

### 3 Methoden

#### 3.1 Präparation der zerebralen KapillargefäÙe

##### 3.1.1 MikrogefäÙ-Präparation nach Harik et al. (1985)

Das Gehirn wurde nach Entnahme unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und in 5 ml Puffer A resuspendiert. Nach einem Homogenisationsschritt in einem Glas-Teflon Homogenisator und einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 1.000 x g wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 5 ml Puffer B resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 5.000 x g wurde der Überstand entfernt, das Pellet in 2 ml Puffer A gelöst und die Probe auf 2 x 2 cm große Säulen transferiert, die mit gewaschenen Glaskugeln gefüllt waren. Die Säulen wurden viermal mit Puffer A gewaschen und die Kapillaren anschließend durch Inkubation mit 1 ml Puffer A (30 min bei + 4°C unter Schütteln) von den Glaskugeln gelöst. Die Suspension mit den Kapillaren wurde 15 min bei + 4°C und 12.000 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Kapillaren entweder bei – 80°C gelagert oder direkt für die RNA-Extraktion eingesetzt.

Puffer A: 1 x PBS; 5 mM EDTA ; 5 mM Sucrose

Puffer B: Puffer A mit 15% Dextran 70

##### 3.1.2 Kapillar-Präparation nach Risau et al. (1990)

Alle Reaktionsschritte wurden auf Eis durchgeführt und die Puffer, soweit möglich, auf 4°C heruntergekühlt. Nach Entnahme der Hirne wurden die blutgefäÙreichen Hirnhäute Pia mater und Dura mater und der Plexus choroideus vorsichtig entfernt. Das Kleinhirn wurde abgetrennt, der Kortex mit zwei Skalpellern zerkleinert und in 5 ml TJ-2 Puffer aufgenommen. Das zerkleinerte Hirn wurde durch hoch- und herunterpipettieren in einer 5 ml Pipettenspitze homogenisiert. Hierfür wurde zuerst eine abgeschnittene Spitze, später eine intakte Spitze verwendet. Das Homogenat wurde mit TJ-2 Puffer auf 50 ml aufgefüllt und durch Zentrifugation für 10 min bei 400 x g sedimentiert. Nach vorsichtigem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml 0,75%-iger Kollagenaselösung vorsichtig resuspendiert. Der Kollagenaseverdau erfolgte für 70-80 min bei 37°C auf einem Rolleninkubator und wurde durch Zugabe von 40 ml TJ-2 Puffer gestoppt. Sollte die Kapillarpräparation für Proteinblots, Immunhistochemie oder Elektronenmikroskopie verwendet werden, wurde dem TJ-2 Puffer Orthova-

### 3. Methoden

---

nadat als Proteaseinhibitor in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt. Das Gewebe wurde 10 min bei 400 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 50 ml sterilfiltrierter 25%-iger BSA-Lösung resuspendiert. Die Kapillarfragmente wurden während der folgenden 20-minütigen Zentrifugation bei 1.200 x g sedimentiert, während das Myelin auf der BSA-Lösung schwamm. Myelin und BSA wurden vorsichtig dekantiert und die pelletierten Kapillargefäße sofort für die RNA-Extraktion eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

|                    |                                                                                                   |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TJ-2 Puffer:       | 15 mM HEPES; 153 mM NaCl; 5,6 mM KCl;<br>2,3 mM $\text{CaCl}_2$ ; 2,6 mM $\text{MgCl}_2$ ; 1% BSA |
| 0,75% Collagenase: | 0,075 g Collagenase in 10 ml TJ-2 Puffer                                                          |
| 10 x PBS:          | 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7,4 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                                         |
| 25% BSA:           | 25 g BSA pro 100 ml 1 x PBS                                                                       |

## 3.2 RNA Präparationsmethoden

### 3.2.1 Guanidiniumhydrochlorid-Extraktion von RNA

Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Zentrifugationsschritte bei  $4^{\circ}\text{C}$  und maximaler Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge. Bis zu 100 mg Gewebe wurde mit einem Mörser unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Anschließend wurden 1 ml des Lysepuffers GTC hinzugegeben und das Gewebe unmittelbar danach homogenisiert. Dazu wurde entweder ein Ultrathurax bzw. ein Teflon-Potter benutzt, oder das Gemisch wurde mehrmals durch eine G-20 Kanüle gezogen. Zu der homogenisierten Probe wurden 100  $\mu\text{l}$  2 M Natriumacetat und 0,9 ml Phenol gegeben und 5 min gevortext. Anschließend wurde die Probe mit 300  $\mu\text{l}$  Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1 versetzt und nochmals für 3 min kräftig gevortext. Das Chloroform sorgte für eine Trennung der organischen Phase, die die Proteine und die DNA enthält, von der wässrigen Phase, in der die RNA gelöst ist. Die Probe wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und nochmals mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Nach 3-minütigem Vortexen wurde die Probe für 10 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde wiederum in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der Waschschrift wiederholt. Nach Zugabe von 1 Volumen Isopropanol zu der wässrigen Phase wurde die RNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 2 bis 16 h ausgefällt. Die gefällte RNA wurde während eines 30-minütigen Zentrifugationsschrittes sedimentiert, zweimal mit 80%

### 3. Methoden

---

Ethanol gewaschen und das Pellet bei 37°C im Heizblock getrocknet. Während der Trocknung sollte darauf geachtet werden, daß das RNA-Pellet nicht zu trocken wird, da es ansonsten nur sehr schwer in Lösung geht. Die RNA wurde in geeigneter Menge RNase-freiem Wasser aufgenommen und die Probe für 5 min auf 67°C erhitzt, um die Löslichkeit zu verbessern.

Lysepuffer GTC: 4 M GTC; 0,5% Sarcosyl; 0,8%  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### **3.2.2 Extraktion von RNA aus kleinen Mengen Gewebe mit Trizol**

Dieses Protokoll wurde für die Extraktion von RNA aus kleinen Mengen Gewebe (1-10 mg) verwendet. Das eingefrorene Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff mit einem Glasstößel pulverisiert und zu 800  $\mu$ l Trizol-Reagenz gegeben. Als Fällungshilfe wurde Glykogen in einer Endkonzentration von 250  $\mu$ g/ml hinzupipettiert und die Probe mit einem Ultrathurax homogenisiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde die Probe mit 160  $\mu$ l Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis von 49:1 versetzt und 5 min mit maximaler Geschwindigkeit gevortext. Die Trennung der organischen und der wäßrigen Phase erfolgte während eines 10-minütigen Zentrifugationsschrittes bei  $\geq 13.000 \times g$ . Die obere Phase wurde abgenommen und nochmals mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die wäßrige Phase mit 400  $\mu$ l eiskaltem Isopropanol versetzt und über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Die Probe wurde bei  $14.000 \times g$  für 30 min zentrifugiert und das RNA-Pellet anschließend zweimal mit 80% Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde es in 30  $\mu$ l RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **3.2.3 Extraktion von RNA über Qiagen RNeasy Mini-Säulen**

Dieses Protokoll kann für RNA-Extraktion aus bis zu 30 mg Gewebe bzw.  $1 \times 10^7$  Zellen angewendet werden. Vor Beginn der Aufreinigung wurde pro ml Lysepuffer RLT (alle Puffer wurden von Qiagen/Hilden bezogen) 10  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugegeben. Diese Lösung kann bis zu einem Monat bei RT aufbewahrt werden. Das pulverisierte Gewebe wurde in 600  $\mu$ l Puffer RLT aufgenommen und mit einem Ultrathurax homogenisiert. Während eines dreiminütigen Zentrifugationsschrittes bei maximaler Geschwindigkeit wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Sollte RNA aus eukaryotischen Zellen extrahiert werden, wurden Qiashredder Säulen für den Aufschluß der Zellen verwendet. Dazu wurde das Pellet ebenfalls in 600  $\mu$ l Puffer RLT aufgenommen, auf die Qiashredder Säulen gegeben und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zu dem Lysat wurden 600  $\mu$ l 70% Ethanol zu gegeben und durch

### 3. Methoden

---

Pipettieren oder Vortexen vermischt. Die Probe wurde auf RNeasy Minisäulen gegeben und kurz zentrifugiert (15 sec bei maximaler Geschwindigkeit). Anschließend wurde die Säule mit 350 µl Puffer RW1 gewaschen und erneut zentrifugiert. Für den DNase-Verdau wurden 10 µl einer DNase-Stammlösung (3 U/µl) mit 70 µl Puffer RDD verdünnt, auf die Säulen pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch 350 µl Puffer RW1 gestoppt und erneut zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 500 µl Puffer RPE und einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt für 2 min, um alle Reste des Ethanols von der Säule zu entfernen, wurde die RNA mit 30-50 µl RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O von der Säule eluiert.

### 3.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Phenolextraktion von RNA oder cDNA

RNA- oder DNA-Proben, die nach enzymatischen Reaktionen oder nach der Aufreinigung aus Zell- oder Gewebelysaten mit Proteinen verunreinigt waren, wurden durch eine Phenol-extraktion aufgereinigt. Hierzu wurden sie mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, für 5 min gevortext und anschließend 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die obere, wäßrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und weitere zweimal mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und zentrifugiert. Anschließend wurde die Nukleinsäure mit Ethanol oder Isopropanol ausgefällt.

#### 3.3.2 Alkoholfällung von Nukleinsäuren

Die DNA- bzw. RNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,6) bzw. 1/10 Volumen 5 M Ammoniumacetat versetzt. Der Vorteil des Ammoniumacetates bestand darin, daß weniger Salze mit ausgefällt wurden. Als Fällungshilfe bei sehr geringen Mengen an Nukleinsäure fand lineares Acrylamid in einer Endkonzentration von 10-20 µg/ml Verwendung. Die Fällung der RNA bzw. DNA erfolgte durch Zugabe von 2,5 Volumen absoluten Ethanol bzw. 0,7 Volumen Isopropanol und einer Inkubation für 2 h bei -20°C. Um die Nukleinsäure zu sedimentieren, wurde die Probe bei 15.000 x g für 30 min in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert, zweimal mit 80%-igem Ethanol gewaschen, für 20 min erneut zentrifugiert und getrocknet. Das Nukleinsäurepellet wurde in TE-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O aufgelöst und bei -20°C (DNA) bzw. bei -80°C (RNA) gelagert.

### **3.3.3 Verdau der genomischen DNA mit DNase I**

Zu der RNA-Probe wurden 2 µl 10 x DNase-Puffer und 1 µl DNase I (1 U/µl) hinzu gegeben und mit RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Der Verdau erfolgte für 15 min bei 37°C. Die Reaktion wurde mit 1 µl 20 mM EGTA abgestoppt und das Enzym 10 min bei 75°C inaktiviert.

### **3.3.4 Reverse Transkription von RNA**

#### **3.3.4.1 Einzelstrangsynthese**

Während der reversen Transkription wurde, von einer RNA-Matrize ausgehend, einzelsträngige cDNA erzeugt. Die Synthese der komplementären cDNA erfolgte, wie bei allen Nukleinsäure-Polymerasen, in 5'-3'-Richtung und benötigte für die Initiation einen Primer. Je nach Aufgabenstellung fanden entweder Poly-(dT) Primer oder Randomhexamere Verwendung. Poly-(dT) Primer binden an die Polyadenylierungssequenz und werden für die Umschreibung von mRNA eingesetzt, während ribosomale RNA aufgrund des Fehlens eines Poly-(A) Schwanzes nicht revers transkribiert wird. Sollte Gesamt-RNA umgeschrieben werden, so wurden Randomhexamere für die Initiation gewählt. Diese Hexamere bestehen aus willkürlich ausgewählten, kurzen Oligonukleotiden und binden unspezifisch über die gesamte Länge einer RNA.

Für die reverse Transkription wurde bis zu 1 µg Gesamt-RNA mit 2 µl Poly-(dT) Primer (500 µg/ml) bzw. 1 µl (3 µg/µl) Randomhexameren versetzt, mit RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt und für 5 min bei 70°C denaturiert. Die Probe wurde auf Eis abgekühlt und 4 µl 5 x RT-Puffer, 2 µl DTT (100 mM), 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl) hinzugegeben. Die reverse Transkription erfolgte bei 42°C für 1 h. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Enzym durch eine 10-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Das RNA-DNA-Hybrid wurde direkt für nachfolgende PCR-Reaktionen oder für die Synthese doppelsträngiger cDNA verwendet.

#### **3.3.4.2 Synthese von doppelsträngiger cDNA**

Für die Synthese der doppelsträngigen cDNA wurde die RNA des RNA-DNA-Hybrids durch RNaseH abgedaut und der zweite cDNA Strang durch Kombination von DNA-Polymerase I und *E.coli* DNA Ligase aufgebaut. Zu den 20 µl aus der reversen Transkription wurden 8 µl 5 x Secondstrand-Puffer, 1,6 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 4 µl Enzymmix (6 U/µl DNA Polymerase I, 0,25 U/µl RNase H, 1,2 U/µl *E.coli* DNA Ligase) und 6,4 µl ddH<sub>2</sub>O hinzugegeben und 2 h bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl T4 DNA Polymerase (3 U/µl) hinzugefügt

### 3. Methoden

---

und weitere 30 min im Kühlblock bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 µl EDTA/Glykogen abgestoppt, die cDNA phenolisiert, gefällt, gewaschen und anschließend in ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer aufgenommen.

EDTA/Glykogen-Mix:            0,2 M EDTA; 1 mg/ml Glykogen

#### **3.3.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden im allgemeinen 0,1 bis 1 µg DNA mit 1 bis 5 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 20 µl 2 h bei 37°C inkubiert. Die Menge an eingesetztem Enzym kann, entsprechend seiner spezifischen Aktivität, allerdings variieren.

Präparativ wurde das gleiche Verhältnis von Enzym zu DNA eingesetzt, jedoch sollte nie mehr als 1/10 des Gesamtvolumens an Enzymstammlösung eingesetzt werden, da ansonsten das darin enthaltene Glyzerin die Spezifität des Enzyms beeinträchtigen kann und es zu unvollständigen Spaltungen oder, im Falle von Star-Aktivität des Enzyms, zu unspezifischen Restriktionsschnitten kommen kann. Die Inkubationszeit erhöhte sich bei präparativen Restriktionsverdaus auf 4 bis 16 h. Bestand die Möglichkeit, so wurde das Enzym nach Beendigung des Verdaus durch Hitze inaktiviert.

#### **3.3.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion nach Arnheim und Erlich (1992) wird für die schnelle *in vitro* Amplifizierung von DNA eingesetzt. Hierbei wird eine spezifische DNA-Sequenz zwischen den Bindungsstellen eines 5'-terminalen und eines 3'-terminalen Desoxynukleotid-Primers durch eine DNA-Polymerase bei jedem Zyklus annähernd verdoppelt. Durch entsprechendes Auswählen der Primer ist es auch möglich, Insertionen, Schnittstellen für Restriktionsenzyme, Nukleotidaustausche oder Deletionen in eine DNA einzuführen.

Für die Auswahl der Primer gelten folgende allgemeingültige Regeln:

- Die Länge der Primer sollte zwischen 15 und 30 Basen betragen.
- Die Primer sollten so ausgewählt werden, daß der G-C-Gehalt zwischen 40% und 80% liegt.
- Sequenzstücke, die identische Basenpaare wie z.B. Poly-T-Bereiche aufweisen, sollten nicht für die Auswahl der Primer gewählt werden.
- Palindromische Sequenzabschnitte, Sekundärstrukturen wie Haarnadelkurven und 3'-Komplementaritäten sollten unbedingt vermieden werden.

### 3. Methoden

---

- Die Schmelztemperatur der beiden Primer sollte um nicht mehr als 2°C voneinander abweichen.

Die ungefähre Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der beiden Primer kann durch folgende Formel berechnet werden:

$$T_m = \sum (A + T) \times 2^\circ\text{C} + \sum (G + C) \times 4^\circ\text{C}$$

Hierbei dürfen nur diejenigen Nukleotide in die Berechnung eingehen, die auch tatsächlich mit der DNA hybridisieren.

Für den überwiegenden Anteil der PCR-Reaktionen wurde der Advantage II Polymerasemix von BD Biosciences eingesetzt. Der Mix besteht aus AdvanTaq-1 DNA Polymerase (eine DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die eine N-terminale Deletion trägt), einer Polymerase mit einer Korrekturfunktion und einem TaqStart-Antikörper, der eine vorzeitige Aktivität der Polymerase, z.B. während des Pipettierens, verhindert. Dieser Polymerasemix wurde speziell für lange und akkurate DNA Amplifikationen entwickelt (Barnes, 1994). Der dazugehörige 10-fach konzentrierte Puffer enthält Magnesium in einer Konzentration von 35 mM, so daß eine sonst übliche Austitrierung der Magnesiumkonzentration für die einzelnen Primerkombinationen nicht mehr nötig ist.

Für eine PCR-Reaktion wurden typischerweise 10-100 ng DNA in einem Volumen von 25 µl eingesetzt. Zu der DNA wurden 2,5 µl Advantage II Puffer, 0,5 µl eines 10 mM dNTP-Mixes (enthält 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 1 µl des 5'- und des 3'-Primers (beide in einer Konzentration von 10 µM) und 0,5 µl Advantage II Polymerasemix hinzupipettiert. Die Reaktion wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 25 µl aufgefüllt, kurz vermischt, zentrifugiert und anschließend in einem Thermozykler inkubiert. Für die Inkubation wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

| Zyklen | Temperatur                                      | Zeit                                    | Segment                                                     |
|--------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1      | 95°C                                            | 30 sec                                  | Inaktivierung des inhibierenden TaqStart Antikörpers        |
| 25-40  | 95°C<br>T <sub>m</sub> Primer -2°C<br>68°C/72°C | 15 sec<br>30 sec<br>1min/Kb Zielsequenz | Amplifikation der Zielsequenz                               |
| 1      | 75°C                                            | 10 min                                  | Abschluß der Synthese und Generierung der Adenosinüberhänge |

Der Advantage II Polymerasemix ist bis zu 72°C aktiv, somit konnten auch Primerpaare, deren  $T_m$  weit über 68°C lagen, für die PCR-Reaktion eingesetzt werden. Traten unerwartet viele Nebenprodukt bei der PCR auf, so konnte statt einer zeitintensiven Temperaturoptimie-

---

### 3. Methoden

---

rung eine sog. *touchdown* PCR eingesetzt werden (Don RH, 1991). Für die *touchdown* PCR wurde die Annealingtemperatur 5-10°C über der errechneten T<sub>m</sub> der Primer festgesetzt und schrittweise um 0,5°C pro Zyklus bis zu einem „*touchdown*“ abgesenkt, der normalerweise 2°C unterhalb der T<sub>m</sub> der Primer lag. Unter diesen Temperaturbedingungen sollte die Amplifikation derjenigen Produkte bevorzugt ablaufen, die einen höchstmöglichen Grad an Übereinstimmungen zwischen Primern und Zielsequenz aufweisen. In einer sich direkt anschließenden PCR, die mit 20 bis 25 Zyklen bei einer konstanter Annealingtemperatur 2°C unterhalb der errechneten T<sub>m</sub> der Primer ablief, erfolgte eine weitere Amplifikation der bis dahin gebildeten Produkte.

Als Kontrolle der PCR wurden 1/10 des Reaktionsvolumens auf einem Agarosegel aufgetragen. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Gelkonzentration, bei der die beste Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte:

| Agarosekonzentration | Größe der zu trennenden Fragmente | optimaler Puffer |
|----------------------|-----------------------------------|------------------|
| 1%                   | 0,5-10 Kb                         | TAE-Puffer       |
| 1,2%                 | 0,4-7 Kb                          | TAE-Puffer       |
| 1,5%                 | 0,2-2 Kb                          | TBE-Puffer       |
| 2%                   | 0,1-1 Kb                          | TBE-Puffer       |
| 3%                   | <0,2 Kb                           | TBE-Puffer       |

#### 3.3.7 5'-RACE-PCR (*Rapid amplification of cDNA ends*)

Diese Methode ermöglicht die Klonierung der 5'- und 3'-Enden eines nur 30-70 Bp großen cDNA-Fragmentes. Die Grundidee der RACE-PCR besteht darin, daß an die 5'- bzw. 3'-Enden ein spezifischer Adaptor ligiert wird. In der folgenden PCR werden ein Gen-spezifischer Primer (GSP) und ein Primer, der an den Adaptor bindet, für die Amplifikation eingesetzt. Bei der Auswahl des GSP sollten mehrere Bedingungen beachtet werden:

- Die Länge der Primer sollte sich zwischen 23 und 30 Bp bewegen.
- Der GC-Gehalt sollte zwischen 50% und 75% betragen und die Schmelztemperatur des Primers optimalerweise höher als 70°C liegen, so daß eine *touchdown* PCR durchgeführt werden kann.



### 3. Methoden

---

Für die 5'-RACE-PCR wurden 1 µg Gesamt-RNA mit dem CDS-Primer in cDNA umgeschrieben. Zusätzlich wurde ein SMART-Oligonukleotid hinzugesetzt, das eine nachgeschaltete Amplifikation der cDNA erlaubte. Das Protokoll für die Transkription und die folgende PCR wird in Kapitel 3.4.2.2 beschrieben. Das Produkt der PCR wurde über Qiaquick Säulen aufgereinigt und im Agarosegel kontrolliert. Für die Adaptorligation wurden 8 µl der amplifizierten cDNA mit 2 µl Ligationspuffer, 2 µl Adaptor 1 und 7 µl ddH<sub>2</sub>O gemischt, kurz anzentrifugiert und 2 µl einer hochkonzentrierten T4 DNA Ligase (2.000 U/ml) hinzugegeben. Die Ligation erfolgte bei 16°C für 16 h und wurde mit 1 µl EDTA/Glykogen-Mix (0,2 M EDTA, 1mg/ml Glykogen) abgestoppt. Der Ligationsansatz wurde für 5 min bei 72°C inkubiert, in 100 µl Tricine-EDTA Puffer verdünnt und nochmals für 5 min auf 75°C erwärmt.

Für die RACE-PCR wurden 5 µl der verdünnten Probe mit 5 µl Advantage II Puffer, 1 µl dNTP-Mix (10mM), 2 µl GSP (10µM), 2 µl Nested Primer 1 (10 µM) und 39 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde 1 µl Advantage II Polymerasemix hinzugegeben und folgendes Heizprofil für die PCR gewählt:

| Zyklus | Temperatur           | Dauer  |
|--------|----------------------|--------|
| 1      | 75°C                 | 5 min  |
| 1      | 95°C                 | 30 sec |
| 8      | 95°C 20 sec          | 20 sec |
|        | 72°C (-0,5°C/Zyklus) | 30 sec |
|        | 72°C                 | 4 min  |
| 30     | 95°C                 | 20 sec |
|        | 72°C                 | 4 min  |
| 1      | 75 °C                | 10 min |

Nach Beendigung der PCR wurden 5 µl auf einem 0,8%igen Agarosegel analysiert. Für die Isolierung der cDNA-Bande wurde ein präparatives 0,8%iges Agarosegel mit breiten Taschen gegossen und 30 µl der Probe mit 5 µl Probenpuffer versetzt. Die entsprechende Bande wurde unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten und über Qiaquick Minisäulen aufgereinigt. Anschließend wurde das cDNA-Fragment durch eine TA-Klonierung in den pCRII Vektor ligiert und in *E.coli* Top 10 Zellen transformiert. Von Übernachtskulturen positiver Klone wurde Plasmid-DNA präpariert und das inserierte Fragment mit M13 Primern sequenziert. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit dem Geneworks Programm.

### **3.3.8 Agarose-Gelelektrophorese**

#### **3.3.8.1 Analytische Gelelektrophorese**

Ungeschnittene oder mit Restriktionsenzymen verdaute DNA kann mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Für analytische Zwecke wurden 0,8-1,5%-ige TAE-Agarosegele verwendet. Die in der Mikrowelle aufgekochte und abgekühlte Agarose wurde mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) versetzt, in einen abgedichteten Gelschlitten gegossen und nach Einsetzen eines Probenkammes bis zum Erhärten stehengelassen. Das Gel wurde mit 1 x TAE überschichtet, die mit Probenpuffer versetzten Proben aufgetragen und bei 100 V für 0,5 - 1 h aufgetrennt. Die Verwendung des Bromphenolblau-Farbstoffes im Probenpuffer erlaubte eine ungefähre Abschätzung der Laufstrecke und der Position der interessanten DNA-Moleküle. Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Gel unter kurzzeitigem UV-Licht betrachtet.

#### **3.3.8.2 Präparative Gelelektrophorese**

Die präparative Gelelektrophorese diente der Auftrennung und Isolierung von DNA-Molekülen. Je nach Größe der zu isolierenden DNA-Bande wurden 0,8 bis 3%-ige TAE- bzw. TBE-Agarosegele gegossen und in entsprechendem Puffer laufen lassen. Nach Beendigung des Laufes wurde die entsprechende Bande unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß transferiert und das Gewicht des Gelblockes bestimmt. Die Aufreinigung der DNA aus der Agarose erfolgte mit dem Qiaex II Kit oder dem Qiaquick Gel-Extraktionskit.

### **3.3.9 DNA-Aufreinigung**

#### **3.3.9.1 Aufreinigung von DNA über Qiaquick Spin Minisäulen**

Mittels diese Methode werden PCR Fragmente mit einer Größe zwischen 100 Bp und 10 Kb von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen gereinigt. Das Prinzip dieser Aufreinigung über Qiaquick Minisäulen besteht darin, daß DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen bei neutralem oder leicht saurem pH reversibel an eine Silikonmatrix bindet und auf diese Weise aufgereinigt werden kann. Die Agarose wird hierbei durch Zugabe hoher Konzentrationen chaotroper Salze gelöst, die die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Zuckermonomeren der Agarose-Polymere zerstören. Durch Elution mit Wasser werden die DNA-Moleküle von der Silikonmatrix entfernt. Die hier verwendeten Puffer wurden von Qia-gen (Hilden) bezogen. Alle Zentrifugationsschritte wurden, soweit nicht anders angegeben, bei maximaler Geschwindigkeit in der Mikrozentrifuge bei RT ausgeführt.

### 3.3.9.1.1 PCR-Aufreinigung

Zu einem Volumenanteil der PCR-Reaktion wurden 5 Volumenanteile Puffer PB gegeben und anschließend gevortext. Das Gemisch wurde auf eine Qiaquick-Säule pipettiert und die Säule für 30-60 s zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, 0,75 ml des Waschpuffers PE auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues Sammelgefäß gesteckt und nochmals für 2 min zentrifugiert. Dieser Schritt diente dazu, eventuell noch vorhandenes Ethanol aus dem Waschpuffer vollständig von der Säule zu entfernen. Um die DNA zu eluieren, wurden die Qiaquick-Säulen auf Eppendorfgefäße gesetzt und 50 µl des Elutionspuffers EB vorsichtig auf die Mitte der Säule pipettiert. Nach einer einminütigen Inkubation bei RT erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt für 1 min. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

EB-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

### 3.3.9.1.2 Entfernung von Nukleotiden aus DNA-Reaktionen

Dieses Protokoll wurde verwendet, um nicht-inkorporierte Nukleotide, Enzyme, Salze und kleine Oligonukleotide (<10 Bp) aus enzymatischen Reaktionen zu entfernen. Zu dem Reaktionsgemisch wurden 10 Volumenteile Puffer PN1 gegeben und die Probe gevortext. Das Gemisch wurde auf eine Qiaquick-Säule pipettiert und 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen. Nach Entfernen des Durchflusses wurde die Säule nochmals 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um sicherzugehen, daß das Ethanol aus dem Waschpuffer von der Säule entfernt wurde. Für die Elution wurden 30-50 µl Puffer EB auf die Säule pipettiert und 1 min zentrifugiert.

### 3.3.9.1.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Dieses Protokoll diente zur Extraktion von im TAE- oder TBE-Agarosegel aufgetrennten DNA Fragmenten. Die aus dem Gel ausgeschnittene DNA-Bande wurde in ein vorher gewogenes Eppendorfgefäß gegeben, das Gewicht bestimmt und 3 Volumenteile Puffer QG hinzugegeben, wobei davon ausgegangen wurde, daß 100 mg Agarosegel 100 µl Puffer QG entsprechen. Das Agarosegel-Puffergemisch wurde gevortext und 10 min bei  $50^{\circ}\text{C}$  in einem Heizblock inkubiert. Zwischendurch wurde die Probe immer wieder gevortext. War das aufzureinigende Fragment kleiner als 500 Bp oder größer als 4 Kb wurde ein Gelvolumen an Isopropanol hinzugegeben. Dieser Schritt erhöhte die Ausbeute an DNA. Das Gemisch wurde auf eine Qiaquick-Säule gegeben, zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Die Säule wurde mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und eventuell zurückgebliebenes Ethanol durch einen weiteren 2-minütigen Zentrifugationsschritt entfernt. Zur Elution der DNA wurde die Säule auf

### 3. Methoden

---

ein neues Eppendorfgefäß gesteckt, 50 µl Puffer EB auf die Mitte der Säule pipettiert und 1 min zentrifugiert.

#### **3.3.9.2 Aufreinigung von kleinen DNA Fragmenten über Qiaex II**

Verglichen mit den Qiaquick Säulen ist die Aufreinigung von sehr großen (bis 50 Kb) oder sehr kleinen DNA-Fragmenten (< 40 Bp) aus Agarosegelblöcken mit der Qiaex II Methode von Qiagen sehr viel effizienter. Der Unterschied liegt in der Silikonsuspension, die die kleinen oder großen Fragmente besser bindet als die feste Matrix in den Qiaquick Säulen.

Das ausgeschnittene Gelstück wurde gewogen und mit 3 Volumen QX1-Puffer und 10 µl Glasmilchsuspension versetzt. Bei DNA-Fragmenten größer 4 Kb wurden zusätzlich zwei Volumen ddH<sub>2</sub>O hinzugegeben. Die Auflösung der Agarose und Bindung der DNA an die Silikonsuspension erfolgte während einer 10-minütigen Inkubation bei 50°C. Durch kurzes anzentrifugieren bei maximaler Umdrehung wurde die Glasmilch pelletiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt, und die Probe nochmals mit 500 µl Puffer QX1 gewaschen. Noch enthaltene Salze und andere Verunreinigungen wurden während der zwei folgenden Waschschriffe mit je 500 µl Puffer PE entfernt. Danach wurde die Glasmilch bei 37°C getrocknet. Die DNA wurde in 20–50 µl ddH<sub>2</sub>O oder EB-Puffer, je nach gewünschter Konzentration, eluiert. Um die Ausbeute zu maximieren, konnte die Elution ein zweites Mal wiederholt werden.

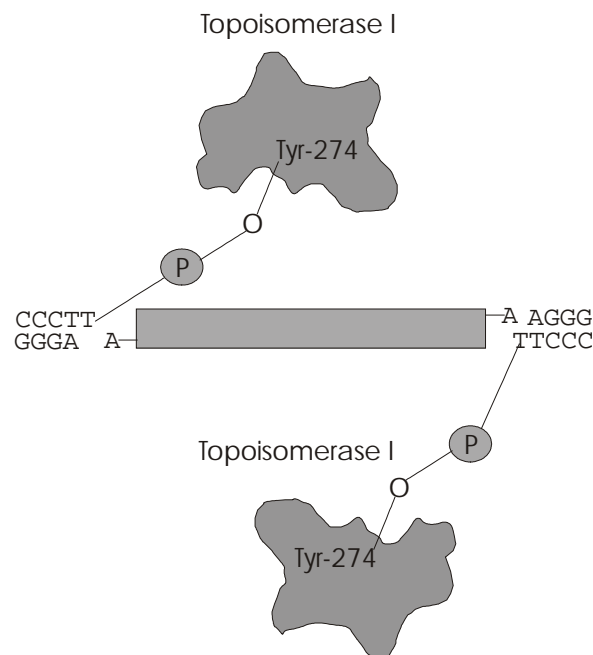
#### **3.3.10 Ligation von DNA-Fragmenten**

Zur Insertion eines doppelsträngigen DNA-Fragmentes mit überhängenden DNA-Enden in einen linearisierten Vektor wurden ca. 200 ng DNA-Fragment mit 100 ng Vektor-DNA, 4 µl 5 x Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA Ligase (400 U/ml) gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Das optimale Insert-Vektor Verhältnis ist hierbei abhängig von der Größe der eingesetzten Komponenten und kann empirisch bestimmt werden. Generell wurden aber bei einem Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:2 bis 1:3 gute Ergebnisse erhalten. Alternativ wurde über Nacht bei 16°C ligiert. Für eine nachfolgende chemische Transformation in Bakterienzellen mußte der Ligationsansatz nicht mehr aufgereinigt werden.

Sollten DNA-Fragmente mit glatten Enden in einen entsprechend geschnittenen Vektor oder an Adaptoren ligiert werden, so mußte die Konzentration der Ligase erhöht werden. Optimalerweise wurden Enzymstammlösungen mit einer Konzentration von 2.000 U/ml eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 16°C über Nacht.

#### 3.3.11 Topo-TA Ligation von PCR-Fragmenten

Die Methode der TA-Klonierung bedient sich der spezifischen Aktivität der Topoisomerase I und der matrizenunabhängigen terminalen Transferaseaktivität der *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase, die während der PCR-Reaktion ein Desoxyadenosin (A) an die 3'-Enden der naszierenden DNA anhängt. Die aus dem Vaccinia-Virus isolierte Topoisomerase I bindet an doppelsträngige DNA und schneidet das Phosphodiester-Rückgrat eines Stranges spezifisch nach der Sequenz „5'-CCCTT“ (Shuman, 1991). Die dabei frei werdende Energie wird in einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des geschnittenen Stranges und einem Tyrosin-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase konserviert. Diese Phosphotyrosinbindung kann durch die 5'-Hydroxylgruppe des geschnittenen Stranges attackiert werden und führt zu einer Umkehrung der Reaktion und Freisetzung der Topoisomerase I (Shuman, 1994). Während der TA-Klonierung wird das PCR-Fragment mit dem Adenosinüberhang zu dem pCRII-Vektor gegeben, der linearisiert mit einem 3'-Thymidinüberhang vorliegt, an dem die Topoisomerase I kovalent gebunden ist. In einer darauffolgenden Reaktion greift die 5'-Hydroxylgruppe des PCR-Fragmentes an der Phosphotyrosinbindung an und wird in den Vektor inseriert.



**Abb. 3.1: Topo-TA Klonierung.**

Die Topoisomerase I ist kovalent über eine Phosphatgruppe an das terminale Thymidin des linearisierten Vektors gebunden. Das PCR-Produkt mit dem Adenosinüberhang greift diese Bindung an und wird in den Vektor integriert (verändert nach dem Topo-TA Klonierungsprotokoll von Invitrogen/Schelden)

### 3. Methoden

---

Für die Reaktion wurden 10 -100 ng PCR-Produkt mit 1 µl NaCl/MgCl<sub>2</sub>-Mix (Endkonzentration: 200 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>) gemischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 5 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 µl des Topo-Vektors erfolgte die Ligation bei RT für 5 min. Anschließend wurde die Probe direkt für die Transformation eingesetzt.

#### **3.3.12 Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen (*CaCl*<sub>2</sub>-Methode)**

Die Bakterien wurden über Nacht in einer 20 ml LB-Flüssigkultur ohne Antibiotika bei 37°C angezogen. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und unter Schütteln (200 UpM) bei 37°C bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,45 bis 0,55 wachsen lassen. Sobald die Kultur dicht genug war, wurde sie sofort auf Eis gestellt und anschließend bei 6.000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 0,1 M kalter Kalziumchloridlösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Sedimentation wurde das Pellet in 5 ml 0,1 M Kalziumchloridlösung mit 10% sterilem Glycerin aufgenommen und in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### **3.3.13 Transformation kompetenter *E.coli***

##### **3.3.13.1 Hitzeschock-Transformation**

Kompetenten *E.coli* Top10 Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 2 - 5 µl des Ligationsansatzes wurden zu den Zellen pipettiert und vorsichtig durch Rühren mit der Pipettenspitze vermischt. Nach Inkubation für 5 - 30 min auf Eis schloß sich ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42°C an, gefolgt von einer kurzen Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium zu dem Transformationsansatz gegeben und die Zellen 1 h bei 37°C unter Schütteln (200 UpM) inkubiert. Da der pCRII Vektor bzw. die pBluescript Vektoren das Gen für das lacZ α Peptid enthielt, konnte die Identifizierung von Klonen, die die gewünschte Insertion trugen, durch Blau-Weiss Selektion vereinfacht werden. Dazu wurden 40 µl einer 40 mg/ml X-Gal-Lösung auf die Agarplatten verteilt, 10 bis 50 µl des Transformationsansatzes auf den LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Da eine α-Komplementation der β-Galaktosidase und die damit verbundene Hydrolyse des X-Gal nur dann erfolgte, wenn das Plasmid kein Insert besaß, sollten für die nachfolgende Plasmidpräparation nur weiße oder hellblaue Kolonien gepickt werden.

##### **3.3.13.2 Schnelltransformation ( nach Pope und Kent, 1996)**

Ein Aliquot der kompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut, 2-10 µl des Ligationsansatzes hinzugegeben, vorsichtig durch Rühren mit der Pipettenspitze vermischt und 5 min auf Eis

### 3. Methoden

---

inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

| Antibiotikum | Stammlösung | Arbeitskonzentration |
|--------------|-------------|----------------------|
| Ampicillin   | 100 mg/ml   | 100 µg/ml            |
| Kanamycin    | 100 mg/ml   | 50 µg/ml             |

#### **3.3.14 Anlegen von Glyzerinkryokonserven**

Um Kryokonserven der Bakterienklone anzulegen, wurden 0,75 ml einer Übernachtskultur in ein Kryogefäß überführt und mit 0,25 ml sterilem Glycerin versetzt. Die Lagerung der Kryokonserven erfolgte bei -80°C.

#### **3.3.15 Präparation von Plasmid-DNA**

##### **3.3.15.1 Minipräparation von Plasmid-DNA**

Der gewünschte Bakterienklon wurde in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht angezogen. Für die Plasmidpräparation wurden 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und die Bakterien durch Zentrifugation für 1 min bei 9.000 x g sedimentiert. Alle folgenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei 13.000 x g. Der Überstand wurde abgenommen und die Bakterien in 250 µl Puffer P1 (Puffer wurden von Qiagen/Hilden bezogen) resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl des SDS-haltigen Puffers P2 und mehrmaligem Schwenken erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 350 µl Neutralisierungspuffer P3 beendet und Proteine, SDS, genomische DNA und weitere Zelltrümmer durch 15-minütige Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde auf Qiagen Minipräparationssäulen transferiert und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Säulen wurden zweimal mit je 750 µl Puffer PE gewaschen. Anschließend folgte ein weiterer 2-minütiger Zentrifugationsschritt, um verbleibendes Ethanol zu entfernen. Die Säulen wurden auf frische Eppendorfgefäße gesteckt und die DNA mit 50 µl Elutionspuffer EB bzw. ddH<sub>2</sub>O von den Säulen eluiert.

##### **3.3.15.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA**

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. 100 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Klones wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 6.000 x g sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Puffer P1 (Puffer wurden von Qiagen/Hilden bezogen)

### 3. Methoden

---

resuspendiert und die Bakterien durch Zugabe von 10 ml Puffer P2 und einer 5-minütiger Inkubation bei RT lysiert. Proteine, SDS, Zelltrümmer und genomische DNA wurde durch Zugabe von 10 ml kaltem Neutralisierungspuffer P3 und 15-minütiger Inkubation auf Eis ausgefällt. Die Sedimentation der Zelltrümmer erfolgte bei 20.000 x g für 30 min bei 4°C. In der Zwischenzeit wurde eine Qiagen-tip-500 Säule durch Zugabe von 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig über einen Faltenfilter auf die Säule gegeben. Nachdem die Probe durch die Säule gelaufen war, wurde die Säule zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wurde mit 15 ml Puffer QF von der Säule eluiert und durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol präzipitiert. Die Sedimentation der DNA erfolgt bei 20.000 x g für 30 min. Das Pellet wurde mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und nochmals 20 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und die DNA in einer entsprechenden Menge Puffer EB oder ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **3.3.15.3 Endotoxin-freie Maxipräparation**

Für die Transfektion in humane Zellen war es notwendig, bakterielle Endotoxine restlos aus der DNA-Probe zu entfernen. Endotoxine sind Lipopolysaccharide aus der Zellwand von Gram(-) Bakterien wie *E.coli* und erniedrigen die Transfektionsrate von DNA in eukaryotische Zellen erheblich. Anzucht und Lyse der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Nach Zugabe des Neutralisationspuffer P3 (Puffer wurden von Qiagen bezogen), wurde das Lysat in eine Qiafilter Kartusche überführt und 10 min bei RT inkubiert. Um die präzipitierten Zelltrümmer, Proteine und SDS abzutrennen, wurde die Kappe am Boden der Kartuschen entfernt und die Probe mit ständigem Druck durch die Kartusche gepreßt. Anschließend wurde das gefilterte Lysat mit 2,5 ml Puffer ER versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurde eine Qiagen-tip 500 Säule mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert und die Probe nach Beendigung der Inkubation auf die Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit 30 ml Puffer QC wurde die DNA mit 15 ml Puffer QN eluiert, mit 10,5 ml Isopropanol versetzt und für 30 bei 20.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml endotoxin-freiem 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in endotoxin-freiem TE Puffer resuspendiert.

#### **3.3.16 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA**

Zur exakten Bestimmung der Konzentration einer in Wasser oder in TE-Puffer gelösten DNA- bzw. RNA-Probe wurde die optische Dichte der Lösung bei 260 nm bestimmt.

Bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm gilt:

$OD_{260} = 1$  entspricht 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA)



### 3. Methoden

---

Verunreinigungen, z.B. Proteine, konnten durch eine gleichzeitige Messung bei 280 nm erfaßt werden. Im Idealfall einer reinen RNA-Lösung sollte der Quotient aus den bei 260 nm und 280 nm erhaltenen Werten 1,9 bis 2,1 betragen.

#### **3.3.17 RNA-Analyse mit dem Bioanalyzer**

Der 2100 Bioanalyzer in Verbindung mit dem RNA 6000 LabChip wurde für die Quantifizierung und Analyse von Gesamt-RNA nach der RNA-Extraktion eingesetzt. Um zu Beginn der Messung die Elektroden des Gerätes zu säubern, wurde ein Reinigungschip mit 350 µl RNaseZAP gefüllt und vorsichtig in den Bioanalyzer gestellt. Nach 1 min wurde der Chip wieder entfernt und die Elektroden mit einem zweiten Reinigungschip, der mit 350 µl RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O gefüllt wurde, für 10 sec gewaschen. Um den LabChip vorzubereiten, wurde er in die Chip Priming Station eingespannt, 9 µl eines Gel-Farbmixes aufgebracht und durch vorsichtiges Herunterdrücken des Kolbens für genau 30 sec verteilt. Nachdem der Chip auf Luftblasen kontrolliert wurde, wurden jeweils 9 µl des Farbmixes in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert. Anschließend wurden in die restlichen Wells je 5 µl RNA Probenpuffer gefüllt. Als interner Standard wurde 1 µl der RNA 6000 Leiter von Ambion in die entsprechende Position gegeben und die restlichen 12 Wells mit je 1 µl der zu messenden Probe befüllt. Der Chip wurde 1 min bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext, in den Bioanalyzer gestellt und die Quantifizierung gestartet. Nach Beendigung der Messung wurden die Elektroden ein weiteres Mal mit RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

### **3.4 Subtraktive cDNA-Hybridisierung**

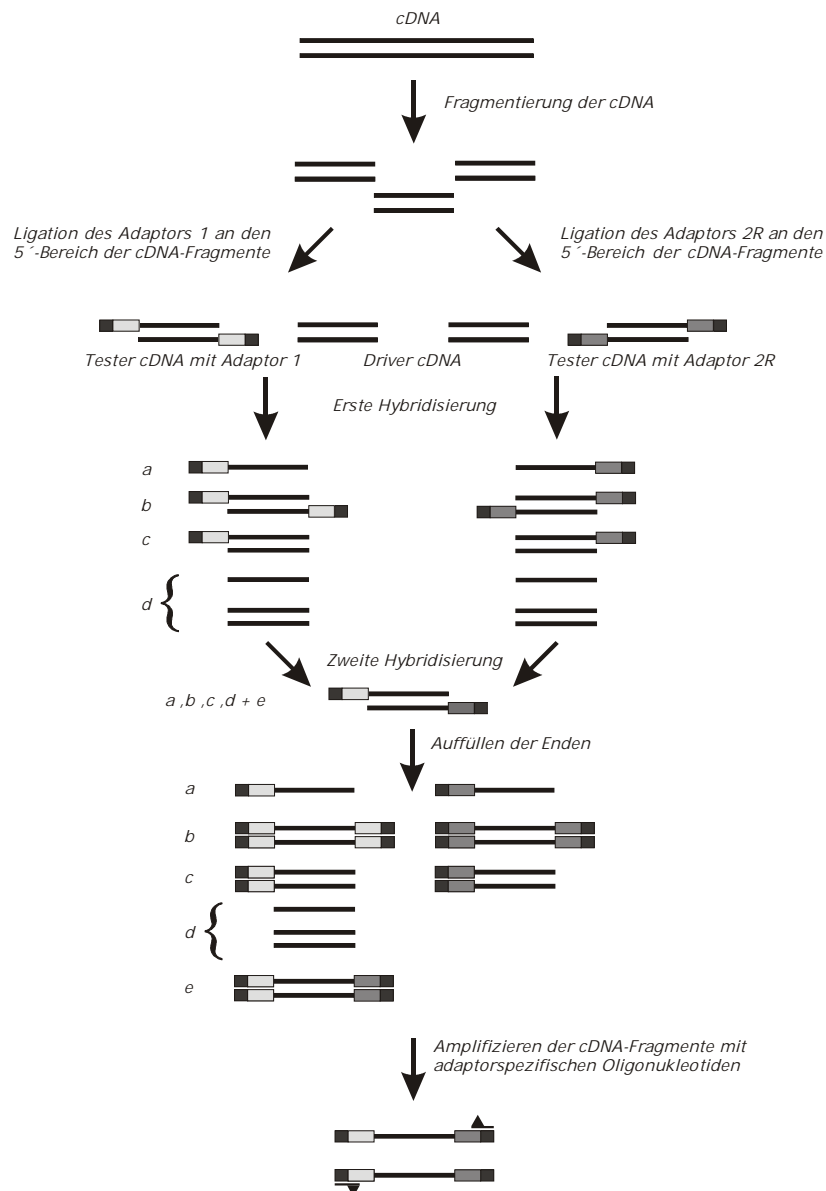
#### **3.4.1 Theorie**

Die subtraktive Hybridisierung ermöglicht den Vergleich der RNA-Expression von zwei unterschiedlichen Populationen. Hierbei wird die eine Population (bezeichnet als Driver) von einer zweiten Referenzpopulation (bezeichnet als Tester) abgezogen, und man erhält eine cDNA Bank mit den in der Tester-Population höher exprimierten Genen (Diatchenko 1996). Tauscht man Driver und Tester in einem zweiten Versuch gegeneinander aus, so enthält man eine zweite cDNA Bank, die die herunterregulierten Gene enthält.

Ein Schema der Subtraktion ist in Abb. 3.2 dargestellt. Für die subtraktive Hybridisierung werden die beiden RNA-Populationen in cDNA umgeschrieben und fragmentiert. Dieser Schritt ist notwendig, um Sekundärstrukturen zu vermeiden, die die Hybridisierungsreaktion behindern würden. Die Tester-Population wird in zwei Gefäße aufgeteilt und die Subpopula-

### 3. Methoden

tionen an den Adaptor 1 bzw. Adaptor 2R ligiert. Da den beiden Adaptoren eine Phosphatgruppe fehlt, bindet nur ein Strang der Oligonukleotide an die 5'-Enden der cDNA-Fragmente. Während der ersten Hybridisierung wird nun jede der beiden Testerpopulation, die entweder Adaptor 1 oder Adaptor 2R trägt, mit einem Überschuss an Driver hybridisiert. In dieser Phase sollten alle Testermoleküle, die ein Pendant in der Driverpopulation besitzen, als doppelsträngige cDNA vorliegen (Abb. 3.2: b,c,d).



**Abb. 3.2: Schema der subtraktiven cDNA-Hybridisierung.**

Das Schema der subtraktiven Hybridisierung ist im Text erklärt (verändert nach Diatchenko *et al.*, 1999)

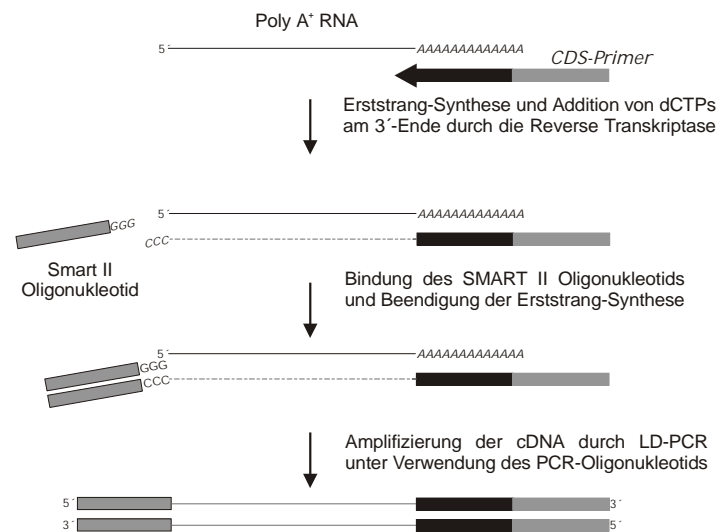
### 3. Methoden

---

In einer darauf folgenden zweiten Hybridisierung werden die beiden Ansätze aus der ersten Hybridisierung vermischt und frischer Driver hinzugefügt. cDNAs, die in der Tester Population in höherer Anzahl als in der Driver Population vorliegen, sollten jetzt miteinander hybridisieren und als doppelsträngige Fragmente vorliegen, die an ihren beiden Enden unterschiedliche Adaptoren tragen (Abb. 3.2. e). Die Adaptoren werden aufgefüllt und die cDNAs mit einer PCR amplifiziert. Die im Anschluß an die erste Amplifizierung folgende zweite PCR mit Nested Primern bewirkt eine weitere Anreicherung der differentiell exprimierten cDNAs, da während dieser PCR nur diejenigen Fragmente amplifiziert werden, die an den Enden unterschiedliche Adaptoren tragen.

#### **3.4.2 SMART cDNA Synthese**

Für die cDNA Subtraktion wurden 2 µg Poly A<sup>+</sup> RNA benötigt. Da es nicht möglich war, diese Mengen an RNA zu isolieren, wurde auf das SMART cDNA Synthesekit von BD-Biosciences zurückgegriffen. Dieses Kit ermöglicht die Synthese von qualitativ hochwertiger cDNA aus geringen Mengen Gesamt-RNA (100 ng bis 1 µg). Diese Methode macht sich dabei die terminale Transferase-Eigenschaft der MMLV Reversen Transkriptase zunutze, die nach Beendigung der Umschreibung einige Cytosine an den 3'-Bereich addiert. Ein SMART-Oligonukleotid, das einige Guanosine am 3'-Ende trägt, bindet an diesen dCTP-Abschnitt, worauf die MMLV ihre Matrize wechselt und die SMART-Sequenz in den cDNA-Strang einarbeitet. Das synthetisierte RNA-DNA-Hybrid enthält somit am 5'-Ende die SMART-Oligonukleotidsequenz, die eine Primerbindungssequenz trägt. Dieselbe Primersequenz ist auch im Poly-(dT)-Primer enthalten, der für den Transkriptionsstart eingesetzt wird. In einer folgenden PCR wird ein Primer verwendet, der an diese Bindungssequenz am 5'- und 3'-Bereich bindet und eine Amplifikation der vollständigen cDNA-Probe ermöglicht. Da die Transferaseeigenschaft der MMLV nur dann aktiviert wird, wenn das Enzym das Ende der RNA erreicht hat, sollten durch diese Methode vorzugsweise cDNAs in vollständiger Länge synthetisiert werden (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3: SMART cDNA-Synthese.**

Die Erklärungen der SMART cDNA-Synthese finden sich im Text oben (verändert nach dem SMART cDNA Synthesis Protokoll von BD Biosciences/Heidelberg).

#### 3.4.2.1 Erststrang-Synthese

Für die Erststrangsynthese wurden 1 µg Gesamt-RNA mit 1 µl des cDNA Synthese- Primers (CDS-Primer 10 µM) und 1 µl des SMART Primers (10 µM) versetzt. Mit ddH<sub>2</sub>O wurde der Ansatz auf 5 µl aufgefüllt, gemischt und zentrifugiert. Der Reaktionsansatz inkubierte 2 min bei 70°C, anschließend wurde er kurz anzentrifugiert und auf Eis abgekühlt. Zu dem Ansatz wurden 2 µl 5 x RT- Puffer und 1 µl DTT (100 mM), sowie 1 µl 50 x dNTP-Mix (je 10 mM) und 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase hinzugegeben. Die Umschreibung der RNA erfolgte bei 42°C für 1,5 h in einem Inkubator. Nach Beendigung der Umschreibung wurde die Probe mit 40 µl TE Puffer versetzt und 7 min bei 72°C inkubiert. Das RNA-DNA-Hybrid wurde bei -20°C gelagert oder sofort für die folgende PCR eingesetzt.

#### 3.4.2.2 Amplifizierung der cDNA durch LD-PCR (long-distance PCR)

In diesem Schritt wurde die Einzelstrang cDNA durch eine PCR-Reaktion amplifiziert. Dabei mußte für jede cDNA-Probe die optimale Anzahl der Zyklen ermittelt werden. Für einen 100 µl Ansatz wurden 5 µl der verdünnten Einzelstrang cDNA eingesetzt. Das Pipettierschema lautete folgendermaßen:

| Komponente                       | Menge  |
|----------------------------------|--------|
| Einzelstrang cDNA                | 5 µl   |
| ddH <sub>2</sub> O               | 79 µl  |
| 10 x Advantage II Puffer         | 10 µl  |
| 50 x dNTP Mix                    | 2 µl   |
| PCR Primer (10 µM)               | 2 µl   |
| 50 x Advantage II Polymerase Mix | 2 µl   |
| Σ                                | 100 µl |

Die PCR lief nach folgendem Heizprofil ab:

| Zyklus | Temperatur | Dauer |
|--------|------------|-------|
| 1      | 95°C       | 1 min |
| 30     | 95°C       | 5 sec |
|        | 65°C       | 5 sec |
|        | 68°C       | 6 min |

Nach jeweils 15, 18, 21, 24, 27 und 30 Zyklen wurden 15 µl der Probe entnommen, mit 5 µl Ladepuffer versetzt und bei 4°C bis zur Beendigung der PCR gelagert. Hiernach wurden jeweils 10 µl der bei den verschiedenen Zeitpunkten gesammelten Proben auf einem 1%-igen Ethidiumbromid-Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht analysiert. Die optimale Zyklenzahl war dadurch gekennzeichnet, daß sich die PCR Reaktion in der exponentialen Phase befand, also noch nicht ihr Plateau erreicht hatte. Mit Hilfe des Gelbildes wurde diejenige Zyklenzahl bestimmt, bei der eine beginnende Sättigung der Bandenintensität erkennbar war. Für die optimale Anzahl der Amplifizierungsrunden wurden zwei Zyklen abgezogen. Damit sollte sichergestellt werden, daß die Reaktion noch in der exponentiellen Phase ablief. Nach Ermittlung der Zyklenzahl wurden für jede cDNA drei PCR-Reaktionen nach obigem Protokoll angesetzt. Die Polymerase wurde nach Beendigung der PCR durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA inaktiviert und von jedem Ansatz 5 µl auf ein 1%-iges Agarosegel geladen und analysiert.

#### 3.4.2.3 Aufreinigung der cDNA

Die drei Ansätze aus der LD-PCR wurden gepoolt und 10 µl der Probe für eine spätere Gelanalyse bei + 4°C gelagert. Für die Aufreinigung der cDNA wurden die Proben mit einem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 versetzt, 3 min gevortext und anschließend 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 700 µl Butanol hinzugegeben

---

### 3. Methoden

---

und 2 min gevortext. Butanol entzieht dem Ansatz Wasser und erlaubt auf diesem Wege eine Einengung wäßriger Lösungen. Die Probe wurde 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und die obere, organische Butanolphase vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Butanolextraktion wurde so oft wiederholt, bis das Volumen der Probe zwischen 40 und 70 µl lag. Für die Chromatographie wurden Chroma Spin-1000 Säulen mehrmals über Kopf gedreht, bis die Gelmatrix resuspendiert war. Der Deckel und der untere Verschuß wurden entfernt und die Säule in ein Sammelgefäß gestellt. Bei allen folgenden Schritten sollten die aufgetragenen Lösungen durch die Säule tropfen. Nachdem der Lagerpuffer ausgeflossen und verworfen war, wurde die Säule mit 1,5 ml 1 x TNE-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die Probe vorsichtig auf die Mitte der Gelmatrix pipettiert. Ab diesem Schritt wurden alle Durchflüsse separat gesammelt und auf einem Agarosegel hinsichtlich ihres cDNA-Gehaltes kontrolliert. Die Säule wurde einmal mit 25 µl und dann mit 150 µl 1 x TNE-Puffer gewaschen. Sodann wurde die Säule auf ein neues Eppendorfgefäß gesteckt und die cDNA mit 320 µl 1 x TNE-Puffer eluiert. Um sicherzugehen, daß keine cDNA auf der Säule zurückblieb, wurden nochmals 75 µl 1 x TNE-Puffer auf die Säule gegeben und der Durchfluß in einem separaten Eppendorfgefäß gesammelt. Von der nicht-aufgereinigten Probe und von jedem einzelnen Wasch- oder Elutionsschritt wurden 10 µl auf einem 1%-igen Agarosegel kontrolliert.

TNE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8); 10 mM NaCl; 0,1 mM EDTA

#### 3.4.2.4 Fragmentierung der cDNA

10 µl der nicht-fragmentierten cDNA-Probe wurden für eine spätere Gelanalyse bei 4°C gelagert. Für die Fragmentierung wurden 35 µl 10 x Restriktionspuffer und 1,5 µl des Restriktionsenzym *Rsa* I (10 U/µl, NEBiolabs) zu 313 µl Probe gegeben und 3 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der 3 h wurden 10 µl verdaute und 10 µl unverdaute cDNA auf einem 1%-igen Agarosegel analysiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 8 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Für die Aufreinigung des Restriktionsverdaus wurden 3 Volumen Puffer QG (Qiagen/Hilden) und 1 Volumen Isopropanol zu der Probe gegeben und gevortext. Anschließend wurde die Probe auf eine Qiaquick Säule geladen und zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit 0,75 ml Puffer PE erfolgte die Abtrennung der cDNA von der Säule mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O. Um das Volumen zu verkleinern, wurde die cDNA einer Fällung mit Ammoniumacetat und Ethanol unterzogen und das Pellet anschließend in ddH<sub>2</sub>O gelöst, so daß eine Konzentration von 300 ng/µl, erreicht wurde.

#### 3.4.3 Subtraktive Hybridisierung

##### 3.4.3.1 Ligation der Adaptoren an die fragmentierte cDNA

In diesem Schritt wurden an die Tester cDNA Probe Adaptoren ligiert. Dazu wurden 1  $\mu$ l der Tester cDNA mit 5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O verdünnt und folgendes Pipettierschema befolgt:

| Komponenten                    | Tester 1   | Tester 2R  |
|--------------------------------|------------|------------|
| verdünnte cDNA                 | 2 $\mu$ l  | 2 $\mu$ l  |
| Adaptor 1 (10 $\mu$ M)         | 2 $\mu$ l  | -          |
| Adaptor 2R (10 $\mu$ M)        | -          | 2 $\mu$ l  |
| 5 x Ligationspuffer            | 2 $\mu$ l  | 2 $\mu$ l  |
| T4 DNA Ligase (400 U/ $\mu$ l) | 1 $\mu$ l  | 1 $\mu$ l  |
| ddH <sub>2</sub> O             | 3 $\mu$ l  | 3 $\mu$ l  |
| $\Sigma$                       | 10 $\mu$ l | 10 $\mu$ l |

Von jedem der beiden Ligationsansätze wurden 2  $\mu$ l abgenommen und in einem dritten Eppendorfgesäß vermischt. Diese Probe stellte die unsubtrahierte Kontrolle dar. Alle Proben wurden kurz zentrifugiert und über Nacht bei 16°C inkubiert. Durch Zugabe von 1  $\mu$ l EDTA/Glykogen-Mix wurde die Reaktion abgestoppt und für 5 min bei 72°C inkubiert. 1  $\mu$ l der unsubtrahierten Kontrolle wurden in 1 ml ddH<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20°C gelagert. Für eine Kontrolle zur Bestimmung der Ligationseffizienz wurden 1  $\mu$ l aus den Tester-1 und Tester-2R Ansätzen in 9  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die übrigen Proben wurden für die folgenden Hybridisierungen verwendet.

##### 3.4.3.2 Kontrolle der Ligationseffizienz

Um die Effizienz der Ligation zu überprüfen, wurde eine Test-PCR durchgeführt. Für jeden der Ligationsansätze, d.h. für Tester 1 und Tester 2R, wurden jeweils zwei PCR-Ansätze nach unten dargestelltem Schema pipettiert:

### 3. Methoden

---

| Komponenten                               | Ansatz 1<br>(Tester 1) | Ansatz 2<br>(Tester 1) | Ansatz 3<br>(Tester 2R) | Ansatz 4<br>(Tester 2R) |
|-------------------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Tester 1 cDNA<br>(an Adaptor 1 ligiert)   | 2 µl                   | 2 µl                   | -                       | -                       |
| Tester 2R cDNA<br>(an Adaptor 2R ligiert) |                        |                        | 2 µl                    | 2 µl                    |
| 10 x Advantage II Puffer                  | 2,5 µl                 | 2,5 µl                 | 2,5 µl                  | 2,5 µl                  |
| 50 x dNTP-Mix                             | 0,5 µl                 | 0,5 µl                 | 0,5 µl                  | 0,5 µl                  |
| GAPDH 3'-Primer (10 µM)                   | 1 µl                   | 1 µl                   | 1 µl                    | 1 µl                    |
| GAPDH 5'-Primer (10 µM)                   | 1 µl                   | -                      | 1 µl                    | -                       |
| PCR Primer 1 (10 µM)                      | -                      | 1 µl                   | -                       | 1 µl                    |
| 50 x Advantage II Enzym-Mix               | 0,5 µl                 | 0,5 µl                 | 0,5 µl                  | 0,5 µl                  |
| ddH <sub>2</sub> O                        | 17,5 µl                | 17,5 µl                | 17,5 µl                 | 17,5 µl                 |
| Σ                                         | 25 µl                  | 25 µl                  | 25 µl                   | 25 µl                   |

Die Proben wurden gemischt, zentrifugiert und 5 min bei 75°C inkubiert, um die Adaptoren aufzufüllen. Anschließend wurde eine PCR nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

| Zyklus | Temperatur | Dauer   |
|--------|------------|---------|
| 1      | 94°C       | 30 sec  |
| 25     | 94°C       | 10 sec  |
|        | 65°C       | 10 sec  |
|        | 68°C       | 2,5 min |

5 µl der PCR-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt, auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht analysiert. Das Verhältnis der Intensität der GAPDH-Bande zu der Intensität der Bande mit dem PCR Primer 1 sollte nicht mehr als 4:1 betragen.

#### 3.4.3.3 Erste und Zweite Hybridisierung

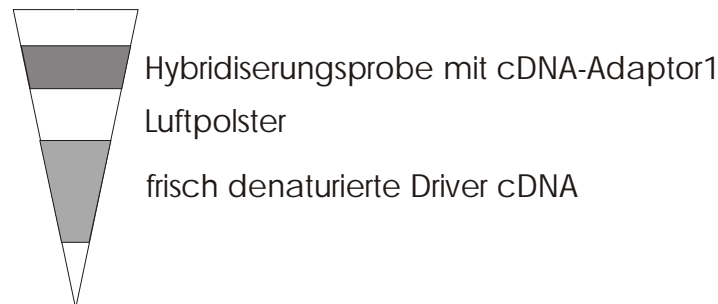
Der 4 x Hybridisierungspuffer sollte mindestens 10 min bei 37°C inkubiert werden, um etwaige Präzipitationen zu lösen. Für die erste Hybridisierung wurden (a) 1,5 µl der Driver-cDNA mit 1,5 µl der Tester 1 cDNA (ligiert an Adaptor 1), und (b) in einem zweiten Ansatz mit 1,5 µl der Tester 2R cDNA (ligiert an Adaptor 2R) gemischt. Zu den beiden Ansätzen wurde 1 µl des 4 x Hybridisierungspuffers hinzugegeben, kurz gevortext und zentrifugiert. Die Proben wurden mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und 1,5 min bei 98°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C, dabei sollte nicht kürzer als 6 h und nicht länger als 12 h inkubiert werden. Für die zweite Hybridisierung wurden 1 µl der Driver cDNA mit 1 µl 4 x Hybridisierungspuffer und 2 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt und 1,5 min bei 98°C denaturiert. Um die beiden Ansätze aus der 1. Hybridisierung zu vermischen, ohne daß einer der Ansätze vorher mit der



### 3. Methoden

---

frisch denaturierten Driver cDNA in Berührung kommt, wurde die Hybridisierungsprobe, die die cDNA mit dem Adaptor 1 enthielt, in einer 100 µl Pipettenspitze angesogen, sodann ein Luftpolster in die Spitze hineinpipettiert und anschließend 1 µl der frisch denaturierten Driver cDNA aufgenommen (s. Abb. 3.4.). Hiernach wurde der gesamte Inhalt der Pipettenspitze in das verbleibende Eppendorfgefäß mit der cDNA, die an den Adaptor 2R ligiert war, entleert, kurz gemischt, zentrifugiert und anschließend bei 68°C über Nacht hybridisiert. Am nächsten Morgen wurde 200 µl Dilutionspuffer hinzupipettiert und die Probe 7 min bei 68°C inkubiert.



**Abb. 3.4: Darstellung des Pipettierschrittes für die zweite Hybridisierung.**

4 x Hybridisierungspuffer: 4 M NaCl; 200 mM HEPES (pH 8,3);  
4 mM Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)

Dilutionspuffer: 20 mM HEPES (pH 8,3); 50 mM NaCl; 0,2 mM EDTA

#### 3.4.3.4 PCR-Amplifizierung der subtrahierten cDNA-Proben

Während dieses Schrittes wurden die differentiell exprimierten cDNAs durch zwei PCR-Reaktionen amplifiziert. In der ersten PCR-Reaktion wurden 1 µl der verdünnten Hybridisierungsprobe sowie 1 µl der nicht-subtrahierten Kontrolle (aus Kapitel 3.4.3.1) als Vorlage eingesetzt. Das Pipettierschema der PCR sah folgendermaßen aus:

| Komponente                  | Menge   |
|-----------------------------|---------|
| cDNA                        | 1 µl    |
| 10 x Advantage II Puffer    | 2,5 µl  |
| 50 x dNTP-Mix               | 0,5 µl  |
| PCR Primer 1 (10 µM)        | 1 µl    |
| 50 x Advantage II Enzym-Mix | 0,5 µl  |
| ddH <sub>2</sub> O          | 19,5 µl |
|                             | Σ 25 µl |

### 3. Methoden

---

Nachdem die Ansätze gemischt und zentrifugiert waren, wurden sie für 5 min bei 75°C inkubiert, um die Adaptoren aufzufüllen. Die PCR lief nach folgendem Zyklus ab:

| Zyklus | Temperatur | Dauer   |
|--------|------------|---------|
| 1      | 94°C       | 25 sec  |
| 27     | 94°C       | 10 sec  |
|        | 66°C       | 30 sec  |
|        | 72°C       | 1,5 min |

Nach Beendigung der PCR wurden 8 µl für eine spätere Agarosegelanalyse abgenommen und bei 4°C gelagert. 3 µl aus jeder PCR wurden mit 27 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und 1 µl dieser Verdünnung für die folgende nested-PCR eingesetzt.

| Komponente                   | Menge   |
|------------------------------|---------|
| cDNA aus der 1. PCR          | 1 µl    |
| 10 x Advantage II Puffer     | 2,5 µl  |
| 50 x dNTP-Mix                | 0,5 µl  |
| nested PCR Primer 1 (10 µM)  | 1 µl    |
| nested PCR Primer 2R (10 µM) | 1 µl    |
| 50 x Advantage II Enzym-Mix  | 0,5 µl  |
| ddH <sub>2</sub> O           | 18,5 µl |
|                              | Σ 25 µl |

Die PCR-Bedingungen lauteten:

| Zyklus | Temperatur | Dauer   |
|--------|------------|---------|
| 11     | 94°C       | 10 sec  |
|        | 68°C       | 30 sec  |
|        | 72°C       | 1,5 min |
| 1      | 75°C       | 10 min  |

Auch von dieser PCR-Reaktion wurden 8 µl abgenommen und zusammen mit den 8 µl der ersten PCR-Reaktion in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt.

#### 3.4.3.5 Klonierung der subtrahierten cDNA-Proben

Die subtrahierte cDNA Bank wurde in *E.coli* kloniert, um einzelne Klone zu erhalten und dauerhafte Kryokonserven dieser Klone anlegen zu können. Dazu wurden die cDNA-Fragmente über eine TA-Klonierung in den pCRII-Vektor inseriert, in *E.coli* Top 10 Zellen transformiert (Kapitel 3.3.11 und 3.3.13.1) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten

### 3. Methoden

---

Morgen wurden die Bakterienplatten aus dem Brutschrank genommen und Einzelkolonien für 3 ml Übernachtskulturen gepickt. Von diesen Übernachtskulturen wurden Kryokonserven angelegt. Der Rest der Kultur wurde für eine PCR zur Amplifizierung der cDNA-Insertionen verwendet.

#### 3.4.3.6 Kontrolle der Subtraktionseffizienz

Die subtrahierten und unsubtrahierten Proben aus der nested-PCR wurden auf eine Konzentration von 100 ng/μl eingestellt. Um die Effizienz der Subtraktion zu überprüfen, wurde die Verteilung der GAPDH in den beiden Proben verglichen. Das dazugehörige PCR-Schema und das Temperaturprofil der PCR sahen folgendermaßen aus:

| Komponente                      | Menge    |
|---------------------------------|----------|
| cDNA aus der 2. PCR (100 ng/μl) | 1 μl     |
| 10 x Advantage II Puffer        | 10 μl    |
| 50 x dNTP-Mix                   | 2 μl     |
| GAPDH 3'-Primer (10 μM)         | 4 μl     |
| GAPDH 5'-Primer (10 μM)         | 4 μl     |
| 50 x Advantage II Enzym-Mix     | 2 μl     |
| ddH <sub>2</sub> O              | 77 μl    |
|                                 | Σ 100 μl |

| Zyklus | Temperatur | Dauer  |
|--------|------------|--------|
| 1      | 94°C       | 25 sec |
| 30     | 94°C       | 10 sec |
|        | 60°C       | 10 sec |
|        | 68°C       | 2 min  |

Nach 18, 21, 24, 27 und 30 Zyklen wurden 15 μl entnommen, mit 3 μl Gel-Ladepuffer versetzt und bei 4°C gelagert. Nach Beendigung der PCR wurden die Proben nebeneinander auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und unter UV-Licht analysiert.

#### 3.4.4 Differential Screening Protokoll

##### 3.4.4.1 Herstellung des Dot Blots

Dieses Protokoll diente der Überprüfung der tatsächlichen Expressionsunterschiede der einzelnen cDNAs. Für diesen Test wurden die klonierten cDNA-Fragmente mit einer PCR amplifiziert und auf Nylonmembranen pipettiert. Die Membranen wurden jeweils mit radioaktiv markierter cDNA aus den Gehirnkapillaren von SHR und SHRSP hybridisiert und die Intensitätssignale der einzelnen cDNA-Klone miteinander verglichen.

Für die PCR wurden 1 μl der Bakterienkultur mit 3 μl Advantage II 10 x Puffer, 0,6 μl dNTP-Mix (10mM), je 1,2 μl Nested Primer 1 und 2R (10μM) und 0,6 μl Advantage II Polymerase-mix vermischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 30 μl aufgefüllt. Das Heizprofil der PCR lautete wie folgt:

| Zyklus | Temperatur | Dauer   |
|--------|------------|---------|
| 1      | 94°C       | 30 sec  |
| 30     | 94°C       | 10 sec  |
|        | 68°C       | 30 sec  |
|        | 72°C       | 1,5 min |
| 1      | 75°C       | 7 min   |

5 µl der PCR wurden auf einem 1%-igen Agarosegel kontrolliert. Für den Dot Blot wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 10 µl frisch angesetzter 0,6 N NaOH versetzt, kurz anzentrifugiert und 2 µl auf eine Hybond N Nylonmembran aufgebracht. Für jede cDNA wurden Doppelproben pipettiert. Die Filter wurden für 2-4 min in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) neutralisiert und anschließend in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gewaschen. Um die cDNA auf den Filtern zu fixieren, wurden sie für 1 min in einem Stratalinker mit 120 mJ bestrahlt. Anschließend wurden sie auf Filterpapier getrocknet und bei RT gelagert.

#### 3.4.4.2 Markierung der Proben und Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde 1 µg Gesamt-RNA mit Randomhexameren in cDNA umgeschrieben und mit dem rediprime Kit radioaktiv markiert. In der Zwischenzeit wurden Dot Blots mit 15-20 ml Hybridisierungspuffer DS für 1 h bei 68°C prähybridisiert. Für die Markierungsreaktion wurden 10 µl der cDNA aus der RT-Reaktion mit 35 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgefüllt. Die Probe wurde für 5 min bei 99°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in ein Eppendorfgefäß überführt, daß das rediprime Reaktionsgemisch enthielt. Nach Zugabe von 2,5 µl α-<sup>33</sup>P dCTP (50 µCi) wurde das Reaktionsgemisch durch kurzes Pipettieren gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde durch 5 µl 0,2 M EDTA gestoppt, die Probe mit 50 µl Blockierungslösung und 50 µl 20 x SSC versetzt. Anschließend wurde sie 5 min bei 95°C denaturiert. Nachdem die Probe auf Eis abgekühlt war, wurden 10 ml Hybridisierungspuffer DS hinzugegeben und das Hybridisierungsgemisch zu den Filtern in die Hybridisierungsflaschen gegeben. Die Hybridisierung lief über Nacht bei 70°C ab.

Hybridisierungspuffer DS: 1 M NaCl; 1%SDS; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

#### 3.4.4.3 Waschen und Exponieren der hybridisierten Filter

Die Filter wurden am nächsten Tag zweimal mit Waschpuffer 1 und einmal mit dem hochstringenten Waschpuffer 2 für jeweils 20 min bei 68°C gewaschen. Anschließend wurden sie zwischen zwei Whatman Filtern getrocknet. Für die Detektion der Signale wurden die Filter

### 3. Methoden

---

für 2-3 Tage auf einer Phosphoimagerplatte exponiert. Nach dem Einlesen der Imagerplatte wurden die Signale mit der MacBas Software ausgewertet.

Waschpuffer DS 1: 2 x SSC; 0,5% SDS

Waschpuffer DS 2: 0,2 x SSC; 0,5% SDS

#### 3.5 Herstellung von hochdichten cDNA-Filter

Zur Herstellung eines Replikates der Rattenhirn cDNA Bank wurden die 384-Well Platten, die die *E.coli* Klone enthielten, überimpft. Dazu wurden Kulturplatten mit je 50 µl 2 x YT Medium + 5 µl HMFm befüllt und die Klone mit einem 384-Nadel Replikator überimpft. Die Kulturen wurden 2 Tage bei 37°C inkubiert. Die nachfolgende PCR zur Amplifizierung der cDNA-Inserts wurde ebenfalls im 384er Format durchgeführt. Als Primer dienten die M13 Sequenzierprimer. Der PCR-Ansatz bestand aus 3 µl 10 x PCR-Puffer L, 9 µl 5 M Betain, 0,24 µl dNTP Mix (25mM), 0,15 µl M13 fw Primer, 0,15 µl M13 rv Primer (beide 50 µM), 0,2 µl *Taq*-Polymerase und 17,26 µl ddH<sub>2</sub>O. Die PCR-Platten wurden mit einer Multikanalpipette befüllt und ein Tropfen der Bakterienkultur mit einem 384-Nadel Replikator überführt. Die PCR-Platten wurden mit Microseal A Folien abgedichtet und in die PCR-Maschine gestellt. Die Reaktion lief nach folgendem Temperaturprofil ab:

| Zyklus | Temperatur | Zeit   |
|--------|------------|--------|
| 1      | 94°C       | 1 min  |
| 40     | 94°C       | 30 sec |
|        | 60°C       | 30 sec |
|        | 72°C       | 1 min  |
| 1      | 72°C       | 7 min  |

Von jeder Platte wurden zwei Reihen, also 32 Proben, durch Gelelektrophorese kontrolliert. Als Kontrollen für die cDNA-Filter wurde geschnittene Plasmid-DNA von GAPDH, β-Actin, Angiotensinogen und Renin auf 100 ng/µl verdünnt und in definierte Positionen der 384 Well Platten pipettiert. Die Positionen für die Kontrollen wurden so gewählt, daß sie über den gesamten Filter verteilt waren. Diese Verteilung sollte Auskunft über die Qualität des folgenden Spotting-Schrittes und über den Hybridisierungsablauf geben. Die fertig prozessierten Platten wurden eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

10 x PCR-Puffer L: 0,5 M KCl; 0,35 M Tris Base; 0,15 M Tris HCl (pH 7,5);  
15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1% Tween 20; 1,5 mM Kresylrot

---

#### **3.5.1 Spotten der cDNA-Filter**

Für die Markierungsspots wurde Lachssperma DNA in einer Konzentration von 600 µg/ml eingesetzt. Als visuelle Kontrolle des Spottens wurde zusätzlich Bromphenolblau in die Lachsspermaprobe zugegeben. Dazu wurden 2 ml einer 10mg/ml Stammlösung Lachssperma mit 31,33 ml einer Bromphenolblaulösung versetzt. Die amplifizierten cDNA-Fragmente und die Lachsspermakontrolle wurden mit NaOH denaturiert und mit einem Spotter auf 22 x 22 cm große Nylonmembranen gespottet.

#### **3.5.2 Vorbereitung und Markierung der Hybridisierungsproben**

Bevor die Filter mit den Proben hybridisiert werden konnten, mußten sie 1-2 h bei 65°C in Hybridisierungspuffer vorbehandelt werden. Dazu wurden sie entweder mit 10-20 ml Hybridisierungslösung in Glasflaschen im Hybridisierungssofen inkubiert, oder in einer Kunststoffbox mit Hybridisierungspuffer überschichtet und unter Schütteln im Wasserbad prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurden sowohl cDNA aus den subtrahierten Proben als auch Gesamt-RNA aus den Kapillaren von SHR und SHRSP eingesetzt. Von der subtrahierten cDNA wurden insgesamt 700 ng pro Hybridisierung markiert, von der Gesamt-RNA 2 µg mit Random-hexameren in cDNA umgeschrieben und komplett für die Markierungsreaktion verwendet. Für die Kontrollpositionen wurden 20 µl Lachssperma (10 mg/ml) eingesetzt. Die cDNA bzw. die Lachssperma-DNA wurde 3-5 min bei 95°C denaturiert und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Für die Markierungsreaktion wurden 18 µl LS-Lösung, 1,5 µl BSA (10 mg/ml), 1,5 µl dATG Nukleotidmix (100 µM) und 0,5 µl Klenow-Fragment (5 U/µl) auf Eis zusammenpipettiert, 2,5µl  $\alpha^{33}\text{P}$  dCTP addiert und der Markierungsmix zu der denaturierten Probe gegeben. Die Markierung erfolgte für 3 h bei 37°C. Um nicht-inkorporierte Nukleotide abzutrennen, wurde die markierte Probe über Sephadex G-50 Säulen aufgereinigt. Dazu wurde die Säulenmatrix durch kurzes Vortexen resuspendiert, die untere Spitze abgedreht, der Deckel durch eine Vierteldrehung gelöst und die Säule für 1 min bei 735 x g zentrifugiert. Danach wurde die Säule auf ein neues Eppendorfgefäß gesteckt, die markierte Probe vorsichtig auf die Mitte der Säule überführt und erneut für 2 min bei 735 x g zentrifugiert.

|                        |                                                                                |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Hybridisierungspuffer: | 1 M NaCl; 1%SDS; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)                                       |
| LS-Lösung:             | 50 µl HEPES; 50 µl TM-Puffer; 14 µl Oligos pd(N) <sup>6</sup>                  |
| TM-Puffer:             | 250 mM Tris-HCl (pH 8,0); 25 mM MgCl <sub>2</sub> ;<br>50 mM β-Mercaptoethanol |

#### **3.5.3 Hybridisierung der cDNA-Filter**

Zu den markierten Hybridisierungsproben wurde 50 µl Lachssperma DNA gegeben, die Proben wurden 10 min bei 99°C denaturiert und auf Eis heruntergekühlt. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Lachssperma-DNA wurde die Probe in 10-15 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen und zu den cDNA-Filtern in die Hybridisierungsflaschen gegeben. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 65°C statt. Am nächsten Tag wurden die Filter zweimal für 20 min mit 50 ml vorgewärmten Waschpuffer 1 und anschließend einmal mit Waschpuffer 2 für 5-20 min gewaschen. Alle Waschschriffe liefen bei 65°C ab. Die Filter wurden in Folie eingeschlagen und für 1 bis 3 Tage auf Phosphoimagerplatten exponiert.

Waschpuffer 1:                    2 x SSC; 0,1% SDS

Waschpuffer 2:                    0,2 x SSC; 0,1% SDS

#### **3.5.4 Analyse der Hybridisierungsergebnisse**

Die Phosphoimagerplatten wurden eingescannt und die Dateien mit dem Programm *rename-images* in das Tiff-Format konvertiert. Bei diesem Schritt wurde auch die Information über den Filter und den benutzten Scanner mit eingegeben, da diese Informationen bei der späteren Analyse der Filterintensitäten und den Filtervergleichen benötigt wurden. Mit dem Programm *X-Digitize* wurde ein Gitter über die Filter gelegt, um die Positionen der identifizierten Spots zu ermitteln. Dazu wurden nacheinander die Positionen der Kontrollsignale der vier Ecken angeklickt. Das Programm legte daraufhin automatisch ein Gitter über den Filter. Für die Feinabstimmung konnte das Gitter manuell korrigiert werden. Die Intensitäten der einzelnen Signale wurden mit dem Programm *hfa-loop* ausgewertet. Dieses Programm lieferte neben einer Analyse der Qualitäten der Doppelspots und der einzelnen Blöcke (s. Abb. 4.10 und 4.11) auch eine Liste, in der die Intensitäten der einzelnen Positionen auf dem Filter aufgelistet wurden. Mit dem Programm *makelist* war es nun möglich, mehrere Filter miteinander zu vergleichen. Dazu wurde ein Filter als Referenzfilter festgelegt und die Signalintensitäten jedes weiteren Filters auf das Niveau des Referenzfilters herauf- oder herunterreguliert. Anschließend wurden die Signale der einzelnen Positionen in Relation zueinander gebracht. Diese Vergleichswerte wurden in einer Tabelle zusammengefaßt und konnten unter UNIX oder in Excel ausgewertet werden.

### 3.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte auf dem ABI Prism 377 DNA Sequenzer. Die Methode beruht auf der automatischen Analyse fluoreszenz-markierter DNA. Für die Sequenzreaktion wurden normalerweise 10 µl der Plasmid-DNA Minipräparation eingesetzt. Da mit dieser Menge sehr gute Sequenzierungsergebnisse erhalten wurde, wurde auf eine Messung der Konzentration verzichtet. Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA aus einer Maxi-präparation wurden zwischen 200 und 500 ng DNA eingesetzt. Für die Sequenzierung der hier verwendeten Plasmide wurden überwiegend die M13 Sequenzierprimer in einer Endkonzentration von 3,2 pmol verwendet. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Geneworks Programm (Oxford Molecular Group) bzw. mit der von ABI vertriebenen Sequencing Analysis Software.

### 3.7 Quantitative RT-PCR

#### 3.7.1 Theorie der real-time quantitativen RT-PCR (TaqMan-PCR)

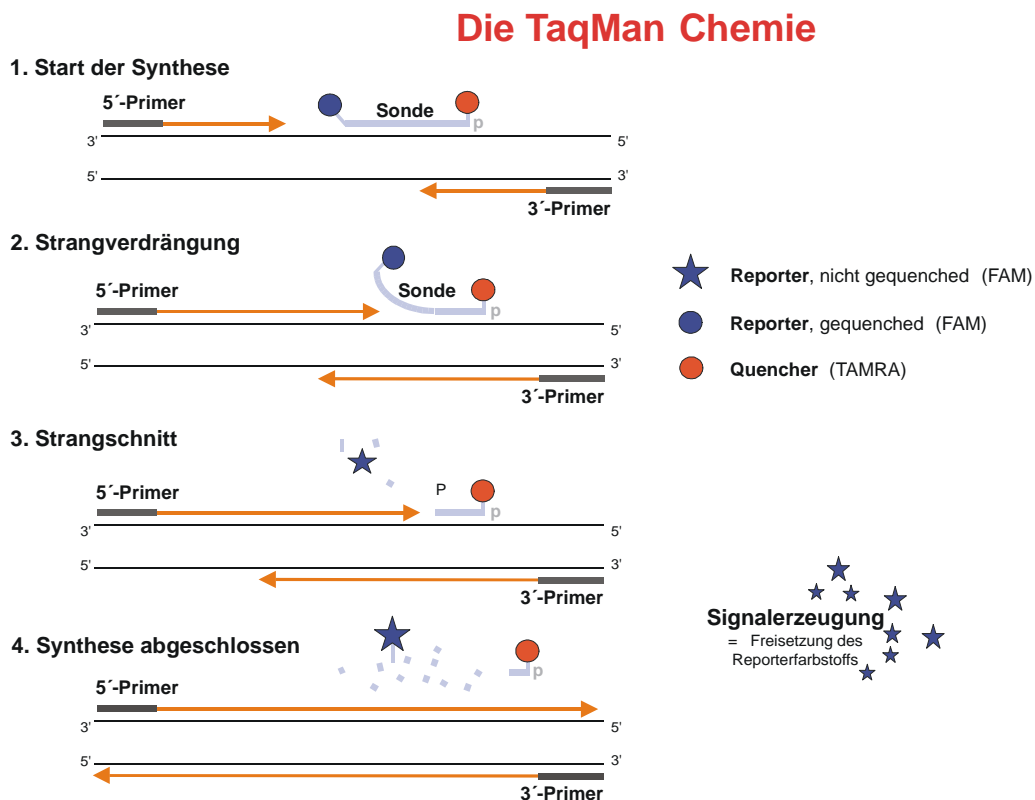
Quantitative RT-PCR wird eingesetzt, um die Expressionshöhen der RNA in einer Probe zu bestimmen. Analog der konventionellen RT-PCR wird die RNA in cDNA umgeschrieben und diese mit spezifischen Primern amplifiziert. Bei einer normalen PCR lässt sich jedoch das Produkt nur sehr schwer quantifizieren, da bei einem typischen Verlauf die Reaktion von einer exponentiellen Phase, in der in jedem Zyklus nahezu eine Verdoppelung des Produktes erfolgt, in eine Plateauphase übergeht, in der die Reaktion nahezu zum Stillstand kommt und keinerlei Amplifizierung mehr erfolgt. Da das Produkt normalerweise erst nach Eintritt der Reaktion in die Plateauphase quantifiziert wird, können die tatsächlichen Mengenverhältnisse durch diese Art der Messung nicht korrekt wiedergespiegelt werden.

Eine sehr elegante Methode der Quantifizierung besteht in der Verwendung von sequenz-spezifischen Primern in Verbindung mit einer doppelt fluoreszenzmarkierten Sonde, die ebenfalls nur an diese eine definierte Sequenz bindet. Der TaqMan Assay macht sich die 5'-Nukleaseaktivität der *Taq* Polymerase zunutze (Lee *et al.*, 1993). Die fluorogene Sonde trägt am 5'-Ende einen sog. Reporterfarbstoff (zumeist ein Fluoreszeinderivat) und am 3'-Ende einen Quencher (ein Rhodaminderivat). Zusätzlich ist der 3'-Bereich durch einen Phosphatrest blockiert. Wird nun die Sonde durch Licht einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$  angeregt (488 nm), so emittiert der Reporterfarbstoff Licht bei einer längeren Wellenlänge  $\lambda'$ . Im Falle des verwendeten 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) liegt die Emission bei 518 nm. Die abgestrahlte Fluoreszenz des Reporters wird in der intakten Sonde durch die räumliche Nähe



### 3. Methoden

zum Quencher-Farbstoff durch einen Fluoreszenzenergietransfer (FET) unterdrückt. Im Laufe der PCR hybridisieren die Primer und die Sonde an ihre Zielsequenz. Während der Extensionsphase verdrängt die *Taq* Polymerase die Sonde von der Matrize. Dieses Ereignis aktiviert die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase und die Sonde wird hydrolysiert. Hierdurch werden Reporter und Quencher getrennt, der FET wird unterbrochen und das Fluoreszenzsignal des Reporters kann detektiert werden (Abb. 3.5). Aufgrund der Spezifität der Sonde (maximal 1 Basenaustausch wird von dem System toleriert), kann so die Zunahme eines PCR-Produktes während der gesamten Reaktion gemessen werden. Um Volumenschwankungen aufgrund von Pipettierfehlern auszugleichen, enthält der für die TaqMan-PCR verwendete Reaktionspuffer einen passiven Referenzfarbstoff (ROX), der in die Analyse der Fluoreszenzwerte einbezogen wird.



**Abb. 3.5: Ablauf der TaqMan PCR-Reaktion.**  
(verändert nach den Betriebsunterlagen für den PE SDS 7700).

#### **3.7.2 Definition der verwendeten Werte**

Das Signal einer TaqMan-PCR entspricht der Veränderung in der Emission der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes, die durch Hydrolyse der Sonde während der Extensionsphase entsteht.

**R<sub>n</sub>-Wert:** Der R<sub>n</sub>-Wert entspricht dem normalisierten Reportersignal und wird als Quotient der Emissionsintensität des Reporters dividiert durch die Intensität der Emission der passiven Referenz (ROX) ausgedrückt.

**ΔR<sub>n</sub>-Wert:** Um Hintergrundsignale auszuschalten, werden die gemittelten Fluoreszenzsignale in den ersten Zyklen, in denen noch kein Anstieg der Reporterfluoreszenz durch die Hydrolyse der Sonde gemessen werden kann, aufgenommen und vom R<sub>n</sub>-Wert abgezogen. Dieser Wert wird als ΔR<sub>n</sub>-Wert bezeichnet.

**threshold:** Der threshold bezeichnet den Schwellenwert für die gemessene Reporterfluoreszenz. Er liegt statistisch abgesichert über dem Hintergrundrauschen und wird für jeden TaqMan Lauf neu definiert.

**Ct-Wert:** Als Ct-Wert oder threshold Cycle wird die Zyklenzahl definiert, bei der das Fluoreszenzsignal des Reporters den threshold überschreitet. Er stellt also den Schnittpunkt der threshold Geraden mit der Amplifizierungskurve einer Probe dar. Für die Quantifizierung werden die Ct-Werte der Standardreihe gegen den log-Wert der Ausgangskonzentration aufgetragen und durch Interpolation der Meßwerte eine Standardkuve erstellt. Mittels dieser Standardkurve kann die Probe quantifiziert werden.

#### **3.7.3 Auswahl der Primer und der Sonden**

Das Design der genspezifischen Primer und der Sonde unterliegt mehreren spezifischen Anforderungen. So sollten folgende Parameter bei der Auswahl der Primer-Sonden Kombination beachtet werden:

- Die optimale Länge der Sonde beträgt zwischen 20 und 30 Basenpaaren und der Schmelzpunkt sollte mindestens 5-10°C höher liegen als der der Primer. Der GC-Gehalt der Sonde sollte etwa 50% betragen.
- Aufeinanderfolgende, identische Nukleotide sollten vermieden werden, dies gilt insbesondere für Guanosin. Auch darf die Sonde nicht mit einem Guanosin be-

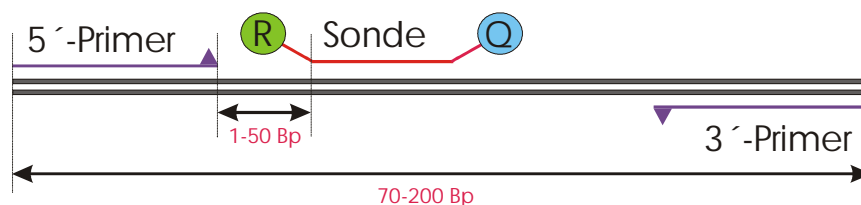
### 3. Methoden

---

ginnen, da das Guanosin im geringen Maße auch nach Hydrolyse der Sonde das Signal des Reporters quenchen kann und somit das Ergebnis verfälscht.

- Für die Auswahl der Sonde sollte der Strang ausgewählt werden, der der Sonde mehr Cytosinreste als Guanosinreste liefert.
- Da die Effizienz einer PCR im hohen Maße von der Länge des Amplifikats abhängt, sollte das Amplikon nicht mehr als 70 bis 90 Basenpaare umfassen.
- Der Abstand zwischen dem 3'-Ende des 5'-Primers und dem 5'-Ende der Sonde sollte so wenig Basenpaare wie möglich betragen, damit sichergestellt wird, daß auch jedes Enzymmolekül im Zuge der Extension auf die Sonde trifft.
- Die Schmelztemperatur der Primer sollte bei 60°C liegen und der G-C-Gehalt zwischen 20% und 80% betragen.
- Daneben gelten allgemeine Richtlinien der Primerauswahl, so sollten Komplementaritäten zwischen den Primern sowie zwischen Sonde und Primern vermieden werden und auch Sequenzen mit auffälliger Sekundärstruktur sollten nicht verwendet werden.

Für die Auswahl der TaqMan Sets wurde die Primer Express Software von ABI benutzt, die die erforderlichen Parameter unterstützte.



**Abb. 3.6: Graphische Darstellung des Amplikons für die TaqMan-Analyse.**

Die Abkürzungen bedeuten Reporter (R) und Quencher (Q) (verändert nach den Betriebsunterlagen für den PE SDS 7700).

#### 3.7.4 Verdünnung der Sonde

Die Konzentration der Sonden-Stammlösung sollte 5 µM betragen. Um den Verdünnungsfaktor zu berechnen, wurde die lyophilisierte Sonde in 500 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, gevortext und die Konzentration photometrisch bestimmt. Dazu hat sich eine 1/10-Verdünnung der Sonde bewährt. Die Konzentration der Sonde berechnete sich nach folgender Formel:

### 3. Methoden

---

$$C_{\text{Sonde}} (\mu\text{M}) = \text{OD}_{260} \times 10^6 \times \text{Verdünnungsfaktor} : \sum \text{Extinktionskoeffizienten}$$

Um die Summe der Extinktionskoeffizienten zu berechnen, wurde die Anzahl der einzelnen Basen ausgezählt, mit dem entsprechenden Extinktionskoeffizienten multipliziert und die Werte für FAM und TAMRA addiert. Die einzelnen Koeffizienten sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

| <b>Base/Farbstoff</b> | <b>Extinktionskoeffizient (<math>\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}</math>)</b> |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Adenosin              | 15.200                                                                           |
| Cytosin               | 7.050                                                                            |
| Guanosin              | 12.010                                                                           |
| Thymidin              | 8.400                                                                            |
| Reporter (FAM)        | 20.958                                                                           |
| Quencher (TAMRA)      | 31.980                                                                           |

#### **3.7.5 Optimierung der einzelnen TaqMan Sets**

Für jedes Primer-Probenset mußte die optimale Konzentration an Magnesiumchlorid bestimmt werden. Magnesium kommt neben seiner Funktion als essentieller Co-Faktor der DNA Polymerase auch eine weitere Bedeutung in der Modulation des Fluoreszenzsignales zu, da es einen großen Einfluß auf die Stabilität der Hybridisierung der Sonde mit der DNA-Matrix ausübt. Nur eine starke Bindung der Sonde mit ihrer Zielsequenz führt zu einer vollständigen Hydrolyse. Bei schwacher Bindung der Sonde kann es zu dem Effekt kommen, daß die Sonde nur verdrängt wird, aber intakt bleibt und somit kein Signal detektiert werden kann. Für die TaqMan PCR betrug die Magnesiumkonzentration typischerweise zwischen 3,5 und 6 mM, doch konnten in manchen Fällen auch höhere Konzentrationen von bis zu 10 mM Magnesiumchlorid eingesetzt werden. Ein weiterer Optimierungsschritt lag in der Bestimmung der optimalen Konzentration der eingesetzten Primer. Durch verschiedene Kombinationen der Primerkonzentration konnten Unterschiede im Hybridisierungsverhalten der beiden Primer ausgeglichen werden. Dieser Optimierungsschritt wurde durchgeführt, wenn das Signalbild der Reaktion nicht optimal ausfiel. Typischerweise wurden für jeden Primer Konzentrationen von 50 nM, 300 nM und 900 nM ausgetestet, so daß 9 verschiedene Kombinationen möglich waren.

#### 3.7.6 Pipettierschema einer TaqMan PCR

Bei jeder TaqMan-Reaktion wurde neben der Messung des Zielgenes auch die Bestimmung der Expression der ribosomalen 18S RNA durchgeführt. So konnte die Expressionshöhe des Zielgenes auf die Expression der 18S rRNA normalisiert werden. Wie oben erwähnt wurde, hing die Konzentration an Magnesiumchlorid von der verwendeten Sonde ab. In der folgenden Tabelle ist ein typischer Standardmix für eine TaqMan PCR mit einer Endkonzentration der Primer von 300 nM dargestellt. Führte eine Primermatrix zu abweichenden Konzentrationen, mußten die Mengen an Primer und ddH<sub>2</sub>O entsprechend variiert werden.

| Komponente                | eingesetzte Menge | Endkonzentration |
|---------------------------|-------------------|------------------|
| 10 x TaqMan PCR-Puffer    | 2,5 µl            | 1 x              |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM) | variabel          | variabel         |
| dATP (10 mM)              | 0,5 µl            | 200 µM           |
| dGTP (10 mM)              | 0,5 µl            | 200 µM           |
| dCTP (10 mM)              | 0,5 µl            | 200 µM           |
| dUTP (20 mM)              | 0,5 µl            | 400 µM           |
| Primer 1 (10 µM)          | 0,75 µl           | 300 nM           |
| Primer 2 (10 µM)          | 0,75 µl           | 300 nM           |
| Sonde (5 µM)              | 1 µl              | 200 nM           |
| AmpliTaq Gold (5 U/µl)    | 0,125 µl          | 0,625 U          |
| AmpErase UNG (2 U/µl)     | 0,25 µl           | 0,5 U            |
| ddH <sub>2</sub> O        | ad 24 µl          |                  |

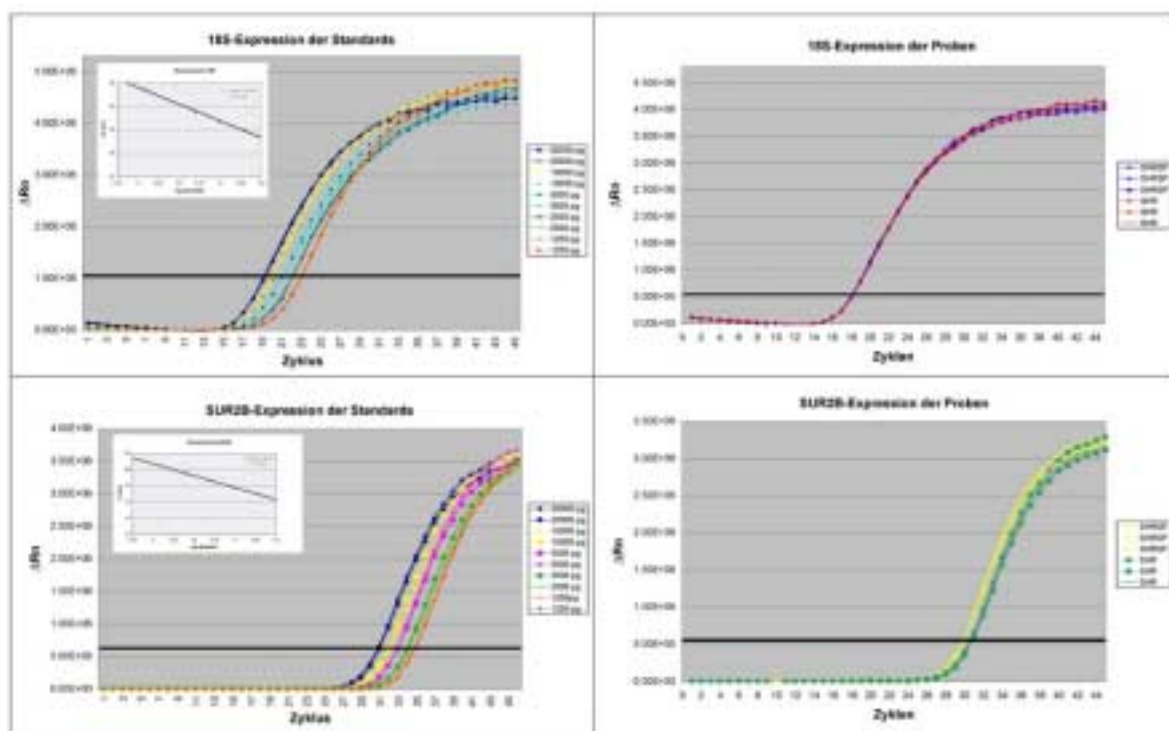
Zu dem Standardmix wurde 1 µl cDNA hinzupipettiert. Für jedes TaqMan Set wurde eine Standardreihe pipettiert, die 5 Verdünnungen einer cDNA enthielt (20 ng, 10 ng, 5 ng, 2,5 ng und 1,25 ng in cDNA umgeschriebene RNA). Alternativerweise können für die Standardreihe Plasmidpräparationen eingesetzt werden, die das Zielgen enthalten. Die Konzentration der zu quantifizierenden Proben betrug typischerweise 10 ng. Pipettiert wurden jeweils Doppelsätze für die Standardreihe und Dreifachansätze für die Proben.

Für die TaqMan-PCR wurde folgendes standardisiertes Temperaturprofil verwendet:

| Zyklen | Temperatur   | Dauer           | Segment                               |
|--------|--------------|-----------------|---------------------------------------|
| 1      | 50°C         | 2 min           | UNG-Inkubation                        |
| 1      | 95°C         | 5 min           | Aktivierung der <i>Taq</i> Polymerase |
| 40     | 95°C<br>60°C | 15 sec<br>1 min | Amplifikation                         |

### 3.7.7 Analyse der TaqMan-PCR

Die aufgenommenen Rohdaten wurden durch die Sequence Detection Software (SDS-Software) automatisch analysiert. Das Programm erstellt aus den pipettierten Standardproben eine Standardkurve und gibt die Werte für die Steigung der Kurve, den Y-Achsenabschnitt und den Korrelationskoeffizienten der interpolierten Kurve an (Abb. 3.7). Mit Hilfe dieser Standardkurve war es möglich, die Proben relativ zu den eingesetzten Konzentrationen der Standardproben zu quantifizieren. Zusätzlich erlaubte die Steigung der Geraden eine Aussage über die Effizienz der PCR-Reaktion.



**Abb. 3.7: Beispiel eines TaqMan-Plots.**

In dieser Darstellung sind exemplarisch die TaqMan-Plots für SUR2B und 18S dargestellt. Anhand der Verdünnungsreihen (links) wurde eine Standardkurve generiert. Mit Hilfe dieser Standardkurven. Mit Hilfe der Standardkurven erfolgte die Quantifizierung der beiden Proben (rechts im Bild).

Um die Proben zu analysieren wurden die entsprechenden Ct-Werte in Excel importiert und mit Hilfe der Standardkurve in relative Konzentrationswerte umgerechnet. Die Konzentration der Proben errechnete sich dabei wie folgt:

$$\log \text{Konzentration}_{\text{Probe}} = \text{CT-Wert} - (\text{Y-Achsenabschnitt} / \text{Steigung})$$

bzw. 
$$\text{Konzentration}_{\text{Probe}} = 10^{[\text{CT-Wert} - (\text{Y-Achsenabschnitt} / \text{Steigung})]}$$

Für jede TaqMan Probe wurde die Konzentration ermittelt und anschließend die Mittelwerte der identischen Replikate gebildet. Um die Werte zu normalisieren, wurde der Mittelwert des

### 3. Methoden

---

Zielgenes durch den Mittelwert des Referenzgenes (18S rRNA) dividiert. Man erhielt so eine einheitslose Zahl, über die die relativen Konzentrationen der verschiedenen Proben miteinander verglichen werden konnten.

#### 3.8 *In situ* Hybridisierung

Das Plasmid, das die vollständige kodierende Sequenz von rRGS5 trug, wurde mit *Bam*HI bzw. *Not*I linearisiert und für die folgende Markierungsreaktion eingesetzt. Die Markierung mit SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase und Digoxigenin-11-UTP erfolgte nach dem Standardprotokoll von Boehringer.

Für die *in situ* Hybridisierung wurden Gehirne aus SHR in Isopentan bei -35°C eingefroren und 10 µm dicke Schnitte im Kryostaten hergestellt. Die Schnitte wurden auf APES-beschichtete Objektträger überführt, 5 min in gepuffertem 3% Paraformaldehyd fixiert, mit PBS gespült und zweimal für 5 min mit sterilem Wasser gewaschen. Nach einer Deproteinierung in 0,2 M HCl wurden die Schnitte in Triethanolaminpuffer/Essigsäureanhydrid azetyliert, durch Behandlung mit steigenden Ethanolkonzentrationen dehydriert und getrocknet. Daraufhin erfolgte eine Inkubation mit Prähybridisierungspuffer. Die markierten Sense- oder Antisenseproben wurden mit Hybridisierungspuffer versetzt und auf die Objektträger gegeben. Die Schnitte wurden mit silikonisierten Deckgläschen bedeckt und 16 h bei 37°C in einer befeuchteten Hybridisierungskammer inkubiert. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Deckgläschen durch Inkubation in 1 x SSC bei 48°C entfernt und die Proben 4 h in 0,5 x SSC / 50% Formamid bei 48°C gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit 1 x SSC abgespült, kurz mit Puffer 1 gewaschen und 60 min mit 5% normalem Schafserum (NSS) und 0,3% Triton-X 100 in Puffer 1 inkubiert. Die Objektträger wurden kurz mit Puffer 1 abgespült und anschließend über Nacht bei 4°C mit einem Schaf Anti-Dig-Alkaline-Phosphatase Konjugat inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Objektträger kurz in Puffer 1 gewaschen und in Puffer 2 äquilibriert. Für die Detektion des Signals wurden die Proben über Nacht mit einer Chromogenlösung in einer Kammer bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 10 mM Tris/HCl Lösung mit 1 mM EDTA (pH 8,0) abgestoppt und die Proben mit destilliertem Wasser abgespült. Unmittelbar danach wurden die Proben mit Neutralrot gefärbt und mit Glycerin-Gelatine eingedeckt.

Puffer 1: 100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5

Puffer 2: 100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>;  
pH 9,5

### 3. Methoden

---

|                                               |                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Schaf Anti-Dig Alkaline Phosphatase Konjugat: | 1:500 in Puffer 1 mit 1% Normalem Schaf Serum und 0,3% Triton-X 100                                                                                                                                  |
| Chromogen-Lösung:                             | 45 µl Nitrobluetetrazolium [75 mg/ml in 70% Dimethylformamid]; 35 µl 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat [50 mg/ml in 100% Dimethylformamid]; auf 10 ml mit Puffer 2 aufgefüllt.                     |
| Prähybridisierungspuffer:                     | 50% deionisiertes Formamid; 50 mM Tris-HCl (pH 7,6); 25 mM EDTA; 20 mM NaCl; 0,25 mg/ml Hefe tRNA; 2,5 x Denhardt's Lösung                                                                           |
| Hybridisierungspuffer:                        | 50% deionisiertes Formamid; 20 mM Tris-HCl (pH 7,6); 1 mM EDTA (pH 8,0); 0,3 M NaCl; 0,2 M DTT; 0,5 mg/ml Hefe tRNA; 0,1 mg/ml poly-(A) <sup>+</sup> - RNA; 1 x Denhardt's Lösung; 10% Dextranulphat |
| Denhardt's Lösung:                            | 0,05% Ficoll; 0,05% Polyvinylpyrrolidon; 0,05% BSA                                                                                                                                                   |

## 3.9 Zellkultur

### 3.9.1 Präparation von HUVE Zellen

Die Nabelschnüre wurden mit isotonischer Kochsalzlösung bei RT gewaschen und für 25 min bei 37°C trypsiniert (0,1%  $\alpha$ -Chymotrypsin in 1 x PBS, Seromed, Berlin). Anschließend wurden die Endothelzellen durch Zentrifugation bei 400 x g für 10 min sedimentiert und das Zellpellet in Wachstumsmedium aufgenommen (enthält 20% fötales Kälberserum, 1% L-Glutamin, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, HEPES (10 mM), 1% Natrium-Pyruvat, 1% Schutzmedium (Seromed) sowie Penicillin und Streptomycin). Die Endothelzellen wurden für 3 - 4 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend subkultiviert. Für Transfektionsversuche wurde Passage 2, für Stimulationsexperimente Passage 3 verwendet.

### 3.9.2 Transfektion von Endothelzellen

Das hier verwendete Superfect Reagenz ist ein aktiviertes Dendrimer, das eine spherische Anordnung einnimmt und an den Ausläufern geladene Aminosäuren trägt. Die DNA wird von dem Superfect Reagenz in eine kompakte Struktur gezwungen, die die Aufnahme in die Zelle begünstigt. Da der Transfektionskomplex eine positive Nettoladung aufweist, kann er an



### 3. Methoden

---

auf der Zelloberfläche sitzenden negativen Rezeptoren wie z.B. sialylierten Glykoproteinen binden und in die Zelle aufgenommen werden. Nach Fusion der Endosomen mit den Liposomen wird der pH-Wert der Liposomen abgepuffert, so daß lysosomale Nukleasen inhibiert werden und die transfizierte Plasmid-DNA intakt in den Zellkern gelangt.

Für die Transfektion wurden die Zellen 24 h vorher in 24-Well Platten umgesetzt. Die Dichte der Zellen sollte zwischen 40 und 80% liegen. Pro Well wurden 1 µg Plasmid-DNA mit Serum-freiem Medium auf ein Endvolumen von 60 µl verdünnt. 5 µl Superfect-Reagenz wurden hinzugegeben und die Probe 30 sec gevortext. Um die Komplexbildung zu fördern, wurde die Probe 5 min bei RT inkubiert, gevortext und nochmals für 5 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Zu dem Transfektionskomplex wurden 350 µl serumhaltiges Wachstumsmedium gegeben, durch Hoch- und Herunterpipettieren gemischt und sofort auf die Zellen gegeben. Die Inkubationszeit betrug zwischen 2,5 und 3 h, anschließend wurde das Transfektionsmedium abgenommen, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und 500 µl Wachstumsmedium auf die Zellen gegeben. Nach 24 bis 48 h Inkubation konnten die Zellen für die Mikroskopie benutzt werden.

#### **3.9.3 Stimulierung von HUVE Zellen**

Für die Stimulierungsexperimente wurden die Zellen 48 h vor Versuchsbeginn in mittelgroße Flaschen ausgesät. Das zur Stimulation eingesetzte Reagenz wurde in 100 µl Medium auf die entsprechend gewünschte Konzentration verdünnt und sofort auf die Zellen gegeben und vermischt. Eine Auflistung der Konzentrationen der eingesetzten Stimuli ist in der unten abgebildeten Tabelle wiedergegeben. Nach Beendigung der Stimulation wurde das Medium entfernt und die Zellen mit einem Gummischaber abgekratzt. Die Zellen wurden in 1 x PBS überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde entweder gleich weiterverarbeitet oder zur späteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

| <b>Stimulans</b> | <b>Stammlösung</b> | <b>Endkonzentration</b> |
|------------------|--------------------|-------------------------|
| ANP              | 10 µM              | 10 nM                   |
| CPT-cAMP         | 25 mM              | 250 µM                  |
| PDBu             | 2 mM               | 200 nM                  |
| PMA              | 1 mM               | 100 nM                  |
| PTX              | 100 µM             | 100 mM                  |

### 3.10 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie wurde eingesetzt, um lebende Endothelzellen zu betrachten, die mit einem RGS5-GFP Fusionsprotein transfiziert wurden. Im Gegensatz zur Auflichtfluoreszenzmikroskopie wird bei der konfokalen Mikroskopie nur ein kleiner Bereich der zu mikroskopierenden Probe hell erleuchtet. So soll Streulicht, das bei der Auflichtmikroskopie entsteht, vermieden werden. Eine speziell auf die Zielebene abgestimmte Lochblende leitet das reflektierte Licht auf den Detektor. Streulicht, das aus den darunter- oder darüberliegenden Ebenen reflektiert wird, wird durch die Lochblende abgeschirmt. So kann eine relative hohe Tiefenschärfe erreicht werden. Das hier verwendete Gerät MCR 1024 (Biorad) arbeitet mit einem Argon-Krypton Laser, der Licht der Wellenlängen 488 nm, 568 nm und 643 nm emittiert. Das GFP-RGS5 Fusionsprotein wurde bei 488 nm angeregt und strahlte Licht der Wellenlänge 522 nm ab. Für die Auswertungen der Fluoreszenzwerte wurde die Bildverarbeitungssoftware MCR 1024 Laser Scanning Confocal Imaging Software (Biorad) verwendet.