Nitrocellulosemembran von Amersham Pharmacia Biotech aufgetragen und beide Antiseren und die entsprechenden Präimmunseren in Verdünnungen von 1:500, 1:1000 und 1:5000 auf ihre Reaktivität gegen das Antigen getestet. Als sekundärer Antikörper wurde der HRP-konjugierte anti-Kaninchen Antikörper verwendet. Eines der beiden Präimmunseren (SA1392) zeigte eine schwache Reaktion mit beiden Peptiden, während das Präimmunserum des Kaninchens SA1393 rein war und das dazugehörige Antiserum eine starke Reaktivität mit dem Peptid EPO12831 aufwies. Im Western-Blot mit transferiertem überexprimierten Protein aus HeLa oder COS-7 Zellen konnte jedoch kein spezifisches Signal mit dem zu erwartenden Molekulargewicht detektiert werden.

2.2.4.3 Affinitätsaufreinigung der Antiseren

Die Affinitätsaufreinigung der Antiseren wurde in zwei Stufen durchgeführt. Zuerst wurden die Immunoglobuline aus dem Serum aufgereinigt und im zweiten Schritt wurde eine Affinitätschromatographie mit SulfoLink Reagentien von der Firma Pierce durchgeführt. Hierfür wurden 20 ml des Antiserums SA1393 10 min bei 500 x g abzentrifugiert um eventuell vorhandene Zellreste zu entfernen. Danach wurde das Serum für 10 min bei 10 000 x g zentrifugiert um die Lipidschicht des Serums abzunehmen. Zu

den verbleibenden 10 ml lösliche Fraktion wurden auf Eis für 11/2 h unter ständigem Rühren tropfenweise 10 ml gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{O}_4$ -Lösung gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 10 000 x g für 10 min bei 4°C wurde der Überstand vorsichtig abdekantiert, und das Pellet in 6 ml Startpuffer resuspendiert und über Nacht sowie zweimal am nächsten Tag gegen Startpuffer in einer Slide-A-Lyzer Dialyse Kassette von der Firma Pierce dialysiert. Während die dialysierte Probe durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 10 000 x g geklärt und der pH des Serums mit 600 µl 1 M Tris pH 8,0 eingestellt wurde, äquilibrierte man 2 ml Protein-A Agarose von der Firma Roche mit einem 5-fachen Volumen Startpuffer. Danach wurde das Serum auf die Protein-A Agarose gegeben, einmal mit einem 5-fachen Volumen Affinitätsaufreinigung (Protein-A Agarose) Waschpuffer 1 und dann mit einem 5-fachen Volumen Affinitätsaufreinigung (Protein-A Agarose) Waschpuffer 2 gewaschen bis bei einer Wellenlänge von 280 nm kein Protein gemessen wurde. Die gebundenen Immnglobuline wurden schrittweise mit 500 µl Eluierungspuffer in ein Eppendorfgefäß mit 100 µl Neutralisationspuffer eluiert bis bei einer Wellenlänge von 280 nm kein Protein messbar war (12 Eluate). Danach wurden die Eluate unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen auf einem 10% PAA-Gel mit Silberfärbung auf ihre Reinheit getestet. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen konnten die Gesamt-IgGs bei ca.150 kDa und unter reduzierenden Bedingungen die schwere und die leichte Kette bei jeweils ca. 55 kDa bzw. ca. 25 kDa klar detektiert werden. Die aufgereinigten IgG-Fraktionen wurden vereinigt, gegen PBS über Nacht dialysiert und mit 10% NaN_3 -Lösung in einem Verhältnis von 1:1 versetzt. Die Isolierung von antigenspezifischen Antikörpern aus der IgG-Fraktion erfolgte durch Kopplung an eine SulfoLink Säule. Das SulfoLink Coupling Gel besteht aus immobilisiertem Iodacetyl mit einer atomigen Kohlenwasserstoffkette, das an eine Agarose vernetzt ist. So kann das Peptid ungehindert durch eine Sulfohydryl-Gruppe eines Cystein-Restes an das Gel binden. Vor der Bindung des Peptids an die Gelmatrix wurden 2ml SulfoLink Coupling Gel mit 6 ml Äquilibrierungspuffer eingestellt. Dazu wurden 3 mg Peptid EPO12831 in 500 µl Äquilibrierungspuffer gegeben und dieser Ansatz 15 min bei RT über Kopf geschüttelt. Damit sich die Gelmatrix absetzen konnte, wurde die Säule für 30 min bei RT stehen gelassen und daraufhin der Puffer abgelassen. Daraufhin wurde die Säule mit 3 ml Äquilibrierungspuffer versetzt, über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag mit 1 ml Peptidbindungspuffer versetzt. Dieser Ansatz wurde wieder 15 min bei RT über Kopf geschüttelt, 30 min stehen gelassen und dann der Puffer abgelassen. Es schlossen sich zwei Waschschrte mit à 16 ml Peptid Waschpuffer I und Peptid

Waschpuffer II an. Die Antigensäule wurde in Waschpuffer II verschlossen bei 4°C gelagert. 20 ml des aufgereinigten Antiserums SA1393 wurden mit 30 ml Bindungspuffer und 1 ml Peptid EPO12831 an SulfoLink gekoppelt versetzt und über Nacht bei 4°C über Kopf geschüttelt. Der Ansatz wurde 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das Pellet (Säulenbett) mit 2 ml Bindungspuffer auf die Säule gespült. Der Puffer der Säule wurde abgelassen und 8 ml davon aufgehoben. Es schlossen sich weitere Elutionsschritte mit 10 ml Gentle Puffer, 10 ml PPIPES-Puffer, 10 ml Citrat puffer, 10 ml Glycinpuffer und 10 ml Triethylaminpuffer an. Hierbei wurden jeweils 5 x 2 ml in je 100 µl 1M Tris, pH 8,0 bzw. bei den Triethylamin Fraktionen in je 100 µl 1M Tris, pH 7,5 aufgefangen und bei 4°C gelagert. Die einzelnen Fraktionen wurden auf Dot-Blots (siehe Methoden 2.2.6.1) auf ihre Reaktivität gegen das Peptid EPO12831 getestet wobei die Glycineluate die größte Immunantwort auf das Antigen ergaben. Den höchsten Titer ergaben die Glycinfractionen #1 und #2 die das Antigen noch bei einer Verdünnung von 1:5000 detektierten. Im Western-Blot mit überexprimierten Protein aus HeLa oder COS-7 Zellen konnte jedoch kein spezifisches Signal mit der zu erwartenden Größe detektiert werden.

2.2.5 Studien von funktionellen Domänen in NYX

2.2.5.1 Klonierung von NYX-Expressionskonstrukten mit V5-Erkennungsstelle

Für die Expression in Säugerzellen wurde der Vektor pcDNA4/V5-His von Invitrogen verwendet. Dazu wurde die gesamte humane und Maus cDNA oder auch cDNAs mit fehlenden NYX-Domänen mit entsprechenden Primern amplifiziert. Um allzu lange Primer zu vermeiden, wurden zwei Vorwärtsprimer verwendet. Die Vorwärtsprimer, die für die Amplifikation der gesamten humanen und Maus cDNA verwendet worden sind, enthielten die NYX-Signalsequenz, eine V5-Erkennungsstelle (GGTAAGCCTATCCCTAACCCCTC-TCCTCGGTCTCGATTCTACG) und 20 Nukleotide der entsprechenden NYX-cDNA. Der Rückwärtsprimer, der in beiden PCRs verwendet wurde, beinhaltete das NYX-Stopp Kodon um die sich im Vektor stromabwärts befindenden V5- und His-Erkennungsstellen zu umgehen. Nach der ersten Amplifikation wurden die Produkte mittels QIAquick Gelextaktionskit gereinigt und als Template für die zweite PCR eingesetzt. Die Primer für die Amplifikation der humanen und Maus cDNAs waren: 1.NYX.FOR, 2.NYX.FOR mit 1.2.NYX.REV und entsprechend 1.Nyx.FOR, 2.NyxFOR mit 1.2.NyxREV. Für Expressionskonstrukte ohne C-terminaler Sequenz oder ohne Signalpeptid wurden die oben beschriebenen Plasmide als Template verwendet. Um das humane und Maus Insert

ohne C-terminaler Sequenz zu amplifizieren wurden folgende Primer-Kombinationen gewählt: NYXΔGPIFOR mit NYXΔGPIREV und NyxΔGPIFOR mit NyxΔGPIREV. Um das Maus Insert ohne Signalsequenz, bzw. ohne Signalpeptid und ohne C-terminaler Sequenz zu amplifizieren, wurden folgende Primer verwendet: NyxΔSSFOR mit NyxΔSSREV und NyxΔGPIΔSSFOR mit NyxΔGPIΔSS.

2.2.5.2 Transfektion in COS-7 und HeLa Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wurden in 6-Loch *TPP* Zellkultur Testplatten 1×10^5 und in 75 cm² Flaschen 3×10^6 COS-7 und HeLa-Zellen in den entsprechenden Medien (DMEM-Ham's F12 w/o L-Glutamine w/o Hepes Lab Force mit 3 mM L.Glutamin, Streptomycin (100U/ml, Penicilin (100U/ml) und 10% FCS) ausgesät. Die Transfektion wurde nach dem PolyFect Transfektionsprotokoll von Qiagen nach den Angaben des Herstellers mit 1 bzw. 15 µg Plasmid DNA, 10 bzw. 50 µl PolyFect und 100 µl Optimem von Invitrogen durchgeführt. Die Transfektionseffizienz lag durchschnittlich bei 20%.

2.2.5.3 Immunfluoreszenz

Nach 24-stündiger Inkubation der transfizierten COS-7 und HeLa Zellen wurden diese mit unterschiedlichen Färbe- und Fixiermethoden analysiert. Um Oberflächenproteine zu detektieren wurden die Zellen lebend wie folgt gefärbt: Zur Reduzierung unspezifischer Signale wurde der anti-V5 Antikörper von Invitrogen in einem adäquaten Volumen Zellmedium 1:3000 verdünnt und mit einem hitzedenaturierten, nicht transfizierten Zelllysate (COS-7 oder HeLa) versetzt. Nach einem 10-minütigen Absorptionsschritt bei 37°C und einem kurzen Zentrifugationsschritt wurde die Antikörperlösung auf die lebenden Zellen gegeben. Zur Beseitigung von ungebundenem Antikörper wurden die Zellen nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C dreimal mit Zellmedium gewaschen. Danach wurden die Zellen für weitere 10 min bei 37°C mit einem FITC-konjugierten anti-Maus Antikörper in einem 1:500 Verhältnis in Zellmedium inkubiert. Wieder wurden unspezifische Bindungen des Antikörpers durch einen dreimaligen Waschschrift mit Medium entfernt. Danach wurden die Zellen entweder sofort mit 2% Formaldehyd in 1 x PBS für 5 min fixiert oder für weitere 30 min in Medium inkubiert um zu erreichen, dass nicht verankertes Protein von der Plasmamembran gelöst wird. Nach der Detektion und Fixierung des Oberflächenproteins der lebenden Zellen wurde der intrazelluläre Pool dieses Proteins durch einen 15-minütigen Permeabilisierungsschritt der Zellmembran mit 0,2% Triton X 100 in 1 x PBS analysiert. Nach einem dreimaligen PBS Waschschrift wurden die

Zellen mit preabsorbiertem anti-V5 Antikörper in PBGT für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem dreimaligen PBGT Waschschrift wurde der erste Antikörper durch die 30-minütige Inkubation bei RT mit einem Cy3 anti-Maus Antikörper in einem Verhältnis 1:500 in PBGT detektiert. Danach wurden die Zellen 3 x mit PBGT gewaschen und mit 1% Formaldehyd in PBS nachfixiert um eine Farbverschiebung zwischen den Epitopen an unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen zu vermeiden. In einigen Experimenten wurde das endoplasmatische Retikulum (ER) in lebenden Zellen mit einem ER Marker von MolecularProbes in einem Verhältnis 1:1000 in Medium sichtbar gemacht. Der Golgi-Komplex wurde mit einem anti-humanen Golgin-97 Maus Antikörper von MolecularProbes in einer Verdünnung von 1:1000 in PBGT detektiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBGT wurden sie mit einem CY5-konjugierten anti-Maus Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in PBGT gefärbt. Nach der Entfernung von nicht-gebundenem 2. Antikörper wurden die Zellen in VectaShield Medium (Vector Laboratories) mit 100 ng/ml DAPI (4',6-Diamidino-2 phenyl-indol-dihydrochlorid, Sigma) eingebettet und mit einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.2.5.4 Zellfraktionierung und Western-Blot Analyse

Zur immunochemischen Detektion des überexprimierten Proteins wurden 48 h nach der Transfektion COS-7 oder HeLa Zellen pelletiert, 2 x mit PBS gewaschen und in Lysepuffer (siehe Material 2.1.17.4) mit 5 – 7 Stößen mit einem eisgekühlten Teflon-Pistil homogenisiert. Die unlöslichen Bestandteile und Zellkerne wurden bei 1000 x g für 20 min bei 4°C abzentrifugiert. Die Überstände wurden bei 100 000 x g für 1 h bei 4°C pelletiert, der daraus resultierende Überstand mit einem vierfachen Volumen Aceton gefällt und bei 20 000 x g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Dieses und die Pellets der ersten Zentrifugationen wurden in 40 µl Hefelysepuffer (siehe Material 2.1.17.4) gelöst und eine detektierbare Menge an Protein in sechsfachen Probenpuffer auf ein 10% SDS PAGE aufgetragen. Die Proteine wurden durch einen semi-trockenen elektrischen Transfer auf eine PVDF Membran von Roche geblottet, die daraufhin über Nacht mit Milchpulver von Protifar geblockt wurde. Nach einer Präabsorption des anti-V5 Antikörpers mit nicht transfizierten 95°C hitzedenaturierten HeLa Zellen bei 37°C für 15 min wurde die Membran mit diesem Antikörper in 1%-iger PBST Lösung 1 h bei RT unter ständigen Drehen inkubiert. Daraufhin wurde der erste Antikörper mit einem anti-Maus HRP (engl.: Horse Raddish Peroxidase) Antikörper mit dem Chemilumineszenz-Reagenz von Perkin Elmer und Exposition von Röntgenfilmen visualisiert.

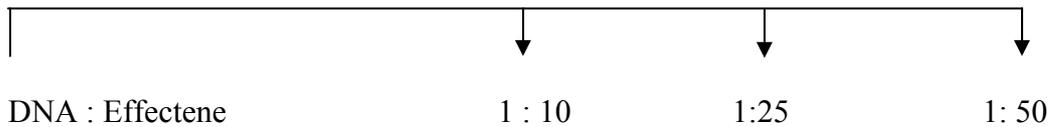
2.2.6 Untersuchungen zur putativen Promoter Region

2.2.6.1 Klonierung der putativen Promoter Region von NYX in Maus und Mensch

Die mittels vergleichender Sequenzanalyse und durch Computer gestützte Motivanalyse vorhergesagte putative Promotersequenz wurde mit Proof Start Polymerase mit Q-Lösung von Qiagen PCR amplifiziert. Hierfür wurden Vorwärts- und Rückwärts-Primer mit *XhoI*-Linkern verwendet. Die PCR Produkte wurden mit dem Gelextraktionskit von Qiagen aufgereinigt, in den pCR-Blunt II-TOPO Vektor von Invitrogen zwischenkloniert und mit Standardprimern und Fragment-spezifischen Primern [Mo-Insert(For) bzw. Hu-Insert(For)] sequenziert. Nach einem *XhoI*-Verdau der Plasmide wurden die *XhoI*-Fragmente in den pGL3-Basic Vektor von Promega kloniert und mit Vektor-spezifischen [(RVprimer3(for) und pGL3 REV Pri)] und Insert-spezifischen Primern [Mo-Insert(For) bzw. Hu-Insert(For)] sequenziert.

2.2.6.2 Dual-Glo™Luciferase Assay

In 96-Loch TPP Zellkultur Testplatten von Fisher Scientific wurden 2×10^4 HeLa- bzw. NIH 3T3 Maus Fibroblasten Zellen ausgesät und in 100 µl HeLa- bzw. NIH 3T3 Medium (DMEM-Ham's F12 w/o L-Glutamine w/o Hepes, bzw. DMEM w/o L-Glutamine w/NaPyruvate, LabForce mit 3 mM bzw. 6 mM L-Glutamin, jeweils Streptomycin (100U/ml, Penicilin (100U/ml) und 10% FCS) über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die optimalsten Bedingungen unter Verwendung von folgendem Pipettierschema für die Transfektion ermittelt:

**DNA Ansätze**

A	1	2	3
0,2 µg DNA In 120 µl EC Puffer + 1,6 µl Enhancer	0,5 µl Effectene 1/4 A	1,25 µl Effectene 1/4 A	2,5 µl Effectene 1/4 A
B	4	5	6
0,4 µg DNA In 120 µ EC Puffer + 3,2 µl Enhancer	1 µl Effectene 1/4 B	2,5 µl Effectene 1/4 B	5 µl Effectene 1/4 B
C	7	8	9
0,8 µg DNA In 120 µ EC Puffer + 6,4 µl Enhancer	2 µl Effectene 1/4 C	5 µl Effectene 1/4 C	10 µl Effectene 1/4 C

Die entsprechende DNA Konzentration des zu untersuchenden Konstrukts und des Ko-Reporters wurden in einem Verhältnis 10:1 mit EC-Puffer auf 30 µl pro Ansatz aufgefüllt. Zu diesem Ansatz wurde dann, je nach Bedingung, die entsprechende Menge an Enhancer-Lösung dazu gegeben, kurz gemischt und 2-5 min bei RT inkubiert. Parallel dazu wurde die entsprechende Effectene Konzentration auf 20 µl EC-Puffer pro Ansatz aufgefüllt und zu den DNA Ansätzen gegeben. Während der Transfektionsansatz zur Komplexbildung 10 min bei RT inkubierte, wurden die am Vortag ausgesäten Zellen 1 x mit PBS gewaschen und mit 100 µl frischem Medium versetzt. Daraufhin wurden jeweils 50 µl des Transfektionsansatzes gleichmäßig auf den ausgesäten Zellen verteilt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ konnte die Lumineszenz mit einem Luminometer (Luminoskan Ascent Labsystems) gemessen werden. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und 75 µl frisches Medium und 75 µl Dual-Glo™ Reagenz zur Lyse auf die Zellen gegeben und gut miteinander vermischt. Nach 5-minütiger Lyse wurden die Zellen in weiße 96-Loch Clinplatten (Labssystem) pipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde die Firefly-Lumineszenz und nach Zugabe von 75 µl Dual-Glo™ Stop & Glo® Reagenz und 10-minütiger Inkubation bei RT die Renilla-Lumineszenz gemessen. Um die

Ergebnisse der Firefly Werte zu normalisieren, wurden diese nach Subtraktion der Blindwerte durch die Renilla Werte nach Abzug der Blindwerte dividiert und der Mittelwert von drei gleichen Transfektionen berechnet und Ein kommerziell erhältlicher pGL3-Vektor mit einem SV40 Promotor (Promega) diente als Positiv-Kontrolle.

2.2.6.3 Deletionskonstrukte

Etwa 20 µg der pGL3-Plasmide mit den entsprechenden putativen Promoterbereichen von *NYX* wurden mit 40 Einheiten des *ExoIII* sensitiven Enzyms *MluI* für 3 h bei 37°C verdaut. Zur Inaktivierung des Restriktionsenzym wurde der Ansatz bei 65°C für 10 min inkubiert und daraufhin mit 30 Einheiten des *ExoIII* resistenten Enzyms *KpnI* 3 h bei 37°C verdaut. Nach der Inaktivierung des Ansatzes bei 65°C für 10 min schloss sich der Exonuclease Verdau mit Reagentien von MBI Fermentas in einem Gesamtvolumen von 60 µl an. Hierfür wurden 7,5 µl S1 Nuclease Mix in 8 verschiedene Eppendorf Röhrchen vorgelegt und der *MluI/KpnI* Verdau bei 25°C äquilibriert. Danach wurden 2,5 µl des Ansatzes zu 7,5 µl vorgelegtem S1Nuclease Mix pipettiert (t=0 min) und zu dem Rest des Ansatzes 400 Einheiten *ExoIII* gegeben. Nach 5, 8, 12, 16, 20, 25 und 30 min wurden jeweils 2,5 µl des Verdaus zu dem vorgelegten S1 Nuclease Mix pipettiert, die Proben bei RT für 30 min inkubiert und mit jeweils 1 µl S1 Nuclease STOP Puffer bei 70°C inkubiert. Die behandelten Proben wurden im 1% Agarosegel auf Deletionen getestet und mit einem 0,3-fachen Volumen (7,5 M) Ammoniumacetat und einem 2-fachen Volumen 100% Ethanol bei -20°C über Nacht gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in einem adäquaten Volumen EB Puffer von Qiagen aufgenommen. Danach wurden die gefällten Deletionskonstrukte in 40 µl Ligase Mix gegeben und 16 h bei 16°C inkubiert und nach Standardbedingungen in JM109 kompetente Zellen transformiert. Die DNA der isolierten Plasmide wurde mit Vektor-spezifischen Primern [(RVprimer3(for) und pGL3 REV Pri)] sequenziert und die Konstrukte wie unter 2.2.6.2 auf ihre Luziferaseaktivität getestet.