

4 Methoden

4.1 Probenmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete Probenmaterial wurde gewonnen, in Kooperation mit der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universität Halle-Wittenberg, aus transmuralen, nicht vernarbten, linksventrikulären Myokardproben von 27 explantierten, terminal insuffizienten Herzen im Rahmen einer Herztransplantation. Das Kontrollmaterial wurde von 20 aus klinischen Gründen nicht transplantierbaren Spenderherzen gewonnen. Das Herzgewebe wurde kurz nach Entnahme (maximal fünf Minuten) in flüssigen Stickstoff eingelagert. Die Patienten und die Angehörige der Spender waren über die Verwendung des Gewebes für wissenschaftliche Zwecke aufgeklärt und hatten ihre Einwilligung gegeben. Erweiterte Information über die Charakterisierung der Patienten, z.B. anhand welcher Methodik die linksventrikuläre Ejektionsfraktionen bestimmt wurde, stand uns nicht zu Verfügung.

4.2 RNA-Präparation

Die Gesamt-RNA wurde aus dem Probenmaterial nach Chirgwin et.al. durch CsCl-Ultrazentrifugation präpariert. Zuerst wurden die zuvor in flüssigem Stickstoff gelagerten Proben gewogen, danach in Aluminiumfolie verpackt und sofort wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewicht der Probe sollte dabei 1/10 des Volumens an GTC-Lösung (8ml) nicht überschreiten. Anschließend wurden die Proben mit einem Hammer pulverisiert, wobei das Auftauen durch wiederholtes Eintauchen im flüssigen Stickstoff verhindert wurde. Das entstandene Pulver wurde mit einem Spatel in, 8 ml GTC-Lösung gefüllten, 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und dann sofort mit einem Ultraturax homogenisiert. Dieser wurde danach mit 0,1% SDS-Lösung und Aqua bidest gespült. 2,6 ml CsCl-Lösung wurden in einem Beckmann-Röhrchen (Ultrazentrifugen-Röhrchen für Sorval-SW 40-Rotor) pipettiert. Auf diese wurde vorsichtig das Homogenisat geschichtet. Die fertigen Probenröhrchen wurden bei 22°C und 150000 x g (ca 33 000 rpm) über 21 h zentrifugiert. Danach wurde der Überstand bis ca 1 cm vom Boden abgenommen und der Rest wurde so dekantiert, dass die Zwischenphase das entstandene RNA-Pellet nicht verunreinigen konnte. Den unteren Teil des Beckman-Röhrchens wurde mit einem Skalpell abgeschnitten und auf Eis gelegt.

Bei allen folgenden Schritten ist wichtig immer DEPC behandeltes H₂O zu benutzen um die ubiquitär vorkommende RNAsen zu denaturieren. Aus diesem Grunde wurde auch bei der Vorbereitung allen Puffern DEPC behandeltes H₂O verwendet.

Das RNA-Pellet wurden in 200µl TSPE-Puffer gelöst und in ein Greiner-Röhrchen überführt. Der letzte Schritt wurde wiederholt, so dass es sich insgesamt 400µl ergeben. Anschließend wurde die RNA mit 0,1 Vol 3M Natrium-Azetat und 10 ml 96% Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Die Proben wurden 30 Min lang bei 10000 rpm und -10°C in einem Sorvall HB-6 Rotor zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und das Pellet ca 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das ausgetrocknete Pellet wurde dann auf Eis in 200µl DEPC behandeltem H₂O gelöst und in einem Eppendorf-Tube überführt. Der letzte Schritt wurde mit 100 µl DEPC-behandeltem H₂O wiederholt, so dass insgesamt ein Endvolumen von 300µl resultierte. Die RNA Konzentration wurde dann mit einem Spektralphotometer bei A₂₆₀ bestimmt. Anschließend wurde 0,1 Vol 3M Natrium-Azetat, pH 6,0 und 2,5 Vol Ethanol hinzugefügt und erneut über Nacht bei -20°C gefällt. In einer kühlbaren Eppendorf-Zentrifuge wurden die Tubes 30 Min bei 14000 rpm und -10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend dekantiert und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und auf Eis in 100µl DEPC-H₂O gelöst. Zum Schluss wurde die gewonnene RNA erneut bei A₂₆₀ spektralphotometrisch bestimmt. Eine Qualitätskontrolle wurde einerseits durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel und durch den Quotienten der Absorption bei A₂₆₀ und A₂₈₀ durchgeführt. Dieser Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die RNA Konzentration wurde nach folgender Gleichung bestimmt:

$$(4.1) \quad C = A_{260} \cdot E \cdot V$$

C: Konzentration der RNA in g/ml

A₂₆₀: Absorption bei 260 nm

E: Extinktionskoeffizient 40 ng/µl für RNA
 50 ng/µl für DNA

V: Verdünnung des Messansatzes

Um Degradation zu vermeiden, wurde die RNA bei -80°C gelagert.

4.3 Reverse Transkription

Die einsträngige mRNA wird durch reverse Transkription (RT) in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Eine doppelsträngige cDNA ist notwendig für die spätere Polymerasenkettenreaktion, da die Polymerase nicht Uracil wie in der mRNA sondern nur Thymin Basen verwenden kann. Zudem ist eine doppelsträngige cDNA viel stabiler und von ubiquitär vorkommenden RNAsen nicht degradierbar.

Für diese Reaktion wurde reverse Transkriptase aus Retroviren verwendet. Wie schon oben erwähnt ist die RNA unter normalen Umweltbedingungen aufgrund von ubiquitär vorhandenen, RNA denaturierenden Enzymen (RNasen) sehr labil. Deshalb muss mit grosser Sorgfalt sichergestellt werden, dass alle bei der reversen Transkription verwendeten Chemikalien und Geräte RNase-frei sind.

Die Reverse Transkriptase benutzt die mRNA als Template und baut dazu die entsprechende cDNA. Dazu sind Primer (Startermoleküle) benötigt, die komplementär an die mRNA binden können. Um die gesamte mRNA umzuschreiben verwendet man Hexanucleotid-Primer, die durch ihre Kürze an verschiedenen zufälligen Stellen der mRNA hybridisieren (daher auch random Primer benannt).

Der Ansatz für die reverse Transkription enthält pro Probe:

Random Primer (100 ng/μl)	4 μl
Gesamt-RNA x μl (250 ng)	2,5 μl

3 min 70o C; 5 min 1o C (während dieser Zeit Zugabe der folgenden Komponenten)

5x first strand-Puffer	5 μl
dNTP (je 12,5 mM)	1 μl
DTT (10 mM)	2,5 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0,5 μl
Super Script™ II RT (200 U/μl)	0,25 μl
DEPC-Wasser	ad 25 μl Gesamtansatzgröße

Der gesamte Ansatz wurde bei 42°C für eine Stunde inkubiert und die Reaktion durch dreiminütiges Erhitzen auf 95°C beendet. Die erhaltene cDNA wurde anschließend direkt in der PCR-Reaktion eingesetzt werden.

4.4 Aufbau der kompetitiven Standard-kalibrierten RT-PCR für XIAP und hIAP-1

Viele Gene sind auf mRNA Ebene so niedrig exprimiert, dass sie direkt z.B. via Northern-Blot Hybridisierung kaum zu quantifizieren sind. Dieses Problem kann gelöst werden in dem eine reverse Transkription mit einer Polymerasenkettenreaktion verbindet. Dabei wird zunächst die einsträngige mRNA in einer doppelsträngigen cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription.) Diese Doppelstrang DNA ist essentiell für die Polymerasenkettenreaktion, die die so gewonnene cDNA Sequenz vervielfältigen kann. Wenn man dazu zwei cDNA Sequenzen unterschiedlicher Länge nimmt und von einer davon die genaue Konzentration kennt, kann man die genaue Konzentration der zweiten DNA eruieren. Beide Templates werden miteinander um die Substrate der Reaktion kämpfen und es kommt zu unterschiedlichen Ergebnissen. Wenn man von der zu untersuchende cDNA verschiedene Konzentrationen nimmt und immer gegen die gleiche Konzentration an Standard cDNA hybridisieren lässt, kommen Banden unterschiedlicher Größe und Luminiszenz in der Gelelektrophorese zu Stande. (s. Abb. 4.1)

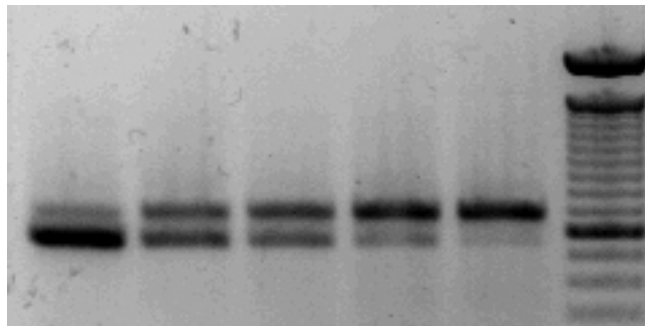


Abb 4.1 Beispiel einer kompetitiven RT-PCR. Die untere Bande entspricht den Standard in, von links nach rechts gesehen, abnehmender Konzentration. Die obere Bande entspricht das zu untersuchende Material. Rechts am Rand die molekulare Skala. Mit zunehmender Konzentration des Standards wird weniger Zielsequenz DNA amplifiziert

Die Gele wurden dann photographiert und densitometrisch analysiert und die Konzentration der zu untersuchende cDNA kalkuliert. (s. Kap 4.4.5)

4.4.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Die durch die reverse Transkription entstandene cDNA wurde mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) in einem Thermocycler (TRIO Thermoblock Biometra, Göttingen) amplifiziert. Jede PCR besteht aus drei Schritten die mehrmals zyklisch wiederholt werden. (s. Abb. 4.2)

Im 1. Schritt werden die entstandenen Doppelstränge durch Erhitzen auf 95°C getrennt.

Im 2. Schritt werden die Proben auf der die Oligonukleotid-Primer an die DNA hybridisieren können (Annealing Temperatur)

Im 3. Schritt wird die Probe auf 72°C erwärmt, weil die Taq-DNA Polymerase bei dieser Temperatur ihr Syntheseoptimum erreicht. An den Primern beginnend ergänzt sie dann den DNA Einzelstrang zu einem Doppelstrang. Anschließend werden die Proben wieder auf 95°C erhitzt und somit ein neuer Zyklus initiiert. Theoretisch verdoppelt sich so bei jedem Zyklus die DNA-Menge. Nach 30 Zyklen würde sich die Anzahl der Zielmoleküle auf 2^{30} d.h. ca. $1,07 \times 10^9$ erhöhen. In Praxis wird aber dieser Wert aufgrund von abnehmenden Konzentrationen an Substraten (dNTPs und Primern), wegen unvollständigem Annealing und unvollständiger Strangsynthese nicht erreicht. Abhängig der Expression des Zielmoleküls, wählt man die Anzahl der PCR Zyklen (zwischen 20 und 40). Für die kompetitive PCR ist der Ziel diese Zyklenanzahl so auszuwählen, dass die Reaktion nicht im Sättigungsbereich der Reaktionskurve liegt. Tabelle 4.1 zeigt eine Übersicht über die Primer und Bedingungen der verwendeten PCR.

Gen	Primer	Primersequenz (in -5' zu -3' Richtung)	Fragmentgröße (bp)	Tan (°C)	Zyklen
h-IAP-1	S	GTT CAT CCG TCA AGT TCA AG	680	52	33
	AS	GTT CTT TCT TCT GGT AGT CTC C			
XIAP	S	GAT GCT GTG AGT TCT GAT AGG	446	52	33
	AS	CTT AAT GTC CTT GAA ACT GAA C			

Tab. 4.1. Übersicht der Primer und der Reaktionsbedingungen für die PCR. Tan Annealing Temperatur

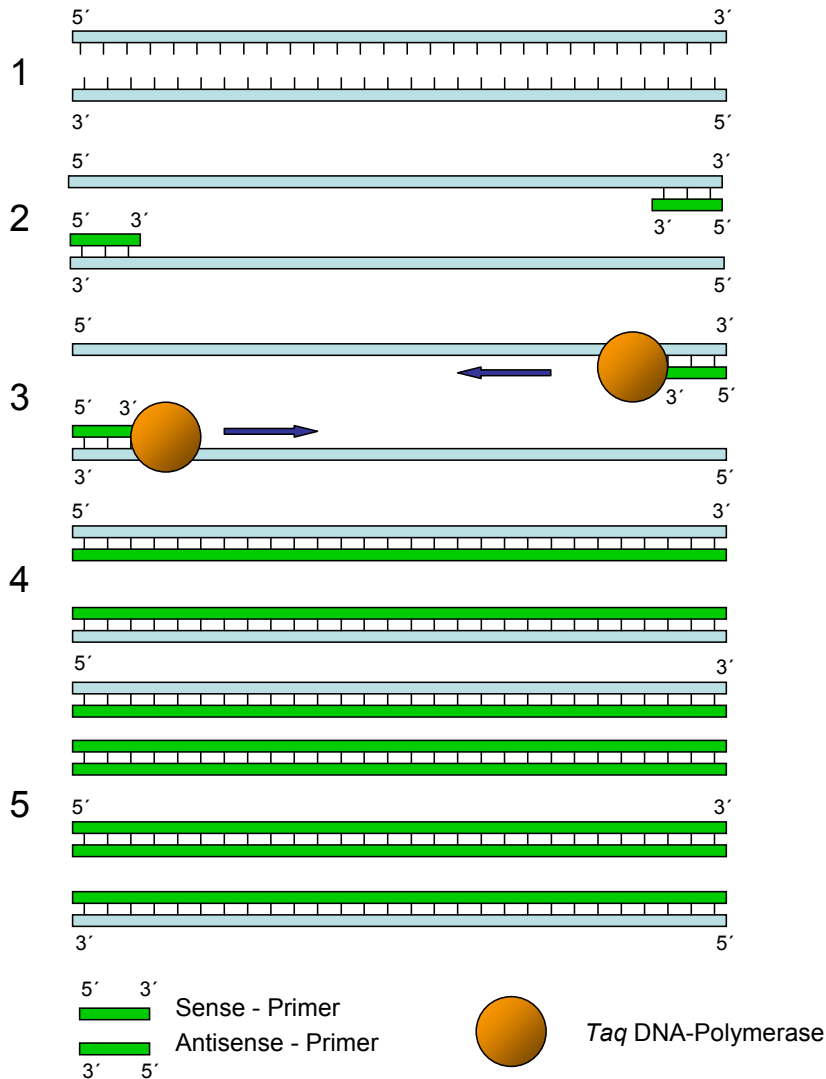


Abb 4.2. Ablauf einer Polymerasekettenreaktion. 1. DNA wird auf 95°C erhitzt und in zwei Strängen getrennt. 2. Kühlung des Reaktionsgemisches auf der Annealing Temperatur und anhaften der Primer. 3. DNA Polymerase bindet an Primer und DNA und beginnt mit DNA-Synthese. 4. Entstehung zwei kompletter DNA Produkte nach einem Zyklus 5. Nach 2 Zyklen Entstehung vier DNA Produkten.

Anschließend wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Gele wurden photographiert, die daraus entstandene Negative eingescannt und weiter ausgewertet (s. Kap 4.4.5).

4.4.2 Auswahl der Primer

Primer sind kleine Oligonukleotidsequenzen (zwischen 8 und 20 Basen Länge). Sobald die DNA durch Erhitzen in zwei Stränge geteilt ist haften diese Oligonukleotide an den Sense- bzw. Antisense DNA-Strang. Sie dienen als Startsequenz für die DNA Polymerase.

Die Primer wurden mittels DNA-Software (Generunner) nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- i. Die Primer sollten ein 300 bis 600 bp langes PCR-Produkt liefern. Diese Länge erleichtert die Auftrennung im Agarosegel und verringert die Wahrscheinlichkeit, dass die DNA Polymerase den DNA-Strang nicht vollständig abliest. Bei der kompetitiven RT-PCR würde dies möglicherweise aufgrund der Längedifferenz auch die Amplifikation von Standard und Zielsequenz unterschiedlich beeinflussen. Zudem liegt die Fehlerquote der Taq DNA-Polymerase bei 1 pro 10000 bp. Je kürzer das zu amplifizierende Fragment, desto weniger die Wahrscheinlichkeit der Amplifizierung falscher Fragmenten.
- ii. Um die Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA erkennen zu können, ist es günstig, Sense und Anti-sense-Primer in zwei unterschiedliche Exone zu legen. Ein PCR Produkt der DNA würde sich aufgrund der darin enthaltene Introns als deutlich größere Bande darstellen
- iii. Sense- und Antisense-Primer sollten eine gleiche, möglichst hohe Schmelztemperatur haben. Dadurch kann eine relativ hohe Annealing-Temperatur gewählt werden, wodurch Mispriming (Hybridisieren an falsche Matrize) unwahrscheinlicher wird.
- iv. Die Primersequenzen sollten mit einer Sequenz-Datenbank verglichen werden, um eine Erzeugung unerwünschter PCR-Produkte auszuschliessen.
- v. Die Primer sollten eine geringe Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstrukturen (z.B. Haarnadelschleifen) zeigen und keine Dimere bilden
- vi. Die Sense- und Antisense-Primer sollten jeweils an nur eine Stelle im Zielfragment anhaften können.

4.4.3 PCR Ansatz

Für eine PCR wurde wie folgt ein 25µl Ansatz auf Eis pipettiert,

10x PCR Buffer	2,5µl
dNTP (200µM)	1,5µl
Sense Primer (10 pmol/µl)	0,5µl
Antisense Primer (10 pmol/µl)	0,5µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,2µl
RT Ansatz	1,0µl
Standard (unterschiedliche Verdünnungsreihen)	2,0µl
DEPC-H ₂ O	ad 25µl

danach mit 2 Tropfen Mineralöl bedeckt, kurz geschüttelt und zentrifugiert. Die PCR fand in einem Thermoblock mit folgender Programmierung statt:

Schritt 1	Denaturieren	95°C	3 min
Schritt 2	Denaturieren	95°C	30 sec
Schritt 3	Primer Annealing	52°C	30 sec
Schritt 4	DNA Synthese	72°C	30 sec
Schritt 5	33 Zyklen der Schritte 2 bis 4		
Schritt 6	Abschluss DNA Synthese	72°C	5 min
Schritt 7	Kühlen	4°C	

4.4.4 Kompetitive RT-PCR

Eine genaue Quantifizierung von mRNA-Transkripten ermöglicht die kompetitive RT-PCR. Dabei wird mehreren RT-Reaktionen eine konstante Menge Gesamt-RNA sowie Standardmoleküle zugefügt. Weil die Standardmoleküle die gleichen Primer-Bindungsstellen wie die zu messende Zielsequenz haben, werden die Standards bei der nachfolgenden PCR-Reaktion in gleicher Weise amplifiziert. Durch die unterschiedliche Länge von Standard- und Zielsequenz, stellen sich in der Gelelektrophorese zwei unterschiedliche Banden dar. Sind die Banden gleich stark, waren auch in der RT-Reaktion ebenso viele Standard- wie Zielsequenzmoleküle vorhanden. Aus der bekannten Menge der Standards ergibt sich so die

Expressionshöhe der Ziel-mRNA. Durch mathematische Verfahren lassen sich sogar absolute mRNA- Molekülzahlen ermitteln (s. Kap. 4.4.5)

4.4.5 Synthese des Standard DNA-Fragmente für die kompetitive RT-PCR

Für die Durchführung einer kompetitiven RT-PCR wird die Konstruktion eines internen Standards vorausgesetzt. Dieser sollte folgende Eigenschaften in sich vereinen

- Damit der Standard genauso vervielfältigt wird wie die Zielsequenz, muss er die gleichen Primer-Bedingungen besitzen.
- Um den Standard bei der Elektrophorese gut von der Zielsequenz trennen zu können, soll er sich um 100-150 bp von dieser unterscheiden.

Die Konstruktion der Standards, dargestellt in Abb. 4.3, wurde mit Hilfe von einem sog. Linker-Primer nach Förster (Förster 1994) durchgeführt.

Als erstes wurde eine normale PCR mit den spezifischen Sense- und Antisense-Primer durchgeführt. Bei der ersten Reamplifikation wurde 1 µl einer 1:1000 Verdünnung der ersten Reaktion genommen und anstelle des Antisense Primers ein Linker-Primer benutzt. Dieser besteht aus einer Teilsequenz innerhalb des Zielprodukts (nested primer) und aus einem Teil (10 bp) des 3`-Ende des Antisense-Primers. Es entsteht eine verkürzte Sequenz, die am Ende ein Stück des Antisense-Primer-Bindungsstelle besitzt. Vom entstandenen Produkt wurde wiederum 1µl einer 1:1000 Verdünnung für eine erneute PCR eingesetzt. Beim nächsten Schritt wurden wieder die Sense- und Antisense-Primer benutzt. Die so entstandene Sequenz ist gegenüber der Zielsequenz um eine bestimmte Länge verkürzt und besitzt die gleiche Antisense-Primer-Bindungsstelle wie die Zielsequenz.

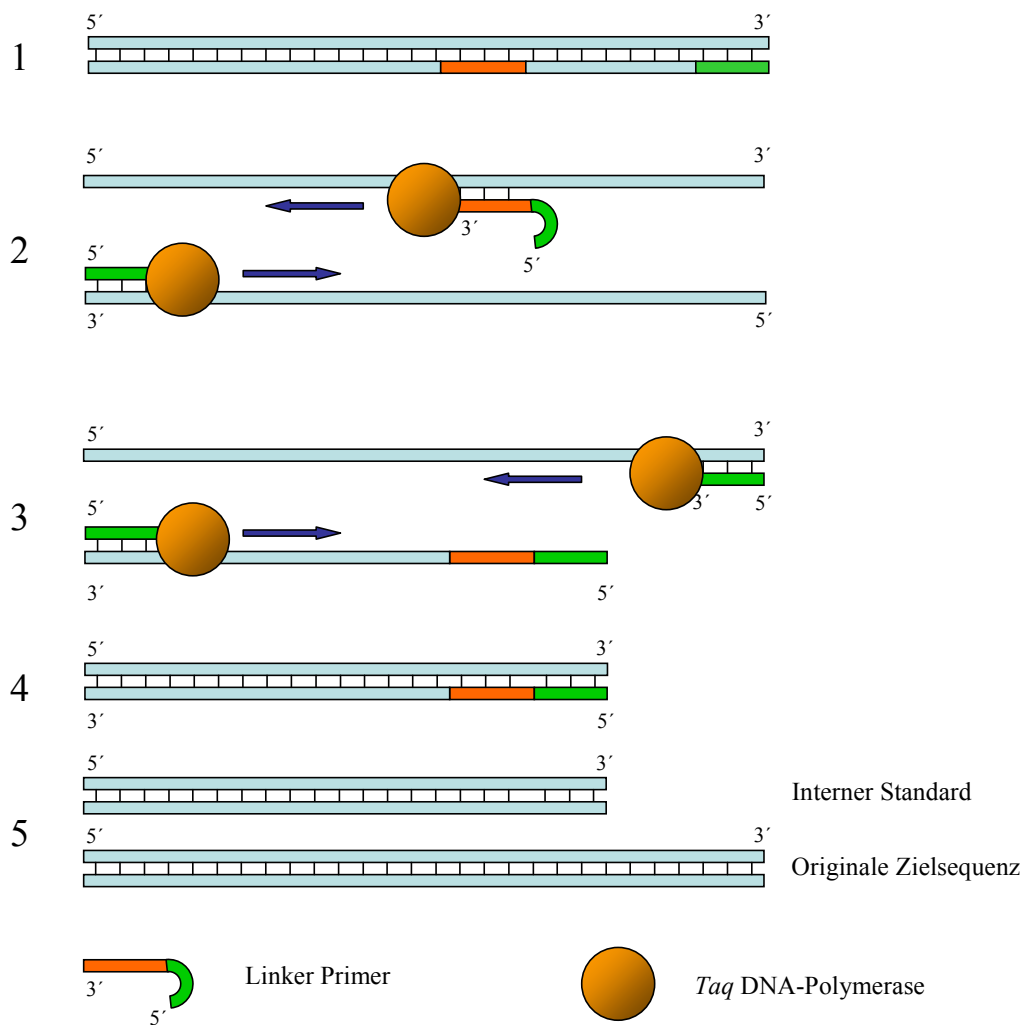


Abb 4.3 Herstellung eines Standards. 1. Initiale cDNA wird erhitzt und in zwei Strängen gespalten. 2. In der zweiten Reaktion haftet der Linker Primer auf dem kodierenden Strang und mit Hilfe der *Taq* Polymerase wird ein komplementärer Strang synthetisiert. 3 und 4. Im nächsten Zyklus wird der vorher synthetisierte komplementäre Strang als Matrix benutzt und so ein verkürztes Endprodukt erzeugt. 5. Vergleich Zielsequenz mit internem Standard.

Gen	Linker-Primersequenz (in 5' zu 3'Richtung)	Fragment (bp)	Standard (bp)	Färbefaktor (Fragment/Standard)
h-IAP-1	GGT AGT CTC CGC TGC AAT ATT TCC TTT TAC	680	533	1,2758
XIAP	GAA ACT GAA CGA TAT TTG CAC CCT GGA TAC	446	264	1,6894

Tab 4.2 Übersicht der Linker-Primer und der Färbefaktor zur Konstruktion des internen Standards.

4.4.6 Bestimmung der Molekülzahl der Standard-DNA Fragmente

Nach der Konstruktion des Standards wurde eine Sequenzierung durchgeführt und dann kloniert (s. Kap 4.7). Nach Sequenzierung und Identifizierung des richtigen Klons wurde das Standard von der Plasmid DNA durch Restriktion herausgeschnitten (s. Kap. 4.8). Nach gelektrophoretischer Auftrennung, wurde das Standard dann aus dem Agarosegel herausgeschnitten und daraus eluiert (s. Kap. 4.6). Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde die Standardmolekülenzahl nach folgender Formel bestimmt. (Formel 4.2). Dabei muss die Anzahl der Basen von der Restriktionsstelle bis zum Anfang bzw. Ende des Standards berücksichtigt werden, da das durch die Klonierung gewonnene Standard leicht länger ist.

(4.2)

$$x = \frac{A_{260} \cdot V_F \cdot N_{Av}}{(n_A \cdot A_A) + (n_T \cdot A_T) + (n_G \cdot A_G) + (n_C \cdot A_C)}$$

x	Molekülzahl pro l
A_{260}	Absorption bei 260 nm
V_F	Verdünnungsfaktor
N_{Av}	Avogadro Konstante ($N_{Av} = 6,0221367 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
n_A, n_T, n_G, n_C	Anzahl der jeweiligen Nukleotide des DNA Fragmentes
A_A, A_T, A_G, A_C	Absorptionskoeffizient der jeweilige Nukleotide

Nach der Bestimmung der Standardmolekülenzahl wurden Verdünnungsreihen in 10er Schritten gefertigt und mehrere PCR mit normalen RTs durchgeführt um den Äquivalenzpunkt zu bestimmen. Danach wurden 5-6 Verdünnungsreihen um diesen Punkt für jedes Gen hergestellt und die Aliquots bei -20°C gelagert.

4.4.7 Auswertung der kompetitiven RT-PCR

Die PCR-Produkte von Standard- und Zielsequenz wurden, wie in Abb 4.4 A dargestellt, über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf einem UV-Transilluminator photographiert und danach mit einem Scanner digitalisiert. Die Flächenintegrale der Fragmente wurden mit

dem Software Programm AIDA™ (AIDA evaluation software, Raytest, Straubenhardt, Deutschland) ermittelt und die graphische Auswertung mit Excel™ erfolgt. Wegen des Längenunterschiedes von Standard- und Zielfragment wird bei gleicher molekularer Konzentration weniger Ethidiumbromid im Standard als im Zielfragment interkaliert. Daher wurden die Flächenintegrale des Standards zunächst mit einem Färbefaktor korrigiert (Zielsequenz in bp/ Standardsequenz in bp). Wie Abb. 4.4 B zeigt, wurde dann der Logarithmus des Quotienten der Flächenintegrale aus korrigiertem Standard und Zielfragment gegen den Logarithmus der eingesetzten Standardmoleküle aufgetragen. Dabei muss beachtet werden, dass beim Standardfragment beide cDNA Stränge amplifiziert werden, während beim RNA/cDNA Hybrid des RT Produktes nur der cDNA Strang vervielfältigt wird. Daraus wie aus der Formel (4.3) ersichtlich, stellt b bei $x = 0$ (d.h. Standardsequenz = Zielsequenz) das gewünschte Ergebnis, nämlich die Anzahl der Zielsequenz-mRNA-Moleküle in der anfangs eingesetzten Gesamt-RNA, dar.

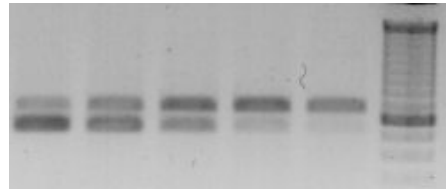
$$(4.3) \quad y = ax + b$$

4.5 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Molekülen entsprechend ihrem Molekulargewicht. Dazu wird die negative Ladung, die die DNA aufgrund der Phosphatgruppen besitzt zu Nutze gezogen. In einem elektrischen Feld wandert die DNA zur Anode hin. Wenn das Ganze durch ein Medium stattfindet in dem DNA-Stücke mit unterschiedlicher Länge unterschiedliche Geschwindigkeiten aufweisen, werden diese entsprechend ihren Molekulargewicht getrennt.

Das Agarosegel wurde durch Aufkochen von 1% w/v Agarose in 1x TBE-Puffer, Mischen auf einem Magnetrührer, Zugabe von Ethidiumbromid (1 µl/100 ml Gel-Lösung) und Gießen des Gels in eine Gelform mit einem Probenkamm vorbereitet. Die DNA-Proben wurden nach dem Zusatz von 1/10 Vol loading buffer aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde parallel ein Molekulargewichtsstandard, eine sog. DNA-Leiter aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte in einer mit TBE gefüllten Elektrophoresekammer in der ein elektrisches Feld mit einer Spannung zwischen 70 und 120 Volt (4 V/cm) appliziert wurde. Die DNA wurde im Agarosegel durch das Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

A



B

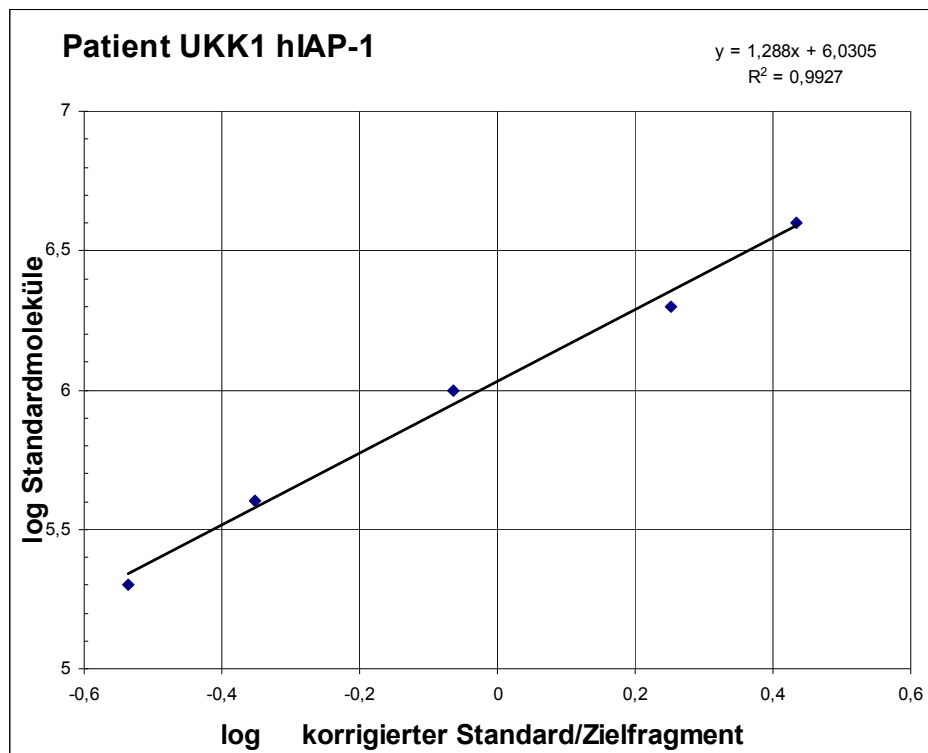


Abb 4.4 A. Ergebnis einer PCR. Wie in Abb 4.1 dargestellt abnehmende Standardkonzentration von links nach rechts. B. Ergebnis der gleichen PCR nach Densitometrie, bei $x=0$

4.6 Elution von cDNA Fragmenten aus Agarosegelen

Nach erfolgter DNA-Separation im Agarosegel wurde ein cDNA Segment mit der erwünschten Größe aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA daraus eluiert. Dafür können verschiedene Methoden verwendet werden

4.6.1 Elution über semipermeable Membran

Das ausgeschnittene Agarosegelstück wird in einem semipermeablen Dialyseschlauch (Spectra/Por® Membrane MWCO 1000, Spectrum Medical Industries, California, USA) mit TE Puffer eingebracht und in einer Elektrophoresekammer eingetaucht. Wie zuvor bei der Gelelektrophorese wird ein elektrisches Feld erzeugt (120V über 20 min), und die DNA wandert aus dem Gel Richtung Kathode im TBE Puffer und auf der semipermeablen Membran. Anschließend werden die Polen in der Elektrophoresekammer getauscht. Mit einer kurzzeitigen elektrischen Stromabgabe von wenigen Sekunden werden die DNA-Anteile, die an der Membran haften wieder im TBE Puffer abgegeben. Anschließend mit einer Pipette der TE Puffer mit der darin gelöster DNA in einem Reaktionsgefäß überführt. Danach wird die DNA gefällt.

4.6.2 DNA-Fällung

Im Reaktionsgefäß wurde 2,5 Vol Ethanol (oder 0,7 Vol Isopropanol) und 0,1 Vol 3M Ammoniumacetat hinzugefügt und gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde über 1h bei -70°C erhitzt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation über 40 Min bei 4°C. Der Überstand wurde abgesaugt und es erfolgten zwei Waschzyklen mit 70% Ethanol. Dabei wurden 500µl Ethanol hinzugefügt und der Ansatz über 20 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Nach dem zweiten Zyklus wurde das DNA-Pellet in ca 20µl sterilem H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

4.7 Klonierung der PCR Fragmenten

Um große Mengen an DNA aus PCR-Fragmenten zu erzeugen, kann man diese Fragmente durch Klonierung in bakterielle Plasmide einbringen und vermehren. Dabei muss das DNA – Fragment zuerst in einem Plasmid-Vektor ligiert und dieser danach in Bakterien transformiert werden.

Die Taq DNA Polymerase baut am 3'-Ende eines DNA Stranges ein zusätzliches Adenosin ein. Diese Eigenschaft wird benutzt für das sog. TA-Cloning. Hier wurde das pCR® II Dual Promoter Vector Kit (Invitrogen Corp.) benutzt. Der im Kit mitgelieferte linearisierte Vektor

besitzt Thymidin Enden, so daß es zu einer effektiven Insertion des PCR Fragments im Vektor kommen kann. Zur Ligation des PCR Produkts im linearisierten Vektor kam das Quick Stick[®] DNA Ligation Kit (Bioline) zum Einsatz. Dabei wurde eine rekombinante T4-DNA Ligase verwendet, die einer Inkubation über 5 Minuten bei Raumtemperatur benötigt.

Es wurde folgender Ansatz verwendet:

cDNA	40 ng
pCR [®] II Vector (molekulares Verhältnis PCR Produkt/Vektor ca 3/1)	100ng,
QS DNA Ligase	1 µl
4xQS Puffer	5µl
sterile Aq. bidest	ad 20µl

Der Ansatz wurde anschließend über 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz mit im Kit mitgelieferten kompetenten E.coli gemischt und die Zellsuspension über 1 h bei 37°C and 250rpm inkubiert.

Für das "blue white staining" wurden LB Agar Plates mit 50µg/ml Ampicillin vorbereitet und 40 µl of X-Gal Lösung (40mg/ml) and 40 µl IPTG Lösung (100mM) addiert. Anschließend wurden 300µl der Zellsuspension über die vorgewärmten LB Agar Platen verteilt und bei 37°C über 24 Stunden inkubiert. Von jeder Plate wurden dann 10 weisse Kolonien herausgepickt und in 5 ml LB-Medium (mit 100µg/ml Ampicillin) bei 37°C übernacht inkubiert. Im Folgenden wurde die Plasmid-DNA mittels einer Minipräp isoliert. Dafür wurde das Qiagen[®] Miniprep Kit verwendet. 12µg der Plasmid-DNA wurde dann mit 2µl des Restriktionsenzym EcoR1 (BioLab) geschnitten. Der pCR[®] II Vector weist zwei EcoR1 Restriktionsstellen auf (eine auf dem jeweiligen Ende der inserierten Sequenz). Anschließend wurden sieben Klone, die das zu erwartende Restriktionsmuster aufwiesen, sequenziert. (s. Kap. 4.9). Für die Sequenzierungsreaktion wurden 500ng ungeschnittene Plasmid DNA, 3µl Big Dye[®] und 5pg eines von zwei Primern (M13 reverse oder T7 primer) verwendet. Diese Primer erkennen die korrespondierende Promotorregionen, von denen jeweils eine Stromaufwärts und eine Stromabwärts der inserierten Sequenz im Vektor liegt. Gleichzeitig darf keine solche Restriktionsenzymstelle in der zu klonierende Sequenz beinhaltet sein. In

Abb. 4.5 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Sequenzierung des internen Standards für das Gen hIAP-1 dar.

Von den positiven Klonen wurden Bakterienstammlösungen zur weiteren Verwendung angefertigt (500µl Bakteriensuspension und 500µl steriles 50% Glycerol) und bei -20°C eingefroren.

4.8 Bakterienkulturen und Isolierung der Plasmid DNA

Zur Identifizierung der richtigen Klonen wurden 15µl der Bakteriensuspension in 3 ml LB-Flüssigmedium (mit 100 µg/ml Ampicillin, 50µg/ml Kanamycin) gegeben und bei 37°C und 200 min⁻¹ übernacht kultiviert. Anschließend wurde die DNA mittels einer Minipräparation mit JETquick Plasmid Mini Prep, (Genomed, Bad Oyenhausen) entsprechend der Herstellerangaben isoliert.

Bei der Produktion größerer Menge DNA Plasmids, wie bei der Herstellung der DNA Standards wurden 30 µl der Bakterienstammlösung in 50 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin, 50µg/ml Kanamycin) vermischt und bei 37°C und 200 min⁻¹ eine Übernachtskultur angesetzt. Anschließend wurde die Plasmid DNA mit Hilfe des Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

4.9 DNA Restriktion

Durch die DNA Präparation wurde die Plasmid DNA isoliert. Nur ein kleiner Teil dieses Plasmids aber entspricht die erwünschte DNA. Anschließend folgte also eine DNA Restriktion. Dabei wird die DNA innerhalb bzw. in der Nähe ihrer spezifischen Erkennungsequenz durch Restriktionsendonukleasen geschnitten. Durch die Auswahl bestimmter Restriktionsenzyme können definierte DNA-Fragmente erzeugt oder ein DNA Stück auf das Vorhandensein der entsprechenden Erkennungssequenzen untersucht werden. Durch Elektrophorese wurden die Produkte sichtbar gemacht und die erwünschte DNA Banden wurden anschließend eluiert und sequenziert. Der typische Restriktionsansatz:

DNA	zu schneidende Menge
10x Restriktionspuffer	1/10 des Ansatzvolumens
Restriktionsenzym	1 U/ μ g eingesetzter DNA
Steriles H ₂ O	zur Einstellung des Ansatzvolumens

Normalerweise wird 1 h bei 37°C mit 1 U/ μ g DNA verdaut. Um eine vollständige Restriktion sicherzustellen wurde der Ansatz 2h bei 37°C mit etwa 3 U/ μ l DNA inkubiert. Nach der Restriktion wurden die Restriktionsenzyme durch 2 minütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert. Danach wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt.

4.10 DNA Sequenzierung

Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung müssen die gewonnene DNA Fragmente sequenziert werden. Dabei findet eine Polymerasenkettenreaktion mit Farbstoffmarkierten Diphosphat Basen statt. Sobald eine Diphosphatbase am PCR Produkt integriert wird kann die Polymerase keine weiteren Basen entlang der Ziel-DNA anbinden, so entstehen unterschiedlich lange DNA Stücke, deren letzte Base markiert sind. Die Proben werden elektrophoretisch getrennt und durch ein Scanner werden die Sequenzen gelesen.

Zur DNA-Sequenzierung wurde ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit der Firma Amersham verwendet.

Es wurde folgender Ansatz vorbereitet:

Sequencing reagent pre-mix	8 μ l
DNA	5 μ l
Sterile Aq. Bidest	6 μ l
M 13 reverse primer (5pmol) oder T7 primer	1 μ l

Der Ansatz wird gemischt und in einem Thermocycler eingebracht. Dabei wurden 30 Zyklen mit 95°C über 40 sec, 50°C über 30sec, 60°C über 4 min programmiert.

Zu dem Ansatz wurden 7 μ l 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Vol Ethanol (96%) hinzugefügt und eine DNA Fällung durchgeführt (s. 4.5.2). Das Pellet wurde in 4 μ l loading dye aufgelöst. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben und die automatische Auswertung erfolgte

mit einem ABI Prism 373 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Weiterstadt) im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin-Luther Universität Halle Wittenberg (Dr. G. Kaltenborn) In Abb. 4.5 ist ein exemplarisches Ergebnis einer Sequenzierung.

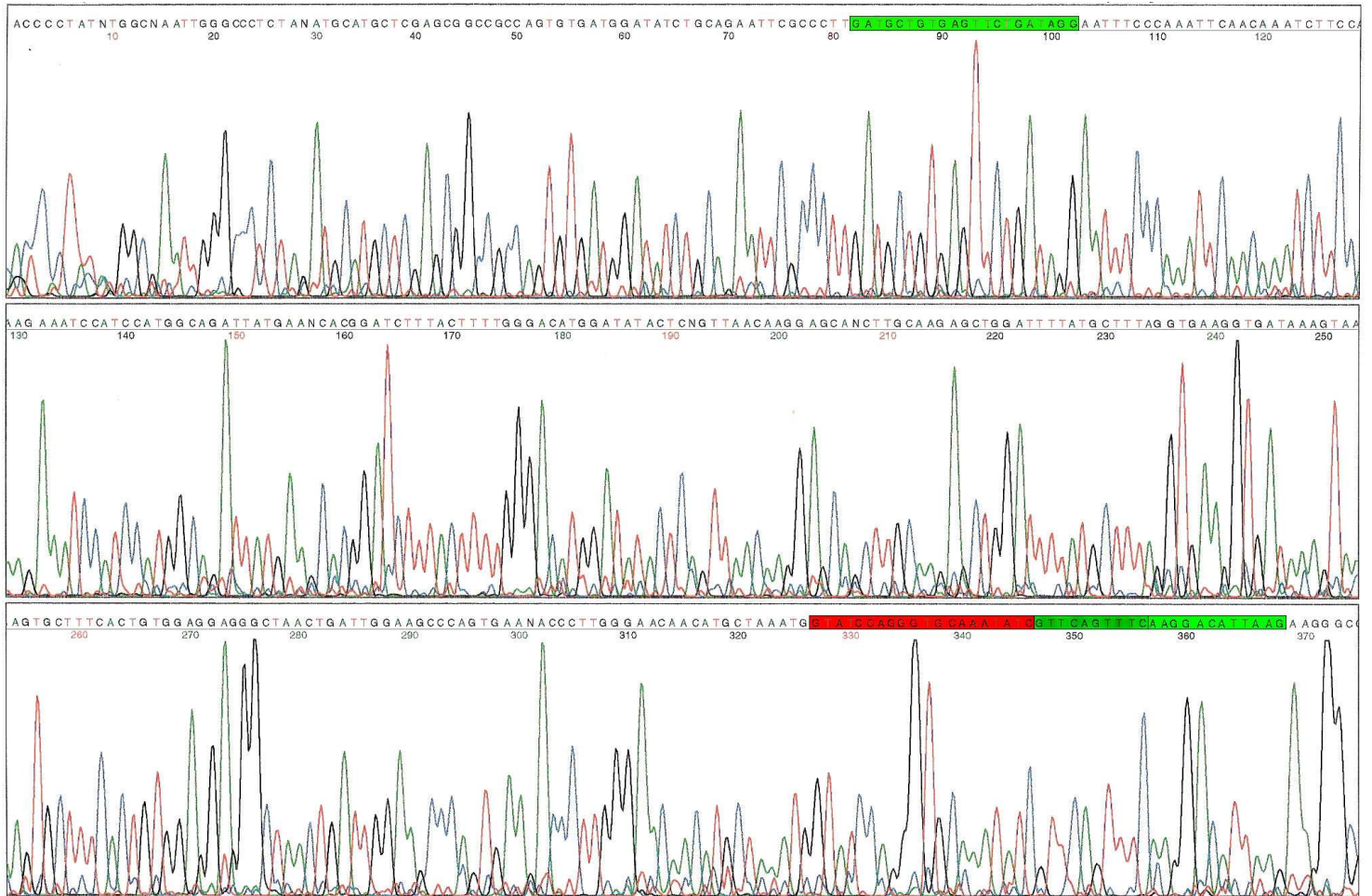


Abb. 4.5 Ergebnis der Sequenzierung des internen Standards für das Gen hIAP-1. Die Sequenzen der entsprechenden Primern wurden farblich verdeutlicht. (s. auch im Vergleich Abb 4.3 Reihe 4)