

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Für diese Dissertation wurden Proben von Patienten und deren Angehörigen verwendet, die im Rahmen einer Studie zur „SMARD1“ der Klinik für Pädiatrie m.S. Neurologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Chr. Hübner zugesandt wurden. Einschlusskriterien für Patienten waren a) das Vorhandensein einer beliebigen Form der spinalen Muskelatrophie mit Atemnot (SMARD) und b) die Bereitstellung klinischer Daten in Form eines ausgefüllten Fragebogens, der im Rahmen der genetischen Beratung der SMARD-Patienten Verwendung findet. Er beinhaltet Fragen bezüglich der allgemeinen kindlichen Entwicklung, des neurologischen Befundes und Auffälligkeiten während der Schwangerschaft. Das Zusammentragen bzw. die Kategorisierung der klinischen Daten von 141 SMARD-Patienten wurde durch Frau cand. med. M. Schlicke vorgenommen.

Die Proben gesunder Probanden stellte Frau Dr. R. Mateeva-Varon (Institut für Humangenetik der Charité) zur Verfügung. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité genehmigt (Referenznummer 110/2002, zuletzt am 10.01.2005). Die schriftliche Einverständniserklärung aller Patienten bzw. deren Sorgeberechtigter zur diagnostischen bzw. wissenschaftlichen molekulargenetischen Untersuchung war eine weitere Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie.

Die Extraktion genomischer DNA aus dem Patientenmaterial wurde z.T. durch den Einsender oder durch das Institut für Humangenetik, Charité Berlin, durchgeführt.

2.2 Material

2.2.1 Geräte

2.2.1.1 Zentrifugen

Gerät	Hersteller
5804R, 5415 C, 5417R	Eppendorf
400 R, Megafuge 2.0	Heraeus
Avanti J-20	Beckman

Tabelle 2: **Verwendete Zentrifugen.**

2.2.1.2 PCR

Gerät	Hersteller
Mastercycler + Mastercycler gradient	Eppendorf
GeneAmp PCR System 9600 bzw. 2400	Applied Biosystems
PCR Express HBPX 220	Thermo Hybaid GmbH
7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems

Tabelle 3: Verwendete PCR-Maschinen.

2.2.1.3 Gelelektrophorese, Western Blot, Southern Blot

Gerät	Hersteller
Elektrophoresekammer Agarose-Gele	Life Technologies, Gibco BRL
Elektrophoresekammer PAGE	Biometra, Amersham
Blot-Apparatur	Biometra
Hybridisierungsöfen	Stratagene (PersonalHyb)
Electrophoresis Power Supply	Amersham
Vertical electrophoresis unit SE 600	Amersham
Spannungsgeräte (versch. Systeme)	Gibco BRL, BioRad, Biometra
Kühlfalle KH-3	Biometra

Tabelle 4: Verwendete Geräte für die Gelelektrophorese, für Western und Southern Blots.

2.2.1.4 Proteinexpression

Gerät	Hersteller
Innova-Schüttler	New Brunswick Scientific
Rotator	neolab
Sonifikator UP 100H	Hielscher

Tabelle 5: Verwendete Geräte für die Proteinexpression.

2.2.1.5 Zellkultur

Gerät	Hersteller
CO ₂ -Inkubator BIOSAFE eco	Integra Biosciences
Lamin-Flow Werkbank	Heraeus
Invertmikroskop TELAVAL 31	Zeiss

Tabelle 6: Verwendete Geräte für die Zellkultur.

2.2.1.6 Kapillargelelektrophoresegeräte

Gerät	Hersteller
ABI-Prism 3100 bzw. 3730	Applied Biosystems

Tabelle 7: Kapillargelelektrophoresegeräte.

2.2.1.7 Phosphoimager

Gerät	Hersteller
Fuji-Bas 2000	Fujifilm GmbH

Tabelle 8: Verwendeter Phosphoimager.

2.2.1.8 Sonstiges

Gerät	Hersteller
UV-Flächenstrahler	Herolab/ Uvitec
Videokamera	Herolab
Vibrofix VF1 Electronic	Jahnke & Kunkel
Wasserbad	GFL
Waage BP 3100 S	Sartorius
Mikrowellenherd	Bosch
Gene Quant II	Pharmacia Biotech
Pipetten	Eppendorf, Gilson, Finnpipette
Film-Entwicklermaschine	Kodak X-OMAT
Thermostat 5320	Eppendorf
Agitator	Boots Celltech Diagnostics
Magnetrührer	IKA-Labortechnik
Szintillationszähler	Wallac
UV Stratalink 1800	Stratagene
Vortexer	neolab

Tabelle 9: Weitere verwendete Geräte.

2.2.2 Software

Programm	Hersteller	Verwendungszweck
MS Office	Microsoft	
E.A.S.Y Plus	Herolab GmbH	Agarosegeldarstellung
ABI PRISM Sequencing Analysis 3.4.1.	Applied Biosystems	Sequenzierungsauswertung
ABI PRISM® 3100 GeneScan® Analysis Software	Applied Biosystems	Fragmentgrößenanalyse
7500 System SDS v1.4 Software	Applied Biosystems	Real-Time PCR
Tina v2.0	Raytest Isotopen Messgeräte GmbH	Phosphoimager
BAS Reader	Fujix	
Gene Cluster v3.0	Michiel de Hoon	Clustering software

TreeView v1.0.13	Alok Saldanha	Dendogramme
WinSTAT	R. Fitch Software	Statistik
GeneMarker®	Softgenetics	Fragmentgrößenanalyse (Quantifizierung)
Genie	Michael Reese	<i>Splice score</i> - Vorhersage
IMAGE J	Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health	Quantifizierung von Imagefiles
ClustalW Software	EBI	<i>Multiple Alignments</i>
Clone-Suite Professional	Scientific & Educational Software Inc.	Klonierungen
Swiss-PdbViewer	Nicolas Guex, Alexandre Diemand, Manuel C. Peitsch & Torsten Schwede	Darstellung von Proteinstrukturen
POV-Ray	Persistence of Vision Raytracer Pty. Ltd.	Darstellung von Proteinstrukturen

Tabelle 10: **Verwendete Software.**

2.2.3 Zellen

Zelllinie bzw. <i>E.coli</i> Stamm	Hersteller
SMARD1-Patientenzelllinien + diverse Kontrollzelllinien	Institut für Humangenetik, Charité, Berlin
<i>E. coli</i> JM109	Promega
<i>E. coli</i> Rosetta gami 2	Novagen

Tabelle 11: **Verwendete Zelllinien bzw. *E. coli* Stämme.**

2.2.4 Vektoren

Vektor	Hersteller
pCR-Script	Stratagene
pBluescript II KS(-)	Stratagene
pBluescript II KS(+)	Stratagene
pGEX-6P1	GE Healthcare
pGEM-Mol	überlassen von B. Laggerbauer
pGEM-C4	überlassen von B. Laggerbauer
pCDNA3	Invitrogen

Tabelle 12: **Verwendete Vektoren.**

2.2.5 Primer

s. Anhang

2.2.6 Antikörper

Antikörper	Spezies	bezogen von
Anti-IGHMBP2-K14B	Kaninchen	K. v. Au, geb. Grohmann
Anti-IGHMBP2-481	Kaninchen	L. Handoko
Anti- β -Tubulin	Kaninchen	Calbiochem
Anti-rabbit-IgG-HRP	Maus	Calbiochem
Anti-mouse-IgG-HRP	Ziege	Calbiochem

Tabelle 13: Verwendete Antikörper.

2.2.7 Enzyme

Alle Restriktionsendonukleasen und ihre entsprechenden Reaktionspuffer wurden über New England Biolabs bezogen. Hinsichtlich der Bezeichnung der Restriktionsendonukleasen folge ich den Nomenklaturempfehlungen von Roberts *et al.* (2003).

Enzym	Hersteller
Exonuklease I (Exo I)	New England Biolabs
T7 RNA polymerases	New England Biolabs
SP6 RNA polymerases	New England Biolabs
T4 Polynucleotide Kinase (PNK)	New England Biolabs
Alkalische Phosphatase, (" <i>calf intestinal phosphatase</i> "; <i>CIP</i>)	New England Biolabs
T3 RNA Polymerase	Promega
RNasin™ Plus RNase Inhibitor	Promega
Gen Therm™ DNA-Polymerase	Rapidozym
SAP („ <i>shrimp alkaline phosphatase</i> ")	Roche
PfuTurbo™ Polymerase	Stratagene
PreScission™ Protease	GE Healthcare
Phusion™ Polymerase	Finnzymes
Proteinase K	Boehringer Mannheim
RNase A	Boehringer Mannheim
Trypsin/ EDTA	PAA
M-MLV Reverse Transcriptase	Invitrogen
LigaFast™ Rapid DNA Ligation System	Promega
DNase I	Invitrogen

Tabelle 14: Verwendete Enzyme.

2.2.8 Kits

Kit	Hersteller
ABI Prism BigDye Terminator Cycle	Applied Biosystems

Sequencing Ready Reaction Kit V1 und V3	
QiaPrep Spin Mini und Midi Kits	Qiagen
TaqMan Kit	Applied Biosystems
Rediprime II random prime labelling Kit	Amersham Bioscience
QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

Tabelle 15: **Verwendete Kits.**

2.2.9 Säulen

Säule	Hersteller
MicroSpin G-25 columns	GE Healthcare
MicroSpin G-50 columns	GE Healthcare

Tabelle 16: **Verwendete Säulen.**

2.2.10 Radioaktiv markierte Moleküle

Produkt	Hersteller
γ -[³² P]ATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic GmbH
α -[³² P]ATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic GmbH
α -[³² P]CTP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic GmbH
Redivue α -[³² P]CTP (3000 Ci/mmol)	Amersham Bioscience

Tabelle 17: **Verwendete Radioaktivität.**

2.2.11 Längen- und Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas
1-kb-DNA-Marker	Gibco BRL
GenScan 500 HD [ROX Dye]	Applied Biosystems
Lambda/ HindIII	Gibco BRL

Tabelle 18: **Verwendete Längen- und Größenstandards.**

2.2.12 Chemikalien

Die üblichen, an dieser Stelle nicht aufgeführten Laborchemikalien und Reagenzien wurden in *pro analysi* Qualität von den Herstellern Merck, Appllichem, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

Chemikalie	Hersteller
dNTP-Set	Promega
NTP-Set	Roche

Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim
Complete Mini™	Roche
40% AA/Bis-AA 29:1	Biorad
40% AA/Bis-AA 19:1	Biorad
Bactotrypton	BD Bioscience
Yeast extract	BD Bioscience
Poly(A)-Ribonukleotide	Sigma-Aldrich
Poly(U)-Ribonukleotide	Sigma-Aldrich
Poly(C)-Ribonukleotide	Sigma-Aldrich
Poly(G)-Ribonukleotide	Sigma-Aldrich
Pepstatin	Applichem
Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Applichem
Leupeptin	Applichem
4-(2-Aminoethyl)-benzensulfofluorid (AEBSF)	Applichem
Aprotinin	Applichem
Gluthathion-Sepharose 4B	GE Healthcare
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Sonicated Salmon Sperm DNA	GE Healthcare
PEI-Cellulose F-Platten	Merck
Agarose (electrophoresis grade)	Invitrogen-Life Technologies

Tabelle 19: Auswahl der verwendeten Chemikalien.

2.2.13 Zellkulturmedien

Produkt	Hersteller
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH
Dulbecco's modified Eagle Medium	PAA Laboratories GmbH
fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH
Penicillin-Streptomycin	PAA Laboratories GmbH
Goat serum	Invitrogen

Tabelle 20: Verwendete Reagenzien in der Zellkultur.

2.2.14 Verbrauchsmittel

Sterile Einwegmaterialien für die Zellkultur, wie z.B. serologische Pipetten, Zellkulturschalen und -flaschen, Schraub- und Schnappdeckelröhrchen wurden über BD Bioscience oder Nunc bezogen. Verbrauchsmaterialien für molekularbiologische bzw. biochemische Methoden, wie z.B. 0,5 ml - 2 ml Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Zentrifugenröhrchen wurden über VWR bestellt.

Produkt	Hersteller
Nylonmembran	Roche

Nitrocellulosemembran	Whatman GmbH
RX New - Filme	FujiFilm
Poly-Prep Chromatography Columns	Biorad
Laborhandschuhe	VWR
Objektträger und Deckgläschen (versch. Größen)	Menzel
Whatman Filter	Whatman GmbH

Tabelle 21: Weitere verwendete Verbrauchsmittel.

2.2.15 Lösungen und Puffer

2.2.15.1 Allgemein

Puffer	Zusammensetzung
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	130 mM NaCl; 10 mM Phosphatpuffer (Na ₂ HPO ₄ ; NaH ₂ PO ₄) pH 7,4
DEPC-ddH ₂ O	0,05-0,1% (v/v) DEPC (Diethylpyrocarbonat)
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Trinatriumcitrat x 2 H ₂ O
1x TE	10 mM Tris; 1 mM Na ₂ EDTA pH 7,5
1x TBE	89 mM Tris/HCl pH 8,3; 89 mM Borsäure; 1 mM Na ₂ EDTA pH 7,5

Tabelle 22: Allgemeine Lösungen und Puffer.

2.2.15.2 Southern Blot

Puffer	Zusammensetzung
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
Neutralisationslösung	3 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl pH 7,2
Denhardts Reagenz (50x)	10 mg/ml Ficoll (Typ 400), 10 mg/ml PVP; 10 mg/ml BSA
Hybridisierungspuffer	35% Formamid; 3x Denhardts Reagenz; 5 mM Phosphatpuffer; 0,5% SDS, 5x SSC, 1,25 mM EDTA

Tabelle 23: Puffer für die Southern Blot-Methode.

2.2.15.3 Gelsysteme

Puffer	Zusammensetzung
4x Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4 % SDS
4x Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4 % SDS
1x Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin
SDS-Polyacrylamid-Gele (Sammelgel)	1x Sammelgelpuffer; 5% Polyacrylamid (29:1); 0,1% (v/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED
SDS-Polyacrylamid-Gele	1x Trenngelpuffer; 10% Polyacrylamid (29:1); 0,1% (v/v)

Patienten, Material und Methoden

(Trenngel)	APS; 0,1% (v/v) TEMED
RNA-Polyacrylamid-Gele (denaturierend)	6% Polyacrylamid (19:1); 8 M Harnstoff; 0,5x TBE; 0,1% (v/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED
RNA-Polyacrylamid-Gele (nativ)	8% Polyacrylamid (19:1); 0,5x TBE; 0,1% (v/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED

Tabelle 24: Verschiedene Puffer der Gelsysteme.

2.2.15.4 Western Blot

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer (LCLs)	50 mM NaP _i ; pH 7,5; 25 mM NaF; 25 mM Glycerophosphat; 2 mM EDTA; 2 mM DTT; 0,5% Triton X-100; Complete™ Mini
1x TBS-T	20 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20; 0,1% (w/v) SDS
Ponceaurot	2% Ponceaurot S; 30% (w/v) Trichloressigsäure; 30% (w/v) Sulfosalicylsäure
Coomassie	0,1% (w/v) Serva Blue R; 20% (w/v) Trichloressigsäure
Coomassie-Entfärber	Methanol; Essigsäure
Blockerlösung	5% (w/v) Milchpulver; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween 20
ECL-Lösung A	0,4 mM Coumarsäure; 2,5 mM Luminollösung; 0,1 M Tris pH 8,3
ECL-Lösung B	0,018% (v/v) H ₂ O ₂ ; 0,1 M Tris pH 8,3
Stripping-Lösung	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 0,7% (v/v) β-Mercaptoethanol

Tabelle 25: Verschiedene Puffer und Lösungen der Western Blot-Methode.

2.2.15.5 Ladepuffer

Puffer	Zusammensetzung
2x Ladepuffer (SDS-PAGE)	62,5 mM Tris pH 6,8; 25% Glycerin, 2% (w/v) SDS, 350 mM DTT; 0,025% (w/v) Bromphenolblau
RNA-Probenpuffer (denaturierend)	90% (v/v) Formamid; 0,025% (w/v) Xylencyanol; 0,025% (w/v) Bromphenolblau
2x Ladepuffer (EMSA)	1% (w/v) Xylencyanol; 0,1% (w/v) Bromphenolblau

Tabelle 26: Verschiedene Ladepuffer.

2.2.15.6 Bakterienkultur

Lösung	Zusammensetzung
LB-Medium	5 g/l NaCl; 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; pH 7,5
LB-Agar	LB Medium inkl. 1,5% Agar (w/v)

Super Broth	5 g/l NaCl; 35 g/l Trypton; 20 g/l Hefeextrakt; pH 7,5
SOC-Medium	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 20 mM Glucose

Tabelle 27: Verschiedene Lösungen bei der Kultivierung von *E. coli*.

2.2.15.7 Proteinexpression

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	20 mM HEPES-NaOH pH 7,0; 1 M NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 20% Glyzerin; 0,01% NP-40; 5 mM β-Mercaptoethanol; 0,1 mM AEBSF; 0,5 mg/l Leupeptin; 0,7 mg/l Pepstatin A; 2 mg/l Aprotinin
Waschpuffer A	20 mM HEPES-NaOH pH 7,0; 1 M NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 20% Glyzerin; 0,01% NP-40; 5 mM β-Mercaptoethanol
Waschpuffer B	20 mM HEPES-NaOH pH 7,0; 1 M NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 20% Glyzerin; 5 mM β-Mercaptoethanol
Waschpuffer C	20 mM HEPES-NaOH pH 7,0; 1 M NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 20% Glyzerin; 5 mM β-Mercaptoethanol; 20 mM Imidazol pH 7,0
Waschpuffer D	20 mM HEPES-NaOH pH 7,0; 1 M NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 50% Glyzerin; 5 mM β-Mercaptoethanol; 20 mM Imidazol pH 7,0
Elutionspuffer	20 mM HEPES-NaOH pH 7,0; 1 M NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 50% Glyzerin; 5 mM β-Mercaptoethanol; 300 mM Imidazol pH 7,0

Tabelle 28: Verschiedene Puffer bei der Proteinexpression.

2.2.15.8 *In vitro*-Assays

Puffer	Zusammensetzung
AES-Puffer	300 mM Natriumacetat; 2mM EDTA; 0;1% SDS
Duplex-Hybridisierungspuffer	25 mM HEPES-NaOH pH 7; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% (w/v) SDS
Bindungspuffer	50 mM NaCl; 30 mM Tris-HCl pH 7,0; 1,2 mM MgCl ₂ ; 1,5 mM DTT; 0,5 mM EDTA; 20 U RNasin™; 15% Glyzerin
ATPase assay - Puffer	50 mM Triethanolamin pH 8,2; 150 mM KCl; 3 mM MgCl ₂ ; 1,25 mM DTT and 20 μM [α- ³² P]ATP
Helikase-Stopplösung	150 mM Na ₂ EDTA pH 8,0; 50% (v/v) Glyzerin; 2% (w/v) SDS; 0,25% (w/v) Bromphenolblau und 0,25% (w/v) Xylencyanol

Tabelle 29: Verschiedene Puffer für die *in vitro*-Assays.

2.3 Methoden

2.3.1 Statistische Methoden

2.3.1.1 Hierarchische Cluster-Analyse

Für die Cluster-Analyse wurden die klinischen Daten aller im Rahmen des "SMARD"-Projektes dem Institut für Humangenetik und der Klinik für Pädiatrie m.S. Neurologie, Charité Berlin, zugesandten Patientenproben (n=141) verwendet, da mehr als 50% der klinisch relevanten Fragen im zugehörigen Fragebogen beantwortet waren.

Unter einer Clusteranalyse (deutsch: Ballungsanalyse) versteht man ein strukturaufdeckendes, multivariates Analyseverfahren zur Ermittlung von Gruppen (im Folgenden auch Cluster genannt) von Objekten, deren Eigenschaften oder ihre Ausprägungen bestimmte Ähnlichkeiten oder Unterschiede aufweisen. Diese Methode wird in vielen Bereichen angewandt (z.B. auch im Marketing) und in der Biologie meist zur Auswertung von Genexpressionsstudien eingesetzt (Yeung und Ruzzo, 2001). Bei der hierarchischen Clusterung handelt es sich um ein agglomeratives Verfahren, in dem die einzelnen Objekte (engl.: *Items*) schrittweise zu Clustern und diese wiederum zu größeren Gruppen zusammengefasst werden. Die entstehende Baumstruktur wird meist in einem Dendogramm dargestellt.

Dabei wird jeder Patient als ein Objekt innerhalb eines n-dimensionalen Raumes betrachtet. Der verwendete Algorithmus bestimmte nun zwischen diesen Objekten Euklidische Distanzvektoren in Abhängigkeit ihrer Ähnlichkeit, d.h. Patienten mit einem ähnlichen Symptomenmuster waren durch kürzere Vektoren miteinander verbunden als Patienten mit unterschiedlichen Symptomen. Alle errechneten paarweisen Abstände (Distanzvektoren) wurden in einer „*proximity matrix*“ abgelegt. In einem zweiten Schritt, wurden nun Gruppen von Objekten zusammengefasst, die durch kurze Vektoren miteinander verbunden waren. Dadurch entstanden Cluster, innerhalb derer sich die Patienten ähnlicher waren als Patienten unterschiedlicher Cluster. Da das Computerprogramm nur Zahlen verarbeiten konnte, wurden das Vorhandensein eines klinischen Merkmals mit +1 und dessen Abwesenheit mit -1 kodiert. In die Analyse flossen die folgenden 13 klinische Merkmale ein: "Manifestation der Atemnot" (kongenital, 6 Wochen bis 6 Monate, 6 bis 13 Monate und nach dem 13. Lebensmonat), Vorhandensein von "Muskelschwäche" (distale, hauptsächlich in den unteren Extremitäten, allgemeine), "Multiple kongenitale Kontrakturen", "*talipes equinovarus* Deformation", "Frühgeburt" and "Intrauterine Wachstums-

retardierung". Als „Beginn der Atemnot“ wurde der Zeitpunkt definiert, an dem eine maschinelle Beatmung begonnen wurde oder hätte beginnen müssen. Diese Vorgehensweise ist allgemein akzeptiert, da dieser Zeitpunkt als „hartes“ Kriterium in den meisten Krankenakten vermerkt ist.

Für die Clusteranalyse benutzte ich den ungewichteten „*average linkage clustering*“-Algorithmus der Gene Cluster v3.0 Software (von Michiel de Hoon, <http://bonsai.ims.u-tokyo.ac.jp/~mdehoon/software/cluster>). Der Algorithmus berechnete die Distanz zwischen zwei Clustern als Durchschnitt jedes Abstandes zwischen einem Objekt des einen Clusters mit allen Objekten des anderen Clusters. Diese absoluten Distanzen werden über den Pearsons Korrelationskoeffizienten berechnet und als Ähnlichkeitsmaß verwendet. Die sich daraus ergebenden Dendrogramme wurden mit dem Programm TreeView v1.0.13 (von Alok Saldanha, <http://jtreeview.sourceforge.net>) gezeichnet. Jedes klinische Merkmal allein oder in Boole'schen Kombinationen mit anderen Merkmalen wurde anschließend auf eine mögliche Korrelation mit dem Vorhandensein einer *IGHMBP2*-Mutation im Vierfelder-Test untersucht. Bei jeder untersuchten Korrelation wurde der χ^2 -Wert, die Wahrscheinlichkeit p nach Fischer und ϕ , sowie die Spezifität und Sensitivität eines jeden klinischen Merkmals für die Vorhersage einer *IGHMBP2*-Mutation angegeben. Unter „Sensitivität“ des Tests versteht man, mit welcher Wahrscheinlichkeit das Vorhandensein eines Merkmals den Nachweis einer *IGHMBP2*-Mutation vorhersagt. Die „Spezifität“ des Tests gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Abwesenheit des Merkmals das Fehlen einer *IGHMBP2*-Mutation voraussagt.

2.3.2 Molekularbiologische Methoden

2.3.2.1 RNA-Extraktion, Phenol-Chloroform Extraktion, Ethanolfällung

RNA wurde mit TRIZOL™ (Invitrogen) nach den Vorgaben des Herstellers isoliert. In diesem Protokoll kamen zwei grundlegende Methoden zum Einsatz: eine Phenol-Chloroform Extraktion und die Ethanol-Präzipitation.

Die Phenol-Chloroform Extraktion diente der Abtrennung der Nukleinsäuren aus proteinhaltigen Lösungen. Die Nukleinsäuren blieben aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen in der oberen, wässrigen Phase gelöst, während die enthaltenen Proteine zwischen beiden Phasen, in der sogenannten Interphase, präzipitieren. Nach anschließender Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen. Die erneute Zugabe von einem Volumen Chloroform befreite die

wässrige Lösung vom restlichen Phenol. Nach gründlichem Vortexen beider Phasen und erneuter Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen und die Nukleinsäuren anschließend in 100% Ethanol gefällt. Die Fällung der Nukleinsäuren beruht auf der besseren Löslichkeit des Alkohols in Wasser im Vergleich zu Nukleinsäuren. Er entzieht dadurch der Nukleinsäure die Hydrathülle. Die gelegentliche Zugabe von Salzen (Endkonzentration: 0,3 M Natriumacetat pH 5,3) erleichtert das Ausfällen, weil sie die negativen Ladungen des Phosphoribosegerüsts der Nukleinsäure neutralisieren. Anschließend wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 70% Ethanol gewaschen. Das resultierende Pellet wurde an der Luft getrocknet und in dem jeweiligen Puffer resuspendiert. Der Erfolg der RNA-Präparation wurde durch Gelelektrophorese auf einem 1% Agarosegel und durch Quantifizierung mittels UV Spektroskopie überprüft.

2.3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren bestimmte ich durch Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm mit Hilfe eines UV-Fotometers (Pharmacia). Die Umrechnung von Absorptionswerten in Konzentrationen erfolgte mit folgenden Konstanten: 1 OD₂₆₀ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA oder 40 µg/ml RNA. Die Konzentrationen der gelieferten Oligonukleotide wurden aus den vom Hersteller gegebenen Extinktionskoeffizienten berechnet.

2.3.2.3 cDNA-Synthese

Die RNA wurde nach Verdau mit DNase I mit Hilfe der M-MLV reverse Transkriptase nach den Standardbedingungen des Herstellers (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden 0,5-1,0 µl zur Amplifikation in die PCR eingesetzt.

2.3.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: *Polymerase chain reaction*; PCR) ermöglicht mit Hilfe eines zyklischen Reaktionstemperaturprofils die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte. Die PCR wurde 1983 von Mullis und Mitarbeitern der Firma Cetus in Kalifornien/USA entwickelt und 1985 publiziert (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Faloona 1987). Eine für die Amplifikation des *IGHMBP2*-Genes aus genomischer DNA häufig benutzte Modifikation ist die „touch down“-PCR, bei der die Annealingtemperatur innerhalb eines definierten Temperaturintervalls von Zyklus zu Zyklus gesenkt wird. Durch die hohen Hybridisierungstemperaturen zu Beginn der

PCR wurde eine besonders spezifische Hybridisierung der Oligonukleotide erreicht. Diese verlief langsamer als eine unspezifischere, weshalb die Effizienz der Amplifikation in den ersten Zyklen niedrig war. Nach einer gewissen Anzahl von Zyklen war das spezifische DNA-Template bereits soweit vervielfältigt worden, dass es nunmehr als Matrize dienen konnte und die PCR mit einer niedrigeren (unspezifischeren) Hybridisierungstemperatur effizienter fortgesetzt werden konnte. Nachfolgend (*Tabelle 30* und *Tabelle 31*) habe ich einen standardisierten Reaktionsansatz und das Amplifikationsschema einer PCR-Reaktion dargestellt.

Reagens	Menge [µl]
PCR-Puffer (10x)	3
Primer F (10pmol/µl)	1,5
Primer R (10pmol/µl)	1,5
dNTP (10mM)	0,6
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,15
ddH ₂ O	22,25
DNA	1
Gesamtvolumen	30

Tabelle 30: Pipettierschema einer typischen PCR-Reaktion.

Temperatur	Dauer
95 °C	5 min
95 °C	15 s
v. °C	20 s 35 Zyklen
72 °C	v. s
72 °C	10 min
4 °C	∞

Tabelle 31: Amplifikationszyklus einer typischen PCR-Reaktion. V.= variabel (abhängig von der Länges des Amplicons)

Die Reaktionen unterschieden sich in der Annealingtemperatur, die für die jeweiligen Primerpaare empirisch bestimmt wurde und in der Regel zwischen 53°C und 66°C lag, sowie in der Elongationszeit, die in Abhängigkeit von der Produktlänge (ca. 1 min/ kbp Produktlänge) variiert wurde. Für die Amplifikation der Exone 3, 9, 11, 12, 14 und 15 des *IGHMBP2*-Genes kam die „touch down“-Methode zur Anwendung (Grohmann *et al.*, 2001). Die Amplifikation der cDNA-Fragmente erfolgte auf ähnliche

Weise. Es wurden 0,5 µl-1,0 µl des Reaktionsgemisches der ersten Strangsynthese als Matrize eingesetzt, gegebenenfalls erhöhte ich die Zyklenzahl. Plasmide kamen in der Regel stark verdünnt (<50ng/ Reaktion) als Matrize in PCR-Reaktionen zum Einsatz. Die Zyklenzahl wurde in diesem Fall meist auf 25 Zyklen reduziert.

2.3.2.5 Gelelektrophorese

Die Auftrennung negativ geladener Nukleinsäuren erfolgte in einer Gelmatrix in einem elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist abhängig von ihrem Stokesschen Radius und der Agarosekonzentration des Gels. Eine Anlagerung des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid an die Doppelhelix machte die DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar.

2.3.2.6 Sequenzierung

Das Prinzip der Sequenzierung folgt der von Sanger 1977 entwickelten Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Es wurden „ABI PRISM BigDye Terminator v3.0/ v1.0 Ready Reaction Cycle Sequencing“ Kits (Applied Biosystems) verwendet, bei denen die Didesoxynukleotide fluoreszenzmarkiert sind.

PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierungsreaktion durch Inkubation mit SAP und Exonuklease I für 45 min bei 37°C und anschließend für 15 min bei 80°C inkubiert. Die Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden durch Ethanolfällung gereinigt und auf Kapillargelelektrophoresegeräten ABI 3100/ 3730 (Applied Biosystems) analysiert.

2.3.2.7 Quantitative Fragmentgrößenanalyse durch „Primer induced restriction assay“ (PIRA)

Für die Analyse der c.1235+3A>G Spleißstellenmutation war das relative Verhältnis dreier verschiedener mRNA-Transkripte (Wildtyp, ΔExon8, c.1334C) zu bestimmen. Dabei wurden die Exone 7 bis 9 mit einem FAM-markierten PCR-Primer (P34F) und einem „Mismatch“-induzierenden Rückwärtsprimer (P35R) durch RT-PCR auf cDNA Ebene amplifiziert. Bei Vorliegen des c.1334C-Allels entsteht eine XmaI-Schnittstelle. Die PCR-Produkte wurden mit XmaI nach Standardprotokoll verdaut und anschließend durch Gelelektrophorese auf dem Kapillargelelektrophoreseapparat 3730 aufgetrennt. Die Größe der Fragmente konnte mittels eines HD-ROX 500 Standards ermittelt werden. Die Analyse des Laufes wurde durch ABI PRISM® 3100 GeneScan® Analysis-Software (Applied Biosystems) durchgeführt und die

Quantifizierung der Fragmente erfolgte mit Hilfe der GeneMarker®-Software (SoftGenetics). Die Vollständigkeit der Restriktion wurde durch XmaI-Inkubation von Kontroll-PCR-Produkten, die 0% oder 100% c.1334A>C Mutation trugen, geprüft.

2.3.2.8 Quantitative Real-Time PCR

Für die Real-Time PCR Reaktionen wurden 1 µl cDNA als Matrize eingesetzt. PCRs wurden unter der Verwendung von „SYBR GREEN PCR Master Mix“ (Applied Biosystems) und dem Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion verlief über 40 Zyklen bestehend aus einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 Sekunden und einem kombinierten Annealing-/ Elongationsschritt bei 60°C für 60 Sekunden. Die Menge der *IGHMBP2*-Transkripte wurde durch cDNA-Amplifikation mit den Primern P33F und P9R in Duplikaten oder Triplikaten bestimmt. *HPRT*- und *UBC*-spezifische Primer (Vandersompele *et al.*, 2002) wurden zur Quantifizierung von „housekeeping“-Genen als endogene Kontrollen verwendet. Die Spezifität des Produktes und die Abwesenheit von Kontamination wurden durch eine Dissoziationskurve verifiziert. Die relative Quantifizierung der cDNA Kopienanzahlen erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Pfaffl, 2001).

2.3.2.9 Herstellung einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde

Die radioaktive Markierung einer cDNA-Sonde, die durch Amplifikation mit den Primern P4F und P12R generiert wurde und damit die Exone 6-12 umfasst, erfolgte mit dem „Rediprime II random prime labelling“ Kit und Redivue α -[³²P]-dCTP (Amersham Biosciences). 25 ng aufgereinigte DNA wurde in 45 µl ddH₂O verdünnt, für 5 min bei 95°C denaturiert und für 10 min auf Eis abgekühlt. Die denaturierte DNA wurde zum „Amersham labelling reaction mix“ (Klenow Fragment/ dNTP/ random Primer) hinzugefügt, 5 µl Redivue α -[³²P]-dCTP hinzupipettiert und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurde die Reaktion mit 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die Abtrennung nichteingebauter dNTPs und überschüssiger Primer erfolgte mittels MicroSpin G-50 Säulen. Vor der Hybridisierung wurde die markierte Sonde für 5 min bei 95°C denaturiert.

2.3.2.10 Southern Blot

10 µg genomische DNA wurde mit HindIII über Nacht verdaut und in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt; als Größenreferenz diente ein λ / HindIII

Marker (Gibco BRL). Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel für 10 min in Denaturierungspuffer und anschließend für 45 min in Neutralisierungspuffer inkubiert. Der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylon Membran (Roche) wurde in 20x SSC-Puffer über Nacht durchgeführt. Die Membranen habe ich vorsichtig mit 2x SSC gespült und auf Whatmanpapier getrocknet. Die DNA wurde anschließend durch UV Crosslinking (UV Stratalink 1800, Stratagene) mit der Membran kovalent vernetzt. Die Membranen habe ich anschließend in Hybridisierungspuffer äquilibriert. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht im Hybridisierungsöfen. Danach habe die Membranen mit 2x SSC/ 0,1%SDS Puffer bei 60-65°C gewaschen, mit 2x SSC gespült und noch feucht in Frischhaltefolie verpackt. Die Detektion der Signale erfolgte durch Autoradiografie.

2.3.2.11 Herstellung von IGHMBP2-Konstrukten und gerichtete Mutagenese

Den *IGHMBP2*-Leserahmen habe ich aus humaner cDNA amplifiziert und über Sall/NotI-Schnittstellen in den pBluescript KSII(-)-Vektor (Stratagene) kloniert. Anschließend wurde eine Linker-Sequenz, die für einen 6x-His-Tag kodiert, am C-terminus des *IGHMBP2*-Leserahmens durch „*dual asymmetric PCR*“ (Young und Dong, 2004) eingeführt. Dieses Plasmid (pBs-*IGHMBP2*-6xHis) diente als Matrize für die *in vitro*-Mutagenese, die nach dem Protokoll des „*QuickChange XL Site Directed Mutagenesis*“ Kit (Stratagene) durchgeführt wurde. Die Abwesenheit anderer Mutationen wurde durch Sequenzierung der Klone verifiziert. Anschließend wurden alle *IGHMBP2*-Leserahmen in den Vektor pGEX-6P1 (GE Healthcare) subkloniert, sodass ich die entsprechenden Expressionskonstrukte erhielt (pGEX-*IGHMBP2*-Wt/mut-6xHis).

Die Konstrukte enthielten zwei Kontrollsubstitutionen hochkonservierter Aminosäuren im Walker A (GKT219AAA) bzw. B-Motiv (DE375AA) der ATPase-Domäne (*Abbildung 25*), die katalytisch aktiv sind. Dies begründet sich darauf, dass Substitutionen korrespondierender Aminosäuren anderer Helikasen zu einer drastischen Reduktion der NTP-Hydrolyse führten (Weng *et al.*, 1996; Graves-Woodward *et al.*, 1997). Kristallografische Untersuchungen ergaben, dass das Lysin (*IGHMBP2*: K220) mit Phosphaten des Mg-ATP- oder Mg-ADP-Komplexes interagiert, während das Threonin (*IGHMBP2*: T221) bei der Koordination des Mg²⁺-Ions eine Rolle spielt (Velankar *et al.*, 1999; Rocak und Linder, 2004). Die beiden sauren Aminosäuren (D375 und E376) im Walker B-Motiv sind ebenfalls in einer Position, die es ermöglicht, das NTP-assoziierte Mg²⁺-Ion zu koordinieren und darüber hinaus

das angreifende Wassermolekül bei der Hydrolyse des NTPs zu aktivieren (Story und Steitz, 1992).

Acht Konstrukte enthielten je eine SMARD1-bezogene Missense-Mutation, die bei SMARD1-Patienten gefunden wurde und sich in der Nähe der Helikasemotive befindet: Q196R, T221A, C241R, E382K, H445P, D565N, N583I, R603H. Eine weitere Substitution (T493I), die nicht in der Nähe eines Helikasemotivs liegt, habe ich kloniert, weil ich sie in zwei SMARD1-Patienten gefunden hatte, die unterschiedliche Krankheitsverläufe (infantile *versus* juvenile Manifestation der Erkrankung) aufwiesen.

2.3.2.12 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die analytische und präparative Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte unter den vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen Reaktionsbedingungen. Für weitere Anwendungen wurde die DNA entweder durch Elution aus einem TBE-Agarosegel mit dem „*QIAquick Gel Extraction*“ Kit oder über „*QIAquick PCR Purification*“ Kit-Säulen (beides Qiagen) nach den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt.

2.3.2.13 Ligation

Vektor-DNA (25-50 ng) und das zu klonierende DNA-Fragment wurden im stöchiometrischen Verhältnis von 1:3 nach den Vorgaben des „*LigaFast™ Rapid DNA Ligation System*“-Protokolls (Promega) ligiert und die Hälfte des Reaktionsansatzes anschließend ohne weitere Behandlung für die Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt.

2.3.2.14 Transformation, Selektion positiver Klone und Plasmidpräparation

Die Transformation durch Hitzeschock chemisch kompetenter JM109-Zellen (*E. coli*) geschah nach dem Protokoll des Herstellers (Promega). Die Auswahl positiver Klone erfolgte je nach Vektor über *lacZ*-vermittelte Blau-Weißselektion und/oder durch „*colony*“-PCR. Dazu wurden die Klone in 10-20 µl ddH₂O resuspendiert und 5 µl für eine PCR mit spezifischen Primern eingesetzt. Gegebenenfalls habe ich z.B. bei der *in vitro*-Mutagenese das Vorhandensein der eingebrachten Mutation zusätzlich durch Restriktionsspaltung des PCR-Produktes überprüft. Positive Klone wurden ausgewählt und die Plasmide mit „*QIAprep Spin Mini-, Midi- oder Maxiprep*“ Kit (Qiagen) präpariert. Die Überprüfung des Inserts der präparierten Plasmide erfolgte

stets durch Restriktionsanalyse und Größenvergleich oder durch Sequenzierung. Bei erfolgreicher Selektion wurde ein Glycerolstock des Plasmids durch Zugabe von 1-2 Volumen 100% Glycerin angelegt und bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Zellbiologische Methoden

2.3.3.1 Kultivierung von LCL-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) waren im Institut für Humangenetik der Charité, Berlin, aus heparinisierten Blutproben von Patienten generiert und zur Verfügung gestellt worden. Dabei wurde die Eigenschaft des humanpathogenen Epstein-Barr-Virus (EBV) ausgenutzt, menschliche B-Lymphozyten zu transformieren (Neitzel, 1986). Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5% CO₂ und in RPMI-Medium (PAA Laboratories GmbH), das mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/ Streptomycin (P/S) versetzt war. Das Medium der als Suspensionskultur wachsenden LCLs wurde regelmäßig unter sterilen Bedingungen gewechselt. Dabei wurden die Zellen in einem Zwischenschritt mit 1x PBS gewaschen.

Bei der Herstellung der Kryokulturen erfolgten zunächst die Ablösung adhärenter Zellen (s.o.), deren Pelletierung im Medium bei 180 g für 10 min und das Waschen mit PBS (Suspensionskulturen wurden nur pelletiert und gewaschen). Die Zellen wurden dann wieder zentrifugiert, in Gefriermedium (90% FKS, 10% DMSO) resuspendiert, in Fraktionen à 1 ml in Kryo-Röhrchen abgefüllt und langsam auf -80 °C abgekühlt. Über den Zeitraum von einigen Monaten konnten die Zellen bei -80 °C verwahrt werden; bei längerer Verwahrung wurden sie in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert.

2.3.4 Proteinbiochemische Methoden

2.3.4.1 Protein-Extraktion

Zwischen 10-20 ml einer exponentiell wachsenden Kultur (ca. $6-9 \times 10^5$ Zellen/ ml) wurden bei 180 g pelletiert und anschließend zweimal in eiskaltem PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in variablen Mengen eiskalten Lysepuffers (50mM NaP_i pH 7,5; 25 mM NaF; 25 mM Glycerophosphat; 2 mM EDTA; 2 mM DTT; 0,5% Triton X-100; Complete Mini™) aufgenommen, 20 min bei 4 °C gerollert und für 20 min bei 20800 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff

bei -80 °C gelagert. Ein Aliquot der Extrakte wurde für die Konzentrationsbestimmung verwendet.

2.3.4.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des nach Bradford (Bradford, 1976) benannten Reagens (BioRad) in einer Doppelbestimmung. Dabei wurde die Konzentration der Proteinlösung durch fotometrische Absorptionsbestimmung bei 595 nm und anschließendem Vergleich mit der Kalibriergeraden einer BSA-Verdünnungsreihe bestimmt.

2.3.4.3 Gelsysteme

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Unter denaturierenden Bedingungen können Proteine in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Stokeschen Radius aufgetrennt werden. Das Polyanion SDS im Probenpuffer und im Gel ist ein Detergens, das fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört, indem es in stöchiometrischen Mengen an die Proteine bindet. Zur Reduktion der Disulfidbrücken gibt man β -Mercaptoethanol in den Ladepuffer. Die durch die Bindung von SDS erworbene negative Ladung der SDS-Proteinkomplexe ist in ihrer Stärke ungefähr proportional zur Proteingröße (Stokesradius) und sehr viel stärker als die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins. Im elektrischen Feld wandern die SDS-Proteinkomplexe daher in indirekter Abhängigkeit von ihrer Größe. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Polyacrylamid-Gelen variabler Konzentration (Vernetzungsgrad 29:1 Acrylamid:Bisacrylamid). Zunächst habe ich zwei abgedichtete Glasplatten zu etwa 3/4 mit Trenngel-Lösung gefüllt und mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um eine ebene Schichtgrenze und einen Luftabschluss zu erhalten. Nach Auspolymerisierung entfernte ich das Isopropanol und füllte das Sammelgel ein, in das ich anschließend einen Kamm zur Aussparung der Ladetaschen platziert habe. Vor dem Beladen des Gels habe ich die Taschen stets mit Laufpuffer gespült. Die Elektrophorese fand in 1x Laemmli-Puffer bei 45 mA und 4 °C für die erste halbe Stunde statt. Danach wurde die Elektrophorese bei 60 mA fortgesetzt. Die Proteinbanden im Gel wurden in Coomassie-Lösung angefärbt und der Hintergrund durch Inkubation in zwei Entfärberlösungen wieder entfernt.

Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Um *in vitro*-transkribierte RNAs aufzureinigen, gelangte die Methode der denaturierenden RNA-Gelelektrophorese zum Einsatz. Die Acrylamidkonzentration (Vernetzungsgrad 19:1 Acrylamid:Bisacrylamid) der Gele betrug 8% in 0,5x TBE und 8 M Harnstoff. Das Gel wurde zwischen zwei mit Klebeband abgedichtete Glasplatten gegossen, wobei die Ecken der Glasplatten doppelt abgeklebt waren. Vor dem Beladen wurden die Geltaschen mit 0,5x TBE gespült. Die RNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen denaturierenden RNA-Probenpuffer versetzt und für 2 min auf 95°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Die Auftrennung erfolgte bei 35 mA bis die die Lauffront etwa 2/3 der Gelstrecke zurückgelegt hatte.

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Die native Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Protein-RNA/ DNA-Komplexen oder RNA-Molekülen unter nicht-denaturierenden Bedingungen entsprechend ihrer elektrischen Nettoladung. Für die Reaktionsprodukte der Helikaseassays wurden 8%ige Polyacrylamid-Gele (Vernetzungsgrad 19:1 Acrylamid:Bisacrylamid) verwendet. Die RNA/ DNA-Protein-Komplexe der EMSA-Versuche (engl.: EMSA/ *Electrophoretic mobility shift assay*) wurden in 4,5% Polyacrylamid-Gelen (Vernetzungsgrad 80:1 Acrylamid:Bisacrylamid) mit 4% Glycerin aufgetrennt. Vor dem Beladen fand ein Vorlauf bei 15 mA statt und die Ladetaschen wurden zweimal mit 0,5x TBE-Laufpuffer gespült. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA für etwa 90 Minuten in 0,5x TBE-Puffer bei 4°C.

2.3.4.4 Western Blot

Proteinextrakte wurden in 2x Probenpuffer für 2-5 min bei 96°C denaturiert, nach dem Abkühlen auf Eis abzentrifugiert und in einem SDS-PAGE aufgetrennt. Danach wurden die Proteinproben im „*semi-dry*“-Verfahren bei 300 mA für 4 h auf Nitrocellulosemembranen im Transferpuffer (0,7x Laemmli-Puffer; 30% Methanol) übertragen. Die Membran wurde anschließend mit Ponceaurot gefärbt, um die Markerbanden und Laufspuren darzustellen.

Die Membran wurde in Blockerlösung (5% [w/v] Trockenmilch; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20) meist bei 4°C über Nacht geblockt. Die Inkubationen mit den Anti-IGHMBP2-Antikörpern in den erforderlichen Konzentrationen erfolgten meist bei Raumtemperatur für 90 min in Blockerlösung. Anti-β-Tubulin-Antikörper (Abcam) wurde als Ladekontrolle verwendet. Nach zweimaligem Waschen der Membran in TBS-T für 10 min wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper in

den entsprechenden Konzentrationen für eine Stunde ebenfalls bei Raumtemperatur in Blockerlösung inkubiert. Die Visualisierung der Signale erfolgte durch Chemilumineszenz (ECL-Reagens).

2.3.4.5 Expression des rekombinanten IGHMBP2 in *E. coli*

Nach Transformation der Expressionsplasmide (pGEX-IGHMBP2-Wt/mut-6xHis) in Rosetta gami™ (DE3)pLysS-Zellen (Novagen) wurden zwei aufeinanderfolgende Starterkulturen (10 ml und 200 ml) in SuperBroth-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angelegt. Nach Inokulation von 100 ml Starterkultur auf 2,5 l SuperBroth-Medium wurde bei einer $OD_{600}=0,6-1,0$ die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) bei 16 °C über Nacht induziert. An jedem Präparationstag wurden zwei IGHMBP2-Mutanten und ein Wildtyp-Protein exprimiert. Die Zellen wurden am darauf folgenden Morgen bei 5300 g (Avanti J-20, JA-10) abzentrifugiert und in Lysepuffer (20 mM HEPES-NaOH pH 7,0; 1 M NaCl; 5 mM $MgCl_2$; 20% Glycerin; 0,01% NP-40; 5 mM β -Mercaptoethanol; 0,1 mM AEBSF; 0,5 mg/l Leupeptin; 0,7 mg/l Pepstatin A und 2 mg/l Aprotinin) bei 4 °C und 250 rpm in einem Schüttler resuspendiert.

2.3.4.6 Aufreinigung des rekombinanten IGHMBP2

Die Aufreinigung des rekombinanten Wildtyp- und mutierten IGHMBP2-Proteins erfolgte durch zwei nacheinander durchgeführte Affinitätschromatographieschritte. Alle Arbeiten habe ich bei 4 °C durchgeführt.

Das im Lysepuffer gelöste Bakterienpellet wurde sonifiziert (Hielscher UPH-100, mittlere Stärke) und bei 48400 g (Avanti J-20, JA 25.50-Rotor) für 1 h ultrazentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend mit äquilibrierter Gluthathion-Sepharose (GE Healthcare) für 2 h bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Die Sepharose wurde für 5 min bei 720 g (Eppendorf 5804R) abzentrifugiert und zweimal mit Waschpuffer A (20 mM HEPES-NaOH pH 7,0; 1 M NaCl; 5 mM $MgCl_2$; 20% Glycerin; 0,01% NP-40; 5 mM β -Mercaptoethanol) und zweimal mit Waschpuffer B (20 mM HEPES-NaOH pH 7,0; 1 M NaCl; 5 mM $MgCl_2$; 20% Glycerin; 5 mM β -Mercaptoethanol) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die IGHMBP2-Hälften der gebundenen Fusionsproteine durch Inkubation mit PreScission™-Protease (GE Healthcare) in 4 ml Waschpuffer B auf einem Rotator bei 4 °C über Nacht abgespalten. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt kamen die Überstände auf äquilibrierte Ni-NTA Agarose (Qiagen), die anschließend mit einem

Säulenvolumen Waschpuffer C (20 mM HEPES-NaOH pH 7,0; 1 M NaCl; 5 mM MgCl₂; 20% Glycerin; 5 mM β-Mercaptoethanol; 20 mM Imidazol pH 7,0) und zwei Säulenvolumina Waschpuffer D (20 mM HEPES-NaOH pH 7,0; 1 M NaCl; 5 mM MgCl₂; 50% Glycerin; 5 mM β-Mercaptoethanol; 20 mM Imidazol pH 7,0) gewaschen wurden. Die Elution erfolgte mit 1 ml Elutionspuffer (20 mM HEPES-NaOH pH 7,0; 1 M NaCl; 5 mM MgCl₂; 50% Glycerin; 5 mM β-Mercaptoethanol; 300 mM Imidazol pH 7,0), die in 4 Fraktionen à 250 µl gesammelt wurde. Die Expression wurde anschließend durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung kontrolliert. Die Fraktionen, die die höchsten IGHMBP2-Anteile enthielten, wurden vermischt und die Proteinkonzentration durch Bradford-Kolorimetrie bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C, wobei die Wildtyp-Präparationen über einen Zeitraum von mindestens einem halben Jahr enzymatisch aktiv blieben.

2.3.4.7 Radioaktive Markierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

In vitro-Transkription

Für die Herstellung der RNA-Duplices wurden RNA-Stränge *in vitro* transkribiert. Als Matrizen dienten linearisierte Plasmide, die nach dem Restriktionsverdau durch Phenol-Chloroform Extraktion gereinigt wurden. Die von mir verwendeten Plasmide, RNA Polymerasen und erzeugten RNAs sind in *Tabelle 32* aufgelistet.

Plasmid	linea- risiert durch	Markierung	RNA Polymerase	erzeugter RNA- Strang	Länge [nt]	RNA- Duplex
pGEM-C4	PvuII	α-[³² P]-CTP	SP6 Polymerase	C4	197	C4/Mol
pGEM-Mol	HindIII	keine	T7 Polymerase	Mol	86	C4/Mol
pCDNA3	EcoRI	α-[³² P]-CTP	SP6 Polymerase	RNA-A1	57	5'-RNA
pCDNA3	NotI	keine	T7 Polymerase	RNA-A2	86	5'-RNA
pBluescript II KS(+)-ΔSacl/KpnI	PvuII	α-[³² P]-CTP	T3 Polymerase	RNA-A3	139	3'-RNA
pBluescript II KS(+)-ΔSacl/KpnI	PvuII	keine	T7 Polymerase	RNA-A4	229	3'-RNA

Tabelle 32: Übersicht der zur in vitro-Transkription verwendeten Materialien und Reagenzien.

Drei der in *Tabelle 32* aufgeführten RNA-Moleküle wurden während der Transkription durch Zugabe von α-[³²P]-CTP radioaktiv markiert. Der typische Versuchsansatz sah folgendermaßen aus:

Transkription	radioaktiv	nicht radioaktiv
Vorlagen-DNA	1-2 µg	1-2 µg
Transkriptionspuffer 5x	6 µl	6 µl
0,1 M DTT	2,5 µl	2,5 µl
RNAsin™	1 µl	1 µl
5 mM NTPs	-	5 µl
5 mM ATP, GTP, UTP + 1mM CTP	5 µl	-
RNA-Polymerase	1,5 µl	1,5 µl
[α - ³² P]-CTP	3 µl	-
DEPC-ddH ₂ O	ad 30 µl	ad 30 µl

Tabelle 33: Typischer Reaktionsansatz für die *in vitro*-Transkription.

Die Transkripte wurden anschließend über denaturierende RNA-Gelelektrophorese aufgetrennt, mit einem RNase-freien (durch Erhitzen dekontaminiertem) Skalpell ausgeschnitten und über Nacht auf einem Rotator bei 4°C in 400 µl AES-Puffer eluiert. Am folgenden Tag wurden die RNAs mit 1 ml Ethanol abs. gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in DEPC-ddH₂O aufgenommen. Die Konzentration der radioaktiven RNA-Lösungen ergab sich aus der Messung der emittierten β -Strahlung (radioaktiven Strahlung) in einem Szintillationszähler. Die Konzentrationsbestimmung der nicht-radioaktiven Transkripte erfolgte mit Hilfe eines UV-Fotometers. Zur Herstellung unmarkierter RNA, die kompetitiv in Helikase-Assays eingesetzt werden sollte, wurde das Transkript C4 einmalig auch nicht-radioaktiv erzeugt.

Radioaktive Phosphorylierung der DNA

Die Markierung von 5'-Enden durch radioaktive Phosphorylierung erfolgte mit 20 U T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK, New England Biolabs), 10–15 pmol DNA-Oligonukleotid und 25-35 pmol γ -[³²P]-ATP unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen bei 37°C für 30 min.

Oligonukleotid	Markierung	Länge [nt]	DNA-Duplex
DNA-A1	γ -[³² P]-ATP	57	5'-DNA
DNA-A2	keine	86	5'-DNA
DNA-A1rev	γ -[³² P]-ATP	57	3'-DNA
DNA-A2rev	keine	86	3'-DNA

Tabelle 34: Übersicht der verwandten Materialien und Reagenzien zur 5' Markierung.

Nichtinkorporierte Radioaktivität wurde durch DNA-Präzipitation und anschließender Gelfiltration über Microspin G-25 Säulen (GE Healthcare) entfernt. Die Konzentration

der radioaktiv markierten Oligonukleotide im Filtrat wurde ebenfalls mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt.

2.3.4.8 Bildung partiell doppelsträngiger Nukleinsäuren

Für die Erzeugung von Duplices wurden jeweils ein radioaktiv markierter und ein unmarkierter Strang in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen im Hybridisierungspuffer (25 mM HEPES-NaOH pH 7; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% (w/v) SDS) gemischt, in einem Wasserbad auf 95 °C erhitzt und langsam abgekühlt. Der Erfolg der Hybridisierung wurde durch native PAGE überprüft.

2.3.4.9 Analyse der enzymatischen Aktivitäten der Helikasen

Analyse der Nukleinsäure-Bindungsaktivität mit Hilfe der „*Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA)“-Methode

Die Bindungsaktivität wurde mit 25 fmol radioaktiv markierter, einzelsträngiger RNA (C4) oder DNA (DNA-A1) in einem Standardreaktionsansatz (40 µl) mit 100 ng IGHMBP2-Protein im Bindungspuffer (50 mM NaCl; 30 mM Tris-HCl pH 7,0; 1,2 mM MgCl₂; 1,5 mM DTT; 0,5 mM EDTA; 20 U RNasin™; 15% Glycerin) analysiert. RNasin™ wurde in den Reaktionen mit DNA-Substraten weggelassen. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die gebildeten Komplexe durch Zugabe von 0,2% Glutardialdehyd fixiert. Dieser Schritt war notwendig, um eine Auflösung des gebildeten Komplexes während der Migration im elektrischen Feld bei der anschließenden nativen PAGE zu verhindern. Diese Instabilität resultiert möglicherweise aus der positiven Ladung des IGHMBP2-Proteins (pI=9,1) unter den gegebenen Laufbedingungen der Gelelektrophorese bei pH 8,3, sodass die Protein-Hälfte des Komplexes in die entgegengesetzte Richtung als die Nukleinsäure wandern würde.

Nach 10 min Fixierung wurde der Reaktionsansatz mit 2x Ladepuffer (89 mM Tris-Borat; 2 mM EDTA; 20% Glycerin; 10 µg/µl Heparin; and 0,1% (w/v) Xylencyanol; 0,1% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und die Hälfte der Reaktion in einer nativen PAGE aufgetrennt. Die Visualisierung der Banden erfolgte durch Autoradiographie.

Analyse der NTPase-Aktivität

100 ng gereinigtes Protein wurde in einem ATPase-Reaktionsgemisch (50 µl) für 1 h bei 37 °C unter bekannten Bedingungen (Laggerbauer *et al.*, 1996) inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe einzelsträngiger, homopolymerer RNA (Sigma-Aldrich) oder doppelsträngiger DNA (GE Healthcare) in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml stimuliert. Zusätzlich wurden dem Reaktionsgemisch 10% Glycerin zugesetzt. Die Zugabe eines Volumens 0,5 M Na₂EDTA pH 8,0 stoppte die Reaktion ab. Danach wurden 0,8 µl des Reaktionsgemisches durch Dünnschichtchromatographie auf Poly(ethylenimin)-cellulose (PEI)-Platten (Merck) analysiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch Autoradiografie und auf einem Fuji Bas-2000 PhosphorImager (Fujifilm Europe GmbH) sichtbar gemacht. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der TINA v2.0-Software (Raytest Isotopen Messgeräte GmbH). Zur korrekten Identifikation der Hydrolyseprodukte wurde eine Reaktion mit 0,1 U CIP (New England Biolabs) für 6 min bei 37°C durchgeführt.

Analyse der Helikase-Aktivität

Die Entwindung partiell doppelsträngiger RNA- und DNA-Substrate wurde unter gleichen Pufferbedingungen wie im Bindungstest (leicht modifiziert nach Lagerbauer *et al.*, 1998) getestet, mit der Ausnahme, dass der Reaktion 200 µM ATP zugesetzt und 25 fmol Duplex anstatt einzelsträngiger Substrate verwendet wurden. RNasin™ kam in Versuchen mit DNA-Substraten nicht zur Anwendung. Die Reaktion wurde bei 30°C für 1 h inkubiert, bevor sie durch Zugabe von 8 µl Helikase-Stopp-Lösung (150 mM Na₂EDTA pH 8,0; 50% (v/v) Glycerin; 2% (w/v) SDS; 0,25% (w/v) Bromphenolblau und 0,25% (w/v) Xylencyanol) gestoppt wurde. Die Reaktionsprodukte wurden durch nichtdenaturierende PAGE (19:1) mit einem 8%igen Gel in 0,5x TBE bei 4°C aufgetrennt und durch Autoradiografie sichtbar gemacht.