

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Züchtung von Zelllinien

Sämtliche Zelllinien in dieser Arbeit (s. Tab. 1) wurden in 10% FCS-haltigem RPMI-Medium, das mit Penicillin/Streptomycin versterzt war, in Zellkulturflaschen (Greiner) gezüchtet. Durch einen speziellen Brutschrank (Jouan) wurden die optimalen Wachstumsbedingungen von 37°C und 5% CO₂ hergestellt. Während der Wachstumsphase wurden die Zellen je nach Bedarf mit Medium gefüttert. War eine Zellzahl von ca. 5×10^7 erreicht, wurden die Zellen durch Zentrifugation (1300 rpm, 10 min, 4°C) geerntet und 2x mit Hanks-Puffer (Seromed) gewaschen. Anschließend wurde ein Zelltiter von 5×10^7 Zellen/ml hergestellt, indem die Zellen in eine entsprechende Menge Hanks-Puffer aufgenommen wurden.

3.1.2. Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Zelllinien

Etwa 10^6 Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium bei 0°C überführt und anschließend sofort bei -80°C eingefroren. Später wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt, wo sie über lange Zeiträume aufbewahrt werden konnten.

Wieder benötigte Zellen wurden aufgetaut, indem die Einfrierröhrchen in 40°C warmen Wasser so lange geschwenkt wurden bis keine Eiskristalle mehr sichtbar waren. Anschließend wurden sie in 10 ml Hanks-Puffer aufgenommen und dann sofort sedimentiert (1300 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und auf die Kulturgefäße verteilt.

3.2. Isolierung genomischer DNA

3.2.1. Phenolextraktion

Die Zellsuspension (s. Abschnitt 3.1.1) wurde in einen Erlenmeyerkolben überführt und pro 10^7 Zellen mit 2 ml Extraktionspuffer und 2 µl RNase Lösung versetzt, um die Zellen durch vorsichtiges Schwenken zu lysieren. Die Lösung wurde 1 h bei 37°C inkubiert, und anschließend wurden 5 µl Proteinase K Lösung pro ml Gesamtlösung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei 50°C wurde das gleiche Volumen äquilibriertes Phenol (pH 8) zugegeben, durch vorsichtiges Schwenken und Rollen gut verteilt und über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurde durch Zentrifugation (10 min, 3000 rpm, 10°C) der Emulsion die wäßrige DNA enthaltene Phase von der Phenol-Phase getrennt. Die obere wäßrige Phase mit der DNA wurde mit einer Pipette mit möglichst großen Spitzendurchmesser - um Scherkräfte zu vermeiden - vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Die Phenolextraktion wurde wiederholt. Nach Zugabe von 0,2 Volumen 10 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol fiel die DNA unter vorsichtigem Mischen aus. Die

DNA wurde mit Hilfe einer zugeschmolzenen Pasteurpipette herausgeangelt und in 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA in TE gelöst (6 ml/10⁷ Zellen) und nochmals mit 0,2 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen Ethanol gefällt. Nach nochmaligem Waschen mit 70% Ethanol wurde die DNA getrocknet bis keine Flüssigkeit mehr zu sehen war. Anschließend wurde die DNA in TE (2ml/10⁷ Zellen) gelöst.

3.3. Isolierung von Gesamt RNA

Bei der Isolierung von RNA ist darauf zu achten, daß die Umgebung und alle verwendeten Materialien RNase frei sind. Alle Schritte wurden mit Handschuhen unter einem Abzug durchgeführt, der nur für RNA-Arbeiten verwendet wird. Plastikwaren sind zwar normalerweise nukleasefrei, aber um Neu-Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Verpackungen nur unter diesem Abzug geöffnet und anschließend wieder gut verschlossen. Glas- oder Porzellanwaren (z.B. Mörser) wurden entweder bei 200°C gebacken oder mit RNase AWAY™ (Molecular BioProducts) gereinigt und anschließend mit DEPC-Wasser gespült.

Es wurden zwei verschiedene Kits zur RNA-Isolierung verwendet: das RNAagents® Total RNA Isolation System (Promega) und das peqGOLD TriFast™ (peqLab). Beide Kits sind dafür geeignet, RNA aus Gewebe, adhärenen Zellen oder Zellsuspensionen zu isolieren.

3.3.1. RNAagents® Total RNA Isolation System (Promega)

Die Denaturierlösung von Promega enthält Guanidinthiocyanat, Citrat, Sarcosin und β-Mercaptoethanol in einem einzigen Gemisch.

Die Zellen wurden geerntet (s. Abschnitt 3.1.1), 2x mit Hankspuffer gewaschen und in der vom Hersteller angegebenen Menge Denaturierlösung resuspendiert. Anschließend wurden die von Promega empfohlenen Volumina Natriumacetat und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (Promega) zugegeben. Nach gründlicher Vermischung wurde die Probe für 15 min auf Eis gelagert und danach für 20 min in einer Kühlzentrifuge (4°C) bei 10 000 x g zentrifugiert. Die RNA-haltige obere wäßrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und eine äquivalente Menge Isopropanol zugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei -20°C wurde die RNA durch Zentrifugation (10 000 x g, 30 min, 4°C) pelletiert. RNA, die nicht sofort benötigt wurde, wurde nochmals in Denaturierlösung aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die RNA, die anschließend gleich weiterverarbeitet werden sollte, wurde mit 75% Ethanol (0°C) gewaschen, getrocknet und anschließend in einer vom Hersteller angegebenen Menge nukleasefreiem Wasser aufgenommen.

3.3.2. peqGOLD TriFast™ (peqLab)

Mit diesem System kann man RNA, DNA und Proteine extrahieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur RNA extrahiert.

Die peqGOLD TriFast™-Lösung enthält Phenol und Guanidinisoithiocyanat in einphasiger Lösung. Nach der Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phasen auf. Die RNA befindet sich in der wäßrigen Phase, die DNA in der

organischen und der Interphase und die Proteine in der organischen Phase.

Mit dieser Methode wurde RNA aus Gewebe extrahiert. Bei dem Gewebe handelte es sich um Hodengewebe, daß freundlicherweise von Prof. Schnorr aus der Urologie der Charité bereitgestellt wurde. Das Gewebe wurde zunächst mit einem Skalpell verkleinert und anschließend mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das hart gefrorene Gewebe wurde mit einem Mörser zerstampft und mit 1 ml peqGOLD Trifast-Lösung pro 50-100 mg Gewebe versetzt. Das Gemisch wurde in ein Röhrchen überführt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die von peqLab empfohlene Menge Chloroform zugegeben, geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Nachdem bei 12000 x g 5 min zentrifugiert worden war, wurde die obere wäßrige Phase mit der RNA in ein neues Röhrchen überführt und die Inter- und Phenolphase für eine mögliche Extraktion von DNA und Proteinen bei 4°C gelagert. Die Präzipitation der RNA erfolgte mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetzte ml peqGOLD Trifast-Lösung. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde die Probe bei 12000 x g (4°C) 30 min zentrifugiert. Die nicht gleich benötigte RNA wurde in dem Denaturierungspuffer von Promega bei -80°C gelagert, während die RNA, die sofort weiter verarbeitet werden sollte, 2 x mit 75% Ethanol gewaschen wurde (Zentrifugation: 10 min, 12000 x g, 4°C). Nach Trocknen des Pellets wurde eine entsprechende Menge an nukleasefreiem Wasser zugegeben.

3.4. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

3.4.1. Photometrische Bestimmung

Mit Hilfe eines Photometers wurde die Konzentration der DNA bzw. RNA bei 260 nm bestimmt. 50 µg DNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml entsprechen 1 OD. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte größer als 1,6 sein, um Proteinverunreinigungen auszuschließen.

3.4.2. Picogreen-Messung

Für kleine DNA-Mengen (1-80 ng DNA) wurde die Picogreen-Messung verwendet. Picogreen (Molecular Probes) bindet hauptsächlich an doppelsträngige DNA.

1 µl der zu messenden Probe wurden mit 9 µl Picogreen (1:50 verdünnt) in einer Terasaki-Platte (NUNC™ BrandProducts) vermischt. Die Anregung (bei 488 nm) und die Messung der Lichtemission (~542 nm) erfolgte in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Tekan, Crailsheim). Anhand einer Eichkurve konnte die DNA-Konzentration ermittelt werden.

3.5. Gelelektrophorese

Geladene Partikel wie z.B. Nukleinsäuren kann man mit Hilfe der Gelelektrophorese voneinander trennen. Da DNA-Moleküle grundsätzlich negativ geladen sind, wandern sie zur Anode. Bei gleicher Ladung ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle abhängig von ihrer jeweiligen Größe und Konformation sowie der Gelmatrix. Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller kann es sich durch die Gelmatrix bewegen.

3.5.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 50 und 1000 bp wurden mit Hilfe von 10%igen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt.

Für ein 16 x 16 cm² Gel wurden 30 ml einer 10%igen Acrylamidlösung mit 300 µl APS (10%, stets frisch angesetzt) und 30 µl TEMED versetzt. TEMED initiiert die Polymerisation, weshalb die Lösung schnell zwischen zwei durch Abstandshalter getrennte Glasplatten gegossen und anschließend ein Kamm passender Größe eingesetzt wurde. Nach 30 min wurde der Kamm aus dem auspolymerisierten Gel entfernt und die Taschen mit 1 x TBE gespült. Die DNA-Proben wurden mit 20% des Ladepuffers vermischt und mit einer Hamilton-Glasspritze in die Taschen gefüllt. Als Größenstandard dienten 200 ng der 1 kb Leiter von Gibco-BRL.

Die Elektrophorese wurde mit 50 Watt in 1 x TBE durchgeführt. Die Laufzeit betrug meist 45 min, wurde aber bei kleinen Fragmenten verkürzt bzw. bei großen Fragmenten verlängert. Anhand der im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe konnten die Positionen der DNA-Fragmente geschätzt werden. Bromphenolblau läuft bei ~30 bp, Xylencyanol bei ~100 bp.

3.5.2. Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Agarosekonzentration lassen sich DNA-Fragmente zwischen 500 und 20 000 bp auftrennen. Für präparative Gele wurde speziell gereinigte DNase-freie SEAKEM-Agarose von FMC eingesetzt, für analytische Gele hingegen einfache Agarose (Biozym).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 0,7% bis 1%ige Gele verwendet (Fragmente < 7000 bp). Die Agarose wurde in 1 x TAE Puffer durch Kochen gelöst und mit ~60°C in eine Gelkammer gewünschter Größe gegossen. Anschließend wurde ein Kamm passender Größe eingesetzt, um die entsprechende Anzahl an Taschen zu erzeugen. Nach Erstarren der Agarose und Entfernen des Kammes wurde das Gel in eine horizontale Kammer mit TAE gegeben. Dann wurden die Proben - versetzt mit Ladepuffer - aufgetragen. Als Größenstandard dienten wie bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese 200 ng der 1 kb Leiter von Gibco-BRL. Die angelegte Spannung bzw. Leistung und Laufzeit war der jeweiligen Größe des Agarosegels angepaßt. Als limitierender Faktor wurde die Spannung gewählt (24 x 19 cm: ~ 200 V; 13 x 10 cm: ~150 V; 10 x 8 cm: ~100 V). Sollte eine besonders gute Auftrennung erreicht werden (z.B. ein Verdau, der später geblottet werden sollte), wurde die Elektrophorese besonders langsam vollzogen (24 x 19 cm: 46 V, ÜN).

3.5.3. RNA-Gele

RNA ist üblicherweise einzelsträngig und bildet deshalb Sekundärstrukturen in normalen Agarosegelen. Die Auftrennung ist deshalb nicht zufriedenstellend. Deshalb wird RNA durch eine modifizierte Gelelektrophorese analysiert. Da RNA außerdem leicht degradiert wird, ist es besonders wichtig, daß Gel, Laufpuffer, Auftragspuffer usw. RNase-frei sind.

1 g Agarose wurde in 72 ml H₂O in der Mikrowelle gelöst und auf 60°C abgekühlt. Anschließend wurden 10 ml MOPS-Puffer (10 x) und 18 ml 12,3 M Formaldehyd unter einem Abzug zugegeben. Die Agarose-Lösung wurde in eine horizontale Laufkammer gegossen und ein Kamm passender

Größe eingefügt. Während das Gel erstarrte, wurde die aufzutragende RNA-Probe vorbereitet. Es wurden mindestens 3-5 µg RNA aufgetragen. 5,5 µl Probenvolumen wurden mit 2,5 µl 1 x MOPS, 4,5 µl 12,3 M Formaldehyd und 5 µl FA-Ladepuffer vermischt und 15 min bei 55°C inkubiert. Anschließend wurden noch 12,5 µl Formamid zugefügt. 2 µl RNA-Standard (MBI Fermentas) wurden mit 2 µl Ladepuffer (MBI Fermentas) versetzt und 10 min bei 70°C inkubiert. Die Proben wurden in die Taschen gefüllt und in einer 10 x 8 cm großen Gelkammer bei ~100 V aufgetrennt. Danach wurde das Gel 2 x 20 min in 0,5 M Ammoniumacetat geschüttelt, um das Formaldehyd zu entfernen. Die Färbung erfolgte mit EtBr in 0,5 M Ammoniumacetat (0,5 µg/ ml EtBr) für ~30 min und anschließend wurde möglichst lange mit H₂O entfärbt (mindestens 1 h). Eine intakte RNA sollte eine 28S-Bande bei ca. 4800 bp und eine 18S-Bande bei ca. 1900 bp zeigen. Das 28S / 18S Verhältnis sollte dabei 2:1 sein.

3.5.4. Denaturierendes Polyacrylamid-Gel für Sequenzanalysen

Denaturierende Polyacrylamid-Gele werden dazu verwendet einzelsträngige DNA aufzutrennen. Das Laufverhalten ist fast ausschließlich von der Fragmentlänge abhängig. Durch Zusatz von Harnstoff und Erhitzen der Probe wird sichergestellt, daß die DNA einzelsträngig und linear vorliegt.

Zur Analyse von Sequenzreaktionen wurden 4%ige denaturierende Polyacrylamid-Gele verwendet. Dafür wurden 4 ml Acrylamidlösung (40%ig), 4 ml 10 x TBE und 20 g Harnstoff vermischt und mit aqua dest auf 40 ml aufgefüllt. Durch Erhitzen auf 90°C wurde der Harnstoff gelöst. Ein anschließendes Entgasen der Lösung (Wasserstrahlpumpe oder Vakuumpumpe) verhinderte die Blasenbildung im Gel. Nachdem die Lösung auf RT abgekühlt war, wurden 240 µl APS (10%ig) und 16 µl TEMED zugefügt und möglichst schnell mit einer 20 ml Spritze durch einen 0,2 µm Membranfilter (Schleicher&Schuell) zwischen zwei 40 cm lange Glasplatten (0,25 mm Abstand) gegossen. Ein "Haifischkamm" mit 64 Taschen wurde eingefügt. Nach 1-2 Stunden bei RT war das Gel auspolymerisiert und nach Entfernen des Kammes sowie sorgfältigem Reinigen der Glasplatten, wurde das Gel in die vertikale Laufkammer des Licor-Sequenzers gehängt. Um die denaturierenden Bedingungen des Geles herzustellen, mußte das Gel außer dem Harnstoff-Zusatz noch auf 50°C erhitzt werden, weshalb ein Vorlauf von ca. 30 Minuten (1500 V, 37 mA, 50 W, 50°C) erfolgte. Die in Stop-Formid-Puffer suspendierten Proben (s. Abschnitt 3.11.1) wurden mit Hilfe einer 8-Kanal Hamiltonspritze in die Taschen des vorbereiteten Gels gefüllt (1 µl Probe). Die Elektrophorese erfolgte zu den gleichen Bedingungen wie beim Vorlauf. Die Scan-Geschwindigkeit betrug 3, was einer Laufzeit von ungefähr 10 Stunden bei einer Leseweite von ~800 bp entsprach.

3.6. Nachweis gelelektrophoretisch aufgetrennter Moleküle

3.6.1. Fluoreszenzfärbung mit Ethidiumbromid

Ethidiumbromid (EtBr) ist aufgrund seiner tetrazyklischen, planaren Struktur in der Lage, sich zwischen die Basen der DNA zu lagern. Es fluoresziert im ultravioletten Licht und läßt so die Moleküle sichtbar werden. Nachteil dieser Methode ist allerdings, daß das eingelagerte EtBr teilweise eine mutagene Wirkung auf die DNA hat, was bei nachfolgenden Experimenten stören kann.

Die Gele mit der aufgetrennten DNA wurden 15 min in EtBr-Lösung inkubiert und anschließend 15 min in destilliertem Wasser entfärbt. Das interkalierte EtBr wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators bei einer Lichtwellenlänge von 300 nm angeregt, was zu einer Fluoreszenz von 590 nm führte. Zur Dokumentation wurden die Ergebnisse mit einem Kamerasystem (BioDoc, Biometra) aufgenommen und auf High-Density-Papier (UPP-110HD, Sony) gedruckt.

Die EtBr-Lösung wurde mehrfach verwendet. Wenn die Lösung nach längerem Gebrauch trübe geworden war, wurden 5 g KMnO_4 und 10 ml 8 M HCl pro Liter zugegeben und 48 h bei RT gerührt. Das ansonsten cancerogene EtBr wurde dadurch oxidiert und konnte anschließend gefahrlos weggeschüttet werden.

3.6.2. Fluoreszenzfärbung mit SYBR-Green

Sollten die auf dem Gel aufgetrennten DNA-Proben für Klonierungsexperimente weiterverwendet werden, wurde eine SYBR-Green-Anfärbung vorgezogen. SYBR-Green hat im Vergleich zu EtBr eine geringere mutagene Wirkung auf DNA. SYBR-Green färbt doppelsträngige und einzelsträngige DNA sowie RNA. Die Probe wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit 0,5-1 μl SYBR-Green versetzt und konnte nach erfolgter Elektrophorese mit einer Lichtwellenlänge von 300 nm auf einem Blautisch angeregt werden. Die Dokumentation erfolgte wie oben (s. Abschnitt 3.6.1) beschrieben.

3.7. DNA-Isolierung aus Gelen

3.7.1. DNA-Isolierung aus Polyacrylamid-Gelen

3.7.1.1. DNA-Elution durch Diffusion

Mit einem spitzen Gegenstand wurde in den Boden eines 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßes ein Loch gebohrt. Dieses wurde auf ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt und anschließend mit einem Gelstück beschickt, das die gewünschte DNA enthielt. Die beiden ineinander geschobenen Gefäße mit dem Gelstück wurden für 2 min zentrifugiert, so daß das Gel in zerkleinerter Form in das 1,5 ml Gefäß überführt wurde. Je nach Gelmenge wurden 50-200 μl 5 M NaCl zupipettiert. Das Gel/NaCl-Gemisch wurde mindestens 15 min bei 50°C inkubiert, was dazu führte, daß die DNA aus dem Gel in die Salz-Lösung diffundierte. Gel- und

Salzreste wurden durch Gelfiltration mit einer G-50 Säule entfernt (s. Abschnitt 3.9.1). Anschließend wurde das Volumen mit Hilfe einer Ethanol-Fällung (s. Abschnitt 3.8.1) bzw. durch Gefriertrocknung auf die gewünschte Menge eingeeengt.

3.7.1.2. Elektroelution

Für diese Art der Isolierung wurde eine Elektroelutionskammer BT 100 von Schleicher und Schüll verwendet. Zwischen Anode und Kathode befand sich der Gelraum. Zur Kathode und Anode hin wurde der Gelraum durch eine DNA-undurchlässige Membran abgeschlossen. Der Gelraum konnte je nach Gelmenge durch unterschiedliche Abstände dieser beiden Membranen variiert werden. Eine DNA-durchlässige Membran wurde kurz vor der DNA-undurchlässigen Membran an der Anode eingefügt. Der Abstand zwischen diesen beiden Membranen stellte den Entnahmeraum dar, der möglichst klein sein sollte, um das Entnahmenvolumen so gering wie möglich zu halten.

Der Gelraum wurde mit 0,25 x TAE Puffer und den Gelstückchen gefüllt und in eine Elektrophoresekammer (ebenfalls gefüllt mit 0,25 x TAE) gesetzt. Anschließend wurde die Elektrophorese mit 100 V über Nacht durchgeführt. Durch die angelegte Spannung wandert die DNA aus den Gelstückchen durch die DNA-durchlässige Membran in Richtung Anode in den Entnahmeraum. Kurz vor der Entnahme wurde für 10 sek umgepolt, um die DNA von der DNA-undurchlässigen Membran an der Anode zu lösen. Die gelöste DNA wurde mit einer Pipette aus dem Entnahmeraum in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Volumen wurde durch eine Ethanol-Fällung (s. Abschnitt 3.8.1) oder mit Hilfe eines Lyophilisators eingeeengt und überschüssige Salze durch eine anschließende Gefiltration (s. Abschnitt 3.9.1) beseitigt.

3.7.2. DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen

3.7.2.1. DNA-Elution durch Diffusion

Im Prinzip funktioniert diese Methode wie die unter Abschnitt 3.7.1.1 beschriebene. Allerdings ist hierfür keine hochkonzentrierte Salzlösung erforderlich, sondern die Diffusion aus dem Gel erfolgt mit 1 x TE.

3.7.2.2. DNA-Elution mit einer Absorber-Emulsion

Für diese Art der DNA-Isolierung wurde das Jetsorb-Kit von Genomed verwendet. Das Gelstück mit der gewünschten DNA-Bande wurde wie unter Abschnitt 3.7.1.1 verkleinert. Pro 100 mg Gelmasse wurden 300 µl Suspensionspuffer und 10 µl Jetsorb-Absorber-Emulsion zugegeben. Während einer Inkubation bei 50°C (15 min) wurde die Agarose geschmolzen und die DNA an den Absorber gebunden. Innerhalb dieser Inkubationsphase wurde das Reaktionsgefäß alle 3 min gevortext. Anschließend wurde 30 sek bei >10000 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit 300 µl einer hoch konzentrierten Salzlösung (Puffer A1) gewaschen und anschließend zu den gleichen Bedingungen wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 300 µl einer gering konzentrierten Salzlösung (Puffer A2) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und nochmals mit der niedrig

konzentrierten Salzlösung gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend in 20 µl TE aufgenommen. Während einer nachfolgenden Inkubation bei 50°C (5 min) diffundierte die DNA in die TE-Lösung. Danach wurde zentrifugiert, das entstehende Pellet verworfen und die DNA-haltige TE-Lösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.8. Fällung von Nukleinsäuren

Diese Methode bietet die Möglichkeit DNA-Lösungen zu konzentrieren und die Puffer Bedingungen zu ändern.

3.8.1. Ethanol-Fällung

Nach der Zugabe von 20% einer 5 x Natriumacetatlösung - zur Erhöhung der Salzkonzentration - wurden 2 Volumina Ethanol zugegeben. Nach 20 min bei -80°C wurde der Ansatz 30 min bei 14000 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde 2 x mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in dem gewünschten Puffer und Volumen aufgenommen.

3.8.2. Isopropanol-Fällung

Bei großen Volumina bietet sich die Isopropanol-Fällung an. Enthält die Ausgangslösung noch keine Salze, muß ebenfalls 20% einer 5 x Natriumacetatlösung zugegeben werden. Die Lösung wird mit 0,7 Volumen Isopropanol gemischt und nach 15 minütiger Inkubation bei 14000 g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt (vorsichtig, da das Pellet meist sehr locker sitzt) und anschließend 2 x mit 70%igem Ethanol gewaschen.

3.9. Entfernung niedermolekularer Stoffe aus DNA-Lösungen

Niedermolekulare Stoffe können durch verschiedene Methoden aus DNA-Lösungen entfernt werden (Fällung; Gelfiltration; Dialyse usw.).

3.9.1. Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltration können niedermolekulare Stoffe wie Salze, freie Nukleotide, Ethanol usw. aus einem Reaktionsansatz entfernt werden. Eine 1 ml Insulinspritze wurde unten mit einer 45 µm Fritte (Mobicol) verschlossen und anschließend mit einer Sephadex-G50-Suspension (in TE Puffer) gefüllt. Die Spritze wurde in ein Röhrchen (Falcon 352059) gehängt und 10 min zentrifugiert (1000g, RT), um die Flüssigkeit aus der Gelmatrix zu entfernen. Anschließend wurde die Spritze mit der Säule auf ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und die DNA-Lösung aufgetragen (maximal 100 µl). Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 1000g, RT) wurde das Filtrat in dem Reaktionsgefäß aufgefangen.

3.9.2. Dialyse

In dieser Arbeit wurden für die Dialyse Nitrocellulose Membran-Blättchen (Millipore) verwendet, die schwimmend in eine mit dH₂O gefüllte Schale gelegt wurden. Die DNA-Lösung wurde auf die Blättchen getropft und mindestens eine Stunde schwimmend auf der Wasseroberfläche belassen.

Anschließend wurde die DNA vorsichtig abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt.

3.10. Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986)

Mit Hilfe der PCR kann man einen beliebigen kurzen Abschnitt eines DNA-Moleküls selektiv vervielfältigen, vorausgesetzt die Sequenzen an dessen Enden sind bekannt. Gewöhnlich bedient man sich dabei der thermostabilen DNA-Polymerase des Archaeobakteriums *Thermus aquaticus*.

Zunächst wird die doppelsträngige DNA thermisch denaturiert (bei 94°C). Bei der nachfolgenden Abkühlung können an den nun einzelsträngigen DNA-Molekülen die Oligonukleotide (Primer), die zu den Enden der gewünschten Sequenz komplementär sind, hybridisieren. Diese Annealingtemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer. In der anschließenden Synthesephase, knapp unterhalb des Temperaturoptimums der *Taq*-Polymerase (72°C), werden die Oligonukleotide von der Polymerase zu vollständigen komplementären Strängen aufgefüllt. Dieser Temperaturzyklus wird mehrfach durchlaufen, so daß es zu einer Vervielfältigung des gewünschten DNA-Bereiches kommt.

Da bei der PCR bereits geringste Spuren von DNA eine Kontamination verursachen können, ist auf besonders sauberes Arbeiten zu achten. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Wenn viele Reaktionen gleichzeitig durchgeführt wurden, die sich nur in der zu analysierenden DNA oder der jeweiligen Primer unterschieden, wurde ein „Mastermix“ hergestellt, der außer der DNA oder der Primer sämtliche Reagenzien enthielt. Erst nach dem Verteilen dieses „Mixes“ auf die Reaktionsgefäße wurde die zu analysierende DNA oder die gewünschten Primer zugegeben. Das Gesamtvolumen der unterschiedlichen PCR-Reaktionen schwankte zwischen 20 und 50 µl (s. Abschnitt 2.7). Eine Standardreaktion enthielt ~100 ng DNA, je 10 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer, je 0,2 mM der Desoxyribonukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1 U *Taq*-Polymerase und 1 x PCR Puffer. Falls der PCR Puffer noch kein MgCl₂ enthielt, wurde der Reaktion noch 1,5 mM MgCl₂ zugesetzt. Der Ansatz wurde auf das gewünschte Volumen mit aqua bidest aufgefüllt. Um das Verdampfen des Reaktionsgemisches während der einzelnen Zyklusschritte zu verhindern, wurde die Reaktion entweder mit Mineralöl überschichtet oder entsprechende Deckelstreifen (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet. Die Ansätze wurden in einen 94°C vorgeheizten „Thermocycler“ überführt und nach 5 min bei 94°C wurde das entsprechende Temperaturprogramm (s. Abschnitt 2.7) gestartet. Am Ende der PCR wurde noch 7 min bei 72°C inkubiert.

3.10.1. PCR aus Plasmid-DNA

Mit Hilfe dieser PCR sollten klonierte Fragmente einschließlich der Sequenzier-Primer-Abschnitte des Vektors amplifiziert werden. Die zur Vektorsequenz komplementären Primer (s. Tab. 9) lagen noch jenseits der beiden Sequenzier-Primer-Bindungsstellen des Plasmids. Als Ausgangsmaterial diente entweder 1 µl Bakterienlysat der einzelnen Klone (ÜN-Kultur in 200 µl LB + Amp bzw. Kan) oder direkt von der Petrischale gepickte Klone. Nachdem die Spitze mit dem gepickten Klon in den PCR-Ansatz getaucht worden war, wurde sie anschließend noch in die entsprechend beschrifteten

Löcher der Mikrotiterplatte überführt, um die bei der PCR verwendeten Klone jederzeit verfügbar zu haben. Ein Vorteil dieser PCR ist, daß man anhand der Größe des PCR-Produktes schnell erkennen kann, welche Klone das richtige DNA-Fragment enthalten. Weiterhin können viele Klone gleichzeitig analysiert werden, und das PCR-Produkt kann nach entsprechender Reinigung (s. Abschnitt 3.8.1) direkt sequenziert werden. Fast alle in dieser Arbeit klonierten DNA-Fragmente, die später sequenziert werden sollten, wurden auf diese Weise hergestellt.

3.11. DNA-Sequenzierung (Sanger et al., 1977)

3.11.1. Sequenzier-PCR-Ansatz

Bei der Sequenzier Reaktion hybridisiert zunächst ein Sequenzier-Primer mit einer einzelsträngigen DNA-Vorlage. Die DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend vom Primer den restlichen komplementären Strang. Der Reaktionsansatz enthält zusätzlich zu den normalen Nukleotidbausteinen (dNTPs) Didesoxynukleotide (ddNTPs). Diesen dNTP Analoga fehlt die Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoff, weshalb sie zwar an die wachsende Kette angehängt werden, aber keine Phosphodiesterbindung mit einem weiteren Nukleotid eingehen können. Es werden vier basenspezifische Reaktionen parallel durchgeführt. Jede enthält die vier normalen dNTPs und zusätzlich eine geringe Menge von nur einem der vier ddNTP's. Sobald dieses bestimmte ddNTP eingebaut worden ist, wird die Synthese der Kette abgebrochen. Die Kette bricht allerdings nicht sofort bei der ersten komplementären Base des jeweiligen ddNTP's ab, denn das jeweilige normale dNTP ist ebenfalls vorhanden und kann eingebaut werden. Das Ergebnis ist eine Sammlung von Strängen unterschiedlicher Länge, die in einem Reaktionsansatz alle mit demselben ddNTP enden. Nach Denaturierung durch Formamid und Hitze, trennt man die Reaktionsprodukte, die sich in ihrer Länge z.T. nur durch eine Base unterscheiden durch Gelelektrophorese auf. Die Gele enthalten Harnstoff, der die DNA denaturiert und somit die neusynthetisierten Stränge von den Matrizen trennt. Eine Renaturierung wird verhindert, indem die Gelelektrophorese bei Hochspannung und hohen Temperaturen durchgeführt wird. Die aufgetrennten Fragmente wurden mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Primer von einem automatischen Sequenzer (Likor Modell 4000) detektiert.

Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe des "Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP" durchgeführt. Die gesamte Reaktion wurde auf Eis vollzogen. In einer Mikrotiterplatte wurden pro zu analysierender DNA je 4 x 2 µl Reaktionsgemisch vorgelegt, die jeweils ein bestimmtes ddNTP sowie die Sequenase enthielten. Die anschließenden Reaktionen mußten in einem möglichst abgedunkelten Raum durchgeführt werden, da die verwendeten IRD-markierten Sequenzier-Primer lichtempfindlich sind. In einem Master-Mix – spezifisch für die jeweils zu sequenzierende DNA - wurden ~150 ng DNA/kb, 1 pmol IRD-markierter Primer und 0,25 µl DMSO vermischt und anschließend auf 20 µl mit aqua dest aufgefüllt. Je 5 µl dieses Master-Mixes wurden dann in die jeweiligen vier vorgelegten ddNTP-Mixe pipettiert und durch Pipettieren gut gemischt. Die Zugabe von 10 µl PCR-Öl verhinderte das

Verdampfen des Reaktionsgemisches bei der anschließenden PCR-Reaktion (s. Tab. 11). Die PCR-Reaktion wurde mit 5 µl Stop-Formamid Puffer beendet. Anschließend wurde 1 µl dieser Lösung auf ein 4%iges denaturierendes Polyacrylamidgel (s. Abschnitt 3.5.4) aufgetragen.

Bei den Sequenzier-Primern handelte es sich entweder um die allgemein üblichen - wie M13for/rev oder SP6/T7 - oder aber (falls der Vektor keine entsprechenden „Seiten“ enthielt) um selbst festgelegte Oligonukleotide, die komplementär zur Vektor-Sequenz waren. Teilweise wurden auch Sequenzier-Primer hergestellt, die komplementär zu bestimmten PCR-Primer-Anhängen waren (Poly-T-Tag/VecPrim). Die Primer waren entweder IRD 700 oder 800 markiert. Theoretisch konnten beide Primer in einem Reaktionsansatz pipettiert werden, aber die Erfahrung zeigte, daß „700“ und „800“ getrennt pipettierte Ansätze bessere Ergebnisse erzielten.

3.11.2. Automatisierte Sequenzanalyse

Die Gelelektrophorese (s. Abschnitt 3.5.4) sowie die Messung der Absorption der IRD-markierten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des LICOR Sequenzers. Dieser konnte mittels zweier Laser die Absorption bei zwei verschiedenen Wellenlängen (700 nm und 800 nm) messen. Das Lesen der einzelnen Gelbanden erfolgte mit Hilfe des Programmes Base ImagIR auf OS2-Ebene.

3.12. Herstellung von cDNA

Die Reverse Transkriptase kann einzelsträngige mRNA in cDNA (complementary DNA) umschreiben. Mit Hilfe eines Oligo(dT)Primers, der komplementär zum Poly(A)Schwanz der mRNA ist, synthetisiert das Enzym einen DNA-Strang. Dieses RNA/DNA Hybrid kann man bereits für PCR-Analysen einsetzen. Für die Ligation mit einem Vektor oder einem anderen doppelsträngigen Adaptor muß ein zweiter Strang synthetisiert werden. Dazu kann man den RNA-Anteil des Hybridmoleküls mit Ribonuklease H teilweise abbauen. Die verbleibenden RNA-Fragmente dienen dann als Primer für die DNA-Polymerase, die den zweiten Strang der cDNA aufbaut. Als Produkt entsteht ein doppelsträngiges DNA-Fragment.

Beim Arbeiten mit RNA ist besonders darauf zu achten, daß der Arbeitsplatz, die Pipetten und alle verwendeten Materialien RNase-frei sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur einzelsträngige cDNA hergestellt. Für die cDNA-Synthese wurde das Kit SuperScript™II von Gibco-BRL in modifizierter Form (selbstgenerierter Oligo (dT) Primer) verwendet. 1-5 µg Gesamt-RNA wurden mit 100 pmol Oligo-dT-SMART -Primer (s. Tab. 13) versetzt und auf 12 µl mit nukleasefreiem H₂O aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Danach wurden 4 µl 5 x First-Strand-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP Gemisch hinzupipettiert, gemischt und für 2 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl Reverse Transkriptase (SuperScript II) zugegeben, vorsichtig gemischt und 50 min bei 42°C die Synthese der cDNA ermöglicht. Danach wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70°C (15 min) inaktiviert. Das entstandene cDNA/RNA Hybrid konnte für PCR-Amplifikationen verwendet werden.

3.13. Hybridisierung

Bei dieser Methode hybridisiert eine markierte einzelsträngige Sonde mit den komplementären Basen der zu analysierenden ebenfalls einzelsträngigen DNA oder RNA.

3.13.1. Radioaktive Markierung

3.13.1.1. Markierung der Sonde (nach Anleitung von Amersham, modifiziert)

Verwendet wurde das Megaprime-Kit von Amersham, das auf der Methode von Feinberg und Vogelstein (Feinberg and Vogelstein, 1984) beruht. Oligonukleotide (Nonamere) mit zufälliger Sequenz hybridisieren mit der zu markierenden DNA, die als einzelsträngige Matrize vorliegt. Von diesen Primern aus synthetisiert das Klenow-Fragment der E.coli Polymerase I den zweiten komplementären Strang, wobei neben den normalen Nukleotiden auch radioaktiv markierte Nukleotide eingebaut werden.

20-100 ng DNA und 5 µl Primer in einem Gesamtvolumen von 28 µl wurden für 8 min gekocht und anschließend direkt auf Eis gegeben. Anschließend wurde hinter einem Plexiglasschirm 10 µl Reaktionspuffer, 5 µl α [³²P]dCTP und 2 µl Klenow-Enzym zugegeben. Nachdem die Probe gut gemischt und kurz zentrifugiert worden war, wurde sie für 10 min bei 37°C inkubiert und dann mit 5 µl Stop-Puffer (0,5 M EDTA) versetzt. Da es sich nur um ein kleines Reaktionsvolumen handelte, wurden noch 60 µl E.coli DNA (1 µg / ml) zugegeben, um Verluste durch Adsorption an der Gefäßwand zu verhindern. Nach kurzem Mischen bei RT, wurden 0,8 µl dieses Ansatzes auf ein DE81 Papier pipettiert. Mit dem restlichen Volumen wurde eine Gelfiltration durchgeführt, um die nicht eingebauten Nukleotide zu entfernen (s. Abschnitt 3.9.1). Aus dem Filtrat wurden erneut 0,8 µl auf ein DE81 Papierchen pipettiert. Um die Einbaurate zu bestimmen, wurde die Radioaktivität beider Papiere in einem LKB Counter bestimmt. Bei neuer Aktivität erwartet man einen Vollwert von ~300 000 cpm. Nach der Gelfiltration sollte der Wert nur noch 1000 cpm/ng eingesetzter DNA betragen. War der Einbau deutlich schlechter, wurde die Sonde verworfen.

3.13.1.2. Radioaktive Hybridisierung

Bei der Hybridisierung wurden zunächst 7 ml Hybridisierungslösung (Church and Gilbert, 1984) (für RNA-dot Blots: Express-Hybrid von Clontech) in eine Hybridisierungsröhre pipettiert. Die Membran wurde um eine 10 ml Pipette gewickelt und in die Röhre gesteckt. Anschließend wurde die Membran in der Röhre so abgewickelt, daß sie blasenfrei an der Wand haften blieb. Die Röhre wurde mindestens 30 min im Hybridisierungsöfen (68°C) inkubiert. Anschließend wurden 100 µl denaturierte Block-Lösung zugegeben und nochmals kurz für ca. 15 min inkubiert. Wurden PAC-Blots verwendet, wurde zusätzlich 30 µl PAC-Block (leere PAC-Vektoren ca. 1 µg / µl) zugegeben und für 2 h vorhybridisiert.

Die markierte Sonde (s. Abschnitt 3.13.1.1) wurde ca. 1 h vor Ablauf der Vorhybridisierung für 8 min gekocht und dann in ein 2 ml Schraubröhrchen mit 1 ml Hybridisierungspuffer überführt. Das 2 ml Röhrchen mit der Sonde wurde ebenfalls für 30 min im Hybridisierungsöfen bei 68°C

inkubiert. Anschließend wurde die vorhybridisierte Sonde in die Hybridisierungsröhre pipettiert. Die Röhre wurde über Nacht bei 68°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die radioaktive Hybridisierungslösung aus der Röhre in den stark radioaktiven Abfall entsorgt. Die Membran wurde noch in der Röhre für 10 min mit 20 ml Waschlösung (2 x SSC, 1% SDS) bei 68°C rotierend gewaschen. Dann wurde die Membran entnommen und unter Schütteln 15 min mit 300 ml Waschlösung (1 x SSC, 1% SDS) in einer Wanne bei 68°C gewaschen. Mit dem Handmonitor wurde die verbleibende Aktivität auf dem Blot gemessen. War die Aktivität nur unwesentlich höher als die Umgebungsstrahlung, wurde die Waschprozedur beendet. War die Aktivität noch wesentlich höher, wurde mit den folgenden Lösungen in der angegebenen Reihenfolge gewaschen: 0,5 x SSC, 1% SDS; 0,2 x SSC, 1% SDS; 0,1 x SSC, 1% SDS.

3.13.1.3. Autoradiographie

Die gewaschene Membran wurde auf eine Kopierfolie gelegt, die auf einem entsprechend zugeschnittenen Filterpapier lag. Anschließend wurde der Blot mit Frischhaltefolie luftblasenfrei abgedeckt, die so großzügig geschnitten war, daß man damit das gesamte Blot/Kopierfolie/Filterpapier-Konstrukt umwickeln konnte. Das Filterpapier saugt überschüssige Flüssigkeit auf, während die Frischhaltefolie das Austrocknen der Membran verhindert, da die anhybridisierten Sonden beim Austrocknen fest an die Membran binden und somit nicht mehr abgewaschen werden können.

Die eingewickelte Membran wurde beschriftet, und auf der Rückseite der Schrift wurde ein Phosphoreszenzstreifen angebracht, damit die Beschriftung später ebenfalls auf den Film belichtet wurde. Der Blot wurde mit der DNA-Seite auf eine MS-Verstärkerfolie in eine Filmkassette gelegt und für 20 min lichtdicht verschlossen, damit der Phosphoreszenzstreifen nicht zu stark phosphoreszierte. Anschließend wurde in der Dunkelkammer ein Film zwischen Membran und Verstärkerfolie gelegt und die Kassette bei -80°C je nach Signalintensität zwischen mehreren Stunden und drei Wochen exponiert.

3.13.2. Nichtradioaktive Markierung

3.13.2.1. Markierung der Sonde

Verwendet wurde das ECL-Kit von Amersham. Bei dieser Methode wird die denaturierte einzelsträngige DNA mit positiv geladenen Komplexen der Meerettich-Peroxidase markiert. Durch Zugabe von Glutaraldehyd wird das Enzym kovalent mit der DNA verbunden.

Mindestens 100 ng DNA in 10 µl H₂O wurden für 5 min bei 94°C denaturiert und auf Eis 5 min gekühlt. 10 µl des Labelling-Reagenzes (Peroxidase-Komplexe) wurden hinzupittiert und gemischt. Anschließend wurden 10 µl Glutaraldehyd-Lösung zugegeben und ebenfalls gründlich vermischt. Die Probe wurde bei 37°C 10 min inkubiert und anschließend in 1 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen. Sofort danach wurde sie in die Hybridisierungsröhre mit der vorhybridisierten Membran überführt (s. Abschnitt 3.13.2.2).

3.13.2.2. Nichtradioaktive Hybridisierung

Der ECL-Gold Hybridisierungspuffer wurde mit NaCl (0,5 mol/Liter) versetzt, 5% Blocking-Reagenz (Amersham) zugegeben und anschließend eine Stunde gerührt. Der Hybridisierungspuffer wurde für eine halbe Stunde auf 42°C vorgeheizt und ~5ml dieser Lösung in die Hybridisierungsröhre gegeben. Die Membran wurde wie unter Abschnitt 3.13.1.2 in die Röhre transferiert und mindestens 15 min vorhybridisiert, bevor die markierte Sonde zugegeben wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung verworfen, die Membran aus der Röhre entnommen und 2 x 10 min bei 55°C in einer Wanne mit 0,5 x SSC (0,4%SDS) gewaschen. Danach wurde die Membran noch zwei mal mit 2 x SSC für 5 min gewaschen.

3.13.2.3. Detektion

Das ECL-Kit enthält 2 Detektionslösungen, von denen die eine Wasserstoffperoxid und die andere Luminol beinhaltet. Wasserstoffperoxid, das Substrat für die an die DNA gebundene Peroxidase wird reduziert, während gleichzeitig das Luminol oxidiert wird, wodurch eine blaue Lichtemission erzeugt wird, die auf einem blausensitiven Film sichtbar gemacht werden kann.

Die gewaschene Membran wurde auf eine Kopierfolie gelegt und je nach Größe der Membran wurden ca. 4-7 ml Lösung 1 und 2 direkt vor Gebrauch zusammenpipettiert und auf der Membran verteilt. Nach 1 min wurde die Detektionslösung entfernt, die Membran wie unter Abschnitt 3.13.1.3 verpackt und mit der DNA-Seite auf einen Film gelegt. Der Film wurde in einer Kassette zwischen 2 min und 1,5 h exponiert und anschließend entwickelt.

3.14. Transformation

3.14.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen

5 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie eines E.coli Stammes über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Diese Vorkultur wurde am nächsten Tag in 1 Liter SOB-Medium überführt und solange inkubiert bis eine OD_{550nm} von 0,6 erreicht wurde. Die Bakteriensuspension wurde in vorgekühlte Zentrifugen-Becher überführt und bei 2500 rpm 10 min in einer Kühlzentrifuge (4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 150-200 ml gekühltem Glycerin (10%) resuspendiert und erneut bei 4°C 10 min zentrifugiert (4500 rpm). Dieser Waschschrift wurde ein zweites mal durchgeführt. Der Überstand wurde dekantiert, wobei ca. 30-50 ml in jedem Becher zurückbehalten wurden. Eine Zentrifugation bei 6500 rpm (4°C, 10 min) folgte. Anschließend wurde der Überstand vollständig entfernt. Die Pellets wurden in ca. 15 ml 10%igem Glycerin (gekühlt) vereinigt und in einem kleineren Gefäß bei 8500 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 400-600 µl gekühltem Glycerin (50%) aufgenommen und in gekühlte Reaktionsgefäße á 25-50 µl (entsprechend eines Transformationsansatzes) verteilt. Wenn möglich, wurden die kompetenten Zellen noch am gleichen Tag transformiert, da die Transformationseffizienz von frischen Zellen um das 10 fache höher ist als bei schon einmal eingefrorenen Zellen. Nicht

benötigte elektrokompetente Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

3.14.2. Transformation

3.14.2.1. Elektroporation

Bei der Elektroporation werden die Zellen einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt, der vorübergehend Poren in der Zellmembran entstehen läßt, so daß die DNA-Moleküle in das Zellinnere gelangen können. Bei dieser Methode ist es notwendig, daß Salze aus der zu transformierenden DNA-Lösung entfernt werden, da es sonst zu einem "Kurzschluß" kommen würde, der die Transformationseffizienz stark vermindert. Dies kann durch Fällung, Gelfiltration, Dialyse usw. erreicht werden.

25-50 μl kompetente Zellen (tiefgefrorene Zellen wurden auf Eis aufgetaut) wurden mit 1 ng bis 1 μg zu transformierender DNA vermischt und in eine E-Küvette (2 mm, Biozym Diagnostik, Oldendorf) pipettiert. Die außen trockene Küvette wurde zwischen die beiden Elektroden des Elektroporationsgerätes (BioRad) gesetzt und der Impuls mit 200 bzw. 400 Ω , 2,5 kV und 25 μF gegeben. Anschließend wurde 1 ml SOC in die Küvette pipettiert und danach das gesamte Volumen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, das bei 37°C ca. 1 h inkubiert wurde. Nach der Inkubationszeit wurden 100 μl Bakterienlysate auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.14.2.2. Hitzeschock

Bei dieser Methode werden die entsprechenden kompetenten Zellen einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt, der die Zellmembran vorübergehend durchlässig für DNA-Moleküle werden läßt.

Angewendet wurde diese Methode bei den TOP10 bzw. TOP10F' Zellen von Invitrogen. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 2 μl DNA-Lösung (TOPO-TA-Vektor von Invitrogen mit entsprechendem DNA-Fragment, s. Abschnitt 3.17.2) hinzupipettiert und 5-30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 sek einer Temperatur von 42°C (Wasserbad) ausgesetzt und anschließend sofort wieder auf Eis überführt. Anschließend wurden 250 μl SOC zugefügt und 1 h bei 37°C inkubiert. Von dem Bakterienlysate wurden 10-100 μl auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

3.14.3. Dauerkulturen

300 μl einer ÜN-Bakterienkultur wurden zu 600 μl einer 30%igen Glycerinlösung pipettiert und bei -80°C gelagert.

3.14.4. Animpfen

Um größere Bakterienkulturen herzustellen, wurden zunächst 2-5 ml Vorkulturen angeimpft. Mit einer Impföse wurde entweder eine Kolonie von einer LB-Platte oder Bakterienlysate aus einer Dauerkultur in LB oder SOC überführt (falls erforderlich mit entsprechendem Antibiotikum). Die

Vorkultur wurde bei 37°C ÜN inkubiert und am nächsten Tag in das gewünschte größere LB- oder SOC-Volumen mit entsprechendem Antibiotikum überführt.

3.15. Plasmidisolierung

Die in Bakterien eingeführten Plasmide werden repliziert und lassen sich getrennt von der genomischen E.coli DNA isolieren.

3.15.1. (Mini-) Plasmid-Präparation

2 ml einer ÜN-Kultur wurden in einem Eppendorfgesäß bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl Plasmidisolierungspuffer 1 resuspendiert und anschließend 300 µl Plasmidisolierungspuffer 2 zugegeben. Es wurde vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die dadurch lysierten Zellen wurden mit 300 µl Plasmidisolierungspuffer 3 vermischt und 15 min auf Eis inkubiert, was zur Fällung der Proteine und der genomischen DNA führte. Die ausgefallenen Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 14000 rpm abgetrennt und der Überstand mit 0,7 Vol Isopropanol versetzt. Es folgte eine Zentrifugation des Überstandes bei 14000 rpm (30 min) und das DNA-Pellet wurde anschließend in 100 µl TRIS (0,2M)/EDTA (0,05 M) und 3 µl RNase A (40 µg/ml) aufgenommen. Das Gemisch wurde für 20 min bei 37°C inkubiert und danach eine Ethanol-Fällung (s. Abschnitt 3.8.1) durchgeführt. Das Pellet wurde in ca. 30 µl H₂O aufgenommen.

3.15.2. (Midi-) Plasmid-Präparation

50 ml einer ÜN-Kultur mit Antibiotikum wurden am nächsten Morgen mit 4 ml Plasmidisolierungspuffer 1 versetzt und gut gemischt. Anschließend wurden 4 ml Plasmidisolierungspuffer 2 zugegeben und vorsichtig hin und her gekippt. Es folgte die Zugabe von 4 ml Plasmidisolierungspuffer 3 und eine Inkubation von 20 min auf Eis. Danach wurde 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert, um die Proteine abzutrennen. In der Zwischenzeit wurde eine 20 ml Spritze mit einer ausgestanzten Fritte (90 µm, Mobicol) passender Größe am unteren Ende verschlossen. Der Überstand wurde auf die Fritte gegeben, um die restlichen Proteine zu entfernen und das Lysat mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt. Anschließend wurden 280 µl TRIS (0,2M)/EDTA (0,05 M) und 30 µl RNase A (40 µg/ml) zugegeben und 20 min bei 37°C inkubiert. Nachdem 62 µl 8,5 M Ammoniumacetat zugegeben worden waren, wurde 10 min auf Eis inkubiert und danach 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 744 µl Ethanol versetzt, für 15 min bei -80°C gelagert und wieder bei 14000 rpm 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl TE aufgenommen.

Für Medi-PAC-Präparationen wurde eine 20 ml ÜN-Kultur mit Kanamycin angesetzt und am nächsten Morgen mit 20 µl IPTG (1 M) induziert. Anschließend wurden 30 ml LB mit Kanamycin zugegeben und nochmals für 2 h bei 37°C inkubiert. Die nachfolgenden Schritte wurden wie oben

beschrieben durchgeführt.

Für die präparative Gewinnung besonders sauberer Plasmidmengen wurde das JETstar Protokoll von Genomed durchgeführt. 30 ml einer ÜN-Kultur wurden für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde den Angaben des Herstellers entsprechend in den Lösungen E1, E2 und E3 resuspendiert und dann bei 20°C für 10 min (15000 rpm) zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde an eine mit Puffer E4 äquilibrierte Säule (Genomed) gebunden, mit Puffer E5 gewaschen und mit Lösung E6 eluiert. Das Lysat wurde mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt (s. Abschnitt 3.8.2), 2 x mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

3.16. Restriktionsenzymverdau

Restriktionsendonukleasen schneiden die DNA an spezifischen meist palindromischen Sequenzen, die häufig aus 4-6 Basenpaaren bestehen. Dabei entstehen entweder glatte oder überhängende Enden. Dadurch wird die Ligation mit anderen Fragmenten (meist Vektoren) erleichtert, die ebenfalls mit diesem Enzym geschnitten wurden.

Die zu spaltende DNA wurde mit einem Zehntel des Endvolumens des vom Hersteller mitgelieferten 10fach konzentrierten Puffers gemischt. Nach Zugabe der berechneten Menge Wasser wurden doppelt so viele Units Restriktionsenzym zugegeben wie µg DNA geschnitten werden sollten, mindestens aber 1µl. Allerdings wurde darauf geachtet, daß die Glycerin-Endkonzentration (Enzyme befinden sich in Glycerin) nicht mehr als 10% betrug, da es sonst zu unspezifischen Spaltungen kommen kann. Die Lösung wurde gründlich gemischt und 2–4 h bei der enzyspezifischen Temperatur inkubiert. Danach wurde das Enzym inaktiviert, indem es auf eine vom Hersteller angegebene Temperatur erhitzt wurde. Einige Enzyme wurden auch durch 1 µl Proteinase K (20 ng/µl) inaktiviert (10 min, 50°C). Die Proteinase K wiederum konnte durch ein Zehntel des Endvolumens mit PMSF (10 mM) blockiert werden (15 min, RT). Nach einer Gelfiltration (G-50-Säule) erhielt man dann die gereinigte geschnittene DNA.

Wurden die Vektoren mit Enzymen geschnitten, die glatte Enden erzeugen, wurden PCR-Produkte vor der Ligation "aufgefüllt", d.h. evt. vorliegende einzelsträngige Basen an den Fragmentenden wurden mit den komplementären Basen hybridisiert. Dafür wurde die DNA (0,1-4 µg) mit 2 µl dNTP (10 x), einem Zehntel des Endvolumens Filling-In-Puffer (USB) und 1-5 U Klenow-Enzym versehen (20 µl Ansatz). Zum Auffüllen der Basen wurde der Ansatz 15 min bei 30°C inkubiert und anschließend das Klenow-Enzym bei 75°C (15 min) inaktiviert. Noch einfacher ist es eine Polymerase zu benutzen, die glatte Enden erzeugt wie z.B. die Pyrobest von TaKaRa.

3.17. Ligation

3.17.1. Ligation mit T4-Ligase

Die T4-DNA-Ligase kann DNA-Fragmente miteinander verbinden. Meist wird ein DNA-Fragment mit einem Vektor verbunden. Nach dem Verdau der beiden Moleküle in getrennten Ansätzen, werden sie in einem Ligationsansatz vereint. Die jeweiligen Enden lagern sich aneinander und die Ligase bildet die fehlende 3'-5'-Phosphodiesterbindung aus.

Gleiche Mengen Vektor und Fragment (ca. je 100–300 ng) wurden in einem 10 µl Reaktionsansatz mit 1 µl 10 x Ligasepuffer (Boehringer Mannheim), 1 µl ATP (10 mM) und 1 µl T4-Ligase (1 U/µl, Boehringer Mannheim) aufgenommen. Anschließend wurde mindestens 4 h bei 16°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei der Ligation von zwei PCR-Produkten muß darauf geachtet werden, daß die Primer am 5' Ende phosphoryliert sind.

3.17.2. Ligation ohne Ligase

Bei dieser Methode wurde das TOPO-TA Kloning-Kit (Invitrogen) verwendet. Der Plasmid-Vektor (pCR[®]II TOPO[®]) liegt in linearisierter Form vor und besitzt einzelne 3' Thymidin (T) Überhänge, die kovalent mit der Topoisomerase I verbunden sind. Viele Taq-Polymerasen haben die Eigenschaft ein einzelnes Desoxyadenosin (A) an die 3' Enden von PCR-Produkten zu hängen. Die Ligationseigenschaft der Topoisomerase I ligiert das PCR-Produkt mit dem Vektor anhand dieser beiden Überhänge ohne Zugabe von Ligase und auf eine sehr effiziente Weise. Bei dieser Methode ist allerdings zu beachten, daß nicht alle Taq-Polymerasen A-Überhänge bilden.

Zu 0,5-4 µl PCR-Produkt wurde 1 µl verdünnte Salzlösung (Invitrogen) zugegeben und mit H₂O auf ein Endvolumen von 5 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 1 µl Vektor hinzupipettiert, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Transformation erfolgte wie unter Abschnitt 3.14.2.2 beschrieben.

3.18. Southern Blotting (Southern, 1975) (modifiziert)

Bei dieser Methode wird DNA, die durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt wurde, auf eine Nitrocellulose- oder Nylonmembran übertragen. Diese kann dann für spätere Hybridisierungsexperimente verwendet werden.

3.18.1. Southern-Blot, gravitationsunterstützt

Diese Methode wurde bei Agarosegelen verwendet. Nach dem Fotografieren wurde das Gel 10 min in Depurinierungspuffer geschüttelt und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Nachfolgend wurde das Gel 45 min mit Denaturierungspuffer geschüttelt, wobei der Puffer nach 15 min gewechselt wurde. Die Nylonmembran wurde entsprechend der Größe des Gels zurechtgeschnitten, beschriftet und zunächst in bidestilliertes Wasser gelegt. Anschließend wurde die Membran für 20 min (RT) in 10 x SSC überführt. Abschließend wurde das Gel für 10 min in 20 x SSC geschüttelt und danach mit der Oberseite nach unten auf eine Glasplatte gelegt. Das Gel

wurde nochmals mit 20 x SSC angefeuchtet und die Membran mit einer 10 ml Pipette auf dem Gel luftblasenfrei ausgewalzt. Auf die Membran wurden drei Lagen Filterpapier gelegt (je 3 mm), auf die dann wiederum ein Stapel Papiertücher gelagert wurde. Der gesamte Aufbau wurde mit einer zweiten Glasplatte abgeschlossen, vorsichtig umgedreht und mit einem kleinem Gewicht (~500 g) obenauf über Nacht so belassen. Durch die Gravitation und durch die Saugkraft der Filtertücher wandert die Flüssigkeit aus dem Gel durch die Membran in die Filter- und Papiertücher hinein und nimmt dabei die DNA mit, die allerdings die Membran nicht durchdringen kann und somit dort haften bleibt. Am nächsten Tag wurde die Membran in 2 x SSC gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Wurde eine ungeladene Membran verwendet, mußte die DNA durch 10 sek Belichtung mit UV (300 nm) und anschließendes Backen (40 min 80°C) an die Membran gebunden werden. Bei positiv geladenen Membranen war dieser letzte Schritt nicht erforderlich, da die negativ geladene DNA von allein an der Membran haften blieb.

3.18.2. Southern-Blot, spannungsunterstützt

Bei Polyacrylamid-Gelen wurde für das Southern-Blotting ein Elektrobloetter (Biometra) eingesetzt. Das Gel wurde für 10 min in 1 x TE gelagert. Sechs Lagen Filterpapier und die Membran wurden ebenfalls in 1 x TE getränkt. Auf die Graphitanode der Apparatur wurden 3 Lagen Filterpapier gelegt, die entsprechend der Größe der Graphitfläche zurechtgeschnitten worden waren. Danach wurde die Membran (Gelgröße) mit einer 10 ml Pipette luftblasenfrei ausgewalzt und das Gel ebenfalls luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Anschließend folgten wieder drei Lagen Filterpapier. Der ganze Aufbau mußte gut durchfeuchtet sein, um einen Stromfluß in allen Bereichen zu gewährleisten. Der Deckel mit der Graphitkathode wurde durch gleichmäßiges festes Drücken aufgesetzt und der Strom mit einer Leistung von ~10 Watt für 30 min eingestellt. Die negativ geladene DNA wandert in Richtung Anode und bleibt auf dem Weg dorthin an der Membran haften. Die Membran wurde in 2 x SSC gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Ungeladene Membranen wurden wie unter Abschnitt 3.18.1 behandelt.

3.19. *In-situ*-Hybridisierung

Die *In-situ*-Hybridisierung ist eine Methode, mit der man Nukleinsäuresequenzen spezifisch in Geweben, Zellen und Zellkernen sichtbar machen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine RNA:RNA *In-situ*-Hybridisierung mit Gewebeschnitten durchgeführt. Die Sonden wurden im Institut für Immunogenetik vorbereitet, während die Hybridisierung in der Abteilung für Pathologie im Universitätskrankenhaus Eppendorf (Hamburg) unter der Leitung von Dr. Hermann Herbst durchgeführt wurde. Die Hybridisierung wurde entweder von den dortigen Mitarbeitern ausgeführt oder von mir im Rahmen eines Gastaufenthalts (s. Abschnitt 4.2.3).

Für eine RNA:RNA-Hybridisierung ist es von essentieller Bedeutung, daß alle Materialien und verwendeten Geräte RNase frei sind. Alle verwendeten Glasgeräte wurden daher vor Verwendung 6 h bei 250°C gebacken. Die benötigten Lösungen wurden mit 0,1% DEPC-H₂O in gebackenen Flaschen angesetzt.

3.19.1. Herstellung von einzelsträngigen RNA-Sonden

Zur Herstellung der RNA-Sonden wurde die fragliche Sequenz in einen Vektor eingebaut, der Transkriptionsstartpunkte für RNA-Polymerasen von Bakteriophagen (z.B. SP6 oder T7) enthielt. Das klonierte Fragment wurde sequenziert, um den korrekten Einbau zu verifizieren und um die Richtung des Gens zu ermitteln. Anschließend wurde das rekombinierte Plasmid linearisiert, indem ein Restriktionsenzym gewählt wurde, das nur am 5' Ende schneidet. Dann wurde die anti-Sinn-Sonde hergestellt - ausgehend vom Promotor am 3' Ende. Als Negativkontrolle wurde die Sinn-Sonde generiert, indem am 3' Ende geschnitten und am 5' Ende synthetisiert wurde. Die jeweils korrekte Linearisierung wurde durch ein Agarose-Gel überprüft.

Für die *in vitro* Transkription (alle Schritte auf Eis) wurden 1 µl linearisiertes Plasmid (1 µg/µl), 0,5 µl DTT (100 mM), 1 µl 10 x Transkriptionspuffer (GIBCO-BRL), 1 µl rNTPs (ACG, jeweils 10 mM), 0,5 µl RNasin (40000 U/ml) und 5 µl ³⁵S-UTP miteinander vermischt und anschließend zentrifugiert. Danach wurde 1 µl RNA-Polymerase (T7- oder SP6-Polymerase, abhängig von der Sinn- oder anti-Sinn Orientierung des DNA-Fragmentes) zugefügt. Dabei ist zu beachten, daß nur sehr vorsichtig gemischt werden darf, da RNA-Polymerasen sehr empfindlich gegenüber mechanischer Beanspruchung sind. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend nochmals 0,5 µl der entsprechenden RNA-Polymerase hinzupipettiert. Nach einer weiteren Inkubation von 30 min bei 37°C wurden 5 µl Hefe-tRNA (50 mg/ml, Kofällner), 0,5 µl RNasin und 1 µl DNase hinzugefügt und nochmals 10 min (37°C) inkubiert. Danach wurden 73 µl DEPC-Wasser, 10 µl Na-Acetat (3 M, pH6) und 100 µl Phenol-Chloroformgemisch (Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol, 25:24:1; frisch angesetzt) zugegeben. Anschließend wurde vorsichtig bei geringer Stufe gevortext und für 2 min bei ca. 10000 rpm zentrifugiert, um die beiden Phasen zu trennen. Es wurden je 160 µl 96%iges Ethanol in neue Röhrchen vorgelegt und 80 µl aus der Oberphase des Phenolansatzes hinzupipettiert. Nach 2 h bei -70°C wurde der Ansatz bei 4°C 30 min (14000 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig von dem RNA-Pellet entfernt. Nach Waschen mit 70%igem Ethanol wurde das Präzipitat 15 min bei RT getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 5 µl DTT (100 mM) und 45 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

War die Sonde größer als 300 bp wurde eine alkalische Hydrolyse durchgeführt, um kleine RNA-Fragmente zu erhalten, die besser in das Gewebe eindringen können. Dazu wurde das Sondenvolumen und der Hydrolysepuffer 1:1 vermischt. Der Ansatz wurde bei 60°C für 42-50 min inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich nach der gewünschten Transkriptlänge (150 bp optimal) und wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$t = \frac{L_0 - L_f}{k \times L_0 \times L_f}$$

t = Hydrolysezeit
 L₀ = Anfangslänge des RNA-Transkripts
 L_f = Endlänge des RNA-Transkripts
 k = 0,11 kb⁻¹ x min⁻¹

Die alkalische Hydrolyse wurde mit 100 µl Stoppuffer beendet. Es folgte eine Ethanolpräzipitation und das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 30 µl 10 mM DTT aufgenommen. Für die Messung des ³⁵S-Einbaus wurden 0,5 µl der markierten Sonde auf ein Filterpapier (Whatman GF/C Glasfaserfilter) getropft und getrocknet. Die Filterstückchen wurden in einem Flüssigkeitsszintillationsmeßgerät (Beckmann) gemessen. Überstiegen die cpm mehr als 2 Millionen, wurde das Pellet nochmals gewaschen. Wurde die fertige Sonde nicht am gleichen Tag verwendet, konnte sie bei -80°C gelagert werden.

3.19.2. Parrafinsschnitte

Von den verschiedenen Gewebestückchen, die in Paraffin eingebettet waren, wurden mit Hilfe eines Mikrotoms ca. 30 µm dicke Schnitte angefertigt. Die aufgefangenen Schnitte wurden in einem Heizwasserbad (37°C, DEPC-Wasser) gesammelt und entfaltet. Anschließend wurden die Schnitte auf APES beschichtete Objektträger (Super Frost */Plus) aufgebracht und über Nacht bei 37°C getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten in gebackene Küvetten einsortiert und mindestens 30 min bei RT in Xylol gebadet (besser über Nacht). Anschließend wurden sie für 10 min in Aceton (RT) überführt. Danach folgte zur Hydrierung der Schnitte eine absteigende Alkoholreihe. Dafür wurden die Objektträger je 2 min in 100%igem, 90%igem, 70%igem und 30%igem Ethanol (angesetzt mit DEPC-Wasser) gebadet. Es folgte ein Waschschrift mit 1 x PBS für 10 min bei RT.

Um basische Proteine zu denaturieren wurden die Objektträger 20 min in 0,2 N HCL gespült (bei RT) und anschließend 2 x für 2 min mit 1 x PBS gewaschen. Weiterhin wurden störende Proteine durch einen Pronase-Verdau entfernt. 100 µl Pronase (0,25 mg/ml) wurden in 100 ml 1 x PBS (pH 7,2) überführt und die Schnitte für 10 min bei RT in dieser Lösung gebadet. Eine Inkubation für 30 sec mit 0,1 M Glycin (in 1 x PBS) stoppte die Enzymaktivität. Anschließend wurde wieder 2 x kurz mit PBS gespült. Zur Fixierung der Schnitte erfolgte eine Inkubation mit eiskaltem Paraformaldehyd (4%)/PBS (20 min, pH 7). Danach wurden die Schnitte erneut 3 x mit PBS gewaschen. Um eine unspezifische Bindung der Sonde zu verhindern, wurden positiv geladene Moleküle durch Acetylierung neutralisiert. Zu 0,1 M Triethanolamin wurden kurz vor Gebrauch 0,25% (v:v) Essigsäureanhydrid zugegeben. Die Schnitte wurden für 5-7 min in dieser Lösung inkubiert und erneut 5 x mit PBS gewaschen. Es folgte eine Dehydrierung der Gewebeschnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Dafür wurden die Schnitte je 1 min in 30%igem, 70%igem, 90%igem und 100%igem Ethanol gespült. Die nun fertig präparierten Objektträger wurden für 1-2 h an der Luft getrocknet und in die Hybridisierungskammern zur weiteren Verarbeitung einsortiert.

3.19.3. Hybridisierung

Es wurden mindestens drei Objektträger mit derselben positiven anti-Sinn-Sonde hybridisiert, so daß Entwicklungszeiten mit mindestens drei unterschiedlichen Expositionszeiten möglich waren. Gleichzeitig wurde mindestens eine Sinn-Sonde als Negativkontrolle verwendet, die nach der als optimal erachteten Expositionszeit entwickelt wurde.

Für die Hybridisierung eines Objektträgers wurden 200000 cpm von der Transkriptlösung benötigt, die in 5 µl Sondenmix aufgenommen wurden. Der Sondenmix bestand bei einem Gesamtansatz von 50 µl (10 Objektträger) aus 25 µl Formamid, 5 µl 0,1 M DTT und einer entsprechende Menge an Transkriptlösung (10 x 200000 cpm). Der Ansatz wurde mit DEPC-Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Zur bereits fertigen Hybridisierungslösung (s. Abschnitt 2.5) wurde kurz vor Gebrauch die entsprechende Menge an frischem Formamid hinzupipettiert und der Ansatz bis zum Gebrauch auf 50°C erwärmt. Der Sondenmix wurde für 30 sec bei 80°C denaturiert. Anschließend wurde die Sonde mit der Hybridisierungslösung in einem Verhältnis von 1:4 vermischt, niedertourig gevortext und kurz zentrifugiert. 25 µl dieses Gemisches wurden luftblasenfrei auf einen Schnitt pipettiert und mit silikonisierten Deckgläschen (s. Abschnitt 3.19.4) abgedeckt. Die Hybridisierungskammern mit den Objektträger wurden in Plastiktüten verstaut. In die Tüten wurde zusätzlich Zellstoff gelegt, das mit 50%igem nicht deionisierten Formamid (DEPC-Wasser) getränkt war. Um die Schnitte feucht zu halten, wurde die Plastikfolie luftdicht verschlossen. Die Inkubation erfolgte im Wärmeschrank bei 50°C über Nacht.

3.19.4. Silikonisierung von Deckgläschen

Die Deckgläschen wurden in vertikale Küvetten einsortiert und 20 min in 0,2 N HCL gebadet, anschließend kurz in 96%iges Ethanol getaucht und 15 min getrocknet. Die Deckgläschen wurden 5 h bei 250°C gebacken und nach dem Abkühlen in Silikonlösung (Serva) getaucht, die zur Wiederverwendung in ein gebackenes Gefäß zurückgegossen wurde. Die Silikonbeschichtung wurde 2 h bei 100-115°C eingebrannt. Die fertigen Deckgläschen wurden anschließend staub- und RNase-frei gelagert.

3.19.5. Waschen nach der Hybridisierung

Nach 16 bis 18 h Hybridisierung wurden die Objektträger in horizontale Hellendahl-Küvetten (vorgewärmt auf 52°C) einsortiert. Pro Objektträger wurden ca. 17 ml Posthybridisierungslösung benötigt. Alle Waschlösungen wurden nach Gebrauch als gesonderter radioaktiver Müll entsorgt. Die Posthybridisierungslösung wurde auf 52°C erwärmt und in die Küvetten mit den Objektträgern gegossen. Durch leichtes Schütteln rutschten die silikonisierten Deckgläschen von den Gewebeschnitten herunter und die Schnitte wurden 50 min bei 52°C durch leichtes Schwenken auf einem Schüttler gewaschen. Anschließend wurde die Waschlösung erneuert und nochmals 3 h bei 52°C gewaschen. Die nächste TES-Waschlösung wurde auf 37°C vorgewärmt und die Schnitte 15 min mit dieser Lösung bei 37°C inkubiert. Die Waschlösung wurde nochmals erneuert und RNase A hinzugefügt (20 µg/ml RNase Endkonzentration; 30 min bei 37°C), um einzelsträngiges nicht hybridisiertes Sondenmaterial zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte noch 2 x mit TES-Lösung gewaschen. Danach wurden die Objektträger zwei mal mit 2 x SSC und ein mal mit 0,1 x SSC für je 30 min bei RT gespült. Zur Dehydrierung der Gewebeschnitte folgte eine aufsteigende Alkoholreihe, wobei der Alkohol mit Ammoniumacetat vermischt wurde (für je 20 sec: 30% Ethanol/ 0,3 M NH₄-Acetat, 70% Ethanol/ 0,3 M NH₄-Acetat und 90% Ethanol/ 0,3 M NH₄-

Acetat und für 10 sec in 100% Ethanol/ 0,3 M NH₄-Acetat). Anschließend wurden die Schnitte für mindestens 1-2 h oder über Nacht getrocknet und staubfrei abgedeckt.

3.19.6. Beschichten der Objektträger mit Fotoemulsion

Alle Schritte wurden bei absoluter Dunkelheit durchgeführt. Die Ilford G5 Foto-Emulsion wurde auf 43°C erwärmt, um eine möglichst flüssige Konsistenz zu erhalten, und anschließend 1:1 mit Wasser verdünnt. 10 ml dieser Lösung wurden in eine Küvette gefüllt - möglichst ohne Luftblasen - und in das 43°C temperierte Wasserbad gestellt. Nach 10 min wurden die Objektträger für 1-2 sec in die Emulsion getaucht und anschließend in einen Ständer zum Trocknen gestellt. Nach 1 h waren die Objektträger soweit trocken, daß sie in lichtdichte Kartellboxen gelegt werden konnten, die mit einem Trocknungsmittel versehen waren. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Emulsionsschicht nicht berührt wurde. Schließlich wurden die Boxen noch mit 3 Lagen Aluminiumfolie umwickelt und so 3-40 Tage bei 4°C gelagert.

3.19.7. Entwickeln

Die Kartellboxen wurden zunächst mehrere Stunden bei RT gelagert. In drei verschiedene Glasküvetten wurden die folgenden Lösungen gegeben: 1. Kodak D19 Entwickler (1:1 mit Aqua dest. verdünnt); 2. 1%ige Essigsäure; 3. Kodak Fixierer 3000 Lösung A (auf 25% mit aqua dest. verdünnt). Die Objektträger aus den Kartellboxen wurden bei völliger Dunkelheit in die Glasküvetteneinsätze einsortiert und anschließend für 3 min in den Entwickler getaucht (alle 30 sec wurde geschüttelt). Von dort aus wurden die Objektträger in die Essigsäure (30-60 sec) und schließlich für 3 min in den Fixierer überführt. Danach wurden die Präparate für 20-45 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Die fertigen Präparate wurden nach dem Trocknen mikroskopisch ausgewertet.

3.20. Angewendete Programme

Das Programm AlignIR (Corpet, 1988) wurde verwendet, um homologe Sequenzen miteinander zu vergleichen. Mit dem BLAST Programm (Altschul et al., 1990) wurden zu analysierende Sequenzen mit im Internet veröffentlichten ähnlichen oder gleichen Sequenzen verglichen.