

## 3 Methoden

### 3.1 Methoden der Vertebraten-Zellkultur

#### 3.1.1 Sterilisation von Geräten und Lösungen

Alle zur Kultivierung von Vertebratenzellen verwendeten Gefäße, Materialien, Lösungen und Medien werden vor Gebrauch sterilisiert. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren bei 121°C, 2bar für 20min oder durch trockene Hitze bei 180°C über Nacht. Lösungen mit hitzelablen Inhaltsstoffen, wie Aminosäuren und Proteinen, werden mittels Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,4µm sterilfiltriert. Kulturgefäße werden schon steril bezogen.

#### 3.1.2 Medien und Puffer der Zellkultur

Grundlage des Zellkulturmediums oder der Zellkulturösungen ist hochreines Wasser, das über mehrere Filterstufen gewonnen wurde (Ampuwa-Wasser).

PBS	140 mM NaCl	8g
	2,7 mM KCl	0,2g
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,44g
	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
	pH 7,4	ad 1l
McCoy	McCoy 5A	12g
	26mM NaHCO <sub>3</sub>	2,2g
	Glutamin	10ml
	pH 7,4	ad 1l
MCDB 402	MCDB 402	
	Mit Inositol und Phosphat	für 1l
	Phenolrot pH 7,4	eine Spatelspitze ad 1l
RPMI	RPMI	
	Glutamin	2mM
	26mM NaHCO <sub>3</sub>	2,2g
	pH 7,4	ad 1l
10xTrypsin/ EDTA (Fa. Gibco)	Trypsin	0,5g
	EDTA	0,2g
	NaCl	0,85g
	H <sub>2</sub> O	ad 100ml

Vor Gebrauch werden die Medien auf 37°C erwärmt und auf den im Brutschrank herrschenden CO<sub>2</sub>-Gehalt äquilibriert.

### 3.1.3 Kultivierung von AKR-2B Mausfibroblasten

Die Zelllinie AKR-2B ist eine adhärent wachsende subklonierte Mausfibroblasten-Zelllinie. Die Zellen werden bei 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in McCoy + 5% (v/v) Hyclone-Kälberserum (CS) kultiviert.

Zur Subkultivierung werden die Zellen alle 48h routinemäßig mit einer Dichte von 3500 Zellen/ cm<sup>2</sup> ausgesät. Dazu wird das Kulturmedium abgesaugt und die subkonfluenten Zellen mit PBS gespült. Danach wird der Zellrasen mit Trypsin/ EDTA für 30s überschichtet. Das Ablösen der Zellen von der Zellkulturoberfläche wird mikroskopisch verfolgt und durch Inkubation im Brutschrank unterstützt. Sind alle Zellen gelöst, werden sie in McCoy + 5% (v/v) CS aufgenommen, ein Aliquot daraus gezählt und in einem neuen Zellkulturgefäß ausgesät.

Für Versuche werden die Zellen in einer Dichte von 2700 Zellen/ cm<sup>2</sup> ausgesät und für 5 Tage zum Erreichen der Konfluenz in McCoy + 5% (v/v) CS kultiviert.

### 3.1.4 Kultivierung von Jurkat

Die Zelllinie Jurkat ist eine in Suspension wachsende immortalisierte B-Lymphozyten-Zelllinie. Die Zellen werden bei 37°C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in RPMI + 5% (v/v) fötales Kälberserum (FCS) kultiviert.

Zur Subkultivierung werden die Zellen alle 48h zu einer Zelldichte von 250 000/ ml mit RPMI + 5% (v/v) FCS verdünnt.

### 3.1.5 Zellzahlbestimmung mit Casy1

Die Zellzahlbestimmung im Casy1 erfolgt nach dem Coulter-Counter-Prinzip.

100µl einer Zellsuspension werden in 10ml PBS verdünnt und im Casy1 in Triplikaten à 300µl die Zellzahl automatisch bestimmt.

### 3.1.6 Kryokonservierung

Zur Langzeitkonservierung werden Portionen à 1 x 10<sup>6</sup> Zellen jeder Zelllinie über flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu werden 1 x 10<sup>6</sup> Zellen in je 1ml CS bzw. FCS + 10% (v/v) DMSO suspendiert und in Kryokonservierungsröhrchen überführt. Die Portionen werden dann bei -20°C für 2h, danach 2d bei -80°C und endgültig in Stickstofftanks gelagert.

Zum Auftauen werden die Zellen in vorgewärmten Medium aufgenommen und bei 110x g zum Entfernen des DMSO sedimentiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellsediment in Kulturmedium resuspendiert und in Kulturgefäße ausgesät.

### 3.1.7 Serumentzug und Behandlung der Zellen mit Stimulantien

Zur Induktion des Zelltodes wird den AKR-2B-Mausfibroblasten Serum entzogen. Die eingesetzten Stimulantien können diesem Prozeß entgegenwirken oder ihn unterstützen.

Das Kulturmedium wird dazu abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gespült. Die Zellen werden dann für die angegebene Zeit in MCDB 401 mit bzw. ohne Zusatz von Stimulantien in den angegebenen Konzentrationen unter Kulturbedingungen inkubiert.

<b>Stimulantien</b>	<b>Konzentration</b>
PDGF BB	75ng/ ml in 0,1% (w/v) BSA in PBS
TPA	1µM
Forskolin	5mM
8Br-cAMP	1,5mM
Colchicin	10µM
ATP	100µM
Adenosin	500µM
Okadasäure	100nM
Anisomycin	10 µM

Tab.3.1: Endkonzentration der eingesetzten Stimulantien

### 3.1.8 Elektroporation von AKR 2B-Mausfibroblasten

Zur Transfektion von AKR 2B-Mausfibroblasten mittels Elektroporation wird eine 2d zuvor ausgesäte subkonfluente Kultur aus mindestens zwei 150cm<sup>2</sup> Kulturschalen durch Trypsinisierung suspendiert (s. 3.1.3.) und in 40ml PBS + 2,5% (v/v) CS aufgenommen. Nach einer Zellzahlbestimmung erfolgt die Sedimentierung der Zellen bei 110x g für 5min. Die Zellen werden dann zu einer Konzentration von  $1,3 \times 10^7$  Zellen/ ml im Transfektionsmedium OptiMem von GIBCO resuspendiert. Je 150µl dieser Zellsuspension und 5µg der Vektor-DNA werden in eine 0,2cm Spezial-Küvette für Elektrotransfektion gegeben. Die Küvette wird verschlossen und in die Gene-Pulser Apparatur gesetzt. Durch einen elektrischen Puls bei einer angelegten Spannung von 220V und einer Kapazität von 600µF werden die Zellen transfiziert. Der Ansatz wird mit einer Pasteur-Pipette aus der Küvette entnommen und in vorgewärmtes McCoy + 5% (v/v) CS überführt. Danach werden die Zellen entsprechend der Versuchsanordnung subkultiviert.

### 3.1.9 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Verwendung kommt das Fluoreszenzmikroskop Leica *DM IRB*. Es ist mit den Filtern A, I3 und N.21 von Leica ausgestattet, die eine Anregung mit ultraviolettem bzw. mit grünem Licht ermöglichen. Die Zusammensetzung des jeweiligen Filterblocks ist in Tabelle 3.2 zusammengefaßt.

Filterblock	Anregungsfilter	Teilerspiegel	Sperrfilter
A	BP 340-380	RKP400	LP425
I3	BP 450-490	RKP510	LP515
N2.1	BP 515-560	RKP580	LP590

Tab.3. 2: Filterbeschreibung des Fluoreszenzmikroskops  
in nm; BP=Bandpaßfilter, LP=Langpaßfilter, RKP=Reflexions-Kurzpaßfilter

#### 3.1.1.1 Kultivierung von adhärennten Zellen unter dem Mikroskop

Der Umbau des Fluoreszenzmikroskops Leica *DM IRB* erlaubt eine mittelfristige Kultivierung von adhärennt wachsenden Vertebratenzellen unter dem Mikroskop für etwa 18h. Um den Objektisch wurde eine äußere Kammer konstruiert, um darin eine konstante Temperatur von 37°C mittels einer Heizung und Meßfühlern zu ermöglichen. Zur Kultivierung werden  $1 \times 10^5$  Zellen auf einem runden Deckglas unter Standardbedingungen ausgesät und 12h kultiviert. Dieses Deckglas wird danach paßgenau in eine Halterung eingeschraubt, die dem Schlitten eines Objektträgers ähnelt und durch einen Glasdeckel eine verschlossene Kammer bildet. Die Atmosphäre dieser Kammer kann mittels Schläuchen und einer Pumpe zu einem 5% CO<sub>2</sub>-Luftgemisch äquilibriert werden. Als CO<sub>2</sub>-Luftgemischreservoir dient eine 5l Flasche die zuvor für 24h in einem Brutschrank offen gelagert wird.

Eine Fluoreszenzkamera von Kappa erlaubt die Aufnahme von Bildern in digitaler schwarz-weiß-Qualität. Die Kolorierung erfolgt nachträglich rechnergestützt in Programmen zur Bildbearbeitung.

Durch eine rechnergesteuerte motorisierte Beweglichkeit des Objektträgerschlittens ist die wiederholte Beobachtung mehrerer Gesichtsfelder zu verschiedenen Zeitpunkten möglich.

#### 3.1.1.2 Färbung der Zellen zur Fluoreszenzmikroskopie

Die Färbung der Zellen mit dem Farbstoff Hö33342 (1µg/ ml) erlaubt eine Beobachtung ihrer Kerne. Der Farbstoff kann die Cytoplasmamembran lebender Zellen passieren und interkaliert in die DNA. Zur Anregung und Aufnahme der Emmission wird der Filterblock N.21 verwendet. Die Expression von GFP (green fluorescence protein) wird mittels Filter A

### 3.1.10 Cytometrische Untersuchung von Zellen

Zur Untersuchung transfizierter Zellen wird ein FACS (fluorescence activated cell sorter), Epics Elite ESP von Coulter, verwendet. Dieser ermöglicht die Analyse der Größe, der Granulität und die Emission dreier unterschiedlicher Fluoreszenzen einer jeden untersuchten Zelle.

#### 3.1.10.1 Vorbereitung und Färben der Zellen

Die Färbung mit Phycoerythrin (PE) gekoppeltem Annexin V erlaubt die Identifikation apoptotischer Zellen. Annexin V durchdringt die Cytoplasmamembran nicht und bindet deshalb nur auf der Außenseite an Phosphatidyl-Serin (PS). PS tritt in lebenden Zellen ausschließlich auf der intrazellulären Seite der Cytoplasmamembran auf. Bei apoptotischen Zellen tritt ein sogenannter „flip-flop“ des Lipids auf, d.h. es ist auch auf der Außenseite der Membran nachweisbar.

Die Zellen werden mittels Trypsinisierung geerntet und gezählt. Mit Bindepuffer wird eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ ml eingestellt. 100µl der Suspension wird danach mit 5µl Annexin V-PE gemischt und bei RT im Dunkeln für 15min inkubiert. 3min vor der Messung wird der Suspension noch 3µl 7-AAD (Gebrauchslösung) untergemischt.

Bindepuffer	10mM HEPES/NaOH 140mM NaCl 2,5mM CaCl <sub>2</sub> bei 4°C gelagert	pH 7,4
7-AAD (Stammlösung) (Gebrauchslösung)	10mg/ ml in DMSO (bei -20°C gelagert) 1µg/ml in Bindepuffer (frisch)	
Annexin V-PE	100µg/ml in H <sub>2</sub> O	

#### 3.1.10.2 Messung

Die Messungen wurden von Prof. Dr. J. Hoppe durchgeführt. Neben Größe und Granularität werden die Fluoreszenzen von GFP, Annexin V-PE und 7-AAD vermessen.

#### 3.1.10.3 Auswertung

Die erhaltenen Meßwerte ermöglichen unter Verwendung der geeigneten Programme die selektive Betrachtung von unterschiedlichen Populationen der untersuchten Zellen. Zunächst wird die Population von weitgehend intakten Zellen durch Größe und Granularität bestimmt. In dieser Population wird durch ein Ereignisfenster, das das Auftreten der Fluoreszenzen von

7-AAD bzw. Annexin V-PE berücksichtigt, die toten bzw. apoptotischen Zellen isoliert. Innerhalb dieser Population wird das Auftreten der grünen Zellen, d.h. der GFP exprimierenden Zellen quantifiziert. Dieses Schema erlaubt zu ermitteln, wieviele GFP-transfizierte Zellen lebend, apoptotisch oder nekrotisch sind.

## 3.2 Arbeiten mit *Escherichia coli*

### 3.2.1 Der *E. coli*-Stamm JM109

Im Verlauf dieser Arbeit wurde der *E.coli*-Stamm JM109 verwendet [117]. Der Genotyp dieses Bakterienstammes lautet:

recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1,  $\lambda^-$ ,  $\Delta(\text{lac-proAB})$ , [F', traD36, proAB, lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15]

### 3.2.2 Kultivierung der Bakterien

Zur Herstellung von Bakterienkulturen wird LB-Medium oder Selektionsmedium, d.h. LB-Medium mit Ampicillin oder anderen Antibiotika, mit einigen  $\mu\text{l}$  einer Bakteriendauerkultur oder mit einer Einzelkolonie einer LB-Kulturplatte angeimpft. Für kleine Kulturen läßt man die Bakterien in 2ml Medium in einem sterilen Reagenzglas für mindestens 6h unter Schütteln bei 37°C wachsen, große Kulturen setzt man in sterilen Erlenmeyerkolben an und läßt diese über Nacht inkubieren.

Diese Kulturen können zur Plasmid-Schnellpräparation und Plasmid-Midipräparationen, zur Herstellung von kompetenten Zellen oder von Dauerkulturen verwendet werden.

Zur Vereinzlung oder Subklonierung der Kulturen können diese auf LB-Agar-Platten ausgestrichen werden. Die Kultivierung erfolgt dann über Nacht bei 37°C.

LB-Medium:	0,5% Hefe-Extrakt	5g
	1% Trypton	10g
	1% NaCl	10g
		H <sub>2</sub> O ad 1l
	Autoklavieren	
LB-Agarplatte:	0,5% Hefe-Extrakt	5g
	1% Trypton	10g
	1% NaCl	10g
	1,5% Agar	15g
		H <sub>2</sub> O ad 1l
	Autoklavieren	



### 3.2.5 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen durch Elektroporation

Durch Elektroporation kann Plasmid-DNA in *E.coli*-Bakterien eingefügt werden. Die Bakterien müssen wie im Kapitel 3.2.4 beschrieben, entsalzt und gewaschen sein (Dower *et al.*, 1988; Taketo, 1988; Fiedler und Wirth, 1988).

Zunächst kühlt man eine 0,2cm Spezial-Küvette für Elektrotransformation und 200µl LB-Medium ohne Antibiotika vor. Die bei -70°C gelagerten kompetenten Zellen werden auf Eis gestellt und möglichst schonend aufgetaut. 1-2µl der Plasmid-DNA bzw. des Ligationsansatzes werden auf die Zellen pipettiert. Anschließend kann der Ansatz in eine Küvette überführt werden.

Die Kontakte an der Küvette werden getrocknet und in die *Gene-Pulser* Apparatur eingesetzt. An dieser Apparatur wird eine Spannung von 2,5kV, eine Kapazität von 25µF und ein Widerstand von 200Ω eingestellt. Nach Auslösen des elektrischen Pulses werden die Zellen in 200µl LB-Medium aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend inkubiert man den Ansatz für 30min bei 37°C. Diese Inkubation ist notwendig, um den Zellen die Expression des Resistenzgens zu ermöglichen. Danach werden 100µl bis 200µl der Kultur auf eine LB-Agarplatte mit Selektionmedium ausplattiert und die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert.

Da der *E.coli*-Stamm JM109 die Deletion ΔM15 des lacZ-Gens trägt, können in Kombination mit dem pBluescript-Plasmid die Kolonien mit rekombinanten Plasmiden durch Blau-Weiß-Selektion detektiert werden. Vor dem Ausplattieren der Kultur auf die LB-Platte müssen zu diesem Zweck 50µl IPTG/X-Gal-Lösung ausgestrichen werden.

IPTG/X-Gal-Lösung:	2% X-Gal in DMF (w/v)	40µl
	0,1M IPTG in H <sub>2</sub> O	10µl
	gemischt bei -20°C aufbewahren	



### 3.3 Proteinchemische Methoden

#### 3.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Mit diesem Test kann die Proteinkonzentration von Proben bestimmt werden, die ohne SDS und reduzierende Agentien erstellt wurden.

Pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte werden zu 100µl H<sub>2</sub>O, 10µl Probe- bzw. Standardproteinlösung gegeben und mit 100µl Bradford-Reagenz gemischt. Als Standard-Proteinlösung wird eine serielle Verdünnungsreihe aus 0,25mg/ml bis 0,0125mg/ml BSA in Probenpuffer verwendet. Der Farbumschlag wird densitometrisch in einem ELISA-Reader bei einer Testwellenlänge von 630nm und einer Referenzwellenlänge von 405nm vermessen. Anhand der Standardwerte kann die Proteinmenge der Proben bestimmt werden.

Bradfordreagenz: 0,06% (w/v) Coomassie-g  
in 1,6% (v/v) Perchlorsäure

#### 3.3.2 Proteinbestimmung nach Redingbaugh

Mit diesem Test kann die Proteinkonzentration von Proben im Lämmli-Puffer bestimmt werden, bevor ihnen β-Mercaptoethanol zugesetzt wird.

Zu 200µl eines Gemisches aus den Lösungen A und B im Verhältnis 49:1 werden pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte 10µl Probe- oder Standard-Proteinlösung gegeben und gemischt. Als Standard-Proteinlösung wird eine serielle Verdünnungsreihe aus 2,5mg/ml bis 0,125mg/ml BSA in Probenpuffer verwendet. Die Mikrotiterplatte wird bei 54°C für 45min inkubiert und danach der Farbumschlag densitometrisch in einem ELISA-Reader bei einer Testwellenlänge von 550nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm vermessen. Anhand der Standardwerte kann die Proteinmenge der Proben bestimmt werden.

Lösung A:	1,35% (w/v) NaHCO <sub>3</sub>	6,75g
	0,85% (w/v) NaOH	2,9g
	1% (w/v) Bicinchoninsäure	5g
	0,57% (w/v) KNa-Tartrat	2,85g
		ad 500ml
Lösung B:	2,3% (w/v) CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	

### 3.3.3 Herstellen von Zellysaten aus Vertebratenzellkulturen nach Lämmlil [119]

Zur Gewinnung von Lysaten aus kultivierten Vertebratenzellen, werden diese mit PBS gewaschen. Zu je  $4 \times 10^5$  Zellen werden 50µl Laemmlipuffer gegeben und bei RT für 5min unter Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von 1% (v/v) Benzonase werden die Nukleinsäuren bei RT für 5min unter Schütteln abgebaut. Danach werden die Proteine bei 65°C für 10 min denaturiert. Nach einer Proteinbestimmung werden 10% (v/v) Blaumarker und 2% (v/v) β-Mercaptoethanol zugesetzt. Die Proben sind nun fertig zur SDS-PAGE bzw. zur Lagerung bei -20°C.

Laemmlipuffer:	50mM Tris-Cl, pH 6,7 2% (w/v) SDS
Blaumarker	1 Spatelspitze Bromphenolblau in 20ml H <sub>2</sub> O / Glycerin (1:1)

### 3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmlil

Zur gelelektrophoretischen Trennung von Proteinen wird die Methode nach [119] angewendet.

#### 3.3.4.1 Minigele

Polyacrylamidgele werden mit einer Dicke von 0,75mm in einer Miniprotean Apparatur von Biorad hergestellt. Die Miniprotean Apparatur wird laut Herstellerangaben im Gießständer zusammengebaut. Nach folgender Tabelle (Tab.3.2) werden die Bestandteile der Gele gemischt und zwischen die Glasplatten gegossen. Nachdem das Trenngel eingefüllt wurde gibt man vorsichtig, ohne die Phasen dabei zu vermischen, das Sammelgel darüber und setzt dann den Gelkamm luftblasenfrei ein. Die angegebenen Mengen sind ausreichend für vier Mini-Gele. Nach etwa 30 min sind die Gele polymerisiert und können in die Apparaturen eingesetzt werden. Sie werden mit 1x Laufpuffer für SDS-PAGE überschichtet und die Gelkämme entfernt. Danach werden die Proben und ein Molekulargewichtsstandard in die Geltaschen pipettiert. Bis die Proben in die Gele eingewandert sind wird eine Spannung von 100V angelegt. Danach wird auf 200V erhöht bis die Blaufront das Ende des Gels erreicht hat oder die gewünschte Trennstrecke erreicht ist.

### 3.3.4.2 Midigel für die 2D-Gelelektrophorese

Polyacrylamidgele werden mit einer Dicke von 0,75 mm in einer hausgemachten Midi-Apparatur für die 2D-Gelelektrophorese hergestellt. Die Midiapparatur besteht aus zwei oben angeschliffenen Glasplatten (14cm x 12cm), die mittels Klammern fixiert und Spacern getrennt werden. Dieses Plattensandwich wird unten und an den Seiten sorgfältig mit 2% (w/v) Agarose in H<sub>2</sub>O abgedichtet. Nach Tabelle (Tab.3.2) werden die Bestandteile der Gele gemischt und zwischen die Glasplatten gegossen. Nachdem das Trenngel eingefüllt wurde, schichtet man vorsichtig das Sammelgel bis etwa 5mm an den oberen Rand der Glasplatten darüber und versenkt darin den Zahn eines Gelkamms, um eine Tasche für einen Molekulargewichtsstandard zu erhalten. Nach etwa 30 min sind die Gele polymerisiert und können in die Apparaturen eingesetzt werden. Die Geltasche wird mit 30µl Molekulargewichtsstandard gefüllt, der Gelstreifen der ersten Dimension auf das Trenngel gesetzt und sorgfältig mit 1% (w/v) Agarose in 1x Laufpuffer fixiert. Die Apparatur wird mit 1x Laufpuffer für SDS-PAGE gefüllt und eine Spannung von 100V angelegt bis die Proteine in das Gel eingewandert sind. Danach wird auf 200V erhöht bis die Blaufront das Ende des Trenngels erreicht hat.

	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel</b>		
	<b>3%</b>	<b>10%</b>	<b>12,5%</b>	<b>15%</b>
<b>Acrylamidlösung</b> <b>30,8%T, 1,6%C</b>	0,5ml	5,0ml	6,25ml	7,5ml
<b>Trenngelpuffer</b>	--	3,8ml	3,8ml	3,8ml
<b>Sammelgelpuffer</b>	1,25ml	--	--	--
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3,2ml	3,7ml	1,975ml	1,2ml
<b>Glycerin</b>	--	2,5ml	2,5ml	2,5ml
<b>TEMED</b>	6µl	12µl	12µl	12µl
<b>40% (w/v) APS</b>	12µl	18µl	18µl	18µl
<b>Totalvolumen</b>	5ml	15ml	15ml	15ml

Tab.3.3: Pipettierschema SDS-PAGE

Acrylamidlösung 30,8%T, 1,6%C

30% (w/v) Acrylamid  
0,8% (w/v) Methylenbisacrylamid

Trenngelpuffer

1,5M Tris-Cl pH 8,8  
10% (w/v) SDS

Sammelgelpuffer

0,5M Tris-Cl pH 6,7  
10% (w/v) SDS

10 x Laufpuffer

2M Glycin  
1,5% SDS

### 3.3.5 2D-Gelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichtes und ihres isoelektrischen Punktes wird eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgt eine isoelektrische Fokussierung der Proteine entlang eines vorgefertigten pH-Gradienten.

#### Rehydratisierung der Gelstreifen:

Dazu werden im Vacuumkonzentrator eingeengte Proteinproben in 450µl Rehydratisierungspuffer gelöst bzw. bei hochkonzentrierten Proteinlösungen diese direkt darin aufgenommen. Über Nacht wird auf dieser Lösung der Gelstreifen der isoelektrischen Fokussierung, der sogenannte „Immobiline Strip“ von Pharmacia, in einer geeigneten Kammer inkubiert.

Rehydratisierungspuffer:	8M Harnstoff	2,4g
	Thioharnstoff	0,76g
	1% (w/v) CHAPS	50mg
	1% (w/v) DTT	50mg
	Ampholyte, pH3-10	26µl
		ad 5ml

#### Isoelektrische Fokussierung:

Ist das Gel des Streifens vollständig rehydratisiert, d.h. gequollen, wird dieser in eine Elektrophoresekammer eingelegt, an beiden Enden mit angefeuchteten Elektrodenstreifen belegt und durch die Elektroden eingeklemmt. Zum Schutz vor dem Austrocknen, wird die Apparatur mit sogenannter „Cover fluid“ geflutet. Die Fokussierung erfolgt in zwei Schritten; Zunächst bei 500V, 2mA, 5W für 1h und danach bei 3500V, 2mA, 5W ü.N..

Die Elektrophoresekammer wird dabei durch eine Umwälzpumpe stetig auf 20°C gekühlt.

#### Äquibrierung der Streifen:

Zur Vorbereitung für eine SDS-PAGE müssen die Pufferbedingungen in den Gelstreifen der SDS-PAGE angepaßt werden. Dazu inkubiert man die Streifen unter Schütteln für 15min in Puffer A und danach in Puffer B. Nach vorsichtigem Abspülen mit H<sub>2</sub>O wird der Streifen auf ein vorbereitetes Midigel einer SDS-PAGE gelegt und mit 2% (w/v) Agaroselösung in 1x Laufpuffer fixiert. Die SDS-PAGE erfolgt wie unter 3.3.4.2 beschrieben.

#### Äquibrierungslösung:

	6M Harnstoff	36g
	30% (v/v) Glycerin	30ml
	4% (w/v) SDS	4g
	5mM Tris-Cl pH 6,8	10ml [50mM]
		ad 100ml
Lösung A:	Äquibrierungslösung	
	3,5mg/ml DTT	
Lösung B:	Äquibrierungslösung	
	45mg/ml Iodacetamid	

### 3.3.6 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schagger [120]

Diese SDS-PAGE eignet sich insbesondere, Proteine oder Proteinfragmente von 1–100kD, z.B. nach einer Bromcyanspaltung, noch deutlich zu trennen.

In einer Miniprotean Apparatur von Biorad mit 0,75mm Plattenabstand wird, wie unter 3.3.4.1 beschrieben, zunächst das Trenngel, darauf das Zwischengel gegossen und mit Wasser überschichtet. Sind beide Gele polymerisiert, wird das Wasser entfernt, die Gele mit dem Sammelgel überschichtet und die Apparatur mit einem Taschenkamm verschlossen. Nachdem auch das Sammelgel polymerisiert ist, wird der Kamm entfernt, das Gelsandwich in die Apparatur eingebaut und diese mit Kathoden- und Anoden-Puffer gefüllt. Die Laufbedingungen entsprechen denen der SDS-PAGE, wie unter 3.3.4.1 beschrieben.

Die Gele setzen sich nach folgendem Pipettierschema zusammen:

	<b>Sammelgel</b>	<b>Zwischengel</b>	<b>Trenngel</b>
<b>Acrylamidlösung 49,5%T, 3%C</b>	0,25ml	1,0ml	--
<b>Acrylamidlösung 46,5%T, 6%C</b>	--	--	2,5ml
<b>Gelpuffer</b>	0,8ml	1,65ml	2,5ml
<b>Glycerin</b>	--	--	0,8ml
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2,1ml	2,35ml	1,7ml
<b>40% (w/v) APS</b>	9,3µl	9,3µl	9,3µl
<b>TEMED</b>	3,8µl	3,8µl	3,8µl
<b>Totalvolumen</b>	3,125ml	5ml	7,5ml

Tab.3.4: Pipettierschema Schagger-Gel

Anodenpuffer	0,2M Tris-Cl pH 8,9
Kathodenpuffer	0,1M Tris-Cl pH 8,25 0,1M Tricine 0,1% (w/v) SDS 1mM 3-Mercaptopropionsäure
Gelpuffer	3M Tris-Cl pH 8,45 0,3% SDS
Acrylamidlösung 49,5%T, 3%C	48% (w/v) Acrylamid 1,5% (w/v) Bisacrylamid
Acrylamidlösung 49,5%T, 6%C	46,5% (w/v) Acrylamid 3% (w/v) Bisacrylamid

### 3.3.7 Coomassiefärbung

Um Proteine im Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, werden die Gele in Färbelösung für 15-20min unter Schütteln inkubiert und anschließend nacheinander in Entfärber 1 und 2 bis die Banden deutlich sichtbar sind.

Färbelösung:	0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 10% (v/v) Essigsäure 50% (v/v) Methanol
Entfärber 1	10% (v/v) Essigsäure 50% (v/v) Methanol
Entfärber 2	5% (v/v) Essigsäure 10% (v/v) Isopropanol

### 3.3.8 Silberfärbung nach Blum [121]

Nach dem Auftrennen der Proteine im Polyacrylamidgel wird dieses für 1h bis ü.N. in Fixierer inkubiert. Während diesem und folgender Schritte, ist darauf zu achten, daß das Gel in den Lösungen auf einem Schüttler bewegt wird.

Nach dem Fixieren der Proteine im Gel wird dieses zweimal für 15min in 30% Isopropanol inkubiert. Für genau 1min wird das Gel mit Lösung A überschichtet. Anschließend wird es einmal 1min und zweimal 2min mit H<sub>2</sub>O gewaschen.

In der silbernitrat-haltigen Lösung B wird das Gel 20min inkubiert und danach wieder einmal 1min und zweimal 2min mit H<sub>2</sub>O gewaschen.

In der Lösung C wird das Gel so lange inkubiert bis die Färbung die gewünschte Intensität hat. Dann spült man das Gel mit H<sub>2</sub>O und stoppt die Färbereaktion durch Zugabe von Fixierer ab. Im Fixierer soll das Gel noch mindestens 15min inkubieren.

Fixierer:	50% (v/v) Methanol 12% (v/v) Essigsäure	250ml 60ml H <sub>2</sub> O ad 500ml
Lösung A:	Formaldehyd (37%) Natriumthiosulfat (43%) H <sub>2</sub> O ad 300ml	200µl 125µl
Lösung B:	Formaldehyd (37%) 0,2% (w/v) Silbernitrat	200µl 600mg H <sub>2</sub> O ad 300ml
Lösung C:	Formaldehyd (37%) Natriumthiosulfat (43%) 6% (w/v) Dinatriumcarbonat	200µl 3µl 18g

### 3.3.9 Western- und Affinitäts-Blot

Um einzelne Proteine aus einem Proteingemisch detektieren zu können, trennt man die Proteine nach bereits beschriebener Methode (s. Kap. 3.3.3 „SDS-PAGE“) auf und transferiert sie anschließend auf eine Membran.

Dazu werden die Gele nach dem Lauf direkt zum Transfer verwendet. Das Auftragen eines vorgefärbten Größenmarkers, wie SDS-7B von Sigma oder Benchmark von Gibco BRL, erleichtert die Kontrolle der Transfereffizienz. Diese kann nach dem Transfer auch über eine Färbung des Gels durch Coomassie-Blau, d.h. durch den Nachweis verbleibender Proteine im Gel, überprüft werden.

#### Das Blotten:

Die Nitrozellulosemembran BAS 85 und das Blottingpapier GB003, beides von der Fa. Schleicher & Schuell, werden auf die dem Gel entsprechende Größe zugeschnitten und im Transferpuffer befeuchtet. Sollen Proteine, die größer als 100kD sind, transferiert werden, muß dem Blotpuffer 0,2% SDS zugefügt werden.

Es wird das sogenannte *Semi-Dry*-Verfahren angewendet. Dazu werden die Membran und das Gel in folgender Weise auf die Graphitplatte der Kathode einer *Semi-Dry*-Apparatur geschichtet und mit der Anodenplatte bedeckt:

- 6 Lagen feuchtes Whatmanpapier
- SDS-Gel
- Membran
- 6 Lagen feuchtes Whatmanpapier

Mit einem Glasstab entfernt man Luftblasen, die sich zwischen den einzelnen Schichten befinden. Die Stromstärke wird entsprechend der Membranfläche eingestellt, wobei gilt:  $1\text{cm}^2 \cong 0,8\text{mA}$  für 1h bei gleichbleibender Stromstärke.

Soll auf eine PVDF-Membran transferiert werden, wird diese zunächst mit Methanol vollständig benetzt und danach wie auch die Whatmanpapiere in dem Transferpuffer für PVDF-Membranen gewaschen.

### Die Detektion:

Nach dem Transfer wird die Membran in 2% (w/v) BSA-Lösung für 1h abgesättigt. Um eine gleichmäßige Benetzung der Membran zu gewährleisten, wird sie bei diesem und allen folgenden Schritten in Schalen mit je 5ml Puffer auf dem Schüttler bewegt.

Die Membran wird dann mit dem 1. Antikörper für 1h bei RT oder ü.N. bei 4°C inkubiert. Der 1. Antikörper ist in 2%-BSA-Lösung verdünnt und kann durch Zugabe von 0,03% (w/v) Natriumazid bei 4°C aufbewahrt und einige Male wiederverwendet werden. Nach der Inkubation des 1. Antikörpers werden die Membranen sechsmal Lösung für jeweils 5min mit 0,5%-BSA- gewaschen.

Der mit der Peroxidase konjugierte 2. Antikörper wird in der empfohlenen Konzentration in 2% (w/v) BSA-Lösung (lt. Angaben des Herstellers) verdünnt und auf den Membranen für 1h inkubiert. Danach wird wieder sechsmal mit 0,5% (w/v) BSA-Lösung für jeweils 5min gewaschen.

Für den Affinitätsblot wird anstatt des 1. und 2. Antikörpers Peroxidase-konjugiertes Avidin in 2%-BSA-Lösung eingesetzt. Danach wird zehnmal mit 0,5%-BSA-Lösung für jeweils 5min gewaschen.

Die ECL („enhanced chemiluminescence“):

In der Dunkelkammer bei Rotlicht werden die Membranen 1min mit je 5ml Luminol-Reaktionslösung und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung inkubiert, etwas getrocknet und in Plastikfolie eingelegt. Diese Lösungen müssen immer frisch angesetzt werden.

Je nach Stärke der Lumineszenz legt man Röntgenfilme für einige Sekunden bis 30min auf die Membran und läßt die Filme anschließend in einer Entwicklungsmaschine entwickeln.

Transferpuffer für Nitrocellulose:	50mM CAPS-Puffer	11,1g
	1mM 3-Mercaptopropionsäure	87µl
	pH 10	H <sub>2</sub> O ad 1l
	10% Methanol (frisch zugeben)	
	0,2% SDS (frisch zugeben)	

Transferpuffer für PVDF-Membranen:	50mM CAPS-Puffer	11,1g
	1mM 3-Mercaptopropionsäure	87µl
	pH 10	H <sub>2</sub> O ad 1l
	30% Methanol (frisch zugeben)	
	0,2% SDS (frisch zugeben)	

Tris-Puffer für Western Blot:	50mM Tris	6,06g
	150mM NaCl	8,77g
	0,2% NP 40	2ml
	pH 7,5	H <sub>2</sub> O ad 1l

2%-BSA-Lösung:	2% BSA in Tris-Puffer für Western-Blot (frisch ansetzen)
----------------	---



0,5%-BSA-Lösung:	0,5% BSA in Tris-Puffer für Western-Blot (frisch ansetzen)	
Luminol-Stammlösung:	250mM Luminol in DMSO	224mg ad 5ml
p-Cumarsäure-Stammlösung:	90mM in DMSO	74,2mg ad 5ml
Diese beiden Lösungen sind aliquotiert und lichtgeschützt bei -20°C haltbar.		
Luminol-Reaktionslösung:	Luminol-Stammlösung p-Cumarsäure-Stammlösung 0,1M Tris-Cl, pH 8,5	500µl 220µl ad 50ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung:	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (37%) 0,1M Tris-Cl, pH 8,5	20µl ad 40ml

### 3.3.10 Erstellen von cytosolischen Extrakten aus Vertebratenzellen

Zum Erstellen von cytosolischen Extrakten werden kultivierte Zellen einmal mit PBS und einmal mit Extraktions-Puffer gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgen auf Eis. Adhärenz wachsende Zellen werden mit einem Zellschaber und Suspensionszellen mittels Zentrifugation bei 100x g geerntet und danach eine Konzentration von etwa  $10^7$  Zellen pro 250µl Extraktions-Puffer eingestellt. Die Zellsuspension wird in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen mit einem Ultraturrax aufgeschlossen. Sollen größere Zellmengen bearbeitet werden, kann der Zellaufschluß auch durch einen 2ml Glas/Teflon Dounce & Potter-Homogenisator erfolgen. Die Effizienz des Zellaufschlusses wird mikroskopisch verfolgt. In jedem Ansatz wird aus einer Stammlösung eine Endkonzentration von 1µM PMSF und 1x Inhibitormix-EDTAfree eingestellt. Durch Zentrifugation bei 100 000x g und 4°C für 20min in einem Festwinkelrotor erfolgt die Trennung von partikulären und cytosolischen Bestandteilen. Der cytosolische Extrakt befindet sich im Überstand und wird vorsichtig abgenommen. Er kann für mindestens 14 Tage bei -80°C aufbewahrt werden.

Cytosolische Extrakte, die einer Anionenaustausch-Chromatographie unterzogen werden sollen, werden anstatt in Extraktions-Puffer in Eluent A erstellt (s.3.3.12.1).

Extraktions-Puffer	50mM KCl 2mM MgCl <sub>2</sub> 50mM HEPES, pH 7,0 5mM EGTA
PMSF-Stammlösung 7x Inhibitormix EDTAfree	1mM PMSF in EtOH 1 Tablette in 1ml Extraktions-Puffer

### 3.3.11 Aktivitätstests für Caspasen

Zur Bestimmung der Aktivität von Caspasen in Extrakten, werden diese mit Tetrapeptidsubstraten für Caspasen versetzt. Der Umsatz dieser Substrate läßt sich durch die Freisetzung einer chromophoren (p-Nitroanilin, pNa) bzw. fluorophoren (Aminomethylcoumarin, amc) Gruppe, die an Position 1 des Tetrapeptids gekoppelt ist, quantifizieren.

Die Aktivität errechnet sich aus der Menge der freigesetzten Gruppe (pNa bzw. amc) in *pmol* der Inkubationszeit (in *min*) und der eingesetzten Gesamtproteinmenge (in *mg*) nach folgender Formel: Aktivität = Produktmenge (pmol) / Proteinmenge (mg)\* Inkubationszeit (min). Die spezifische Aktivität ist die Differenz aus einer solchen Aktivität mit und ohne spezifischem Inhibitor. So wird die Restaktivität in inhibierten Reaktionen als unspezifische kontaminierende Aktivität betrachtet.

#### 3.3.11.1 Chromophorer Aktivitätstest

75-100µg Gesamtprotein eines cytosolischen Extraktes bzw. 50µl einer Fraktion der Anionenaustauschchromatographie werden in einer Vertiefung einer 96-Lochplatte mit 10µl einer Stammlösung des Substrats und mit ICE-Puffer auf 100µl aufgefüllt. Die Bestimmung erfolgt in Triplikaten. Nach kurzem Mischen auf einem Schüttler erfolgt eine Inkubation bei 37°C für 30–45min. Das freigesetzte p-Nitroanilin wird durch den gelben Farbumschlag densitometrisch im ELISA-Reader bei einer Testwellenlänge von 405nm und einer Referenzwellenlänge von 630nm vermessen. Die Quantifizierung und die Berechnung der Aktivität erfolgt mit Hilfe einer mit aufgetragenen p-Nitroanilin-Lösung als Standard.

ICE-Puffer	50mM KCl 2mM MgCl <sub>2</sub> 100mM HEPES, pH 7,4 10% (w/v) Saccharose 0,1% (w/v) Chaps 0,1 mg/ml BSA
p-Nitroanilin-Lösung	50µM p-Nitroanilin in ICE-Puffer

### 3.3.11.2 Fluorophorer Aktivitätstest

75-100µg Gesamtprotein eines cytosolischen Extraktes werden in einer Quarzküvette mit 10µl einer Stammlösung des Substrats und mit ICE-Puffer auf 2ml aufgefüllt. Die Freisetzung des Aminomethylcoumarins wird in einem Fluorospektrophotometer bei RT über einen Zeitraum von 20 min bei einer Anregungswellenlänge von 380nm und einer Emissionswellenlänge von 440nm aufgenommen. Anhand der Steigung des linearen Fluoreszenzanstiegs und einer Aminomethylcoumarinlösung als Standard, wird die Aktivität berechnet.

Aminomethylcoumarin-Lösung                      288nM AMC

### 3.3.12 Chromatographische Verfahren

Aus einem Proteingemisch, wie z.B. aus einem cytosolischen Extrakt, können einzelne Proteine, wie Caspasen, mittels Chromatographie schrittweise gereinigt werden. Hierzu werden zwei unterschiedliche Materialien verwendet: Source Q von Pharmacia, ein Anionenaustauscher und Hydroxylapatit von Merck.

Dazu werden Universal-Glassäulen von Merck, Superfomace 75-5 und Superformance 10, mit Säulenmaterial befüllt. Die Menge des Materials, das dem Säulenbettvolumen der jeweiligen Säule entspricht, wird in Puffer gewaschen bzw. gequollen und danach auf ein Gesamtvolumen eingestellt, das dem des Säulenbetts und der sogenannten Füllsäule entspricht.

Die Glassäulen werden durch eine sogenannte Füllsäule verlängert, das vorhydratisierte Säulenmaterial eingefüllt und an die Pumpe der HPLC-Anlage angeschlossen. Bei einer konstanten und angepaßten Flußrate wird das Material gleichmäßig in die Säule gepackt.

Der Probenauftrag erfolgt über einen Schleifeninjektor von 2ml Volumen oder einem sogenannten Superloop von bis zu 50ml Volumen. Durch einen Gradienten von Puffer A zu Puffer B werden die Proteine aufgetrennt und in einem Fraktionssammler gesammelt.

Um den Verlauf der Auftrennung zu beobachten, wird die Absorption der Proteinlösung in einem Detektor mit Spektrophotometer bei 280nm gemessen und mit Hilfe eines Schreibers und eines Analog-Digital-Wandlers aufgezeichnet und gespeichert. In der Regel führt man Vorläufe ohne Proteinlösung und mit Standardproteinen durch, um die Säule zu überprüfen und zu reinigen.



Zur Trennung der Proteine wird nach dem Auftragen ein Gradient von 10mM zu 300mM Phosphat-Puffer bei einer Flußrate von 0,5ml/min eingestellt und Fraktionen à 750µl gesammelt.

Phosphat-Puffer, pH 6,8

700mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 700mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
bis pH 6,8 erreicht ist

### 3.3.13 Bromcyanspaltung

100µl Proteinlösung werden in einem Vacuumkonzentrator vollständig eingengt und danach in 70µl 100% (w/v) Bromcyan in Ameisensäure aufgenommen. Ist die Probe unter Schütteln gelöst, wird mit H<sub>2</sub>O auf 100µl aufgefüllt und ü.N. bei RT inkubiert. Die Lösung wird erneut in einem Vacuumkonzentrator eingengt und dann in 15µl Lämmli-Puffer mit Blaumarker, beschrieben unter 3.3.3, aufgenommen. Durch Zugabe kleiner Mengen an 1M Tris-Puffer wird der pH-Wert wieder soweit angehoben, daß eine Blaufärbung der Lösung zu erkennen ist. Danach wird nochmals Blaumarker zugesetzt.

### 3.3.14 TCA-Fällung von Proteinen

Zur Konzentration von Proteinen aus einer Lösung kann eine Fällung der Proteine mittels TCA durchgeführt werden. Dazu wird in der Proteinlösung eine Endkonzentration von 10% (v/v) an TCA eingestellt, gemischt und für 15min auf Eis inkubiert. Der weiße Niederschlag wird für 10min bei 13000x g und RT in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Dieser wird dann zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und dazwischen durch Zentrifugieren sedimentiert. Die Proteine werden danach in einem geeigneten Puffer, z.B. Lämmli-Puffer, durch gründliches Mischen gelöst.

### 3.4 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

#### 3.4.1 Standardmethoden zur Reinigung von DNA

Die nachfolgend beschriebenen Methoden zur Reinigung von DNA sind Standardanwendungen in der Molekularbiologie und sind Bestandteil später beschriebenen Methoden.

##### Phenolextraktion:

Zur Abtrennung von Proteinen aus wäßrigen, nukleinsäurehaltigen Lösungen gibt man das gleiche Volumen Phenol (pH 8) zu und schüttelt den Ansatz kräftig. Zur Trennung der Phasen zentrifugiert man für 5min bei 13000x g. Die wässrige Phase wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Bei starken Verunreinigungen wird der Vorgang wiederholt. Anschließend wird der Ansatz noch ein- bis zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) ausgeschüttelt, um restliches Phenol zu entfernen. In der Regel folgt dem Phenolisieren eine Ethanolfällung, um die DNA anzureichern.

##### Ethanol-fällung:

Um Nukleinsäuren aus wäßrigen Lösungen zu konzentrieren, können diese mit Ethanol ausgefällt werden. Dazu muß die Lösung auf eine Salzkonzentration von 0,3M eingestellt werden. Hier wird in der Regel eine 3M Natriumacetatlösung (pH 5,2) verwendet. Bei besonders geringen DNA-Mengen gibt man zur Fällung 20µg Glykogen (10mg/ml Stammlösung) zu. Nach Zugabe von zweieinhalb Volumina absolutem Ethanol wird der Ansatz für 30min bei -20°C inkubiert. Um die DNA zu sedimentieren, zentrifugiert man die Reaktionsgefäße bei 4°C bei 13000x g für mindestens 15min. Nachfolgend wird das Sediment mit je 500µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 5min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Sediment 5min im Vakuumkonzentrator getrocknet. Die DNA kann nun in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O oder TE gelöst werden und bei -20°C aufbewahrt werden.

### 3.4.2 Plasmidschnellpräparation aus *E. coli* durch alkalische Lyse

Zur Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA nach Birnboim und Doly [122,123] wird eine 2ml Bakterienkultur (s. Kap. 3.2.2) bei 13000x g für 5min zentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgenommen. Das Sediment kann bei -20°C eingefroren oder direkt weiterverwendet werden.

Das Bakteriensediment wird in 200µl Puffer P1 resuspendiert und dabei lysiert. Nach Zugabe von 200µl Puffer P2 wird erneut gut gemischt, die Lösung sollte klar werden. Bei Zugabe von 200µl Puffer P3 fällt nach Mischen ein weißer Niederschlag aus. Dieser wird durch Zentrifugieren für 5min, 13000x g bei 4°C sedimentiert, der klare Überstand abgenommen und nochmals für 5min zentrifugiert. Der Überstand wird wieder in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und Inkubation bei RT für 10min kann die Plasmid-DNA gefällt werden. Anschließend wird die DNA bei 4°C, 15000xg für 15min zentrifugiert, das Sediment einmal mit 70% Ethanol gewaschen und im Vakuumkonzentrator getrocknet. Man löst das DNA-Sediment in 30-50µl H<sub>2</sub>O und bewahrt das gereinigte Plasmid bei -20°C auf. Die Plasmid-DNA kann direkt in weitere Versuche verwendet werden oder zur erneuten Transformation von *E.coli*-Bakterien eingesetzt werden.

Puffer P1:	50mM Tris-Cl 10mM EDTA, pH 8,0 100µg/ml RNase A
Puffer P2:	200mM NaOH 1% SDS
Puffer P3:	3M Kaliumacetat pH 5,5

### 3.4.3 Plasmidmidipräparation aus *E. coli* mit LiCl

Zur Reinigung größerer Mengen an Plasmid-DNA werden 50ml einer Bakterienübernachtskultur bei 13000x g und 4°C für 15min zentrifugiert.

Das Bakteriensediment wird in 2ml Puffer P1 mittels eines weichen Pinsels resuspendiert und für 10min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2ml Puffer P2 wird durch Invertieren gut gemischt und auf Eis inkubiert. 2ml Puffer P3 wird danach ebenso durch Invertieren untergemischt und auf Eis gestellt. Letztlich werden noch 9ml 5M LiCl zugegeben und auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugieren für 15min (13000x g bei RT) wird der Niederschlag sedimentiert, danach der klare Überstand abgenommen und erneut für 5min zentrifugiert. Der

Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol bei RT für 10min gefällt. Anschließend wird die DNA abermals zentrifugiert, das Sediment einmal mit 70% Ethanol gewaschen und im Vakuumkonzentrator getrocknet. Man löst das DNA-Sediment in 1ml P1 und inkubiert es für 30min bei 37°C zum Abbau der restlichen RNA. Anschließend wird die DNA durch Phenolisierung und durch eine Ethanol fällung gewonnen. Das so gereinigte Plasmid kann bei -20°C aufbewahrt werden.

#### 3.4.4 Präparation von Gesamt-RNA aus Vertebratenzellen durch saure Phenolextraktion

Die Isolierung von Gesamt-RNA wird nach der Methode von Chomczynski und Sacchi [Chomczynski , 1987 #199] durchgeführt. Bei der Isolierung und beim Arbeiten mit RNA muß peinlichst darauf geachtet werden, daß alle Lösungen und Materialien frei von Ribonukleasen sind. Lösungen werden mit DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt oder vor Gebrauch autoklaviert. Beim Arbeiten sollen Handschuhe getragen werden.

Etwa  $1 \times 10^6$  Zellen werden in 1 x PBS gewaschen und danach in 300µl RNA-Lysispuffer, 30µl 2M Natriumacetat (pH 4,2) und 300µl Phenol (pH 5,5, wassergesättigt) lysiert. Die Lösung wird in sterile Reaktionsgefäße überführt und unter Schütteln für 2 min inkubiert.

Anschließend werden 60µl eines Chloroform/Isoamylalkoholgemisches (49:1 v/v) zugegeben, der Ansatz für 2min kräftig durchmischt und für 20min auf Eis inkubiert. Durch nachfolgende Zentrifugation in der Tischzentrifuge (13000x g, 30min, 4°C) erfolgt die Phasentrennung.

Die wässrige obere Phase wird vorsichtig abgenommen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wird durch Zugabe von 300µl eiskaltem Isopropanol und Inkubation für mindestens 1h bei -20°C gefällt. Anschließend wird die RNA in einer Tischzentrifuge (13000x g, 30min, 4°C) sedimentiert, der Überstand abgenommen und das RNA-Sediment in 500µl 70% (v/v) Ethanol zweimal gewaschen. Bei diesen Waschschritten wird jeweils 5min bei 4°C zentrifugiert. Nachdem man das Ethanol abgenommen hat, trocknet man die RNA im Vakuumkonzentrator für 5min. Das RNA-Sediment wird in 6µl DEPC-H<sub>2</sub>O gut suspendiert und kann bei -70°C aufbewahrt werden.

RNA-Lysispuffer:	4M Guanidiniumthiocyanat	23,6g
	25mM Tri-Natriumcitrat	367mg
	0,5% (w/v) Natriumlaurylsarcosin	250mg
	pH 7,0	H <sub>2</sub> O ad 50ml
	0,1M Mercaptoethanol (am Versuchstag frisch zugeben)	7µl/ml



### 3.4.5 Präparation von PolyA<sup>+</sup>-RNA aus Gesamt-RNA

Um PolyA<sup>+</sup>-RNA zu gewinnen, werden 100µg Gesamt-RNA mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100µl aufgefüllt und dann mit 100µl 2x Puffer D gemischt. Zur Denaturierung der RNA wird der Ansatz für 5min bei 70°C inkubiert und dann für mindestens 5min auf Eis gestellt. Währenddessen werden 200µl Dynabeads zweimal mit 1x PufferD gewaschen. Dazu wird das 1,5ml Reaktionsgefäß in den Magnethalter gestellt und die Dynabeads dadurch abgesetzt. Die überstehende Lösung wird nun vorsichtig abgezogen, das Reaktionsgefäß aus dem Halter entnommen und die neue Lösung eingefüllt. Zur Kopplung der RNA an den poly-dT-Arm der Dynabeads wird diese mit den Dynabeads für 5min bei RT inkubiert. Nach 5-maligem Waschen mit 1x Puffer D, wird 6 mal mit Puffer E gewaschen. Beim letzten Schritt wird der Waschpuffer sehr gründlich abgezogen und durch 8µl Puffer F ersetzt. Nach einer Inkubation von 2 min bei 70°C wird die polyA<sup>+</sup>-RNA-Lösung im Magnethalter von den Dynabeads getrennt und kann bei -80°C gelagert werden. Die Dynabeads sind wiederverwendbar und können dazu in 1x Puffer D bei 4°C aufgehoben werden.

2x Puffer D	20 mM Tris-Cl, pH 7,5 1M LiCl 2mM EDTA
Puffer E	10mM Tris-Cl, pH 7,5 0,1M LiCl 1mM EDTA
Puffer F	2mM EDTA

### 3.4.6 Reinigung von DNA über „Spin Columns“

PCR-Produkte oder enzymatisch modifizierte Vektor-DNA kann über kommerzielle Systeme, wie z.B. „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ von der Firma Qiagen, gereinigt werden. In diesen Systemen sind sog. „*Spin Columns*“ - kleine Säulen, die nach Angaben des Herstellers mit einer spezialbehandelten Silicamatrix gefüllt sind, enthalten. Die DNA kann aus Agarosegelen (s. 3.5.1) gewonnen werden oder direkt aus der Lösung zur Reinigung eingesetzt werden. Ähnliche Aufreinigungskits sind u.a. auch von der Firma Macherey & Nagel erhältlich. Diese Firmen behalten sich vor, die Zusammensetzung der Puffer nicht preiszugeben. Die Durchführung erfolgt nach den Vorschriften der Hersteller.

### 3.5 Analyse von Nukleinsäuren

#### 3.5.1 Auftrennen von DNA und RNA in Agarosegelen

Zur analytischen und präparativen Agarosegelelektrophorese werden horizontale Flachbettgele der Größe 10cm x 7,5cm und 7,5cm x 5,5cm verwendet. Die Konzentration des Agarosegels ist abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden DNA. Für DNA >1000bp wird in der Regel ein 1% Agarosegel verwendet, bei DNA <1000bp ein 3% Agarosegel.

In 100ml geschmolzene Agarose werden je 3µl Ethidiumbromid (5mg/ml SL) zur Sichtbarmachung der DNA gemischt und die Agarose in einen Gelträger gegossen. Ein Auftragskamm wird in die flüssige Agarose plziert und nach Erstarren des Gels kann der Gelträger in die Elektrophoresekammer eingesetzt werden. Das Agarosegel wird vollständig mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben werden mit 20-50% (v/v) DNA-Ladepuffer vermischt und in die Auftragstaschen gefüllt. 100-150ng eines geeigneten Größenmarkers (s. Kap. 2.5.2) wird zum Vergleich in eine separate Tasche eingefüllt.

Zur Auftrennung der DNA legt man eine Spannung von 130V an. Der Lauf wird dann beendet, wenn die sichtbare Bromphenolblaubande sich im unteren Drittel des Gels befindet. Anschließend kann die DNA durch Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht werden und mit Hilfe einer Videokamera fotografiert werden.

Dieses System kann auch zur schnellen Auftrennung und Überprüfung von RNA-Proben verwendet werden, z.B. bevor RNA in eine reverse Transkription (Kap. 3.8.2) eingesetzt wird. Dazu wird die Elektrophoresekammer, der Gelträger und der Kamm mit 70% Ethanol und mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült und die Kammer mit autoklaviertem 1x TAE-Puffer gefüllt. Die Agarose wird ebenfalls mit autoklaviertem 1x TAE-Puffer angesetzt und sollte frisch sein. Die RNA wird mit DNA-Ladepuffer, der zuvor sterilfiltriert wurde (0,2µm Rotrandfilter) vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung und das Sichtbarmachen der RNA erfolgt wie bereits beschrieben.

50x TAE:	2M Tris	121,1g
	Essigsäure	28,6ml
	EDTA	9,3g
	pH 8,0	H <sub>2</sub> O ad 500ml

1% Agarose:	1% Agarose (w/v) in 1 x TAE erhitzen und bei 60°C aufbewahren
-------------	--

3% Agarose:	1% Agarose (w/v) 2% Agarose Low-Melting-Grade (w/v) in 1 x TAE erhitzen und bei 60°C aufbewahren
DNA-Ladepuffer:	50% 1 x TAE (v/v) 50% Glycerin (v/v) 0,05% Bromphenolblau (w/v) 0,05% Xylencyanol (w/v)

### 3.5.2 Auftrennen von RNA in Formaldehydgelen

Das Auftrennen von RNA erfolgt in der Regel durch denaturierende Formaldehydgele [124]. Zur Herstellung eines 1,25% Formaldehydgels, werden 0,72g Agarose in 30ml DEPC-H<sub>2</sub>O in einem Mikrowellengerät erhitzt und gelöst. Anschließend gibt man 10xMOPS-Puffer und Formaldehyd unter dem Abzug zu und füllt mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 60ml auf. Die warme Gellösung wird in den Gelträger (Größe 15cm x 10cm) gegossen und ein Auftragskamm eingesetzt. Nach Erstarren des Gels, wird es in die Elektrophoresekammer gestellt und mit 1x MOPS-Puffer für RNA-Gele überschichtet. Mit 60V Spannung läßt man das Gel ohne Proben für mindestens 5min „vorlaufen“.

Die RNA, in 6µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst (s. Kap. 3.4.4), wird mit 9µl Probenpuffer vermischt. Nach 2min Schütteln werden die Proben für 15min bei 70°C denaturiert, anschließend 5min auf Eis gestellt und 2µl RNA-Ladepuffer zugegeben.

Die Auftragstaschen werden ausgespült und die Proben in die Taschen pipettiert. Für etwa 10min läßt man die Proben bei 60V langsam in das Gel einlaufen und erhöht die Spannung anschließend auf 150V. Um während der Elektrophorese die Bildung eines pH-Gradienten im Puffer zu vermeiden, wird der Puffer in der Elektrophoreseapparatur durch eine spezielle Pumpe gemischt.

Kurz vor Austritt des Bromphenolblaus aus dem Gel wird die Elektrophorese gestoppt. Die RNA kann mittels Ethidiumbromid durch UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden. In der Regel wird die RNA nach der Auftrennung auf eine Membran durch Northern Blot transferiert (s. Kap. 3.7.1).

Formaldehyd-Agarosegel:	1,25% Agarose 10x MOPS-Puffer Formaldehyd (mind. 37%) DEPC-H <sub>2</sub> O	0,72g 6ml 11ml ad 60ml
10 x MOPS-Puffer für Formaldehydgele:	0,2M MOPS 10mM EDTA pH 7,0 autoklavieren	20,9g 1,9g H <sub>2</sub> O ad 500ml

Probenpuffer:	Formamid deionisiert	80µl
	Formaldehyd (mind.37%)	20µl
	10x MOPS-Puffer	20µl
	5mg/ml Ethidiumbromid	2µl
RNA-Ladepuffer für Formaldehydgele:	50% Glycerin (v/v)	5ml
	1mM EDTA pH 8,0	20µl - 0,5M SL
	0,25% Bromphenolblau (w/v)	25mg
	0,25% Xylencyanol (w/v)	25mg
	DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 10ml

### 3.5.3 Auftrennen von DNA in Polyacrylamidgelen

Zum Auftrennen von DNA bis zu 1000 Basen, die nach dem Riboquant DNA-Protektions-Assay (Kap. 3.8.5) synthetisiert wird, werden denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele verwendet. Diese Gele werden in der Regel in einer Größe von 30cm x15cm und in einer Stärke von 0,4mm hergestellt.

Vor dem Herstellen des Gels werden die Glasplatten, eine rechteckige Platte und eine Platte mit sogenannten Ohren gut mit Aceton, Ethanol und H<sub>2</sub>O gereinigt. Damit sich das Gel nach der Auftrennung gut von einer Platte löst und auf der anderen haften bleibt, wird - in der hier verwendeten Apparatur - die Platte mit den Ohren mit einer Silanisierlösung behandelt. Dazu pipettiert man im Abzug je 10ml dieser Silanisierlösung auf die Glasplatte und verteilt die Lösung mit einem Papiertuch. Dies wird einmal wiederholt und nach dem Trocknen wird die Platte mit destilliertem H<sub>2</sub>O gespült. Die Platten und Spacer werden gereinigt und anschließend zusammengebaut.

Nachdem die 4% Acrylamidlösung luftblasenfrei zwischen die Platten gegossen wurde, schiebt man den in 10% (w/v) gespülten Taschenkamm vorsichtig ein. Die Polymerisation des Gels dauert mindestens eine Stunde. Zur Aufbewahrung ü.N. sollte das Gel oben und unten mit einem mit 1x TBE befeuchteten Papiertuch und Haushaltsfolie eingeschlagen werden, um es vor dem Austrocknen zu schützen.

Das Gel wird in die Apparatur eingebaut, mit 1x TBE-Puffer über- und unterschichtet und der Kamm wird herausgezogen. Die Vorelektrophorese bei 40Watt soll mindestens 1h andauern.

Mit einer Mikropipette werden die DNA-Proben in die Geltaschen eingefüllt. Bei 50Watt und gleichbleibender Spannung wird die Auftrennung für etwa 2h durchgeführt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird die Glasplatte mit den „Öhrchen“ vorsichtig mit einem Spatel abgehoben. Ein saugfähiges Papier (z.B. Whatman Papier GB003) wird auf das Gel gelegt. Das Gel haftet am Papier und kann so gut abgezogen werden. Zum Trocknen wird das Gel für 1h bis 2h in eine Sterilbank, die Luft nach unten absaugt, gelegt. Anschließend wird in einer

Expositions-kammer ein Röntgenfilm auf das trockene Gel aufgelegt und einige Tage exponiert.

10x TBE:	1M Tris	121,1g
	0,83M Borat	51,4g
	10mM EDTA	3,6g
	pH 8,3 H <sub>2</sub> O ad 1l	
Silanisierlösung:	5% Dimethyldichlorsilan in Chloroform (v/v)	
4%-Acrylamid-Gellösung:	8M Harnstofflösung	32,5ml
	10x TBE	5ml
	Rotiphorese	7,5ml
	APS (40% w/v)	75µl
	TEMED	25µl
	H <sub>2</sub> O ad 50ml	

### 3.5.4 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen werden von Herrn Wolfgang Hädelt (Physiologische Chemie II, Prof. W. Sebald) an einem automatischen Sequenziergerät nach dem Kettenabbruchverfahren [125] durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen werden nach Angaben des Herstellers des Sequenzier-Kits (Applied Biosystems) mit Hilfe unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleosidtriphosphate angesetzt.

In der Regel werden PCR-Produkte oder Plasmide sequenziert, die zuvor über *Spin Columns* (Kap. 3.4.9) bzw. durch LiCl gereinigt wurden. Je nach Länge des DNA-Fragments werden etwa 50ng DNA und 10pmol Primer benötigt.

### 3.5.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Spektralphotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration:

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäurelösung wird von einem Aliquot ein kontinuierliches Spektrum bei 240nm bis 320nm aufgenommen. Aus dem Quotient des A<sub>260nm</sub>-Wertes und A<sub>280nm</sub>-Wertes kann die Reinheit der Präparation berechnet werden. Der Wert sollte für DNA bei 2 und für RNA bei 1,8 liegen.

Zur Berechnung der Konzentration wird die Absorption bei 260nm bestimmt und mit folgenden Werten gleichgesetzt:

Doppelsträngige DNA:	OD <sub>260nm</sub> = 1 entspricht 50µg/ml
Einzelsträngige DNA und RNA:	OD <sub>260nm</sub> = 1 entspricht 40µg/ml
Oligonukleotide:	OD <sub>260nm</sub> = 1 entspricht 33µg/ml

Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration im Gel:

Die Konzentration einer DNA-Lösung kann durch Auftrennung über Gelelektrophorese bestimmt werden. Man trägt eine geeignete Menge DNA-Probe und einen DNA-Marker auf ein Agarosegel auf und trennt die Banden auf. Da die Konzentration der einzelnen Banden eines Markers bekannt ist, läßt sich die Menge der DNA durch Vergleichen der Ethidiumbromidfärbung bestimmen.

Genauer kann die Konzentration bestimmt werden, indem das Gel durch eine Videokamera digitalisiert wird. Mit Hilfe eines geeigneten Computerprogramms, wie „Image Quant“ der Firma Molecular Dynamics, können die einzelnen Banden mit den Markerbanden durch die Anfärbung miteinander korreliert werden.

### 3.5.6 Northern Blot

#### 3.5.6.1 Transfer der RNA

Nach Auftrennen der RNA unter denaturierenden Bedingungen im Formaldehydgel, wie in Kap. 3.5.3 beschrieben, kann die RNA mit Hilfe eines Vakuums aus dem Gel auf eine Nylonmembran übertragen werden.

Die Vakuum-Blotapparatur wird mit Ethanol und DEPC-H<sub>2</sub>O gereinigt. Ein saugfähiges Papier (z.B. Whatman GB003) in der Größe der Membran wird mit 6x SSC angefeuchtet und auf die Szinterplatte der Apparatur gelegt. Ebenso wird die feuchte Nylonmembran luftblasenfrei auf das Papier plaziert. Nachdem eine „luftundurchlässige Gummimaske“ auf die Apparatur gelegt wird, paßt man das Gel auf die Membran in das Fenster der „Gummimaske“ ein. Die Ränder zwischen Gel und „Gummimaske“ werden mit 1%iger Agaroselösung abgedichtet. Nachdem die Agarose fest ist, wird die Pufferkammer auf die Apparatur aufgesetzt. Das Gel wird mit 6x SSC-Lösung überschichtet und für 2h ein Vakuum von -50 bis -60bar angelegt.

Nachdem die RNA transferiert ist, muß sie auf der Membran fixiert werden. Mit Hilfe eines UV-Stratalinkers (Fa. Stratagene) wird die RNA mit UV-Licht der Energie 1200µJ/cm<sup>2</sup> auf der Nylonmembran quervernetzt. Mit einem Kugelschreiber werden anschließend im UV-Licht die Lauffront, Auftragsfront, 18S- und 28S-rRNA auf der Membran angezeichnet. Die Nylonmembran kann getrocknet werden und in Haushaltsfolie eingeschweißt aufbewahrt werden oder direkt zur Hybridisierung eingesetzt werden.

20x SSC:	3M NaCl 87,7g	
	0,3M Tri-Natriumcitrat	44.1g
	pH 7,0	H <sub>2</sub> O ad 500ml

### 3.5.6.2 Hybridisieren der RNA mit der Sonde

Zur Hybridisierung wird die Nylonmembran, auf die die RNA transferiert wurde, mit 2x SSC befeuchtet und zum Hybridisieren in eine Glasröhre eingelegt. Pro Membran werden 10ml Hybridisierungslösung zugegeben.

In einem Hybridisierungsofen wird die Membran für mindestens 1h bei 55°C vorhybridisiert. In diesem Ofen werden die Röhren so gedreht, daß die Membran, die an den Wänden der Röhre anliegt, bereits mit einer geringen Menge Puffer befeuchtet wird. Alle Lösungen und Puffer sollten vor Gebrauch auf die Temperatur im Ofen äquilibriert sein. Die Temperatur hängt von der Stringenz der hybridisierenden DNA ab. Im Verlauf dieser Arbeit wurden Temperaturen zwischen 50°C und 60°C gewählt.

Die radioaktiv markierte und gereinigte DNA-Sonde (Kap. 3.7.6) wird zum Denaturieren 5min auf 95°C erhitzt und auf Eis gestellt. Die in den Glasröhren vorhandene Hybridisierungslösung wird durch 5ml frische Lösung ersetzt. In diese Lösung wird die DNA-Sonde direkt gemischt, die Röhre gut verschlossen und über Nacht bei 55°C inkubiert.

Nach der Inkubation wird die Membran bei 5°C höherer Temperatur gewaschen, hierzu wird die Lösung dekantiert und die Nylonmembran je zweimal mit Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 jeweils 15min inkubiert. Um die Stringenz zu erhöhen kann noch zweimal mit Waschpuffer 3 gewaschen werden. Anschließend wird die Membran auf ein angefeuchtetes Whatman-Papier (GB003) gelegt und in Folie eingeschweißt. Die Detektion der Radioaktivität erfolgt durch Einlegen in eine Phosphor-Imager-Kassette über Nacht bei RT oder durch Auflegen eines Röntgenfilms für mehrere Tage bei -70°C.

100x Denhardts:	2% Ficoll	2g
	2% Polyvinylpyrrolidon	2g
	2% BSA	2g
		H <sub>2</sub> O ad 100ml
	filtrieren und bei -20°C aufbewahren	

Hybridisierungslösung:	20x SSC	12,5ml
	100x Denhardts	5ml
	0,5M Natriumphosphat pH 6,5	5ml
	10% SDS (w/v)	1ml
	15mg Heringssperma-DNA (5min auf 95°C erhitzen, auf Eis abkühlen)	1,5ml
	DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 50ml

Waschpuffer 1:	2x SSC 50mM Natriumphosphat 0,1% SDS 2mM EDTA DEPC-H <sub>2</sub> O	10ml - 20x SSC 10ml - 0,5M 1ml - 10% SDS 1ml - 200mM ad 100ml
Waschpuffer 2:	1x SSC 0,1% SDS 2mM EDTA DEPC-H <sub>2</sub> O	5ml - 20x SSC 1ml - 10% SDS 1ml - 200mM ad 100ml
Waschpuffer 3:	0,4x SSC 0,1% SDS 2mM EDTA DEPC-H <sub>2</sub> O	2ml - 20x SSC 1ml - 10% SDS 1ml - 200mM ad 100ml

### 3.5.7 Riboquant-DNA-Protektionsassay

Durch diesen Assay der Firma Pharmingen können multiple Transkripte sensitiver als durch einen Northernblot nachgewiesen werden. Dazu wird Gesamt-RNA oder polyA<sup>+</sup>-RNA mit den radioaktivmarkierten „anti-sense“-Sonden hybridisiert und danach überstehende einzelsträngige RNA bzw. DNA durch eine Nuclease abgebaut. Die Hybride werden in einem Polyacrylamidgel (s. 3.5.3) getrennt und anhand des Sondenstandards identifiziert.

Die Durchführung erfolgt nach den Angaben der Firma Pharmingen; dargestellt im Handbuch des Riboquant Assay Auflage 5, April 1998.

Zum Einsatz von selbsthergestellten Sonden, wird DNA mittels den Primern TOPO-1 & -2 aus dem Vektor pcDNA3.1./V5/His TOPO, in den die Sondensequenz eingebracht wurde, durch PCR amplifiziert. Dabei entsteht ein PCR-Produkt, das sowohl die Sondensequenz als auch 3' davon T7-Promotor-Sequenzen enthält. 20ng des gereinigten PCR-Produktes werden zur radioaktiven Markierung mittels der T7-Polymerase eingesetzt. Folgende Schritte werden entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

## 3.6 Amplifikation von DNA

### 3.6.1 Primer

Die Länge der Primer oder Oligonukleotide, die in einer PCR eingesetzt werden, liegt normalerweise bei etwa 20 Nukleotiden. Der GC-Gehalt sollte zwischen 40% und 60% liegen. Die Primer werden meist so gewählt, daß die Schmelztemperatur nach der „2AT und 4GC-Regel“ (s. Tab. 2.4) zwischen 50°C und 60°C liegt.



### 3.6.2 Reverse Transkription

Da eine direkte Vervielfältigung von RNA durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Kap. 3.6.3.) nicht möglich ist, muß die RNA mit Hilfe des retroviralen Enzyms „Reverse Transkriptase“ in DNA umgeschrieben werden (Erststrangsynthese).

Verwendet man einen Oligo-dT-Primer zur Erststrangsynthese, werden alle mRNA-Moleküle umgeschrieben, da diese eine Poly-A-Sequenz am 3'-Ende besitzen. Durch die Verwendung genspezifischer Primer ist es aber auch möglich nur eine gewünschte Sequenz zu erhalten.

Für die Reverse Transkription sollte der Primer immer frisch aus einer Stammlösung verdünnt werden. Dazu werden 1 bis 5µg Gesamt-RNA mit dem Primer vermischt und für 5min auf 70°C erhitzt. Man stellt den Ansatz 5min auf Eis und gibt anschließend Reversen Transkriptionspuffer, DTT, Reverse Transkriptase, RNasin und dNTPs hinzu. Die dNTPs bestehen aus einer Mischung von dATP, dCTP, dGTP und dTTP zu gleichen Teilen. Der 15µl Reaktionsansatz wird gut vermischt und für 60min bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation kann diese so entstandene cDNA direkt in eine PCR eingesetzt werden oder für etwa zwei Wochen bei -20°C aufbewahrt werden.

Reverser Transkriptionsansatz:	1-5µg Gesamt-RNA	xµl
	10µM Primer	2µl
	5x M-MLV-RT-Puffer	6µl
	M-MLV Reverse Transkriptase	1µl
	100mM DTT	1µl
	10mM dNTPs	1µl
	RNasin (40U/µl)	1µl
		DEPC-H <sub>2</sub> O ad 30µl

5x M-MLV-Reverse-Transkriptase- Puffer:	250mM Tris-Cl, pH 8,3
	375mM KCl
	15mM MgCl <sub>2</sub>

### 3.6.3 PCR (Standard-Protokoll)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, mit der geringe Mengen an DNA vervielfältigt werden können [126,127]. Ein typischer PCR-Ansatz wird auf 100µl berechnet.

Die Konzentration des Magnesiumchlorids ist abhängig vom verwendeten Primer. Meist setzt man Magnesiumchlorid in einer Endkonzentration von 1,5mM ein. Die Menge an DNA variiert, von Plasmid-DNA verwendet man etwa 5ng, von genomischer DNA 1µg. Das Reaktionsvolumen liegt zwischen 10µl und 100µl. Falls mehrere Reaktionen gleichzeitig angesetzt werden sollen, ist es sinnvoll einen sogenannten „Mastermix“ herzustellen, um Pipettierfehler zu vermeiden.

Die verschiedenen Stufen der PCR-Reaktion verlaufen folgendermaßen. Zunächst wird der Ansatz für 5min auf 94°C erhitzt, um die DNA zu denaturieren. Anschließend läßt man den Ansatz folgenden Reaktionszyklus 25 bis 40 mal durchlaufen:

• Denaturierung	94°C	0,5min -1min
• Annealing	50-60°C	0,5min -1min
• Elongation	72°C	1min - 3min

Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz und der Prozessivität der verwendeten Polymerase. Nachdem der Ansatz die Reaktionszyklen durchlaufen hat, läßt man die Reaktion noch für 5min auf 72°C inkubieren, um vorzeitig abgebrochene DNA-Stränge aufzufüllen. Anschließend kühlt man den Reaktionsansatz auf 4°C und bewahrt ihn bei -20°C auf.

PCR-Ansatz:	10x Taq-Puffer	10µl
	25mM MgCl <sub>2</sub>	6µl
	15µM 5'-terminaler Primer	2µl
	15µM 3'-terminaler Primer	2µl
	10mM dNTP	2µl
	Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)	0,5µl
	Matrizen-DNA	xµl
		H <sub>2</sub> O ad 100µl

10x Taq-Polymerase-Puffer: (ohne MgCl <sub>2</sub> )	1M Tris-Cl, pH 8,3 500mM KCl
---	---------------------------------

### 3.6.4 RT-PCR

Die RT-PCR ist eine Kombination aus Reverser Transkription und PCR. Als Matrize setzt man hier die durch Reverse Transkription erhaltene cDNA ein (Kap. 3.8.2). In einem 100µl PCR-Ansatz verwendet man 2µl eines 15µl RT-Ansatzes und führt eine PCR mit Primern durch, die für das gesuchte Gen spezifisch sind.

### 3.6.5 Klonierung von PCR-Produkten mittels des TOPO-Cloning Kits

Sollen PCR-Produkte weiter vervielfältigt und gentechnisch bearbeitet werden, müssen sie in einen Vektor eingebracht werden, der dann in *E. coli* kloniert wird. Mit Hilfe des TOPO-Cloning Kits können PCR-Produkte direkt, ohne weitere Modifikation, problemlos kloniert werden.

Die Durchführung erfolgt entlang den Herstellerangaben der Fa. Clontech. Verwendung finden dabei der TOPO-Vektor pCR2.1 und der Vektor pCDNA3.1./V5/HisTOPO, der zur Expression in Eukaryonten verwendet werden kann.

### 3.7 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

#### 3.7.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ist eine Methode, die bei molekularbiologischen Arbeiten häufig angewendet wird. Zur Durchführung einer Restriktionsreaktion wird isolierte DNA mit dem für das Enzym vorgeschriebenen 10x Restriktionspuffer auf die optimale Salzkonzentration eingestellt (Kap. 2.5.1). Die Dosis an Enzym richtet sich nach der eingesetzten DNA-Menge und nach den Herstellerangaben.

Man läßt den Ansatz bei entsprechender Temperatur 1 bis 3h inkubieren. Die Vollständigkeit der Hydrolyse und die Größe der entstandenen Fragmente können mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 3.5.1) überprüft werden.

#### 3.7.2 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente, wie PCR-Produkte, in einen Vektor ligieren zu können, müssen die 5'-Enden des DNA-Doppelstranges phosphoryliert werden. Der Vektor selbst liegt dephosphoryliert vor (Kap. 3.7.3).

Zur Durchführung dieser Reaktion wird gereinigte DNA in einem geeigneten Ansatzvolumen mit der entsprechenden Menge an 10x T4-DNA-Polynukleotidkinasepuffer auf die optimale Salzkonzentration eingestellt. Da in diesem Puffer kein ATP vorhanden ist, muß ATP in der Endkonzentration von 1mM zugegeben werden. Von der T4-DNA-Polynukleotidkinase gibt man 0,5 - 1µl zu (entspricht 5-10U). Mit H<sub>2</sub>O wird der Ansatz auf das entsprechende Volumen aufgefüllt und für 90min bei 37°C inkubiert.

Phosphorylierung von PCR-Produkten:	10x T4-PNK-Puffer	2µl
	10mM ATP	2µl
	T4-DNA-PNK (10U/µl)	1µl
	DNA-Probe (<500µg)	xµl
		H <sub>2</sub> O ad 20µl

10x T4-Polynukleotidkinasepuffer:	700mM Tris-Cl, pH 7,6
	100mM MgCl <sub>2</sub>
	50mM DTT

### 3.7.3 5'-Dephosphorylierung von DNA

Um eine unerwünschte Selbstligation von Vektor-DNA zu vermeiden, müssen die bei einem Restriktionsverdau entstandenen 5'-Phosphatenden mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase entfernt werden.

1-5µg Vektor-DNA werden in einem 50µl Ansatz mit 10x Puffer auf die entsprechende Salzkonzentration eingestellt, 2U Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) zugegeben und für 40min bei 37°C inkubiert. Nach der Phosphorylierung wird der Ansatz durch Phenolisieren und Ethanol-fällung gereinigt (Kap. 3.4.1).

Dephosphorylierung:	10x CIP-Puffer	5µl
	Alkalische Phosphatase (CIP)	2µl
	Vektor DNA (1-5µg)	xµl
		H <sub>2</sub> O ad 50µl

10x CIP-Puffer:	500mM Tris-Cl, pH 8,5
	1mM EDTA

### 3.7.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die enzymatische Verknüpfung von DNA-Fragmenten wird mit Hilfe der T4-DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 im unten beschriebenen Puffer durchgeführt. Man setzt in der Regel Fragment-DNA zu Vektor-DNA im molaren Verhältnis von 3:1 ein. Vor einer sog. Blunt-End-Ligation muß die Fragment-DNA phosphoryliert werden, der Vektor dephosphoryliert (Kap. 3.6.2 und 3.6.3).

In einem 10µl Ligationsansatz werden 100ng Vektor-DNA mit der entsprechenden Menge an Fragment-DNA, der T4-Ligase und dem 10 x Puffer vermischt und bei 16°C über Nacht inkubiert.

Zur Transformation durch Elektroporation (Kap. 3.2.5) werden 1-2µl des Ligationsansatzes auf je 50µl *E.coli*-Bakterien eingesetzt. (Kap. 3.2.4).

Ligationsansatz:	10x T4-DNA-Ligasepuffer	1µl
	T4-DNA-Ligase	1µl
	Insert-DNA (10-50pmol)	xµl
	Vektor-DNA (100ng)	yµl
		H <sub>2</sub> O ad 10µl

10x T4-Ligasepuffer:	500mM Tris-Cl, pH 7,8
	100mM MgCl <sub>2</sub>
	100mM DTT
	10mM ATP
	500µg/ml BSA

Falls das DNA-Fragment nicht als Einzelfragment, sondern in einem Gemisch von Fragmenten vorliegt, kann auch eine sogenannte „In-Gel-Ligation“ durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wird die DNA nach der Phosphorylierung auf einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt (Kap. 3.5.1). Unterhalb der betreffenden Bande wird ein gleichgroßes Fragment aus der Agarose ausgeschnitten und mit 0,6% Agarose (*Low Melting Grade Agarose*) gefüllt. Bei 4°C läßt man die Agarose für 15min abkühlen und legt erneut Spannung an. Mittels einer UV-Handlampe kann die weitere Auftrennung beobachtet werden. Sobald die gewünschte DNA in die 0,6% Agarose eingelaufen ist, stoppt man den Lauf und hebt mit einem Spatel die Agarose mit dem DNA-Fragment aus dem Gel. In einem Reaktionsgefäß erhitzt man die DNA im Gel für 5min auf 65°C und läßt das Gel auf 37°C abkühlen. Auf diese Weise kann die DNA pipettiert und wie beschrieben zur Ligation eingesetzt werden. Vor der Transformation muß der Ligationsansatz, um ihn pipettieren zu können, erneut für 5min auf 65°C erhitzt und auf 37°C abgekühlt werden.

### 3.7.5 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch Random Priming

Diese Prozedur wird mit dem sogenannten „*DNA-Labeling-Kit*“ der Fa. Pharmacia durchgeführt. Mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I und von Hexanukleotiden wird ein DNA-Fragment radioaktiv markiert und kann zur Hybridisierung als Sonde in einen Northern Blot oder Southern Blot eingesetzt werden.

Von dem zu markierenden Fragment werden 50ng in 34µl H<sub>2</sub>O verdünnt, für 5min auf 95°C erhitzt und auf Eis gestellt. Dann pipettiert man Reagent-Mix, radioaktives Isotop [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-CTP und Klenow-Fragment zu und läßt diesen Ansatz mindestens 45min bei 37°C inkubieren. Zur Abtrennung der nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide wird der Reaktionsansatz über eine Sephadex G50-Säule gereinigt (Herstellung s.u.)

Die Säule wird in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gestellt und mit 300µl Puffer D äquilibriert. Die radioaktiv markierte Sonde wird vorsichtig auf das Säulenmaterial aufgetragen. Nachdem die Sonde eingelaufen ist, wird die Säule mit 300µl Puffer D nachgespült. Die Sephadex G50-Säule wird in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und 100µl Puffer D werden auf das Säulenmaterial pipettiert. Dieser Vorgang wird bis zu 10 mal wiederholt. Anschließend werden die einzelnen Fraktionen in den Reaktionsgefäßen mit dem Phosphorkanal eines  $\beta$ - $\gamma$ -Detektors vermessen. Man kann beim Durchmessen der einzelnen Fraktionen in der Regel zwei Elutionspeaks an Radioaktivität finden, wenn die Reaktion mit dem Klenow-Fragment funktioniert hat. In den Reaktionsgefäßen der ersten radioaktiv markierten Fraktion

Mononukleotide. Die Fraktionen mit der Sonde werden zusammenpipettiert und für 5min auf 95°C erhitzt. Anschließend werden die Proben schnell auf Eis abgekühlt und können zur Hybridisierung eingesetzt werden.

Herstellung der Sephadex G50-Säule:

10g Sephadex G50 werden in 160ml DEPC-H<sub>2</sub>O gequollen und vier- bis fünfmal mit DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wird das Säulenmaterial in Puffer D äquilibriert und nach Autoklavieren bei 4°C aufbewahrt.

Eine Pasteurpipette wird mit Glaswolle abgedichtet und bei 180°C für 4h sterilisiert. Die Pasteurpipette wird in einen Meßzylinder mit DEPC-H<sub>2</sub>O gestellt und langsam bis 2cm unter dem Rand mit Sephadex G50 gefüllt.

Reaktionsansatz:	50ng DNA-Fragment	34µl
	Reagent-Mix	10µl
	2MBq [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-CTP (54µCi)	5µl
	Klenow-Fragment	1µl

Reagent-Mix: enthält dATP, dGTP, dTTP und Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz, genauere Angaben sind nicht bekannt

Puffer D: 10mM Tris-Cl  
10mM NaCl 0,5mM  
EDTA,  
pH8,5

